

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARCOS DE ABREU ALMEIDA

**VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
(*WESTERN BLOT*) PARA O DIAGNÓSTICO DA
HISTOPLASMOSE**

Rio de Janeiro

2014

**VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
(*WESTERN BLOT*) PARA O DIAGNÓSTICO DA
HISTOPLASMOSE**

MARCOS DE ABREU ALMEIDA

Dissertação apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosely Maria Zancopé Oliveira

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Lourenço Tavares de Andrade

Rio de Janeiro

2014

Dedico esta dissertação aos meus pais, Maria do Socorro e Manoel, meus grandes exemplos, pelo apoio e amor sem medida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai zeloso que me acompanhou em mais esta jornada. Obrigado Senhor, pela oportunidade e por todos os dons que me confiastes.

Aos meus pais, Maria do Socorro e Manoel, por serem meus grandes exemplos, pela minha educação, meus valores, por todo o esforço em proporcionar a mim e a minha irmã tudo aquilo que vocês não tiveram. E a minha irmã, Mayana, por ser a flor que chegou para colorir nossa família. Vocês são grandes merecedores desta nossa conquista.

À Dra Rosely Maria Zancopé Oliveira, minha orientadora, pela oportunidade dada há oito anos quando dei os primeiros passos na iniciação científica, por me proporcionar fazer parte desta equipe de profissionais os quais muito admiro, pelos ensinamentos, orientação e principalmente por todas as vezes que fui a sua sala, desmotivado, preocupado e de lá saí com a certeza de que tudo daria certo. Obrigado pelo incentivo e confiança.

À Dra Carla Lourenço Tavares de Andrade, pela co-orientação. Obrigado por topar seguir conosco nesta jornada.

À Dra Cláudia Vera Pizzini, por suas colocações brilhantes, sugestões e colaboração no decorrer da realização deste trabalho. Obrigado ainda pelos primeiros ensinamentos, desde a minha iniciação científica, pela amizade e pelas boas risadas, rs.

À Dra Regina Helena Saramago Peralta, pela disponibilidade e valiosa colaboração na realização da purificação e tratamento do antígeno utilizado nestas análises, e por ter aceitado fazer a revisão desta Dissertação e participar da Banca Examinadora.

Ao Dr José Mauro Peralta, por sempre me receber de portas abertas em seu laboratório, pelos conhecimentos compartilhados e por ter aceitado fazer parte da Banca Examinadora. Obrigado a toda a sua equipe, em especial ao Dr Jorge Gonçalves.

Ao Dr Dayvison Francis Saraiva Freitas, pelo exemplo de dedicação em aprender novas metodologias, pelo incentivo na realização deste trabalho e pela atenção dispensada ao aceitar avaliar este trabalho.

À Dra Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, que gentilmente nos auxiliou na realização das análises estatísticas desta pesquisa.

Ao Dr Mauro de Medeiros Muniz, "meu chefe", pelo incentivo de sempre, pelo bate-bola diário na discussão de metodologias e resultados. Ah, e obrigado por lapidar o meu linguajar científico, rsrs.

Aos grandes companheiros de Laboratório, Manoel, Rodrigo, Helena, Mônica, Rowena, Fábio, Fernando, Victor, Leonardo, Luã, Lisandra, Gabriela, Gabriella e Vanessa, pelo apoio, companheirismo e incentivo de sempre.

À aqueles que hoje não fazem parte mais de nossa equipe diária de trabalho, mas que são grandes incentivadores, os doutores Allan Guimarães e Priscila Albuquerque.

Aos meus amigos-irmãos, que sonharam esse mestrado comigo desde antes do processo seletivo. Obrigado pelo incentivo de TODOS os dias, os de alegria e principalmente os dias difíceis... seus ouvidos são santos. Amo a cada um do tamanho do universo - Aline, Danda, André, Cris, Mi, MV, Rachel, Rodrigo e Rose.

Aos grandes amigos, Gustavo, que divide comigo a dor e a alegria de ser um mestrando, Bruno, Binho, Maiza, Denise, Rosana e Vanessa, meus anjos sem asas. O apoio e incentivo de vocês foram fundamentais neste período.

Ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, pelo estímulo e pelos ensinamentos. E a todos os funcionários deste Curso, em especial à Priscila Sá, secretária da Pós-graduação, pela atenção, eficiência e por estar sempre pronta a nos ajudar.

Aos meus colegas de turma, pelo agradável convívio durante todo nosso período de disciplinas, e em especial as gratas surpresas, minhas novas amigas, Carla Ribeiro, Lisandra Serra e Maria Odete.

Ao CNPq, à FAPERJ e ao PAPES VI-Fiocruz, pelo suporte financeiro deste projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e concretização desta conquista. Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência.

“Todos os dons que me destes, com gratidão vos devolvo...”

Santo Inácio de Loyola

Almeida, M.A. **Validação de ensaio imunoenzimático (*Western blot*) para o diagnóstico da histoplasmose**. Rio de Janeiro, 2014. 97 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

A histoplasmose é uma micose cosmopolita causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, cujo habitat é o solo rico em excretas de aves e morcegos. Esta infecção ocorre a partir da inalação de propágulos de *H. capsulatum* e apresenta um amplo espectro clínico, variando de formas leves a disseminadas, a depender do inóculo infectante, do *status* imunológico do hospedeiro e da virulência da cepa. O diagnóstico da histoplasmose é baseado em aspectos clínicos, epidemiológicos, radiológicos e laboratoriais, embora alguns sintomas possam ser confundidos com outras doenças, tais como a tuberculose e outras micoses. O teste de referência para a confirmação do diagnóstico é o isolamento e identificação de *H. capsulatum* em cultivo. Entretanto, na ausência dos mesmos, a sorologia tem sido utilizada para o diagnóstico presuntivo da histoplasmose através da detecção de anticorpos. O principal complexo antigênico utilizado para a detecção de anticorpos anti-*H. capsulatum* é a histoplasmina, constituída principalmente pelos antígenos C, H e M. Estes últimos, em sua forma nativa, são glicoproteínas contendo epítomos protéicos específicos e glicosídicos inespecíficos. Deglicosilações químicas pelo metaperiodato de sódio (NaIO₄) provaram aumentar a sensibilidade e especificidade em métodos imunoenzimáticos, tais como *Western blot* e ELISA, reduzindo a reatividade cruzada com outros fungos. O principal objetivo do presente estudo foi validar o método imunoenzimático (*Western blot*) para a detecção de anticorpos no diagnóstico da histoplasmose. Desta forma, foi realizado um estudo caso-controle, utilizando 118 amostras de soro de pacientes com histoplasmose e 118 amostras de soro de indivíduos com história clínico-epidemiológica compatível com micose sistêmica, saudáveis ou acometidos por outra micose ou tuberculose, residentes no estado do Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas no período de 2000 a 2013 e encaminhadas ao Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Os parâmetros de validação diagnóstica foram calculados considerando a categorização dos resultados obtidos em uma tabela 2 X 2 e analisados pelo SPSS 17.0. O *Western blot* demonstrou uma sensibilidade de 94,9%, especificidade de 94,1%, acurácia de 94,5% e uma precisão quase perfeita. As fitas demonstraram-se viáveis para utilização por até cinco anos após a sensibilização com o antígeno HMIN-PT. Estes resultados comprovam a validade do ensaio imunoenzimático (*Western blot*) para detecção de anticorpos anti-*H. capsulatum* utilizando HMIN-PT como uma ferramenta de boa acurácia no diagnóstico da histoplasmose e reprodutível. Desta forma, contribuindo para o melhoramento do diagnóstico desta micose, uma vez que esta técnica permitirá a obtenção de resultados em menos de 24 horas, o que supõe um grande avanço a despeito das técnicas existentes na atualidade e poderá vir a ser implantada e disponibilizada para outros centros do Sistema Único de Saúde.

Palavras-chave: 1. Histoplasmose 2. Imunodiagnóstico 3. *Western blot*

Almeida, M.A. **Validation enzyme immunoassay (Western blot) for the diagnosis of histoplasmosis.** Rio de Janeiro, 2014. 97 p. Dissertation [Science Dissertation in Clinic Research in Infection Diseases] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a worldwide systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. The fungus lives in soil that contains large amounts of birds or bats droppings. This infection occurs through inhalation of spores of *H. capsulatum* and has a wide clinical spectrum, ranging from mild to disseminated forms that depend on the infecting inoculum, the immune status of the host and the virulence of the strain. The diagnosis of histoplasmosis is based on clinical, epidemiological, radiological and laboratory aspects; however, some symptoms may be confused with other diseases, such as tuberculosis and other mycoses. The reference test for the confirmation of the diagnosis of histoplasmosis is the isolation and identification of *H. capsulatum* in culture. However, in the absence of it, serology has been used for the presumptive diagnosis of histoplasmosis through antibody detection. The principal antigenic complex used to detect antibodies anti-*H. capsulatum* is the histoplasmin, consisting mainly of antigens C, H and M. These antigens, in their native forms, are glycoproteins containing specie-specific protein epitopes and non-specific glycosides. Chemical deglycosylations by sodium metaperiodate (NaIO₄) have shown to increase the sensitivity and specificity of immunoenzymatic methods, such as Western blot and ELISA, reducing cross-reactivity with other fungi. The aim of this study was to validate the immunoassay method (Western blot) to detect antibodies in the diagnosis of histoplasmosis. Therefore, a case-control study was conducted using 118 serum samples from patients with histoplasmosis, and 118 serum samples from individuals with clinical and epidemiological history compatible with systemic mycosis, either healthy or suffering from other mycosis or tuberculosis. These patients were residents in the state of Rio de Janeiro and the samples, collected from 2000 to 2013, were sent to the Mycology Laboratory of the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Diagnostic validation parameters were calculated based on the categorization of results obtained in a 2 x 2 table and analyzed using SPSS Statistics 17.0. The Western blot was shown sensitivity of 94.9%, specificity of 94.1%, accuracy of 94.5% and also almost perfect precision. Besides, the strips have been proved to be viable for use or at least five years after the sensitization with antigen HMIN-PT. These results prove the validity of the enzyme immunoassay (Western blot) for the detection of antibodies anti-*H. capsulatum*, using HMIN-PT as a good accuracy tool in the diagnosis of histoplasmosis and reproducible, contributing to improve the diagnosis of this mycosis, since this technique allows obtaining results in less than 24 hours which implies a breakthrough despite existing at present and will eventually be deployed and made available to other centers belonging to the Public Health System.

Keywords: 1. Histoplasmosis 2. Immunodiagnostic 3. Western blot.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Histoplasma capsulatum</i> (Fase filamentosa).....	17
Figura 2: <i>Histoplasma capsulatum</i> (Fase leveduriforme).....	17
Figura 3: Distribuição da histoplasmose no Brasil indicada por meio de inquéritos de reatividade intradérmica à histoplasmina.....	24
Figura 4: Demonstração da reatividade da histoplasmina frente a soro policlonal anti- <i>H. capsulatum</i> pelo método da imunodifusão dupla.....	59
Figura 5: Demonstrativo da reatividade dos soros frente ao antígeno histoplasmina pela técnica de imunodifusão dupla de Ouchterlony.....	61
Figura 6: Demonstrativo da reatividade dos soros frente ao antígeno HMIN-PT pelo método de <i>Western blot</i>	65
Figura 7: Análise da viabilidade das membranas.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características sociais e clínico-laboratoriais dos pacientes casos de histoplasmose.....	57
Tabela 2: Características clínico-sociais do grupo controle.....	58
Tabela 3: Tabela 2X2 para avaliação de desempenho do teste de <i>Western blot</i>	62
Tabela 4: Características de desempenho do teste de <i>Western blot</i>	62
Tabela 5: Classificação dos índices de concordância pelo coeficiente <i>Kappa</i>	63
Tabela 6: Resultados do desempenho dos testes sorológicos para detecção de anticorpos contra <i>Histoplasma capsulatum</i>	64

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Distribuição do número de pacientes estudados com diagnóstico provado e provável no INI Evandro Chagas no período de 2000-2013.....56
- Gráfico 2:** Sítio do espécime clínico onde houve a confirmação do diagnóstico de histoplasmose por cultura ou exame histopatológico.....58
- Gráfico 3:** Cromatograma da purificação do antígeno histoplasmina.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AUC – Área sob a curva (*Area under the curve*)
- BCIP – Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*)
- BHI – Infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*)
- BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)
- CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CBP – Proteína de ligação de cálcio (*Calcium Binding Protein*)
- CD4+ – Linfócitos T CD4
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- CYTED – Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (*Programa Ibero-Americano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ELISA – Ensaio enzimático por imunoabsorção (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- EORT/MSG – *Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group - Consensus Group.*
- FN – Falso negativo
- FP – Falso positivo
- GMS – Grocott metenamina de prata (*Grocott's Methenamine Silver*)
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana adquirida (*Human Immunodeficiency Virus*)
- HMIN – Histoplasmina
- HMIN-P – Histoplasmina purificada
- HMIN-PT – Histoplasmina purificada e deglicosilada
- HPA – Antígeno polissacáride de *H. capsulatum*
- HSP – Proteína de choque térmico (*Heat Shock Protein*)
- IC – Intervalo de confiança
- ID – Imunodifusão dupla de Ouchterlony
- IFN- γ - Interferon gama
- IgG – Imunoglobulina de classe G
- IgM – Imunoglobulina de classe M
- IL - Interleucina
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ITS – Espaços internos transcritos (*Internal Transcribed Spaces*)

LBA – Lavado broncoalveolar

mAb – Anticorpo monoclonal

MICOMOL – Rede Iberoamericana de diagnóstico molecular das micoses sistêmicas e oportunistas (*Red Iberoamericana de Diagnóstico Molecular de las Micosis Sistemicas y Oportunistas*)

NBT – Azul de nitro tetrazolio (*nitro blue tetrazolium*)

PAS – Ácido periódico de Schiff

PBS – Tampão salina fosfato (*Phosphate buffer saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)

PDA – Ágar batata dextrose (*Potato Dextrose Agar*)

PM – Peso molecular

RFC – Reação de fixação de complemento

RIA – Radioimunoensaio

SDS – Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

SUS – Sistema Único de Saúde

TBS – Salina tamponada com Tris (*Tris buffer saline*)

TBS-T – Salina tamponada com Tris, acrescida de *Tween 20*

TBS-TL – Salina tamponada com Tris, acrescida de *Tween 20* e leite desnatado

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (*Tumoral necrosis factor alpha*)

UAg EIA – ELISA para detecção de antígeno na urina

UFF – Universidade Federal Fluminense

VN – Verdadeiro negativo

VP – Verdadeiro positivo

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

WB – *Western blot*

YPS – Gene específico da fase leveduriforme (*Yeast Phase Specific Gene*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	HISTÓRICO	15
1.2	CARACTERÍSTICAS DO AGENTE	16
1.3	ECOLOGIA	18
1.4	EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.4.1	Histoplasmose no Mundo	19
1.4.2	Histoplasmose no Brasil	23
1.4.3	Histoplasmose no estado do Rio de Janeiro	27
1.5	PATOGENIA	28
1.6	INFECÇÃO POR <i>Histoplasma capsulatum</i>	30
1.7	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	31
1.8	DIAGNÓSTICO	33
1.8.1	Diagnóstico micológico	33
1.8.2	Diagnóstico histopatológico	35
1.8.3	Teste do exoantígeno	35
1.8.4	Diagnóstico imunológico.....	36
1.8.4.1	Detecção de anticorpos.....	36
1.8.4.2	Detecção de antígeno.....	39
1.8.5	Diagnóstico molecular.....	42
1.9	TESTE INTRADÉRMICO.....	44
1.10	HISTOPLASMINA	44
2.	JUSTIFICATIVA	46
3.	OBJETIVO.....	48
3.1	OBJETIVO GERAL.....	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4.	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	DESENHO DO ESTUDO	49
4.2	CASUÍSTICA.....	49
4.3	MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS	50
4.3.1	Antígenos.....	50
4.3.1.1	Produção do antígeno histoplasmina (HMIN).....	50
4.3.1.2	Purificação da HMIN por cromatografia de troca catiônica.....	51
4.3.1.3	Processo químico de deglicosilação da HMIN.....	51
4.3.1.4	Produção de antígenos filtrados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	51
4.3.2	Dosagem de proteínas.....	52
4.3.3	Imunodifusão Dupla de Ouchterlony.....	52
4.3.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	53
4.3.5	Western blot	54
4.4	ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS FITAS	55
4.5	PLANO DE ANÁLISE.....	55
4.6	ASPECTOS ÉTICOS	55
5.	RESULTADOS	56

5.1	CASUÍSTICA.....	56
5.2	ANTÍGENOS	59
5.3	PURIFICAÇÃO DA HMIN POR CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIONICA E DEGLICOSILAÇÃO PELO NaIO ₄	59
5.4	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	60
5.5	IMUNODIFUSÃO DUPLA DE OUCHTERLONY.....	60
5.6	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO <i>Western blot</i>	61
5.7	ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS FITAS	66
6.	DISCUSSÃO	67
7.	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	91
	ANEXO I – Parecer consubstanciado do CEP	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A histoplasmose foi descoberta por Samuel Taylor Darling em 1905 na região do canal do Panamá, estudando material de autópsia de um homem negro, adulto, proveniente da Martinica, com doença febril e hepatomegalia. Ao exame microscópico de fragmentos de fígado, baço e pulmão foram evidenciados parasitos intracelulares, de forma muito semelhante às leishmanias, no entanto apresentava uma cápsula. Durante sua pesquisa, achou se tratar de um novo protozoário, o qual denominou *Histoplasma capsulatum*. No ano seguinte estudou mais dois casos fatais de histoplasmose: outro homem negro proveniente da Martinica e um trabalhador chinês que vivia no Panamá há 15 anos (DARLING, 1906).

O agente etiológico, inicialmente designado como um protozoário foi considerado um fungo por Henrique da Rocha Lima, estudante brasileiro, em 1912, ao rever o material estudado por Darling (ROCHA-LIMA, 1912).

O primeiro diagnóstico de histoplasmose, em uma pessoa viva, foi realizado por Dood em 1934 (DODD; TOMPKINS 1934) e sua natureza fúngica foi confirmada após obtenção de cultivos a partir de material clínico por De Monbreum nos Estados Unidos em 1934, quando se reconheceu seu caráter dimórfico (DE MONBREUM, 1934).

Histoplasma capsulatum foi isolado a partir de amostras de solo pela primeira vez por Emmons (1949). Esse solo foi obtido de um galinheiro, demonstrando que esta é a fonte de infecção mais importante para o homem e para os animais. Pouco tempo depois, foi reconhecida a associação do fungo com ambientes contaminados por excretas de aves e morcegos (AJELLO; ZEIDBERG 1951). No Brasil, o primeiro caso de histoplasmose foi relatado por Almeida e Lacaz em 1939, ao isolarem *H. capsulatum* a partir de um fragmento de biópsia de uma lesão de cromomicose.

1.2 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

Histoplasma capsulatum é um eucarioto pertencente ao reino Fungi, encontra-se no filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Onygenacea, gênero *Histoplasma* (*Ajellomyces*), espécie *Histoplasma capsulatum*, englobando três variedades distintas: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente da histoplasmose capsulata ou clássica, *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, agente etiológico da linfangite epizoótica dos equinos (HIBBETT et al. 2007). *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* é a de maior importância em nosso meio devido a sua distribuição geográfica, e a responsável pela histoplasmose nas Américas. Estudos de filogenia têm definido ao menos oito clados de *H. capsulatum*: Nam 1 (North American class 1), Nam 2 (North American class 2), Lam A (Latin American group A), Lam B (Latin American group B), Australian, Netherlands (Indonesian), Eurasian e African (KASUGA et al. 2003)

Trata-se de um fungo dimórfico, encontrado na natureza (saprofitismo) sob a forma filamentosa ou quando cultivado a temperaturas abaixo de 35°C e nos tecidos como levedura (parasitismo) ou quando cultivados a 37°C (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013). Em temperaturas inferiores a 35°C, *H. capsulatum* se apresenta como colônias brancas a acastanhadas, algodonosas, microscopicamente caracterizado por hifas hialinas, septadas, ramificadas e de morfologia típica, representada por macroconídios, medindo de 8 a 16µm de diâmetro, geralmente esféricos, inicialmente de parede lisa, desenvolvendo com o envelhecimento da colônia, projeções semelhantes a tubérculos, e ainda microconídios ovais com diâmetros de dois a cinco micrômetros, de paredes lisas, como pode ser visto na Figura 1. Estes últimos são as partículas infectantes deste fungo para os homens e animais suscetíveis (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013).

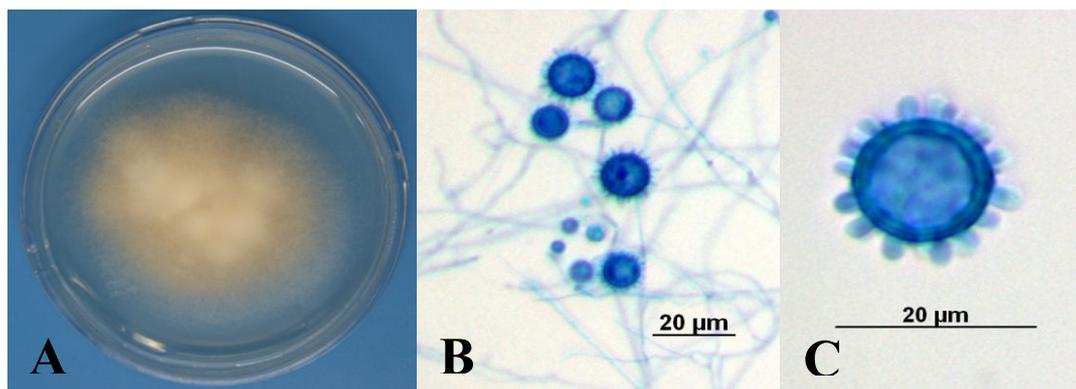


Figura 1: *Histoplasma capsulatum* (Fase filamentosa). (A) Cultivo da fase filamentosa. (B) e (C) Aspectos microscópicos da fase filamentosa com micro e macroconídios característicos. Corados por lactofenol azul de algodão. 40 e 100X.
Fonte: Elaboração própria.

Em parasitismo, ou a partir de espécimes clínicos cultivados a 37°C em meios de cultura apropriados, *H. capsulatum* se apresenta como colônias de aspecto úmido, lisa e de coloração branco-amarelada. Microscopicamente se mostra como pequenas leveduras, medindo de dois a quatro micrômetros de diâmetro, esféricas ou ovais, de paredes finas e unibrotantes, como demonstrado na Figura 2 (ZANCOPE-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013).

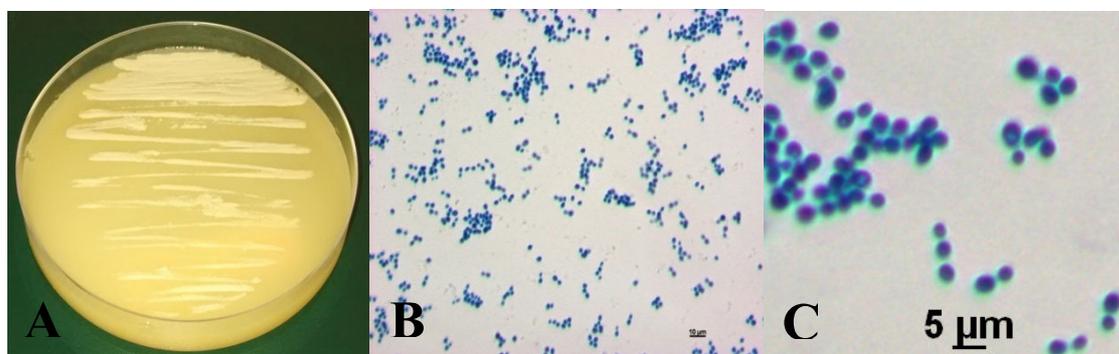


Figura 2: *Histoplasma capsulatum* (Fase leveduriforme). (A) Cultivo da fase leveduriforme. (B) e (C) Aspectos microscópicos da fase leveduriforme com leveduras unibrotantes. Corados por lactofenol azul de algodão. 10 e 40X.
Fonte: Elaboração própria.

A parede celular de *H. capsulatum* é formada principalmente por quitina, α -1,3 glucana e β -1,3-glucana. A quantidade de quitina é superior neste fungo, quando comparado com outros fungos dimórficos. Entretanto, existem diferenças na composição de glucanas nas duas fases: α -1,3 glucana é o principal componente da fase leveduriforme, enquanto que na fase filamentosa é β -1,3-glucana (HEARN, 1997). A presença de altos níveis de α -1,3 glucana está associada com a virulência do isolado

(RIPPON, 1988), no entanto, Hearn (1997) sugere a possibilidade de um mesmo isolado passar do fenótipo α -1,3 glucana (+) para α -1,3-glucana (-), o que explicaria a existência das formas crônica e latente da histoplasmose.

1.3 ECOLOGIA

Histoplasma capsulatum é um fungo dimórfico, encontrado no meio ambiente na forma filamentosa, como saprófita de solos enriquecidos com matéria orgânica como fezes galinhas, outras aves e morcegos. Esta relação é devida ao alto teor de ácido úrico encontrado nestes excrementos, sendo este componente utilizado como fonte de nitrogênio pelo *H. capsulatum*, imprescindível ao seu crescimento e proliferação. Além disso, tais micro nichos geralmente apresentam condições de temperatura, umidade, e acidez do solo, ideais à sobrevivência deste microrganismo (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE 1986; CANO; HAJJEH 2001).

Cavernas, construções antigas ou abandonadas, forros, sótãos ou porões de casa, galinheiros, árvores ocas e campos cultiváveis são importantes fontes de infecção. Além disso, a própria movimentação do solo proporciona a dispersão dos microconídios pelo ar. Um grama de solo contaminado pode conter até seis mil propágulos fúngicos infectantes (LONDERO; WANKE 1988).

Dos vários animais suscetíveis à infecção, o morcego exerce também o papel de disseminador do fungo na natureza, devido ao intenso parasitismo das células de sua mucosa intestinal, que apresentando lesões, acabam por excretar o fungo nas suas fezes, desempenhando um importante papel na manutenção do ciclo biológico de *H. capsulatum* na natureza (TAYLOR et al. 2000; DIAS et al. 2011). A infecção por *H. capsulatum* já foi detectada em várias espécies de animais, dentre eles, cães, felinos, roedores, primatas, quirópteros, marsupiais, equinos e aves (LARSH, 1975; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE 1986; TAYLOR et al. 1996; CANO; HAJJEH 2001; ESPINOSA-AVILÉS 2008; REYES-MONTES 2009; CANTEROS et al. 2010; QUIST et al. 2011).

Em 2005, uma lontra marinha (*Enhydra lutris kenyoni*) foi encontrada na Ilha Kodiak, no Alasca, a 57° de latitude norte, fora da área de distribuição conhecida de *H. capsulatum*. O animal veio a morrer de histoplasmose disseminada, onde microrganismos compatíveis com *H. capsulatum* foram observados na histopatologia, e identificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento. Os autores

sugerem que aves marinhas migratórias ou transmissão por aerossol através dos ventos pode ter resultado na transmissão para a lontra do mar, uma vez que este não é um animal migratório. Este foi o primeiro relato de histoplasmose em seres humanos ou animais selvagens no Alasca, e também em um mamífero marinho livre na natureza (BUREK-HUNTINGTON; GILL; BRADWAY 2014).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

1.4.1 Histoplasmose no Mundo

A histoplasmose é epidemiologicamente importante devido a sua distribuição mundial (KAUFFMAN, 2008), com uma ampla distribuição geográfica, tendo sido descritos casos autóctones em todos os continentes, em mais de 60 países (NEGRONI, 2005). No entanto, apresenta nítido predomínio nas Américas, leste da Ásia e Oceania e na África Subsaariana (FARINA et al. 2005).

A variedade de *H. capsulatum* pode ser diferente de acordo com o local estudado. Duas variedades de *H. capsulatum* são patogênicas para o homem: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, mais encontrada no continente americano e *H. capsulatum* var. *duboisii*, encontrado nos continentes africano e europeu (WHEAT et al. 2004; KAUFFMAN, 2007; DE DEUS FILHO et al. 2009). Esta distribuição está associada a diversos fatores, ratificando a ideia de que o clima moderado, a umidade e as características do solo colaboram para caracterizar uma área como endêmica para *H. capsulatum* (KAUFFMAN, 2007).

A histoplasmose é uma das micoses de maior importância no continente americano devido a sua endemicidade, sendo a região central dos Estados Unidos uma das áreas com maior concentração de indivíduos infectados naquele país.

A maioria dos conhecimentos sobre a epidemiologia da histoplasmose tem origem em investigações realizadas durante surtos epidêmicos, que em geral ocorrem quando um pequeno número de indivíduos é exposto ao mesmo tempo a um grande número de partículas infectantes em suspensão em uma área de solo contaminado (FERREIRA; BORGES 2009).

Numerosos surtos de histoplasmose são associados a visitas a cavernas, onde habitam morcegos e *H. capsulatum* tem sido isolado com frequência em suas excretas.

O primeiro surto relatado de histoplasmose ocorreu em 1948 no Estado de Arkansas, nos Estados Unidos e foi associado à exploração de cavernas (WASHBURN; TUOHY; DAVIS 1948).

Em 1955, foi descrita uma epidemia de histoplasmose na Venezuela entre exploradores de cavernas, onde *H. capsulatum* foi isolado do solo e os trabalhadores tiveram sorologia positiva por reação de fixação de complemento (RFC) e testes cutâneos com histoplasmina (CAMPINS et al. 1956).

Em Illinois, nos EUA, quatro trabalhadores revolvendo pilhas de fezes de morcegos no sótão de um prédio de mais de 100 anos, infestado por morcegos marrons (*Eptesicus fuscus*), fizeram com que a poeira se espalhasse pelo ar. Sete a dez dias depois, os quatro trabalhadores desenvolveram sintomas compatíveis com histoplasmose e apresentaram resultados positivos nas sorologias (reação de fixação de complemento com títulos de 1:32 e imunodifusão dupla (ID) com detecção de linhas M e/ou H) e ainda, achados radiológicos compatíveis. Foram estudados ainda um total de 73 indivíduos que haviam visitado o edifício, levando à descoberta de 16 novos casos de histoplasmose pulmonar aguda, identificada com base em sorologias positivas e sintomas compatíveis. *Histoplasma capsulatum* foi isolado do escarro de um paciente e a partir do solo do edifício onde os morcegos foram encontrados no sótão (BARTLETT et al. 1982).

No México, em 1988, foi descrito um surto de histoplasmose pulmonar aguda em três membros de uma família do Novo México que apresentaram sintomas compatíveis com a doença e que recentemente visitara um celeiro abandonado em Iowa, um dos 50 Estados dos Estados Unidos, localizado na Região Centro-Oeste do país (FUORTES; HAYES 1988).

Em junho de 1994, ocorreu um surto de histoplasmose pulmonar aguda em uma penitenciária que passava por reforma, no estado da Virgínia - EUA, e foram identificados 151 casos de histoplasmose pulmonar aguda. A confirmação do diagnóstico foi obtida por cultura e exame histopatológico realizados em dois pacientes, e nos demais, por observação de títulos de anticorpos iguais ou maiores que 1:32 na RFC e/ou por detecção de anticorpos pelo método da ID (HAJJEH et al. 1995). Foram analisadas ainda 40 amostras de soro destes pacientes, pelo método de *Western blot*, utilizando o mesmo antígeno empregado em nosso estudo de validação deste ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da histoplasmose. No estudo desenvolvido pelo

nosso grupo, obteve-se uma sensibilidade de 45,0-100%, a depender do tempo de infecção, e especificidade de 78,0%, quando analisados com o antígeno histoplasmina purificado e sensibilidade de 90,0-100% e especificidade de 100%, quando utilizado o antígeno histoplasmina purificado e deglicosilado. Os valores variaram de acordo com a forma clínica da doença, aguda ou convalescente (PIZZINI et al. 1999).

Na Europa existem relatos de casos de histoplasmose, no entanto, na maioria das vezes estão relacionados a indivíduos com passagens por áreas endêmicas (FLOR et al. 2003; ASHBEE et al. 2008; BUITRAGO et al. 2011). Em 1997, Nasta e colaboradores reportaram quatro casos de histoplasmose pulmonar aguda em italianos, exploradores de cavernas, ao retornarem do Peru.

No Japão, em 2001, foi descrito um relato de caso de histoplasmose pulmonar aguda associada à visita a cavernas em dois japoneses que retornaram de Yucatan, um dos 31 Estados do México, após trabalharem em uma caverna infestada de morcegos por cerca de três semanas. E ainda, quase todos os seus colegas de trabalho haviam desenvolvido tosse, febre e dor de cabeça após cinco dias de trabalho na caverna (HATAKEYAMA et al. 2001).

Durante a primavera de 2001, estudantes universitários da Pensilvânia apresentaram uma doença respiratória febril aguda após voltarem das férias de Acapulco, México, com o diagnóstico presuntivo de histoplasmose pulmonar aguda. Um estudo inicial constatou que o local provável de exposição a *H. capsulatum* foi o Hotel H, por isso se realizou um estudo de coorte entre os viajantes que ficaram hospedados neste hotel. Das 273 amostras de soro testadas, 148 (54,0%) foram positivas nas técnicas de ID e/ou RFC. *Histoplasma capsulatum* foi isolado de amostras ambientais coletadas neste hotel pelo método de inoculação intraperitoneal em camundongos e o uso frequente das escadas do Hotel H, onde havia uma construção em curso, foi associado com o risco aumentado de infecção por este fungo (MORGAN et al. 2003).

Dois surtos de histoplasmose, envolvendo 51 pessoas, ocorridos entre outubro de 1998 e abril de 1999, em uma caverna na Costa Rica foram descritos por Lyon e colaboradores (2004). No primeiro grupo, 44 de 75 pessoas foram diagnosticadas com histoplasmose aguda. No segundo grupo com 14 turistas dos Estados Unidos e Canadá, 9 apresentaram a infecção.

Um estudo realizado por Gutierrez e colaboradores (2005) de 1997 a 2003, em uma região do Panamá, demonstrou que dos 2.379 pacientes admitidos na enfermaria de

aids do hospital em estudo, 182 pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) ou com aids apresentaram cultura positiva para *H. capsulatum*.

Foram relatados ainda outros dois surtos em Illinois, um em 2001 e outro em 2003. Em 2001, oito entre 11 trabalhadores que revolveram solo de um galpão que havia sido usado como depósito de alimentos para animais e grãos apresentaram anticorpos circulantes contra *H. capsulatum* detectados pelas técnicas de imunodifusão dupla e reação de fixação de complemento. E em 2003, seis de 12 trabalhadores apresentaram diagnóstico de histoplasmose pelas mesmas técnicas após trabalharem na reconstrução de uma ponte, onde havia guano de morcegos (HUHN et al. 2005).

Em 2006, Peters e colaboradores relataram que no período de 2000 a 2006 foram identificados na Holanda, 14 casos de pacientes com coinfeção HIV e histoplasmose. Embora este país não seja uma área endêmica desta micose, os médicos são mais preparados para encontrar casos de histoplasmose pelo crescente número de imigrantes soropositivos de áreas endêmicas de *H. capsulatum*, como a América do Sul e África.

Julg e colaboradores (2008) relataram três casos de pesquisadores que contraíram histoplasmose após exposição por aproximadamente uma hora e meia na entrada da caverna Tamana, no grupo de ilhas de Trinidad e Tobago para observação das espécies de morcegos locais.

Em 2008, Hoenigl e colaboradores relatam o caso de três viajantes austríacos apresentando febre, dispneia, dor torácica, cefaleia, artralgia e fadiga quatro semanas depois de visitarem uma caverna habitada por morcegos no México. Testes sorológicos demonstraram positividade para anticorpos IgM contra *H. capsulatum* nos três pacientes, no entanto, a metodologia empregada não foi descrita.

Um surto de histoplasmose foi associado com uma viagem para El Tamarindo, perto do Golfo do México, onde os indivíduos apresentaram sintomas clínicos depois de cavarem um buraco no chão, dentro de uma casa onde um tesouro havia sido supostamente enterrado. Neste local, *H. capsulatum* foi isolado em amostras de solo até dez centímetros abaixo da superfície (CORCHO-BERDUGO et al. 2011).

Santos e colaboradores (2013) relataram três casos de histoplasmose aguda em trabalhadores mexicanos envolvidos com limpeza de esgotos, expostos a guano de morcego. Foi relatada a detecção de altos títulos de anticorpos anti-*H. capsulatum* pelo método da precipitação em tubo e um dos indivíduos evoluiu para óbito 23 dias após a exposição.

Em estudo retrospectivo realizado na China, analisando o período entre 1990 e 2011, foram identificados 300 casos de histoplasmose neste país e 75,0% eram de regiões por onde passa o rio Yangtze. A maior parte dos casos foi considerada como infecções autóctones, devido à negação destes indivíduos de terem realizado viagens para fora da China. Destes, 43 pacientes tiveram histoplasmose pulmonar e 257 histoplasmose disseminada (PAN et al. 2013).

Recentemente, em Quebec, no Canadá, foram identificadas 14 pessoas com sintomas respiratórios entre 30 indivíduos potencialmente expostos à reforma de uma casa antiga, entre elas, trabalhadores envolvidos com a reforma e residentes da região. Foi então encontrada uma forte correlação entre a exposição à poeira da demolição contendo excretas de morcego ou pássaros e o diagnóstico de histoplasmose. Dos 14 casos descritos, 4 foram confirmados pela detecção de antígeno (1 no soro e 3 na urina) e os outros 10 casos foram considerados casos clínicos de histoplasmose pela presença de manifestações clínicas compatíveis e radiografia de tórax demonstrando anormalidades. No entanto, nenhum dos casos confirmados ou clínicos foram associados a algum indício de imunossupressão (CDC, 2014).

1.4.2 Histoplasmose no Brasil

A histoplasmose é uma das micoses sistêmicas mais comuns no Brasil, com uma prevalência bastante significativa, onde ocorre com maior frequência nas regiões sudeste, sul e nordeste (PRADO et al. 2009). Já foram relatadas microepidemias em oito estados brasileiros (Amazonas, Bahia, Minas Gerais, Paraíba, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) e no Distrito Federal, com isolamento no solo em seis deles: Distrito Federal, Paraíba, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (COLOMBO et al. 2011).

A distribuição de *H. capsulatum* no meio ambiente tem sido estudada, podendo ser enumerados os trabalhos referentes ao isolamento deste fungo do solo (ZANCOPE-OLIVEIRA; TAVARES; MUNIZ 2005), apesar de diversos inquéritos com o teste cutâneo usando histoplasmina revelarem uma prevalência bastante significativa da histoplasmose-infecção no Brasil (ZANCOPE-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013).

O isolamento de *H. capsulatum* no Brasil já foi descrito tanto em amostras ambientais, tais como em solo e aglomerados de fezes de morcegos, quanto de amostras

provenientes de animais silvestres e domésticos e do próprio homem (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE 1986; NAIFF et al. 1986).

Numerosos inquéritos epidemiológicos realizados no Brasil, através da reatividade intradérmica a histoplasmina, demonstraram expressivos índices de positividade da infecção nas diferentes regiões do país. Dados demonstrados na Figura 3 (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA 2006).

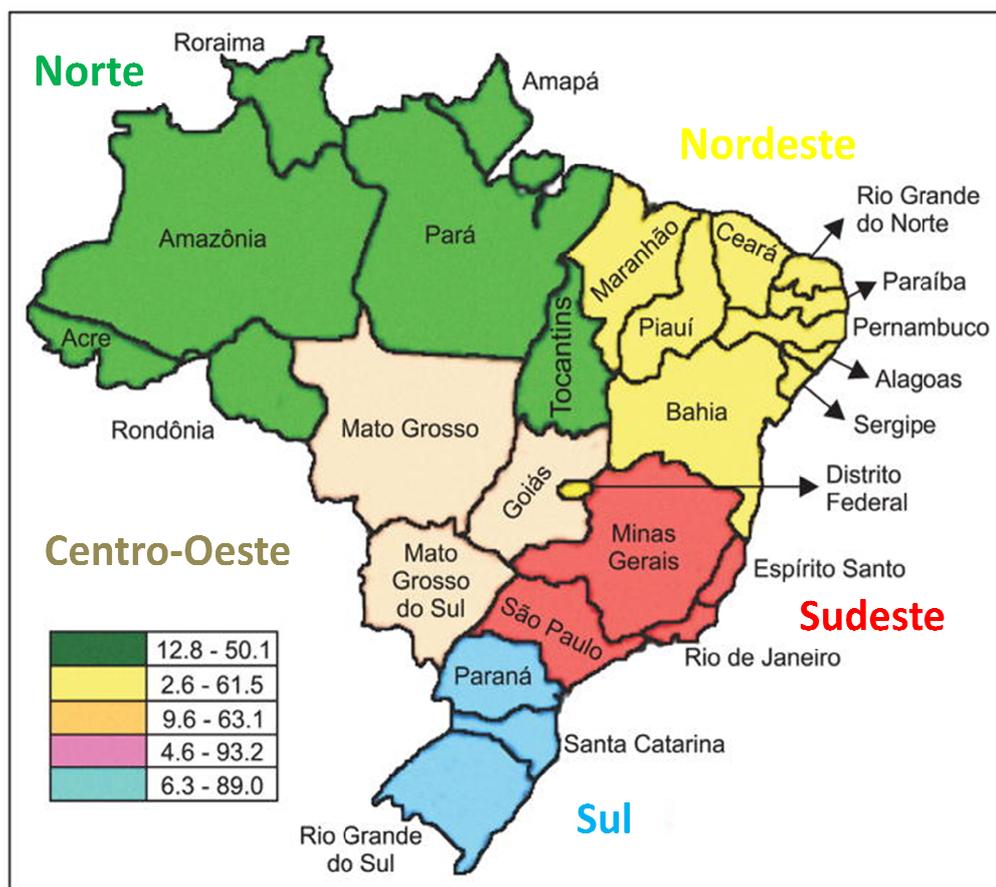


Figura 3: Distribuição da histoplasmosse no Brasil indicada por meio de inquéritos de reatividade intradérmica à histoplasmina (%).

Fonte: Traduzido de Guimarães; Nosanchuk; Zancopé-Oliveira 2006.

Em nosso país, há registro de surtos de histoplasmosse em pessoas que foram infectadas ao visitarem grutas ou cavernas habitadas por morcegos ou estiveram em casas cujos forros possuíam contaminação maciça de fezes de aves ou morcegos (FAVA-NETTO et al. 1976; SUZAKI et al. 1995; TAYLOR et al. 1999; CURY et al. 2001; VICENTINI-MOREIRA et al. 2008). E apesar da epidemiologia da histoplasmosse ter sido bem estudada, os casos de histoplasmosse no Brasil podem ser subestimados, sugerindo que áreas endêmicas são mais dispersas do que se pensa (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; TAVARES; MUNIZ 2005).

Um inquérito intradérmico realizado em três municípios do interior da Paraíba encontrou uma reatividade à histoplasmina variando entre 18,5% e 31,5% (COSTA; WANKE; BARROS 1989).

Na Amazônia, em estudo específico com índios do Parque Indígena Aripuanã, localizado entre os Estados de Rondônia e Mato Grosso, mostrou positividade ao teste intradérmico com histoplasmina de 80,5%, em 114 participantes da comunidade de Zoró; 78,7%, em 265 índios participantes da comunidade de Suruí e 5,8% em 173 participantes da comunidade de Gavião (COIMBRA et al. 1994).

Em 1995, Suzaki e colaboradores, relataram que um grupo de oito turistas japoneses adquiriram histoplasmose ao entrarem e permanecerem por cerca de duas horas em uma caverna próxima a Manaus (Amazonas). Em Minas Gerais, de 417 mineradores estudados, 17,0% foram positivos para histoplasmina no teste intradérmico (RODRIGUES; RESENDE 1996).

No estado da Bahia, Peçanha Martins et al. (2000) relataram um surto de histoplasmose envolvendo um adulto e três crianças membros de uma mesma família, após exposição a fezes de morcegos, relacionada à limpeza do forro da casa, no qual os animais se abrigavam. Em Minas Gerais, Cury et al. (2001) relatam um surto ocorrido em Pedro Leopoldo, em 1997, onde quatro indivíduos desenvolveram histoplasmose pulmonar aguda após contato com uma gruta habitada por morcegos. Também em Minas Gerais, um estudo na reserva indígena Xacriabá com 180 indígenas, empregando o método da contra-immunoelektroforese, revelou 3,9% de reatividade na detecção de anticorpos anti-*H. capsulatum* (MARTINEZ et al. 2002).

No Rio Grande do Sul, após um levantamento de 25 anos (1977-2002), foram encontrados 111 casos de histoplasmose disseminada, onde 70 (63,1%) eram em pacientes portadores do vírus HIV (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO 2004). Após a realização de outro estudo retrospectivo, agora em um hospital no Espírito Santo, foi observado um total de 12 casos de histoplasmose disseminada em pacientes com aids, correspondendo a 2,1% do total de pacientes com infecção por HIV atendidos no período de 1999 a 2001 (CASOTTI et al., 2006).

Em Santa Catarina, foi relatado pela primeira vez um surto em Blumenau, onde foi possível o isolamento do fungo do foco de infecção. Dois indivíduos apresentaram histoplasmose pulmonar aguda após limpeza do forro da casa, entrando em contato com fezes de morcego (OLIVEIRA; UNIS; SEVERO 2006).

No Mato Grosso do Sul, em levantamento realizado por Chang e colaboradores (2007) no período de 1998 a 2005, evidenciou-se o registro de 30 casos de histoplasmose disseminada, em que 83,3% destes tinham coinfeção com HIV.

Em 2008, Vicentini-Moreira e colaboradores relataram um surto ocorrido em 2007, na cidade de Arapeí - São Paulo, em um grupo de 35 pessoas que visitaram uma caverna habitada por morcegos, que já havia sido interditada após a confirmação do isolamento de *H. capsulatum*. Na primeira amostra, coletada um mês após a exposição ao fungo, somente um indivíduo apresentou anticorpos anti-*H. capsulatum* na imunodifusão dupla e 51,0% na técnica de *Western Blot*, no entanto, os autores não descrevem o antígeno utilizado. Em uma nova amostra, coletada dois meses após a exposição, foi encontrada uma reatividade de 97,0% e 100% respectivamente.

Em um estudo realizado de 1996 a 2006 por Prado e colaboradores (2009) no Brasil, os autores relataram o crescimento da histoplasmose como causa primária de morte associada ou não com aids. Neste período foi observado que a histoplasmose foi a terceira causa de morte entre estes pacientes em relação a micoses sistêmicas.

Recentemente, Rocha-Silva e colaboradores (2014) descreveram quatro casos de infecção por *H. capsulatum* em indivíduos imunocompetentes, em biólogos que fizeram uma expedição para determinar a prevalência do fungo na caverna Tamboril, situada na região noroeste de Minas Gerais. Este relato demonstra a importância de avaliar a presença de *H. capsulatum* em cavernas brasileiras antes de abrir para visitação pública.

A real magnitude da histoplasmose no Brasil é desconhecida, da mesma forma que outras micoses sistêmicas, uma vez que não é doença de notificação compulsória. A prevalência da infecção somente pode ser estimada através do teste intradérmico com a histoplasmina, definindo o grau de endemicidade em diferentes regiões. A maioria do conhecimento sobre a epidemiologia da histoplasmose tem sido derivada de investigações realizadas durante surtos epidêmicos.

1.4.3 Histoplasmose no estado do Rio de Janeiro

O estado do Rio de Janeiro apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas endêmicas ou hiperendêmicas (ZANCOPE-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013).

O primeiro caso brasileiro de histoplasmose crônica disseminada e o primeiro de histoplasmose pulmonar crônica foram relatados em pacientes residentes no estado do Rio de Janeiro, respectivamente, em 1945 e 1959 (DUARTE, 1945; PAULA et al. 1959a). O primeiro relato de uma microepidemia de histoplasmose no Brasil envolveu crianças nativas também do Rio de Janeiro, em 1959 (PAULA, 1959b).

Pesquisas com o teste intradérmico com histoplasmina em seres humanos e o isolamento de *H. capsulatum* do solo, a partir de órgãos de cães sem raça definida e de animais silvestres apontam para a existência de áreas de alta endemicidade desta micose no estado do Rio de Janeiro (WANKE, 1985; SILVA-RIBEIRO et al. 1987; ZANCOPE-OLIVEIRA; WANKE 1986; 1987). O fungo foi também isolado a partir da cavidade de uma árvore localizada em uma avenida da cidade do Rio de Janeiro (LAZÉRA, 1989).

Em um período de dois anos (1981-1982), Wanke coletou e estudou 43 casos de histoplasmose neste estado, agrupados pelas seguintes formas clínicas: 40 casos de histoplasmose pulmonar aguda (4 surtos envolvendo 35 indivíduos e 5 casos isolados), 2 pacientes apresentando a forma pulmonar crônica e, 1 paciente com a forma crônica disseminada (WANKE, 1985).

Lazzarini-de-Oliveira, Arantes e Caiuby em 1999, descreveram um estudo realizado no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho no período de 1990 a 1995, onde avaliaram a frequência do achado de fungos através da broncofibroscopia em dois grupos. No primeiro grupo, em que foram avaliados 908 pacientes portadores de HIV, 10 pacientes tiveram o diagnóstico de histoplasmose confirmado pela cultura, e dos 1035 pacientes com sorologia negativa para HIV ou que a sorologia não foi realizada, nenhum foi diagnosticado com histoplasmose pela cultura ou histopatologia.

Em 2003, Martins e colaboradores, relataram uma microepidemia ocorrida em Niterói, onde cinco crianças, após limparem um forno desativado para produção de carvão vegetal, apresentaram histoplasmose pulmonar aguda após contato com o fungo.

Em um estudo realizado em uma clínica privada de pneumologia, em 18 pacientes residentes da área urbana das cidades do Rio de Janeiro e Niterói, demonstra

que a presença de histoplasmose pulmonar em áreas urbanas é uma realidade, sendo muitas vezes sub-diagnosticada devido aos sintomas inespecíficos e em muitos casos com regressão espontânea (MARTINS et al. 2005).

1.5 PATOGENIA

Histoplasma capsulatum infecta seu hospedeiro por via respiratória e com raras exceções por outras vias, tais como inoculação cutânea (SAHEKI et al. 2008) e um caso descrito na literatura de transmissão vertical (FERREIRA et al. 1988). Esta micose apresenta um amplo espectro clínico, variando desde formas leves, a graves e disseminadas.

O início da infecção por *H. capsulatum* depende de uma complexa interação entre o fungo e seu hospedeiro e, pelo menos três condições podem ser observadas na patogenia desta micose: o estado de competência imunológica do hospedeiro, a virulência da cepa infectante e/ou a carga parasitária adquirida (GOODWIN et al. 1981). As células T e fagócitos representam a principal resistência do hospedeiro contra *H. capsulatum*. A imunidade protetora é caracterizada pela indução da produção de citocinas pelas células T, particularmente IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a qual ativa subsequentemente as células fagocíticas. As células efetoras primárias da resistência do hospedeiro ao *H. capsulatum* são os macrófagos (ALLEENDOERFER; DEEP 1998).

A infecção pelo *H. capsulatum* se inicia após a inalação e deposição das partículas infectantes nos alvéolos pulmonares, os microconídios e pequenos fragmentos de hifas, que são leves e se dispersam pelo ar. Este evento é seguido pela conversão destas partículas em leveduras, que tem sido considerado como fator crítico para a patogenicidade de *H. capsulatum* (LÓPEZ, 2006; ARAVALLI et al. 2008). Nos alvéolos, estes organismos se incorporam ao parênquima pulmonar através da migração de macrófagos alveolares, bem como de polimorfonucleares, determinando pneumonia intersticial. Este processo de transição pode começar dentro de algumas horas a alguns dias após a exposição. Durante a infecção primária, as células leveduriformes são fagocitadas, levando à ativação do sistema fagocítico mononuclear e liberação de mediadores químicos participantes do mecanismo oxidativo. Fagócitos repletos de *H. capsulatum* migram então para os linfonodos adjacentes, onde novo foco inflamatório é

formado, constituindo complexo primário pulmonar. Posteriormente há ocorrência de disseminação hematogênica para outros órgãos como fígado, baço e medula óssea entre outros.

Cerca de duas a três semanas após o início da infecção, ativa-se a imunidade celular específica e linfócitos T sensibilizados ativam macrófagos para fagocitarem e lisarem leveduras intracelulares (WHEAT, 2003), além da formação de granuloma, delimitando o processo tanto nos focos primários como nos secundários. Esta reação granulomatosa é seguida de necrose de caseificação, encapsulamento fibroso e frequente depósito de sais de cálcio nas lesões residuais. O controle da infecção parece estar associado com a ativação da imunidade celular, e a resolução da infecção é coincidente com a ativação e proliferação de linfócitos T, que ainda induzem os macrófagos a secretarem TNF- α para auxiliarem na destruição do fungo (FLOR et al. 2003).

Após a infecção primária, *H. capsulatum* pode persistir viável no interior dos granulomas durante anos (NOSANCHUK; GACSER 2008). Assim, reativação endógena pode explicar casos de histoplasmose disseminada em indivíduos imunocomprometidos residentes em áreas de baixa endemicidade, mas que anteriormente viveram em áreas endêmicas ou viajaram para tais áreas.

Algumas características que atuam como facilitadores da patogênese da histoplasmose são o dimorfismo regulado pela temperatura, sobrevivência do fungo dentro de fagolisossomos, parasitismo intracelular em macrófagos, habilidade de causar infecção persistente, modulação do pH, diferenças na expressão de genes, capacidade de utilização de ferro e cálcio e de formar seu próprio ambiente no hospedeiro e capacidade de produção de melanina (WOODS et al. 2001; NEMECEK et al. 2006; TABORDA et al. 2008; HILTY et al. 2011).

Várias proteínas podem participar da patogenia da histoplasmose e são consideradas fatores de virulência deste fungo. Um exemplo, demonstrado *in vitro* e *in vivo*, é a CBP (*Calcium Binding Protein*), uma proteína de ligação de cálcio secretada pelas células fúngicas durante a fase leveduriforme. A realização de experimentos de ruptura gênica, com a deleção do gene *CBP1*, demonstrou que as leveduras resultantes não cresceram quando privadas de cálcio, e também não foram capazes de destruir os macrófagos *in vitro* ou se proliferar em um modelo de infecção animal (BATANGHARI et al. 1998; SEBGHATI et al. 2000).

O *YPS3*, um gene expresso na fase leveduriforme de *H. capsulatum*, codifica uma proteína ligante de quitina que é localizada na superfície da parede celular e liberada em meio de cultura. Em estudo de virulência, o gene *YPS3* foi silenciado e os mutantes não apresentaram diferenças de crescimento durante a cultura *in vitro* e pareciam ter virulência normal numa linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7. No entanto, em um modelo de infecção animal, os mutantes causaram diminuição significativa da carga fúngica (BOHSE; WOODS 2007).

As proteínas HSP60, H2B, superóxido dismutase e catalases de *H. capsulatum*, carregadas por vesículas são reconhecidas por soros hiperimunes, indicando que essas proteínas possam estar envolvidas na interação parasito-hospedeiro (ALBUQUERQUE et al. 2008; NOSANCHUK et al. 2008). Guimarães e colaboradores (2009) produziram anticorpos monoclonais (mAbs), caracterizados como imunoglobulinas G (IgG), para HSP60 de *H. capsulatum* e demonstraram que imunoglobulinas das sub-classes IgG1 e IgG2a prolongaram significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com *H. capsulatum*. No entanto, mAb de sub-classe IgG2b não apresentou fator protetor. Os mAbs protetores reduziram a sobrevivência de *H. capsulatum* intracelular e aumentaram a fusão fagolisossomo de macrófagos *in vitro*. O exame histopatológico de órgãos de camundongos infectados demonstrou que os mAbs de efeito protetor reduziram a carga fúngica e os danos nos órgãos. Os órgãos de animais infectados tratados com mAb tiveram níveis de interleucina-2 (IL-2), IL-12, e TNF- α aumentados e diminuição significativa dos níveis de IL-4 e IL-10.

1.6 INFECÇÃO POR *Histoplasma capsulatum*

A histoplasmose apresenta um amplo espectro clínico, variando desde uma infecção assintomática até doença grave disseminada. Em geral, a maioria dos casos é subclínica ou assintomática, devido ao desenvolvimento da imunidade mediada por células, como os linfócitos T CD4+, e ativação de macrófagos. Em sua maioria, os indivíduos apresentam um quadro respiratório inespecífico, autolimitado e benigno, que desaparece deixando uma reação de hipersensibilidade aos antígenos do fungo, podendo passar até mesmo sem diagnóstico na rotina clínica (GURNEY; CONCES 1996).

Segundo Wheat e Kauffman (2003), a infecção aguda causada por *H. capsulatum* é assintomática em 50,0 – 90,0% dos casos.

Após a exposição primária a *H. capsulatum*, menos de 1,0% dos indivíduos apresentam manifestações clínicas, dentre estes, principalmente aqueles que foram expostos à inalação de grande quantidade de propágulos fúngicos (KAUFFMAN, 2009).

1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A histoplasmose pode ficar restrita aos pulmões ou ocorrer à disseminação para os linfonodos mediastinais e todo o sistema fagocítico-mononuclear, acometendo vários órgãos como baço e medula óssea. Formas progressivas e disseminadas da histoplasmose, assim como a gravidade das manifestações clínicas, em geral, são decorrentes da reativação fúngica quando existem falhas da imunidade celular ou dos mecanismos de fagocitose e lise dos macrófagos (FERREIRA; BORGES 2009). No entanto, infecção pulmonar aguda grave também pode ocorrer quando um indivíduo é exposto a um grande inóculo de *H. capsulatum* (WHEAT; KAUFFMAN 2003).

Os casos sintomáticos desta micose, em indivíduos imunocompetentes, apresentam-se comumente como infecções autolimitadas do trato respiratório. A inalação abundante de conídios de *H. capsulatum* leva ao surgimento de uma forma pulmonar aguda, em geral, após duas a três semanas da exposição ao fungo. Nesta forma clínica os sintomas podem ser identificados de 85,0 a 100% dos casos, nos quais se constata febre, calafrios, mialgia, anorexia, tosse, dispneia, cefaleia, e dor torácica. Entretanto, todos estes sintomas são inespecíficos, e portanto, podem ser comumente observados em outras doenças (WHEAT et al. 2000; SEVERO et al. 2001; ROSSINI; GOULART 2006). Na maioria dos casos, esta forma clínica tende a regredir sem tratamento específico em duas a quatro semanas (FERREIRA; BORGES 2009). A histoplasmose pulmonar aguda é observada em casos isolados ou sob a forma de surtos epidêmicos, em pessoas que realizam atividades recreativas ou laborais, em locais onde há micronichos do fungo (KAUFFMAN 2007).

Em indivíduos com lesões pulmonares pré-existentes, como enfisema centrolobular ou bolhoso, ou defeitos anatômicos estruturais, a histoplasmose pode ocorrer sob a forma pulmonar crônica. Neste caso, a histoplasmose apresenta

características extremamente similares à tuberculose, com formação de granulomas e acometimento da região apical-posterior dos pulmões, já que estas lesões pulmonares favorecem a instalação do foco inicial da doença. Esta forma, em geral, acomete indivíduos com mais de 50 anos de idade, tabagistas e portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. Clinicamente pode-se observar a presença de febre baixa vespertina, sudorese noturna, perda de peso, dor torácica e tosse com hemoptise (GOODWIN; DESPREZ 1973; WHEAT et al. 2000; FERREIRA; BORGES 2009; OIKAWA et al. 2010).

A forma disseminada da histoplasmose ocorre principalmente em pessoas com algum mecanismo de imunossupressão, como pacientes com neoplasias hematológicas (leucemias e linfomas), transplantados, em uso prolongado de corticosteroides e indivíduos com aids. Entretanto, cerca de 20,0% dos casos ocorrem em pessoas saudáveis que foram expostas a um inóculo maciço. Esta é uma forma clínica definida pela presença de foco extrapulmonar e extraganglionar de curso progressivo. (KUROWSKI; OPSTAPCHUK 2002; WHEAT et al. 2004). Febre persistente, perda de peso e esplenomegalia são os achados clínicos mais frequentes na histoplasmose disseminada. Outros sinais e sintomas que podem ser observados incluem adenopatias, hepatoesplenomegalia, tosse, adinamia e sudorese (CORTI et al. 2000; HAJJEH, 1995). Em geral, observa-se infiltrado pulmonar intersticial à radiografia de tórax, e pancitopenia ao hemograma (KAUFFMAN 2007; PONTES et al. 2010). A ocorrência de manifestações cutâneas em áreas não endêmicas pode ser menor que 1,0%, no entanto, existem estudos que mostram que manifestações cutâneas de histoplasmose disseminada ocorrem com maior frequência em pacientes com aids (KARIMI et al. 2002; PECHING; KUMAKAWA; GALARZA 2004). Pacientes com infecção mista (aids e histoplasmose), procedentes da América do Sul, especialmente do Brasil, apresentam alguma lesão de pele, em até 80,0% dos casos (CORTI et al. 2000; KARIMI et al. 2002).

A imunodepressão grave em decorrência da aids predispõe à disseminação extrapulmonar da histoplasmose, principalmente em indivíduos com linfócitos T CD4+ menor que 200 células/mm³, apresentando-se com manifestações graves, rapidamente progressivas e fatais, em até 30,0% dos casos (KARIMI et al. 2002; DAHER et al. 2007; PONTES et al., 2010; DAMASCENO et al. 2013). Em geral, ocorre disseminação fúngica para vários órgãos e tecidos, o que requer agilidade no diagnóstico e tratamento da histoplasmose (LEIMANN et al. 2005).

Vale ressaltar que em hospedeiros imunodeprimidos, mesmo cepas consideradas de baixa virulência, semelhantes à cepa "Downs", tornam-se virulentas, causando a histoplasmose disseminada (KLIMPEL; GOLDMAN 1987). Isso ocorre, devido à reativação endógena de focos quiescentes de fungos viáveis encontrados dentro de granulomas. Com isso, quando há uma queda da imunidade celular, infecções disseminadas ocorrem por reativação da infecção latente de *H. capsulatum*, mesmo muitos anos após a infecção primária (WOODS, 2002).

Endocardite, infecção vascular e infecção de sistema nervoso central (SNC) por *H. capsulatum* também são descritas de forma isolada, entretanto, são formas clínicas menos comuns desta micose (WHEAT; MUSIAL; JENNY-AVITAL 2005; KAUFFMAN 2007; LEDTKE 2012). Pacientes com histoplasmose disseminada podem apresentar comprometimento do SNC em até 20,0% dos casos (FERREIRA; BORGES 2009). Complicações como mediastinite, pericardite, broncolitíase e envolvimento pleural podem ocorrer em pacientes com histoplasmose pulmonar. Fibrose mediastínica é uma complicação grave e frequentemente letal, porém observa-se raramente em indivíduos que apresentaram a forma pulmonar aguda da histoplasmose (KAUFFMAN 2007).

1.8 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da histoplasmose baseia-se nos aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos e epidemiológicos, uma vez que sua sintomatologia é inespecífica, fato que pode gerar um diagnóstico equivocado. Com isso, é fácil compreendermos a necessidade de métodos diagnósticos específicos, mantendo as evidências clínicas como suporte e guia para os demais diagnósticos (WHEAT et al. 2004; ROSSINI; GOULART 2006; HOOLBROOK; RAPPLEYE 2008).

1.8.1 Diagnóstico micológico

O diagnóstico definitivo baseia-se na identificação de *H. capsulatum* em materiais biológicos, empregando-se simultaneamente duas metodologias: exame direto e cultivo. No exame direto, a demonstração da presença de células leveduriformes de *H. capsulatum* em espécimes clínicos por microscopia, em preparações a fresco ou

utilizando hidróxido de potássio (KOH 10%) apresenta baixa sensibilidade, uma vez que o fungo se apresenta com dimensões muito pequenas, tornando o agente fúngico de difícil identificação após este tratamento. Melhor rendimento nestes casos é obtido quando são preparados esfregaços corados por Gomori-Grocott (GMS) ou Giemsa para a observação das estruturas fúngicas, onde *H. capsulatum* é visto como elementos ovalados ou arredondados, dentro dos macrófagos. A sensibilidade do exame microscópico direto em geral é baixa, mesmo com colorações específicas e está relacionada à forma clínica: 10,0% na histoplasmose pulmonar aguda, 40,0% na pulmonar crônica e menor que 25,0% na forma disseminada (WHEAT, 2003; GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA 2006).

A confirmação do diagnóstico se dá pelo isolamento e identificação de *H. capsulatum* em amostras de tecido e/ou fluidos corporais através de cultivo em meios especiais para isolamento, como Agar Sabouraud e Mycosel, entre outros, incubados a 25° C durante 6 a 12 semanas. Nestas condições, *H. capsulatum* inicialmente aparece como colônias glabras, que com o tempo tornam-se filamentosas, aéreas, algodoadas, de coloração branca, compostas microscopicamente por uma trama miceliana, caracterizada por hifas hialinas septadas, microconídios e macroconídios tuberculados em vários estágios evolutivos e estas colônias tendem a escurecer proporcionalmente ao tempo de cultivo. A evidência destes conídios sugere a identidade deste como *H. capsulatum*. Entretanto, a conversão desta fase para a forma leveduriforme é necessária, visto que fungos saprófitos do gênero *Chrysosporium* podem apresentar estruturas de propagação semelhantes às produzidas pelo agente da histoplasmose (GAUR; LICHTWARDT 1980). Para obtenção desta fase é necessário realizar repiques da fase filamentosa da colônia suspeita em meios enriquecidos, tais como Agar sangue, Agar infusão cérebro-coração (BHI), ambos acrescidos de cisteína, e ML Gema com incubação a 35-37°C (FRESSATTI, 1992). Quando convertidos, observam-se colônias lisas, branco-amareladas, úmidas, apresentando à microscopia, leveduras ovais, unibrotantes, de morfologia uniforme (RIPPON, 1988; LACAZ et al. 2009). No entanto, *H. capsulatum* não converte facilmente, dependendo da exigência de nutrientes, condições de temperatura e ainda, das características fisiológicas de cada cepa (EISSENBERG; GOLDMAN 1991).

O isolamento e identificação do fungo em cultivo, considerado método de referência, apresentam limitações uma vez que pode ser lento, durando de 6 a 12 semanas (RIPPON, 1988; BUITRAGO et al. 2006; MAUBON et al. 2007), e ainda as

culturas podem ser negativas em muitos pacientes com formas brandas de histoplasmose, limitando sua utilização nestes casos. Pacientes com histoplasmose disseminada e crônica apresentam cultivos positivos provenientes de seus espécimes clínicos, no entanto, mesmo nestes casos a cultura pode ser falso-negativa em 20,0% dos casos disseminados e 50,0% dos casos crônicos (WHEAT et al. 1997).

1.8.2 Diagnóstico histopatológico

O diagnóstico histopatológico da histoplasmose é baseado na observação de macrófagos parasitados com células leveduriformes em cortes corados pela hematoxilina-eosina (H&E). As leveduras aparecerão como um corpúsculo ligeiramente basofílico, esférico ou ovalado, medindo de dois a quatro micrômetros de diâmetro, rodeado por um halo claro delimitado por uma parede celular muito fina e hialina, podendo apresentar um brotamento estreito variável (RIPPON, 1988; ROSSINI; GOULART 2006; CUNHA et al. 2007).

Outras colorações utilizadas são a impregnação argêntea de *Gomori-Grocott* (GMS) e ácido periódico de Shiff (PAS), nas quais, a parede celular do fungo é fortemente corada, permitindo a visualização de leveduras unibrotantes, pequenas, ovais ou arredondadas. No entanto, a positividade deste método gira em torno de 50,0%, ocorrendo ainda resultados falso-positivos com outros fungos como *Candida glabrata*, *Penicillium marneffeii*, *Pneumocystis jirovecii* ou artefatos de coloração (WHEAT et al. 2002).

1.8.3 Teste do exoantígeno

Um método para imunoidentificação de *H. capsulatum* e que auxilia na resolução de problemas taxonômicos são os exoantígenos, macromoléculas imunogênicas solúveis produzidas pelo fungo no início de seu desenvolvimento (KAUFMAN; STANDARD 1987). O método convencional para identificação das proteínas H e M presentes nos exoantígenos de *H. capsulatum* é a ID, que tem se apresentado como uma ferramenta para imunoidentificação de formas micelianas atípicas de *H. capsulatum* diferenciando-as de fungos saprófitas morfológicamente semelhantes. No entanto, este método apresenta resultados falso-negativos, e

considerando-se que os ensaios imunoenzimáticos são mais sensíveis do que as técnicas de precipitação, *Dot-blot* e *Western blot* foram comparados com os testes tradicionais para detecção de macromoléculas solúveis específicas, produzidas por *H. capsulatum* em cultura (DISALVO et al. 1980; REISS et al. 2000), apresentando uma melhor sensibilidade (100%) quando comparado à ID (33%) (REISS et al. 2000).

1.8.4 Diagnóstico imunológico

Os métodos de diagnóstico imunológico são importantes no diagnóstico das principais micoses sistêmicas: aspergilose, blastomicose, histoplasmose, e principalmente na paracoccidiodomicose. Em algumas ocasiões, o resultado destes métodos é a primeira indicação da natureza fúngica da doença de um paciente.

1.8.4.1 Detecção de anticorpos

Na ausência de métodos micológicos, a sorologia apresenta-se como um importante instrumento para o diagnóstico presuntivo da histoplasmose, pois avalia indiretamente a existência do patógeno no hospedeiro, pela detecção de anticorpos e/ou antígenos.

Segundo Guimarães, Nosanchuk e Zancopé-Oliveira (2006), as técnicas de imunodifusão dupla de Ouchterlony (ID) (OUCHTERLONY, 1962) e reação de fixação do complemento (RFC) (KAUFMAN, 1992) são as duas principais técnicas utilizadas na rotina laboratorial devido a sua conveniência, disponibilidade e precisão.

Entretanto, a ID, técnica altamente específica, com valores próximos a 100%, apresenta limitações quanto à sensibilidade (70,0-100%), na qual os anticorpos específicos podem não ser detectáveis até quatro a seis semanas após o aparecimento dos sintomas, fornecendo resultados falso-negativos (PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA 2006). A RFC, embora muitas vezes seja mais sensível (72,8-94,3%) que a ID, pode apresentar reatividade cruzada com soro de pacientes infectados com *Blastomyces dermatitides*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida* sp (WHEAT et al. 1986a).

A imunodifusão dupla detecta a presença de anticorpos por meio da reação com precipitinas específicas H e M, sendo uma análise qualitativa em que se reconhece como positiva a detecção de uma ou duas linhas de precipitação, as linhas H e M. A linha H usualmente coexiste com a linha M, no entanto, frequentemente a linha M se apresenta como única. A linha H geralmente aparece depois da linha M e está presente no soro de pacientes com histoplasmose ativa, e em alguns, persiste por um a dois anos após a recuperação, porém desaparece primeiro que a linha M e está presente em apenas 7,0% dos soros de pacientes com histoplasmose aguda (WHEAT, 2001). Anticorpos anti-M são desencadeados na histoplasmose aguda ou crônica e em parte dos indivíduos sensibilizados após o teste cutâneo com histoplasmina (ROSSINI; GOULART 2006; KAUFFMAN, 2007). O tempo necessário para desenvolvimento de anticorpos anti-*H. capsulatum* é de duas a seis semanas (LEIMANN et al. 2005). A presença de ambas as precipitinas (H e M) é considerada conclusiva para o diagnóstico da histoplasmose, embora a condição de doença exija a avaliação clínica do paciente (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA 2006).

Foi demonstrado que ensaios imunoenzimáticos, tais como *Western blot* (WB) (PIZZINI et al. 1999) e ELISA (GUIMARÃES et al. 2004) apresentam maior sensibilidade que a imunodifusão e a reação de fixação de complemento na detecção de anticorpos.

Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo comprovaram que a purificação da histoplasmina por cromatografia de troca catiônica seguida de tratamento químico ou enzimático promove uma melhora significativa na utilização deste antígeno pelos métodos de WB e ELISA, para detecção de anticorpos anti-H e anti-M (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al, 1993; 1994a; 1994b; GUIMARÃES et al. 2004), demonstrando resultados promissores, em pacientes com histoplasmose de fase aguda e convalescente, onde a sensibilidade do teste variou entre 90,0 e 100% (PIZZINI et al. 1999).

Vários protocolos de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos utilizando diversas preparações antigênicas vem sendo descritos. Um ensaio de ELISA para detecção de anticorpos específicos contra *H. capsulatum* (IgM e IgG) foi desenvolvido usando o antígeno adsorvido em microesferas metálicas revestidas de policarbonato. Em 135 amostras de soros de pacientes com histoplasmose confirmada por cultura, as sensibilidades foram de 76,0% para RFC, 53,0% para ID e 64,0% para o ELISA (IgM e IgG combinado). O ELISA detectou anticorpos anti-*H. capsulatum* em 36,0% das amostras com títulos de anticorpos negativos por RFC e 46,0% das amostras

com títulos de anticorpos negativos por ID, e ainda, detectou anticorpos anti-*H.capsulatum* em 27,0% das amostras que foram negativas por ambas as técnicas (RFC e ID). A especificidade deste ensaio não pode ser avaliada por soros de pacientes com outras infecções fúngicas por não estarem disponíveis (ZIMMERMAN et al. 1989).

Um ensaio de ELISA utilizando um extrato de células leveduriformes apresentou uma sensibilidade de 86,0% e especificidade de 91,0% em pacientes com histoplasmose pulmonar aguda utilizando anti-IgG humana, ao passo que quando utilizado anti-IgM humana a sensibilidade foi de 66,0% e a especificidade de 100% (TORRES et al. 1993).

Um ELISA indireto foi desenvolvido e avaliado como método para detecção de anticorpos contra histoplasmina (HMIN) glicosilada e deglicosilada, com a obtenção de 92,0% de sensibilidade e de 96,0% de especificidade, podendo atuar como uma metodologia auxiliar aos métodos existentes de diagnóstico que possam ser aplicados, mesmo em situações em que as instalações do laboratório sejam relativamente limitadas (GUIMARÃES et al. 2004). Este último foi avaliado como um imunoensaio sensível para a detecção de anticorpos em soros de pacientes com todas as formas clínicas da histoplasmose: aguda (100%), crônica (90,0%), disseminada (89,0%), oportunista (86,0%) e mediastinal (100%) (GUIMARÃES et al. 2010).

Foi demonstrado que a detecção de anticorpos em pacientes imunodeficientes, em especial os portadores de HIV, apresenta limitações em relação à sensibilidade dos diferentes testes (DURKIN et al. 1997; BUITRAGO et al. 2006). No entanto, um estudo realizado por Arango-Bustamante e colaboradores (2013) analisando prontuários de 391 pacientes com histoplasmose, no qual o diagnóstico da histoplasmose foi avaliado por cultura, RFC e ID. O valor da positividade em culturas foi de 35,7%, a reatividade dos testes sorológicos foi de 95,2%, e uma combinação de ambas as metodologias foi de 16,9% em pacientes não-HIV. Enquanto que o valor da positividade em culturas foi de 75,0%, a reatividade dos testes sorológicos foi de 92,4%, e uma combinação de ambas as metodologias foi de 26,0% em pacientes HIV / aids. Estes resultados indicam que a cultura é o método de diagnóstico para fungos mais confiável para pacientes com HIV / aids, no entanto, testes sorológicos não devem ser descartados como ferramentas para o diagnóstico de histoplasmose nestes casos.

1.8.4.2 Detecção de antígeno

A detecção de antígeno em fluidos corporais pode ser mais eficaz do que o teste de detecção de anticorpos para o diagnóstico da histoplasmose (KLOTZ; PENN; GEORGE 1986), sendo frequentemente utilizada para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes, principalmente imunodeprimidos apresentando a forma disseminada da doença e cujos títulos de anticorpos são baixos ou ausentes (WHEAT et al. 1991). Na histoplasmose crônica, a detecção de antígeno pode ser negativa em virtude da baixa carga fúngica, e os testes sorológicos para detecção de anticorpos são positivos na maioria dos casos (WHEAT, 2003). Durante a infecção por *H. capsulatum*, o antígeno pode ser liberado pelas células fúngicas e detectado em fluidos corporais como soro, lavado broncoalveolar (LBA), líquido, líquido pleural e urina (WHEAT; KOHLER; TEWARI 1986b; WHEAT et al. 1989; 1992).

Entre os testes descritos para detecção de antígeno, o radioimunoensaio (RIA) foi um dos mais utilizados. Baseado na detecção de antígeno polissacáride de *H. capsulatum* (HPA) na urina e no soro de indivíduos infectados, demonstrou-se eficaz no diagnóstico desta micose, especialmente em pacientes com histoplasmose disseminada, nos quais apresentou inicialmente uma sensibilidade de 91,0% na análise da urina e 50,0% em amostras de soro (WHEAT; KOHLER; TEWARI 1986b). Com o aprimoramento da técnica ocorreu um aumento nos níveis de detecção, demonstrando uma sensibilidade de 95,0% na urina e 86,0% em soros de pacientes com aids e histoplasmose disseminada (WHEAT et al. 1989; 2002). Em geral, pacientes com histoplasmose disseminada apresentam altos níveis de HPA na urina, e além de importante para o diagnóstico, a quantificação por RIA é útil para o monitoramento do tratamento, no qual geralmente a diminuição dos títulos de antígenos detectáveis está associada à melhora do paciente (FOJTASEK et al. 1994). Testes falso-positivos podem ocorrer em pacientes com blastomicose ou paracoccidioidomicose (GARNER; KERNODLE 1995). Este teste tem sido substituído por ensaios imunoenzimáticos em virtude da exposição à radioatividade.

O ELISA em seus diversos protocolos é outro método para detecção de antígenos. Um ELISA de inibição utilizando anticorpos monoclonais para detecção de uma proteína de 70 kDa apresentou uma sensibilidade variando de 57,1 a 88,9%, a depender da forma clínica da histoplasmose e uma especificidade de 98,0% quando testados frente a soros de indivíduos residentes em área endêmica e 85,4% quando

avaliados paralelamente a amostras de soro de pacientes com outras infecções fúngicas ou bacterianas (GOMEZ et al. 1997).

Um ELISA sanduíche de segunda geração foi desenvolvido para minimizar os resultados falso-positivos causados por anticorpos humanos antioelho, e como resultado, foram eliminados os resultados falso-positivos em 18 de 19 casos, sem redução na sensibilidade em pacientes com histoplasmose (WHEAT et al. 2006). Uma metodologia empregada para aumentar a sensibilidade do teste para detecção de antígeno na urina de pacientes com histoplasmose foi a ultracentrifugação, que promoveu um ganho na sensibilidade com uma pequena redução da especificidade (EGAN et al. 2008). A sensibilidade do teste para detecção de antígeno de *H. capsulatum* era menor no soro do que na urina, então na tentativa de melhorar o rendimento da antigenemia, amostras de soro de pacientes com histoplasmose foram tratadas com EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) a 104°C com a intenção de remover a formação de imunocomplexos que levam o teste a resultados falso-negativos. Com a utilização desta metodologia, o teste foi capaz de detectar antígeno circulante no soro de dois terços das amostras anteriormente negativas e com histoplasmose provável, com base na suspeita clínica (SWARTZENTRUBER et al. 2009).

Um ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno MVista *Histoplasma* (MiraVista Dianostics) foi modificado para permitir a quantificação de antígeno em LBA e se comparou este método à cultura e citopatologia. Como resultado, o antígeno foi detectado em LBA em 93,5% dos pacientes com histoplasmose, a cultura e a citopatologia apresentaram um mesmo resultado em relação à sensibilidade: 48,0%. Combinando detecção de antígenos e citopatologia em LBA, ambos os métodos de diagnóstico rápido, a sensibilidade foi de 96,8% em pacientes com histoplasmose. Sendo assim, a detecção de antígeno em LBA complementa a detecção de antígeno no soro e urina como um teste de diagnóstico para histoplasmose (HAGE et al. 2010a).

Um estudo multicêntrico, descrito também por Hage e colaboradores (2011), avaliou a sensibilidade e especificidade do ELISA para detecção de antígeno de *Histoplasma* MVista em diferentes formas clínicas. Como resultado, foi encontrada uma sensibilidade de 91,8% quando realizado em amostras de urina de pacientes com histoplasmose disseminada, 83,3% em pacientes com histoplasmose aguda, 30,4% em pacientes com a forma subaguda e 87,5% em pacientes com a forma pulmonar crônica. Nas amostras de soro, o teste apresentou uma sensibilidade de 100% nos casos de histoplasmose disseminada. A especificidade foi de 99,0% entre os doentes com

infecções não fúngicas e indivíduos hígidos, no entanto foi identificada reatividade cruzada em 90,0% dos pacientes com blastomicose.

Theel e colaboradores (2013) avaliaram o kit comercial para detecção de antígeno de *H. capsulatum* na urina, *Histoplasma* UAg EIA (IMMY) em comparação ao MVista *H. capsulatum* quantitative antigen EIA (MiraVista Diagnostics), obtendo como resultado uma sensibilidade de 64,5% e uma especificidade de 99,8%, utilizando um valor limite de 0,5 ng/ml. O kit *Histoplasma* UAg EIA (IMMY) pode oferecer uma abordagem alternativa para a detecção de antígeno de *H. capsulatum* na urina, no entanto serão necessários estudos adicionais para melhor caracterizar o desempenho deste teste em conjunto com achados clínicos. Recentemente, Theel e Ramanan (2014) sugerem que valores positivos baixos, no kit *Histoplasma* UAg EIA, devem ser interpretados com cautela, uma vez que o significado clínico de resultados positivos com valores inferiores a 0,6 ng/ml foi avaliado em 25 pacientes sem evidência de infecção prévia por *H. capsulatum*, onde 12/25 pacientes foram considerados falsos positivos.

Em outro estudo, este desenvolvido por Zhang, Gibson e Daly (2013), avaliou-se dois reagentes comercialmente disponíveis para a detecção de antígeno na urina de pacientes imunocomprometidos para o diagnóstico da histoplasmose. Um foi o FDA-cleared *in vitro* diagnostic assay kit (Alpha *Histoplasma* Antigen EIA), utilizando anticorpo policlonal de coelho, e o outro um anticorpo monoclonal anti-*Histoplasma* galactomanana. Em conclusão, o ensaio monoclonal mostrou maior sensibilidade (90,5%) e especificidade (96,3%) em relação ao policlonal (61,9 e 79,3%), com áreas sob a curva (AUC) de 0,987 e 0,754, respectivamente.

Recentemente, foi validado um ELISA de captura para detecção de antígeno circulante de *H. capsulatum* na urina de pacientes com infecção mista pelo HIV e *H. capsulatum*, e avaliada a correlação entre antigenúria e melhora clínica durante o acompanhamento terapêutico. A sensibilidade do teste foi de 86,0% e a especificidade global foi de 94,0%. Este foi ainda, considerado como uma ferramenta potencial para monitorar e avaliar a resposta de terapia antifúngica em pacientes com aids e histoplasmose disseminada, especialmente naqueles gravemente imunodeprimidos (CACERES et al. 2014).

1.8.5 Diagnóstico molecular

No intuito de driblar as limitações em relação ao diagnóstico da histoplasmose, técnicas de biologia molecular têm contribuído para o desenvolvimento de abordagens que detectem indiretamente *H. capsulatum* em espécimes clínicos por meio da identificação de ácidos nucleicos específicos, oferecendo maior rapidez, bem como alta sensibilidade e especificidade e facilidade na interpretação de resultados (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 2011), especialmente para indivíduos portadores de aids (BUITRAGO et al. 2006).

Dentro dos métodos moleculares, PCR é a técnica mais utilizada no diagnóstico da histoplasmose em espécimes clínicos. A partir desta, outras técnicas, tais como, a PCR aninhada e a PCR em tempo real são empregadas nas análises do DNA de *H. capsulatum* (BIALEK et al. 2002; BUITRAGO et al. 2006).

Um ensaio de PCR aninhada foi desenvolvido na busca pela detecção de DNA fúngico de *H. capsulatum* em amostras de biópsias empregando iniciadores desenhados a partir do gene que codifica uma proteína de 100 kDa, demonstrando uma sensibilidade e especificidade de 100%, o que sugere não haver necessidade de sequenciamento do DNA genômico a fim de evitar altas taxas de resultados falso-positivos (BIALEK et al. 2002). Posteriormente esta mesma metodologia foi validada, agora em amostras respiratórias, na qual foi observada uma sensibilidade de 100% e especificidade de 92,4% quando comparados a amostras de indivíduos hígidos e 95,2% avaliados frente a espécimes clínicos de indivíduos com outras doenças fúngicas e tuberculose confirmadas pela cultura e/ou coloração específica (MUÑOZ et al. 2010).

Em 2003, Bracca e colaboradores desenvolveram uma PCR semi-aninhada para o diagnóstico da histoplasmose, amplificando uma porção do gene do antígeno H. Como resultado, o teste apresentou alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar material genômico correspondente a menos de 10 células leveduriformes de *H. capsulatum*.

Com o objetivo de identificar isolados de *H. capsulatum*, Guedes e colaboradores (2003) aplicaram em uma PCR, sequências de oligonucleotídeos desenhadas a partir de regiões do antígeno M, apresentando 100% de sensibilidade e total ausência de amplificação quando testado com DNA genômico de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida spp.*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*,

Blastomyces dermatitidis, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*.

Outro estudo, comparando esta mesma PCR, tendo como alvo o gene do antígeno M de *H. capsulatum*, com o diagnóstico sorológico e a cultura em cinco pacientes com suspeita de histoplasmose observou que quatro destas amostras amplificaram na PCR, diferente da sorologia que só detectou três amostras reativas e da cultura, que só detectou uma amostra. Embora o número de casos de histoplasmose examinados neste estudo seja pequeno, estes dados sugerem que o diagnóstico molecular tem potencial para aumentar a confiabilidade do diagnóstico da histoplasmose, quando usado em combinação com métodos já estabelecidos (OHNO et al. 2013).

Um novo ensaio, baseado na PCR em tempo real empregando sondas que amplificam a região ITS1, foi utilizado para detecção de DNA de *H. capsulatum* em amostras de soro de pacientes infectados pelo HIV e com histoplasmose comprovada, demonstrando uma sensibilidade de 70,0% e especificidade de 100% (BUIRAGO et al. 2006). A PCR em tempo real também foi empregada, agora utilizando iniciadores específicos para a porção de 99 pares de bases do gene que codifica a proteína de 100 kDa, para detectar *H. capsulatum* em tecido embebido em parafina e fixado em formalina. Este ensaio apresentou 88,9% e 100% de sensibilidade e especificidade respectivamente (KOESELL; HINRICHS; IWEN 2012).

Um estudo multicêntrico, formado por cinco laboratórios, membros da rede MICOMOL do programa CYTED, teve por objetivo avaliar três diferentes protocolos de PCR para detecção de *H. capsulatum* (PCR convencional, aninhada e em tempo real), no qual a sensibilidade geral destes protocolos foi de 86,0% e a especificidade de 100%. Todos os laboratórios foram capazes de amplificar DNA de *H. capsulatum*, e sugerem que a PCR em tempo real seja uma ferramenta promissora para detecção de forma eficiente deste patógeno em amostras clínicas (BUIRAGO et al. 2013).

Diferentemente do isolamento, a técnica de PCR em espécimes clínicos é segura em função da rápida degradação do patógeno pela extração do material genético, o que limita a possibilidade de contaminações laboratoriais do operador (RICKERTS et al. 2002) e permite um diagnóstico precoce, antes mesmo da cultura se tornar positiva (BUIRAGO et al. 2006).

1.9 TESTE INTRADÉRMICO

O teste intradérmico com histoplasmina é importante nos estudos epidemiológicos, porém sua utilização para fins diagnósticos não é recomendada, devido ao alto índice de positividade em áreas endêmicas os quais representam exposição ao agente, no entanto não configuram doença.

Esta técnica consiste na inoculação por via intradérmica de 0,1 ml de histoplasmina, um antígeno filtrado de cultura de *H. capsulatum*, que permite avaliar a resposta de hipersensibilidade tipo IV mediada por células (FAVA; NETTO 1998), onde o aparecimento de uma endureção maior que cinco milímetros de diâmetro, no local da inoculação após 12 a 24 horas, indica um contato prévio com este fungo. Todavia, somente pode ser considerado diagnóstico de histoplasmose quando existe a transformação de negatividade para positividade, simultaneamente a um quadro clínico compatível e história epidemiológica sugestiva (NEGRONI, 1982; ROSSINI; GOULART 2006; KAUFFMAN, 2007).

A reação negativa não significa somente ausência de infecção, mas também pode significar infecção recente ou fase terminal da doença. Resultados falso-positivos podem acontecer em virtude de reações cruzadas com outros fungos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus* spp. e *Sporothrix* spp.) e falsos negativos em pacientes imunodeprimidos (BULMER; BULMER 2001; ZHAO et al. 2001).

1.10 HISTOPLASMINA

O principal complexo antigênico utilizado para fins diagnósticos é a histoplasmina, um filtrado de cultura de *H. capsulatum* na forma filamentosa, crescida em meio sintético (BRADLEY et al. 1974; PINE, 1977). Os principais constituintes antigênicos são os antígenos C, H e M. O antígeno C é um carboidrato (galactomanana), responsável pela reatividade inespecífica observada com outras espécies fúngicas (AZUMA et al. 1974). O antígeno H é uma β -glucosidase, e o antígeno M é uma catalase, que ativam tanto a resposta humoral quanto a resposta mediada por células (HAMILTON et al. 1990; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1993; 1994b; DEEP; DUROSE 1995). Estes últimos são desencadeadores da resposta imune celular e humoral, e são capazes de induzir a formação de precipitinas (HEINER, 1958).

Com o objetivo de tornar o diagnóstico da histoplasmose mais específico, aplicou-se métodos de purificação e concentração para utilização deste complexo antigênico. Purificação por métodos cromatográficos e tratamentos enzimáticos e químicos, estes últimos com finalidade de oxidar a porção glicosídica destes antígenos foram propostos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1993; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1994b). Ambos os antígenos H e M, em sua forma nativa, são glicoproteínas com peso molecular de 116 e 94 kDa respectivamente, contendo epítomos proteicos específicos e glicosídicos ligados à porção N-terminal. Deglicosilações enzimáticas ou químicas pelo metaperiodato de sódio (NaIO_4) além de oxidarem a porção glicosídica do antígeno M, agora com peso molecular de 94 kDa, provaram aumentar a sensibilidade e especificidade em métodos imunoenzimáticos, reduzindo assim a reatividade cruzada com outros fungos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1994a; PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES et al. 2004).

2. JUSTIFICATIVA

As infecções respiratórias continuam a constituir um dos mais importantes problemas de saúde pública com elevada taxa de mortalidade. Dentre estas, a histoplasmose tem apresentado grande relevância nos últimos anos, principalmente pela baixa de imunidade da população bem como por sua alta taxa de morbidade e mortalidade. Além disso, no Brasil, esta é uma das micoses sistêmicas mais comuns, com uma prevalência bastante significativa (PRADO et al. 2009).

O diagnóstico laboratorial definitivo da histoplasmose se dá pelo isolamento, identificação e conversão para a fase leveduriforme do fungo, metodologias fastidiosas, além de alguns isolados serem de difícil conversão, sendo dependente não só de meios de cultura apropriados, temperatura e metodologia especial, como também das características fisiológicas da cepa. Melhorias no diagnóstico, principalmente na histoplasmose disseminada, dependem em parte da padronização e validação de métodos mais rápidos, sensíveis e específicos (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006). Desta forma, a introdução de imunoenaios no diagnóstico da histoplasmose tem sido estabelecida em pesquisas laboratoriais como uma valiosa alternativa para os métodos tradicionais (PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES et al. 2004; SCHEEL et al. 2009). Rapidez, bom limiar de detecção e potencial para o aprimoramento são as maiores vantagens destes métodos.

Os imunoenaios, tais como *Western blot* e ELISA (PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES et al. 2004) são mais rápidos, apresentam maior sensibilidade e especificidade. Entretanto, ainda não são utilizados na rotina de laboratórios de análises clínicas por não serem validados e aceitos pelos órgãos oficiais competentes. Segundo a VISA-Legis (portal.anvisa.gov.br) o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para tal finalidade devendo garantir, por meio de estudos experimentais, que o atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados. Portanto é fundamental determinar estes parâmetros, os quais também

permitirão avaliar a incidência e prevalência de uma infecção. Além disso, a validação de testes rápidos sensíveis e específicos para o diagnóstico possibilitará condutas clínicas e preventivas mais apuradas, e conseqüentemente os custos dos cuidados médicos serão reduzidos, com um aumento na qualidade de vida dos pacientes afetados por esta micose.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Validar o ensaio imunoenzimático *Western blot* para o diagnóstico da histoplasmose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A- Analisar a eficiência/accurácia da técnica de *Western blot* para detecção de anticorpos circulantes em pacientes com histoplasmose utilizando o antígeno histoplasmina na sua forma deglicosilada (HMIN-PT), como método diagnóstico, por meio da demonstração da sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razão de verossimilhança positivo e negativo, com os respectivos intervalos de 95% de confiança;
- B- Comparar o desempenho do *Western blot* com os testes confirmatórios utilizados rotineiramente em Micologia;
- C- Avaliar a viabilidade de fitas de *Western blot*, previamente sensibilizadas com o antígeno histoplasmina na sua forma deglicosilada (HMIN-PT).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, composto por 118 casos e 118 controles, uma amostra de conveniência.

4.2 CASUÍSTICA

Os critérios de inclusão utilizados neste estudo se detiveram à primeira amostra de soro, coletado de indivíduos com história clínico-epidemiológica compatível com histoplasmose, residentes no estado do Rio de Janeiro, cujas amostras foram consecutivamente encaminhadas ao Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia do INI, no período de 2000 a 2013, classificados como histoplasmose confirmada ou provável, e que não receberam tratamento prévio para a doença.

O critério de classificação de histoplasmose foi baseado no consenso europeu EORT/MSG (DE PAUW et al. 2008), no qual os casos foram previamente definidos como histoplasmose confirmada, em paciente com manifestações clínicas e achados radiológicos compatíveis com esta micose em cuja secreção, fluido corporal ou material de lesão foi observada a presença de *H. capsulatum*, por exame micológico direto, cultura ou exame histopatológico, e casos prováveis aqueles pacientes com manifestações clínicas e achados radiológicos compatíveis com a micose e títulos de anticorpos séricos anti-*H. capsulatum* realizado por ID.

Os controles foram obtidos de 40 pacientes com história epidemiológica e suspeita clínica de micose pulmonar, com diagnóstico imunológico negativo pelo método de ID para histoplasmose, paracoccidiodomicose e aspergilose; 40 indivíduos hígidos; e 38 pacientes com diagnóstico comprovado para outras infecções: paracoccidiodomicose (10), tuberculose (10), aspergilose (9), coccidiodomicose (6) e criptococose (3).

As amostras de soro dos pacientes casos de histoplasmose, os controles com história epidemiológica e diagnóstico sorológico negativo pelo método de ID e os soros

heterólogos utilizadas neste projeto estão armazenadas na soroteca do Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia do INI em temperaturas entre -10°C e -30°C. Já as amostras dos indivíduos hígidos foram cedidas por pacientes doadores de sangue do Hemonit, do Hospital Universitário Antonio Pedro, UFF-Niterói, mediante a assinatura do TCLE (Apêndice I).

4.3 MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

4.3.1 Antígenos

Para reações de imunodifusão dupla, foi utilizado o complexo antigênico histoplasmina (PINE et al. 1977) e antígenos filtrados de *P. brasiliensis* (FAVANETTO, 1961) e *A. fumigatus* (COLEMAN; KAUFMAN 1972). Para as reações de *Western blot* foi utilizada como antígeno a histoplasmina purificada e tratada (processo de deglicosilação química com metaperiodato de sódio) descrito anteriormente por Zancopé-Oliveira e colaboradores 1993; 1994-b. Denominaremos neste trabalho HMIN para o antígeno histoplasmina e HMIN-PT para o antígeno histoplasmina purificado e tratado com metaperiodato de sódio (NaIO₄).

4.3.1.1 Produção do antígeno histoplasmina (HMIN)

A histoplasmina (HMIN) foi produzida a partir da cepa de *H. capsulatum* IGS 4/5 (INCQS 70308), em que *H. capsulatum* em sua fase miceliana foi inoculado em meio Smith-Asparagina e mantido em incubação a 25°C com agitação constante a 150 rpm por 30 dias. Timerosal na diluição de 1/10.000 foi adicionado, permanecendo em agitação por mais sete dias. Este material foi então centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45 µm. O sobrenadante resultante foi concentrado aproximadamente 20 vezes utilizando um Amicon (Millipore, Danvers, MA), célula de ultrafiltração (com um ponto de corte de 10 kDa e uma capacidade total de 200 ml) com discos de polietersulfona de ultrafiltração de agitação, utilizando N₂ como corrente de gás de pressão. Então este material foi dialisado contra tampão salina fosfato (PBS), 0,01 M, pH 7,2 (PINE et al. 1977 modificado).

4.3.1.2 Purificação da HMIN por cromatografia de troca catiônica

A HMIN obtida foi dialisada contra tampão citrato de sódio 0,025 M, pH 3,5, centrifugada a 20.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi aplicado em coluna (16 x 100 mm) de CM-Sepharose, HiPrep CM FF 16/10 (GE Healthcare, Sweden) previamente equilibrada com tampão citrato de sódio 0,025 M, pH 3,5. O antígeno foi eluído através de um gradiente descontínuo de cloreto de sódio (NaCl) preparado a partir do tampão citrato de sódio 0,025 M, pH 3,5, acrescido de 0,05 M, 0,5 M e 1 M de NaCl. As frações eluídas da coluna foram concentradas dez vezes e dialisadas contra PBS. Cada amostra recebeu uma concentração final de 0,05% de uma solução de mertiolato. As frações foram monitoradas por *SDS-PAGE*, para reconhecimento de sua composição (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1993 modificado).

4.3.1.3 Processo químico de deglicosilação da HMIN

Alíquotas de um mililitro do antígeno HMIN, previamente purificado, na concentração proteica aproximada de 2,0 mg/ml foram oxidadas com 200 µl de solução de metaperiodato de sódio a 100 mM, diluído em tampão acetato 0,5 M, pH 5,5 por 18 horas a 4°C em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de quantidade equimolar de glicerol por 15 minutos a 4°C. Esta etapa foi seguida pela adição de 100 mM de borohidrato de sódio por duas horas a 4°C. Por fim, a mistura foi dialisada em água destilada a 4°C por 18 horas. Ao fim da diálise foi realizada uma nova dosagem de proteína do antígeno. O material foi estocado em freezer, a -20°C até o momento do uso (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1994b modificado).

4.3.1.4 Produção de antígenos filtrados de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*

O antígeno filtrado de *P. brasiliensis* foi produzido a partir da cepa Pb 339, seguindo o protocolo descrito por Fava-Netto em 1961 e o de *A. fumigatus* foi produzido a partir da cepa JJG, seguindo o protocolo descrito por Coleman e Kaufman em 1972.

4.3.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais do antígeno HMIN e HMIN-PT foi realizada segundo a técnica descrita por Bradford (1976), modificada para utilização com reagente comercial (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA) tendo albumina sérica bovina como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com um filtro de 595 nm de comprimento de onda.

4.3.3 Imunodifusão Dupla de Ouchterlony

A reação de imunodifusão dupla foi realizada de acordo com a técnica descrita por Ouchterlony (1962), em que uma lâmina de microscopia foi recoberta com 3,5 ml de “Agar Noble” a 1,0%, perfurada com três rosetas em cada lâmina, compostas de sete poços com três milímetros de diâmetro. O poço central foi preenchido com antígeno, e nos poços periféricos foram aplicados os soros a serem testados, nos orifícios das extremidades superiores e inferiores foram aplicados soro padrão. O volume de material aplicado em cada poço foi de 10 µl. O soro padrão utilizado foi obtido de um paciente com histoplasmose comprovada sorologicamente e micologicamente. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 37°C por 48 horas.

Após a incubação, as lâminas foram então deixadas em banho por duas horas em solução de citrato de sódio 5,0%, 46 horas em solução salina 0,9%, e posteriormente passaram por um processo de secagem do gel por aproximadamente cinco horas em estufa a 60°C. Após este procedimento, as lâminas foram coradas durante dez minutos com azul brilhante de Comassie R-250 a 0,5% preparado em solução descorante (etanol a 50,0% com 10,0% de ácido acético glacial) e descoradas em banhos sucessivos com a solução descorante (metanol a 40,0% com 10,0% de ácido acético glacial). A leitura das lâminas foi realizada por observação visual, na qual os soros que apresentaram linha de precipitação com identidade total com o soro padrão foram considerados positivos.

Esta metodologia foi empregada utilizando soro dos pacientes casos frente ao antígeno histoplasmina em dois momentos, o primeiro imediatamente após a coleta do sangue e o segundo no período de execução deste projeto para comprovar a viabilidade destas amostras estocadas a -20°C. O grupo controle formado por pacientes com história epidemiológica para histoplasmose foi testado por imunodifusão dupla frente aos antígenos histoplasmina, filtrado de cultura de *P. brasiliensis* e filtrado de cultura de *A.*

fumigatus. Já os grupos controles de indivíduos hígidos e pacientes com cultura comprovada para outras micoses e tuberculose também foram testados pelo método da imunodifusão dupla contra a histoplasmina.

Este método foi utilizado ainda para a padronização da histoplasmina, filtrado de cultura de *P. brasiliensis* e filtrado de cultura de *A. fumigatus*, no qual foi realizada uma diluição seriada, a fim de verificar a melhor formação da linha de precipitação e desta forma, determinar até que título estes antígenos seriam capazes de reagir com os anticorpos de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *A. fumigatus*.

4.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica foi utilizada tanto para análise do antígeno HMIN e HMIN-PT, quanto para realização das reações de *Western blot*, a qual seguiu metodologia descrita por Laemmli (1970). Foi empregado um sistema que consiste em gel de empilhamento na concentração a 4,0% e gel de separação a 10,0% de acrilamida/bisacrilamida, utilizando um sistema vertical Bio Rad Mini Protean II (Bio Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA). Para a corrida eletroforética foi utilizado HMIN-PT, na concentração de 0,25 µg de proteína por milímetro do pente utilizado, diluída em proporções iguais de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo 5,0% de 2-mercaptoetanol e 2,0% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A amostra foi então fervida a 100°C por três minutos para desnaturação das proteínas. Por fim foi adicionado o corante marcador de corrida (“tracking dye”) na relação de 3 ul para cada 100 µl da amostra. Foram utilizados padrões de massas moleculares pré-corados para monitoramento da corrida eletroforética e comparação da migração relativa das bandas separadas pela eletroforese. Para início da corrida eletroforética foi aplicada uma corrente de 25 mA, mantida até as amostras entrarem uniformemente no gel de separação, quando então a corrente foi aumentada para 30 mA. A reação foi finalizada quando o corante marcador da corrida atingiu a base do gel de separação.

4.3.5 *Western blot*

Após realizar a eletroforese do antígeno HMIN-PT, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA). A técnica utilizada foi à mesma descrita por Pizzini e colaboradores (1999), empregando-se uma cuba de eletroforese (Mini-trans-blot cell, Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA).

A porção da membrana contendo o padrão de peso molecular foi separada da membrana contendo as proteínas do antígeno. Esta membrana foi cortada em tiras de aproximadamente 3 mm de largura, as quais foram utilizadas nas reações imunoenzimáticas, ou guardadas à temperatura ambiente entre folhas de papel de filtro até o momento do uso.

Inicialmente, cada tira contendo os antígenos foi colocada em compartimentos de uma placa específica e incubada por uma hora, à temperatura ambiente sob agitação constante em TBS-T (TBS + 0,2% Tween 20 pH 7,5) contendo 5,0% de leite desnatado, a fim de evitar possíveis ligações inespecíficas. Essas tiras foram então lavadas três vezes com TBS-T, cinco minutos para cada lavagem. Logo após, as amostras de soro foram diluídas (1:100) em TBS-TL (TBS-T + 5,0% leite desnatado) e incubadas com as tiras por uma hora sob agitação constante. Posteriormente as tiras foram lavadas três vezes com TBS-T, cinco minutos para cada lavagem. Após a lavagem, IgG de cabra anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch, EUA), na diluição de 1:3.000 em TBS-TL, foi adicionado nas tiras de nitrocelulose, e incubado por uma hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Após outras três lavagens com TBS-T, por cinco minutos cada lavagem, a reação foi revelada adicionando-se uma solução contendo 1 ml de BCIP (5-bromo 4-cloro 3- indolil-fosfato) e 1 ml de NBT (azul de nitro tetrazolium) para cada 100 ml de tampão diluente do substrato (Tris HCl 0,1 M pH 9,5 / 0,1 M NaCl – 5 mM MgCl₂ + 6 H₂O₂) (AP Conjugate Substrate Kit - Bio-Rad Laboratories, EUA). Após observação das reações, as tiras foram lavadas exaustivamente com água destilada para parar a reação.

Dois profissionais treinados realizaram as análises utilizando o *Western blot*, mascarado para os sinais radiológicos e os resultados da cultura e imunodifusão. As amostras foram identificadas por outro profissional com numeração sequencial, para não permitir a identificação de casos e controles pelos executores das análises. O

profissional A realizou esta técnica duas vezes e o profissional B realizou a técnica uma vez, para avaliação do índice de concordância intra e interobservador.

4.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS FITAS

Membranas de nitrocelulose previamente sensibilizadas com o antígeno HMIN-PT foram mantidas à temperatura ambiente e testadas progressivamente ao longo do tempo nos períodos de um dia, um mês, seis meses, um, dois, três, quatro e cinco anos, pela reação imunoenzimática de *Western blot* para avaliação da viabilidade das mesmas, respeitando as condições citadas anteriormente.

4.5 PLANO DE ANÁLISE

A acurácia diagnóstica do *Western blot* foi avaliada pela sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razão de verossimilhança positiva e negativa, com os respectivos intervalos de 95% de confiança. E ainda, foi calculado o índice kappa, para verificação da concordância intra e entreobservador. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS 17.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto estabelece que as informações metodológicas e os resultados obtidos no mesmo são confidenciais, não devendo ser repassados a outros laboratórios ou divulgados publicamente sem prévia concordância dos envolvidos no projeto. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Infectologia, até então Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, bem como no CEP do Hospital Universitário Antônio Pedro, com aprovação sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 19109913.0.0000.5262 (Anexo I).

5. RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Durante o período entre 2000 e 2013, 118 novos casos de histoplasmose foram diagnosticados no INI Evandro Chagas, então IPEC, e que preencheram os critérios de inclusão determinados neste estudo. Os casos de histoplasmose foram classificados como confirmados e prováveis. Foram considerados confirmados aqueles casos em que se obteve identificação de *H. capsulatum* pelo método da cultura ou pelo exame histopatológico e prováveis aqueles pacientes com manifestações clínicas, achados radiológicos compatíveis com histoplasmose e títulos de anticorpos séricos anti-*H. capsulatum* realizado por ID (Gráfico 1).

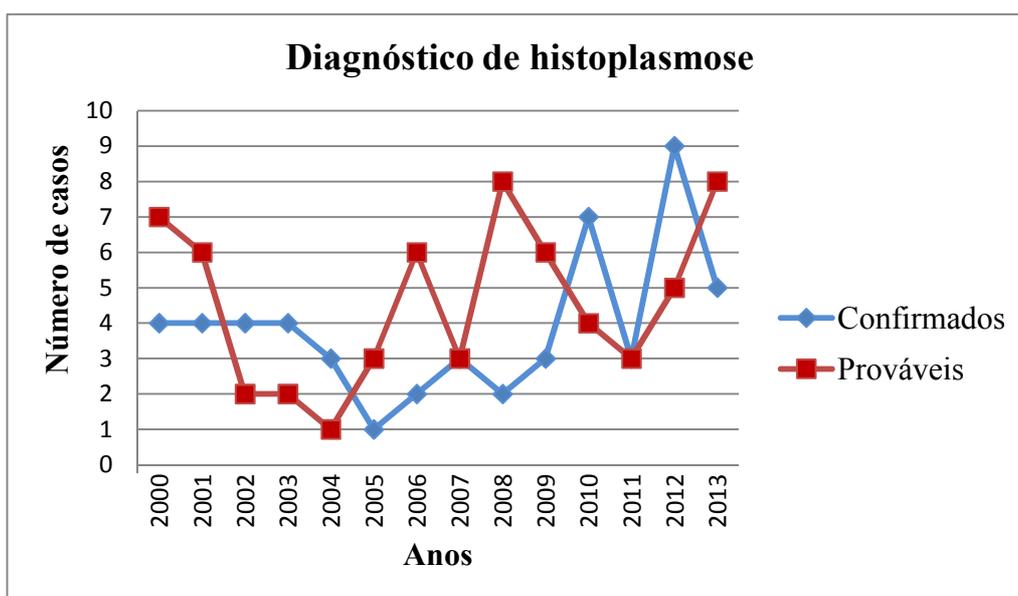


Gráfico 1: Distribuição do número de pacientes estudados com diagnósticos confirmados e prováveis no INI Evandro Chagas no período de 2000-2013 (n=118).

A Tabela 1 demonstra as características clínico-sociais dos pacientes casos de histoplasmose. Quando avaliada a idade destes pacientes, houve uma variação de 10 a 78 anos, com média de 41,2 anos e mediana de 40,5 anos.

Tabela 1: Características sociais e clínico-laboratoriais dos pacientes casos de histoplasmose (n=118).

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	89	75,4
Feminino	29	24,6
Idade (anos)		
≤ 19	8	6,8
20-39	49	41,5
40-59	46	39,0
≥ 60	15	12,7
Imunodifusão dupla		
Positivo	108	91,5
Negativo	10	8,5
Diagnóstico		
Confirmado	54	45,8
Provável	64	54,2
Forma Clínica		
Pulmonar	60	50,8
Disseminada	43	36,5
Ganglionar	5	4,2
Não classificada	10	8,5
HIV		
Positivo	44	37,3
Negativo	21	17,8
Não realizado	53	44,9
Tuberculose		
Positivo	20	16,9
Negativo	43	36,4
Não realizado	55	46,6

Quando confirmado o diagnóstico de histoplasmose por cultura ou exame histopatológico, a maioria dos isolamentos e/ou identificação do fungo foi oriunda de espécimes clínicos obtidos da medula óssea (15/60) e de sítio pulmonar (14/60), conforme demonstrado no Gráfico 2. Cabe ainda salientar que em seis casos o isolamento/identificação do fungo ocorreu em dois espécimes clínicos diferentes.

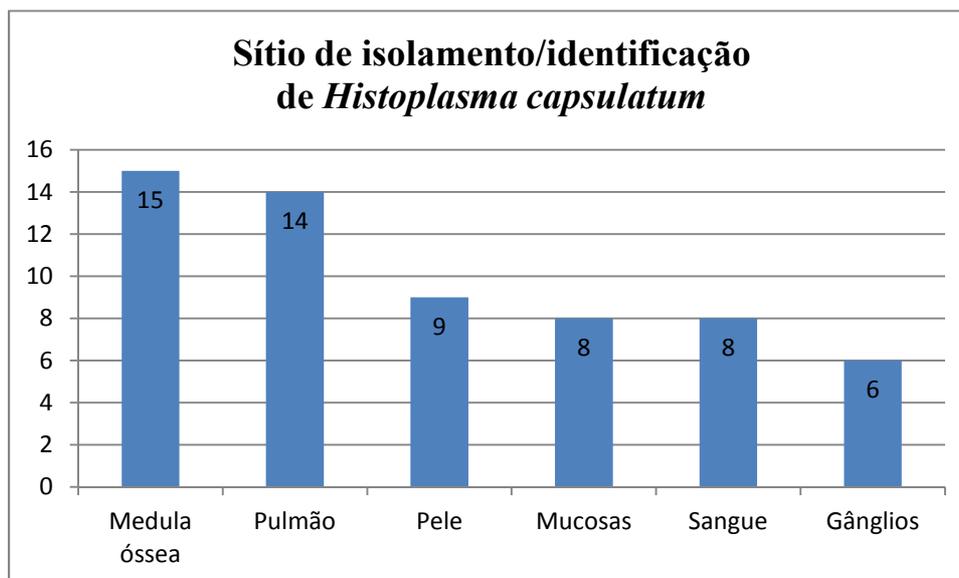


Gráfico 2: Sítio do espécime clínico onde houve a confirmação do diagnóstico de histoplasmose por cultura ou exame histopatológico (n=60).

A Tabela 2 demonstra as características clínico-sociais dos pacientes do grupo de controles, onde foi verificada uma variação de idade de 15 a 81 anos, com uma média de 42,4 anos e mediana de 43,5 anos.

Tabela 2: Características clínico-sociais do grupo controle (n=118).

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	90	76,3
Feminino	28	23,7
Idade (anos)		
≤ 19	7	5,9
20-39	44	37,3
40-59	54	45,8
≥ 60	13	11,0
HIV		
Positivo	22	18,6
Negativo	59	50,0
Não realizado	37	31,4
Tuberculose		
Positivo	17	14,4
Negativo	30	25,4
Não realizado	71	60,2

5.2 ANTÍGENOS

O antígeno denominado histoplasmina foi produzido como descrito anteriormente por Pine e colaboradores (1977), com pequenas modificações e testado pelo método da imunodifusão dupla, realizando uma diluição seriada em PBS, frente a anticorpos de paciente com histoplasmose comprovada micologicamente, obtendo como resultado uma positividade até a titulação de 1/8 (Figura 4). O mesmo procedimento foi realizado para a padronização dos antígenos filtrados de cultura de *P. brasiliensis* e *A. fumigatus*, que apresentaram reatividade até as titulações de 1/128 e 1/2 respectivamente.

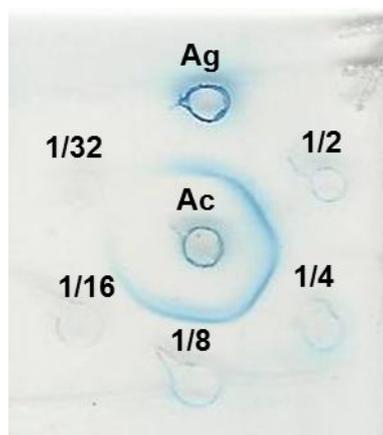


Figura 4: Demonstração da reatividade da histoplasmina frente a soro policlonal anti-*H. capsulatum* pelo método da imunodifusão dupla. Ac – Soro de paciente com histoplasmose comprovada micologicamente; Ag – Antígeno histoplasmina ; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 – titulações do antígeno testado.

5.3 PURIFICAÇÃO DA HMIN POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA CATIONICA E DEGLICOSILAÇÃO PELO NaIO₄

A histoplasmina foi purificada e a eluição das proteínas acompanhada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 280 nm. Então, foi realizado um “pool” das frações de maior densidade óptica (12-27), apresentadas no cromatograma (Gráfico 3). O antígeno histoplasmina foi deglicosilado pelo tratamento químico com o NaIO₄ (metaperiodato de sódio) e analisado por SDS-PAGE.

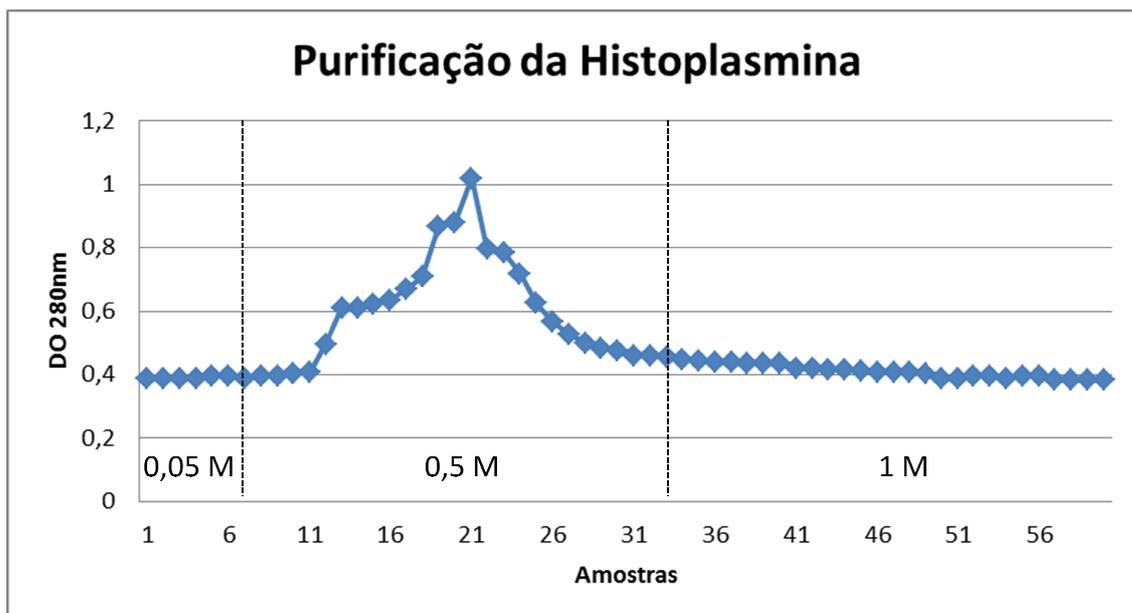


Gráfico 3: Cromatograma da purificação do antígeno histoplasmina. Obtido da cromatografia de troca catiônica em coluna de CM-Sepharose e eluição por tampão citrato de sódio 0,025 M com um gradiente descontínuo de 0,05 M, 0,5 M e 1 M de NaCl.

5.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Foram realizadas dosagens de proteínas do antígeno histoplasmina em sua forma nativa, purificada, e purificada e tratada, empregando o micrométodo de Bradford. Foi calculada então, através da curva padrão de BSA, as seguintes concentrações: 8,70 mg/ml; 2,82 mg/ml e 0,14 mg/ml, para histoplasmina na forma nativa, purificada, e purificada e tratada, respectivamente. O rendimento da purificação da histoplasmina foi de 29,68%.

5.5 IMUNODIFUSÃO DUPLA DE OUCHTERLONY

Dos 118 casos testados pelo método de imunodifusão dupla, 108 (91,5%) apresentaram reatividade, caracterizada pela presença de ao menos uma linha de precipitação. Entre estas, dez (8,4%) apresentaram as duas linhas de precipitação, H e M. Dez amostras apresentaram resultado negativo, caracterizado pela ausência de linhas de precipitação específicas, todas oriundas de pacientes com a forma disseminada da histoplasmose, representando 23,3% dos pacientes com esta forma clínica. Dos 118 controles testados, nenhum apresentou positividade para histoplasmose por este método.

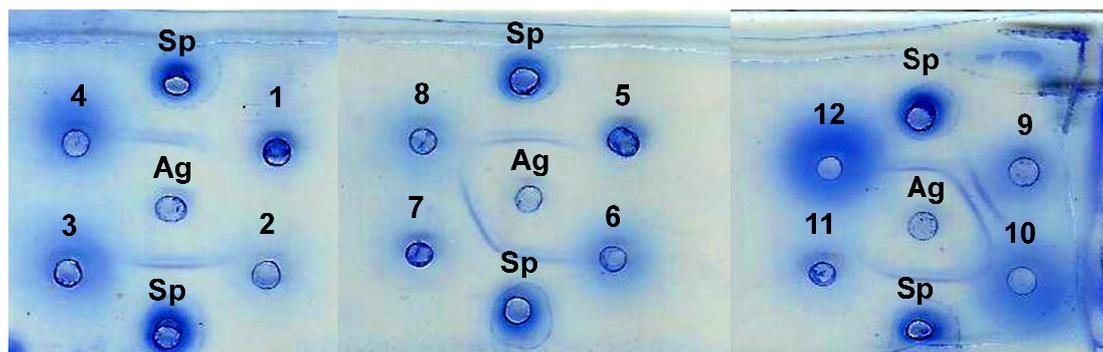


Figura 5: Demonstrativo da reatividade dos soros frente ao antígeno histoplasmina pela técnica de Imunodifusão dupla de Ouchterlony. Ag- Antígeno histoplasmina; Sp- Soro padrão; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11 e 12 – Soros não reagentes; 7 e 10 – Soros reagentes com a linha M de *H. capsulatum*; 9- Soro reagente com as linhas H e M de *H. capsulatum*.

No intuito de avaliar a estabilidade das amostras estocadas em freezer a -20°C em nossa soroteca, todas as nossas amostras consideradas casos ($n=118$) foram testadas novamente pelo método de imunodifusão dupla e os resultados foram comparados com os realizados imediatamente após a coleta, demonstrando um índice de concordância quase perfeito ($Kappa = 0,93$).

5.6 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO *Western blot*

Os parâmetros de validação diagnóstica foram calculados considerando a categorização dos resultados obtidos em um tabela 2 X 2 (Tabela 3), e os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 3: Tabela 2 X 2 para avaliação de desempenho do teste de *Western blot*

Teste avaliado <i>Western blot</i>	Padrão-ouro		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	112 (VP)	7 (FP)	119
Negativo	6 (FN)	111 (VN)	117
Total	118	118	236

* Foram considerados como padrão ouro os critérios estabelecidos pelo consenso europeu EORT/MSG (DE PAUW et al. 2008), em que os casos foram previamente definidos como confirmados e prováveis. VP – Verdadeiro Positivo. FN – Falso Negativo. FP – Falso Positivo. VN – Verdadeiro Negativo.

Tabela 4: Características de desempenho do teste de *Western blot*

Parâmetros	Valores	IC* 95%	
Sensibilidade	94,9%	92,1%	97,7%
Especificidade	94,1%	91,1%	97,1%
Acurácia	94,5%	91,6%	97,4%
VPP	94,1%	91,1%	97,1%
VPN	94,9%	92,1%	97,7%
Razão de Verossimilhança +	16,0	7,79	32,86
Razão de Verossimilhança -	0,05	0,02	0,12

* IC – Intervalo de Confiança. VPP – Valor Preditivo Positivo. VPN – Valor Preditivo Negativo.

Foram observadas seis amostras com resultados falso-negativos e sete amostras com resultados falso-positivos pelo teste de *Western blot*. As amostras que apresentaram reações falso-positivas neste imunoensaio foram provenientes de pacientes portadores de paracoccidiodomicose (cinco), aspergilose (um) e tuberculose (um) e as amostras com reações falso-negativas foram obtidas de pacientes com histoplasmose disseminada, em pacientes portadores do vírus HIV.

Outro parâmetro importante para a validação de um teste diagnóstico é a precisão. Para a verificação deste parâmetro, dois operadores habilitados e treinados para realização do teste receberam amostras de soro, mascaradas para os sinais radiológicos e os resultados da cultura e imunodifusão. As amostras foram identificadas por um terceiro profissional com numeração sequencial, para não permitir a identificação de casos e controles pelos executores das análises. Os ensaios

imunoenzimáticos foram então realizados separadamente por cada um dos dois profissionais, incluindo todas as etapas, desde a preparação dos reagentes.

O profissional A realizou o ensaio por duas vezes e o profissional B realizou uma vez, para avaliação do índice de concordância intra e interobservador, calculado utilizando o índice *Kappa*. Como resultados, obtivemos um índice de concordância intraobservador de $Kappa = 0,99$ e um índice de concordância interobservador de $Kappa = 0,96$. Ambos classificados como “quase perfeita”, segundo a classificação proposta por Landis e Koch (1977), como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Classificação dos índices de concordância pelo coeficiente *Kappa*

Valores de Kappa	Concordância
< 0	Nenhuma
0 - 0,19	Pobre
0,20 - 0,39	Razoável
0,40 - 0,59	Moderada
0,60 - 0,79	Substancial
0,80 - 1,00	Quase perfeita

Fonte: adaptado de Landis; Koch 1977.

Comparando os dois testes sorológicos, ID e WB, foi observado um ganho na sensibilidade quando utilizado o método de WB. E ainda, quando positivos nos dois métodos, o WB apresentou uma capacidade de detecção de anticorpos contra o antígeno H maior que o da ID (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados do desempenho dos testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *Histoplasma capsulatum*

Teste sorológico	n	%
<i>Imunodifusão dupla</i>		
Linha M	98	83,2
Linhas H e M	10	8,4
Não reativos	10	8,4
Total	118	100
<i>Western blot</i>		
Linha M	65	55,1
Linhas H e M	47	39,8
Não reativos	06	5,1
Total	118	100

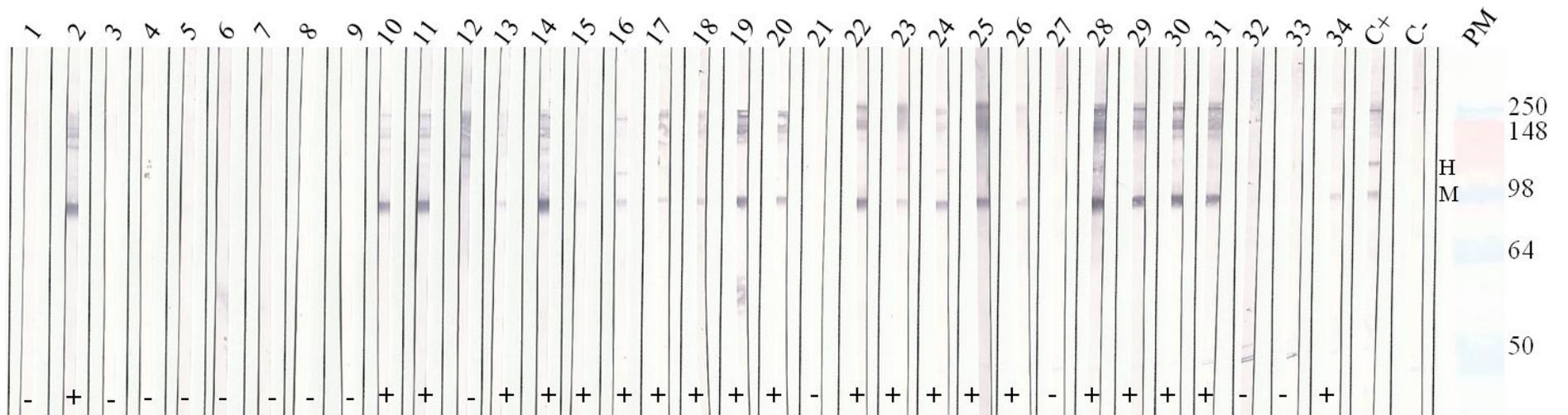


Figura 6: Demonstrativo da reatividade dos soros de pacientes frente ao antígeno HMIN-PT pelo método de *Western blot*. 1 ao 34 – Referente às amostras dos pacientes. C+ - Controle positivo. C- - Controle negativo. H e M – Antígenos reconhecidos pelos soros dos pacientes. PM – Peso molecular. Números à direita correspondem ao padrão de peso molecular.

5.7 ANÁLISE DA VIABILIDADE DAS FITAS

Membranas de nitrocelulose previamente sensibilizadas com o antígeno HMIN-PT foram testadas com um dia, um mês, seis meses, um, dois, três, quatro e cinco anos, através da reação de *Western blot*, apresentando reatividade frente ao mesmo soro de paciente com imunodifusão dupla positiva e cultura positiva para *H. capsulatum*, comprovando a viabilidade das mesmas até este momento (Figura 7). Estas tiras, partes de uma mesma membrana, foram conservadas em temperatura ambiente, entre duas folhas de papel de filtro.

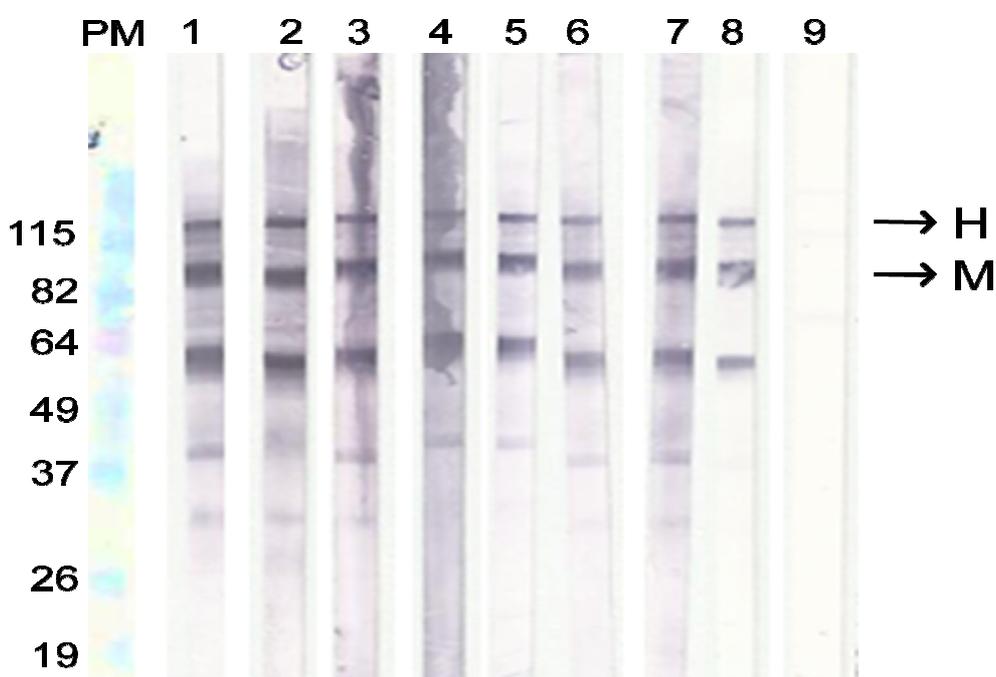


Figura 7: Análise da viabilidade das membranas. PM- Peso Molecular; 1- Um dia; 2- Um mês; 3- Seis meses; 4- Um ano; 5- Dois anos; 6- Três anos; 7- Quatro anos; 8- Cinco anos e 9- Controle negativo.

6. DISCUSSÃO

Os imunoenaios, como por exemplo, o *Western blot*, metodologia validada neste estudo, são metodologias mais rápidas, e apresentam maior sensibilidade e especificidade. Caracterizando esta metodologia como uma importante ferramenta para o diagnóstico da histoplasmose, uma vez que detecta anticorpos precocemente, permitindo condutas clínicas mais rápidas e apuradas.

O estado do Rio de Janeiro, onde residem os pacientes participantes deste estudo, apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas endêmicas ou hiperendêmicas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013). No entanto, estes dados são obtidos por meio de inquéritos epidemiológicos com o teste intradérmico com histoplasmina, e para um controle mais eficiente e uma análise epidemiológica mais precisa, a histoplasmose deveria ser uma doença de notificação compulsória, uma vez que existe uma falta de dados capazes de demonstrar a real situação desta micose no país, considerado endêmico. Este fato ganha força pela importância que as infecções fúngicas vêm tomando nas últimas décadas (PIROFSKI; CASADEVALL 2008).

A maior frequência de casos de histoplasmose neste estudo ocorreu em adultos jovens, de 20 a 39 anos, corroborando com dados da literatura que apontam que nesta fase da vida grande parte dos indivíduos inicia alguma atividade profissional, onde a frequência de atividades de lazer aumenta, assim como a incidência de doenças infecciosas, por exemplo, a aids, que favorece um comprometimento do sistema imune, tornando o indivíduo mais exposto a infecções como a histoplasmose (ROSSINI; GOULART 2006; HOLBROOK; RAPPLEYE 2008).

A população predominante neste estudo foi do gênero masculino (75,4%), que segundo um estudo realizado por Cury e colaboradores (2001) e uma revisão feita por Prado e colaboradores (2009), é o grupo mais atingido pela histoplasmose. Se observada uma coorte prospectiva internacional sobre a epidemiologia da histoplasmose em pacientes com aids, homens representam 95,1% da população estudada enquanto em nosso estudo constituem 81,8% (McKINSEY et al. 1997).

A histoplasmose pulmonar aguda pode afetar indivíduos com atividade ocupacional ou recreacional que envolvam manipulação de solo com acúmulo de guano em áreas endêmicas, ficando expostos a uma grande carga de propágulos fúngicos. Já a forma disseminada da histoplasmose usualmente acomete indivíduos imunocomprometidos, como pacientes transplantados, com doenças hematológicas

malignas, em tratamento com corticoides, com deficiência de células T congênita ou com infecção pelo HIV (COLOMBO et al. 2011).

Devido ao aumento da população com imunidade celular comprometida, o número de casos de histoplasmose com a forma disseminada excedeu as outras formas clínicas, diferentemente do encontrado em nosso estudo, em que a forma pulmonar excedeu a forma disseminada, 50,8 e 36,5% respectivamente (WHEAT et al. 1990).

O isolamento e identificação de *H. capsulatum* pode ser realizado em diversos espécimes clínicos, particularmente cultura de fluidos respiratórios, medula óssea, hemoculturas e biópsias de pele e mucosas (RAMOS-E-SILVA et al. 2012). Cultura de espécimes clínicos respiratórios podem apresentar resultados positivos em cerca de 60,0% dos pacientes com histoplasmose pulmonar (SWARTZENTRUBER et al. 2009; HAGE; WHEAT 2010b). Já a histopatologia é um método operador dependente e necessita experiência dos micropatologistas. A sensibilidade da histopatologia apresenta uma variação entre 17,0 e 70,0% no diagnóstico da histoplasmose (HAGE; WHEAT 2010b). Em nosso estudo, assim como no realizado por Chang e colaboradores (2007), medula óssea foi o espécime clínico onde houve um maior número de isolamentos (15/60).

Nos EUA, a incidência de lesões de pele provenientes da infecção por histoplasmose em pacientes com aids ocorre em apenas 10,0% dos casos. Por outro lado, na América Latina este número é bem maior, variando de 38,0 a 85,0%. Neste estudo, a incidência de lesões de pele por *H. capsulatum* em pacientes com aids foi de 20,5%. A disseminação da histoplasmose ocorre em pacientes infectados pelo vírus HIV com contagens de células T CD4+ inferiores a $75/\text{mm}^3$. Especula-se que a diferença entre o número de indivíduos com lesões de pele na América Latina e nos EUA seja relacionada a diferentes espécies filogenéticas de *H. capsulatum* circulando em diferentes regiões geográficas. (BONIFAZ et al. 2009; MARQUES et al. 2013; SMITH; RIDDELL IV; KAUFFMAN 2013).

Outra limitação relacionada ao diagnóstico da histoplasmose é que segundo alguns estudos, as características muito semelhantes entre histoplasmose e tuberculose podem retardar o reconhecimento de manifestações clínicas da histoplasmose e por consequência, permitir o avanço desta doença, uma vez que a visão se direciona para a tuberculose (UNIS; SEVERO 2005).

No Brasil, em revisão realizada por Prado e colaboradores (2009) num período de 11 anos (1996-2006), 10,1% dos pacientes com aids que evoluíram a óbito tiveram a histoplasmose mencionada em seus atestados de óbito.

A histoplasmose tem sido aceita como uma das doenças definidoras de aids desde 1987 (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al. 2014), no entanto, a frequência de histoplasmose associada a aids tem declinado desde 1996 devido ao resultado da terapia antirretroviral e da profilaxia com 200 mg/dia de itraconazol em pacientes HIV positivos com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 150/mm³ que residem ou residiram em área endêmica (RAMOS-E-SILVA et al. 2012).

O diagnóstico definitivo da histoplasmose ainda se dá pelo isolamento/identificação de *H. capsulatum*. Apesar deste método ser de baixo custo, apresenta algumas limitações como resultado tardio, cerca de 6 a 12 semanas, baixa sensibilidade em pacientes com formas brandas da histoplasmose, e mesmo em casos de pacientes com histoplasmose disseminada e crônica, a cultura pode ser falso-negativa em 20,0% (WHEAT et al. 2002) e 50,0%, respectivamente (WHEAT et al. 1984), além de necessitar de mão de obra qualificada para coleta e realização do cultivo e identificação do fungo. Por outro lado, os testes sorológicos são mais rápidos e sensíveis (PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES et al. 2004), podem ser automatizados ou semiautomatizados e não necessitam de procedimentos invasivos.

Um grande esforço na busca pelo desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico mais acurado das doenças infecciosas tem sido feito, uma vez que a maioria dos métodos diagnósticos apresentam limitações significativas, em virtude do grande número de resultados falsos positivos e falsos negativos (CELIK; KOCABAS 2007).

Diversas técnicas são utilizadas para o imunodiagnóstico da histoplasmose e dentre elas, as amplamente utilizadas na rotina laboratorial são ID e a RFC. A ID se apresenta como uma técnica bastante específica (90,0-100%), demonstra menor sensibilidade (70,0-100%) em alguns casos, ao passo que a RFC apresenta uma sensibilidade semelhante (72,8-94,3%), porém perde em especificidade (70,0-80,0%) (WHEAT et al. 1986a; PIZZINI et al. 1999). Nesta população estudada, utilizando o método da ID, obtivemos bons índices de sensibilidade e especificidade, 91,5 e 100% respectivamente. No entanto, este resultado pode estar influenciado devido ao fato de o método de ID ter sido um dos critérios para a classificação de casos de histoplasmose.

Dentre o universo de 118 amostras de soro de pacientes com histoplasmose testadas por ID, 98 apresentaram somente a linha M (83,2%), a qual aparece no soro dos

pacientes antes da linha H e persiste por mais tempo. Anticorpos anti-M estão presentes no soro de pacientes com infecção aguda ou crônica e podem estar presentes também em indivíduos sensibilizados após o teste cutâneo com histoplasmina (ROSSINI; GOULART 2006; KAUFFMAN, 2007). Ambas as bandas, H e M, foram demonstradas em soro de dez pacientes (8,4%). A linha H geralmente aparece depois da linha M e está presente no soro de pacientes com histoplasmose ativa e em alguns persiste por um a dois anos após a recuperação e está presente em apenas 7,0-10,0% dos soros de pacientes com histoplasmose com infecção aguda (REISS; SHADOMY; LYON 2012). Segundo Hage e colaboradores (2011), a banda H aparece com maior frequência em casos disseminados da histoplasmose (28,6%) que em casos pulmonares (20,4%), diferentemente do encontrado em nossa casuística, 51,0% em histoplasmose pulmonar e 30,0% em histoplasmose disseminada. A presença de ambas as precipitinas (H e M) é considerada conclusiva para o diagnóstico da histoplasmose, embora a condição da doença exija a avaliação clínica do paciente (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA 2006). Foram observados resultados falso-negativos em pacientes com a forma disseminada da histoplasmose (8,4%) corroborando dados da literatura que apontam algo em torno de 20,0% dos casos disseminados (WHEAT et al. 1997), justificado pelos níveis de anticorpos produzidos por estes pacientes e pela capacidade de detecção da técnica.

Neste estudo, devido à dificuldade de obtenção de amostras de soro recém-coletadas, foram utilizadas amostras estocadas, por apresentarem como vantagens a conveniência e rapidez. No entanto, as amostras foram testadas novamente por ID, apresentando um índice de concordância quase perfeito ($Kappa = 0,93$) entre o teste realizado na época da coleta e no atual momento. Supõe-se que as cinco amostras positivas num primeiro momento e agora negativas pelo método da ID, perderam reatividade pelo processo de congelamento e descongelamento.

Em estudos prévios de nosso grupo, o antígeno histoplasmina foi purificado por processo de cromatografia, e o antígeno M, caracterizado por processos imunoquímicos como uma glicoproteína com massa molecular de 94 kDa, contendo epítomos proteicos espécie-específicos e epítomos glicosídicos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1993; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1994a). Deglicosilações do antígeno M purificado demonstraram ser os determinantes glicosídicos os responsáveis pela reatividade cruzada em imunoenaios (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 1994b; PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES et al. 2004). O antígeno H é uma glicoproteína, uma β -glicosidase,

constituída de 10,0 a 30,0% por carboidratos e sua massa molecular é de 108-120 kDa, como determinado por eletroforese (PINE 1977; HARRIS; DEEPE 1988; DEEPE; DUROSE 1995). E o antígeno C, um carboidrato (galactomanana), em grande parte responsável pelas reações inespecíficas observadas com outras espécies fúngicas (AZUMA et al. 1974). Devido à sua elevada especificidade para o diagnóstico da histoplasmose, anticorpos contra os antígenos H e M são particularmente úteis no diagnóstico desta micose (MARKOWITZ, 1967; PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES et al. 2004).

Quando avaliadas as 118 amostras dos pacientes do grupo de casos de histoplasmose pelo método do WB, a identificação das duas bandas (H e M) aumentou substancialmente (39,8%), fato justificado pela maior sensibilidade dos ensaios inunoenzimáticos frente ao teste de ID.

A avaliação dos parâmetros de desempenho é a principal etapa da validação de testes diagnósticos e as análises de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos são essenciais nesta etapa (DELACOUR et al. 2005; PEELING et al. 2006).

Em nosso estudo, foi encontrada uma sensibilidade de 94,9% e uma especificidade de 94,1%, valores próximos aos descritos por Zancopé-Oliveira e colaboradores (1994a), 100% e 91,2%, e Pizzini e colaboradores (1999), 90,0-100%, a depender da fase da doença e 100%, utilizando a mesma metodologia e o mesmo antígeno descrito neste trabalho. No entanto, em ambos os estudos, o número de amostras avaliadas foi inferior ao descrito neste trabalho. Zancopé-Oliveira e colaboradores (1994a) avaliaram 19 amostras de indivíduos com histoplasmose e 52 outras amostras, entre elas indivíduos portadores de outras infecções fúngicas, tuberculose e indivíduos saudáveis. Pizzini e colaboradores (1999) avaliaram 40 amostras de indivíduos com histoplasmose e 37 amostras de indivíduos saudáveis, não avaliando indivíduos portadores de outras infecções fúngicas. Enquanto que neste trabalho foram avaliadas 118 amostras de indivíduos com histoplasmose e 118 amostras de indivíduos portadores de outras infecções fúngicas, tuberculose e indivíduos saudáveis, o que justificaria as pequenas diferenças encontradas nestes parâmetros.

Outro imunoenensaio, desta vez um ELISA, utilizando também o antígeno HMIN-PT, apresentou como resultado uma sensibilidade de 92,0% e especificidade de 96,0%, utilizando 50 amostras de indivíduos com histoplasmose e 122 outras amostras, de

indivíduos portadores de outras infecções fúngicas, tuberculose e indivíduos saudáveis (GUIMARÃES et al. 2004).

Embora tenhamos encontrado neste teste uma boa sensibilidade (94,9%), ainda foram encontrados resultados falsos negativos em seis pacientes com histoplasmose confirmada por cultura. Todos os seis pacientes foram classificados como casos definidos de aids, em que a ausência de anticorpos detectáveis pode estar associada ao estágio avançado de imunodeficiência, seja humoral ou a partir da formação de imunocomplexos (GUIMARÃES et al, 2004).

Em relação à especificidade do teste (94,1%), reações cruzadas foram observadas em amostras de soro de cinco pacientes com paracoccidioomicose, um com aspergilose e um com tuberculose, todos reagindo frente ao antígeno M. Segundo Kauffman (2008) reações falso-positivas podem ocorrer em infecções fúngicas. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de uma infecção concomitante com histoplasmose subclínica nestes pacientes, uma vez que a histoplasmose pode coexistir com outras doenças pulmonares granulomatosas, como a tuberculose e outras micoses (WHEAT, 2001). A sobreposição de área endêmica de histoplasmose (AIDÉ, 2009), paracoccidioomicose (COUTINHO et al, 2002) e tuberculose (MAIOR et al, 2012) colaboram para um melhor entendimento das reações cruzadas em nosso estudo.

Outra possibilidade é que estes anticorpos podem ter surgido no passado, a partir da exposição a *H. capsulatum*, uma vez que a maioria dos casos de histoplasmose são subclínicos, e anticorpos anti-M podem permanecer por vários anos, mesmo após a recuperação do paciente. Estas precipitinas residuais poderiam levar a um diagnóstico equivocado de histoplasmose em pacientes acometidos por outros agentes infecciosos (WHEAT, 2001) ou até mesmo em indivíduos saudáveis residentes em área endêmica de histoplasmose (BROCK et al, 1984) como é o caso do estado do Rio de Janeiro (AIDÉ, 2009).

Estudo de clonagem, expressão e caracterização do gene que codifica a glicoproteína M (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al, 1999) demonstrou que esta molécula apresenta homologia com as catalases presentes em *A. fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Eimericella nidulans*, e portanto, podem conter epítomos não glicosilados expostos, reconhecidos por anticorpos de outra infecção fúngica, como por exemplo, a aspergilose. Estes dados corroboram a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas com outras micoses.

Além da sensibilidade e especificidade, outro parâmetro essencial para a validação de um teste diagnóstico é a precisão, que mede a sua reprodutibilidade. Neste estudo foram observadas concordâncias intra e interobservador classificadas como quase perfeitas ($Kappa = 0,99$ e $Kappa = 0,96$, respectivamente) demonstrando que o teste é reprodutível, tornando possível a sua avaliação em estudos multicêntricos.

Na literatura não encontramos informações sobre o tempo em que as membranas de nitrocelulose previamente sensibilizadas com o antígeno HMIN-PT se mantêm viáveis para a reação do ensaio imunoenzimático. Desta forma, estas membranas foram armazenadas à temperatura ambiente entre duas folhas de papel de filtro e testadas em determinados pontos por um período de cinco anos após a eletrotransferência de proteínas, através da reação de *Western blot*, apresentando reatividade frente ao mesmo soro de paciente com histoplasmose confirmada pelo método da cultura, comprovando a possibilidade de utilização das mesmas, sem comprometer a qualidade do teste. O que possibilita uma distribuição destas fitas para laboratórios da rede pública de saúde, que não disponham de uma estrutura com muitos recursos, e que necessita apenas de profissionais devidamente capacitados para a realização do ensaio imunoenzimático e ainda a possibilidade de comercialização destas fitas.

É importante ressaltar que o teste validado é de simples realização, necessitando apenas de uma infraestrutura laboratorial básica para sua realização. Este método pode ser realizado por qualquer profissional, desde que devidamente treinado, e uma atenção especial deve ser dada à leitura do teste, uma vez que uma banda, mesmo que apresente uma fraca reatividade, é considerada positiva. Desta forma, deve-se levar em consideração os dados clínicos e epidemiológicos deste indivíduo.

Os resultados demonstrados neste trabalho comprovam a validade do ensaio imunoenzimático (*Western blot*) utilizando HMIN-PT como uma ferramenta de boa acurácia (94,5%) no diagnóstico da histoplasmose e que pode vir a ser implantada e disponibilizada para outros centros do Sistema Único de Saúde (SUS).

Como perspectiva futura, será realizada uma validação multicêntrica envolvendo laboratórios de outros estados brasileiros e outros países que se dediquem ao diagnóstico desta micose.

7. CONCLUSÕES

A técnica de *Western blot* para detecção de anticorpos circulantes em pacientes com histoplasmose, utilizando o antígeno HMIN-PT como método diagnóstico, apresentou uma boa acurácia, demonstrando que este método pode ser considerado uma ferramenta útil no diagnóstico da histoplasmose a ser utilizado pelo SUS.

Este método demonstrou uma reprodutibilidade quase perfeita, demonstrando sua capacidade de produzir resultados repetidos e consistentes.

Quando comparado aos testes confirmatórios utilizados rotineiramente em Micologia, o WB apresentou maior sensibilidade, e quando comparado a testes sorológicos utilizados no diagnóstico desta micose, também apresentou uma melhor sensibilidade e especificidade superior à RFC e equivalente à ID. Além disso, é um teste mais rápido.

A viabilidade após cinco anos das membranas de nitrocelulose previamente sensibilizadas com o antígeno HMIN-PT demonstra que este método poderá ser um complemento aos métodos convencionais de diagnóstico da histoplasmose em estudos de campo e/ou em laboratórios com instalações relativamente limitadas.

REFERÊNCIAS

- Aidé MA. Chapter 4: histoplasmosis. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(11):1145-51.
- Ajello L, Zeidberg LD. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria Boydii* from soil. *Science*. 1951 Jun; 113(2945):662-3.
- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancope-Oliveira RM, et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell microbiol*. 2008 Aug; 10(8):1695-710.
- Allendoerfer R, Deepe GS, Jr. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. *J Immunol*. 1998 Jun; 160(12):6072-82.
- Almeida F, Lacaz CS. Cogumelo do gênero *Histoplasma* isolado de lesões de cromomicose - Associações de fungos nas lesões. *Folia Clinica et Biológica*. 1939; 11:65-9.
- Arango-Bustamante K, Restrepo A, Cano LE, de Bedout C, Tobon AM, Gonzalez A. Diagnostic value of culture and serological tests in the diagnosis of histoplasmosis in HIV and non-HIV Colombian patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Nov; 89(5):937-42.
- Aravalli RN, Hu S, Woods JP, Lokensgard JR. *Histoplasma capsulatum* yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. *J Neuroinflammation*. 2008; 5:30.
- Ashbee HR, Evans EG, Viviani MA, Dupont B, Chryssanthou E, Surmont I, et al. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med Mycol*. 2008 Feb; 46(1):57-65.
- Azuma I, Kanetsuna F, Tanaka Y, Yamamura Y, Carbonell LM. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *Mycopathol Mycol Appl*. 1974 Oct 15; 54(1):111-25.
- Bartlett PC, Vonbehren LA, Tewari RP, Martin RJ, Eagleton L, Isaac MJ, et al. Bats in the belfry: an outbreak of histoplasmosis. *Am J Public Health*. 1982 Dec; 72(12):1369-72.
- Batanghari JW, Deepe GS, Jr., Di Cera E, Goldman WE. *Histoplasma* acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism. *Mol Microbiol*. 1998 Feb; 27(3):531-9.

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. J Clin Microbiol. 2002 May; 40(5):1644-7.

Bohse ML, Woods JP. RNA interference-mediated silencing of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. Infect Immun. 2007 Jun; 75(6):2811-7.

Bonifaz A, Chang P, Moreno K, Fernandez-Fernandez V, Montes de Oca G, Araiza J, et al. Disseminated cutaneous histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome: report of 23 cases. Clin Exp Dermatol. 2009 Jun; 34(4):481-6.

Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. J Clin Microbiol. 2003 Apr; 41(4):1753-5.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7; 72:248-54.

Bradley G, Pine L, Reeves MW, Moss CW. Purification, composition, and serological characterization of histoplasmin-H and M antigens. Infect Immun. 1974 May; 9(5):870-80.

Brock EG, Reiss E, Pine L, Kaufman L. Effect of periodate oxidation on the detection of antibodies against the M-antigen of histoplasmin by enzyme immunoassay (EIA) inhibition. Current Microbiology 1984; 10(3):177-80.

Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006 Oct; 25(10):665-8.

Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. J Travel Med. 2011; 18(1):26-33.

Buitrago MJ, Canteros CE, Frias De Leon G, Gonzalez A, Marques-Evangelista De Oliveira M, Munoz CO, et al. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. Rev Iberoam Micol. 2013 Oct-Dec; 30(4):256-60.

Bulmer AC, Bulmer GS. Incidence of histoplasmin hypersensitivity in the Philippines. Mycopathologia. 2001; 149(2):69-71.

Burek-Huntington KA, Gill V, Bradway DS. Locally acquired disseminated histoplasmosis in a northern sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*) in Alaska, EUA. J Wild Dis. 2014 Apr; 50(2):389-92.

Caceres DH, Scheel CM, Tobon AM, Ahlquist Cleveland A, Restrepo A, Brandt ME, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay that detects *Histoplasma*

capsulatum antigenuria in Colombian patients with AIDS for diagnosis and follow-up during therapy. Clin Vaccine Immunol. 2014 Sep; 21(9):1364-8.

Campins H, Dorante M, Lopez LG, Zubillaga C. An epidemic of histoplasmosis in Venezuela. Am J Trop Med Hyg. 1956 Jul; 5(4):690-5.

Cano MV, Hajjeh RA. The epidemiology of histoplasmosis: a review. Semin Respir Infect. 2001 Jun; 16(2):109-18.

Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs. Rev Iberoam Micol. 2010 Mar 31; 27(1):14-9.

Casotti JA, Motta TQ, Ferreira Jr CU, Cerutti Jr C. Disseminated histoplasmosis in HIV positive patients in Espirito Santo state, Brazil: a clinical-laboratory study of 12 cases (1999-2001). Braz J Infect Dis. 2006 Oct; 10(5):327-30.

CDC. Histoplasmosis outbreak associated with the renovation of an old house - Quebec, Canada, 2013. MMWR. 2014 Jan; 62(51-52):1041-4.

Celik U, Kocabas E. New diagnostic tool of tuberculosis: interferon-gamma assays. Tuberk Toraks. 2007; 55(1):108-17.

Chang MR, Taira CL, Paniago AM, Taira DL, Cunha RV, Wanke B. Study of 30 cases of histoplasmosis observed in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007 Jan-Feb; 49(1):37-9.

Coimbra Junior CE, Wanke B, Santos RV, do Valle AC, Costa RL, Zancoppe-Oliveira RM. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Tupi-Monde Amerindian populations from Brazilian Amazonia. Ann Trop Med Parasitol. 1994 Apr; 88(2):197-207.

Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. Appl Microbiol. 1972 Feb; 23(2):301-8.

Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. Med Mycol. 2011 Nov; 49(8):785-98.

Corcho-Berdugo A, Munoz-Hernandez B, Palma-Cortes G, Ramirez-Hernandez A, Martinez-Rivera M, Frias-de Leon M, et al. An unusual outbreak of histoplasmosis in residents of the state of Mexico. Gac Med Mex. 2011 Sep-Oct; 147(5):377-84.

Corti ME, Cendoya CA, Soto I, Esquivel P, Trione N, Villafane MF, et al. Disseminated histoplasmosis and AIDS: clinical aspects and diagnostic methods for early detection. AIDS Patient Care STDS. 2000 Mar; 14(3):149-54.

Costa W, Wanke B, Barros MAO. Paracoccidioidomicose e Histoplasmosose capsulata. Inquérito intradêmico em três municípios do Estado da Paraíba, João Pessoa. Revista do CCS. 1989 Jul/Dez; 11(2):181-8.

Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de Saúde Pública* 2002; 18:1441-54.

Cunha VS, Zampese MS, Aquino VR, Cestari TF, Goldani LZ. Mucocutaneous manifestations of disseminated histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: particular aspects in a Latin-American population. *Clin Exp Dermatol*. 2007 May; 32(3):250-5.

Cury GC, Diniz Filho A, Cruz AG, Hobaika AB. Outbreak of histoplasmosis in Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 Sep-Oct; 34(5):483-6.

Daher EF, Silva GB, Jr., Barros FA, Takeda CF, Mota RM, Ferreira MT, et al. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis in HIV patients from Brazil. *Trop Med Int Health*. 2007 Sep; 12(9):1108-15.

Damasceno L, Novaes AR Jr, Alencar CH, Lima DT, Sidrim JJ, Gonçalves MV, et al. Disseminated histoplasmosis and aids: relapse and late mortality in endemic area in North-Eastern Brazil. *Mycoses*. 2013; 56(5):520-6.

Darling ST. A protozoon general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymphonodes. *JAMA*. 1906; 46:1283-5.

De Deus Filho A, Wanke B, Salmito Cavalcanti Mdo A, Soares Martins LM, Castelo Branco de Deus A. Histoplasmosis in the northeast of Brazil. Report of three cases. *Rev Port Pneumol*. 2009 Jan-Feb; 15(1):109-14.

Deepe GS, Jr., Durose GG. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1995 Aug; 63(8):3151-7.

Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramirez JM. ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology. *Annales de biologie clinique*. 2005 Mar-Apr; 63(2):145-54.

De Monbreun WA. The cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. *Am J Trop Med*. 1934; 14:93-125.

De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 15; 46(12):1813-21.

Dias MA, Oliveira RM, Giudice MC, Netto HM, Jordao LR, Grigorio IM, et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of Sao Paulo State, Brazil. *Epidemiol Infect*. 2011 Oct; 139(10):1642-4.

DiSalvo AF, Sekhon AS, Land GA, Fleming WH. Evaluation of the exoantigen test for identification of *Histoplasma* species and *Coccidioides immitis* cultures. *J Clin Microbiol.* 1980 Mar; 11(3):238-41.

Dodd K, Tompkins EH. A case of histoplasmosis of Darling in an infant. *Am. J. Trop. Med.* 1934; 14:127-37.

Duarte E. Histoplasmose. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1945; 43(3):457-94.

Durkin MM, Connolly PA, Wheat LJ. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay methods for detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antigen. *J Clin Microbiol.* 1997 Sep; 35(9):2252-5.

Egan L, Connolly PA, Fuller D, Davis TE, Witt J, 3rd, Knox KS, et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* antigenuria by ultrafiltration of samples with false-negative results. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Apr; 15(4):726-8.

Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Oct; 4(4):411-21.

Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Rep.* 1949 Jul 15; 64(28):892-6.

Espinosa-Aviles D, Taylor ML, del Rocio Reyes-Montes M, Perez-Torrez A. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). *J Zoo Wildl Med.* 2008 Sep; 39(3):450-4.

Farina C, Rizzi M, Ricci L, Gabbi E, Caligaris S, Goglio A. Imported and autochthonous histoplasmosis in Italy: new cases and old problems. *Rev Iberoam Micol.* 2005 Sep; 22(3):169-71.

Fava-Netto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1961; 21:99-194.

Fava-Netto C, Almeida Neto JM, Guerra MA, Costa EO. Epidemic histoplasmosis. New outbreak in the North of the coast of the State of Sao Paulo. Epidemiological survey with histoplasmin and paracoccidioidina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1976 Mar-Apr; 18(2):108-12.

Fava SDC, Netto CF. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998 May-Jun; 40(3):155-64.

Ferreira CS, Szejder MA, Wanke B, Rego STA, Martins RM. Histoplasmose disseminada fatal. Relato de três casos em lactentes no primeiro trimestre de vida, sendo um em neonato de três dias (histoplasmose congênita). *Jornal de Pediatria.* 1988; 64:34-40.

Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009 Mar-Apr; 42(2):192-8.

Flor A, Estivills D, Perez R, Ordeig J, Ramos F, Soler Bel J, et al. Acute pulmonary histoplasmosis in a Spanish traveller to Nicaragua: an imported disease case. *Rev Iberoam Micol.* 2003 Mar; 20(1):24-8.

Fojtasek MF, Kleiman MB, Connolly-Stringfield P, Blair R, Wheat LJ. The *Histoplasma capsulatum* antigen assay in disseminated histoplasmosis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 1994 Sep; 13(9):801-5.

Fressatti R, Dias-Siqueira VL, Svidzinski TI, Herrero F, Kemmelmeier C. A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992 Jan-Mar; 87(1):53-8.

Fuortes L, Hayes T. An outbreak of acute histoplasmosis in a family. *Am Fam Physician.* 1988 May; 37(5):128-32.

Garner JA, Kernodle D. False-positive *Histoplasma* antigen test in a patient with pulmonary blastomycosis. *Clin Infect Dis.* 1995 Oct; 21(4):1054.

Gaur PK, Lichtwardt RW. Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia.* 1980 Jun; 18(2):105-14.

Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, Restrepo A, et al. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1997 Oct; 35(10):2618-22.

Goodwin RA, Jr., Des Prez RM. Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis. *South Med J.* 1973 Jan; 66(1):13-25.

Goodwin RA, Loyd JE, Des Prez RM. Histoplasmosis in normal hosts. *Medicine (Baltimore).* 1981 Jul; 60(4):231-66.

Guedes HL, Guimaraes AJ, Muniz Mde M, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *J Clin Microbiol.* 2003 Feb; 41(2):535-9.

Guimaraes AJ, Pizzini CV, De Matos Guedes HL, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J Med Microbiol.* 2004 Jun; 53(Pt 6):509-14.

Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Zancoppe-Oliveira RM. Diagnosis of Histoplasmosis. *Braz J Microbiol.* 2006 Jan; 37(1):1-13.

Guimaraes AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancoppe-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 2009 Apr; 77(4):1357-67.

Guimaraes AJ, Pizzini CV, De Abreu Almeida M, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancoppe-Oliveira RM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using purified,

deglycosylated histoplasmin for different clinical manifestations of histoplasmosis. *Microbiol Res (Pavia)*. 2010 Mar; 2(1).

Gurney JW, Conces DJ. Pulmonary histoplasmosis. *Radiology*. 1996 May; 199(2):297-306.

Gutierrez ME, Canton A, Sosa N, Puga E, Talavera L. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. *Clin Infect Dis*. 2005 Apr 15; 40(8):1199-202.

Hage CA, Davis TE, Fuller D, Egan L, Witt JR, 3rd, Wheat LJ, et al. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection in BAL fluid. *Chest*. 2010a Mar; 137(3):623-8.

Hage CA, Wheat LJ. Diagnosis of pulmonary histoplasmosis using antigen detection in the bronchoalveolar lavage. *Expert Rev Respir Med*. 2010b Aug; 4(4):427-9.

Hage CA, Ribes JA, Wengenack NL, Baddour LM, Assi M, McKinsey DS, et al. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 2011 Sep; 53(5):448-54.

Hajjeh RA. Disseminated histoplasmosis in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1995 Aug; 21 Suppl 1:108-10.

Hajjeh R, Turf E, Woolard D, Kaufman L, Padhye A, McNeil M. An outbreak of acute histoplasmosis (AH) in a correctional center in Virginia. 35th General Meeting of the Interscience. Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, D.C.: American Society for Microbiology 1995.

Hamilton AJ, Bartholomew MA, Figueroa J, Fenelon LE, Hay RJ. Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi. *J Med Vet Mycol*. 1990; 28(6):479-85.

Harris JE, Deepe GS, Jr. Characterization of antigenic determinants in histoplasmin that stimulate *Histoplasma capsulatum*-reactive T cells in vitro. *Infect Immun*. 1988 Sep; 56(9):2343-9.

Hatakeyama S, Kashiyama T, Takechi A, Sasaki S, Akamatsu E. Cave-associated acute pulmonary histoplasmosis in two Japanese returning from Mexico. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2001 Apr; 39(4):293-7.

Hearn VM. Structure and function of the fungal cell wall. In: Jacobs PH, Nall L, editors. *Fungal Diseases: Biology, immunology AND diagnosis*. New York: Marcel Dekker; 1997, p. 27-60.

Heiner DC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics*. 1958 Oct; 22(4 Part 1):616-27.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007 May; 111(Pt 5):509-47.

Hilty J, George Smulian A, Newman SL. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. *Med Mycol*. 2011 Aug; 49(6):633-42.

Hoenigl M, Schwetz I, Wurm R, Scheidl S, Olschewski H, Krause R. Pulmonary histoplasmosis in three Austrian travelers after a journey to Mexico. *Infection*. 2008 Jun; 36(3):282-4.

Holbrook ED, Rappleye CA. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Aug; 11(4):318-24.

Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, et al. Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. *Environ Health Perspect*. 2005 May; 113(5):585-9.

Julg B, Elias J, Zahn A, Koppen S, Becker-Gaab C, Bogner JR. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. *J Travel Med*. 2008 Mar-Apr; 15(2):133-6.

Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, et al. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1; 186(11):1655-60.

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castaneda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*. 2003 Dec; 12(12):3383-401.

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

Kauffman CA. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Aug; 21(4):421-5.

Kauffman CA. Histoplasmosis. *Clin Chest Med*. 2009 Jun; 30(2):217-25.

Kaufman L, Standard PG. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Annu Rev Microbiol*. 1987; 41:209-25.

Kaufman L. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin Infect Dis*. 1992 Mar; 14 Suppl 1:23-9.

Klimpel KR, Goldman WE. Isolation and characterization of spontaneous avirulent variants of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1987 Mar; 55(3):528-33.

Klotz SA, Penn RL, George RB. Antigen detection in the diagnosis of fungal respiratory infections. *Semin Respir Infect*. 1986 Mar; 1(1):16-21.

Koepsell SA, Hinrichs SH, Iwen PC. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *J Clin Microbiol*. 2012 Oct; 50(10):3395-7.

Kurowski R, Ostapchuk M. Overview of histoplasmosis. *Am Fam Physician*. 2002 Dec 15; 66(12):2247-52.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica* Lacaz. 9.ed. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 594-617.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15; 227(5259):680-5.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977 Mar; 33(1):159-74.

Larsh HW. The epidemiology of histoplasmosis. In: Al-Doory Y, editor. *The Epidemiology of Human: Micotic Diseases*. Illinois: Springfield; 1975. p. 52-73.

Lazera MS. Fontes saprofíticas de *Cryptococcus neoformans* na cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1989.

Lazzarini-de-Oliveira LC, Arantes AA, Caiuby MJ. Usefulness of routine investigation of fungal infections through bronchoscopy in HIV-infected and non-HIV-infected patients in a general hospital, reference to AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999 May-Jun; 32(3):255-61.

Ledtke C, Rehm SJ, Fraser TG, Shrestha NK, Tan CD, Rodriguez ER, et al. Endovascular infections caused by *Histoplasma capsulatum*: a case series and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Jun; 136(6):640-5.

Leimann BC, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, et al. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. *Rev Iberoam Micol*. 2005 Sep; 22(3):141-6.

Londero AT, Wanke B. Histoplasmosse capsulata. *J Bras Méd*. 1988; 55:94-109.

Lopez CE. Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Rev Argent Microbiol*. 2006 Oct-Dec; 38(4):235-42.

Lyon GM, Bravo AV, Espino A, Lindsley MD, Gutierrez RE, Rodriguez I, et al. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Apr; 70(4):438-42.

Maior ML, Guerra RL, Cailleaux-Cezar M, Golub JE, Conde MB. Time from symptom onset to the initiation of treatment of pulmonary tuberculosis in a city with a high incidence of the disease. *J Bras Pneumol* 2012; 28(2):202-9.

Markowitz H. Antibodies in histoplasmosis. *J Bacteriol*. 1967 Jan; 93(1):40-6.

Marques SA, Silveiras MR, de Camargo RM, Marques ME. Cutaneous histoplasmosis disclosing an HIV-infection. *An Bras Dermatol*. 2013 May-Jun; 88(3):420-3.

Martinez R, Vitali LH, Henriques JH, Machado AA, Albernaz A, Lima AA. Seroepidemiological survey for infections by fungi causing systemic mycoses in the Xacriaba Indian Reserve, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Jul-Aug; 35(4):347-50.

Martins EML, Marchiori E, Damato SD, Pozes AS, Silva ACG, Dalston M. Histoplasmosse pulmonar aguda: relato de uma microepidemia. *Radiol Bras.* 2003; 36:147-51.

Martins RC, Nigri DH, Monteiro AS, Addor G, Franco CAB. Histoplasmosse pulmonar em clínica privada no Rio de Janeiro. *Pulmão RJ.* 2005; 14(3):197-201.

Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Aug; 58(4):441-4.

McKinsey DS, Spiegel RA, Hutwagner L, Stanford J, Driks MR, Brewer J, et al. Prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: incidence, risk factors, and pathophysiology. *Clin Infect Dis.* 1997 Jun; 24(6):1195-203.

Morgan J, Cano MV, Feikin DR, Phelan M, Monroy OV, Morales PK, et al. A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico, spring 2001. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Dec; 69(6):663-9.

Munoz C, Gomez BL, Tobon A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, et al. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 Jan; 17(1):62-7.

Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986; 28:19-27.

Nasta P, Donisi A, Cattane A, Chiodera A, Casari S. Acute Histoplasmosis in Spelunkers Returning from Mato Grosso, Peru. *J Travel Med.* 1997 Dec; 4(4):176-8.

Negróni R. Inmunología de las micosis. In: Margni RA, editor. *Inmunología e Inmunoquímica.* La Habana: Ed. Científico-Técnica; 1982. p. 340-62.

Negróni R. Histoplasmosse. In: Focaccia R, editor. *Tratado de Infectologia Veronesi.* 3. ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 1415-26.

Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science.* 2006 Apr; 312(5773):583-8.

Nosanchuk JD, Nimrichter L, Casadevall A, Rodrigues ML. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. *Commun Integr Biol.* 2008a; 1(1):37-9.

- Nosanchuk JD, Gacser A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. *Microbes Infect.* 2008b; 10(9):973-7.
- Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother.* 2013 Oct; 19(5):999-1003.
- Oikawa F, Carvalho D, Matsuda NM, Yamada AT. Histoplasmosis in the nasal septum without pulmonary involvement in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: case report and literature review. *Sao Paulo Med J.* 2010 Jul; 128(4):236-8.
- Oliveira FM, Unis G, Severo LC. An outbreak of histoplasmosis in the city of Blumenau, Santa Catarina. *J Bras Pneumol.* 2006 Jul-Aug; 32(4):375-8.
- Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. *Prog Allergy.* 1962; 6:30-154.
- Pan B, Chen M, Pan W, Liao W. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. *Mycoses.* 2013 May; 56(3):212-21.
- Paula A, Blundi E, McClure V, Pernambuco P. Histoplasmoses pulmonar. Tratamento pela anfotericina B. *Brasil-méd.* 1959a; 73:13-8.
- Paula A. Microepidemia de histoplasmoses. *Rev Serv Nac Tuberc.* 1959b; 3:11-20.
- Pecanha Martins AC, Costa Neves ML, Lopes AA, Querino Santos NN, Araujo NN, Matos Pereira K. Histoplasmosis presenting as acute respiratory distress syndrome after exposure to bat feces in a home basement. *Braz J Infect Dis.* 2000 Apr; 4(2):103-6.
- Peching G, Kumakawa Z, Galarza C. Histoplasmosis diseminada aguda: enfoque de manifestaciones cutáneas. *Folia Dermatol. Peru.* 2004; 15(3):172-5.
- Peeling RW, Smith PG, Bossuyt PM. A guide for diagnostic evaluations. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Sep; 4(9 Suppl):2-6.
- Peters EJ, Kauffmann RH, Blok P. Fever and high lactate dehydrogenase in HIV-positive patients from the Antilles and Surinam: histoplasmosis? *Neth J Med.* 2006 Sep; 64(8):302-6.
- Pine L, Gross H, Malcolm GB, George JR, Gray SB, Moss CW. Procedures for the production and separation of H and M antigens in histoplasmin: chemical and serological properties of the isolated products. *Mycopathologia.* 1977 Oct 28; 61(3):131-41.
- Pirofski LA, Casadevall A. The damage-response framework of microbial pathogenesis and infectious diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 635:135-46.
- Pizzini CV, Zancoppe-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. Evaluation of a *Western blot* test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 Jan; 6(1):20-3.

Pontes LB, Leitao TM, Lima GG, Gerhard ES, Fernandes TA. Clinical and evolutionary characteristics of 134 patients with disseminated histoplasmosis associated with AIDS in the State of Ceara. *Rev Soce Bras Med Trop*. 2010 Jan-Feb; 43(1):27-31.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 May; 104(3):513-21.

Quist EM, Belcher C, Levine G, Johnson M, Heatley JJ, Kiupel M, et al. Disseminated histoplasmosis with concurrent oral candidiasis in an Eclectus parrot (*Eclectus roratus*). *Avian Pathol*. 2011 Apr; 40(2):207-11.

Ramos-e-Silva M, Lima CM, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol*. 2012 Nov-Dec; 30(6):616-27.

Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancope-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol*. 2000; 38 Suppl 1:147-59.

Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM. *Fundamental Medical Mycology*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2012. p. 31-72.

Reyes-Montes MR, Rodriguez-Arellanes G, Perez-Torres A, Rosas-Rosas AG, Paras-Garcia A, Juan-Salles C, et al. Identification of the source of histoplasmosis infection in two captive maras (*Dolichotis patagonum*) from the same colony by using molecular and immunologic assays. *Rev Argent Microbiol*. 2009 Apr-Jun; 41(2):102-4.

Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacobi V, Just-Nubling G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Nov; 21(11):821-3.

Rippon JW. *Medical Mycology: The pathogenic Fungi and the pathogenic Actinomycetes*. 3th. Philadelphia: W.B. Saunders; 1988. p. 381-423.

Rocha-Lima H. Beitrag zur kenntnis der Blastomykoses. Lymphangitis epizootica und Histoplasmosia. *Zentralbl Bakteriol*. 1912; 67:233-49.

Rocha-Silva F, Figueiredo SM, Silveira TT, Assuncao CB, Campolina SS, Pena-Barbosa JP, et al. Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave-Minas Gerais state, Brazil. *Med Mycol Case Rep*. 2014 Apr; 4:1-4.

Rodrigues MT, de Resende MA. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil. *Mycopathologia*. 1996; 135(2):89-98.

Rodriguez-Cerdeira C, Arenas R, Moreno-Coutino G, Vasquez E, Fernandez R, Chang P. Systemic fungal infections in patients with human immunodeficiency virus. *Actas Dermosifiliogr*. 2014 Jan-Feb; 105(1):5-17.

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

Saheki MN, Schubach Ade O, Salgueiro Mde M, Conceicao-Silva F, Wanke B, Lazera M. Primary cutaneous histoplasmosis: case report on an immunocompetent patient and review of the literature. Rev Soc Bras Med Trop. 2008 Nov-Dec; 41(6):680-2.

Santos L, Santos-Martinez G, Magana-Ortiz JE, Puente-Pinon SL. Acute histoplasmosis in three Mexican sewer workers. Occup Med (Lond). 2013 Jan; 63(1):77-9.

Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Reed Y, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Histoplasma capsulatum* antigenuria in immunocompromised patients. Clin Vaccine Immunol. 2009 Jun; 16(6):852-8.

Sebghati TS, Engle JT, Goldman WE. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. Science. 2000 Nov; 290(5495):1368-72.

Severo LC, Oliveira FM, Irion K, Porto NS, Londero AT. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001 Jul-Aug; 43(4):183-7.

Silva-Ribeiro VL, Ferreira-da-Cruz MF, Wanke B, Galvao-Castro B. Canine histoplasmosis in Rio de Janeiro: natural and experimental infections. J Med Vet Mycol. 1987 Oct; 25(5):319-22.

Smith JA, Riddell Jt, Kauffman CA. Cutaneous manifestations of endemic mycoses. Curr Infect Dis Rep. 2013 Oct; 15(5):440-9.

Suzaki A, Kimura M, Kimura S, Shimada K, Miyaji M, Kaufman L. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. Kansenshogaku Zasshi. 1995 Apr; 69(4):444-9.

Swartzentruber S, LeMonte A, Witt J, Fuller D, Davis T, Hage C, et al. Improved detection of *Histoplasma* antigenemia following dissociation of immune complexes. Clin Vaccine Immunol. 2009 Mar; 16(3):320-2.

Taborda CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologia. 2008 Apr-May; 165(4-5):331-9.

Taylor ML, Granados J, Toriello C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. Mycoses. 1996 Sep-Oct; 39(9-10):375-9.

Taylor ML, Chavez-Tapia CB, Vargas-Yanez R, Rodriguez-Arellanes G, Pena-Sandoval GR, Toriello C, et al. Environmental conditions favoring bat infection with

Histoplasma capsulatum in Mexican shelters. Am J Trop Med Hyg. 1999 Dec; 61(6):914-9.

Taylor ML, Chavez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. Fungal Genet Biol. 2000 Aug; 30(3):207-12.

Theel ES, Jespersen DJ, Harring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. J Clin Microbiol. 2013 Nov; 51(11):3555-9.

Theel ES, Ramanan P. Clinical significance of low-positive *Histoplasma* urine antigen results. J Clin Microbiol. 2014 Sep; 52(9):3444-6.

Torres M, Diaz H, Herrera T, Sada E. Evaluation of enzyme linked immunosorbent-assay and *Western blot* for diagnosis of histoplasmosis. Rev Invest Clin. 1993 Mar-Apr; 45(2):155-60.

Unis G, Oliveira Fde M, Severo LC. Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2004 Nov-Dec; 37(6):463-8.

Unis G, Severo LC. Histoplasmose pulmonar cavitária crônica simulando tuberculose. J Bras Pneumol. 2005; 31(4):318-24.

Vicentini-Moreira AP, Kohara VS, Passos AN, Feliciano RS, Barreto LC, Freitas RS, et al. Microepidemia de histoplasmose no Município de Arapeí, São Paulo. BEPA. 2008; 5:58.

Wanke B. Histoplasmose. Estudo epidemiológico, clínico e experimental. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1985.

Washburn AM, Tuohy JH, Davis EL. Cave sickness, a new disease entity? Am J Public Health Nations Health. 1948 Nov; 38(11):1521-6.

Wheat LJ, Wass J, Norton J, Kohler RB, French ML. Cavitory histoplasmosis occurring during two large urban outbreaks. Analysis of clinical, epidemiologic, roentgenographic, and laboratory features. Medicine. 1984 Jul; 63(4):201-9.

Wheat LJ, French ML, Kamel S, Tewari RP. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. J Clin Microbiol. 1986a Mar; 23(3):493-9.

Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. N Engl J Med. 1986b Jan 9; 314(2):83-8.

Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP, Garten M, French ML. Significance of *Histoplasma* antigen in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. Arch Intern Med. 1989 Feb; 149(2):302-4.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield PA, Baker RL, Curfman MF, Eads ME, Israel KS, et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1990 Nov; 69(6):361-74.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Blair R, Connolly K, Garringer T, Katz BP. Histoplasmosis relapse in patients with AIDS: detection using *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen levels. *Ann Intern Med*. 1991 Dec 15; 115(12):936-41.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Blair R, Connolly K, Garringer T, Katz BP, et al. Effect of successful treatment with amphotericin B on *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* polysaccharide antigen levels in patients with AIDS and histoplasmosis. *Am J Med*. 1992 Feb; 92(2):153-60.

Wheat LJ. Histoplasmosis. Experience during outbreaks in Indianapolis and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1997 Sep; 76(5):339-54.

Wheat LJ, Sarosi G, McKinsey D, Hamill R, Bradsher R, Johnson P, et al. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000 Apr; 30(4):688-95.

Wheat LJ. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: update 2000. *Semin Respir Infect*. 2001 Jun; 16(2):131-40.

Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 May; 43(1):29-37.

Wheat LJ. Current diagnosis of histoplasmosis. *Trends Microbiol*. 2003; 11:488-94.

Wheat LJ, Kauffman CA. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2003 Mar; 17(1):1-19.

Wheat LJ, Conces D, Allen SD, Blue-Hnidy D, Loyd J. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis, and management. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004 Apr; 25(2):129-44.

Wheat LJ, Musial CE, Jenny-Avital E. Diagnosis and management of central nervous system histoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 2005 Mar; 40(6):844-52.

Wheat LJ, Connolly P, Durkin M, Book BK, Pescovitz MD. Elimination of false-positive *Histoplasma* antigenemia caused by human anti-rabbit antibodies in the second-generation *Histoplasma* antigen assay. *Transpl Infect Dis*. 2006 Dec; 8(4):219-21.

Woods JP, Heinecke EL, Luecke JW, Maldonado E, Ng JZ, Retallack DM, et al. Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Semin Respir Infect*. 2001 Jun; 16(2):91-101.

Woods JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol*. 2002 Mar; 35(2):81-97.

Zancope-Oliveira RM, Wanke B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no Município do Rio de Janeiro. Cad. Saúde Publica. 1986; 2(1):42-52.

Zancope-Oliveira RM, Wanke B. Distribution of sources of infection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Rio da Prata, a municipality of Rio de Janeiro (RJ). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1987 Jul-Aug; 29(4):243-50.

Zancope-Oliveira RM, Bragg SL, Hurst SF, Peralta JM, Reiss E. Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin. J Med Vet Mycol. 1993; 31(1):29-41.

Zancope-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Peralta JM. Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from *Histoplasma capsulatum*. Clin Diagn Lab Immunol. 1994a Sep; 1(5):563-8.

Zancope-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Wanke B, Peralta JM. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. Clin Diagn Lab Immunol. 1994b Jul; 1(4):390-3.

Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GS, Jr. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun. 1999 Apr; 67(4):1947-53.

Zancope-Oliveira RM, Morais e Silva Tavares P, Muniz MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Sep; 45(3):443-9.

Zancope-Oliveira RM, Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Muniz MM, Albuquerque PC, Almeida-Paes R. *Histoplasma*. In: Liu B, editor. Molecular detection of human fungal pathogens. Boca Raton: CRC Press; 2011.

Zancopé-Oliveira RM, Muniz MM, Wanke B. Histoplasmose. In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 1238-49.

Zhang X, Gibson B, Jr., Daly TM. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. J Clin Microbiol. 2013 Dec; 51(12):4095-101.

Zhao B, Xia X, Yin J, Zhang X, Wu E, Shi Y, et al. Epidemiological investigation of *Histoplasma capsulatum* infection in China. Chin Med J (Engl). 2001 Jul; 114(7):743-6.

Zimmerman SE, Stringfield PC, Wheat LJ, French ML, Kohler RB. Comparison of sandwich solid-phase radioimmunoassay and two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen. J Infect Dis. 1989 Oct; 160(4):678-85.

APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
DE ACORDO COM AS NORMAS DA RESOLUÇÃO Nº 466, DO
CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012****VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (*WESTERN BLOT*) PARA O
DIAGNÓSTICO DA HISTOPLASMOSE**

Pesquisador Responsável: Rosely Maria Zancopé Oliveira. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365. Telefones (21) 3865-9506 / 3865-9515 – Celular (21) 9989-0843. Laboratório de Micologia 2ª a 6ª feira das 8:00 h às 17:00 h.

A histoplasmose, causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, é uma micose muito frequente no Rio de Janeiro e no Brasil. A doença se manifesta na maioria dos casos como uma infecção pulmonar aguda, com sintomas semelhantes aos da gripe, mas em alguns pacientes, principalmente naqueles com algum defeito imunológico evoluem para quadros pulmonares mais graves e doença extrapulmonar, que pode ser fatal se não for diagnosticada e tratada rapidamente. Além disso, esta micose pode ser confundida com outras doenças tais como tuberculose e outras micoses. O diagnóstico final da histoplasmose é fornecido através de exames laboratoriais pelo isolamento e identificação do fungo. Entretanto, na ausência dos mesmos, a sorologia apresenta-se como um instrumento importante para o diagnóstico da histoplasmose, pois detecta anticorpos e/ou antígenos no soro do pacientes. Entretanto, estes métodos podem apresentar limitações. Considerando estas dificuldades, nos propomos a avaliar um método imunoenzimático (*Western blot*) para o diagnóstico da histoplasmose. Os conhecimentos adquiridos possibilitarão condutas clínicas e preventivas mais apuradas, e conseqüentemente os custos dos cuidados médicos serão reduzidos, com um aumento na qualidade de vida dos pacientes afetados por histoplasmose.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que tem como objetivo estudar um método de diagnóstico laboratorial da histoplasmose. Para sua participação neste projeto é necessária somente a coleta de amostra de cinco mL do seu sangue, o que corresponde a um tubo, que será utilizada no estudo proposto. No momento da coleta você poderá sentir um pequeno desconforto (ou dor), o qual em

geral passa após o procedimento. Em alguns casos, após a coleta, ocorre um pequeno extravasamento de sangue do local onde houve a picada da agulha em seu braço. Caso isso ocorra, a equipe de coleta está capacitada para solucionar esse problema. Em outro pequeno número de pacientes pode ocorrer formação de hematoma (o braço fica roxo) no local da punção. Isso, embora seja um incômodo, não representa uma manifestação clínica grave e caso isso ocorra seu braço deverá voltar ao normal em alguns dias, sem necessidade de medicamento específico.

Como explicado antes, o exame que será realizado com seu sangue serve para verificar como está a defesa de seu corpo contra o fungo que causa a histoplasmose. Caso queira, após a realização dos exames em sua amostra, os seus resultados poderão ser informados a você, porém esses resultados não devem alterar a conduta clínica que os médicos realizarão, ou seja, você não terá que tomar mais ou menos remédios por conta disso, por exemplo.

Sua participação não é obrigatória, mas voluntária. Você pode se recusar a participar da pesquisa ou, a qualquer momento, desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que este fato cause qualquer constrangimento ou penalidade. O pesquisador se obriga a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, e também poderá interromper sua participação a qualquer tempo, por razões técnicas ou médicas quando, então, você receberá aconselhamento e orientação. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. Antes de assinar este termo, você deve se informar plenamente sobre ele, fazendo todas as perguntas que ache necessário. Devendo ficar esclarecido (a) quanto às informações que se seguem:

A) Sua participação nessa pesquisa também consistirá em permitir que seus registros médicos, ou seja, as anotações feitas pelos médicos e/ou nos bancos de sangue sejam usados como fonte de informação para a condução do estudo. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, seja pelo nome, por fotografias ou características físicas. Os resultados serão divulgados em apresentações ou publicações com fins unicamente científicos ou educativos.

B) Sua participação neste estudo poderá não trazer benefícios diretos para você, mas você estará contribuindo para aumentar os conhecimentos no diagnóstico e compreensão da histoplasmose, beneficiando no futuro outras pessoas que possam adquirir esta doença.

C) Participar dessa pesquisa não implicará em nenhum custo para você e, como voluntário, você não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela participação, pois essa pesquisa não irá gerar lucro financeiro para nenhum dos envolvidos.

D) Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço da pesquisadora responsável, podendo tirar dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou em qualquer momento.

Assinatura do Usuário

Assinatura do Pesquisador Responsável

Testemunha

Testemunha

Rio de Janeiro, de de 2014.

ANEXO I – Parecer consubstanciado do CEP

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação de ensaio imunoenzimático (Western blot) para o diagnóstico da histoplasmose.

Pesquisador: Rosely Maria Zancopé Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 19109913.0.0000.5262

Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 364.054

Data da Relatoria: 12/08/2013

Apresentação do Projeto:

A histoplasmose é a micose com alta prevalência, principalmente nos EUA. Entretanto, regiões com menor endemicidade são encontradas no Brasil. Embora a maioria dos casos se apresente como uma infecção pulmonar aguda, alguns pacientes evoluem para quadros pulmonares mais graves e doença extrapulmonar, que podem ser fatais se não forem diagnosticados e tratados rapidamente. O diagnóstico baseia-se nos aspectos clínicos, radiológicos, epidemiológicos e laboratoriais, embora alguns sinais/sintomas possam ser confundidos com outras doenças tais como tuberculose e outras micoses. O teste padrão de referência para o diagnóstico é o isolamento e identificação do *H. capsulatum* em cultivo. Entretanto, na ausência dos mesmos, a sorologia tem sido utilizada para o diagnóstico presuntivo, através da detecção de anticorpos. Entretanto, o Western blot não foi ainda validado para o diagnóstico de histoplasmose na prática clínica.

Objetivo da Pesquisa:

Adequados.

Objetivo Geral:

Validar o ensaio imunoenzimático Western blot para o diagnóstico da histoplasmose

Objetivo Secundário:

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3965-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 364.054

1. Analisar a eficiência/accurácia da técnica de Western blot para detecção de anticorpos circulantes em pacientes com histoplasmoses utilizando o antígeno histoplasmina na sua forma deglicosilada (HMIN-PT), como método diagnóstico, através da demonstração da sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razão de verossimilhança positivo e negativo, com os respectivos intervalos de 95% de confiança; 2. Comparar o desempenho do Western blot com os testes confirmatórios utilizados rotineiramente em Micologia; 3. Avaliar a viabilidade e durabilidade de fitas de Western blot, previamente sensibilizadas com o antígeno histoplasmina na sua forma deglicosilada (HMIN-PT).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e se restringem a coleta de sangue realizada de maneira prospectiva em caso de necessidade.

Neste caso, os benefícios são muito maiores que os riscos, uma vez que a validação de um método de diagnóstico capaz de detectar a infecção precocemente é importante na implementação do tratamento antifúngico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante desenvolvido desenvolvido em um centro de referência nacional para o diagnóstico de micoses e conduzido por equipe experiente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Por favor, verificar e corrigir o tempo de inclusão do estudo. No resumo está descrito 2000-2012, entretanto, no item critério de inclusão o período descrito é 2000-2013.

Por favor, incluir no TCLE, local destinado a assinatura do sujeito, testemunhas e pesquisador responsável.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foi detectado nenhum impedimento de natureza ética no projeto em questão.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 364.054

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 19 de Agosto de 2013

Assinador por:
Léa Ferreira Camillo-Coura
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br