

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES
DE SAÚDE NA AMAZÔNIA

MARCIA LARISSA PEREIRA DE MENEZES

HISTOPLASMOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS ATENDIDOS EM
UNIDADE DE REFERÊNCIA NO AMAZONAS: características clínico-
epidemiológicas e avaliação da presença de *Histoplasma capsulatum* em
fontes ambientais

MANAUS – AM

2021

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES
DE SAÚDE NA AMAZÔNIA

MÁRCIA LARISSA PEREIRA DE MENEZES

HISTOPLASMOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS ATENDIDOS EM
UNIDADE DE REFERÊNCIA NO AMAZONAS: características clínico-
epidemiológicas e avaliação da presença de *Histoplasma capsulatum* em
fontes ambientais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Orientadora: Prof. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

Coorientadora: Prof. Dra. Kátia Santana Cruz

MANAUS – AM

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

M543h

Menezes, Márcia Larissa Pereira de

Histoplasmose em pacientes com HIV/AIDS atendidos em unidade de referência no Amazonas: características clínico-epidemiológicas e avaliação da presença de *Histoplasma capsulatum* em fontes ambientais. / Márcia Larissa Pereira de Menezes. - Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

69 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ani Beatriz Jackish Matsuura.

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Santana Cruz.

1. Micologia médica 2. Histoplasmose 2. HIV/AIDS – Amazonas I. Título

CDU 616.992:616.98(811.3) (043.3)

CDD 616.96901

22. ed.

MÁRCIA LARISSA PEREIRA DE MENEZES

**HISTOPLASMOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS ATENDIDOS
EM UNIDADE DE REFERÊNCIA NO AMAZONAS: características
clínico-epidemiológicas e avaliação da presença de *Histoplasma
capsulatum* em fontes ambientais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Condições
de Vida e Situações de Saúde na Amazônia,
como requisito obrigatório para a obtenção
do título de Mestre em Saúde Pública.

Aprovada em: 31/08/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura - Orientadora

ILMD/FIOCRUZ



Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

INPA



Prof. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

ILMD/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A palavra de **Deus**, que é viva e eficaz e que me ensinou que posso todas as coisas em Deus e que é Ele quem me fortalece.

A minha mãe **Nize Menezes**, mulher simples mas que sempre me ensinou sobre as maiores riquezas da vida e que sempre está ao meu lado, vibrando a cada conquista. Ao meu pai **José Ribamar Ribeiro**, meu exemplo de garra, coragem e perseverança. Ao meu amado esposo **Jansen Rodrigues**, que é o meu parceiro de vida, meu melhor amigo e que sempre me apoia e incentiva a conquistar os meus sonhos.

Ao casal de amigos **Wladmary e Romeo Fialho**, por serem minha inspiração profissional e pelo incentivo em iniciar o desafio da Pós-Graduação.

A minha orientadora **Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura** e coorientadora **Dra. Kátia Santana Cruz**, pelo apoio sempre recebido, paciência, gentileza e sabedoria na condução deste processo, apesar das dificuldades e desafios que foram surgindo ao longo do caminho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM**, pelo aporte financeiro à pesquisa, pela concessão da bolsa de mestrado, pelas passagens e diárias para participação de cursos. Muito obrigada pelas oportunidades.

Ao PPGVIDA-ILMD/Fiocruz Amazônia, em especial a turma de 2018, pela parceria, unidade e apoio recebido, principalmente pelas colegas **Giselle Diniz e Anny Beatriz**.

A todos os funcionários do ILMD-Fiocruz Amazônia pelo acolhimento, prestatividade e esclarecimento sempre que solicitado.

Ao querido **Ycaro**, pela alegria que sempre nos recebeu na biblioteca, amizade, prestatividade e confiança.

As queridas colegas do laboratório DMAIS **Marla e Maria Eduarda** que foram fundamentais no aprendizado e execução das práticas laboratoriais, assim como todo apoio recebido da colega **Bianca** do laboratório Micologia do INPA. Nunca terei palavras o suficiente para agradecer por todo conhecimento compartilhado e pela paciência em me ensinar.

Ao **Dr. Maurício Mourishi Ogusko**, do laboratório de Micobacteriologia do INPA, pelo apoio nas análises das amostras e pelos ensinamentos.

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos”*

(Pv. 16:3)

RESUMO

Introdução: A histoplasmose é uma doença fúngica comumente observada em pacientes com AIDS como uma doença oportunista negligenciada em muitos países, especialmente na América Latina, incluindo o Brasil. Existe importante relação com fatores ambientais, mesmo em áreas urbanas, onde a sua incidência tem aumentado. **Objetivo:** Descrever as características clínico-epidemiológicas de pacientes com histoplasmose disseminada e com HIV/AIDS e avaliar a presença de *Histoplasma capsulatum* em fontes ambientais. **Métodos:** Foi realizada uma revisão de prontuários de pacientes com HIV/AIDS associados a histoplasmose, atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, no período de 2017 a 2019, assim como a coleta de amostras ambientais dos domicílios destes pacientes e em outras fontes ambientais. Essas amostras foram submetidas a técnica de extração de DNA utilizando kit comercial PowerSoil e em seguida analisadas em PCR em tempo real. **Resultados:** O total de 62 pacientes preencheram os critérios de inclusão com diagnóstico de coinfeção AIDS e histoplasmose, o que corresponde a 4,5% dos casos de AIDS detectados no período. Destes, 68% eram do sexo masculino, com média de idade de 36 anos, baixa escolaridade e em 47% o diagnóstico de AIDS e histoplasmose ocorreu simultaneamente. A mortalidade foi de 45% sendo que 57% destes pacientes não faziam uso regular da HAART e apenas 54% chegaram a iniciar o tratamento com Anfotericina B, não sendo mais possível reverter o quadro clínico, provavelmente devido ao comprometimento imunológico que se encontravam, pois 100% dos pacientes que evoluíram ao óbito tiveram a contagem de células CD4+ < de 100 cél. /mm³. Os principais sintomas encontrados foram respiratórios, gastrointestinais e o emagrecimento. Os casos estavam distribuídos de forma ampla na área urbana da cidade de Manaus/AM com alguma predominância nas regiões Norte (29%) e Leste (19%). Foram coletadas 58 amostras ambientais, divididas entre 12 de domicílios de pacientes com histoplasmose e 46 de outras fontes ambientais, não sendo detectado a presença de *Histoplasma capsulatum* em nenhuma das amostras. **Conclusão:** A coinfeção AIDS/HD é comum e com altas taxas de mortalidade, e 80% dos pacientes informaram residir em áreas urbanas de Manaus, mesmo que a histoplasmose epidemiologicamente seja mais comum em áreas rurais. Nossos resultados evidenciam a importância de mais estudos ambientais para que desta forma seja possível um melhor entendimento da ecoepidemiologia da histoplasmose no Amazonas, assim como se apropriar cada vez mais da técnica de biologia molecular.

Palavras Chave: *Histoplasma capsulatum*; coinfeção AIDS/HD; fontes ambientais; Amazonas

ABSTRACT

Introduction: Histoplasmosis is a fungal disease commonly seen in AIDS patients as an opportunistic disease neglected in many countries, especially in Latin America, including Brazil. There is an important relationship with environmental factors, even in urban areas, where its incidence has increased. **Objective:** To describe the clinical and epidemiological characteristics of patients with disseminated histoplasmosis and HIV/AIDS and to assess the presence of *Histoplasma capsulatum* in environmental sources. **Methods:** A review of the medical records of patients with HIV-AIDS associated with histoplasmosis, attended at the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado - FMT-HVD, from 2017 to 2019, was carried out, as well as the collection of environmental samples from the patients houses and other environmental sources. These samples were subjected to the DNA extraction technique using a commercial PowerSoil kit and then analyzed in real-time PCR. **Results:** The utter of 62 patients met the inclusion criteria with a diagnosis of AIDS co-infection and histoplasmosis, which corresponds to 4.5% of AIDS cases detected in the period. Of these, 68% were male, with a mean age of 36 years, low educational level and in 47% the diagnosis of AIDS and histoplasmosis occurred simultaneously. Mortality was 45% and 57% of these patients did not make regular use of HAART and only 54% started treatment with Amphotericin B. 100% of patients who died had a CD4+ cell count < 100 cells. /mm³. The main symptoms found were respiratory, gastrointestinal and weight loss. The cases were widely distributed in the urban area of the city of Manaus/AM, with some predominance in the North (29%) and East (19%) regions. Fifty-eight environmental samples were collected, divided among 12 from patients houses with histoplasmosis and 46 from other environmental sources, with no detection of *Histoplasma capsulatum* in any of the samples. **Conclusion:** AIDS/DH coinfection is common and has high mortality rates, and 80% of patients reported living in urban areas of Manaus, even though histoplasmosis is epidemiologically more common in rural areas. Our results show the importance of more environmental studies so that, a better understanding of the ecoepidemiology of Histoplasmosis in Amazonas is possible, as well as the increasing use of the technique of molecular biology.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*; AIDS/DH coinfection; environmental sources; Amazonas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01.	Distribuição geográfica do número de casos de Histoplasmose reportados no Brasil (1939 – 2018).....	15
Figura 02.	Ciclo de infecção pelo <i>Histoplasma</i>	17
Figura 03.	Região metropolitana de Manaus.....	30
Figura 04.	Fluxograma das atividades desenvolvidas no presente estudo.....	32
Figura 05.	Fluxograma da seleção para a visita do domicílio dos pacientes com Histoplasmose.....	33
Figura 06.	Coleta das amostras ambientais em tubo falcon de 50 ml.....	34
Figura 07.	Distribuição (frequência absoluta) por sexo e faixa etária dos pacientes com AIDS/HD atendidos na FMT-HVD no período de 2017 a 2019.....	39
Figura 08.	Naturalidade dos pacientes do estudo com coinfeção HD/AIDS.....	40
Figura 09.	Distribuição dos casos de AIDS/HD por zonas de Manaus no período de 2017 a 2019.....	41
Figura 10.	Distribuição anual de pacientes com AIDS/HD atendidos na FMT- HVD no período de 2017 a 2019 e o número de óbitos registrados nesse mesmo período.....	42
Figura 11.	Valor de LT-CD4+ dos pacientes ao diagnóstico com HD/AIDS.....	43
Figura 12.	Percentual de diagnóstico de Histoplasmose de acordo com o tipo de amostra coletada dos pacientes com AIDS atendidos no FMT-HVD no período de 2017 a 2019.....	43
Figura 13.	Coletas de amostras em ambiente domiciliar.....	45
Figura 14.	Coletas de amostras em ambiente público.....	46
Figura 15.	Poeira e fezes de pombo presentes na passarela para pedestres na zona Centro-Sul.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características sociodemográficas de pacientes com AIDS/HD atendidos na FMT-HVD, durante o período de 2017 a 2019.....	39
Tabela 2	Principais manifestações clínicas dos 62 pacientes com diagnóstico de AIDS associados a Histoplasmose.....	41
Tabela 3	Amostras ambientais contaminadas propositalmente com cultura de <i>Histoplasma capsulatum</i> submetidas a análise de qPCR para detecção do fungo.....	47
Tabela 4	Amostras ambientais de domicílios de pacientes com infecção fúngica sistêmica e de áreas públicas da cidade de Manaus/AM submetidas a análise de qPCR para detecção de <i>Histoplasma</i>	48

ABREVIATURAS E SIGLAS

μM – Micromolar
 μm – Micrômetro
AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
CEP – Conselho de Ética e Pesquisa
CDC – Center for Diseases Control
CV- Carga Viral
DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP's – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético
EIA – Enzima imuno ensaio
EUA – Estados Unidos da América
FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado
fg – Fentograma
g – Grama
g – ou RCF – Força Centrífuga Relativa
HAART – Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HE – Hematoxilina-Eosina
HDP – Histoplasmose disseminada progressiva
HPA – Histoplasmose pulmonar aguda
INPA – Instituto de Pesquisa da Amazônia
LBA – Lavado broncoalveolar
LCR – Líquido cefaloraquidiano
ml – Mililitro
mM – Milimolar
NaCl – Cloreto de sódio
ng – Nanograma
PAHO – Pan American Health Organization
pb – Pares de bases
PCR – Reação em cadeia de polimerase
pg – Picograma
pH – Potencial Hidrogeniônico
qPCR – PCR em tempo real
RNA - Reação de Cadeia Polimerase
RPM – Rotações por Minuto
SEMMAS – Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Sustentabilidade
SUS – Sistema Único de Saúde
TBE – Tris-ácido bórico-EDTA
Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano
Var. – Variedade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Aspectos históricos e gerais da Histoplasmose	14
3.2 Infecção por <i>Histoplasma capsulatum</i>	16
3.2.1 Formas clínicas.....	17
3.2.2 Diagnóstico da Histoplasmose	20
3.2.3 Tratamento	23
3.3 Histoplasmose em pacientes com AIDS.....	24
3.4 Fontes de infecções ambientais	25
4 ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS	29
4.1 Tipo de Pesquisa.....	29
4.2 Aspectos éticos e legais da Pesquisa	29
4.3 Local de realização da pesquisa.....	29
4.4 População	29
4.5 Amostras.....	30
4.6 Critérios de inclusão dos pacientes para a coleta no ambiente domiciliar	30
4.7 Critérios de exclusão dos pacientes para a coleta no ambiente domiciliar.....	31
4.8 Plano de Coleta de Dados.....	31
4.8.1 Informações dos Pacientes	31
4.8.2 Visita Domiciliar	31
4.9 Plano de Análise de Dados	33
4.10 Variáveis Analisadas	33
4.11 Coleta das Amostras	34
4.12 Detecção de <i>Histoplasma capsulatum</i> nas amostras ambientais.....	35
4.12.1 Ensaio de detecção de DNA positivo de <i>Histoplasma capsulatum</i>	35
4.12.2 Extração do DNA das amostras ambientais	36
4.12.3 Isolamento do DNA.....	36
4.12.4 Avaliação da qualidade e concentração de DNA das amostras estudadas....	37
4.12.5 Primers e sondas	36

4.12.6 PCR em tempo real.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Análise dos dados epidemiológicos de pacientes com histoplasrose e HIV/AIDS	38
5.2 Avaliação do domicílio dos pacientes com Histoplasrose.....	44
5.2.1 Características dos pacientes que aceitaram participar da pesquisa.....	44
5.2.2 Descrição dos domicílios e das amostras ambientais coletadas	45
5.2.3 Outras Fontes Ambientais	46
5.3 Análise de amostras ambientais para detecção de <i>Histoplasma capsulatum</i> por RT-PCR.....	47
6 CONCLUSÃO.....	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
APÊNDICE (1) - FICHA DO PACIENTE	59
APÊNDICE (2) - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	60
APÊNDICE (3) - FICHA DA CASA DO PACIENTE.....	62
ANEXO A – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	63

1 INTRODUÇÃO

Histoplasma capsulatum é um dos quatro principais patógenos fúngicos que causam infecções oportunistas que afetam os pacientes com HIV/AIDS em estágio avançado (LIMPER et al., 2017).

A histoplasmose é causada quando há inalação de esporos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* presentes no ambiente. A doença pode ocorrer por infecção primária ou por reativação endógena e sua apresentação clínica varia de acordo com o grau de comprometimento imunológico. A forma clínica mais grave dessa doença é a disseminada progressiva (PDH), que é mais frequente nos pacientes com AIDS. O acometimento em pacientes hígidos ocorre especialmente nos Estados Unidos e América Latina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No Brasil, antes do surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a histoplasmose era raramente diagnosticada, constituindo uma curiosidade observada apenas em doentes com linfoma ou outras neoplasias e, esporadicamente, em transplantados renais. Nos anos de 1980 a 1990, com o advento da AIDS, centenas de casos de histoplasmose, em particular na forma disseminada, foram observados entre os portadores desta síndrome (FERREIRA E BORGES, 2009) sendo a infecção sistêmica oportunista mais frequente encontrada neste grupo com altas taxas de mortalidade por ser muitas vezes confundida com outras doenças, como a tuberculose e pneumocistose (BRILHANTE et al., 2012)

No período de 1998 a 2006 foi observado que das 125.633 mortes relacionadas à AIDS, em 10,1% a causa básica associada foi a histoplasmose, o que representa a quarta causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. Estudos de séries de casos de histoplasmose em brasileiros infectados pelo HIV, mostraram uma taxa de mortalidade variando de 26,2 a 47,4% (DAMASCENO-ESCOURA et al., 2019).

Em 2014 em um estudo realizado na Bahia, 34 pacientes foram registrados com coinfeção de HIV e histoplasmose, e destes 22 vieram a óbito, o que mostra uma letalidade de 64,7% dos expostos à doença. Essa alta taxa de letalidade, considerando a histoplasmose como causa básica, intermediária ou terminal, pode indicar diagnóstico tardio, já na fase avançada da doença (GUARANI et al., 2015). As mortes relacionadas à histoplasmose podem ser bastante subestimadas, por ser frequentemente confundida com tuberculose e, quando os pacientes não respondem ao tratamento da tuberculose, isso pode levar a um diagnóstico incorreto de tuberculose resistente aos medicamentos. Consequentemente, numerosos casos e mortes por

tuberculose associada ao HIV relatados nas estatísticas nacionais de incidência e mortalidade são de fato causados pela histoplasmose (ADENIS et al., 2018).

O fato de no Brasil a histoplasmose não ser doença de notificação compulsória, torna extremamente difícil o mapeamento da real distribuição deste processo infeccioso, o que representa um importante problema de saúde pública, especialmente em ambientes urbanos onde morcegos, aves e humanos convivem dentro do mesmo ambiente domiciliar (AMORIM - CONSELHEIRO et al., 2019), sendo que a presença de propágulos fúngicos nessas áreas já foi documentada e pode ser importante para explicar os casos clínicos não associados a qualquer exposição a outros locais de alto risco para a infecção (LEON et al., 2012).

A presença da população de morcegos insetívoros e frugívoros tem crescido significativamente nas áreas urbanas devido à falta de planejamento para a urbanização, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de projetos arquitetônicos e paisagísticos, aumentando conseqüentemente o contato próximo entre morcegos, homens e animais domésticos (SANTOS et al., 2018).

No Amazonas há raros dados sobre a ocorrência do *Histoplasma capsulatum* no ambiente e todos são relatos de *Histoplasma capsulatum* em animais silvestres (ARIAS et al., 1982; NAIFF, MOK E NAIFF, 1985; NAIFF et al., 1996) ou em caverna (SILVA, 2021). Para ambiente urbano e domiciliar não há estudos.

Considerando toda a problemática relacionada a histoplasmose, dados que contribuam para conhecer a sua epidemiologia no Amazonas, associados aos diferentes fatores de infecção são importantes na avaliação de risco, sobre os quais as pessoas podem estar expostas ao *Histoplasma capsulatum*, já que uma vez desenvolvida a doença a letalidade é alta. Dessa forma, esse estudo se propõe a conhecer o perfil dos pacientes com HIV/AIDS com coinfeção de Histoplasmose disseminada no Amazonas e avaliar os domicílios desses pacientes como prováveis fontes de infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever as características clínico-epidemiológicas de pacientes com histoplasmose disseminada e com HIV/AIDS e avaliar a presença de *Histoplasma capsulatum* em fontes ambientais no período de 2017 a 2019.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever e caracterizar os aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da histoplasmose em pacientes com HIV/AIDS atendidos e notificados na FMT – HVD;
- Investigar o ambiente domiciliar de pacientes com diagnóstico de Histoplasmose e amostras ambientais urbanas como fonte de exposição ao *Histoplasma capsulatum*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos históricos e gerais da Histoplasmose

A histoplasmose é uma micose sistêmica causada por um fungo dimórfico, o *Histoplasma capsulatum var. capsulatum*. A doença foi pela primeira vez descrita por Samuel Darling, no Panamá, que entre 1905 e 1906 necropsiou três casos disseminados da doença, dois dos quais provenientes da Ilha de Martinica, onde hoje esta micose é reconhecidamente endêmica. Este patologista, durante a sua pesquisa, concluiu erroneamente que se tratava de um protozoário encapsulado, por se encontrar dentro do citoplasma dos histiócitos, por isso o nome de *Histoplasma capsulatum*. Em 1913, o brasileiro Henrique da Rocha Lima, em Hamburgo na Alemanha, concluiu que o agente etiológico tratava-se de um fungo leveduriforme e somente em 1934, o microrganismo foi corretamente identificado como um fungo com dimorfismo térmico (FERREIRA E BORGES, 2009; SILVA et al., 2019; LOCKHART et al., 2021). O *Histoplasma capsulatum var. capsulatum* é encontrado em solo, principalmente o solo rico em excrementos de aves ou de morcegos. Em meio de cultura à temperatura ambiente, *H. capsulatum var. capsulatum* cresce como saprófita e apresenta crescimento filamentosos, com hifas que produzem microconídios (elementos infectantes) e macroconídios tuberculados. Em meio de cultura a 37°C, *H. capsulatum var. capsulatum* cresce como um parasita e apresenta-se como um fungo semelhante a levedura, arredondado, de 2-4 µm de diâmetro (LACAZ, 2002).

A imunologia micológica foi desenvolvida após 1940 com os estudos da Coccidioidomicose e da Histoplasmose. Em virtude destes estudos, nasceu o conceito de micose doença e micose infecção. Um novo campo de interesse surgiu por volta de 1950, sob o título de Infecções Micóticas Ocasionalis (Micoses por Fungos Oportunistas) (OLIVEIRA, 2014).

Atualmente, a histoplasmose é uma das principais infecções sistêmicas do mundo, com incidência variando de 0,1 a 1 caso por 100 mil habitantes por ano em climas temperados, 10 a 100 casos por 100 mil nos trópicos úmidos, e mais de 100 casos por 100 mil em grupos de alto risco e durante surtos (RODRIGUES et al., 2020) e tem maior prevalência nas Américas, sendo o Brasil também considerado área endêmica, principalmente nas regiões do Nordeste (com ênfase no estado do Ceará) Centro-Oeste, Sul e Sudeste do país, tendo casos reportados em 19 dos 26 estados Brasileiros, bem como Distrito Federal (figura 01) (BAHR et al., 2015; ALMEIDA et al., 2019). Em 1978, um levantamento epidemiológico com testes cutâneos de

A forma pulmonar crônica acomete indivíduos portadores de enfisema pulmonar centrolobular e enfisema bolhoso, propiciando a colonização do *Histoplasma capsulatum* nessas lesões e pode assemelhar-se à tuberculose pulmonar (AIDE, 2009). Além dessas, a histoplasmose disseminada é outra manifestação da doença, onde vai ocorrer a disseminação hematogênica nos estágios iniciais da infecção, seja por primo-infecção ou reativação (KAUFFMAN, 2009). Os sintomas de pacientes com histoplasmose nem sempre são bem definidos, uma vez que se assemelha com os de outras doenças respiratórias. Por este motivo, a detecção rápida da histoplasmose é essencial para a definição do diagnóstico e tratamento adequado tanto em pacientes imunodeprimidos como em imunocompetentes (PIRES, 2017).

No Brasil, a ocorrência da histoplasmose tem sido descrita pela observação de casos clínicos autóctones, seja sob a forma de casos isolados ou sob a forma de microepidemias, bem como pela realização de inquéritos epidemiológicos empregando o teste cutâneo da histoplasmina (FREITAS, 2005) cujo os resultados demonstraram expressivos índices de positividade da infecção nas diferentes regiões do país (GUIMARÃES et al., 2006). Porém, o real problema da histoplasmose no Brasil ainda é subestimado, pois as informações disponíveis sobre a doença provêm de relatos e série de casos e/ou revisões publicadas na literatura, uma vez que a notificação da histoplasmose é obrigatória em apenas um dos 26 estados brasileiros (BRASIL, 2013; NASCIMENTO e GOMES, 2018; ALMEIDA et al., 2019).

3.2 Infecção por *Histoplasma capsulatum*

Histoplasma capsulatum cresce no solo enriquecido com nitrogênio, geralmente associado com guano de pássaros e morcegos. Também tem sido encontrado no solo de galinheiros (NORKAEW, 2013). Após a ruptura do solo, conídios e/ou fragmentos de hifas são inalados pelo hospedeiro e então absorvidos por macrófagos e outras células fagocíticas. Uma vez dentro do hospedeiro, ambos os esporos e filamentos dão origem a células de levedura, que evitam a morte por células fagocíticas e, em vez disso, replicam-se intracelularmente dentro de macrófagos e monócitos (Figura 02) (SIL, 2019). No entanto, *H. capsulatum* tem muitos obstáculos a superar para causar lesão ao hospedeiro, devendo contornar as barreiras da mucosa durante a inoculação aguda, evitar as respostas das células imunes do hospedeiro e encontrar seu nicho dentro dos macrófagos (MITTAL et al., 2019). O resultado da infecção por *H. capsulatum* é dependente das interações dinâmicas entre a imunidade inata, a imunidade adaptativa e os fatores de virulência fúngica. O controle da infecção por *H. capsulatum* é

amplamente baseado na ativação da imunidade celular em conjunto com as respostas inatas, uma vez que a doença progressiva com disseminação ocorre predominantemente na ausência de imunidade celular intacta. Curiosamente, há evidências experimentais recentes demonstrando que a suscetibilidade ao *H. capsulatum* depende fortemente da predisposição genética (NOSANCHUK; GACSER, 2019). Após a infecção geralmente manifestam-se doenças respiratórias semelhantes às da gripe, principalmente subclínicas ou leves. No entanto, quando o inóculo é maciço, pode levar a infecções agudas graves e potencialmente fatais. Uma pequena proporção de pacientes com doença pulmonar subjacente pode desenvolver infiltrados pulmonares fibróticos apicais crônicos e cavitação. Em pessoas imunossuprimidas, o *Histoplasma capsulatum* se espalha progressivamente para outros órgãos, causando uma infecção disseminada que, quando não tratada, é principalmente fatal (NACHER, et al., 2020).

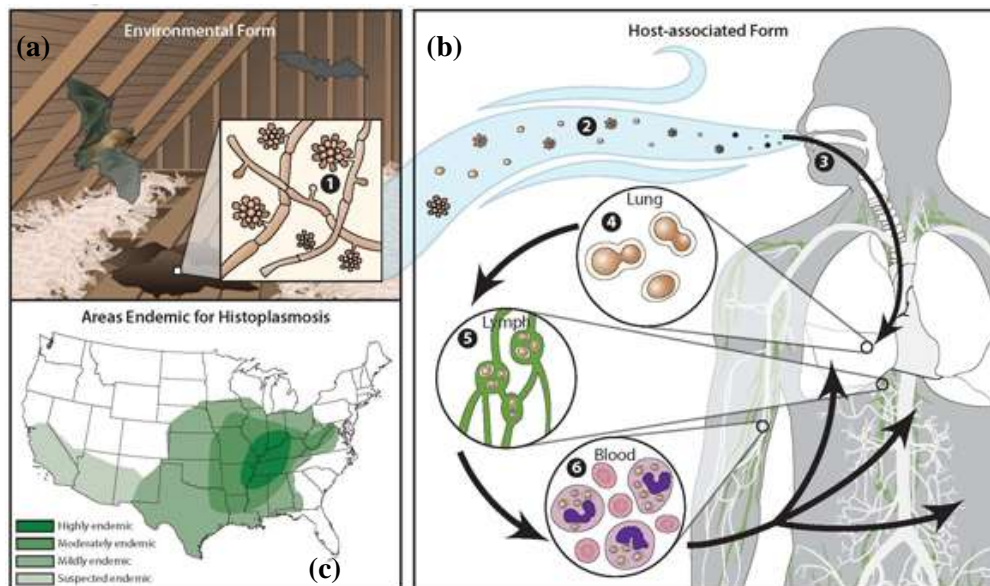


Figura 02: Ciclo de infecção pelo *Histoplasma*: (a) Contaminação no ambiente através do guano de morcego; (b) inalação dos microconídios pelo hospedeiro então absorvidos por macrófagos e outras células fagocíticas; (c) Áreas endêmicas para Histoplasmose (CDC)

3.2.1 Formas clínicas

Os sintomas da histoplasmose podem ser indistinguíveis de outras doenças infecciosas, dificultando o diagnóstico e o tratamento, como é o caso da histoplasmose disseminada que pode ser confundida principalmente com a tuberculose disseminada (TB) (PAHO, 2020). A apresentação clínica depende da intensidade da exposição e o status imunológico do hospedeiro. Após uma exposição a quantidades baixas de inóculo, a infecção é

assintomática em 99% dos indivíduos, e muitos desses casos nunca são identificados. Com exposição a inóculos em quantidades maiores, no entanto, grande parte dos indivíduos apresentam alguns sintomas variando de uma forma autolimitada no pulmão, histoplasmose aguda para doença pulmonar progressiva (GOMEZ, 2011).

3.2.1.1 Forma Pulmonar Aguda

A exposição ao *H. capsulatum* é extremamente comum para pessoas vivendo em áreas de endemicidade, mas a infecção sintomática é incomum. A grande maioria das pessoas infectadas não apresentam sintomas ou apresentam uma doença muito leve que nunca é reconhecida como histoplasmose (KAUFFMAN,2007). A resposta do tecido à invasão resulta em granulomas. Esses granulomas podem ser granulomas caseosos ou não caseosos, nos quais o cálcio pode ser depositado. A função dos granulomas é conter o crescimento de fungos. A inflamação granulomatosa organizada é tipicamente observada na doença autolimitada. O principal determinante dos sintomas é o tamanho do inóculo. O período de incubação típico é de 07 a 21 dias. Febre alta, dor de cabeça, tosse não produtiva e dor no peito são os principais sintomas (AKRAM; KOIRALA, 2021).

3.2.1.2 Forma Pulmonar Crônica

Na histoplasmose pulmonar crônica as lesões são frequentes nos lobos superiores e muitas vezes são confundidas com a tuberculose pulmonar de reinfecção e tratada como tal. Nas imagens de radiografias de tórax observa-se infiltrados irregulares que se consolidam e eventualmente progridem para áreas de cavitação dos pulmões, podendo agravar pela formação de fístulas broncopleurais e pneumotórax. Com o tempo, a inflamação se espalha para os tecidos circundantes, levando à fibrose, perda de volume com aumento compensatório das cavidades, porém em imunocompetentes, os nódulos não aumentam e geralmente são calcificados (AIDE, 2009; LAWRENCE et al., 2016).

3.2.1.3 Forma Neurológica

A doença do SNC ocorre em 5% a 20% dos pacientes, apresentando meningite crônica ou lesões cerebrais focais (GOMEZ, 2011). O envolvimento do SNC ocorre como resultado da disseminação hematogênica para as meninges ou cérebro. A meningite crônica é a manifestação mais comum e é caracterizada por envolvimento meníngeo basilar que pode levar à hidrocefalia comunicante. Com o aumento do uso de exames de imagem por ressonância magnética (MRI), tornou-se claro que pequenas lesões de realce do anel podem frequentemente ser encontradas em todo o cérebro e medula espinhal (KAUFFMAN, 2007).

3.2.1.4 Histoplasmose Disseminada

A histoplasmose disseminada é definida pela presença de foco extrapulmonar e extraganglionar mediastínicos de curso progressivo. O microrganismo obtém acesso à circulação através dos vasos linfáticos e dissemina-se pelo restante do corpo, podendo acometer tegumento, linfonodos, fígado, baço, rins, glândulas suprarrenais e olhos, com uveíte ou panofalmitite (SILVA et al., 2019). Esta é a forma menos comum da histoplasmose (10% dos casos) desenvolvendo-se principalmente em indivíduos com imunidade deficiente, tais como lactentes com sistema imune imaturo; hospedeiros imunocomprometidos, como receptores de órgãos tratados com corticóides e indivíduos infectados pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida) (ROSSINI; GOULART, 2006). É comum ocorrer lesões cutâneas incluindo pápulas difusas, pústulas, foliculite, úlceras, nódulos subcutâneos e erupções semelhantes à rosácea. Lesões do trato gastrointestinal com formação de massas ou ulcerações, causando dor, sangramento, perfuração ou má absorção assim como, lesões orofaríngeas, incluindo placas, nódulos e úlceras da língua, mucosa bucal, laringe ou lábios (WHEAT & KAUFFMAN, 2003).

Esta forma clínica da histoplasmose pode ser dividida em quatro subtipos, que são: histoplasmose disseminada aguda (tipo infantil), histoplasmose disseminada subaguda (tipo juvenil), histoplasmose disseminada crônica (tipo adulto) e histoplasmose oportunística (ROSSINI; GOULART, 2006).

3.2.2 Diagnóstico da Histoplasmose

O diagnóstico da histoplasmose baseia-se em uma abordagem multifacetada que inclui evidências clínicas, radiográficas e laboratoriais da doença. Os padrões ouro para diagnóstico laboratorial incluem demonstração de levedura no exame patológico do tecido e isolamento do molde na cultura de espécimes clínicos (AZAR; HAGE, 2017).

Em 2008 foi realizado um estudo onde buscou-se avaliar a validação entre o diagnóstico clínico e o diagnóstico da necropsia quanto as causas de óbito dos pacientes com AIDS, da FMT-HVD no período de 1996 a 2003 e constatou-se que dos 17 casos diagnosticados na necrópsia, apenas 5 haviam sido diagnosticados clinicamente *antemortem* (SOUZA et al., 2008). Recentemente, outro estudo no mesmo hospital de referência, avaliou a frequência e as características da infecção por *Histoplasma capsulatum* em 61 autópsias realizadas em pacientes que evoluíram para o óbito no período de 2014 a 2015 e a histoplasmose foi identificada em 34% (21) desses pacientes e em 22% foi a principal causa de morte dos pacientes com HIV/AIDS (RAKISLOVA et al., 2021). O retardo no diagnóstico e a confusão com outras doenças granulomatosas, especialmente tuberculose, contribuem com a evolução desfavorável da histoplasmose, mesmo depois de instituída terapêutica antifúngica específica (UNIS et al., 2004).

3.2.2.1 Cultura

Amostras de tecido ou fluidos corporais são enviados ao laboratório para cultura e são semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 25°C para permitir o crescimento da fase micelial de *H. capsulatum*. Após várias semanas, e às vezes até 6 semanas, ocorre o crescimento de um fungo filamentosso branco a castanho claro. Dois tipos de conídios são produzidos nas hifas. Os macroconídios, ou conídios tuberculados, têm de 8 a 15 µm de diâmetro e apresentam projeções distintas em sua superfície; os microconídios são pequenos (2 a 4 µm) e têm paredes lisas. A identificação dos macroconídios tuberculados permite um diagnóstico presuntivo de histoplasmose, entretanto, deve-se notar que fungos pertencentes ao gênero *Sepedonium* também formam macroconídios tuberculados semelhantes. Devido a isso, testes de confirmação são necessários para culturas suspeitas de *H. capsulatum* (MARTAGON-VILLAMIL et al., 2003; KAUFFMAN, 2007).

3.2.2.2 Histopatologia

Para um paciente com doença aguda, uma biópsia de tecido deve ser realizada o mais rápido possível para procurar *H. capsulatum*, sendo possível encontrar distintas leveduras de brotamento ovais com base estreita de 2 a 4 μm , permitindo um diagnóstico provisório de histoplasmose. Manchas de hematoxilina e eosina de rotina geralmente não permitem a visualização das pequenas leveduras, embora quando um grande número de organismos estão presentes, tem-se a impressão de que os macrófagos estão cheios de algo, no entanto, a exata natureza da substância não pode ser avaliada. As leveduras são tipicamente encontradas dentro de macrófagos, mas também podem ser vistos em tecidos.

Os esfregaços de sangue periférico de rotina às vezes mostram leveduras dentro de neutrófilos em pacientes que estão gravemente doentes com disseminação de histoplasmose (KAUFFMAN, 2007). Na fase crônica da doença, o granuloma pode ser macrofágico ou epitelióide, com carga fúngica variável. As lesões cicatriciais geralmente apresentam-se calcificadas e contêm fungos latentes, que podem causar reativações endógenas da doença. Para um diagnóstico seguro, sugere-se envolver cultura das lesões e sorologia (SIDRIM, 1999).

3.2.2.3 Sorologia

Os três ensaios sorológicos mais comuns para a histoplasmose incluem o teste de imunodifusão (ID), teste de fixação de complemento (FC) e o de enzima imunoensaio (EIA).

- O teste de ID detecta a presença de anticorpos séricos que precipitam no gel de ágar após ligação com os antígenos “H” e “M” (AZAR E HAGE, 2017). As precipitinas contra o antígeno “M” são as primeiras a aparecer na histoplasmose pulmonar aguda e as precipitinas “H” ocorrem mais tarde e com menos frequência, e sua presença está mais frequentemente ligada à disseminação extrapulmonar (IMMY, 2019). Inquéritos sorológicos utilizando a imunodifusão já demonstravam ser eficazes, como pôde ser observado em um levantamento sorológico de 4 micoses profundas realizado no estado do Amazonas, em um sanatório de tuberculose em Manaus, onde dos 18 casos de micoses identificadas no soro dos pacientes, 02 foram referentes a histoplasmoses (MOK et al, 1979).

- Os testes de fixação do complemento (FC) para histoplasmose têm uma faixa de sensibilidade de 70 a 90%, mas são menos específicos que a imunodifusão (70 a 80%) (GUIMARÃES et al., 2006).
- O consenso de histoplasmose da OMS/OPAS/CDC trouxe vários avanços, entre eles se destaca o antígeno urinário de *Histoplasma* como o teste de escolha para diagnóstico. Os testes de detecção de antígeno têm o desempenho analítico mais alto para o diagnóstico de histoplasmose disseminada entre pessoas que vivem com HIV (sensibilidade geral 95% e especificidade 97%). De acordo com a metanálise desenvolvida por este grupo de estudo, observou-se que detecção de antígenos foi o método mais preciso para diagnosticar histoplasmose em pessoas que vivem com HIV (PAHO, 2020). A alta incidência de histoplasmose entre os pacientes com AIDS e a gravidade da histoplasmose nesses pacientes, validam a necessidade de um método de diagnóstico mais rápido e sensível (GUTIERREZ et al., 2005). Em ambientes onde o teste de antígeno do *Histoplasma* foi implementado, o número de casos diagnosticados aumentou significativamente e a mortalidade associada à histoplasmose disseminada entre pessoas que vivem com HIV diminuiu. Vale ressaltar que estas recomendações se aplicam para casos de histoplasmose disseminadas, e que em casos de histoplasmose pulmonar, cutânea e neurológica, faz-se necessário a complementação de testes sorológicos, cultura e/ou histopatológico (PAHO, 2020; KAUFFMAN, 2003).

3.2.2.4 Reação da Cadeia de Polimerase – PCR e qPCR

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) está sendo cada vez mais aplicada em rotina para detecção de genes humanos e de microrganismos patogênicos. De uma forma geral, os métodos moleculares são úteis no diagnóstico, atendendo aos requisitos de sensibilidade, especificidade e rapidez (CARCERES, 2019), porém dentre os métodos moleculares utilizados para o diagnóstico, alguns falham em detectar a presença de fungos como do *H. capsulatum* devido à alta variabilidade genética (LEON et al., 2012).

Vários ensaios convencionais para detectar o DNA de *H. capsulatum*, direcionado a genes de uma ou várias cópias, tem sido relatado. Buitrago et al. (2013) concluíram que os protocolos com base em alvos de multicópia são mais eficientes na detecção das menores

quantidades de DNA, tornando-os mais adequados para seu uso no diagnóstico. Carceres et al. (2020), constataram que ensaios utilizando o modo multiplex podem ter alta aplicabilidade no cuidado de pessoas com HIV em estágio avançado e também no cuidado de outros pacientes imunocomprometido. Além disso, os protocolos de PCR em tempo real foram altamente sensíveis e específicos e parecem ser uma ferramenta promissora para detectar este patógeno em amostras clínicas. Esses métodos moleculares são mais rápidos do que culturas e evitam a manipulação do fungo.

3.2.2.5 Teste Cutâneo

O teste cutâneo é particularmente útil em estudos epidemiológicos em regiões geográficas não endêmicas em indivíduos que ocasionalmente visitam áreas endêmicas ou durante epidemias. Este método avalia a reatividade dos pacientes com histoplasmose quando em contato intradermicamente com a proteínas fúngicas (HMIN). Alguns estudos têm sugerido que essa metodologia tem aplicação no diagnóstico de infecções primárias, sintomáticas ou assintomáticas causadas por *H. capsulatum* em indivíduos imunocompetentes. No entanto, o teste cutâneo HMIN é atualmente mais utilizado para fins de pesquisa do que para fins clínicos (GUIMARÃES et al., 2006).

3.2.3 Tratamento

A histoplasmose geralmente é uma infecção benigna e autolimitada. Os casos de regressão espontânea não necessitam de tratamento específico, sendo repouso e observação clínica as medidas mais eficazes (ROSSINI; GOULART, 2006).

O recente guideline em histoplasmose atualiza recomendações para o tratamento em indivíduos vivendo com HIV. Em casos de histoplasmose leve a moderada entre pessoas que vivem com HIV, itraconazol 200 mg três vezes ao dia por três dias e depois, 200 mg duas vezes ao dia, e no caso de histoplasmose grave ou moderadamente grave entre pessoas que vivem com HIV, anfotericina B lipossomal, 3,0 mg/kg, por duas semanas. Em ambientes onde a anfotericina B lipossomal não está disponível, desoxicolato de anfotericina B, 0,7– 1,0 mg/kg, é recomendado por duas semanas. Uma vez que anfotericina B desoxicolato pode estar associada à toxicidade renal, a terapia pode precisar ser mais curta do que duas semanas com base em a avaliação clínica de como a pessoa responde ao tratamento. Envolvimento do sistema

nervoso central pode exigir extensão da terapia de indução ou aumento da dosagem (PEREZ et al., 2021).

3.3 Histoplasmose em pacientes com AIDS

Segundo os critérios do CDC adaptado, considera-se caso de AIDS, para fins de vigilância epidemiológica, todo indivíduo com 13 anos de idade ou mais que apresentar evidência laboratorial de infecção pelo HIV, independentemente da presença de outras causas de imunodeficiência, na qual seja diagnosticada pelo menos uma doença indicativa de AIDS, dentre as quais está a Histoplasmose Disseminada ou a quantificação de linfócitos de CD4 + e CD8+ inferior a 350 células/mm³. A principal vantagem prevista com a adoção desse critério está, justamente, em permitir a vigilância epidemiológica mais precoce da infecção pelo HIV/AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A partir de 1987 todos os casos de indivíduos infectados pelo HIV com histoplasmose extrapulmonar foram definidos como tendo AIDS, pelo Centers for Disease Control (CDC). Em áreas endêmicas da micose, esta doença pode representar a primeira manifestação da AIDS. Nesta síndrome, como em outras doenças imunodepressoras, a histoplasmose representa, muito provavelmente, uma reativação de focos latentes de infecção pregressa ou, mais raramente, aquisição exógena, por ocasião da imunodepressão (ROUSSINI; GOULART, 2006).

Os países das Américas têm a meta de eliminar o HIV como problema de saúde pública até 2030. Na América Latina, a histoplasmose é uma das infecções oportunistas mais prevalentes que afetam as pessoas que vivem com HIV (PVHIV), com uma alta taxa de mortalidade de até 30%. A histoplasmose disseminada geralmente ocorre quando a contagem de células CD4+ é <150 células/mm³ e suas taxas de prevalência variam amplamente. Um estudo de 2012 estimou 6.710 a 15.657 casos de histoplasmose entre PVHIV na América Latina a cada ano. Em alguns países, estima-se que a prevalência e a mortalidade associadas à histoplasmose sejam equivalentes ou superiores à da tuberculose, indicando que a histoplasmose pode ser responsável por uma proporção significativa das mortes a cada ano em alguns países latino-americanos (LOCKHART, et al., 2021). A mortalidade da AIDS associada a histoplasmose varia entre 20% e 70% principalmente em países em desenvolvimento (FALCI et al., 2019).

Em um estudo de caso realizado em Bangladesh, foi observado como muitas vezes o diagnóstico de histoplasmose é negligenciado e tratado erroneamente como tuberculose, o que pode agravar a situação do paciente e levá-lo a óbito, por isso um diagnóstico diferencial para

doenças fúngicas deve ser considerado, em especial o da histoplasmose. O mesmo estudo ainda relata que na Guatemala dos 8 pacientes diagnosticados em um período de 10 anos, todos haviam sido diagnosticados e tratados inicialmente como tuberculose associados a HIV quando na verdade se tratava de histoplasmose (PERVEZ et al., 2010).

Uma pesquisa na Colômbia observou a co-infecção de AIDS em 70,5% dos adultos com histoplasmose e esta foi a causa definidora de AIDS em 29,3% dos casos de AIDS. Se as infecções em pacientes em regiões endêmicas são causadas por exposição exógena ou a reativação de infecções antigas, ainda é desconhecido (GOMES, 2011).

Em Fortaleza, de 378 pacientes com HIV hospitalizados, 164 (43,4%) tinham histoplasmose disseminada (DAHER et al., 2007) e outro estudo de triagem realizado em pacientes com HIV hospitalizados no Brasil encontrou alta prevalência do antígeno de *Histoplasma capsulatum*, variando de 8,8% em Porto Alegre a 44,8% em Natal (FALCI et al., 2019).

Há poucos estudos sobre a prevalência de histoplasmose infecção no Estado do Amazonas. Entre 2017 a 2019, foram registrados 1.372 casos de AIDS no Amazonas e destes indivíduos, 62 (5,2%) foram associados a Histoplasmose (Boletim Epidemiológico FMT-HVD, 2017, 2018, 2019).

3.4 Fontes de infecções ambientais

O *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* como todo organismo vivo, é afetado diretamente por fatores físico-químicos e biológicos do ambiente, fenômeno condicionante, na maioria das vezes, de habitats próprios e muito restrito às diferentes espécies de seres vivos. Sendo assim, observa-se que o *Histoplasma capsulatum* está condicionado a fatores como: umidade, temperatura, tipo de solo e substratos nutritivos disponíveis (ZANCOPÉ - OLIVEIRA; WANKE, 1986).

Pouco se sabe sobre a distribuição e habitats naturais de *H. capsulatum* nas florestas tropicais da Amazônia. O isolamento de *Histoplasma capsulatum* através do método indireto de inoculação de hamster, foi obtido de oito espécies diferentes de mamíferos silvestres capturados em florestas virgens no nordeste e sudoeste da Amazônia brasileira. A presença de *Histoplasma capsulatum* em animais selvagens adquirido naturalmente é indicativo da presença do fungo no ambiente de vivência desses animais (NAIFF et al., 1985; NAIFF et al., 1996).

Antigos edifícios abandonados e cavernas geralmente contêm altas concentrações de *H. capsulatum*. A demolição de edifícios, o movimento do solo, a limpeza de estruturas de pontes

e a espeleologia têm sido implicados como fonte pontual para a dispersão do organismo (BEZERRA, 2013).

O isolamento de *Histoplasma capsulatum* de amostras ambientais e de animais têm contribuído para definir microrregiões onde ocorrem exposição e a infecção humana, mas devido ao pequeno número de isolamentos realizados, permanecem desconhecidos, em grandes áreas brasileiras, os locais nos quais os fungos fazem o ciclo de vida saprófita e onde podem infectar o homem (MARTINEZ et al., 2002). Galvão Dias (2009), analisou a infecção de 87 isolados de *H. capsulatum* (3,58%) no fígado e baço de morcegos presentes na área urbana. Este fato é importante porque morcegos contaminados podem ser fonte de disseminação e risco para pessoas e animais adquirirem a infecção. O conhecimento da história natural da histoplasmose em áreas urbanas pode ter um importante papel no estabelecimento de estratégias de prevenção (GALVÃO DIAS, 2009).

Martins e colaboradores (2005) realizaram um estudo com dados obtidos dos prontuários dos pacientes atendidos em uma clínica particular no Rio de Janeiro, onde o resultado apontou que todos os pacientes diagnosticados com histoplasmose residiam em área urbana e que a presença da Histoplasmose em áreas urbanas era uma realidade, sendo muitas vezes subdiagnosticada, devido aos sintomas inespecíficos e a remissão espontânea em muitos casos (indivíduos imunocompetentes). Estudos como este, são de grande importância para a epidemiologia na construção de um banco de dados mais fidedigno da real distribuição do *Histoplasma capsulatum*.

As áreas de casas com quintais podem manter alguns hábitos comuns que propague a de disseminação de fungos, como manipulação do solo, criação de pássaros e plantações de árvores para paisagismo ou alimentação (CORREA et al., 2016). Em um inquérito realizado no Ceará, foi observado que a presença de mangueiras na vizinhança ($p=0,040$), atividade passadas com o solo ($p=0,045$) e ter visitado fazendas no passado ($p=0,033$) foram mais significativos nas reações positivas aos testes intradérmicos do que ter realizado limpeza de sótãos e galinheiros no passado o que pode demonstrar que locais de risco a exposição ao *Histoplasma capsulatum* estão mudando e que é possível uma contaminação mesmo que a pessoa não tenha visitado outros locais, anteriormente considerados como de risco (BEZERRA, 2013).

Gomez et al. (2018) chamaram a atenção para outra fonte de infecção ambiental que as pessoas têm muito acesso, que são os fertilizantes orgânicos ou solos para jardinagem. Esses solos são ricos em fósforo e nitrogênio porque são enriquecidos com esterco de aves e morcegos, sendo propício a proliferação do fungo do *Histoplasma capsulatum*. A substituição

de matéria orgânica no agroecossistemas é necessária nos trópicos e o uso de fertilizantes orgânicos aumentou. Esta é uma observação importante, pois em 2005, houve um surto de histoplasmose entre 200 estudantes americanos que estavam de férias em Acapulco no México, e após as investigações foram constatadas que a fonte de infecção foram vasos de plantas ornamentais que haviam sido adubadas com composto orgânico provenientes de um viveiro local (TAYLOR et al., 2005). Na Colômbia em um estudo realizado em 2019, das 393 amostras ambientais testadas, um total de 39 (9,9%) foram positivos por PCR Nested com Hc100. Das amostras positivas, 21 (5,3%) foram de fertilizantes compostados e adubos orgânicos, 17 amostras (4,3%) eram de fezes de aves ou esterco de frangos e 01 (0,3%) de uma caverna (excremento do chão/morcego). Foram encontradas taxas de positividade mais altas para amostras sem tratamento de compostagem 18/120 (15%) em comparação com amostras compostas 21/273 (7,7%). O fato de que, entre as amostras positivas, 21% foram encontradas em amostras não compostadas a apenas 7,7% das compostadas, sugere que um processo de compostagem feito corretamente possa reduzir o risco de exposição a *H. capsulatum* ao manipular o produto final do fertilizante orgânico. Isso ocorre porque o processo de compostagem é um processo espontâneo de decomposição de matéria orgânica, principalmente aeróbica, na qual principalmente bactérias e fungos participam. A matéria orgânica é transformada em fertilizante livre de toxinas e microorganismos patogênicos devido à ação dos microorganismos saprófitos (GOMEZ, 2019).

Vários métodos de biologia molecular têm sido utilizados na detecção do *H. capsulatum* no ambiente. Amorim-Conselheiro et al. (2019) estudaram o ambiente urbano de São Paulo coletando amostras de fezes de morcegos instalados dentro de casas e tiveram êxito na detecção de *H. capsulatum* utilizando o método para extração de DNA PowerSoil e PCR em tempo real. Dos 59 locais visitados foi observado a presença do *Histoplasma capsulatum* em 09 (15%). A escolha do PCR em tempo real demonstrou ter detecção rápida, o que torna esta técnica importante, uma vez que a histoplasmose tem se tornado cada vez mais comum nas zonas urbanas, embora já tenha sido considerada uma doença principalmente de comunidades rurais (MATA-ESSAYAG et al., 2008).

Silva (2021) apresentou o desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo utilizando um conjunto de primers e sonda para detecção de *H. capsulatum* com PCR e PCR em tempo real (qPCR) tendo como alvo a região ITS do DNAr. O desenho desenvolvido demonstrou *in silico* ser tão ou mais adequado que outras propostas que tinham como alvo esta mesma região. O conjunto demonstrou resultados satisfatórios

quanto ao limite de detecção, 10 fg/ μ L de amostra (20 fg/reacção), curva padrão adequada (r^2 0,97), baixo erro experimental, ausência de reacção cruzada com outros organismos patogênicos, sensibilidade e especificidade adequados. Esse novo conjunto de primers e sonda foi aplicado em 30 amostras de solo de grutas/cavernas do Município de Presidente Figueiredo – AM, sendo detectado a presença de DNA de *H. capsulatum* em uma amostra. Os resultados deste estudo, demonstram que a qPCR é uma nova opção de detecção/diagnóstico que poderá ajudar no entendimento da distribuição ambiental do patógeno bem como no diagnóstico clínico em amostras biológicas.

4 ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS

4.1 Tipo de Pesquisa

Estudo Observacional, descritivo, Tipo Transversal, comparando as características clínico-epidemiológicas com o ambiente e outros fatores associados a histoplasmose em pacientes com HIV/AIDS.

4.2 Aspectos éticos e legais da Pesquisa

O plano de pesquisa foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa por meio da Plataforma Brasil e aprovado com o CAAE 82715917.4.0000.0005. Os pacientes foram incluídos mediante aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi solicitado um adendo ao Comitê de Ética solicitando a inclusão dos dados dos pacientes do ano de 2019 para aumentar o universo da amostra.

4.3 Local de realização da pesquisa

A seleção dos pacientes se deu através de pacientes com diagnóstico positivo para histoplasmose realizado pelo Laboratório de Micologia Médica da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD e a coleta dos dados clínico-epidemiológico foi realizada através da consulta ao sistema de prontuário eletrônico iDoctor, que é o sistema padrão da instituição. A escolha do local deu-se por se tratar de Hospital de referência do estado do Amazonas para os pacientes portadores de HIV/AIDS e por concentrar a maioria das internações dos casos de infectologia e dermatologia dos municípios do Amazonas, capital e cidades do interior do estado.

4.4 População

A população do estudo foi constituída por pacientes diagnosticados com HIV/AIDS associados a histoplasmose na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), no período de 2017, 2018 e 2019.

4.5 Amostras

As amostras para detecção de *Histoplasma* no ambiente, foram obtidas a partir de coletas no domicílio e peridomicílio dos pacientes com o diagnóstico de histoplasmose.

Também foram incluídas no estudo amostras de solo e poeira domiciliar já disponíveis e armazenadas a -20° C na FIOCRUZ provenientes do domicílio de pacientes com HIV/AIDS mas sem o diagnóstico de Histoplasmose, além de amostras de locais públicos como praças e passarelas e amostras de adubo orgânico composto de uma fonte de matéria orgânica (ou seja, restos de comida, material de poda, palha ou serragem) e uma fonte de nitrogênio (ou seja, excremento de animais) disponíveis nos comércios em geral.

4.6 Critérios de inclusão dos pacientes para a coleta no ambiente domiciliar

Foram incluídos no estudo domicílios de pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, com coinfeção HIV/AIDS e histoplasmose confirmados laboratorialmente, residindo em Manaus ou em município da região metropolitana da capital (figura 03) e que, após prestadas as devidas informações e esclarecimentos com relação ao estudo, aceitaram participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 01). Também foi considerado o tempo de moradia no domicílio e se o mesmo já residia no mesmo local na data do seu diagnóstico de histoplasmose.



Figura 03: Região metropolitana de Manaus / Fonte: SRMM, 2010

4.7 Critérios de exclusão dos pacientes para a coleta no ambiente domiciliar

Residir em outro município, a impossibilidade de contato através dos números telefônicos informados, mudança de endereço e/ou mudança no ambiente, recusas e a não comprovação do diagnóstico de histoplasmose.

4.8 Plano de Coleta de Dados

4.8.1 Informações dos Pacientes

Os dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes com HIV/AIDS diagnosticados com histoplasmose nos anos de 2017 a 2019 foram coletados do prontuário eletrônico iDoctor e requisições da FMT – HVD.

4.8.2 Visita Domiciliar

Primeira Etapa: Permissão via telefone

Foi realizado contato via telefone disponibilizado nos prontuários para verificar se não houve mudança para outro endereço e permissão para a visita domiciliar.

Segunda Etapa: Visita Domiciliar

Após esse processo, nos dirigimos a residência onde foi explicado novamente sobre a pesquisa e apresentado o TCLE (Apêndice 01) e posterior a assinatura.

A aplicação do questionário 01 (Apêndice 02) constou de perguntas a cerca de dados epidemiológicos (idade, sexo, raça, escolaridade, profissão, estado civil, endereço e naturalidade), dados correlacionados ao HIV/AIDS (contagem de leucócitos, início dos sintomas, data do diagnóstico, método de diagnóstico), se possuía diagnóstico para outros problemas respiratórios e se viajou para outras cidades antes do diagnóstico da histoplasmose. Estas informações visavam complementar e atualizar as obtidas previamente no prontuário eletrônico.

Após a vistoria no entorno do domicílio para identificar a presença de árvores, aves no domicílio/peridomicílio foi aplicado então, o questionário 02 (Apêndice 3) contendo perguntas sobre o ambiente domiciliar (tipo de casa, quintal, árvores, criação de aves, presença de morcegos), tempo de moradia, número de moradores e posterior coleta de amostra. Essas atividades estão detalhadas nos fluxogramas das figuras 04 e 05.

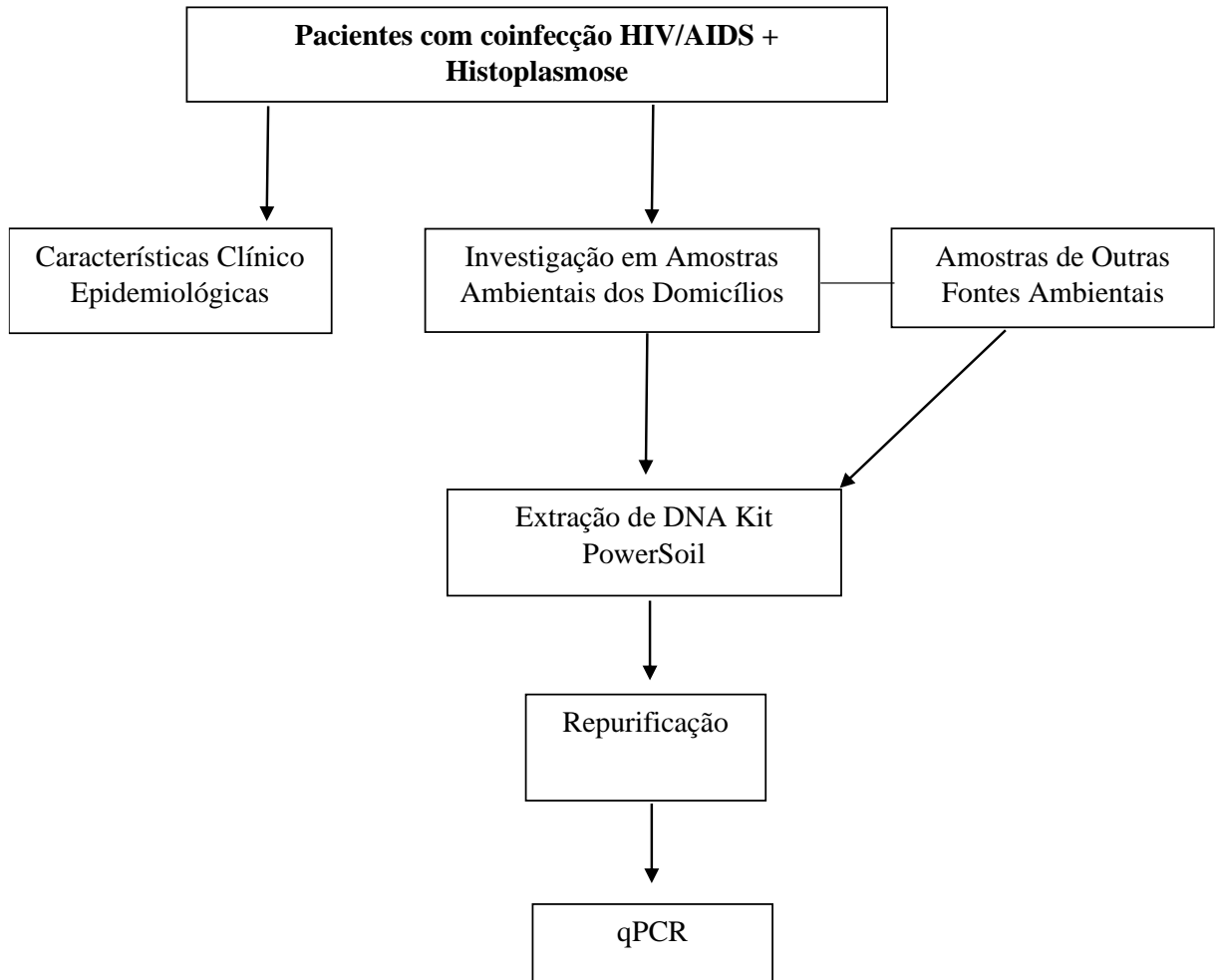


Figura 04: Fluxograma das atividades desenvolvidas no presente estudo

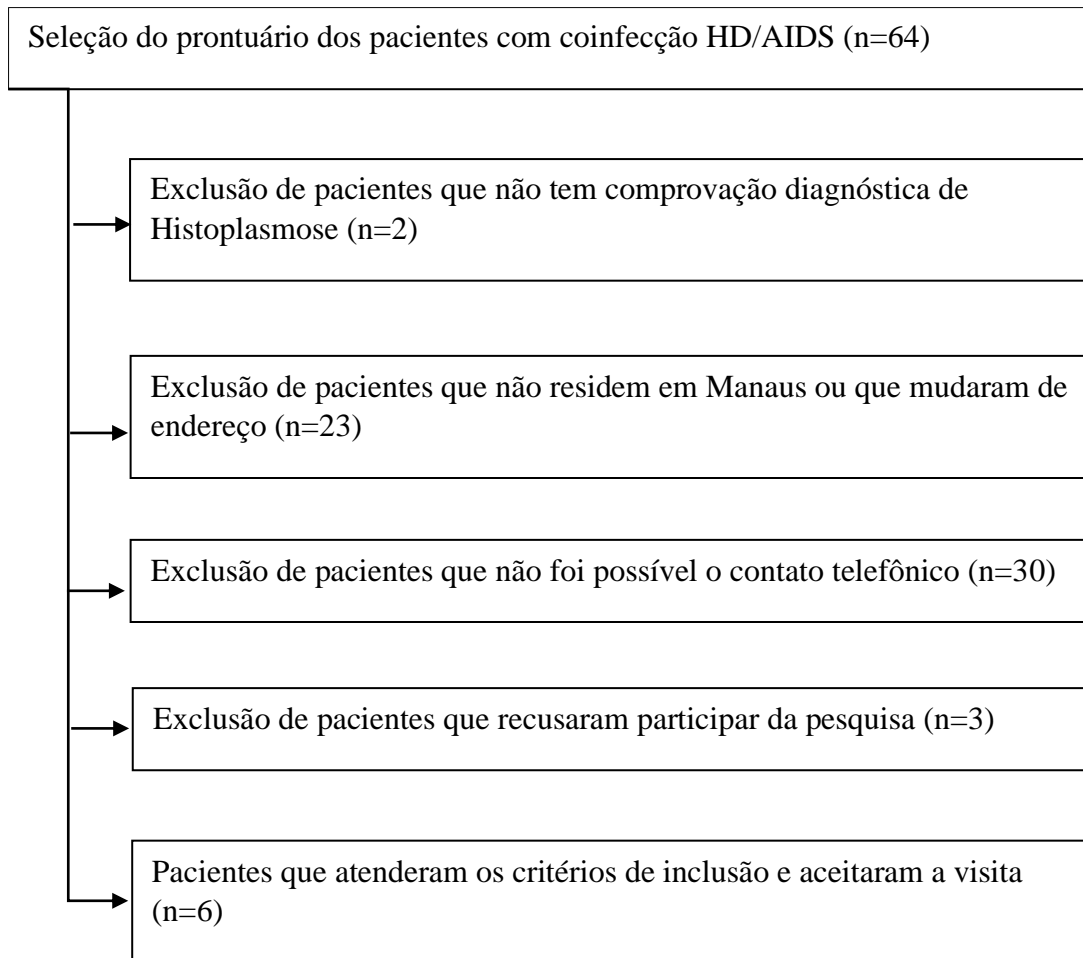


Figura 05: Fluxograma da seleção para a visita do domicílio dos pacientes com Histoplasmose

4.9 Plano de Análise de Dados

As respostas obtidas através do questionário, foram tabuladas utilizando o programa do Microsoft Excel. Foi realizada análise estatística com medidas de frequência e média.

4.10 Variáveis Analisadas

Dados sociodemográficos: foram considerados sexo, idade, estado civil, naturalidade, procedência, ocupação, escolaridade.

Dados da Epidemiologia da histoplasmose: residência em zona urbana e rural, contato com criadouro de ave, árvores antigas no quintal ou próximas da residência, frequentar locais como cavernas ou similares, presença de morcegos ou pombos no domicílio ou nas proximidades, poeira, fezes de morcego ou aves, construções antigas e tipo de profissão.

Dados clínicos do HIV/AIDS: diagnóstico por HIV/AIDS, uso de terapia antirretroviral.

Dados clínicos e laboratoriais: dentre os dados clínicos foram catalogados, data do diagnóstico da histoplasmose, tipo de tratamento antifúngico, contagem de células CD4 <150 células por mm³ e evolução.

4.11 Coleta das Amostras

As coletas foram realizadas utilizando luva de procedimento, óculos de proteção e máscara N95. As amostras foram coletadas com espátulas estéreis e colocadas em frascos também estéreis (tubos de Falcon) de 50 ml (figura 06) e mantidas sob refrigeração a -20° C até o processamento que foi realizado no Laboratório de Micologia da FIOCRUZ. Todas as amostras foram identificadas com respectivos códigos incluindo iniciais das amostras e número da casa.

Os domicílios visitados estavam localizados na zona Norte, distribuídos nos bairros Novo Israel, Cidade Nova, Colônia Terra Nova e Monte das Oliveiras e na zona Leste, nos bairros Colônia Antônio Aleixo e São José Operário. Em cada bairro foi realizado 01 visita onde foram coletados solos, ocos e/ou casca de árvores em estado de decomposição e poeira domiciliar decorrente de varrição. Adubos orgânicos foram adquiridos de fontes comerciais de diferentes fabricantes.



Figura 06: Coleta das amostras ambientais em tubo Falcon de 50 ml

4.12 Detecção de *Histoplasma capsulatum* nas amostras ambientais

As amostras ambientais coletadas foram pesadas 0,25 a 0,30g e em seguida submetidas ao processo de extração DNA fúngico, utilizando o Kit comercial PowerSoil® seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. As amostras foram armazenadas a -20° C e em seguida submetidas a PCR em tempo real no laboratório de Micobacteriologia do INPA. A escolha da técnica de biologia molecular, foi elegível por se tratar de um diagnóstico de alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Quanto ao conjunto de *primers* utilizados foram os mesmos desenvolvidos no estudo de Silva (2021), que em seu estudo, buscou analisar a presença de *Histoplasma capsulatum* em ambientes de cavernas.

4.12.1 Ensaio de detecção de DNA positivo para *Histoplasma capsulatum*

Para as atividades de padronização do controle positivo foram utilizadas amostras de DNA de três isolados clínicos de *Histoplasma capsulatum* (FMT154/2, FMT776 e FMT111) oriundos da coleção da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD. Fragmentos de 1mm (1 alçada) das colônias dos isolados FMT154/2 ou FMT776 foram colocados em tubos Falcon em água salinizada. Foram selecionadas 2 amostras de poeira domiciliar e 2 amostras de adubo orgânico para serem submetidas ao processo de esterilização antes da inoculação proposital do fungo com o objetivo de não termos interferência de outros DNA. Também foram contaminadas 2 amostras de poeira domiciliar e 2 amostras de adubo sem passar pelo processo de esterilização, visando a comparação das amostras nas diferentes situações. O DNA dessas amostras (poeira+fungo e adubo+fungo) foi extraído através do kit PowerSoil® (Qiagen Hilden – Germany) de acordo com as instruções do fabricante e usado para determinar o limite de detecção nas amostras positivas em todas as reações de PCR e qPCR a serem realizadas.

DNA do *Histoplasma capsulatum* (FMT111) em cultura pura foi extraído utilizando o kit Blood and Tissue (Qiagen Hilden – Germany), seguindo o protocolo do fabricante.

4.12.2 Extração do DNA das amostras ambientais

Foi utilizado o kit de isolamento de DNA PowerSoil® que é destinado a extração de DNA genômico de amostras ambientais que podem conter um alto teor de ácido húmico. O protocolo indica os seguintes passos:

Preparo do lisado: Foi adicionado 0,25 gramas de amostra ambiental ao tubo PowerBead e adicionado 60µl da solução C1 e depois submetido ao vórtex por 10 min. Em seguida centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos. Foi transferido 400-500µl do sobrenadante com cuidado para evitar a transferência da camada de detritos que se forma sobre o pelet da esfera e depois adicionada 250µl da solução C2, realizado agitação por vórtex por 5 segundos, incubado a temperatura de 2-8°C por 5 minutos e centrifugado a 10.000 x g por 1 minuto. Em seguida foram transferidos 600µl do sobrenadante para um tubo limpo de 2 ml e adicionados 200µl da solução C3 e 5 segundos no vórtex e incubado novamente a temperatura de 2-8° C e depois submetido a centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto. Transferidos 750µl de sobrenadante para novo tubo de 2 ml e acrescentados 1200µl da solução C4 e levado novamente submetidos a agitação por vórtex por mais 5 segundos.

Ligação do DNA a coluna: Foram adicionados 675µl de sobrenadante a coluna Spin MB e centrifugado a 10.000 x g por 1 minuto e o fluxo descartado. Este processo foi repetido 3 vezes. Em seguida foram adicionados 500µl da solução C5 e centrifugados a 10.000 x g por 30 segundos. Descartado o fluxo e centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos. O fluxo final foi descartado e a coluna (seca) foi centrifugada a 10.000 x g por 1 minuto.

Lavagem e Eluição do DNA: A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 ml e adicionados 75µl da solução C6 e centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos. Após esse procedimento a coluna Spin MB foi descartada e o DNA purificado ficou no tubo que foi armazenado a -20° C.

4.12.3 Isolamento do DNA

Foi utilizado para a purificação do DNA obtido das amostras coletadas a metodologia desenvolvida por Devi et al. (2015) com modificações. O DNA foi descongelado lentamente e depois centrifugado a 12.000g, 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso com 200 µl de tampão TE autoclavado (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8). Foi adicionado 200 µL da

mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugada a 12.000 g durante 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionados 200 µl de isopropanol gelado. Foi permitido precipitar durante 5 min e foi centrifugada a 12.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 µl etanol a 70% e centrifugado a 12.000 g durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e sedimento foi seco ao ar e dissolvido em 25 µl de tampão TE (pH 8).

4.12.4 Avaliação da qualidade e concentração de DNA das amostras estudadas

A avaliação da integridade do DNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizado em luz Ultravioleta (UV). O grau de pureza do DNA extraído das amostras foram medidas utilizando o espectrofotômetro UV- Vis Biodrop Duo (Nova Analítica) nas razões de absorbância de A260/A280 e A260/A230.

4.12.5 *Primers* e sonda

As reações com as amostras foram do tipo multiplex, ou seja, com primers e sondas para B-actina (controle interno positivo) e *H. capsulatum* na mesma reação. Foram utilizados os primers HcITS106F, HcITS205R e B-act862-F e B-act972-R, sonda HcITS-127P-FAM e B-act884P-VIC. O fragmento amplificado deste gene, juntamente ou não, com as sequências alvo ITS de *H. capsulatum*, validam as reações para o fungo. A ausência do amplicon de beta-actina indica a presença de inibidores da qPCR ou falhas nos procedimentos durante o processo pré-analítico e analítico. Assim, com base na sequência nucleotídica do gene da beta-actina, foram desenhados um par de primers e uma sonda marcada com o fluoróforo VIC, específicos para esse gene. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Micobacteriologia do INPA.

4.12.5 PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada conforme procedimento adotado por Silva, (2021, visando a região ITS1 do DNA ribossômico de *H. capsulatum*. A sequência alvo foi amplificada em uma reação final de 12µl contendo 1X Maxima Probe Master Mix qPCR (2X) (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,2 µM de cada primer, 0,2 µM de sonda e 2µL de DNA extraído da amostra. A qPCR foi realizada usando um termociclador QuantStudio 3 do

Laboratório de Micobacteriologia do INPA, gerando amplicons de 100 pares de base de comprimento da sequência do DNA ribossômico do *Histoplasma capsulatum*. Controles positivo (DNA do *H.capsulatum*) e negativo (água MiliQ) foram incluídos em cada ensaio qPCR. Por se tratar de amostras ambientais, foi necessário adicionar o DNA humano como controle exógeno de amplificação, sendo o gene β -actina o controle interno.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos dados epidemiológicos de pacientes com histoplasmose e HIV/AIDS

Durante o período de janeiro de 2017 a dezembro de 2019 foram notificados 1.372 casos de Aids na Fundação de Medicina Tropical Dr. Hietor Vieira Dourado – FMT-HVD. Neste mesmo período foram diagnosticados e confirmados laboratorialmente 62 casos de histoplasmose na referida Fundação, representando 4,5% dentre todos os casos de Aids. Estes resultados correspondem aos valores encontrados por Gutierrez et al. (2005) que evidenciaram que os casos de Histoplasmose Disseminada em áreas endêmicas variam de 5% a 20% em pacientes com AIDS. Vale ressaltar que esses dados são subestimados, pois muitos pacientes evoluem para o óbito sem ter o diagnóstico de Histoplasmose ou são diagnosticados e tratados erroneamente para tuberculose ou outras doenças.

Dentre os 62 pacientes com diagnósticos de histoplasmose 68% eram do sexo masculino, com média de idade de 36 anos (desvio padrão de +/- 10,1), sendo que o paciente com menor idade tinha 20 anos e o mais velho 71. Como podemos observar todos os casos ocorreram em pacientes adultos na faixa etária de 31 a 40 anos (45%) (figura 07). O perfil desses pacientes corresponde aos mesmos encontrados em outros estudos como o de Daher et al., (2007); Arango et al., (2011); Brilhante (2012), que verificaram a mesma média de idade nos pacientes com histoplasmose e uma prevalência de >70% em paciente do sexo masculino.

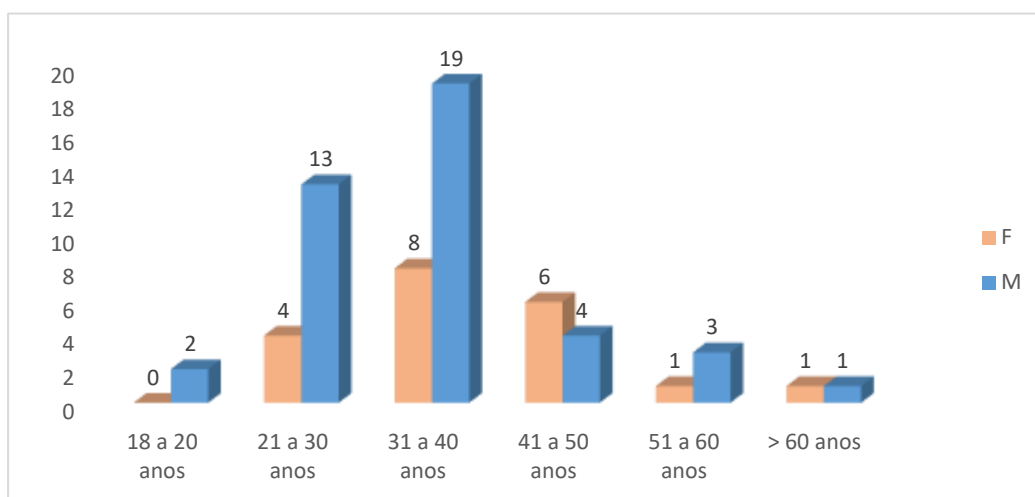


Figura 07 – Distribuição (frequência absoluta) por sexo e faixa etária dos pacientes com AIDS/HD atendidos na FMT-HVD no período de 2017 a 2019

Tabela 1 - Características sociodemográficas de pacientes com AIDS/HD atendidos na FMT-HVD, durante o período de 2017 a 2019.

Dados Demográficos		
Idade		
Média	36	
IC 95%		
Min-Max	20 – 71	
Sexo	N	%
Masculino	42	68
Feminino	20	32
Estado Civil	N	%
Solteiro	28	45
Ignorado	34	55
Escolaridade	N	%
Ensino Fundamental	12	19
Ensino Médio	6	10
Ensino Superior	4	6
Ignorado	40	65
Procedência	N	%
Manaus e Região Metropolitana	56	90
Outros Municípios do Amazonas	6	10

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Entre a população estudada 45% declarou ser solteiro e 19% ter cursado o ensino fundamental, porém essa informação foi ignorada em 55% e 65% dos casos respectivamente.

Quanto a procedência 90% dos pacientes eram de Manaus e região metropolitana e 10% de outros municípios do interior do Amazonas. Esse resultado foi maior do que os encontrados por Mata-Essayag et al., (2008) que observou em seu estudo na Venezuela, que 65% dos pacientes residiam na área urbana (tabela 1 e figura 08).

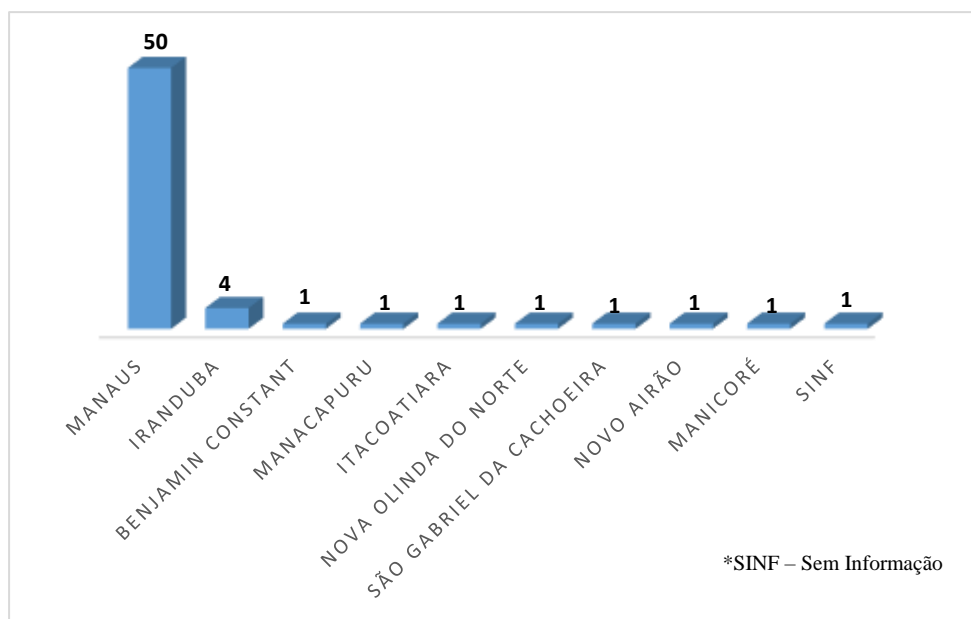


Figura 08 – Naturalidade dos pacientes do estudo com coinfeção HD/AIDS

Segundo os dados do IBGE 2019 o município de Manaus possui 2.182,763 hab, distribuídos em distritos sanitários Norte, Leste, Oeste, Sul, Centro Sul, Centro Oeste e Rural. Observou-se um predomínio nas Zonas Norte (29%) e Leste (19%) (figura 09) sendo que estas áreas da cidade são as mais populosas, tendo a Zona Norte 606.924 hab. e a Zona Leste 542.593 hab, onde juntas constituem as “zonas de expansão” da capital do Estado e onde ocorre a maior parte de desmatamento e invasões clandestinas. Segundo a Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Sustentabilidade, somente em 2019 foram identificados 72 focos de invasões, representando um aumento de 125% em comparação com 2018 (SEMMAS).



Figura 09 – Distribuição dos casos de AIDS/HD por Zonas de Manaus no período de 2017 a 2019.

Tabela 2 – Principais manifestações clínicas dos 62 pacientes com diagnóstico de AIDS associados a histoplasmose.

Sintomas	Nº	%
Febre	45	73
Perda de Peso	36	58
Tosse	31	50
Moniliase Oral	28	45
Dispneia	20	32
Diarreia	17	27
Vomito	11	18
Sudorese	8	13
Fraqueza	9	15

Fonte: Dados da pesquisa 2021

Em 47% (29/62) dos pacientes a AIDS foi identificada durante a internação por HD, resultado similar aos encontrados por Correia, em 2012, em um estudo realizado no Ceará, evidenciando a HD como a doença definidora do diagnóstico de AIDS durante a internação. As manifestações clínicas mais frequentes nesses pacientes foram, febre (45), perda de peso (36), tosse (31) e monilíase oral (28) (tabela 02). Foi observado que 68% (42/62) desses pacientes não estavam fazendo uso da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) o que os expõem ao risco maior de desenvolverem formas graves da Histoplasmose ou outras doenças, devido a

vulnerabilidade do estado imunológico que os mesmos se encontram, pois, as taxas de mortalidade por doenças disseminadas são altas e podem chegar a 50% em pacientes com AIDS. Neste estudo, 28 pacientes evoluíram para o óbito, representando 45% do total de casos (figura 10), sendo que destes, 71% (20/28) a terapia HAART não tinha sido iniciada ou era realizada de forma irregular. Desde o final dos anos 90, a prevalência de histoplasmose disseminada diminuiu em populações HIV positivas com acesso à HAART, mas permanece alta em populações que não têm acesso à esta terapia ou que não aderem ao tratamento.

Scheel et al., (2014), mais recentemente relatou mortalidade de 40% ao estudar uma coorte de 48 pacientes na Guatemala com diagnóstico de HD. Além disso, quatro pacientes com HD morreram antes da confirmação do diagnóstico. Na mesma coorte, a mortalidade associada à outras doenças foi de 26%.

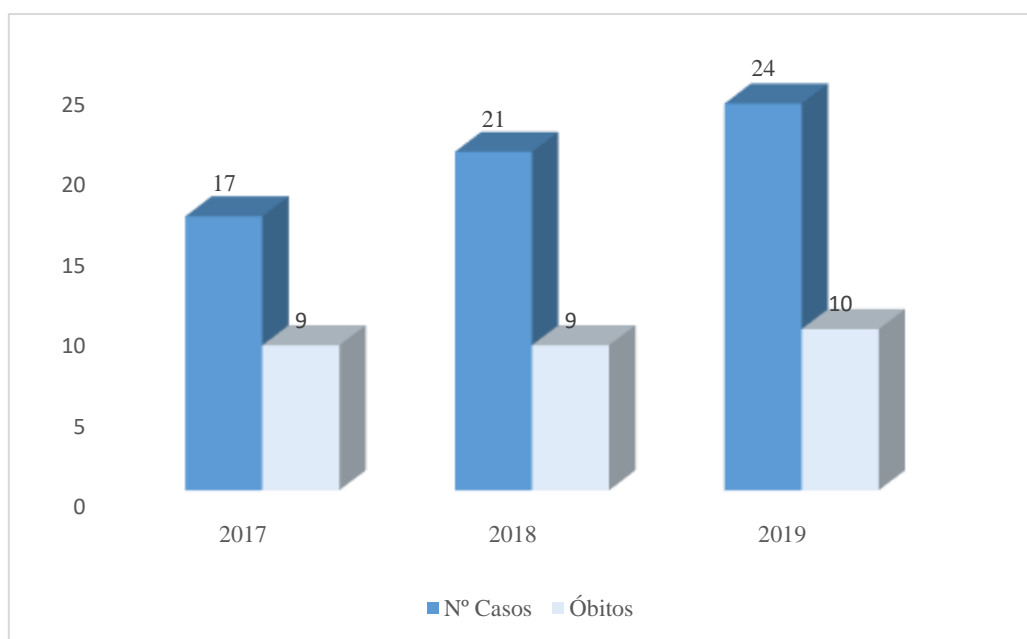


Figura 10 –Distribuição anual de pacientes com AIDS/HD atendidos na FMT- HVD no período de 2017 a 2019 e o número de óbitos registrados nesse mesmo período.

Em 43% dos países latino-americanos, 9 de 21, tem uma incidência de histoplasmose disseminada sintomática maior do que a tuberculose associada ao HIV, além disso, em 14 de 21 (67%) países latino-americanos, a letalidade por histoplasmose disseminada foi maior do que por tuberculose, uma situação esquecida pela maioria dos planos estratégicos nacionais (ADENIS et al.,2018) Portanto, quase 40 anos após a descrição da AIDS, a histoplasmose disseminada ainda está matando muitos pacientes (NACHER et al., 2020).

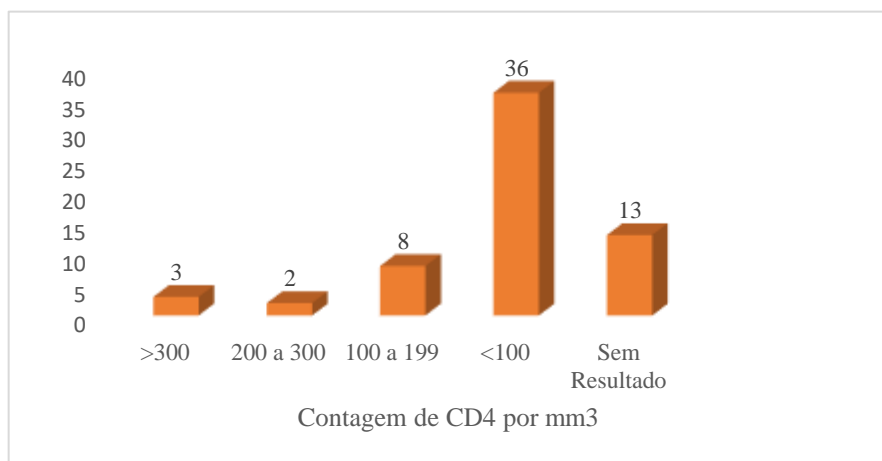


Figura 11 - Valor de LT-CD4+ dos pacientes ao diagnóstico com HD/AIDS

A contagem de CD4+ foi realizada em amostras de sangue de 49 pacientes. Na figura 11 evidenciou-se que 73% (36/49) dos pacientes tiveram contagens de CD4+ menores ou iguais a 100 células/mm³, com um média de 71,06 cél/mm³, sendo o menor valor 3 cél/mm³ e destes, 44% (16/36) evoluíram para o óbito (12 pacientes que também evoluíram para o óbito não tiveram o exame de CD4+ realizado). Resultados semelhantes foram encontrados por Falci e colaboradores, em um estudo realizado em 2019, onde as variáveis independentemente associadas à histoplasmose também foram contagem de CD4+, porém <50 células/mm³. Neste referido estudo, a histoplasmose também foi mais frequente do que a tuberculose em pacientes com contagens baixas de CD4+. Gutierrez et al. (2005) sugere que todos os pacientes com AIDS que apresentam contagem de células <100 / mm³ associados a febre, sintomas respiratórios, perda de peso e diarreia devem ser investigadas para HD.

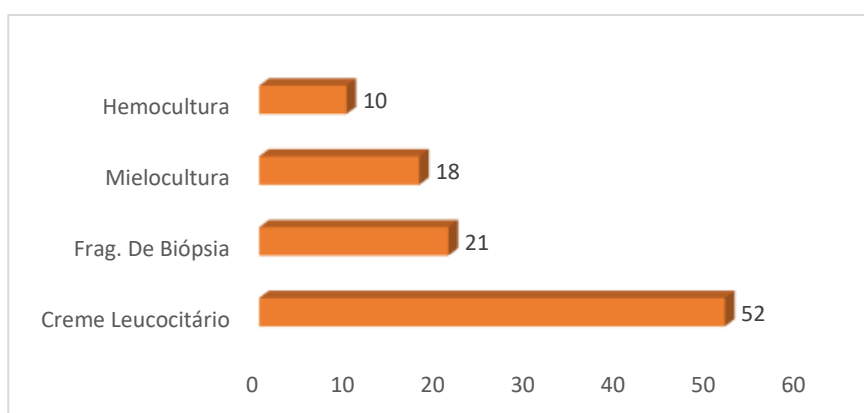


Figura 12 – Percentual de diagnóstico de Histoplasmose de acordo com o tipo de amostra coletada dos pacientes com AIDS atendidos no FMT-HVD no período de 2017 a 2019.

Para o diagnóstico de HD foram realizados exames de cultura de creme leucocitário (52%), fragmentos de biópsia (21%), mielograma (18%) e hemocultura (10%) (figura 12). Em 58% (36/62) foi realizado tratamento antifúngico e a droga de escolha em 92% foi a Anfotericina B, 78% de forma monoterápica e em 22% associada ao Itraconazol. Mesmo com o uso da medicação, 45% (16/36) evoluíram para óbito, supostamente por procurarem o serviço de saúde quando a doença já se encontrava muito avançada e/ou pela demora do diagnóstico da Histoplasmose (em média 30 dias) e conseqüentemente o início tardio do tratamento.

5.2 Avaliação do domicílio dos pacientes com Histoplasmose

Para a avaliação dos domicílios dos pacientes com Histoplasmose, foram feitas tentativas de contato via telefone para as 62 pessoas acometidas por essa infecção fúngica ou familiares. Durante as tentativas do contato via telefone, encontramos diversas dificuldades, entre elas: números errados ou inexistentes, chamadas não atendidas, número informado não ser do paciente, recusas, mudança de endereço e/ou residir em outros municípios de difícil acesso. Além dessas problemáticas, em março de 2020, com o surgimento dos primeiros casos de COVID 19 no Amazonas, as atividades de campo tiveram que ser suspensas, havendo retorno apenas em dezembro de 2020, dessa forma foi possível visitar 06 domicílios, onde foram coletadas 12 amostras que correspondem a 6 amostras de poeira domiciliar, 4 de solo e 2 de ocas de árvore ou madeira.

5.2.1 Características dos pacientes que aceitaram participar da pesquisa

Foram entrevistados 05 pacientes e 01 familiar de paciente, pois havia evoluído para o óbito. A média de idade dos participantes foi de 37,8 anos, 67% do sexo masculino, 5 se autodeclararam pardos, 2 possuíam o ensino médio completo, 2 ensino médio incompleto, 1 ensino fundamental e 1 ensino superior. Quanto ao estado civil 4 declararam solteiros, 1 separado e 1 união estável, 3 eram naturais de Manaus, 1 de Manacapuru, 1 de Santarém e 1 do Ceará. Quanto a profissão foi relatada: aposentado, pedreiro, corretor de imóveis, doméstica, auxiliar de produção e desempregado. Quando perguntado sobre o histórico de viagens, 03 relataram ter viajado antes do diagnóstico de histoplasmose, sendo os destinos Anori e Manicoré (ambos no interior do Amazonas) e Fortaleza. O demais entrevistados relataram não ter realizado viagens antes do diagnóstico.

5.2.2 Descrição dos domicílios e das amostras ambientais coletadas

Ao avaliar as características dos domicílios visitados, foi observado que a média de tempo de moradia destes era de 14,5 anos de residência. Todas as casas eram de alvenaria com piso (cerâmico ou cimento), metade possuía forro, 4 casas possuíam quintal, 2 tinham criação de aves, 2 relataram ver constantemente a presença de pombos nas proximidades do imóvel. Não foi identificado acúmulo de poeira em nenhuma das casas visitadas e a iluminação, assim como a higiene do local foi considerada de regular a boa. Em apenas 01 domicílio foi observado um galinheiro desativado, presença de mangueiras e oco de árvores apodrecidas (figura a e b).



Figura 13: Coletas de amostras em em ambiente domiciliar: Galinheiro desativado em casa de paciente que teve diagnóstico de Histoplasmose (a) e Mangueira presente no mesmo domicílio (b)

Casas tradicionais podem manter algumas fontes de disseminação comuns para fungos, como manipulação do solo e criação de pássaros e plantações de árvores para jardinagem ou consumo. No estudo realizado por Bezerra em 2013, a presença de mangueiras e a atividade envolvendo o solo foram significativamente associadas à reatividade da histoplasmina em estudo realizado com 161 pacientes HIV residentes em Fortaleza. As mangueiras também podem estar relacionadas com a presença de morcegos; esses animais são atraídos por seus frutos e podem viver por anos nos lugares mais próximos para se empoleirar, como os telhados das casas, servindo de áreas de acumulação de matéria orgânica e esterco, um excelente local para a proliferação de *H. capsulatum* (CORREA et al., 2016). Os morcegos são considerados importantes na disseminação e manutenção do fungo no ambiente. No Pará de 100 morcegos pesquisados, 02 foram positivos para o *Histoplasma capsulatum* e ambos eram frugívoros originários principalmente das áreas urbanas (SILVA et al., 2020).

5.2.3 Outras Fontes Ambientais

Foram avaliadas 46 amostras de outras fontes ambientais, sendo 10 amostras de adubo (02 compostado e 08 com fertilizantes orgânicos), 32 amostras de pacientes com HIV/AIDS sem Histoplasmose (21 poeira domiciliar, 10 solo de peridomicílio e 01 de poeira com fezes de pombos) e 4 de áreas públicas com grandes fluxo de pessoas (3 ocos de árvores e 01 amostras de poeiras com fezes de pombos (passarela para pedestres)). Os espaços públicos visitados, foram a duas Praças de Manaus (Praça da Polícia – figura a e b e Praça São Sebastião – figura c) e a passarela de pedestre próxima a um shopping da Zona Centro-Sul com grande fluxo de pessoas (figura d). As amostras dos domicílios dos demais pacientes com HIV/AIDS sem Histoplasmose se encontravam armazenadas na Fiocruz Amazônia. Os adubos foram adquiridos de acordo com a disponibilidade do comércio local, divididos entre os compostados e não compostados, de fabricação caseira e/ou comercial.



Figura 14: Coleta de amostras em ambiente público: Árvore em decomposição na Praça da Polícia em processo de retirada pelos órgãos públicos (a e b) e (c) Árvore também em decomposição na Praça São Sebastião.



Figura 15: Poeira e fezes de pombo presentes na Passarela para pedestres na Zona Centro-Sul.

5.3 Análise de amostras ambientais para detecção de *Histoplasma capsulatum* por RT-PCR

Os resultados da análise por qPCR para detecção de *Histoplasma capsulatum* nas amostras ambientais coletadas estão apresentados na Tabela 03. Esses resultados mostram que o controle positivo da B-actina foi positivo em todas as amostras, porém nas amostras dos domicílios dos pacientes ou amostras de áreas públicas testadas não foi detectada a presença de *Histoplasma*.

Foram selecionadas aleatoriamente algumas amostras dos pacientes para serem contaminadas propositalmente com *Histoplasma* afim de serem utilizados como controle positivo nas primeiras análises as amostras de adubo contaminadas tiveram os resultados negativos, sendo necessário a limpeza do DNA das amostras (repurificação) utilizado clorofórmio;álcool isoamílico (24:1) devido ao número alto de inibidores.

Tabela 3. Amostras ambientais contaminadas propositalmente com cultura de *Histoplasma capsulatum* submetidas a análise de qPCR para detecção do fungo.

Amostra	DNA (ng/ul)	Pureza	SinglePlex		SinglePlex (R)	
			B-actina	H.c	B-actina	H. c
AOH3	2.0	1.9	-	-	+	+
AOH4	1.6	1.8	-	-	+	+
PDH3	0.3	1.6	+	+	+	+
AOH3	0.4	1.5	-	-	+	+
H111	1.8	1.8	-	+	+	+
H111	2.0	1.9	-	+	+	+
AOH1	0.1	1.5	-	-	+	+
AOH2	0.1	1.6	-	-	+	+
SH1	0.2	1.9	-	+	+	+
SH2	0.1	1.6	-	+	+	+
PDH4	0.2	1.6	-	+	+	+
AOH4	*	*	-	-	+	+

AOH – Adubo orgânico com *Histoplasma*; PDH – Poeira domiciliar com *Histoplasma*; H – Cultura de *Histoplasma*; SH – Solo com *Histoplasma*. (R) Repurificadas *Não Realizado.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Após a repurificação, todas as amostras contaminadas tiveram os resultados positivos para *Histoplasma capsulatum* (tabela 03).

Na pesquisa realizada por Amorim-Conselheiro (2019), não foi relatado a necessidade desta repurificação das amostras, apesar de também terem sido utilizados amostras similares ao do nosso estudo (exceto o adubo), onde se obteve 15% de positividade das amostras utilizando apenas o Kit Comercial PowerSoil, porém na pesquisa que Gomez et al., (2018), avaliaram a presença de *Histoplasma capsulatum* em amostras de adubos orgânicos, verificaram a necessidade de utilizar a técnica de repurificação, onde tiveram êxito em seus resultados.

Tabela 4. Amostras ambientais de domicílios de pacientes com HIV/AIDS com e sem Histoplasmosose e de áreas públicas da cidade de Manaus/AM submetidas a análise de qPCR para detecção de *Histoplasma capsulatum*.

Amostra	DNA (ng/ul)	Pureza	Multiplex	
			B-actina	<i>H. capsulatum</i>
CA1	8.5	1.9	+	-
PD4	2.9	1.8	+	-
PD6	4.1	1.8	+	-
PD3(b)	3.4	1.9	+	-
PD16 (a)	4.9	1.9	+	-
PD14	1.8	1.7	+	-
MAD10	1.9	1.9	+	-
SL1	4.4	1.9	+	-
SL2	5.5	1.9	+	-
SL3	1.8	1.8	+	-
SL11(b)	8.5	1.9	+	-
SL17	7.3	1.9	+	-
OAP2	3.3	1.8	+	-
PM	1.5	1.8	+	-
PD1	2.1	1.8	+	-
CM1	2.2	1.9	+	-
SM1	1.9	1.9	+	-
SG1	2.8	1.9	+	-
SL4	0.66	1.8	+	-
OA4	1.7	1.9	+	-
PD12(a)	1.0	1.7	+	-
PD4(b)	1.7	1.7	+	-
PD7(a)	1.6	1.8	+	-
PD15	1.0	1.7	+	-
PD11(a)	1.1	2.0	+	-
PD11	2.2	1.8	+	-
PD15(b)	0.7	1.9	+	-
PD1(c)	1.2	1.8	+	-
SL4(a)	0.6	2.0	+	-
OAP2(a)	0.8	1.6	+	-
PD4(a)	0.7	1.7	+	-

PD3	1.1	1.9	+	-
PD1(b)	1.7	1.7	+	-
PD6	*	*	+	-
PD4	0.7	0.7	+	-
FZ5(a)	1.2	1.2	+	-
PD17(b)	0.7	1.9	+	-
SL10	0.7	1.7	+	-
SL15	0.3	2.1	+	-
PD5	1.5	1.8	+	-
PD2	0.5	1.6	+	-
PD3	0.6	1.9	+	-
PD10	0.5	1.9	+	-
PD10(b)	0.4	1.9	+	-
SL6	0.5	1.9	+	-
SL9(a)	0.1	1.4	+	-
PD5(b)	0.3	1.8	+	-
OAP1	*	*	+	-
AO1	*	*	+	-
AO2	*	*	+	-
AO3	*	*	+	-
AO4	*	*	+	-
AO5	*	*	+	-
AO6	*	*	+	-
AO7	*	*	+	-
AO8	*	*	+	-
AO9	*	*	+	-
AO10	*	*	+	-

PD – Poeira domiciliar; SL- Solo; MAD – Madeira; CM – Casca de mangueira; CA – Casca de árvore; SG – Solo de galinheiro; SM – Solo de Mangueira; OA – Oco de árvore; FZ – Fezes; PM – Passarela; AO – Adubo orgânico.

*Não foi realizado

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Essa nova opção de metodologia de qPCR para detecção do *H. capsulatum*, com o novo conjunto de primers e sonda proposto por Silva (2021), quando aplicado em experimento com amostras ambientais contaminadas por *Histoplasma capsulatum* demonstrou a presença desse fungo. Silva (2021) também utilizou essa metodologia em amostras ambientais de caverna localizada no Amazonas e obteve resultado positivo para detecção de *Histoplasma* em 1 das 30 amostras testadas. Cárceres et al., (2020), em uma revisão dos últimos 6 anos, onde buscou destacar abordagens inovadoras na detecção do *Histoplasma* através de técnicas laboratoriais, também observou que ensaios com multiplex simples (inclusive para uso ambiental) podem ser importantes para um diagnóstico mais rápido e preciso.

Almeida em 2018, em um revisão sistemática envolvendo 270 artigos sobre a ocorrência da Histoplasmose no Brasil, evidenciou a pouca existência de estudos voltados para a análise e identificação do *Histoplasma capsulatum* em animais e solos e demonstrou em seus achados,

que talvez esses dados reflitam a dificuldade do isolamento desse fungo em amostras ambientais. Em outro estudo mais recente, realizado por Rodrigues et al., (2020) identificaram nove grupos genéticos altamente diversos de *Histoplasma capsulatum* no Brasil. A alta variabilidade genética entre os isolados brasileiros juntamente com a presença de espécies crípticas divergentes e/ou genótipos podem apoiar a hipótese do Brasil ser o centro de dispersão do *Histoplasma capsulatum* na América do Sul, possivelmente com a contribuição de hospedeiros migratórios como pássaros e morcegos. Resultados como estes reforçam a importância de mais investigações epidemiológicas no Brasil que permitirão futuras propostas de políticas públicas para conter a disseminação da histoplasmose.

6 CONCLUSÃO

Os pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT/HVD com diagnóstico de HIV/AIDS e coinfeção de Histoplasmose, são predominantemente do sexo masculino, com média de idade de 36 anos, com baixa escolaridade, residentes na zona urbana e periurbana de Manaus. O diagnóstico laboratorial mais solicitado é a cultura de creme leucocitário e metade dos pacientes com diagnóstico de Histoplasmose desconheciam sua sorologia pra HIV/AIDS no momento da internação e/ou consulta e a terapia antiretroviral não era realizada na maioria dos pacientes, e provavelmente por este motivo, mais da metade dos pacientes apresentaram a contagem de CD4+ <100 cél. por mm³ e a mortalidade nesses pacientes foi de alta.

O tratamento antifúngico de escolha para a monoterapia foi a Anfotericina B e quando associada a outro medicamento, a escolha foi o Itraconazol. O início do tratamento com antifúngicos ocorre, muitas vezes tardiamente, devido a média do diagnóstico ser de 30 dias.

Quanto aos achados ambientais, todos os pacientes entrevistados residiam em casas de alvenaria na zona urbana, com pouco contato com aves ou morcegos, ou ambientes conhecidamente característicos para a contaminação por *Histoplasma capsulatum*. As amostras ambientais coletadas tanto em ambiente domiciliar quanto em outras fontes apresentaram resultados negativos para o *Histoplasma* quando submetidos a PCR em tempo real.

As amostras de solo e poeira domiciliar contaminadas propositalmente com cultura de *Histoplasma capsulatum* foram detectadas pela técnica de qPCR com o novo conjunto de sondas e primers de Silva (2021). O diagnóstico positivo para *Histoplasma capsulatum* nas amostras de adubo orgânico (contaminadas propositalmente), compostados ou não com

fertilizantes de origem animal, a detecção só foi possível após a repurificação, caso contrário, os resultados foram negativos devido aos inibidores naturais existentes nesse tipo de amostra.

Nossos resultados evidenciam a importância de mais estudos em amostras de solo e outras fontes ambientais para que desta forma seja possível um melhor entendimento da ecoepidemiologia da Histoplasmose no Amazonas e no Brasil, assim como se apropriar cada vez mais da técnica de biologia molecular, que tem demonstrado ser uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos e investigações de surtos para esta micose sistêmica que possui alto índice de morbimortalidade dentre os pacientes de HIV/AIDS.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, J.R.; NAIFF, R.D.; NAIFF, M.F.; MOK, W.Y. & ALMEIDA, M.M.R. -Isolation of *Histoplasma capsulatum* from an armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in the eastern Amazon of Brazil. **Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 76: 705-706, 1982.

AMORIM-CONSELHEIRO, J. et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* indoors: **A Public Health Approach. Rev Iberoam Micol.** 2019;36(2):79–82, 2019.

AZAR M.M.; HAGE C.A. Laboratory diagnostics for histoplasmosis. **J Clin Microbiol** 55:1612–1620. <https://doi.org/10.1128/JCM.02430-16>, 2017

ADENIS, A.A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **Rev. Lancet Infect Dis** 18 (10) p. 1150- 1159, out. de 2018, disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30354-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30354-2)

AKRAM, S.M.; KOIRALA J. Histoplasmosis. **Treasure Island: StatPearls Publishing**; 2021 Jan-. PMID: 28846361.

ALMEIDA, M.A. et al. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. **Int J Infect Dis.** 2019 Sep;86:147-156. doi: 10.1016/j.ijid.2019.07.009. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31330326.

RODRIGUES, M.A. et al. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. **Studies in Mycology**, Volume 97, 2020, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.02.001>

AIDÉ, M.A. Capítulo 4: histoplasmose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** [online]. 2009, v. 35, n. 11, pp. 1145-1151. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001100013>>. Epub 08 Dez 2009. ISSN 1806-3756. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001100013>.

BAHR, N.C.; ANTINORI, S.; WHEAT, L.J.; SAROSI, G.A. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. **Curr Trop Med Rep.** 2015;2(2):70-80. doi:10.1007/s40475-015-0044-0

BEZERRA, et al. Histoplasmin survey in HIV-positive patients: Results from an endemic area in northeastern Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo55(4):261-265, July-August, 2013.

BIALEK, et al. Evaluation of Two Nested PCR Assays for Deteccion *Histoplasma capsulatum* DNA in HumanTissue. – **Journal of Clinical Microbiology**, May 2002. p.1644-1647.

BOLETIM EPIDEMIOLOGICO 2017 A 2019. FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO – FMT-HVD. http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg_2018/Doencas_e_Agravoslist.asp (acesso em 15 de agosto de 2021).

BRASIL. Resolução nº 004/2013 GAB/SES/GO. Dispõe sobre a regulamentação da inserção da Histoplasmose e outras micoses sistêmicas na lista de doenças de notificação obrigatória no estado de Goiás -GO. **Diário Oficial da União**, Goiás 14 de maio de 2013. Art. 01 anexo II.

BRILHANTE, R.S.N. et al. Histoplasmose em pacientes HIV-positivos no Ceará, Brasil: Aspectos Clínico-laboratoriais e Suscetibilidade Antifúngica in vitro de Isolados de *Histoplasma capsulatum*. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 106, Ed. 8, ago de 2012. Págs. 484-488, <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.003>

BUITRAGO, M.J. 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. doi: 10.1016/j.riam.2013.03.004. Epub 2013 Apr 11. PMID: 23583717.

CACERES, D.H. et al. The Manaus Declaration: Current Situation of Histoplasmosis in The Americas, Report of The II Regional Meeting of The International Histoplasmosis Advocacy Group. **Fungal Infect Rep** 13, 244–249 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12281-019-00365-3>

CACERES, D.H.; FERNÁNDEZ, N.B.; LOCKHART, S. Abordagens Inovadoras para Detecção de *Histoplasma* (2020). **Current Fungal Infection Reports**, 14, 310-316. <https://doi.org/10.1007/s12281-020-00393-4>

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

CORREIA, F.G.S.; ALENCAR, C.H.; DAMASCENO, L.S.; RAMOS, I.C.; PONTES, L.B.; LEITÃO, T.M.J.S. Spatial Distribution of Disseminated Histoplasmosis and AIDS co-infection in an Endemic Area of Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 49 (02), Apr 2016 <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0327-2015>.

DAMASCENO-ESCOURA, A.H. et al. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: Epidemiological, Clinical and Necropsy Data from a Brazilian Teaching Hospital. **Mycopathologia.** 2020 Apr;185(2):339-346. doi: 10.1007/s11046-020-00435-y. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32078723.

DEVI, S. G. et al. A rapid and Economical Method for Efficient DNA Extraction from Diverse Soils Suitable for Metagenomic Applications. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.

DAHER, E.F. et al. Clinical and Laboratory Features of Disseminated Histoplasmosis in HIV Patients from Brazil. **Trop Med Int Health.** 2007 Sep;12(9):1108-15. doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01894.x. PMID: 17875020.

DIAS, M.A. et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Bats in the Urban Area of São Paulo State, Brazil. **Epidemiol Infect.** 2011 Oct;139(10):1642-4. doi: 10.1017/S095026881000289X. Epub 2010 Dec 23. PMID: 21205438.

FALCI, D.R. et al. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and Histoplasma Urine Antigen Detection. **Rev Open Forum Infectious**

Diseases, 2019 Apr 13;6(4): ofz073. doi: 10.1093/ofid/ofz073. PMID: 30997365; PMCID: PMC6461557.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(2):192-198, mar-abr, 2009.

FREITAS, R.S. Caracterização Fenotípica e Padronização de Antígenos de *H. Capsulatum* Var. *Capsulatum* Para o Diagnóstico da Histoplasmose (Pós - Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo), 2005.

FRÍAS DE LEÓN, M.G. Desenvolvimento de Marcadores de Região Amplificada Caracterizados por Sequência Específica para a Detecção de *Histoplasma capsulatum* em Amostras Clínicas e Ambientais. **J Clin Microbiol** . 2012; 50 (3): 673-679. doi: 10.1128 / JCM.05271-11

GOMEZ, B.L. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America. **Fungal Infect Rep**. 19 October 2011, 5:199–205 DOI 10.1007/s12281-011-0073-7

GÓMEZ, L.F. et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* in Organic Fertilizers by Hc100 Nested Polymerase. Chain Reaction and Its Correlation with the Physicochemical and Microbiological Characteristics of the Samples. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 98(5), 2018, pp. 1303–1312.

GÓMEZ, L.F. et al. Molecular epidemiology of Colombian *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from human and chicken manure samples. **Rev. Elsevier**, 2019 disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02084>.

GUARANI, T.N.B.; MELO, R.B.; REBOUÇAS, M.A.M.; FERREIRA, P.A.; FERREIRA, F.C.; BADARÓ, F.S.S. Causas De Óbito Em Pacientes Com Histoplasmose e Vírus da Imunodeficiência Humana Hospitalizados em uma Unidade de Referência do Estado da Bahia. **Revista de Inovação, Tecnologia e Ciências** - <http://periodicos.ftc.br/>, 2015.

GUIMARÃES, A.J.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Diagnosis of Histoplasmosis. **Brazilian Journal of Microbiology**. Mar 2006; 37:1-13 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100001>

GUIA GEOGRÁFICO DO AMAZONAS. Mapas de Manaus. Disponível em: <http://www.brasil-turismo.com/amazonas/manaus-mapa.htm> (acesso em 04 de abril de 2020).

GUTIERREZ, M.E.; 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. doi: 10.1086/428842. Epub 2005 Mar 2. PMID: 15791523.

IMMY - Fungal Antigens, Positive Controls, And Immunodiffusion Plates For Use In The Immunodiffusion (Id) Test, 2007. www.immy.com<acesso em 28.08.2019>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. CIDADE E ESTADOS. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/am/manaus.html>? (acesso em fevereiro de 2020).

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMPER, A.H.; ADENIS, A.; LE, T.; HARRISON, T.S. Fungal infections in HIV/AIDS. **Lancet Infect Dis.**;17(11): 334-343, nov 2017.

LÓPEZ, L. F. et al. Standardization and validation of real time PCR assays for the diagnosis of histoplasmosis using three molecular targets in an animal model. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. 1/15, 2017.

LOCKHART, S.R.; TODA, M.; BENEDICT, K.; CACERES, D.H.; LITVINTSEVA, A.P. Endêmicas e outras micoses dimórficas nas Américas. **J Fungi** (Basileia) . 2021; 7 (2): 151. Publicado em 20 de fevereiro de 2021. doi: 10.3390 / jof7020151

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev.** 2007 Jan;20(1):115-32. DOI: 10.1128/CMR.00027-06. PMID: 17223625; PMCID: PMC1797635.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis. **Clin Chest Med.** 2009 Jun;30(2):217-25, v. doi: 10.1016/j.ccm.2009.02.002. PMID: 19375629.

MARTINEZ, R.; VITALI, L.H.; HENRIQUES, J.H.S.; MACHADO, A.A.; ALBERNAZ, A.; LIMA, A.A. Inquérito Soroepidemiológico para Infecções por Fungos Causadores de Micose sistêmicas na Reserva Indígena Xacriabá, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 35(4): 347-350, jul-ago, 2002.

MARTAGON-VILLAMIL, J. et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. **J Clin Microbiol.** 2003 Mar;41(3):1295-8. doi: 10.1128/JCM.41.3.1295-1298.2003. PMID: 12624071; PMCID: PMC150317.

MATA-ESSAYAG, S. et al. Histoplasmosis A Study of 158 Cases in Venezuela, 2000–2005. **Medicina** - Volume 87 - Edição 4 – pag.193-202, julho de 2008 doi: 10.1097 /MD.0b013e31817fa2a8

MARTINS, R.C.; NIGRI, D.H.; MONTEIRO, A.S.; FRANCO, C.A.B.; ADDOR, G. Histoplasmose pulmonar em clínica privada no Rio de Janeiro / Pulmonary histoplasmosis in a private clinic in Rio de Janeiro city. **Pulmão RJ** ; 14(3): 197-201, 2005. | LILACS / ID: lil-640683

MITTAL, J.; PONCE, M.G.; GENDLINA, I. E.; NOSANCHUK, J. *Histoplasma capsulatum*: Mecanismos para Patogênese. **Top Microbiol Immunol.**; 422: p. 157–191, 2019 disponível em: https://doi.org/10.1007/82_2018_114

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. **Relatório de Recomendações**, 2017, pag 226.

MOK, W.Y.; AYRES, C.H.L.; McMILLEN, S. Levantamento Sorológico de Quatro Micose Profundas no Estado do Amazonas, Brasil. **ACTA Amazonica** 9 (1), 75-78, 1979.

MOK, W.Y.; NETTO, C.F. Paracoccidioidin and Histoplasmin Sensitivity in Coari (state of Amazonas), Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** 1978 Jul;27(4):808-14. doi: 10.4269/ajtmh.1978.27.808. PMID: 686248.

NACHER, M.; COUPPIÉ, P.; EPELBOIN, L.; DJOSSOU, F.; ADEMAR, M.E.; ADENIS, A. Disseminated Histoplasmosis: Fighting a Neglected Killer of Patients with Advanced HIV Disease in Latin America. **PLoS Pathog** 16(5):e1008449, maio de 2020, disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008449>.

NAIFF, R.D.; MOK, W.Y.; NAIFF, M.F. Distribution of *Histoplasma capsulatum* in Amazonian wild Life. **Mycopathologia** 89, 165-168, 1985.

NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; NAIFF, M.F.; FERREIRA, L.C.L.; ARIAS, J. R. New Records of *Histoplasma capsulatum* from Wild Animals in the Brazilian Amazon. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 38 (4): 273-277, julho/agosto, 1996.

NASCIMENTO, M.A.; GOMES, J.G. Perfil de Pacientes com Micoses Sistêmicas Notificados de 2013 A 2018 em Hospital de Referência do Estado de Goiás. **Boletim Epidemiológico do Núcleo Hospitalar de Vigilância Epidemiológica do Hospital Estadual de Doenças Tropical**, Goiania: HDT, 2018. 9 pag. Relatório Institucional.

NOSANCHUK, J.D.E.; GACSER, A. *Histoplasma Capsulatum* - A Interface Hospedeiro-Patógeno. **Microbes and Infect**; (10): p. 973–977, julho de 2008 disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.011>

NORKAEW, T.; et al. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by nested PCR. **Mycopathologia**. 2013 Dec;176(5-6):395-402. doi: 10.1007/s11046-013-9701-9. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24030846.

OLIVEIRA, J.C. Tópicos em Micologia Médica. **4ª Edição, Rio de Janeiro**, 2014.

PAHO/WHO. Guidelines for Diagnosing and Managing Disseminated Histoplasmosis among People Living with HIV. Available online: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52304/9789275122495_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (accessed on 30 junho 2021).

PERVEZ, M.M.; COBB, B.; MATIN, N.; SHAHRIN, L.; FORD, E.R.; PIETRONI, M. Disseminated Histoplasmosis in a Patient with Advanced HIV Disease—Lessons Learnt from Bangladesh. **J HEALTH POPUL NUTR** 2010 June;28(3):305-307.

PEREZ, F.; CACERES, D.H. et. al. Summary of Guidelines for Managing Histoplasmosis among People Living with HIV. **J. Fungi** 2021, 7, 134. <https://doi.org/10.3390/jof7020134>

RAKISLOVA, N. et al. High prevalence and mortality due to *Histoplasma capsulatum* in the Brazilian Amazon: An autopsy study. **PLoS Negl Trop Dis**. 2021 Apr 5;15(4):e0009286. doi: 10.1371/journal.pntd.0009286. PMID: 33819269; PMCID: PMC8049479.

ROSSINI, T.F.; GOULART, L.S. Histoplasmose Clássica: **Revisão. RBAC**, vol. 38(4): 275-279, 2006.

SANTOS, B. et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in insectivorous and frugivorous bats in Southeastern Brazil. **Med Mycol.** 2018 Nov 1;56(8):937-940. doi: 10.1093/mmy/myx138. PMID: 29294049.

SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE DE MANAUS-SEMMAS. Disponível em: <https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2020/01/06/focos-de-invasoes-em-manaus-tiveram-alta-de-125percent-em-um-ano-aponta-monitoramento.ghhtml> (acesso em fevereiro de 2020).

SCHEEL, C.M.; SAMAYOA, B.; HERRERA, A. et al. Desenvolvimento e Avaliação de um Ensaio Imunoenzimático para Detectar a Antigenúria de *Histoplasma capsulatum* em pacientes imunocomprometidos. **Clin Vaccine Immunol.** 2009; 16 (6): 852-858. doi: 10.1128/CVI.00066-09.

SIDRIM, J.J.C; MOREIRA, J.L.B. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Publicado em 1999 Edição 1 pg. 221

SIL, A. Regulação Molecular do Dimorfismo do *Histoplasma*. **Opin Microbiol.**; 52: 151–157, dezembro 2019 disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.011>

SILVA, M.T.G.; SANTANA, F.F.; ARRAES, L.W.M.S.; ARRAES, L.C.M.; SILVA, M.M.M. Disseminated Histoplasmosis In Patients With Human Immunodeficiency Syndrome Acquired. **Braz. J. Hea. Rev.**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 6, 2042-2048, mar./apr. 2019.

DA SILVA, J.A. et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in bats of the Amazon biome in Pará state, Brazil. **Transbound Emerg Dis.** 2021 Mar;68(2):758-766. doi: 10.1111/tbed.13740. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32686315.

DA SILVA, B.K.N.I. Desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo de grutas e cavernas do Município de Presidente Figueiredo. pgs. 81, 2021 Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Amazonas – UFAM, 2021.

SOUZA, S.L.S.; FEITOZA, P.V.S.; ARAÚJO, J.R.; ANDRADE, R.V.; FERREIRA, L.C.L. Causa de Óbito em Pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, Necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(3):247-251, mai-jun, 2008.

TAYLOR, M.L. et al. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2005 Sep 1;45(3):435-41. doi: 10.1016/j.femsim.2005.05.017. PMID: 16061362.

UNIS, G.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Histoplasmosis Dissemínada no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37(6):463-468, nov-dez, 2004.

WHEAT, L.J.; KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2003 Mar;17(1):1-19, vii. doi: 10.1016/s0891-5520(02)00039-9. PMID: 12751258.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; WANKE, B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de Animais Silvestres no Município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, 2 (1), 1986 pags. 42-52.

APÊNDICE (1) - FICHA DO PACIENTE

Pacientes com HIV/AIDS diagnosticado com micose sistêmica ()

Número da ficha: _____ data: ____/____/____

Número do Prontuário: _____

A - Dados Sociodemográficos

1 - Nome: _____

2 - Idade: _____ 3 - Data de nascimento: _____

4 - sexo: ()Feminino ()Masculino

5 - Cor/Raça: _____

6 - Profissão: _____ 7 - Escolaridade: _____

8 - Endereço: _____

9 - Naturalidade: _____

10 - Estado civil: _____ 11 - Profissão: _____

12 - Histórico de Viagem antes do diagnóstico da Histoplasmose? () Sim () Não

Local: _____

B - Dados Laboratoriais

1 - Contagem CD4: _____

2 - Micose sistêmica: ()Histoplasmose

3 - Início dos sintomas: _____

4 - Observações clínicas:

5 - Método diagnóstico: Exame direto () Histopatologia () Cultura ()

Biopsia () outros: _____

6 - Tecido/fluido corporal: _____

7 - Data do diagnóstico: ____/____/____

APÊNDICE (2) - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Márcia Larissa Pereira de Menezes e Ani Beatriz Jackisch Matsuura, aluna de mestrado e pesquisadora da Fiocruz/AM, respectivamente, estamos convidando o (a) senhor (a) a participar de um estudo chamado “Avaliação da Presença de *Histoplasma* em Ambiente Domiciliar de Pacientes com HIV/AIDS atendidos em Unidade de Referência no Amazonas”.

a) O objetivo desta pesquisa é investigar a presença de *Histoplasma capsulatum* em domicílios de micoses oportunistas diagnosticados na FMT-HVD em 2017 a 2019;

b) Será necessário responder algumas perguntas para tentar entender como foi que você adquiriu essa micose;

c) É possível que, durante a participação na pesquisa, haja algum desconforto em relação a visita que será realizada na sua casa para obtenção de amostra ambiental. Mas, para reduzir esse possível desconforto, esta visita será agendada com você;

d) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: analisar se há a presença de fungos causadores de micose sistêmica no ambiente domiciliar e assim verificar se há risco de infecção/re-infecção nesse ambiente. No entanto, este estudo talvez não lhe beneficie diretamente, mas irá contribuir para o avanço científico;

e) As pesquisadoras Márcia Menezes e Ani Matsuura responsáveis por este estudo estarão disponíveis para esclarecer qualquer dúvida sobre a pesquisa no **Centro de Pesquisa Leônidas & Maria Deane – FIOCRUZ/AM, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus-AM - CEP: 69057070, telefone: (92) 3621-2323; (92) 3621-2333**. E se tiver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Fundação de Medicina Tropical "Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD), Avenida Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000, Telefone: (92) 2127-3572, e-mail: cep@fmt.am.gov.br;**

f) A sua participação neste estudo é voluntária e se o (a) senhor (a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e retirar o seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu atendimento na FMT-HVD;

g) As informações relacionadas ao estudo somente serão veiculadas através de artigos, congressos científicos e revistas especializadas. No entanto, quando as informações forem divulgadas garantimos que a identidade do (a) senhor (a) será preservada e mantida em

segredo. Poderemos tirar fotografias do ambiente da sua casa, mas garantimos que será de forma para proteger a sua identificação;

h) Não há compensação financeira relacionada à sua participação, no entanto será garantido o ressarcimento de despesas, quando necessário, tais como transporte e alimentação. Qualquer despesa adicional, será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Da mesma forma, terão direito à indenização garantido caso ocorra algum dano permanente devido à participação nesse estudo.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou dos riscos e benefícios.

Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

Manaus, ___ de _____ de _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou de seu representante legal para a participação neste estudo.

(Assinatura do Pesquisador)

Manaus, ___ de _____ de _____

APÊNDICE (3) - FICHA DA CASA DO PACIENTE

Entrevistado: _____

Entrevistador: _____

Número da ficha: _____ data da visita: ____/____/____

A - Dados Epidemiológicos da Histoplasmose

2 - Endereço: _____

3 - Tipo de moradia: () Casa () Apartamento () Cômodo

4 - Tempo de moradia: _____

5 - Número de moradores: _____

6 - Tipo de parede: () Alvenaria () Madeira () Gesso () Mista (Madeira e Alvenaria) Outros: _____

7 - Tipo de piso: () Cerâmica () Terra Batida () Tábua () Cimento
Outros: _____

8 - Tipo de teto: () Laje () Telha com forro () Telha sem forro () Telha com forro incompleto Tipo de telha: _____

9 - Quintal: () Não () Cimento () Terra

10 - Árvores: () Não () Sim

11 - Criação de aves: () Não () Sim

Espécies: _____

12 - Aves/Peridomicílio: () Não () Sim

() Livres () Em cativeiro

Espécies: _____

13 - Presença de Pombos () Não () Sim

14 - Presença de Morcegos () Não () Sim

15 - Acúmulo de poeira: () Não () Sim

16 - Iluminação natural: () Boa () Regular () Ruim

17 - Higiene do Ambiente: () Boa () Regular () Ruim

18 - Observações do Entrevistador: _____

ANEXO A – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AGENTES FÚNGICOS DE MICOSES SISTÊMICAS EM DOMICÍLIOS DE PACIENTES COM HIV/AIDS E MICOSES OPORTUNISTAS DIAGNOSTICADOS NA FMT-HVD

Pesquisador: Maria Jalene Alves

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 82715917.4.0000.0005

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.075.280

Apresentação do Projeto:

Os fungos *Cryptococcus* e *Histoplasma* são agentes causadores de micoses sistêmicas, acometendo de forma grave indivíduos com HIV/AIDS, representando um importante problema de saúde pública. A infecção ocorre quando há exposição desses pacientes ao ambiente contaminado com propágulos infectantes do fungo. No Brasil os casos de Criptococose e Histoplasmose tem aumentado em pacientes imunocomprometidos, inclusive no norte do país, levando comumente esses indivíduos à óbito. Em Manaus, Amazonas, têm sido realizados estudos de caráter ambiental para verificar a presença e os genótipos de fungos na natureza, não havendo relatos em domicílio de pacientes com HIV/AIDS. Assim, o presente estudo pretende investigar a presença de agentes fúngicos de micoses sistêmicas em domicílios de pacientes com HIV/AIDS diagnosticados com Criptococose e/ou Histoplasmose na Fundação de Medicina Tropical -Dr. Heitor Vieira Dourado, além de avaliar a metodologia de PCR-RT para a detecção de *Cryptococcus* e *Histoplasma*, determinar genótipos e avaliar a sensibilidade dos isolados aos antifúngicos. Os fungos serão obtidos de amostras ambientais coletadas no domicílio dos pacientes. Isolados clínicos também entrarão no estudo. Os isolados de *Cryptococcus* serão submetidos à análise morfológica, a genotipagem por MLST, PCR-RT e a susceptibilidade antifúngica. Já a presença de *Histoplasma* será avaliada por PCR convencional e PCR-RT. Será feito sequenciamento de DNA de

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.075.280

todos os agentes fúngicos investigados. Os resultados obtidos elucidarão lacunas referentes às possíveis fontes de infecção desses fungos e distribuição destes fungos, além de contribuir para a prevenção e controle dessas micoses.

Desenho do estudo:

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, transversal

Os fungos serão obtidos de amostras ambientais, tais como poeira domiciliar, solo, fezes de aves, oco de árvore e madeira em decomposição, coletadas no domicílio de pacientes com HIV/AIDS diagnosticados com Criptococose e/ou Histoplasmose na FMT-HVD, além de pacientes com HIV/AIDS sem micose sistêmica, que serão utilizados como controle do estudo. Os isolados de *Cryptococcus* serão submetidos à análise morfológica, a genotipagem por MLST, PCR-RT e a susceptibilidade antifúngica. Já a presença de *Histoplasma* será avaliada por PCR convencional e PCR-RT.

Hipótese:

Pode haver a presença de fungos causadores de Criptococose e Histoplasmose no ambiente domiciliar dos pacientes estudados.

Desfecho Primário:

Determinar se há a presença de fungos no ambiente domiciliar dos pacientes estudados e as possíveis fontes de infecção por estes fungos

Desfecho Secundário:
Determinar se os fungos encontrados no ambiente domiciliar do paciente são os mesmos responsáveis por causar doença nesses pacientes e verificar as fontes de infecção por estes fungos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a presença de agentes fúngicos de micoses sistêmicas em domicílios de pacientes com HIV/AIDS e micose sistêmica diagnosticados na FMT-HVD nos anos de 2017 e 2018.

Objetivo Secundário:

a) Analisar fontes ambientais para determinar a presença de agentes fúngicos de Criptococose e

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmi.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.075.280

Histoplasmose em domicílios de pacientes com HIV-AIDS diagnosticados com micose sistêmica na FMTHVD;

- b) Avaliar a metodologia de PCR em tempo real para detecção de Histoplasma e Cryptococcus em amostras ambientais;
- c) Determinar os genótipos de Cryptococcus presentes no ambiente domiciliar;
- d) Correlacionar os achados ambientais com os agentes causadores de micose nos pacientes;
- e) Caracterizar os isolados quanto à susceptibilidade aos antifúngicos azólicos e anfotericina B.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos relacionados a participação na pesquisa são: (1) desconforto durante a abordagem ao paciente e a utilização de dados desse paciente; (2) desconforto durante a realização das coletas no ambiente domiciliar. Os riscos serão minimizados pelo entrevistador que será treinado para garantir o sigilo dos participantes, além disso a abordagem será feita de forma individualizada, não exposta ao público, a fim de evitar

constrangimentos e a visita domiciliar será agendada com o próprio paciente. Além disso, qualquer risco não previsto decorrente da participação na pesquisa, será minimizado pelo pesquisador.

Benefícios:

Esse trabalho contribuirá com maiores informações para a compreensão a respeito de possíveis fontes ambientais de infecção e re-infecção de fungos causadores de micose sistêmica, fatores associados a sua infecção, a distribuição desses fungos no Amazonas, sua importância como agente causador de micose em seres humanos e do perfil de sensibilidade à antifúngicos utilizados rotineiramente no tratamento destas micoses, permitindo uma melhor conduta terapêutica frente a estas infecções.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de resposta às PENDÊNCIAS

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmi.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.075.280

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Anexos a este protocolo estão os seguintes documentos:

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1501615_E1 (20/05/2020)

FOLHA_RESPOSTA_CEP (20/05/2020)

Recomendações:

Vide Conclusões ou Pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIAS OBSERVADAS E AS MODIFICAÇÕES

1. Coleta de amostras ambientais de pacientes do ano de 2019 (Data de Início em 02/03/2020) foi modificado para 15/08/2020

Pendência atendida

2. Aplicação do TCLE e obtenção de isolados clínicos dos pacientes de 2019 (Data Início em 02/03/2020) foi modificado para 15/06/2020

Pendência atendida

3. Sensibilidade aos antifúngicos dos isolados de 2019 (Data de início em 01/04/2020) foi modificado para 15/07/2020.

Pendência atendida

4. Análise molecular dos isolados de 2019 (Data de Início em 01/04/2020) foi modificado para 15/07/2020

Pendência atendida

5. Isolamento de *Cryptococcus* e análise morfológica dos pacientes de 2019 (Data de Início em 02/03/2020) foi modificado para 15/06/2020

Pendência atendida

6. Análise dos Dados dos pacientes de 2019 (data de início em 01/04/2020) foi modificado para 15/06/2020

Pendência atendida

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fml.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.075.280

Diante do exposto sugere-se que EMENDA seja APROVADA por este CEP.

SMJ este é o parecer

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1501615_E1.pdf	20/05/2020 12:09:58		Aceito
Outros	FOLHA_RESPOSTA_CEP.pdf	20/05/2020 12:08:09	Marla Jalene Alves	Aceito
Outros	Relatorio_Parcial_CEP_FMT_Cripto_Histo.pdf	29/04/2020 17:25:28	Marla Jalene Alves	Aceito
Outros	FOLHARESPOSTAcep_Marla.pdf	05/03/2018 12:16:04	Marla Jalene Alves	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes.pdf	05/03/2018 12:12:21	Marla Jalene Alves	Aceito
Outros	ProjetocepTCUD.pdf	05/03/2018 12:09:39	Marla Jalene Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetocep_Marla.pdf	05/03/2018 12:08:41	Marla Jalene Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeassentimento_projetocep_Marla.pdf	05/03/2018 12:07:40	Marla Jalene Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCrianca_projetocepMarla.pdf	05/03/2018 12:06:57	Marla Jalene Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCadulto_projetocepMarla.pdf	05/03/2018 12:06:37	Marla Jalene Alves	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostaplataformaBrasilMarla.pdf	11/12/2017 17:29:39	Marla Jalene Alves	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.075.280

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 08 de Junho de 2020

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br