



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"**

**"EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES (PCR PARA LAS SECUENCIAS
1281-1283220 SCAR Y HC100) PARA EL DIAGNÓSTICO DE HISTOPLASMOSIS DISEMINADA
Y PROGRESIVA EN PACIENTES CON SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA"**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

MARÍA DOLORES NIEMBRO ORTEGA

TUTOR

DR. LUIS ALFREDO PONCE DE LEÓN GARDUÑO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

"SALVADOR ZUBIRÁN"

CO-TUTORES

DR. JOSÉ SIFUENTES OSONIO

DRA. ROSA ARELI MARTÍNEZ GAMBOA

DRA. BRENDA ELOÍSA CRABTREE RAMÍREZ

DRA. MARÍA DE LOURDES GARCÍA GARCÍA

DR. PEDRO TORRES GONZÁLEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

"SALVADOR ZUBIRÁN"

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

RESPONSABLE DE SEDE

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A Mati, Fau, Rober y Mica, a Roberto y Estela, mi alegría y bastión de fortaleza.

A Rodrigo que estaría orgulloso.

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Ponce, que ha sido mi mentor en todos estos años, guiándome sabiamente por el camino de la investigación clínica y la medicina y por preocuparse siempre por mi bienestar como ser humano.

A mi comité tutorial, los doctores(as) Brenda Crabtree, Lulú García, Areli Martínez, Pedro Torres y José Sifuentes quienes con su ejemplo de investigadores incansables y con amplia experiencia en el tema, me han impulsado y guiado en este gran trabajo.

A mis compañeros infectólogos (Pedrito, Marisol, Chucho, Chris, los dos Víctor, Juan Pablo, Paty, Norma, Alberto, Javier y Dr. Terán) en cada uno de los centros participantes que hicieron posible el creer que en nuestro país podemos trabajar en equipo y tener investigaciones de alta calidad que aporten en gran medida al bienestar de nuestros pacientes.

Al equipo del Laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ (especialmente a Andre, Janet, Nancy, Barbarita, Tomy, Lula, Paulet, Steven y Naye) por ese trabajo colosal que realizaron al analizar todas las muestras, por la disponibilidad para compartir sus conocimientos y experiencia de forma generosa e impecable.

A mis dos pasantes del Servicio Social, Mich y Miguel, mis escuderos en las horas más oscuras.

A los pacientes que aceptaron participar y contribuir generosamente en el protocolo para la generación de conocimiento para lo que están por venir.

ÍNDICE

I.	RESUMEN -----	4
II.	MARCO TEÓRICO-----	6
III.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN-----	47
IV.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN -----	50
V.	HIPÓTESIS -----	50
VI.	OBJETIVOS -----	50
VII.	METODOLOGÍA -----	51
VIII.	RESULTADOS -----	69
IX.	DISCUSIÓN -----	95
X.	CONCLUSIONES -----	100
XI.	PRESENTACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIÓN -----	101
XII.	ANEXOS-----	129
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	146

I. RESUMEN

La infección por *Histoplasma capsulatum* afecta principalmente a pacientes con infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) con cuentas bajas de CD4+ (<150 cel./ μ l) quienes presentan comúnmente histoplasmosis diseminada (HD). La mortalidad por todas las causas en los primeros tres meses alcanza el 40% en esta población y más del 20% de los casos tienen enfermedad severa con falla orgánica múltiple. En los casos con enfermedad diseminada y progresiva el curso natural de la enfermedad es que lleve a la muerte del paciente en el transcurso de 2-6 semanas si no se diagnostica oportunamente y se inicia tratamiento de forma temprana. Las pruebas diagnósticas en HD, incluyen cultivo, serología, detección de antígeno urinario, microscopía directa e histopatología. La prueba más sensible y específica, en el caso de HD, el antígeno urinario, no se encuentra disponible en la gran mayoría de los centros. El cultivo y la histopatología confirman la infección por *H. capsulatum*, sin embargo, el tiempo que se requiere para su crecimiento e identificación retrasan el diagnóstico. Recientemente se han implementado métodos moleculares para el diagnóstico rápido de estas infecciones, una de ellas, la PCR que emplea como blanco genético la secuencia del gen Hc100 el cual es específico de *Histoplasma capsulatum* y se ha demostrado que permite la supervivencia del hongo dentro de las células humanas, ha mostrado una sensibilidad hasta del 100% y una especificidad del 92.4%. Otra PCR es la que está dirigida a una secuencia genética denominada 1281-1283₂₂₀ SCAR de la cual se ha informado una sensibilidad y especificidad de 100%. Hasta ahora no se ha demostrado su utilidad en estudios clínicos prospectivos ni en la población con VIH específicamente.

Por lo que realizamos un estudio prospectivo, multicéntrico, doble ciego de pruebas diagnósticas. El objetivo principal del estudio fue determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR dirigida a la región 1281-1283₂₂₀ SCAR y al gene Hc100 en sangre periférica para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada en pacientes con VIH/SIDA en comparación con el cultivo de sangre periférica. Objetivos secundarios incluyeron determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR Hc100

y 1281-1283₂₂₀ SCAR en muestras clínicas de mielocultivos y biopsias en comparación con el resultado del mielocultivo y cultivo de biopsias respectivamente; así como del antígeno urinario de Histoplasma IMMY ALPHA EIA, en comparación con la definición de caso probado de histoplasmosis (positividad por cultivo y/o biopsia).

Se ingresaron 412 pacientes en el estudio, encontrando 107 (26%) casos con diagnóstico probado de histoplasmosis. La sensibilidad para la PCR Hc100 en muestras de sangre periférica, médula ósea y biopsias fue del 65.2% (95% IC, 54.1-74.9), 76.7% (95% IC, 76.0-77.4), 90.9% (95% IC, 59.4-99.5) respectivamente; con una especificidad para las mismas muestras del 85.3% (95% IC, 83.0-87.3), 89.2% (95% IC, 89.0-89.4), 69.9% (95% IC, 65.1-71.2) respectivamente.

La sensibilidad del antígeno urinario para el diagnóstico de HDP probada fue del 66.3% (95% IC, 66.3-66.8) y la especificidad del 96.2% (95% IC, 96.0-96.4); su valor predictivo positivo es del 86.3 (95% IC, 76.7-92.9) y el valor predictivo negativo del 88.9% (95% IC, 84.9-92.1); el likelihood ratio positivo de 17.6 (95% IC, 9.9-33.1) y el likelihood ratio negativo de 0.4 (95% IC, 0.3-0.4).

II. MARCO TEÓRICO

1. Antecedentes.

En 1906 Samuel T. Darling reportó los resultados de la autopsia de un hombre de 27 años, de raza negra, de ocupación carpintero, que vivía cerca de la zona del Canal de Panamá, quien ingresó por un cuadro de tres meses de evolución con fiebre y vómito. A su ingreso al hospital se le encontró con fiebre, taquicardia, deterioro neurológico y habla incoherente; hepatomegalia y esplenomegalia, úlceras en íleon y ciego y linfadenitis mesentérica. La sospecha clínica inicial fue de tuberculosis miliar, sin embargo, en la autopsia se encontró gran cantidad de “cuerpos ovals/redondeados” intra y extracelulares en tejido de bazo, médula ósea y pulmón sin tener evidencia del bacilo de la tuberculosis. A este nuevo organismo Darling lo llamó “*Histoplasma capsulata*”, ya que semejaba un parásito encapsulado dentro de un histiocito.¹

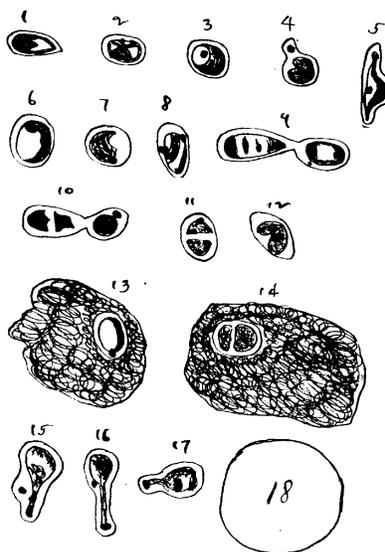


Figura 1. (X 2000), dibujos realizados por Samuel T. Darling. 1-8 formas del parásito; 9, 10, 11, 12 forma de subdivisión; 13, 14 parásito dentro del núcleo de las células esplénicas; 15, 16, 17, formas flageladas; 18, célula del epitelio alveolar que contiene parásitos.

Fuente: Darling ST. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymph nodes. JAMA 1906; 46: 1283-1285.

2. Epidemiología.

La histoplasmosis, una infección fúngica sistémica, causada por *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum*, la cual tiene una distribución mundial y representa la infección fúngica respiratoria más común en humanos y animales², así como la micosis endémica más frecuente en los Estados Unidos y en algunas áreas de México y del Centro y Sur de América.

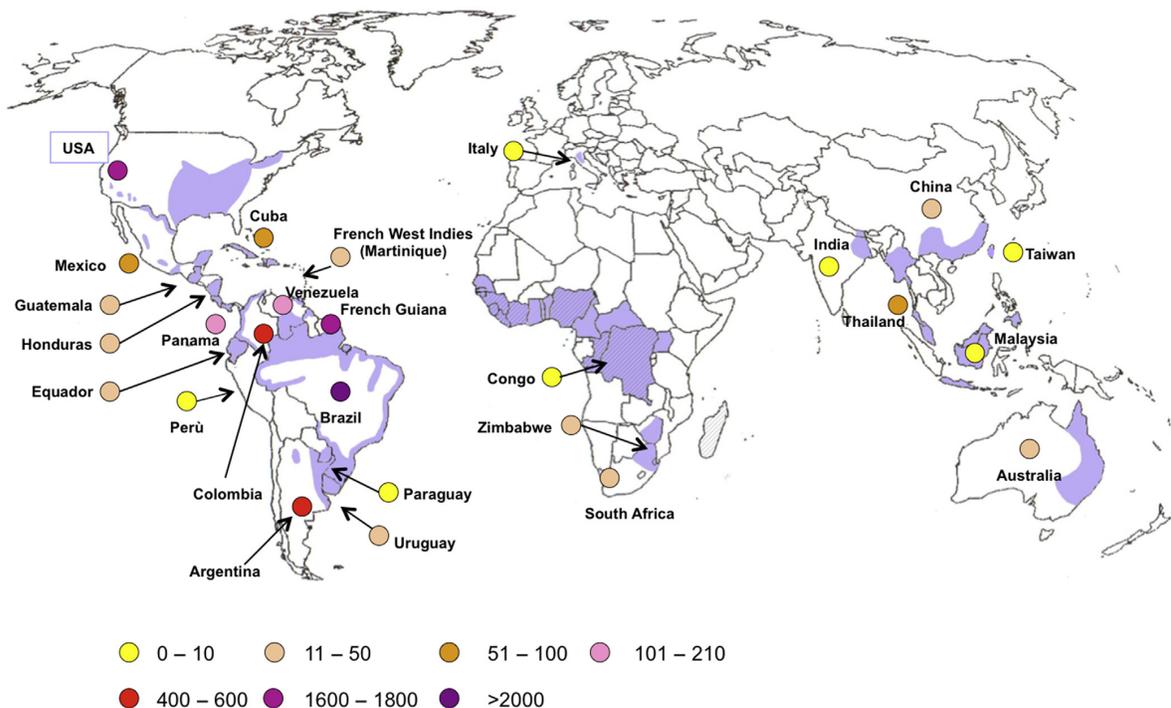


Figura 2. Distribución geográfica de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (morado) e *H. capsulatum* var. *duboisii* (sombreado). Los círculos representan el número de casos publicados autóctonos asociados a SIDA.

Fuente: Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, et al. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River Valley. *Curr Trop Med Rep* 2015; 2(2): 70-80.

En Estados Unidos se sabe que el área endémica en ese país es en los valles de los ríos Ohio y Mississippi y es la causa más frecuente de hospitalización y muerte³ de entre las micosis endémicas. Los registros de vigilancia de los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) estimaron 500,000 infecciones cada año en ese país⁴. Sin embargo, basados en estudios de pruebas cutáneas se estima

una tasa anual más alta. En un estudio realizado entre los marinos de la armada de E.U.A. la positividad para la prueba cutánea de histoplasmina fue del 20%, por lo que calcularon una tasa de infección⁵ del 1%, lo que representa 3 millones de infecciones al año.

En México, Aguirre-Pequeño⁶ reportó que probablemente desde el año 1895 tuviéramos casos sugestivos de histoplasmosis, según lo que constató en las Actas de Salubridad Pública del Estado de Nuevo León, sugiriendo una prevalencia alta entre los mineros expuestos a las esporas del hongo desarrolladas en el guano de los murciélagos; refirió además que esta enfermedad era del dominio popular, apodándola “enfermedad de las cuevas envenenadas”, al manifestarse con cianosis y expectoración hemoptóica.

El primer caso de histoplasmosis informado en México fue descrito por Perrín y Martínez Báez⁷ en 1943, y el primer brote oficial fue observado en dos individuos quienes visitaron una mina abandonada, “El Refugio”, en Lampazos, Nuevo León⁶. Se estableció desde 1957 por Valle y colaboradores, que pudiera ser una enfermedad ocupacional, ya que sus víctimas eran personas que habían penetrado en minas con fines de explotación o bien para extraer guano de murciélago⁸. En este sentido, Martínez Báez señala la importancia de usar métodos de protección para evitar el contagio entre los mineros⁹. Ya en Estados Unidos de América desde 1950 se había clasificado a la histoplasmosis como una enfermedad asociada a los mineros, campesinos y colectores de guano¹⁰.

De 1948 a 1955 se registraron en México 20 brotes y un caso aislado de histoplasmosis, con un total de 235 personas infectadas, algunos solo manifestados por la prueba de histoplasmina positiva. Y de 1956 a 1963 se reportaron 137 personas infectadas (en 11 brotes y 4 casos aislados)¹¹.

González-Ochoa fue el primer micólogo mexicano que propuso de alguna forma la prevalencia de la infección por *Histoplasma* en 22 estados de la República, estableciendo un panorama epidemiológico de la infección basado sobre todo en

pruebas de histoplasmina^{12,13,14}, con una prevalencia entre el 5% al 50% de la población, dependiendo del área estudiada (figura). Por ejemplo, en un estudio¹⁵ realizado en individuos de áreas rurales del estado de Querétaro (pueblo minero de Bucareli) alcanzaron valores de positividad de 53% en la prueba cutánea de histoplasmina. Estudios posteriores en el estado de Guerrero reportaron reacción positiva a la prueba cutánea del orden de 87.2, 80 y 4.7% en Juxtlahuaca, Olinalá y Coyuca de Benítez, respectivamente¹⁶. La variación de los valores dentro del mismo estado se explica posiblemente por la actividad ocupacional de los habitantes, ya que en Juxtlahuaca la población estudiada se asocia al trabajo en las grutas turísticas de la región, en Olinalá a la crianza de gallos de pelea y en Coyuca son una población de pescadores¹⁷.

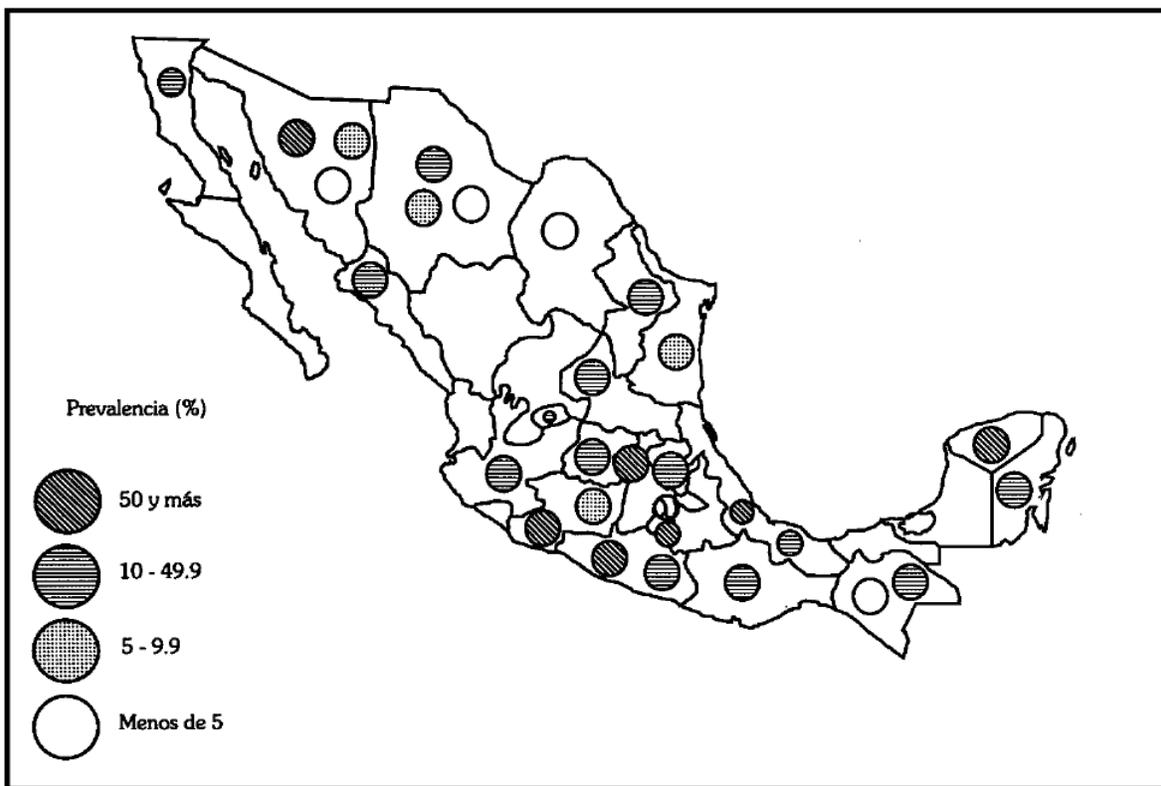


Figura 3. Distribución geográfica de la histoplasmosis en la República Mexicana según la prevalencia a la histoplasmina.

Fuente: Vaca-Marín MA, Martínez-Rivera MA, Flores-Estrada JJ. Histoplasmosis en México. Aspectos históricos y epidemiológicos. Rev Inst nal Enf Resp Mex 1998; 11: 208-215.

Desde 1963 y hasta 1994, Velasco-Castrejón documentó alrededor de 1500 casos en 110 brotes registrados¹⁸. (Tabla) Por su parte la Dirección General de Epidemiología (DGE) registró por medio del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA, 1065 casos de la forma epidémica de histoplasmosis de 1988 a 1994, siendo los estados del centro del país, seguidos del Pacífico Sur y del Golfo (sobre todo Veracruz y Oaxaca) los lugares donde más registro de casos hubo. (mapa) Los brotes se han registrado sobre todo en los estados de Campeche, Oaxaca, Veracruz, Colima y Tabasco.

Año	Sitio de la Epidemia, Estado	No. Casos	Letalidad (%)	Año	Sitio de la Epidemia, Estado	No. Casos	Letalidad (%)
1956	Grutas de Cacahuamilpa, Gro.	8	80	1980	Tecalitlán (túnel), Jal.	8	ND
1960	Túnel de Cardona, Colima	50	84.7	1980	Etzatlán, (mina aband.), Jal.	4	ND
1960	Cueva la Joya, Durango	11	100	1980	Guadalajara (caverna), Jal.	4	ND
1961	Grutas de Cacahuamilpa, Gro.	5	55.6	1980	Torreón (caverna), Coah.	4	ND
1973	El Chico (mina activa), Hgo.	15	46.6	1980	Tijuana, B.C.N.	1	ND
1973	Mina de los Santos, Querétaro	15	46.6	1980	Guanajuato (mina aband.), Gto.	4	ND
1979	Copalillo (túnel), Gro.	15	13.3	1980	Huxtlahuaca (caverna), Gro.	3	ND
1979	Tepic (mina aband.), Nay.	8	12.5	1980	San Joaquín (mina aband.), Qro.	1	ND
1979	Ajjic (túnel), Jalisco,	15	ND	1980	Tzitzio (mina aband.), Mich.	3	ND
1979	S.L.P. (cavernas), S.L.P.	30	ND	1980	S.L.P. (mina aband.)	3	ND
1979	Tzitzio (mina aband.), Mich.	1	ND	1980	Tamaulipas (cueva)	30	ND
1979	Chiapas, Chis.	1	100	1980	Yucatán (cueva)	3	ND
1979	Huasteca Potosina (mina aband.), S.L.P.	1	ND	1980	Indeterminado	13	ND
1979	Cuernavaca (mina aband.), Mor.	2	ND				
1979	Jalisco (mina aband.)	2	ND				

Tabla 1. Cronología de los brotes de histoplasmosis y focos de infección informados en México, 1956-1980.

Fuente: Boletines Epidemiológicos, Dirección General de Epidemiología. ND= No determinada; aband = abandonada.

Desde 1995 en nuestro país ya no se registran de forma oficial los casos, por lo que se ha observado, desde esa fecha, un importante descenso de la enfermedad debido a los escasos registros de la misma, lo que ha traído como consecuencia que no se cuente con reportes recientes de la epidemiología de la enfermedad. De esta forma no se aprecia la magnitud del problema, sin embargo, ésta debe ser muy importante considerando su asociación con la infección por VIH/SIDA.

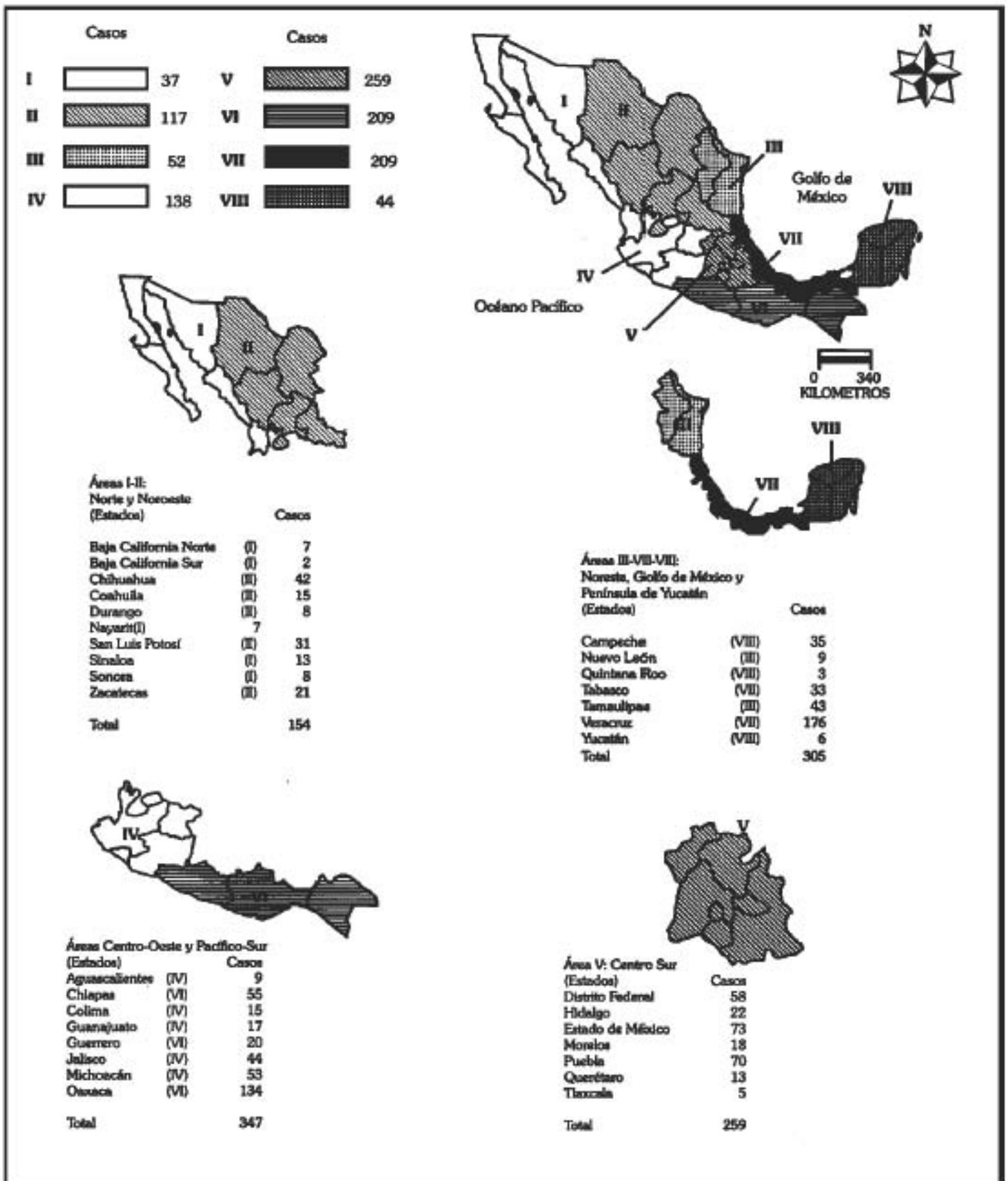


Figura 4. Distribución geográfica de casos de histoplasmosis en la República Mexicana, durante el periodo 1988-1994, según los datos de la Dirección General de Epidemiología.

Con la extensión de la epidemia por VIH en el mundo, la histoplasmosis diseminada y progresiva (HDP) se ha convertido en una amenaza para estos pacientes, ya que si no reciben tratamiento el desenlace suele ser fatal. La tasa de letalidad parece ser mayor en los países con áreas endémicas de histoplasmosis y una alta prevalencia de infección por VIH y que además se tenga baja sospecha clínica, escasa capacidad diagnóstica y poca experiencia en micología¹⁹. Más aún, la histoplasmosis es frecuentemente confundida con tuberculosis, y cuando el paciente presenta falla al tratamiento se diagnostica de forma equivocada como tuberculosis resistente²⁰. Como consecuencia, una gran cantidad de los casos y muertes reportados en estadísticas a nivel nacional como asociadas a VIH y tuberculosis, en realidad son causados por histoplasmosis²¹.

Según el reporte del 2013 de ONUSIDA en América Latina se estima que hay 1.5 millones de personas que viven con VIH²². Histoplasmosis es considerada una enfermedad definitoria de SIDA desde 1987²³. Se estima que en Panamá²⁴ el 7.65% de los pacientes con VIH tienen histoplasmosis confirmada por cultivo; en Guatemala²⁵, la histoplasmosis es la segunda infección oportunista más frecuente en los pacientes con VIH solo después de tuberculosis, pero con una mortalidad más alta; en Venezuela²⁶, antes de que se introdujera la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA), la histoplasmosis se diagnosticaba en el 21.5% de los pacientes con VIH; en Fortaleza, Brasil²⁷, en un estudio que documentó 378 ingresos consecutivos por VIH, se encontró HDP en 164 pacientes (43%); en la Guiana Francesa²⁸, histoplasmosis es la principal causa de enfermedad definitoria de SIDA y de muerte y se encontró que el 42% de los pacientes con VIH con cuentas celulares de CD4+ menores de 200 y el 85% de los pacientes con CD4+ menores de 50 son diagnosticados con HDP en ese país²⁹. Basados en estos datos y estimando una tasa de mortalidad de 40% por histoplasmosis en los pacientes con VIH, se estima que hay 9600 muertes por esta causa cada año; comparado con 84 muertes por malaria y 6000 muertes relacionadas a tuberculosis en pacientes con VIH en el 2013 (figura).

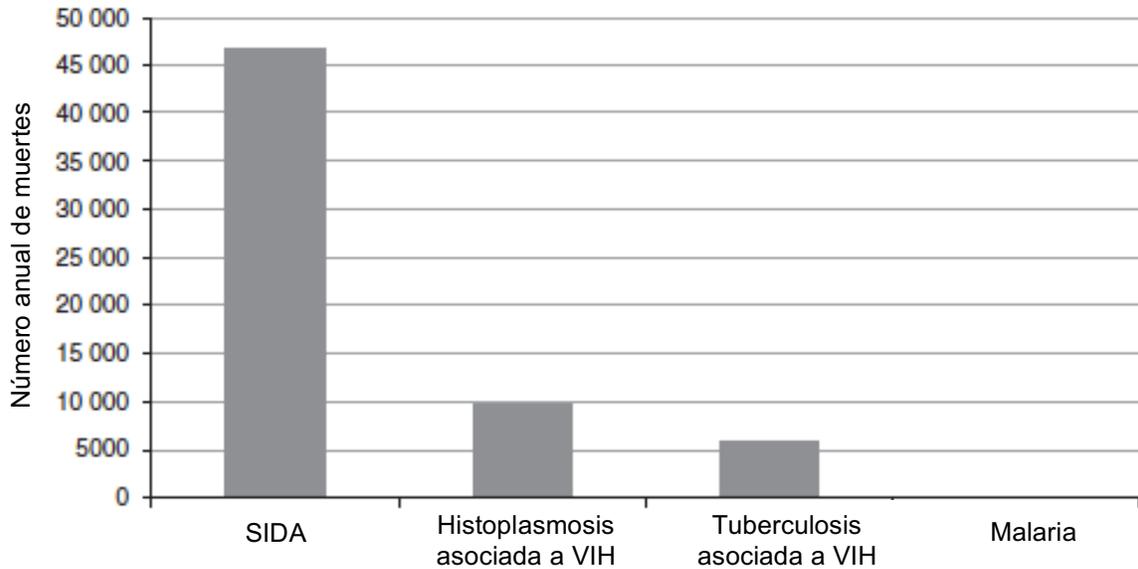


Figura 5. Número estimado de muertes por año por tipo de infecciones principales en América Latina.

Fuente: Group, Group, T. neglected histoplasmosis in L. A. (2016). Disseminated histoplasmosis in Central and South America, the invisible elephant: the lethal blind spot of international health organizations. *AIDS*, 30(2). Retrieved from https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2016/01140/Disseminated_histoplasmosis_in_Central_and_South.2.aspx

El progreso en el cuidado de las personas viviendo con VIH, sobre todo la Terapia Antirretroviral Altamente Activa (TARAA) ha disminuido de manera importante la incidencia de SIDA y muertes relacionadas a SIDA en países desarrollados. En países en vías de desarrollo estos aspectos continúan siendo un reto, y las infecciones fúngicas oportunistas representan un grupo etiológico importante y poco sospechado. Se cree que la histoplasmosis es la principal condición definitoria de SIDA y principal causa de muerte en pacientes con VIH en América Latina. Las guías de la OMS de 2017 para el manejo de infección avanzada por VIH recomiendan por primera vez realizar tamizaje y tratamiento para histoplasmosis en las personas viviendo con VIH en América Latina.

En un estudio publicado en el *Lancet Infectious Diseases*³⁰ en agosto de 2018 cuyo objetivo era comparar la carga de histoplasmosis asociada a VIH con la de tuberculosis en América Latina, reportó una prevalencia de exposición previa a *H. capsulatum* del 32.2% para América Latina en la población general, con un rango de 0.1% en Chile a 57.2% en Guatemala; México con una mediana de 22.8%. La incidencia de histoplasmosis (sintomática y asintomática) en pacientes viviendo con VIH en México en el 2012 fue de 0.92 (0.88-0.96) por 100 personas viviendo con VIH (comparada con la incidencia para la región de América Latina en general de 1.48 casos por 100 personas viviendo con VIH, lo que representa 22 000 casos al año). El número total de casos con histoplasmosis sintomática asociados a VIH en personas con cuentas de CD4 <200 células/ μ L en América Latina fue de 22637 para el año 2012 y para nuestro país se estimó considerando tres escenarios donde el 30%, 50% y 70% del total de infectados con histoplasmosis fuera sintomática se calculó una mediana de 477, 794, 1112 casos respectivamente, en comparación con el reporte de la OMS de 2500 casos de tuberculosis sintomática asociada a VIH en el mismo año en México. Considerando un escenario intermedio en el que el 50% de las infecciones por *Histoplasma* en pacientes con VIH en América Latina son sintomáticas, estimaciones sobre el número total de muertes relacionadas a histoplasmosis en personas viviendo con VIH en esta región para el año 2012 fue de 1118 de acuerdo a un 10% tasa de mortalidad, 2237 con un 20% de mortalidad, 4473 en el escenario de 40% y de 6710 en el escenario de 60% de mortalidad. Para ese mismo año hubo 5062 muertes por tuberculosis en pacientes con VIH según el reporte de la OMS en América Latina. Considerando el peor escenario con un 60% de mortalidad y con la tasa más alta de histoplasmosis sintomática (70%), el número total de muertos asociados a histoplasmosis fue de 9394 pacientes en América Latina. En México, con estas mismas consideraciones se estimarían 667 muertes asociadas a histoplasmosis comparadas con 430 muertes asociadas a tuberculosis.



Figura 6. Mapa. Incidencia anual estimada de histoplasmosis por 100 personas viviendo con VIH en América Latina en el año 2012.

Fuente: Adenis, A. A., Valdes, A., Cropet, C., McCotter, O. Z., Derado, G., Couppie, P., Nacher, M. (2018). Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*. doi:10.1016/s1473-3099(18)30354-2

	Prevalencia Histoplasma	Personas viviendo con VIH (bajo - alto)	Incidencia anual de Histoplasmosis		Incidencia anual de Histoplasmosis sintomática en pacientes			Incidencia anual de Tuberculosis en personas viviendo
			Por 100 personas	N	N(30)	N(50)	N(70)	
Argentina	37.8% (35.3-40.3)	98 000 (80 000-120 000)	1.89 (1.70-2.10)	1864 (1546-2232)	559 (464-670)	932 (773-1116)	1305 (1082-1562)	280 (270-630)
Belize	49.4% (41.7-57.1)	3100 (2800-3400)	3.04 (2.22-4.15)	94 (68-130)	28 (21-39)	47 (34-65)	66 (48-91)	29 (26-31)
Bolivia	22.0% (20.9-23.1)	16 000 (8500-24 000)	0.88 (0.82-0.94)	141 (93-191)	42 (28-57)	70 (47-96)	99 (65-134)	420 (390-560)
Brazil	20.3% (19.7-20.8)	595 000 (530 000-660 000)	0.79 (0.77-0.82)	4714 (4321-5120)	1414 (1296-1536)	2357 (2161-2560)	3300 (3025-3584)	14 000 (13 990- 14 010)
Chile	0.1% (0.03-0.17)	39 000 (25 000-61 000)	0.003 (0.001-0.005)	1.22 (0.35-2.36)	0.37 (0.10-0.71)	0.61 (0.17-1.18)	0.85 (0.24-1.65)	51 (48-120)
Colombia	25.1% (24.4-25.7)	150 000 (110 000-190 000)	1.04 (1.01-1.08)	1565 (1264-1867)	469 (379-560)	782 (632-933)	1095 (885-1307)	1400 (1200-1700)
Costa Rica	36.7% (34.5-38.5)	9800 (8800-11 000)	1.81 (1.64-1.95)	177 (156-199)	53 (47-60)	89 (78-100)	124 (109-140)	61 (55-68)
Ecuador	22.6% (20.0-25.2)	52 000 (36 000-99 000)	0.91 (0.78-1.05)	508 (346-762)	153 (104-228)	254 (173-381)	356 (242-533)	1200 (1100-1400)
El Salvador	44.5% (35.9- 55.0)	25 000 (16 000-45 000)	2.50 (1.75-3.80)	660 (383-1166)	198 (115-350)	330 (191-583)	462 (268-816)	220 (210-220)
French Guiana	32.5% (29.3-35.7)	2900 (1935-3390)	1.50 (1.29-1.73)	42 (32-53)	13 (10-16)	21 (16-26)	30 (23-37)	22 (14-30)
Guatemala	57.2% (54.8-59.6)	58 000 (36 000-130 000)	4.16 (3.78-4.60)	2676 (1665-4322)	803 (500-1297)	1338 (833-2161)	1873 (1166-3025)	900 (810-1000)
Guyana	47.0% (37.1-56.9)	7200 (4300-12 000)	2.76 (1.84-4.12)	204 (116-353)	61 (35-106)	102 (58-177)	143 (81-247)	200 (200-270)
Honduras	38.8% (38.5-39.0)	26 000 (21 000-33 000)	1.97 (1.95-1.99)	518 (441-607)	155 (132-182)	259 (220-304)	363 (308-425)	460 (360-560)
Mexico	22.8% (22.1-23.6)	170 000 (150 000-210 000)	0.92 (0.88-0.96)	1589 (1411-1818)	477 (423-545)	794 (706-909)	1112 (988-1273)	2500 (2500-2600)
Nicaragua	36.7% (34.5-38.6)	9600 (6600-15 000)	1.81 (1.64-1.95)	179 (130-241)	54 (39-72)	89 (65-120)	125 (91-168)	110 (100-120)
Panama	34.9% (33.8-36.0)	17 000 (12 000-22 000)	1.67 (1.59-1.75)	284 (224-346)	85 (67-104)	142 (112-173)	198 (157-242)	280 (250-310)
Paraguay	17.5% (16.4-18.6)	13 000 (7400-24 000)	0.66 (0.61-0.71)	90 (57-134)	27 (17-40)	45 (29-67)	63 (40-94)	280 (260-300)
Peru	19.7% (18.4-21.0)	76 000 (36 000-230 000)	0.76 (0.70-0.83)	693 (334-1 302)	208 (100-391)	346 (167-651)	485 (234-912)	2400 (2200-2700)
Suriname	43.1% (40.7-45.5)	4000 (3600-4400)	2.36 (2.14-2.60)	94 (83-107)	28 (25-32)	47 (42-53)	66 (58-75)	59 (51-67)
Uruguay	10.2% (10.0-10.5)	13 000 (9800-19 000)	0.35 (0.35-0.36)	47 (37-60)	14 (11-18)	24 (19-30)	33 (26-42)	130 (120-140)
Venezuela	48.2% (47.8-48.6)	110 000 (74 000-160 000)	2.90 (2.85-2.95)	3243 (2422-4178)	973 (727-1253)	1622 (1211-2089)	2270 (1695-2925)	1200 (1000-1200)
Total for Latin America	32.2% (32.0-32.4)	1500 000 (1200 000-1900 000)	1.48 (1.47-1.49)	22637 (18934-26225)	6710 (5680-7867)	11183 (9467-13112)	15 657 (13254-18357)	26 202 (25155-28032)

Figura 7. Incidencia anual estimada de histoplasmosis por 100 personas viviendo con VIH en América Latina en el año 2012 y prevalencia.

Fuente: Adenis, A. A., Valdes, A., Cropet, C., McCotter, O. Z., Derado, G., Couppie, P., Nacher, M. (2018). Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*. doi:10.1016/s1473-3099(18)30354

3. Micología.

Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico, que tiene la capacidad de crecer tanto en una forma levaduriforme como en una fase micelial en respuesta a los estímulos ambientales, como son la tensión de CO₂, la temperatura de incubación, potenciales de oxidación-reducción y factores nutrimentales³¹.

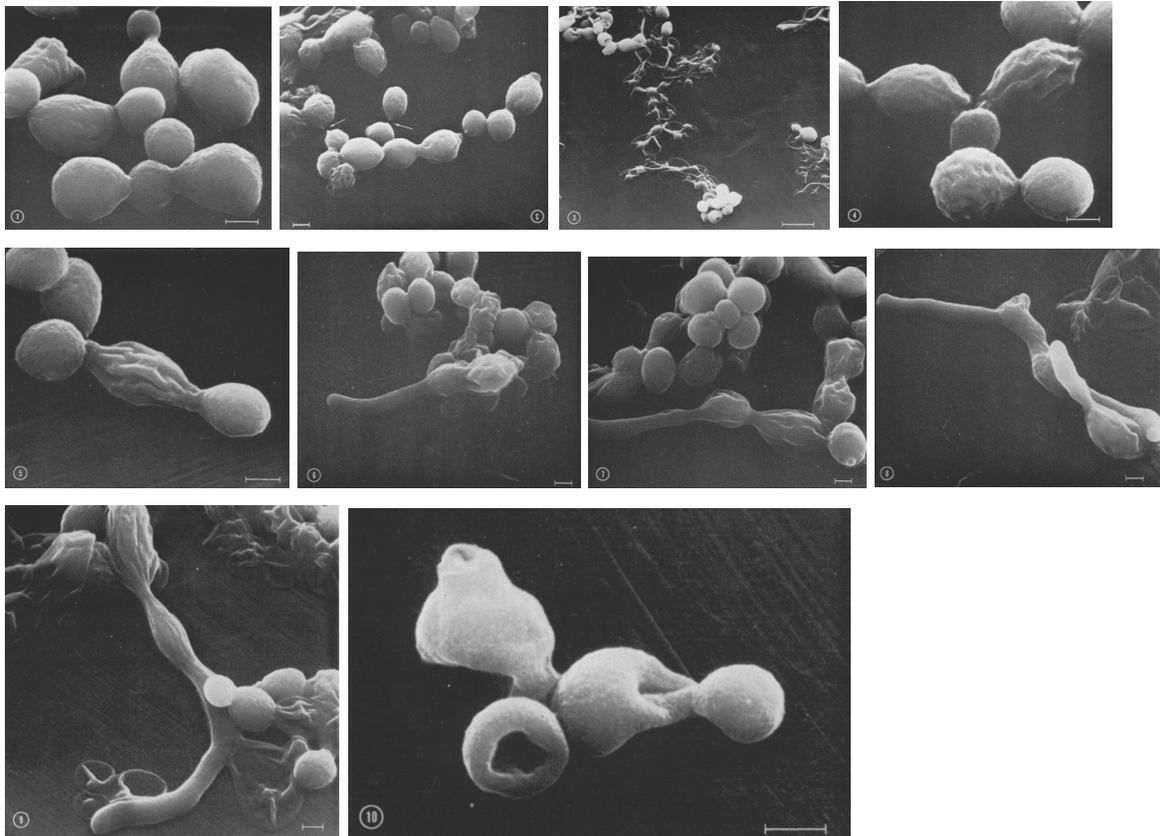


Imagen 1. Fotografías de microscopía electrónica sobre el momento de cambio de fase levaduriforme a fase micelial de *Histoplasma capsulatum*.

Fuente: Garrison RG, Lane JW. Yeastlike to Mycelial Phase Transformation of *Histoplasma capsulatum* as Observed by Scanning Electron Microscopy. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, vol. 43, 2, pag. 185-193, 1971.

Existen dos variedades de *H. capsulatum* que son patógenas en humanos: *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii*, mientras que *H. capsulatum* var. *farciminosum* es un patógeno en caballos. Hasta ahora se han identificado 8 clados: (i) América del Norte clado clase 1; (ii) América del Norte clado

clase 2; (iii) América Latina clado grupo A; (iv) América Latina clado grupo B; (v) clado Australiano; (vi) clado de los Países Bajos (¿Indonesia?); (vii) clado Euro-Asia y (viii) clado Africano. Lo que en realidad tiene importancia es que estos clados representan especies filogenéticas con poblaciones geográficamente distintas. Se cree que la presencia de *Histoplasma* en América Latina tiene entre 3 y 13 millones de años³².

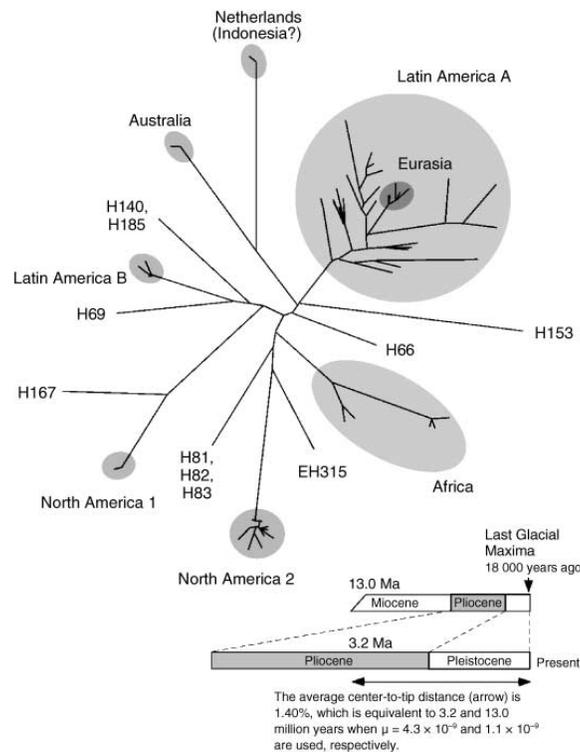


Figura 8. Representación gráfica del árbol filogenético de la vecindad-uni3n de los clados de histoplasma. El promedio de distancia gen3tica entre los diferentes linajes fue de 2.8%. La mitad de los valores corresponde al punto del tiempo de la radiaci3n, que es entre 3.2 y 13.0 millones de a3os cuando se usan tasas de sustituci3n de ADN de 4.3×10^{-9} y 1.1×10^{-9} , respectivamente.

Fuente: Kasuga, T., White, T. J., Koenig, G., Mcewen, J., Restrepo, A., Castañeda, E., Da Silva Lacaz, C., Heins-Vaccari, E. M., De Freitas, R. S., Zancop3-Oliveira, R. M., Qin, Z., Negroni, R., Carter, D. A., Mikami, Y., Tamura, M., Taylor, M. L., Miller, G., Poonwan, N. and Taylor, J. W. (2003), Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Ecology*, 12: 3383-3401. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x

Este hongo se encuentra en la naturaleza principalmente como un moho saprofito, en suelos enriquecidos con fuentes orgánicas de nitrógeno como es en los suelos con guano de aves o de murciélagos³³.

Las actividades que más comúnmente se han asociado como fuente de exposición a *Histoplasma capsulatum* incluyen los granjeros, exposición a gallineros o cuevas, remodelación o demolición de edificios viejos, y tala o limpieza de árboles donde aves como los mirlos han estado^{34, 35}.

En el laboratorio el hongo puede crecer como hongo filamentoso cuando es sembrado en medios de cultivo a temperaturas menores de 35°C. La forma filamentosa se compone de hifas hialinas septadas de 1-2.5 µm de diámetro. Estas hifas producen dos estructuras hialinas de reproducción asexual. Las macroconidias que son estructuras redondeadas, de pared gruesa, de 7-15 µm de diámetro, tuberculados o con proyecciones cilíndricas cortas. Las microconidias por su parte son estructuras esféricas, de pared delgada, de forma piriforme, entre 2-6 µm de diámetro³⁶.

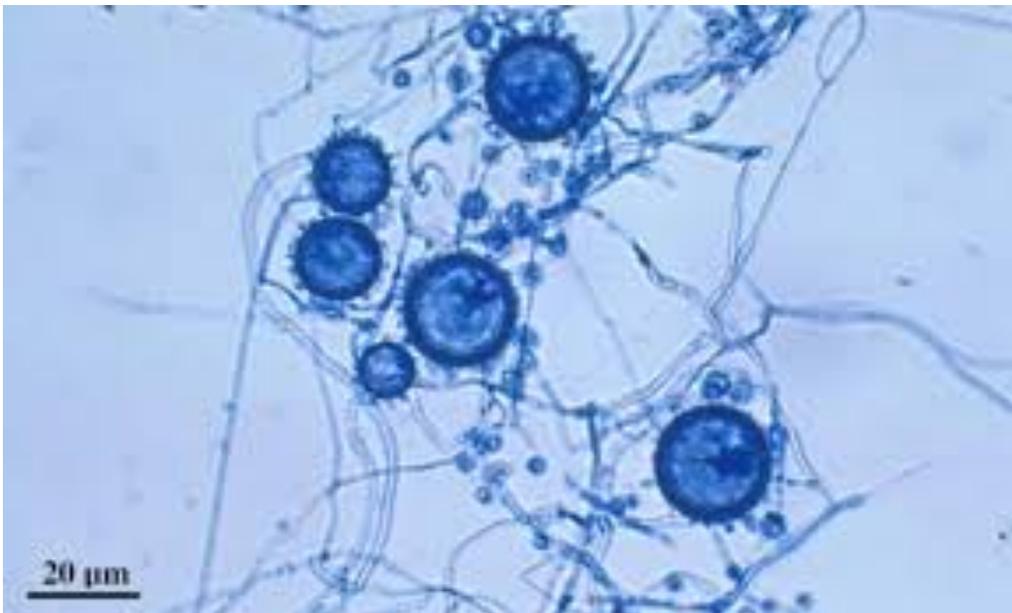
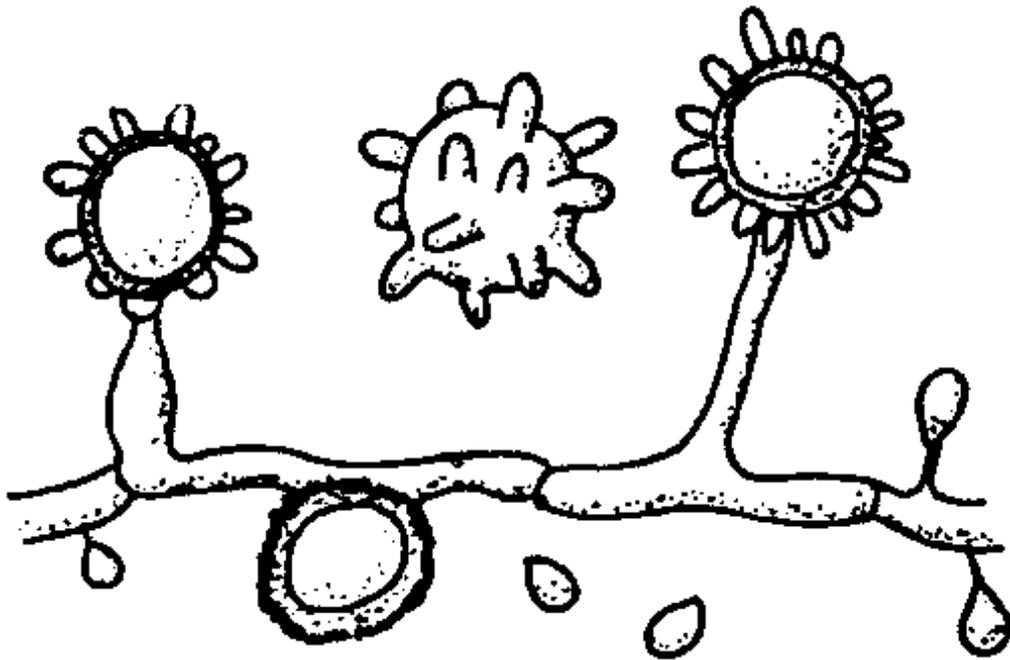


Imagen 2. Representación gráfica y foto de tinción con azul-algodón de *H. capsulatum*, en fase micelial, donde se observan hifas hialinas, macroconidias y microconidias.

En contraste, la forma parasítica de levadura generalmente se identifica en muestras de tejido, dentro de los macrófagos y células del sistema reticuloendotelial. *H. capsulatum* var. *capsulatum* suelen ser levaduras pequeñas (2-4 μm de largo), de pared gruesa y forma ovoide, con base estrecha en un extremo. En el laboratorio crece a temperaturas $\geq 37^\circ\text{C}$ en medios especiales³⁷.

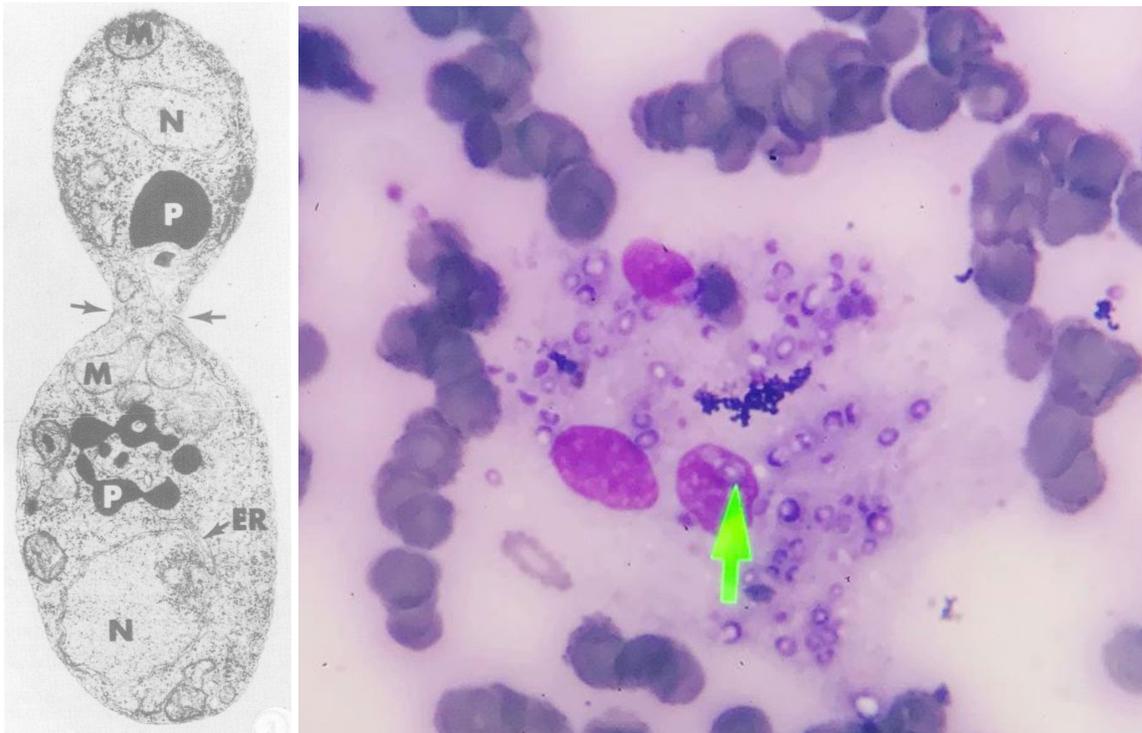


Imagen 3. Izquierda. Foto de microscopía electrónica: Célula de levadura uninucleada (N) madre y botón. Mitocondria (M), retículo endoplásmico (ER), gránulo de polifosfato (P). Las flechas indican el inicio de la formación del septo. Derecha: tinción de Wright de concentrado leucocitario donde se observan estructuras ovaladas, levaduras, intracelulares y extracelulares, sugestivas de *H. capsulatum*.

Fuente: Garrison, R. G. 1985. Cytological and ultrastructural aspects of dimorphism. p. 15-47. In P. J. Szaniszlo (ed.). Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans. Plenum Publishing Corp. New York.

Kwon-Chung describió una fase sexual de *H. capsulatum*, clasificado como ascomiceto, designado originalmente como *Emmonsia capsulata* (y después renombrada como *Ajellomyces capsulatum*). *A. capsulatum* es heterotálico: tiene dos formas de apareamiento (+) y (-). Los pacientes con histoplasmosis tienen preferentemente el tipo de apareamiento (-)³⁸.

4. Patogénesis.

La infección por histoplasma ocurre al inhalar las microconidias que se encuentran en el ambiente. Ésta suele ser asintomática en personas sanas, a menos que el inóculo inhalado sea alto³⁹. En ausencia de situaciones de inmunocompromiso, la infección aguda se resuelve mediante la activación de la inmunidad celular. Como consecuencia del reconocimiento del estímulo patógeno por los linfocitos T, se induce la producción de factor de necrosis tumoral α e interferón gamma, activando así los macrófagos para inhibir el crecimiento del organismo y proteger al hospedero en contra de la infección⁴⁰. La depleción de linfocitos T produce una menor producción de citosinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral α e interferón gamma), aumentando la carga fúngica y la mortalidad en los pacientes.

Los mamíferos quedan expuestos a *H. capsulatum* al inhalar las conidias y fragmentos de hifas que se encuentran en la tierra; hasta el momento no existe documentación de casos que se hayan infectado por transmisión a través de contacto con individuos infectados. Sin embargo, la transmisión vertical se documentó en una ocasión en un neonato⁴¹. En raras ocasiones, la histoplasmosis se puede adquirir por inoculación cutánea del hongo.

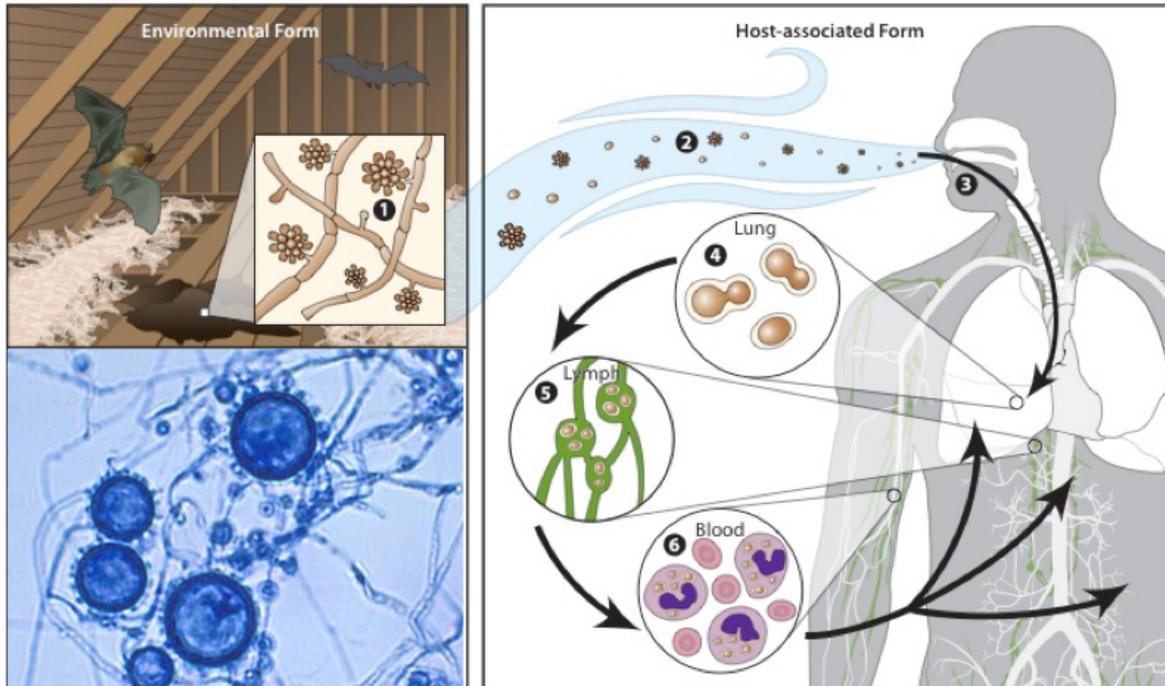


Figura 9. En el ambiente, *Histoplasma capsulatum* se encuentra como hongo filamentosos con hifas aéreas. Las hifas producen macroconidias y esporas de microconidias que son aerosolizadas y dispersadas en el ambiente. Las microconidias son inhaladas hacia los pulmones en los huéspedes susceptibles o en riesgo. La temperatura corporal más cálida activa la transformación del hongo en levaduras ovoideas, las cuales son fagocitadas por el sistema inmune y transportadas a los ganglios linfáticos regionales, desde ahí, el hongo puede viajar a través de la sangre a cualquier parte del cuerpo, sobre todo en casos de pacientes inmunosuprimidos.

Fuente: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/causes.html>; Centers for Disease Control and Prevention

A pesar de que el organismo puede persistir en granulomas de forma continua en la mayoría de los individuos sanos, por lo general el hongo no es viable y es poco frecuente que ocurra infección latente, como ocurre en tuberculosis. Sin embargo, entre los pacientes inmunocomprometidos, donde la inmunidad celular no se desarrolla normalmente, puede existir una reactivación y progresión de la infección y la muerte si no reciben tratamiento de forma oportuna.

El primer paso en la patogénesis es la conversión de la fase saprofitica micelial a la fase de levadura parasitaria. Este proceso puede llevar un tiempo en el medio de cultivo, pero en la presencia de macrófagos en el cuerpo humano ocurre más rápido. La fagocitosis de microconidias y pequeños fragmentos de micelios ocurre en 4 a 6 horas, y la conversión a la fase levaduriforme es aparente entre 24 y 72 horas⁴². Esta transición a levadura es absolutamente necesaria para producir infección⁴³. La conversión en el laboratorio de la fase micelial a la fase de levadura es desencadenada por la temperatura, teniendo relación con el cambio entre el suelo y las células del huésped. Otro factor reconocido necesario en algunas cepas para lograr esta transición es la presencia de cisteína, que se piensa es la que provee de grupos sulfhidrilos suficientes para el proceso y además es un nutriente esencial para la levadura⁴⁴.

Como se mencionó previamente, *H. capsulatum* tiene la habilidad de parasitar a los macrófagos. Una vez que es ingerido y dentro del fagosoma, las levaduras se multiplican a una velocidad comparable a cuando se encuentran en medio de cultivo líquido⁴⁵. El ambiente intracelular provee de ventajas para la supervivencia, incluidas el tener acceso a otros órganos vía sanguínea o linfática y contar con niveles suficientes de hierro útiles para el crecimiento de las levaduras⁴⁶.

Las levaduras y las microconidias de *H. capsulatum* se unen a los receptores CD18 presentes en los macrófagos derivados de monocitos, macrófagos alveolares y polimorfonucleares⁴⁷ lo que permite su unión a estas células y facilita su ingestión. Es probable que la conversión de la fase micelial a la fase levaduriforme tenga lugar, al menos parcialmente, en el espacio intracelular.

Después de la transformación de conidias a levaduras que se lleva a cabo en el pulmón, las levaduras migran, muy posiblemente de forma intracelular, a ganglios linfáticos y posteriormente a órganos distantes ricos en fagocitos mononucleares (hígado, bazo). Las levaduras crecen dentro de los macrófagos.

Para lograr ser un parásito intracelular exitoso, *Histoplasma* no solo debe evitar el efecto de los metabolitos de oxígeno tóxico, sino que también debe evadir las vesículas fagocíticas que acidifican el medio y eventualmente se fusionan con los lisosomas. Un mecanismo de supervivencia que emplea el hongo es el de la alcalinización del fagolisosoma⁴⁸. El mantener el pH en el fagosoma entre 6.0 y 6.5 tiene un doble efecto, por un lado, permite inactivar a las hidrolasas ácidas de los lisosomas y por otro, con este pH las levaduras son capaces todavía de adquirir el hierro de la transferrina⁴⁹, ya que esto requiere un ambiente ácido.

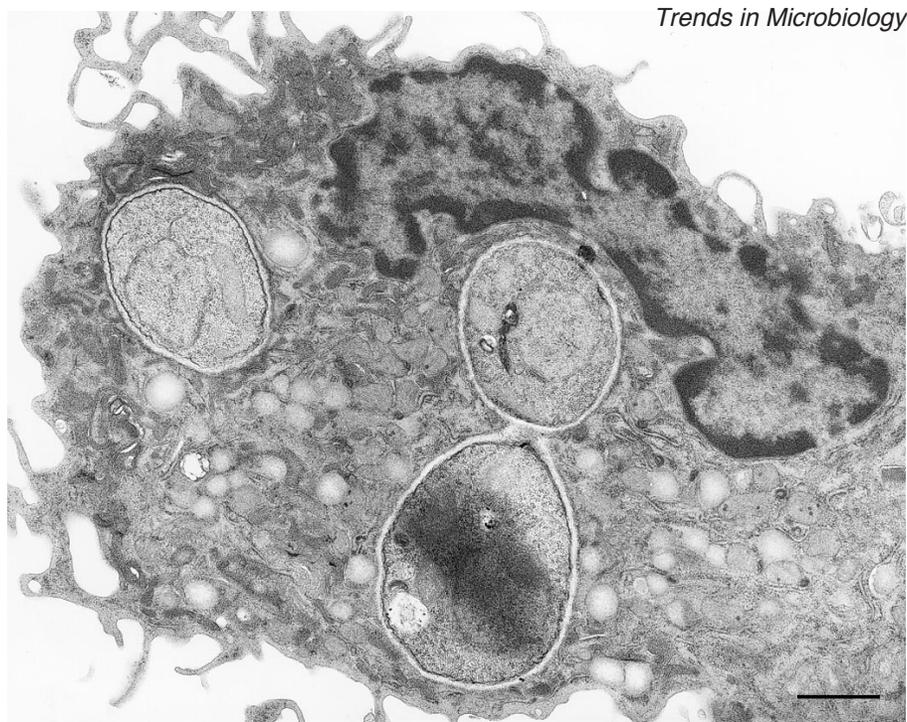


Imagen 4. Micrografía electrónica de levaduras de *Histoplasma capsulatum* dentro de un macrófago humano. Nótese la pared celular gruesa electrón-traslúcida de las levaduras, lo que caracteriza a las especies de *Histoplasma*. Escala barra = 1 μm .

Fuente: Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol.* 7:67-71 1999

Se ha reportado que los macrófagos de los pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) tienen interacción defectuosa con *H. capsulatum*. Estas células unen menor cantidad de levaduras que las células de pacientes no

infectados por VIH; además existe una correlación directa entre la cuenta de linfocitos T CD4+ y la capacidad de los macrófagos de unirse a las levaduras. Sin embargo, una vez dentro de los macrófagos la velocidad de reproducción de las levaduras es mayor en pacientes con VIH. La glicoproteína 120 del VIH es la responsable de la inhibición de la unión de las levaduras con los macrófagos, pero no altera las características de crecimiento de la levadura dentro de los fagocitos⁴⁹.

5. Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad varían desde un cuadro asintomático, enfermedad similar a influenza, histoplasmosis pulmonar crónica, nódulos pulmonares, linfadenopatía mediastinal (o adenitis mediastinal), granulomas o fibrosis mediastinales, histoplasmosis pulmonares, broncolitiasis, presunta histoplasmosis ocular, hasta histoplasmosis diseminada y progresiva, pudiendo afectar prácticamente cualquier tejido del cuerpo⁵⁰. Las manifestaciones dependen principalmente de la magnitud de la exposición (número de partículas inhaladas), el estado inmunológico del huésped y la virulencia de la cepa infectante⁵¹. La gran mayoría de las personas infectadas no presentan síntomas o son leves, por lo que la enfermedad pasa inadvertida⁵².

Entre las personas sintomáticas la infección suele presentarse posterior a la exposición primaria de *H. capsulatum*, sin embargo, es posible que pueda haber reactivación de la infección latente sobre todo entre los pacientes inmunosuprimidos como se mencionó previamente.

La CDC definió enfermedad severa como la que se presenta en aquellos pacientes con histoplasmosis diseminada que presenten uno o más de los siguientes criterios: temperatura >39°C, presión arterial sistólica <90 mmHg, pO₂ <70 torr, pérdida de peso >5% del peso corporal total en los últimos 6 meses, score de desempeño Karnofsky <70, hemoglobina <10 g/dL, cuenta de neutrófilos <1000 cel./μL, cuenta de plaquetas <100,000 cel./μL, AST >2.5 veces el límite superior normal, bilirrubina

o creatinina >2 veces el límite superior normal, albumina <3.5 g/dL, coagulopatía, presencia de disfunción orgánica o meningitis confirmada⁵³.

5.1 Histoplasmosis diseminada y progresiva.

El término de histoplasmosis diseminada y progresiva (HDP) se refiere al crecimiento implacable del hongo en múltiples órganos y sistemas. Se estima que la incidencia es de 1 en 2000 casos de histoplasmosis.

En un estudio publicado con respecto a dos epidemias de histoplasmosis en Indianápolis, los principales factores de riesgo identificados para el desarrollo de HDP fueron la edad mayor a 54 años y la inmunosupresión⁵⁴ especialmente la infección por VIH/SIDA con cuentas de linfocitos T CD4+ <200 cel./ μ L. En la era pre terapia antirretroviral altamente activa (pre-TARAA), la incidencia llegó a ser de 25% en pacientes con SIDA en regiones endémicas. Otros factores de riesgo documentados para HDP son el uso de antagonistas anti-TNF- α o de esteroides, linfopenia de CD4+, malignidad hematológica, trasplante de órgano sólido o de médula ósea, inmunodeficiencia común variable, síndrome de hiper-IgE (Job), defectos en interleucina 12 o en IFN-gamma^{55,56}.

Un paciente puede desarrollar HDP tras la exposición a un gran inóculo del hongo o por la reactivación de un sitio endógeno latente. Actualmente las poblaciones más frecuentemente afectadas son los pacientes con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) y los pacientes con malignidad hematológica como linfomas.

En los pacientes infectados por VIH, los factores de riesgo asociados a histoplasmosis son: cuenta de CD4+ menor a 200 células/ μ L, historia de exposición a gallineros y la presencia de anticuerpos contra histoplasma previamente⁵⁷. En más del 90% de los casos los pacientes presentan fiebre, pérdida de peso, fatiga, mal estar general y anorexia. Los hallazgos físicos más frecuentes son estertores,

hepatoesplenomegalia y linfadenopatías. Es menos frecuente que presenten úlceras orales o lesiones cutáneas. Aunque estudios reportados previamente mencionan que los casos de América Latina en comparación con los de Estados Unidos, más frecuentemente reportan lesiones en piel⁵⁸. Otras manifestaciones reportadas son: masas colónicas, úlceras perianales, corioretinitis, meningitis y encefalitis. Como complicaciones del cuadro puede haber insuficiencia adrenal, síndrome hemofagocítico reactivo y choque séptico con falla hepática, renal, respiratoria (incluyendo SIRA) y coagulopatía. Las afecciones a sistema nervioso central como meningitis, cerebritis o lesiones focales en cerebro o médula espinal ocurren en el 5% al 10% de los casos.

Entre los hallazgos de laboratorio en esta población se encuentran: anemia, trombocitopenia y leucopenia; la elevación de enzimas hepáticas, de deshidrogenasa láctica y de ferritina son poco específicos pero sugestivos de HDP.

En la radiografía de tórax es común la presencia de opacidades nodulares o un patrón retículo-nodular difuso, intersticial o miliar, aunque en 10% a 50% de los casos la radiografía puede ser normal⁵⁹.

La mortalidad de HDP en pacientes inmunosuprimidos es del 100% si no reciben tratamiento oportuno. Es por esto que un diagnóstico rápido y correcto que permita el inicio de antifúngicos de manera temprana es crítico para mejorar el desenlace de los pacientes. En la era previa a la existencia de antifúngicos efectivos, la mayoría de los pacientes morían en el transcurso de 5 a 6 semanas del inicio de los síntomas. Con terapia, las tasas de supervivencia son mayores al 80%.

6. Diagnóstico.

Histoplasmosis representa un reto para los médicos por tres motivos:

1. Los síntomas clínicos no son específicos.
2. No existe una prueba diagnóstica que sea al mismo tiempo sensible, específica, accesible, rápida y barata.
3. Los tratamientos más efectivos son tóxicos y caros.

La “European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group” (EORTC) y el “National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group” (MSG) publicaron definiciones estándar para establecer el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas y por micosis endémicas⁶⁰. Esto con el fin de facilitar la homogenización de los grupos de pacientes para investigaciones clínicas y epidemiológicas, ayudar a diseñar estudios clínicos para evaluar nuevos fármacos y estrategias de manejo, y para lograr una comunicación entre investigadores internacionales.

De acuerdo a la EORTC se define **“Histoplasmosis Probada”** como aquel paciente que presente una enfermedad consistente con histoplasmosis y tenga uno de los siguientes:

- Cultivo positivo para *Histoplasma capsulatum* obtenido de algún sitio afectado o en sangre
- Demostración por histopatología o por microscopía directa la presencia de levaduras intracelulares características dentro de un fagocito en frotis de sangre periférica o en macrófagos de tejidos.

E **“Histoplasmosis Probable”** como la presencia de factores de riesgo en el hospedero para la enfermedad (como historia reciente de neutropenia, receptor de trasplante alogénico de células hematopoyéticas, uso prolongado de esteroides, uso de inmunosupresores o inmunodeficiencias heredadas o adquiridas, entre otros), más cuadro clínico compatible con la enfermedad y evidencia micológica

sugestiva de histoplasmosis como antígeno de *Histoplasma* positivo ya sea en orina, sangre o líquido cefalorraquídeo.

Basados en las definiciones previas, el diagnóstico de histoplasmosis requiere generalmente un abordaje multifacético, que incluya evidencia convincente por laboratorio. El escoger un método diagnóstico sobre otro dependerá de la forma de presentación y estadio de la enfermedad, la disponibilidad de la misma, el costo, la sensibilidad, especificidad y el tiempo que se tardan en tener listos los resultados.

Los métodos diagnósticos probados incluyen tinciones de tejidos o fluidos corporales (Wright, Grocott), cultivos, detección de antígenos en orina y anticuerpos en sangre, métodos moleculares y análisis histopatológico de biopsias⁶¹.

Cultivo

El cultivo sigue siendo el estándar de referencia en el diagnóstico de histoplasmosis diseminada, sobre todo en pacientes con VIH. La especificidad es cercana al 100% pero la sensibilidad depende de las manifestaciones clínicas (pulmonar vs diseminada), del estado de inmunidad del paciente, de la carga fúngica y de la experiencia del laboratorio, por lo que se ha reportado una variación entre el 50% y 85%.

En la enfermedad diseminada, el cultivo con mayor rendimiento diagnóstico es el cultivo de médula ósea, el cual es positivo en más del 75% de los casos⁶². En los casos diseminados, si se utiliza la técnica de hemocultivo con centrifugación-lisis puede contribuir a aumentar el rendimiento diagnóstico de *H. capsulatum*. Cuando la muestra se incuba en el medio apropiado a 25-30 °C, el crecimiento del hongo en la fase micelial ocurre regularmente entre las 2-3 semanas, pero puede tomar hasta 8 semanas demostrar su crecimiento, lo que retrasa el tratamiento del paciente⁶³.

Histoplasma capsulatum en su fase filamentosa de *H. capsulatum* generalmente crece como un micelio algodonoso color blanco o amarillo, y que en la examinación microscópica con tinción de azul algodón lactofenol se observan microconidias (2-5 μm) y macroconidias redondas (7-15 μm) con tubérculos, que se originan de conidióforas hialinas septadas. Las macroconidias con tubérculos son muy sugestivas de *Histoplasma* sin embargo es importante tomar en cuenta que *Sepedonium* spp produce conidias similares en apariencia, por lo que para realizar la identificación definitiva se recomienda usar pruebas de ADN como secuenciación de ácidos nucleicos, sin embargo, estas técnicas se encuentran disponibles únicamente en laboratorios muy especializados de referencia. Además, el cultivo y la manipulación de la fase filamentosa de *H. capsulatum* requiere de personal entrenado y laboratorios con instalaciones con nivel de bioseguridad 2 y 3.

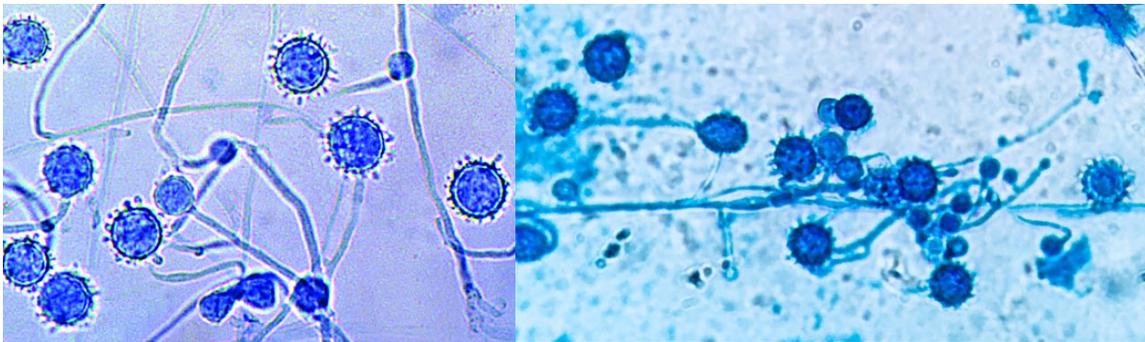


Imagen 5. Izquierda: conidias de *Sepedonium* spp. Derecha: conidias de *Histoplasma capsulatum*.

El medio de cultivo Myco/F Lytic es un medio no selectivo que se utiliza para el aislamiento de micobacterias, levaduras y hongos en la sangre. Desde mediados de los años 80's hubo un incremento de la población inmunosuprimida, así como del reporte de septicemia causada por patógenos oportunistas. Entre 1985 y 1992 hubo un incremento del 18% en los casos reportados de tuberculosis. Para 1990 las infecciones diseminadas por micobacterias no tuberculosas en los pacientes con SIDA reportaron una incidencia acumulada de 7.6%. También se reportó un incremento sostenido en la incidencia de fungemia desde principios de los años 80's, por lo que esta técnica de cultivo tomó relevancia⁶⁴.

Myco/F Lytic es una formulación de Middlebrook 7H9 y caldo de infusión de cerebro y corazón que se utiliza para la recuperación de micobacterias en muestras de sangre y de levaduras y hongos en sangre y fluidos corporales estériles. Se han hecho modificaciones específicas para mejorar el crecimiento y recuperación de estos microorganismos. Estas modificaciones incluyen la adición de citrato férrico amónico como una fuente de hierro para cepas específicas de micobacterias y hongos, la adición de saponina como un agente hematólitico y la adición de proteínas y azúcares específicos para aportar suplementos nutritivos.

Cada frasco contiene un indicador que puede detectar descensos en la concentración de oxígeno en el frasco como resultado del metabolismo y crecimiento de microorganismos. El instrumento BD BACTEC de la serie fluorescente supervisa el sensor para detectar el aumento en la fluorescencia, que es proporcional a la disminución del oxígeno. Un resultado positivo indica la presencia presunta de microorganismos viables dentro del frasco⁶⁵.

Patología

La demostración de la presencia de levaduras intracelulares consistentes con *H. capsulatum* comprueba el diagnóstico de histoplasmosis. Las levaduras tienen forma ovoide, miden entre 2-4 μm , tienen una pared celular delgada no refractaria a la luz y presenta una base estrecha de gemación. Estas levaduras generalmente se encuentran agrupadas dentro de los macrófagos e histiocitos, aunque en algunas ocasiones es posible verlas en el espacio extracelular.

Entre los diagnósticos diferenciales a considerar se incluyen: *Cryptococcus* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Candida glabrata*, *Pneumocystis jirovecii*, *Coccidioides* spp., *Talaromyces* (antes *Penicillium*) *marneffe*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* y *Trypanozoma cruzi*⁶⁶. El uso de tinciones histoquímicas específicas facilita la diferenciación de estos patógenos, como son la tinción de Gomori metenamina de plata y el ácido peryódico de Schiff (PAS) al resaltar la pared de la levadura. La

tinción de hematoxilina y eosina (H&E) generalmente puede ser insensible para detectar la presencia de *H. capsulatum*, excepto cuando la carga fúngica es muy alta. La tinción de mucicarmina permite también la diferenciación con otros hongos al resaltar la cápsula y producir la apariencia de halos característicos. Además, la presencia de respuesta histopatológica granulomatosa orienta al diagnóstico. Cuando se realizan frotis de sangre periférica, la tinción de Wright-Giemsa puede ser útil para identificar grupos de levaduras intracelulares.

Los resultados por lo general se obtienen en el transcurso de una semana, tienen una sensibilidad de <50% en pacientes con VIH y una tasa de falsos positivos del 9%, además de contar con el inconveniente de requerir un procedimiento invasivo para la toma de la muestra y contar con personal especializado para su análisis⁶⁷.

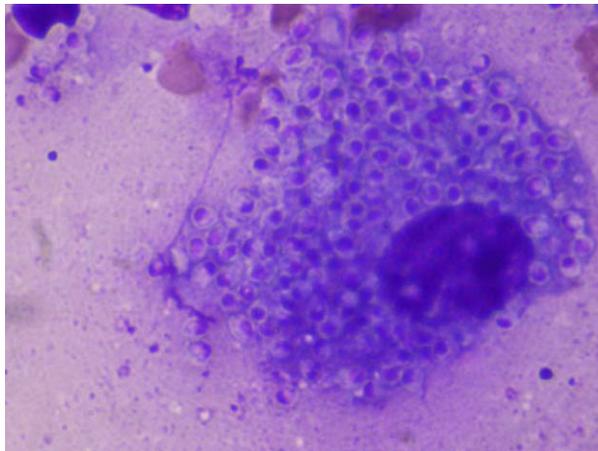


Imagen 6. Espécimen de ganglio cervical por aspirado con aguja fina, mostrando un histiocito con organismos intracelulares consistentes con *Histoplasma capsulatum* (Wright-Giemsa).

Serología

Las pruebas serológicas ofrecen una alternativa rápida a las técnicas microbiológicas; las técnicas más usadas son la detección por inmunodifusión y fijación de complemento. Estas pruebas son más útiles en pacientes con cargas fúngicas bajas, con cuadros crónicos o infecciones primarias con síntomas leves.

La elevación de anticuerpos toma entre 2-6 semanas después de la exposición. Sin embargo, los títulos de los anticuerpos anti *H. capsulatum* permanecen elevados meses e incluso años después de terapia exitosa, como resultado, no es posible diferenciar entre infecciones sub-agudas o inactivas, formas crónicas y recaídas. Además, en los pacientes inmunosuprimidos o con infecciones crónicas diseminadas puede haber frecuentemente resultados falsos negativos⁶².

Detección de antígeno

Debido a su naturaleza no invasiva, “accesibilidad” para los clínicos (aunque en nuestro país no la tenemos aún disponible de forma comercial) y buen rendimiento, las pruebas de detección de antígeno se han vuelto una modalidad destacada para el diagnóstico de histoplasmosis. Como se mencionó previamente, para establecer un diagnóstico definitivo de histoplasmosis se requiere del aislamiento del hongo en cultivo o confirmación por histopatología; el tener un antígeno positivo en un paciente en riesgo y un cuadro clínico compatible establece un diagnóstico probable.

La primera modalidad de prueba diagnóstica usando la detección del antígeno de *Histoplasma* fue desarrollada en 1986 como un radioinmunoensayo en sándwich⁶⁸ usando ¹²⁵I como marcador. Posteriormente la prueba fue modificada en 1989 como un inmunoensayo enzimático (EIA)⁶⁹ utilizando anticuerpos policlonales IgG de conejo anti-*H. capsulatum* como el anticuerpo de captura y anticuerpos con biotina marcados como los detectores, éstos últimos en lugar del radiofármaco ¹²⁵I, sin embargo, tenía el inconveniente de que presentaba falsos positivos con pacientes trasplantados que habían recibido globulina anti-timocito de conejo.

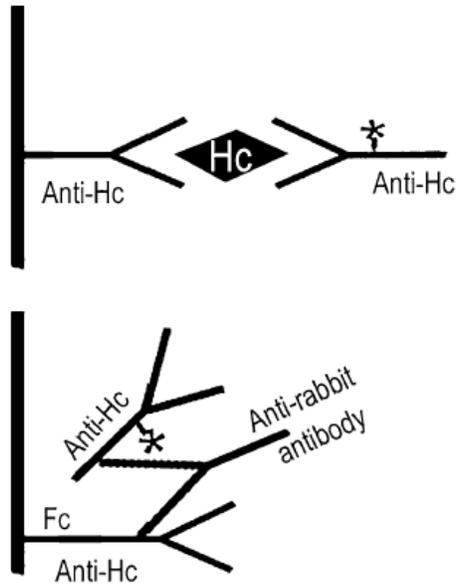


Figura 10. Interacciones de unión responsables por un resultado verdadero positivo causado por el antígeno de *Histoplasma* (sección superior) y un resultado de antigenemia falso positivo causado por anticuerpos anti-conejo (sección inferior). El asterisco indica el marcaje con biotina en el anticuerpo detector. Un resultado verdadero positivo ocurre cuando el antígeno de *Histoplasma* se une a la porción F(ab)´2 del anticuerpo de captura y al anticuerpo detector biotinilado. Un resultado falso positivo resulta cuando en ausencia de antígeno, el anticuerpo anti-conejo se une a la porción Fc de los anticuerpos de captura y detector.

Fuente: L. Joseph Wheat, John Witt, Michelle Durkin, Patricia Connolly; Reduction in false antigenemia in the second generation *Histoplasma* antigen assay, *Medical Mycology*, Volume 45, Issue 2, 1 March 2007, Pages 169–171, <https://doi.org/10.1080/13693780601185947>

En el 2004 se produjo una segunda generación de EIA⁶⁹ que permitía obtener resultados semicuantitativos (calculado en unidades de inmunoensayo enzimático - EU- basados en la comparación con un control negativo) y eliminando prácticamente la tasa de falsos positivos causados por anticuerpos humanos anti-conejo (en pacientes que habían recibido previamente tratamiento con globulina anti-timocito de conejo). Para su elaboración, se utilizaban microplacas cubiertas

con anticuerpos policlonales de conejo anti-*Histoplasma* (anticuerpo de captura), después se incubaban las muestras de los pacientes en dichas microplacas, permitiendo la unión del antígeno al anticuerpo de captura. El antígeno unido era identificado al usar un anticuerpo detector con biotina, seguido por la identificación con estreptavidina peroxidasa de rábano y tetrametilbenzidina. Se mejoró la tasa de falsos positivos causados por anticuerpos anti-conejo al utilizar como anticuerpo detector marcado con biotina el fragmento F(ab)₂' del anticuerpo de conejo anti-*Histoplasma* IgG diluido en buffer que contiene suero normal de conejo. Se demostró además que los niveles de antígeno disminuían con el tratamiento efectivo^{70, 71} y aumentaban con las recaídas⁷², siendo su medición una prueba útil para monitorizar la respuesta a tratamiento. Se consideraban las muestras con valores de unidades de EIA (EU) ≥ 1 como positivos.

En el 2007 se produjo una tercera generación de pruebas para detección de antígeno de *Histoplasma* (MiraVista *H. capsulatum* Galactomanano EIA) brindando resultados cuantitativos⁷³, al determinar el contenido de antígeno en los calibradores del ensayo y compararlos con estándares de referencia que contenían concentraciones conocidas de galactomanano de *H. capsulatum*. Las concentraciones óptimas del antígeno para los calibradores fueron calculadas usando cuatro parámetros en la curva de ajuste estándar variando entre 0.6 y 39 ng/ml. En el estudio publicado sobre su evaluación clínica, estableciendo una prevalencia de histoplasmosis del 10%, se calculó un valor predictivo positivo del 91.4% y un valor predictivo negativo de 99.5%. Los resultados se reportan como positivos o negativos, con un rango cuantitativo entre 0.4 a 19 ng/ml. Las muestras con resultados >0 y <0.4 ng/ml y >19 ng/ml se reportan como “positivos, por debajo de límite de cuantificación” y “positivos, por arriba del límite de cuantificación”, respectivamente. El significado clínico de estos valores positivos bajos, no se ha definido.

Además de su utilidad en el diagnóstico, las pruebas de tercera generación de antígenos EIA *Histoplasma* también permiten una medición cuantitativa para el

seguimiento de respuesta o falla a tratamiento antifúngico. En los estudios realizados en población con VIH/SIDA se ha establecido un punto de corte <2 ng/ml en la antigenemia y antigenuria para determinar cura y suspensión del tratamiento⁷⁴.

Como limitaciones importantes en esta tercera generación de antígeno se encontraron reacciones cruzadas en el 70% de los casos con otras micosis endémicas (blastomicosis, 7/10 pacientes; coccidiomicosis, 6/10 pacientes; paracoccidiomicosis, 4/5 pacientes; y penicilliosis marneffeii, 4/5 pacientes, esporotricosis 1/1); y la tasa de falsos positivos de hasta el 15% reportados en pacientes trasplantados que reciben globulina anti-timocito⁷⁵. Más aún, el antígeno de MiraVista no se encuentra disponible comercialmente, por lo que no es posible que cada laboratorio instaure la prueba de forma local, siendo obligado el envío de las muestras a Indianápolis, E.U.A, aumentando así el tiempo de obtención de resultados. Y no ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos.

En un estudio multicéntrico publicado en el 2011 cuyo objetivo era determinar la sensibilidad del antígeno de tercera generación en diferentes categorías de histoplasmosis en muestras de sangre y orina, se encontró que la sensibilidad del antígeno urinario de MiraVista EIA *Histoplasma* tuvo el mejor rendimiento entre los pacientes que tenían enfermedad diseminada (en los que claramente la carga de enfermedad es mucho más alta), seguida de los pacientes con enfermedad crónica pulmonar y después los que tenían histoplasmosis pulmonar aguda (91.8%, 87.5% y 83%, respectivamente), encontrando los valores más bajos en los pacientes con histoplasmosis subaguda (30%). La sensibilidad de esta prueba es particularmente alta en los pacientes con VIH/SIDA con enfermedad diseminada, en el que la antigenuria se detectó en el 95% de los casos⁷⁶.

Las pruebas de antígeno realizadas en muestras de orina generalmente han probado tener una mayor sensibilidad en las diversas manifestaciones de histoplasmosis en comparación con las pruebas realizadas en suero. Se ha intentado

su realización en otros fluidos corporales, como el lavado broncoalveolar (LBA) y líquido cefalorraquídeo. En estudios realizados en muestras de LBA^{77, 78} se han encontrado resultados variables, con una sensibilidad del 70% hasta el 93%.

Debido a que hasta ese momento los reactivos de MiraVista no estaban disponibles de forma comercial (y siguen sin estarlo), comenzaron a surgir alternativas desarrolladas por otros investigadores, tal es el caso de un EIA *in vitro* (antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA EIA) aprobado desde el 2007 por la “Food and Drug Administration” (FDA) para uso en muestras de orina, disponible de forma comercial para ser implementado en cada laboratorio⁷⁹ (hasta ahora es el único que cuenta con la aprobación de la FDA y está disponible de forma comercial).

El antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA EIA es una prueba por inmunoensayo enzimático, en sándwich, realizado en microplacas usado para la detección cualitativa del antígeno polisacárido de *Histoplasma* en muestras de orina.

Para su realización se utilizan anticuerpos de conejo IgG anti-*Histoplasma* unidos a micropocillos en placa como anticuerpos de captura y anticuerpos de conejo IgG anti-*Histoplasma* biotinilado como anticuerpos de detección. Se agrega la muestra de orina al pocillo y si contiene antígenos de *Histoplasma* se unirán a los anticuerpos de captura y posteriormente serán reconocidos por los anticuerpos de detección. Finalmente se utiliza estreptavidina y tetrametilbenzidina para resaltar los anticuerpos. Se utiliza un lector de longitud de onda para determinar la densidad óptica (absorbancia). Un resultado positivo se considera cuando es ≥ 2.0 unidades EIA. Aunque un resultado negativo no descarta el diagnóstico de histoplasmosis⁸⁰.

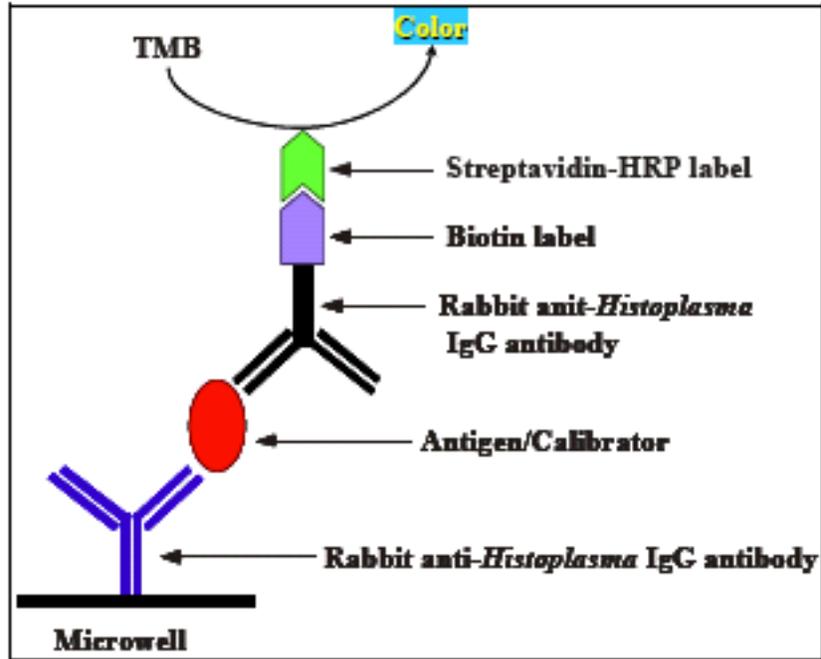


Figura 11. Esquema representativo del funcionamiento del inmunoensayo en sándwich para la detección del antígeno de histoplasma en orina.

Entre las limitaciones reportadas se encuentran que solo está aprobado su uso para muestras de orina. Además, se han reportado reacciones cruzadas con *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis*; *Penicillium marneffe* no se probó, pero se cree que pudiera también tener reacción cruzada. Como tercer punto, esta prueba no debe de usarse con el fin de medir respuesta a tratamiento pues no ha sido aprobada para tal fin. Finalmente, no fue evaluada en muestras de población pediátrica por lo que su uso es incierto.

La prueba de detección de antígeno de *Histoplasma* IMMY ALPHA EIA tiene una sensibilidad reportada por su fabricante del 80.9% (95% IC 67.5-89.6) y una especificidad del 98.7% (95% CI 96.3-99.6). Su mayor utilidad se ha demostrado en pacientes inmunosuprimidos con enfermedad diseminada. Sin embargo, en un estudio publicado por el grupo de investigadores de MiraVista en el que se comparó la sensibilidad y especificidad del antígeno IMMY ALPHA con la de MiraVista (50 muestras de orina positivas por MiraVista, 50 muestras de orina negativas por MiraVista) se encontraron valores menores⁸¹ para el antígeno IMMY ALPHA

(sensibilidad de 44% y especificidad del 84%). Los promotores del antígeno de *Histoplasma* IMMY ALPHA respondieron a dicha publicación señalando que hubo sesgo por parte del equipo de MiraVista al tener fallas técnicas y clínicas serias durante el estudio así como conflictos de interés, ya que el estándar de referencia para comparar los resultados fue el mismo resultado de antígeno urinario por MiraVista sin contar con otra técnica diagnóstica que abalara dicho resultado; dudas sobre el uso correcto del calibrador óptico y la forma de almacenar las muestras de orina, así como la obtención del kit comercial del antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA por parte de MiraVista, entre otros⁸².

Se puede decir que en términos generales el antígeno disponible comercialmente (IMMY ALPHA) ha demostrado un buen desempeño, pero carece de validación clínica suficiente.

Un estudio multicéntrico en el que participaron 3 hospitales en Brasil publicado en el 2016, se comparó de forma prospectiva el desempeño diagnóstico de la prueba de detección de antígeno de *Histoplasma* en orina IMMY ALPHA EIA y del Elisa desarrollado por el CDC en comparación con el cultivo/histopatología en una cohorte de pacientes infectados por VIH y sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva (HDP). Participaron 78 pacientes, ocho fueron confirmados con HDP (7 por histopatología y 3 por cultivo). La sensibilidad de IMMY ALPHA fue del 16.7% y del de la CDC de 17.9%. Hubo concordancia entre las pruebas en el 96.2%. Sin embargo, los reactivos de dicha prueba no seguirán estando disponibles y no habrá más distribución de la misma^{83,86}.

En el 2009 se publicaron los resultados de un estudio realizado entre investigadores del CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, E.U.A) y del Hospital General San Juan de Dios, Guatemala, que en conjunto desarrollaron una prueba de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para la detección de antígeno polisacárido de *Histoplasma*. El estudio usó anticuerpos policlonales en contra de *H. capsulatum* tanto de detección como de captura y establecieron una curva de referencia estándar para cuantificar la antigenuria y garantizar su

reproducibilidad. El punto de corte en este estudio fue de 0.84 ng/ml de antígeno de *H. capsulatum*. Este antígeno fue validado en una cohorte de pacientes con VIH/SIDA y sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva y además en personas sanas en Guatemala (histoplasmosis probada por cultivo n=48; personas sanas n=83; y otras enfermedades n=114). La prueba demostró una sensibilidad del 81% y una especificidad del 95% al detectar el antígeno de *H. capsulatum* en orina⁸⁴. Según otro estudio realizado en una cohorte de pacientes colombianos con VIH e histoplasmosis probada, esta prueba es de utilidad también para medir de forma satisfactoria la respuesta a tratamiento⁸⁵. Sin embargo, esta prueba aún no se encuentra disponible en forma comercial para su uso generalizado.

Siguiendo con la evolución del antígeno, se desarrolló un reactivo de analito específico (ASR) de antígeno de *H. capsulatum* EIA (IMMY, Norman, OK)⁸⁷ el cual es un inmunoensayo que detecta el antígeno de galactomanano por medio de anticuerpos monoclonales, y que brinda resultados cuantitativos (los resultados se reportan en un rango entre 0.4ng/ml a 25 ng/ml, los valores >0.5 ng/ml son considerados positivos). El cual permite la detección de antígeno galactomanano de *H. capsulatum* galactomanano en muestras de orina para ser realizado en un analizador EIA Triturus automatizado y que ha demostrado mejor desempeño que el antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA⁸⁸ e incluso ser muy similar al de MiraVista EIA⁸⁹ (tomando el punto de corte sugerido por el fabricante de 0.5 ng/ml hubo una concordancia en el 97.6% de los resultados, valores de *k* de 0.75; en comparación con MiraVista, el IMMY ASR tuvo una especificidad 99.8% y sensibilidad del 64.5%; si se disminuía el punto de corte a >0.15 ng/ml, la sensibilidad aumentaba a 80.7%, con una especificidad de 96.3% y una concordancia con el antígeno de MiraVista del 95.3%). Los resultados están disponibles en menos de 3 horas.

Finalmente, un estudio retrospectivo⁹⁰ publicado en junio de 2018, comparó esta prueba de antígeno vs cultivo positivo para histoplasma en una cohorte de pacientes con VIH y sospecha de HDP en Guatemala y Colombia. Hubo 63 casos probados

por cultivo de *H. capsulatum*, la sensibilidad fue del 98% (95% CI, 95-100%) y especificidad del 97% (95% CI, 95-99%).

En la conferencia ISHAM 2018 se presentó un póster (información aún no publicada) sobre el nuevo ensayo de MiraVista diagnostics, sobre una prueba de antígeno urinario “lateral flow” usado en pacientes con VIH y no VIH como controles e histoplasmosis confirmada por cultivo, reportaron una sensibilidad del 95% y especificidad del 82%. Por su parte IMMY se encuentra en proceso de desarrollo de un análisis lateral flow para *H. capsulatum*.

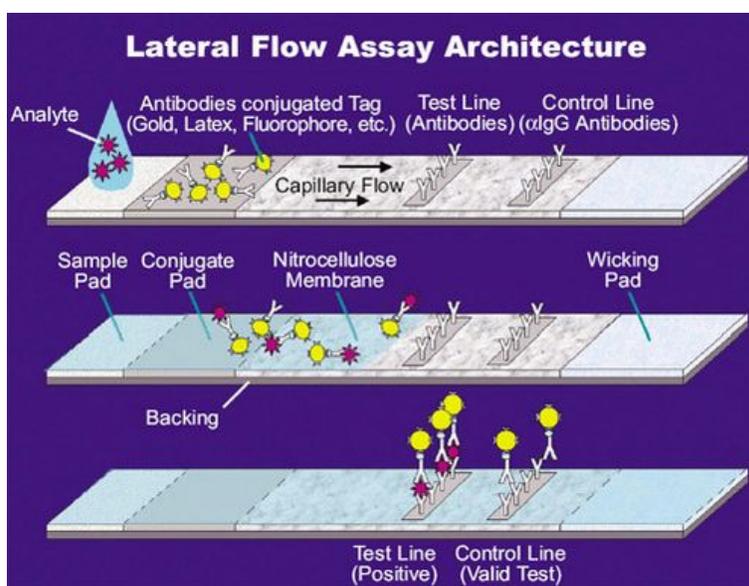


Figura 11. Representación gráfica del uso de ensayos por lateral flow para la detección de antígenos.

Sin embargo, como bien se señala una revisión sistemática publicada recientemente⁹¹, todos los estudios reportados previamente han incluido pocos casos de pacientes con histoplasmosis probada (cultivo y/o histopatología positivos, n= 10-63 casos), con manifestaciones diferentes (HDP, histoplasmosis pulmonar), y además utilizan el antígeno de MiraVista como estándar de referencia para comparar los resultados, en general son retrospectivos y utilizan poblaciones variables no específicamente pacientes con VIH/SIDA.

Reacción en cadena de polimerasa

Los ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar secuencias de genes de hongos se han introducido de forma satisfactoria en el armamento para el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas. Es importante mencionar que estas herramientas no reemplazan el cultivo, la microscopía o la valoración clínica por parte del personal médico, pero pudieran ser de utilidad para el diagnóstico de histoplasmosis en regiones en las que no se cuente con la infraestructura o la experiencia suficiente para el aislamiento de *H. capsulatum* en cultivo⁸⁰.

En las últimas dos décadas se han desarrollado algunos abordajes moleculares para la detección del ADN de *H. capsulatum* en muestras clínicas humanas. Existen diversas publicaciones acerca de pruebas de PCR, por ejemplo, dirigidas al gen que codifica para la proteína 100-kDa de *H. capsulatum*, la cual es esencial para la supervivencia del hongo dentro de las células humanas⁹²; una PCR que detecta el 18S rDNA; una PCR que detecta la región “internal transcribed spacer” (ITS) del complejo genético rRNA; una PCR que detecta los antígenos M y H. Dichos estudios se han llevado a cabo en muestras de biopsias en parafina, en muestras de sangre, tejidos de ratones infectados y muestras de cultivos *in vitro*; sin embargo esta herramienta diagnóstica no se ha establecido de forma regular y tampoco existe un kit comercial disponible para su uso generalizado.

Un estudio publicado en el 2002 por Bialek⁹² y colaboradores, reportaron los resultados de dos PCR anidadas dirigidas a identificar los genes que codifican para la proteína Hc100 y los de la sección de ADN ribosomal (rDNA)18S en biopsias de tejidos humanos en parafina (29 casos de histoplasmosis y 33 biopsias negativas para histoplasmosis). Los primers de la PCR externa dirigida a Hc100 (*H. capsulatum* 100-kDa) delimita una secuencia de 391 nucleótidos del gen que codifica para la proteína de 100-kDa (única para *H. capsulatum*). El producto final de la PCR anidada es de 210 pares de bases. La sensibilidad para Hc100 y

18S(rDNA) en este estudio fue del 68.9%, y la especificidad para Hc100 fue del 100% y para (rDNA)18S fue de 45.5%.

En otro estudio realizado en Colombia⁹³ de forma prospectiva en el 2009, cuyo objetivo era validar la PCR anidada dirigida a la proteína específica Hc100 en comparación con el cultivo, analizaron 146 muestras clínicas de 135 pacientes con sospecha de histoplasmosis (de éstos hubo 67 muestras de cultivo positivas para *H. capsulatum*; no se tuvo acceso a datos clínicos de los pacientes y tampoco se especifica su serología con respecto a infección por VIH); 20 individuos sanos, 29 con enfermedad respiratoria pero con muestras negativas para *Histoplasma* y 60 muestras con otra infección probada. En este estudio la PCR de Hc100 mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92.4%; el valor predictivo positivo fue del 83% y el valor predictivo negativo fue del 100%; el likelihood ratio positivo fue de 25 y el negativo de 0, es decir, un resultado positivo por PCR anidada Hc100 es 25 veces más probable en un paciente con histoplasmosis que en un individuo sin histoplasmosis. Los resultados se confirmaron mediante secuenciación de los productos de PCR. Además, sirvió para determinar la ausencia de este blanco genético en hongos relacionados como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Coccidioides* y especies de *Mycobacterium*. Una aportación más de este estudio fue el confirmar el límite de detección de la prueba, siendo muy sensible pudiendo detectar aproximadamente un mínimo de 10 células de levadura por reacción, o concentraciones tan bajas de ADN de *H. capsulatum* como de 20 fg.

Simon y colaboradores⁹⁴ reportaron la sensibilidad y especificidad de una PCR en tiempo real usando el sistema TaqMan (con las ventajas de disminuir el riesgo de contaminación en comparación con una PCR anidada y con mayor rapidez para obtener los resultados en <3 horas) en comparación con el cultivo y examinación microscópica. Usaron primers específicos de *H. capsulatum* y la sonda de TaqMan de una región del ITS (internal transcribed spacer) del complejo genético de rRNA. Se probaron 348 muestras clínicas, de las cuales 71 muestras fueron positivas para *H. capsulatum* var. *capsulatum* y 277 fueron negativas. El límite de detección de la

prueba fue de 10 fg de ADN por microlitro de *H. capsulatum*. Se reportó una sensibilidad de 95.4% y una especificidad de 96.0%.

En el 2011, Frías de León y colaboradores⁹⁵, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM describieron un nuevo blanco genético para la detección de *H. capsulatum* por PCR, SCAR 1281-1283₂₂₀ el cual validaron con 36 muestras clínicas (17 humanas, 9 experimentales y 10 animales) y 20 muestras ambientales, mostrando una especificidad del 100% y un límite de detección de 0.001 ng de ADN de *H. capsulatum*.

En el 2012 se publicó un estudio multicéntrico⁹⁶ con el objetivo de comparar el desempeño diagnóstico de diferentes protocolos de PCR (Hc100, SCAR₂₂₀, ITS1) para detectar ADN de *H. capsulatum* en cinco laboratorios que forman parte del MICOMOL-Network en la región de Iberoamérica (Argentina, Brasil, Colombia, México y España), incluyendo el Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, en México; en el cual evaluaron 10 tubos que contenían diferentes concentraciones de ADN fúngico (*H. capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*) y controles. En general, se reportó una sensibilidad de 86% y una especificidad del 100% similar entre los tres marcadores.

Investigadores mexicanos del Hospital Juárez de México, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM y del Hospital General de México⁹⁷ reportaron en el 2016 los resultados de la evaluación de la PCR dirigida a Hc100 y a SCAR 1281-1283₍₂₂₀₎ en muestras obtenidas durante tres brotes ocupacionales y recreacionales entre el 2012-2013, en los estados de Morelos, San Luis Potosí y Chiapas. Analizaron siete muestras clínicas de pacientes infectados (suero) y 14 muestras ambientales, con una sensibilidad del 85.7%.

En el 2017 se realizó un estudio para evaluar PCRs cuantitativas en tiempo real (qPCR) dirigidas a tres genes (proteína 100-kDa, el antígeno H y M) en infección controlada de histoplasmosis en un modelo animal con ratones y con infección pulmonar adquirida vía intranasal con levaduras de *H. capsulatum*. Se compararon 30 extractos de ADN de cultivos de *H. capsulatum* (que representaban 6 diferentes

clados) y 36 muestras de ADN extraídas de patógenos clínicos relevantes (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces*, *Syncephalastrum*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Chrysosporium*, *Candida*, *Sporothrix*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Mycobacterium*). Se encontró una sensibilidad y especificidad del 100% para Hc100 y el antígeno H⁹⁸.

En resumen, en la actualidad las pruebas basadas en la identificación de ADN no han logrado establecerse como pruebas rutinarias en el diagnóstico de histoplasmosis, ya que no cuentan con la suficiente validación en estudios en humanos, de tipo prospectivos, en poblaciones específicas en riesgo como VIH, ni con un número suficiente de participantes por lo que no se ha logrado un consenso en su uso ni tampoco existen pruebas comerciales disponibles.

7. Tratamiento de histoplasmosis diseminada y progresiva.

La histoplasmosis diseminada suele ser fatal si no se da tratamiento⁹⁹ por lo que este está indicado en todos los casos. La historia natural de la enfermedad en los casos de HDP, los pacientes mueren en el transcurso de 2-6 semanas aproximadamente. El tratamiento debe enfocarse en dos objetivos principales: la administración de terapia antifúngica efectiva y la disminución o mejoramiento de la inmunosupresión. En pacientes hospitalizados el tratamiento de elección es anfotericina B liposomal por 1-2 semanas seguidas de itraconazol por un año. Se recomienda el seguimiento durante 1-2 años después de haber terminado tratamiento, de niveles de antigenemia y antigenuria para valorar respuesta al tratamiento¹⁰⁰. El tratamiento es de por vida en pacientes en los que no se puede disminuir la inmunosupresión.

III. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los pacientes viviendo con VIH/SIDA en México aún se presentan en estadios tardíos de la enfermedad en los cuales la histoplasmosis es una de las infecciones oportunistas con mayor mortalidad y morbilidad, manifestándose generalmente como enfermedad diseminada y progresiva. Además, la mayoría de los hospitales en el mundo y en nuestro país continúan sin tener los medios necesarios para diagnosticar histoplasmosis y no cuentan con el tratamiento de elección para atenderla, sobre todo en los pacientes más graves, en quienes el pronóstico suele ser fatal si no se diagnóstica y trata de forma oportuna. Por lo que nos enfrentamos a una doble tragedia, por un lado, los médicos fallamos en diagnosticar lo que está matando a nuestros pacientes y por otro lado las autoridades de salud pública no logran controlar una de las principales cargas de la enfermedad.

El diagnóstico micológico recae en el examen directo y en los cultivos de muestras clínicas, lo que suele ser invasivo, suele tomar varias semanas para la detección e identificación de *H. capsulatum*, además de requerir de laboratorios con bioseguridad nivel 3, los cuales se encuentran solamente en centros de referencia.

Las pruebas moleculares para el diagnóstico de HDP han demostrado utilidad en algunas poblaciones, pero pudieran tener variación en su rendimiento de acuerdo al clado prevalente. Actualmente estas pruebas son cada vez más económicas, de fácil acceso, no requieren de instalaciones con bioseguridad nivel 3 y el entrenamiento del personal es sencillo. En el caso de 1281-1283₂₂₀ SCAR no ha sido estudiada su utilidad en pacientes con VIH, por lo que deberá de ser valorado su rendimiento diagnóstico deberá de ser valorado en estos pacientes, incluyendo muestras clínicas de sangre y tejidos. Considero que la estandarización de la metodología, así como la evaluación de la sensibilidad y especificidad en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos, específicamente de pacientes viviendo con VIH es de gran relevancia.

En cuanto a las alternativas para la detección de antígenos de *H. capsulatum* en la orina o en suero por medio de inmunoensayos enzimáticos, estos han ido aumentando, y representan una forma simple, no invasiva y en teoría sensible, aunque su distribución en la actualidad ha sido en pequeña escala en América Latina.

Entre las brechas en investigación que hacen falta por llenar, se encuentran el establecer un método diagnóstico simple que ayude a incrementar el conocimiento sobre la incidencia de la enfermedad y diferenciarla de otras infecciones con manifestaciones clínicas similares como es la tuberculosis, sobre todo en pacientes viviendo con VIH. Desafortunadamente, histoplasmosis continúa siendo una enfermedad olvidada, no sospechada, sub diagnosticada y no tratada en América Latina.

Por lo que el tener una mayor sospecha clínica y conciencia de la enfermedad entre los médicos, lograr establecer un diagnóstico temprano e iniciar terapia adecuada pueden lograr disminuir el número de muertes asociadas a histoplasmosis entre las personas que viven con VIH. La disponibilidad de pruebas rápidas como los inmunoensayos enzimáticos para la detección de antígenos en orina y pruebas moleculares para la detección de ADN, así como el entrenamiento del personal de salud en este respecto ha logrado un aumento en el diagnóstico de histoplasmosis y una disminución en la mortalidad por esta causa.

Si se pretende que una prueba diagnóstica genere un cambio en la práctica clínica actual en la atención de histoplasmosis, ésta debe ser accesible, sensible, específica, amigable para el usuario, rápida, que no requiera de un equipo sofisticado y que los resultados estén disponibles para el que lo solicita de forma inmediata. Además, debe contar con la adecuada validación en una cohorte de pacientes lo suficientemente grande y con las características específicas en las que se pretende tenga su mayor aplicación, como es el caso de pacientes con infección por VIH.

Los estudios publicados previamente han evaluado de forma incompleta las opciones de métodos diagnósticos como los antígenos urinarios y PCRs, pues en algunos casos han utilizado como estándar de referencia el antígeno realizado en el laboratorio de MiraVista y no el cultivo y/o patología considerados el estándar de referencia en la actualidad. Además de que incluyen un número de pacientes pequeño (7-60 casos confirmados de histoplasmosis) y en todo caso no se cuenta con la información clínica suficiente o relevante para el análisis o son muestras ambientales. Por otro lado, la mayoría de los estudios son retrospectivos, utilizando muestras congeladas que se recabaron para estudios previos y vueltas a utilizar para su análisis casi 10 años después de su obtención. Finalmente hay muy pocos estudios realizados en poblaciones de pacientes viviendo con VIH.

Hasta ahora no hay estudios que comparen la sensibilidad y especificidad de las PCRs dirigidas a los genes que codifican para la proteína Hc100 y 1281-1283₂₂₀ SCAR, así como del antígeno urinario de *Histoplasma* IMMY ALPHA vs el cultivo de sangre periférica, médula ósea y tejidos e histopatología en muestras clínicas de pacientes viviendo con VIH y sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva de forma prospectiva.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de las PCR Hc100 y 1281-1283₂₂₀ SCAR en muestras de sangre periférica de pacientes hospitalizados con VIH/SIDA y sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva en comparación con el cultivo de sangre periférica?

V. HIPÓTESIS

La sensibilidad y especificidad de las PCR Hc100 y 1281-1283₂₂₀ SCAR en muestras de sangre periférica para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada y progresiva en pacientes hospitalizados con infección por VIH/SIDA y sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva en comparación con el cultivo de sangre periférica será del 95%.

VI. OBJETIVOS

Objetivo primario: Determinar la sensibilidad y especificidad de las PCR dirigidas al gen que codifica para la proteína Hc100 y para la región 1281-1283₂₂₀ SCAR en muestras de sangre periférica en comparación con el cultivo de sangre periférica para el diagnóstico de HDP en pacientes con VIH/SIDA.

Objetivos secundarios:

- Determinar en pacientes con sospecha de HDP e infección por VIH/SIDA la sensibilidad y especificidad de las PCR dirigidas al gen que codifica para la proteína Hc100 y para la región 1281-1283₂₂₀ SCAR realizadas en:
 - Médula ósea vs mielocultivo
 - Biopsias de tejido vs cultivo de biopsias de tejido

- Determinar la sensibilidad y especificidad del antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA EIA en comparación con la definición de **“histoplasmosis diseminada probada”**

VII. METODOLOGÍA

Se realizó un estudio prospectivo, multicéntrico, doble ciego, de pruebas diagnósticas. Participaron diez centros de referencia distribuidos en siete estados de la República Mexicana (ocho hospitales de tercer nivel y dos de segundo nivel, ver tabla). De noviembre de 2015 a abril de 2018. El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación en cada centro.

Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes, hombres y mujeres, mayores de 18 años, con diagnóstico establecido de infección por VIH/SIDA, que cumplieran con la definición de **“Sospecha de Histoplasmosis Diseminada y Progresiva”**, que estuvieran hospitalizados en alguno de los centros incluidos en el protocolo y que aceptaran participar. Los pacientes eran identificados e invitados al protocolo por un médico infectólogo, con experiencia en el manejo de los pacientes con VIH, quienes eran los responsables del proyecto en cada centro.

Definición de “Sospecha de Histoplasmosis Diseminada y Progresiva”:

pacientes que cumplieran con tres de cualquiera de los siguientes criterios o fiebre + 2 de cualquiera de los siguientes criterios:

Clínicos: pérdida de peso (>5% del peso corporal total en los últimos 6 meses), linfadenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, úlceras en mucosas, lesiones en piel, sangrado gastrointestinal y/o diarrea.

Laboratorio: bicitopenia o pancitopenia (definido como hemoglobina <10 g/dL, cuenta total de neutrófilos <1.8 x10³/μL, plaquetas <100,000/μL), elevación de dos veces el límite superior normal de AST y/o DHL y elevación de ferritina.

Radiología: Evidencia radiográfica de involucro extrapulmonar (adenopatías cervicales, axilares, mediastinales, abdominales, retroperitoneales, inguinales; hepatomegalia, esplenomegalia, abscesos hepáticos y/o esplénicos, pancreatitis, colecistitis, lesiones adrenales, lesiones esofágicas, lesiones en intestino delgado o colon, lesiones en sistema nervioso central, pericarditis, derrame pericárdico, endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, prostatitis y/o epididimitis).

Criterios de exclusión

- Pacientes que tuvieran información clínica incompleta en el expediente clínico y/o en el cuestionario demográfico
- Pacientes que hubieran recibido tratamiento antifúngico intravenoso con anfotericina B por >72 horas previos al ingreso al protocolo y la toma de las muestras clínicas

Criterio de eliminación

- Pacientes cuya muestra presentara inhibidores que no permitieran su amplificación por PCR

A cada hospital participante se le envió el material necesario para la recolección y transporte de las muestras clínicas de manera periódica mediante una empresa especializada contratada para dicho fin.

Los pacientes que aceptaban participar (más dos testigos) firmaban un formato de consentimiento informado (más dos testigos), aprobado por los Comités de Ética e Investigación en cada centro (ver Anexo 1). El médico infectólogo era responsable

de recabar mediante un cuestionario previamente establecido, la información demográfica y clínica necesaria (antecedentes relacionados con la infección por VIH, historia de otras infecciones oportunistas, datos clínicos, de laboratorios y por imagen; así como información relacionada al tratamiento antifúngico iniciado, ver Anexo 2) de cada paciente.

Quedó a criterio del médico infectólogo en cada centro, el solicitar las muestras para analizar por cultivos, histopatología, detección de antígeno urinario y PCRs, que considerara conveniente dependiendo de cada caso clínico, las cuales podrían incluir:

- **Cultivo de sangre periférica**
 - 5 ml de sangre en medio de cultivo BD BACTEC™ Myco/F Lytic

- **Muestra para PCR de Hc100 y 1281-1283220 SCAR en sangre periférica**
 - 4 ml de sangre en Tubos 7.2 mg BD Vacutainer®K₂ EDTA

- **Cultivo de médula ósea**
 - 5 ml de sangre de médula ósea en medio de cultivo BD BACTEC™ Myco/F Lytic
 - 3 ml de sangre de médula ósea en medio de cultivo BD BACTEC™ Peds Plus™/F
 - 0.5 ml de sangre de médula ósea en medio de cultivo Löwenstein-Jensen
 - 0.5 ml de sangre de médula ósea en medio de cultivo Sabouraud
 - 4 laminilla con extendido de sangre de médula ósea para realizar tinción de Gram, Ziehl-Neelsen, Grocott metenammina de plata y Wright

- **Muestra para PCR de Hc100 y 1281-1283220 SCAR en sangre de médula ósea**
 - 4 ml de sangre de médula ósea en tubos 7.2 mg BD Vacutainer®K₂ EDTA

- **Biopsias de tejido**
 - **Cultivo**
 - Medio de transporte Stuart
 - Medio Aerobio BD BACTEC™ Plus
 - Medio Anaerobio BD BACTEC™ Plus
 - Medio de cultivo Löwenstein-Jensen
 - Medio de cultivo Sabouraud

 - **Análisis histopatológico:** transporte en frasco con formaldehído 10%

 - **Muestra para PCR de Hc100 y 1281-1283₂₂₀ SCAR en biopsias**
 - Se maceraba el mismo tejido utilizado para el cultivo de biopsia y se suspendía en solución salina estéril al 0.9%

- **Antígeno Histoplasma IMMY ALPHA EIA**
 - 20 ml de orina transportada en frasco estéril y refrigerada a 4 °C

- **Concentrado leucocitario**
 - 4 ml de sangre periférica en tubos 7.2 mg BD Vacutainer®K₂ EDTA

Los cuestionarios, el consentimiento informado y las muestras biológicas tomadas en cada centro, fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Clínica y al Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) en la Ciudad de México para su análisis.

El proceso y análisis de las muestras fue realizado por personal diferente, siguiendo la metodología habitual que se realiza en el Laboratorio de Microbiología Clínica (el cual cuenta con la Certificación del American College of Physicians, E.U.A.) del INCMNSZ y en el Departamento de Patología del INCMNSZ. Los analistas se encontraron cegados de la historia clínica del paciente, así como del resultado de las otras pruebas.

- Los cultivos, concentrados leucocitarios y antígeno urinario fueron interpretados por personal capacitado para ello (A.R.C. y J.S.C.), quienes tienen amplia experiencia en la identificación de microorganismos en el área de micología.
- Por otro lado, las pruebas para PCR fueron realizadas por otros investigadores, quienes tiene amplia experiencia en métodos moleculares (R.A.M.G. y N.G.V.Z. realizaron la PCR Hc100; mientras que investigadores del Departamento de Microbiología y Parasitología, Recursos en Micología de la Facultad de Medicina de la UNAM, M.R.R.M., E.D.E., M.G.F.L, J.A.R.B., realizaron la PCR 1281-1283₂₂₀ SCAR).
- Las biopsias de tejidos fueron evaluadas y reportadas por el servicio de Patología del INNCOMSZ.

Los resultados preliminares y definitivos de los cultivos, estudios histopatológicos y del antígeno urinario fueron informados tan pronto como se tuvieron disponibles al médico infectólogo encargado de cada paciente (primero por mensajería de texto vía celular y luego por correo electrónico adjuntando los reportes definitivos de los resultados oficiales expedidos por el Laboratorio de Microbiología y el Departamento de Patología del INCMNSZ).

Debido a que es un estudio que pretende evaluar la sensibilidad y especificidad de las pruebas para PCR realizadas en las muestras clínicas, los resultados obtenidos

de las mismas fueron únicamente del conocimiento del investigador principal, no se les dio valor clínico alguno, ni su resultado fue informado a los médicos tratantes.

El manejo y tratamiento de cada paciente estuvo a cargo en su totalidad por el médico infectólogo responsable de cada paciente.

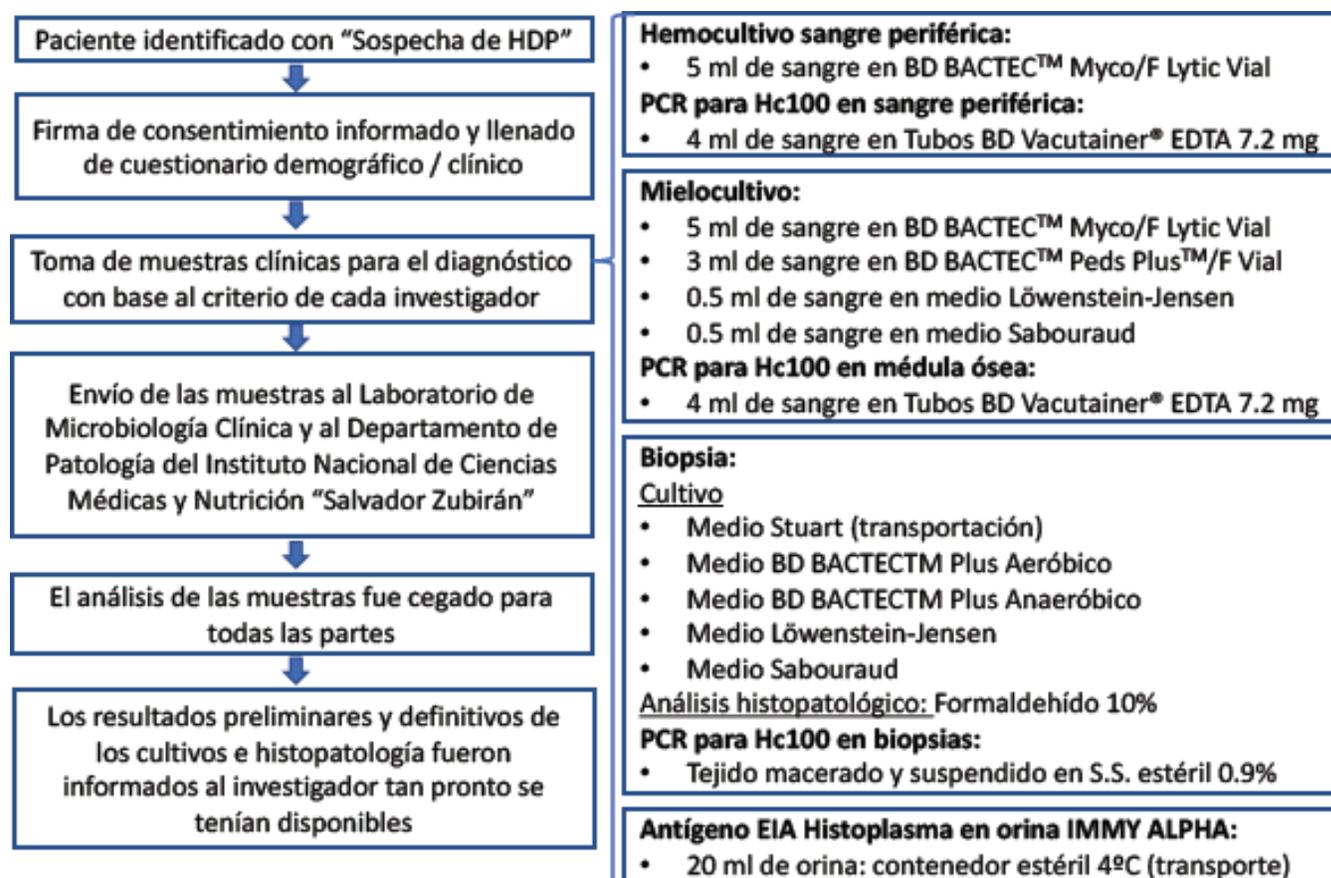


Figura 12. Metodología seguida durante el protocolo, para la selección de pacientes, recopilación de información; toma, envío y análisis de muestras y reporte de resultados.

Otras definiciones operacionales:

- **Definición de caso probable de HD:** Pacientes con sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva y antígeno urinario para histoplasma positivo
- **Definición de respuesta clínica a tratamiento empírico** (el paciente deberá cumplir todas las siguientes):
 - Temperatura máxima diaria menor a 37.8 °C por 72 h consecutivas sin uso de antipiréticos
 - No presentar incremento en la gravedad de signos, síntomas o anormalidades en el laboratorio atribuibles a histoplasmosis
 - Resolución de al menos un signo o síntoma de histoplasmosis que calificó al paciente para ingresar al protocolo

Con base en la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)⁶⁰/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycosis Study Group se estableció:

- **Definición de caso probado de HDP:** pacientes con al menos uno de los siguientes:
 - **Cultivo positivo para *Histoplasma capsulatum*** (hemocultivo por lisis de sangre periférica, mielocultivo y/o cultivo de biopsia de tejido)
 - **Histopatología compatible con histoplasmosis** (levaduras intracelulares o extracelulares e infiltración masiva de macrófagos y escasos linfocitos, identificados mediante las tinciones de Grocott metenamina de plata y ácido periódico de Schiff, PAS) en cualquier muestra clínica de tejidos

- **Definición de otro diagnóstico, NO HDP:** Pacientes en los cuales, posterior a transcurrido el periodo de incubación del cultivo no exista evidencia de crecimiento de *Histoplasma* y/o que no se tenga evidencia histopatológica sugestiva de histoplasmosis, o bien que se haya identificado otra causa de los signos y síntomas iniciales, con antígeno urinario negativo y que no haya requerido tratamiento anti fúngico.

Métodos microbiológicos

1. IMMY ALPHA Histoplasma Antigen Enzyme Immunoassay (HAGEIA)

Material general

1. Bolsa de residuos biológicos.
2. Puntas para micropipetas thermo scientific de 20-200µl y de 200-1000µl.
3. Probeta de 100ml.
4. Vaso de precipitados de 100ml.
5. Recipiente con tapón de rosca con capacidad de 125 ml (para almacenamiento de la solución de lavado 1X).

Instrumentos

1. Micropipeta thermo scientific con capacidad de 20-200µl.
2. Micropipeta thermo scientific con capacidad de 200-1000µl.
3. Lector de ELISAS de longitud de onda doble, con absorbancias leídas a 450 nm y 630 nm, BioRad.
4. Micropipeta multicanal de 8 puntas thermo scientific con capacidad de 20-200µl.

Equipo

0. Incubadora de 37°C.
1. Impresora conectada al lector de ELISAS BioRad.

Desarrollo de la técnica

Se siguieron las indicaciones recomendadas por el fabricante IMMY Diagnostics, realizando ligeros ajustes de forma de trabajo y limpieza. Estos pasos se respetaron en cada corrida de muestras.

Las muestras de orina se recibieron y se mantuvieron en refrigeración hasta un máximo de dos semanas antes de ser procesadas de acuerdo a las indicaciones presentes en el inserto del fabricante.

1. Se realizó un registro de las muestras, indicando la posición en coordenadas en la microplaca de cada muestra a procesar y los controles.
2. Se preparó y sanitizó el área de trabajo con una solución clorada al 1% y alcohol al 70%.
3. Todos los componentes del kit y muestras se llevaron a temperatura ambiente.
4. Se homogeneizó cada reactivo antes de su uso.
5. Se preparó, en cada corrida, una solución de lavado 1X, se utilizó una relación 1:20 de buffer concentrado 20X con agua destilada.
6. Se sacó un número suficiente de micropocillos (HAGMW1) para estándares y muestras a procesar y se insertaron en el soporte para micro pozos.
7. Los pocillos restantes se colocaron en la bolsa original con desecante, y ésta se guardó a 4°C.
8. Se añadieron 100 µl de buffer de lavado 1X (EIAWB1) al pocillo de la posición A1 (blanco para el ensayo).
9. Se añadieron 100 µl de reactivos estándar a la placa, para la construcción de la curva, como se indica a continuación.
 - Posición (B1) 100 µl del estándar para la curva de 100 unidades EIA.
 - Posición (C1) 100 µl del estándar para la curva de 30 unidades EIA.
 - Posición (D1) 100 µl del estándar para la curva de 10 unidades EIA.
 - Posición (E1) 100 µl del estándar para la curva de 2 unidades EIA.

10. Se añadieron 100 μ l del control positivo al pocillo de la posición F1 y el control negativo al pocillo de la posición G1.
11. A partir de la posición H1 en adelante se colocaron 100 μ l de cada una de las muestras de orina (sin tratamiento) en cada uno de los pocillos.
12. La placa se homogeneizó suavemente, por 10-15 segundos, con movimientos elípticos sobre la mesa.
13. La placa se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos ± 5 minutos.
14. Usando una pipeta, se aspiró el contenido de los pocillos y se desechó en un recipiente para residuos biológicos.
15. Con el uso de una pipeta multicanal, se llenaron todos los pocillos con 200 μ l de buffer de lavado 1X.
16. Se repitieron los pasos 14 y 15 dos veces más para obtener un total de tres lavados. Después del lavado final, la placa se golpeó sobre un papel absorbente para quitar la mayor cantidad de solución de lavado posible, sin dejar secar los pocillos.
17. Se añadieron 100 μ L del anticuerpo de detección (HAGDAB) a cada pocillo.
18. La placa se homogeneizó por movimientos elípticos suaves por 10-15 segundos sobre la mesa.
19. La placa se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos ± 5 minutos.
20. Se repitió el procedimiento de los tres lavados de los micropozos respetando los pasos del paso 14-16.
21. Se añadieron 100 μ l de estreptavidina-HRP conjugada (EIASA1) a cada pocillo.
22. La placa se homogeneizó por movimientos elípticos suaves por 10-15 segundos sobre la mesa.
23. La microplaca se incubó a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos ± 2 minutos.
24. Se realizó el procedimiento de tres ciclos de lavado respetando los pasos del 14 al 16.
25. En condiciones de mínima cantidad de luz, se añadieron 100 μ l de sustrato TMB (EIA) a cada pocillo. En el momento de la adición del sustrato al primer pocillo, se inició el conteo de 10 minutos.

26. La placa se homogeneizó por movimientos elípticos suaves por 10-15 segundos sobre la mesa.
27. La placa se incubó a temperatura ambiente (22 - 25°C) durante 10 minutos ± 1 minuto.
28. Se añadieron, en condiciones de mínima interferencia de luz (EIAS1), 100 µl de solución de paro a cada pocillo en el mismo orden que en la etapa del sustrato TMB.
29. La placa se homogeneizó por movimientos elípticos suaves por 10-15 segundos sobre la mesa.
30. La placa se leyó en el espectro y registraron los resultados. La lectura se realizó en un tiempo máximo de 10 minutos.

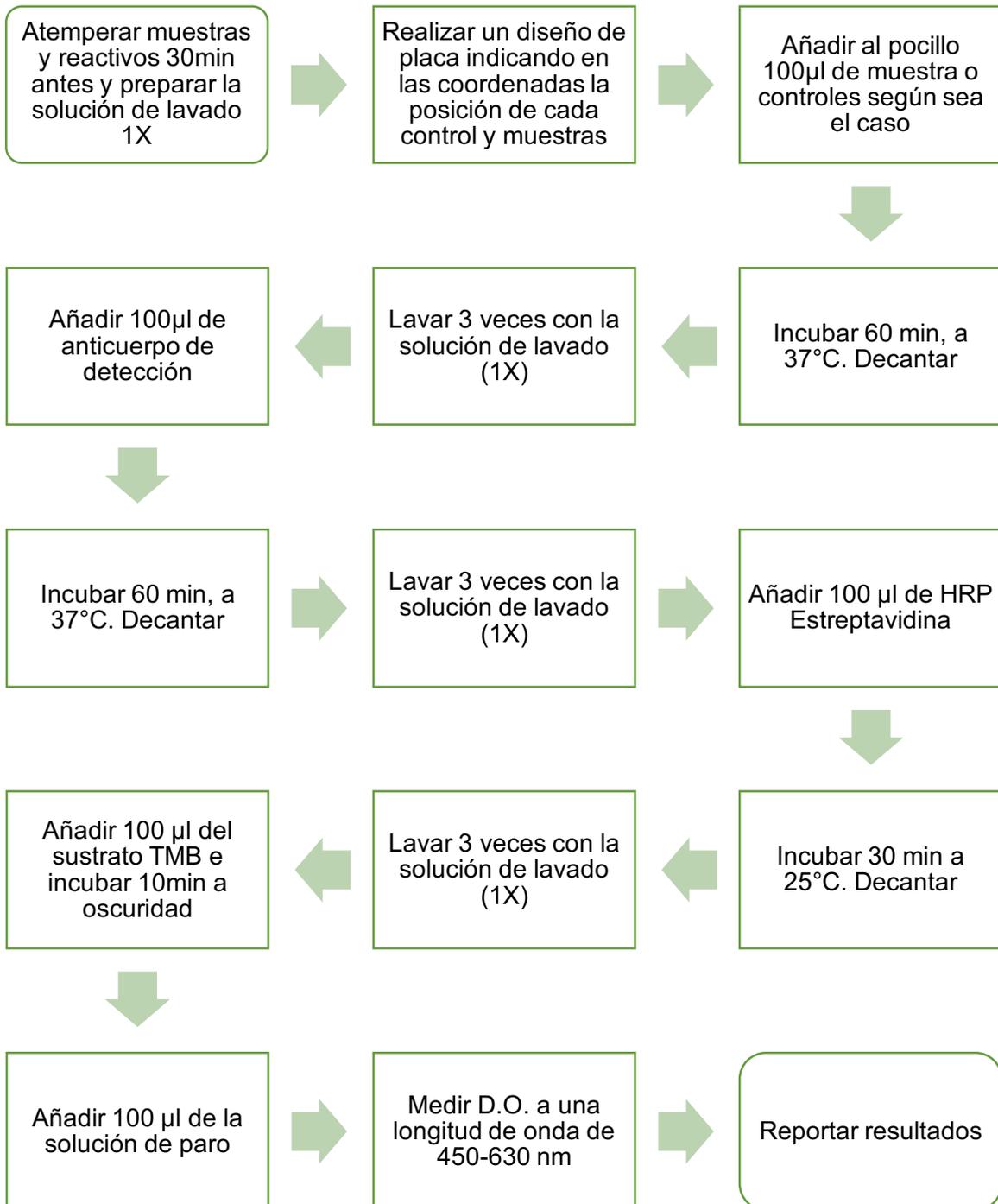
Interpretación de resultados de la prueba

- Positivo: Cuando se reporta un valor mayor o igual de absorbancia a una longitud de onda de diferencia de entre 450 y 620nm al estándar más bajo de 2 unidades EIA.
- Negativo: Cuando se reporta un valor menor de absorbancia a una longitud de onda de diferencia de entre 450 y 620nm al estándar más bajo de 2 unidades EIA.

Según el inserto del producto del antígeno urinario no se ha documentado reacción cruzada con *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* o *Aspergillus* spp. en orina.

DIAGRAMA DE FLUJO

IMMY, ALPHA *Histoplasma* Antigen Enzyme Immunoassay



2. PCR anidada Hc100 en muestras de sangre periférica, médula ósea y biopsias de tejidos

Separación de leucocitos de sangre periférica y médula ósea.

La separación de las células blancas se llevó a cabo por el método de centrifugación por gradiente, que consistió en hacer una dilución 1:1 de sangre periférica o médula ósea en PBS1X estéril (2ml de PBS por 2ml de sangre o médula ósea) y posteriormente se hizo una dilución 3:4, se tomaron 3ml de la mezcla (PBS + sangre o médula ósea) y se vertieron en un tubo falcon con 4 ml de Ficoll (HISTOPAQUE® -1077, Sigma Aldrich). Mediante centrifugación a 1700 rpm durante 25 minutos se obtuvo la separación de las fases, con ayuda de una pipeta de transferencia se retiró la primera fase para posteriormente transferir la capa leucocitaria a un tubo eppendorf de 1.5ml. Se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm, después el paquete celular se lavó con 1ml de PBS1X y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. El pellet se utilizó para la extracción de DNA.

Extracción de DNA

Después de la separación de las células blancas se hizo la extracción de DNA total. El pellet se resuspendió en 180 µl de buffer de lisis (ATL) y se añadieron 20 µl de proteinasa K, la mezcla se incubó a 56°C durante 1 hora. Posteriormente la muestra se expuso 5 min a baño maría a estos, seguidos de tres ciclos de nitrógeno líquido (1min) y baño maría (2 min). Terminada la lisis la muestra se dejó aproximadamente 5 min a temperatura ambiente para continuar la extracción siguiendo el protocolo del kit DNeasy® Blood & Tissue (Quiagen, Alemania). En breve, se añadieron 200 µl de buffer AL y se mezcló vigorosamente en el vórtex, se incubó a 56°C durante 10 minutos, después se agregaron 200 µl de etanol grado Biología Molecular (previamente enfriado a -20°C) y se mezcló con agitación leve. El contenido del tubo eppendorf se transfirió a una columna y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, la columna se transfirió a otro tubo receptor para hacer los lavados con 500 µl de buffer

PW1 seguido de centrifugación a 8000 rpm por 1 min, la columna se transfirió nuevamente a otro tubo receptor y se agregaron 500 µl de buffer PW2, se centrifugo a 14000 rpm por 3 minutos. La columna se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 µl y se agregaron 100 µl de buffer de elución (AE), después de 3 min se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min.

Para la extracción de DNA a partir de biopsias, los fragmentos de tejido se maceraron en un mortero, el macerado se transfirió a un tubo de 1.5 ml, la muestra se centrifugo a 12000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el tejido se resuspendió en 180 µl buffer de lisis (ATL) más 20 µl de proteinasa K, la muestra se incubó a 56°C durante toda la noche. Al otro día la extracción de DNA se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la extracción a partir de sangre y médula ósea.

Para estimar la concentración y determinar las impurezas proteicas presentes en cada muestra, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (© 2010 Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, U.S.A) de acuerdo al Manual de usuario (V3.8 User's Manual).

PCR β-globina (control interno)

Para evaluar la eficacia del proceso de extracción de DNA y la ausencia de inhibidores en el producto final, se realizó una PCR para amplificar como control interno de la reacción un fragmento del gen de beta globina (268 pb) utilizando los iniciadores GH20 (5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3') y PCO4 (5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'). Como control positivo de la reacción se utilizó una muestra de DNA extraído a partir de sangre y como control negativo se utilizó la mezcla de reactivos sin muestra.

De cada muestra se tomaron 2 µl de DNA para hacer la PCR que quedó en un volumen de reacción final de 50 µl. Las concentraciones de los reactivos utilizados

fueron las siguientes: buffer 10x, MgCl₂ 1mM, dNTP's 100 μM, primers GH20 y PCO4 0.5pmol de cada uno y 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen). El programa utilizado fue: 95°C por 7 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

PCR anidada HC100

Los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo fueron los descritos por Bialek *et. al* (2002). Para la PCR externa se utilizaron HCI (5'GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC ACC 3') y HCII (5'ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT 3') donde se amplificó un fragmento de 391 pares de bases. La PCR se estandarizó en las condiciones del laboratorio. La reacción se realizó en un volumen final de 50 μl. Las concentraciones de los reactivos utilizados fueron las siguientes: buffer 10x, MgCl₂ 1mM, dNTP's 100 μM, primers HCI y HCII 0.5pmol de cada uno, 1.5 U de Taq polimerasa y 10 μl de la muestra de DNA. El programa utilizado fue: 95°C por 5min, 35 ciclos de 94°C por 30seg, 65°C por 30seg, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Del producto de la primera reacción HC100 externo se tomaron 5 μl como templado para la 2da PCR interna (anidada), los primers utilizados fueron HCIII (5'GAG ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA 3') y HCIV (5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G- 3') que delimitan un fragmento de 210 pb. La reacción se realizó en un volumen final de 50 μl y la concentración de los reactivos fue la siguiente: buffer 10x, MgCl₂ 1mM, dNTP's 100 μM, primers HCIII y HCIV 0.5pmol de cada uno y 1.35 U de Taq polimerasa. El programa de amplificación fue: 95°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 30seg, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Todos los ensayos incluyen controles negativos sin DNA y controles positivos de DNA extraído a partir de un cultivo de *Histoplasma capsulatum*.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con colorante *SYBR® Safe* y la electroforesis se llevó a cabo a 100v durante 1 hora en buffer TBE (Tris-borato-EDTA) al 0.5X. Como marcador de peso molecular se utilizó el de 100bp DNA ladder (Invitrogen). Posteriormente la fotodocumentación del gel se tomó en el equipo Kodak GEL Logic 1500 Transilluminator Integrated Imaging System (© 2018 New Lab Scientific, Inc.) para observar e identificar el producto correspondiente al peso esperado.

Los amplicones se purificaron con QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, Alemania) y se secuenciaron de acuerdo a la guía de usuario del equipo Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer. Las secuencias obtenidas se identificaron por BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Institución Participante	Responsables
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”	Dra. María Dolores Niembro Ortega Dra. Rosa Areli Martínez Gamboa Dr. Alfredo Ponce de León Garduño Dr. Pedro Torres González Dra. Brenda E. Crabtree Ramírez Dr. José Sifuentes Osornio Dr. Armando Gamboa Domínguez Dr. Edgardo Reyes Gutiérrez Q.F.B. Andrea Rangel Cordero Q.F.B. Janeth Santiago Cruz Q.F.B. Nancy Guadalupe Velázquez Zavala
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)	Dr. Gustavo Reyes Terán Dr. Víctor Hugo Ahumada Topete Dr. Víctor Hugo Lozano Fernández
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”	Dr. Juan Pablo Ramírez Hinojosa Dra. Patricia Rodríguez Zulueta
Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde”, Unidad de VIH, Guadalajara, Jalisco	Dr. Pedro Martínez Ayala Dr. Jaime Andrade Villanueva Dra. Luz Alicia González Hernández
Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, S.L.P.	Dr. Javier Araujo Meléndez Dr. Martín Magaña Aquino
Hospital General de Puebla “Dr. Eduardo Vázquez Navarro”	Dr. Christian Hernández León Dra. Sandra Maldonado Castañeda
Hospital de Alta Especialidad de Veracruz “Virgilio Uribe”	Dra. Marisol Manríquez Reyes
CAPASITS-COECIDA Oaxaca, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO	Dra. Norma Eréndira Rivera Martínez Q.F.B. Sofía Cruz Martínez
Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, Villahermosa, Tabasco.	Dr. Jesús Ruiz Quiñones Dr. Oscar Israel Flores Barrientos Dra. Samantha Chávez Molano Dra. Victoria Matilde Cerino Palomino
Hospital Dr. Gaudencio González “La Raza”	Dr. Alberto Chaparro Sánchez Dr. Jesús Enrique Gaytán Martínez
Departamento de Microbiología y Parasitología, Recursos en Micología, Facultad de Medicina, UNAM	Dra. María del Rocío Reyes Montes Dra. María Lucía Taylor Da Cunha E Mello Dra. Esperanza Duarte Escalante Dra. María Guadalupe Frías de León

Tabla 1. Hospitales y centros participantes, así como el personal responsable en cada centro de llevar a cabo el protocolo.

Cálculo del Tamaño de Muestra

Con base en la fórmula de cálculo de tamaño de muestra de una proporción, se calculó un número total de pacientes a incluir en el estudio de 146. Asumiendo una sensibilidad y especificidad del 95% y una tolerancia del 5% para las pruebas diagnósticas de PCR.

$$n=Z\alpha^2PQ/T^2$$

SENSIBILIDAD

$$= (1.96)^2(0.95)(0.05) / (0.05)^2$$

$$= 0.1825/0.0025 = 73$$

ESPECIFICIDAD

$$= (1.96)^2(0.95)(0.05) / (0.05)^2$$

$$= 0.1825/0.0025 = 73$$

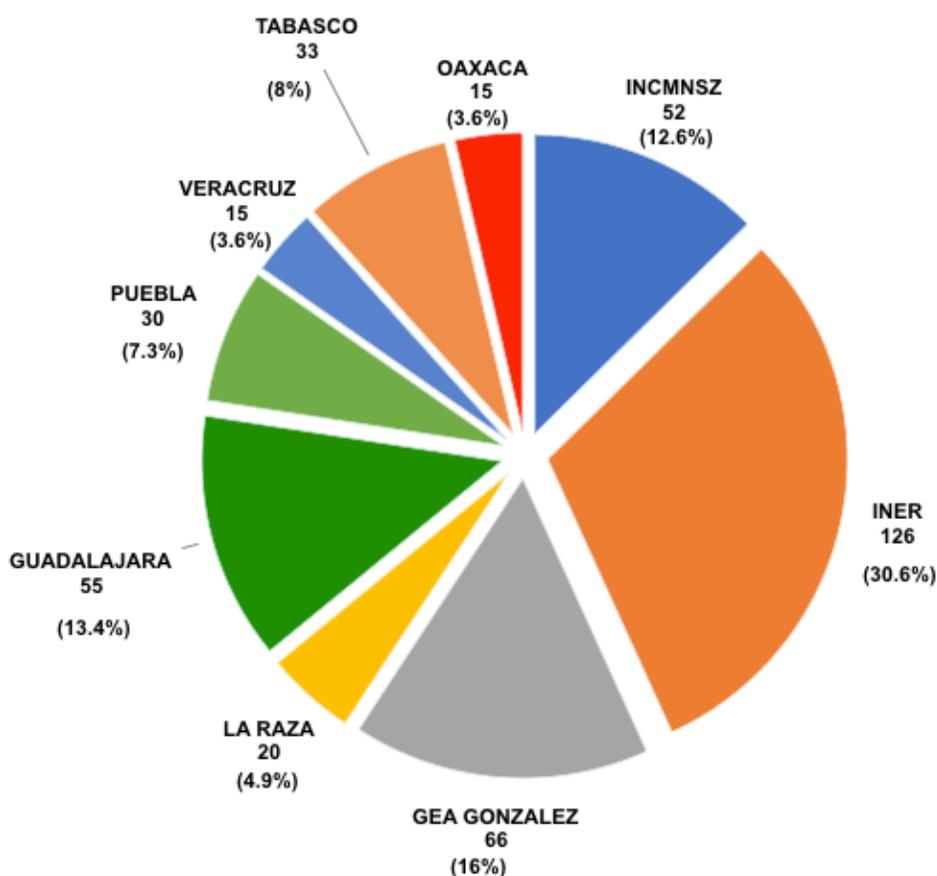
TAMAÑO DE MUESTRA TOTAL = 146 pacientes a incluir en el protocolo

Análisis de datos

Se estimó la sensibilidad y especificidad de las PCR Hc100 y 1281-1283₂₂₀ SCAR con intervalos de confianza del 95% en muestras clínicas de pacientes con infección por VIH/SIDA y sospecha de HDP. También se determinaron los valores predictivos positivos y negativos y likelihood ratios correspondientes. Se utilizó como estándar de referencia el crecimiento de *Histoplasma capsulatum* en cultivo y/o reporte de patología compatible con histoplasmosis. Se empleó estadística descriptiva para reportar las características demográficas y clínicas de la población en estudio. Se usó media o mediana como media de tendencia central en las variables continuas y desviación estándar o intervalos intercuantiles para determinar la dispersión, dependiendo de la distribución de las variables. Se utilizó STATA versión 14.1 Software (College Station, TX).

VIII. RESULTADOS

Durante el periodo de estudio (30 meses), hubo 444 pacientes potencialmente elegibles para participar. De esos se excluyeron treinta y dos pacientes (25 pacientes por no cumplir con la definición de “Sospecha de Histoplasmosis Diseminada y Progresiva”, cuatro pacientes por no contar con la información clínica completa y tres por haber recibido tratamiento antifúngico con anfotericina B intravenosa por >72 horas previas al ingreso al protocolo y la toma de muestras clínicas). En total, incluimos 412 pacientes para el análisis, los centros con mayor número de pacientes ingresados al protocolo fueron el INER, el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, el Hospital Civil de Guadalajara y el INCMNSZ (ver gráfica de distribución por hospital participante).



Gráfica 1. Distribución de los 412 pacientes ingresados al protocolo por hospital participante.

De los 412 pacientes incluidos en el estudio (ver **Figura 13**, diagrama de flujo), el personal del Laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ analizó un total de 2,526 muestras: 409 hemocultivos por lisis de sangre periférica (375 pacientes tuvieron un hemocultivo tomado y 17 pacientes tuvieron dos hemocultivos por lisis tomados); 397 muestras para concentrado leucocitario (una por paciente), 395 muestras para PCR sangre periférica (una por paciente), 395 muestras de orina para antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA EIA (una por paciente), 378 muestras para mielocultivo (una por paciente), 349 muestras para PCR de médula ósea (una por paciente), 116 muestras de cultivo de biopsias (71 pacientes con una muestra, 16 pacientes con dos muestras, tres pacientes con tres muestras y un paciente con cuatro muestras) y de éstos se tuvieron 87 muestras para PCR en biopsia. En el Departamento de Patología del INCMNSZ se analizaron un total de 173 muestras de biopsias (97 pacientes con una muestra, doce pacientes con dos muestras, ocho pacientes con tres muestras, dos pacientes con cuatro muestras, cuatro pacientes con cinco muestras). Los resultados relacionados a las pruebas realizadas por parte de los investigadores de la UNAM (1281-1283₂₂₀ SCAR) no se encuentran aún disponibles por lo que no se reportarán.

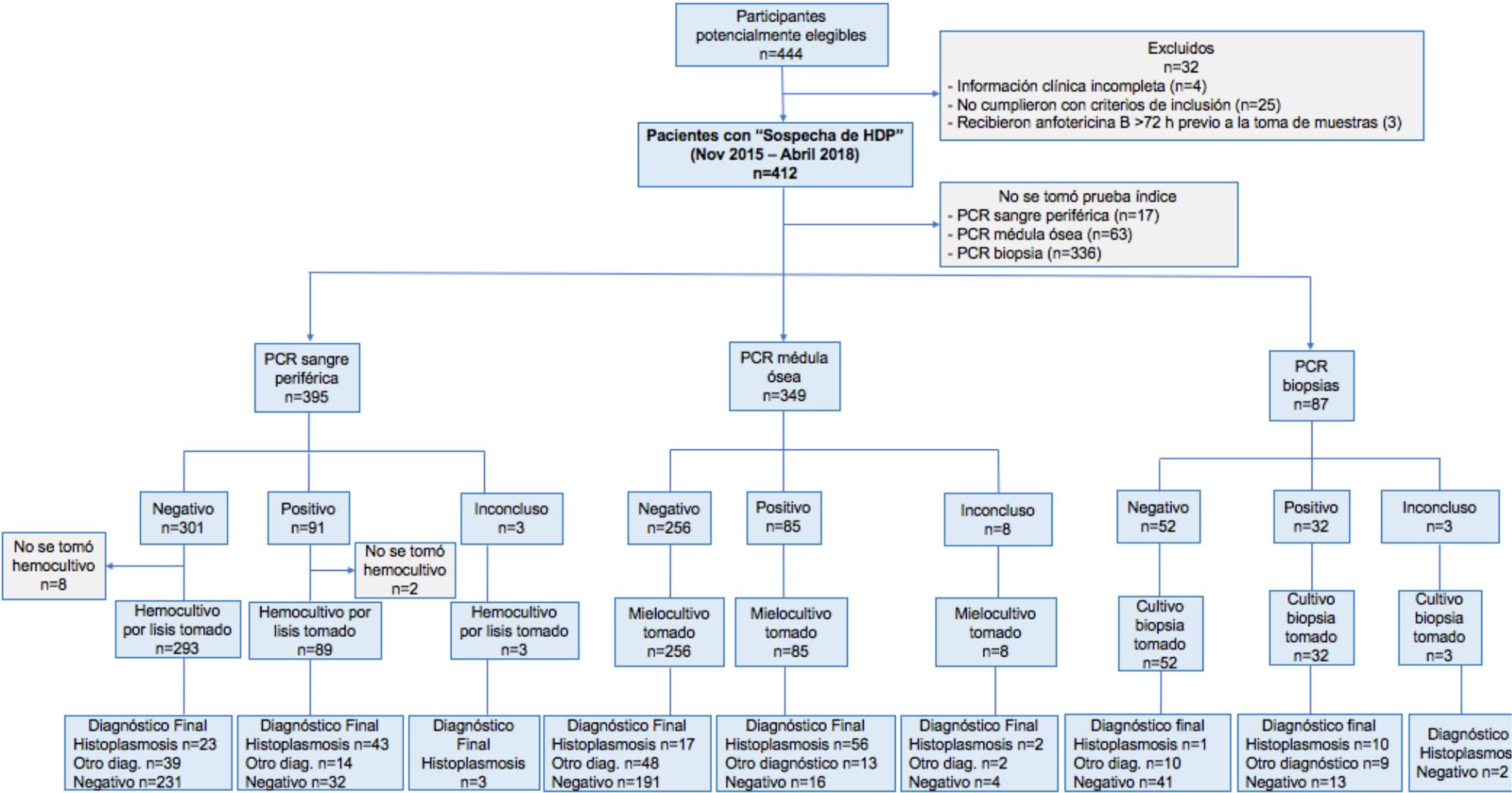


Figura 13. Diagrama de flujo de los pacientes participantes en el estudio y las muestras tomadas (Diagrama STARD). Inconcluso = muestra insuficiente, muestra coagulada, no amplificó el control con beta-globina.

A continuación, se muestran las características generales de los 412 pacientes ingresados al protocolo (**Tabla 2**).

Característica	Total de Pacientes n=412
Datos demográficos y evolución de VIH	
Edad; mediana (RIQ)	35.8 (28-42)
Género masculino (%)	357 (86.7)
Diagnóstico VIH al momento del ingreso	275 (66.8)
Meses desde el diagnóstico VIH, mediana (RIQ)	32.1 (0-35)
Cuenta de linfocitos CD4+ (cel./mm ³); mediana (RIQ)	70.2 (13-80)
CV VIH plasma (copias/mm ³); mediana (RIQ)	864,013 (26,573-569,305)
Virgen a tratamiento ARV (%)	226 (55)
Ha recibido tratamiento ARV (%)	185 (45)
2 ITRAN + 1 ITRNN (%)	112/185 (60.5)
2 ITRAN + 1 IP/r (%)	38/185 (20.5)
2 ITRAN + 1 II (%)	10/185 (5.4)
Otro tratamiento ARV	24/185 (13)
No especificado	1/185 (0.6)
Infecciones oportunistas previas (reportadas por médico tratante)	
PCP (%)	66 (16)
Complejo tuberculosis previa (%)	51 (12.8)
MAC diseminada previa (%)	8 (2)
Histoplasmosis previa (%)	14 (3.4)
Servicio de ingreso	
Urgencias	159 (38.8)
Hospitalización	236 (57.6)
Unidad de terapia intensiva	15 (3.6)
Síntomas	
Fiebre	391 (95.1)
Pérdida de peso	371 (90)
Hepatomegalia	290 (70.4)
Adenopatías	260 (63.1)
Tos	252 (61.2)
Esplenomegalia	223 (54.1)
Disnea	217 (52.7)
Diarrea	203 (49.3)

Náusea	114 (27.7)
Lesiones en piel	97 (23.5)
Vómito	86 (20.9)
Lesión renal aguda	70 (17)
Lesiones en mucosas	52 (12.6)
Sangrado tubo digestivo	50 (12.1)
Anormalidades en el laboratorio	
Anemia (Hb <10 g/dL)	238 (58.6)
Leucopenia (Nt <1800/uL)	127 (31.9)
Trombocitopenia	158 (39.1)
Bilirrubina total (mg/dL); mediana (RIQ)	1.2 (0.45-1.13)
Alanino aminotransferasa (UI/L); mediana (RIQ)	55.6 (22-62)
Aspartato aminotransferasa (UI/L); mediana (RIQ)	108.5 (31-117.5)
Deshidrogenasa láctica (UI/L); mediana (RIQ)	955 (219-813)
Ferritina (ng/mL), mediana (RIQ)	2227.4 (472-2060)
Involucro pulmonar radiográfico	287 (69.8)
Otras infecciones oportunistas/neoplasia	
MAC diseminado	34 (8.3)
Tuberculosis diseminada	29 (7)
<i>Cryptococcus neoformans</i> diseminado	7 (1.7)
Enfermedad por CMV	5 (1.2)
Sarcoma de Kaposi	9 (2.2)
Linfadenopatía por VIH	2 (0.5)
Linfoma	10 (2.4)

Identificamos 107/412 (26%) pacientes con diagnóstico de histoplasmosis probada. Casi la mitad del total de estos pacientes provenían de dos centros hospitalarios, el 25.2% del Hospital Civil de Guadalajara y el 21.5% del Hospital Regional de Alta Especialidad de Tabasco. Los centros que mostraron las tasas de incidencia más altas fueron Veracruz (73.3%), Tabasco (70%), Guadalajara (49%), Oaxaca (46.7%) y Puebla (30%). (Ver mapa)

	INNSZ	INER	GEA GLZ	LA RAZA	GUADALAJARA	PUEBLA	VERACRUZ	TABAS CO	OAXACA
n/N	7/107 (6.5%)	12/107 (11.2%)	8/107 (7.5%)	3/107 (2.8%)	27/107 (25.2%)	9/107 (8.4%)	11/107 (10.3%)	23/107 (21.5%)	7/107 (6.5%)
n/n	7/52 (13.5%)	12/126 (9.5%)	8/66 (12.1%)	3/20 (15%)	27/55 (49%)	9/30 (30%)	11/15 (73.3%)	23/33 (70%)	7/15 (46.7%)

Tabla 3. Distribución de casos positivos de histoplasmosis diseminada y progresiva por hospital de ingreso.

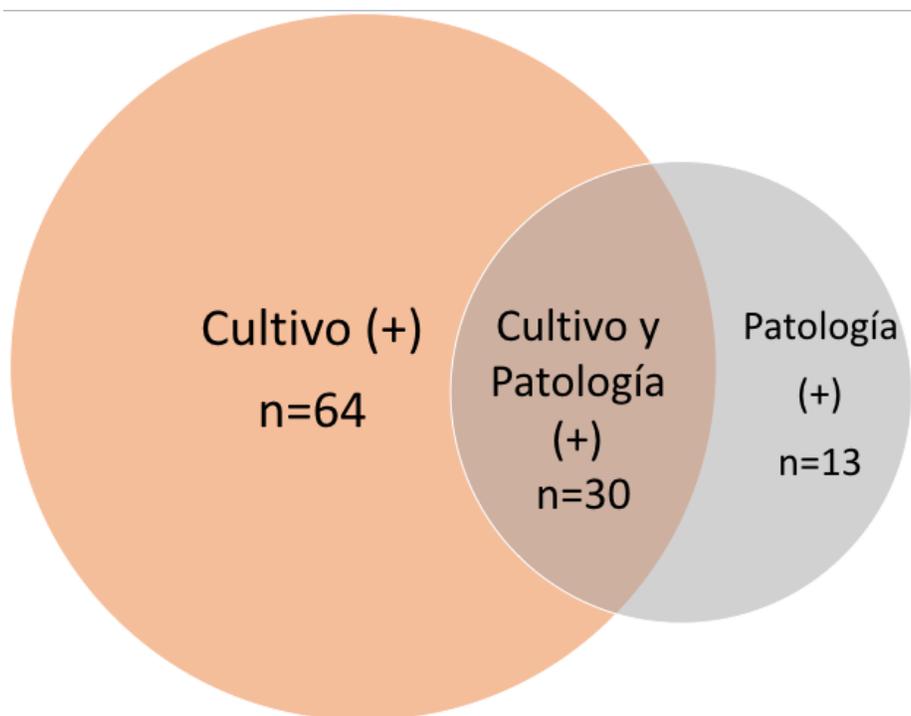
n/N = Número de casos probados de histoplasmosis por centro participante/total de casos probados de todos los centros.

n/n = Número de casos probados por centro participante/total de pacientes ingresados al protocolo por cada centro.



Mapa. Localización de los 107 pacientes con Histoplasmosis Diseminada y Progresiva Probada, de acuerdo a sitio de residencia.

De los 107 casos probados de histoplasmosis, en el 28% (30/107) de los pacientes se identificó la presencia de *Histoplasma* de forma simultánea tanto por cultivo como por patología. En el 60% (64/107) el diagnóstico fue por aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en al menos un cultivo y en el 12% (13/107) de los pacientes el diagnóstico fue exclusivamente por hallazgos histopatológicos compatibles con histoplasmosis en biopsias de tejido.



Gráfica 2. Número y distribución de los 107 casos con histoplasmosis diseminada y progresiva por método de diagnóstico.

Del total de 412 pacientes, *H. capsulatum* creció en el 17.8% (73/409) de los hemocultivos por lisis de sangre periférica (un paciente tuvo dos hemocultivos por lisis positivos para *H. capsulatum*); en el 22% (83/378) de los mielocultivos y en el 10.3% (12/116) de los cultivos de biopsias tomadas (un paciente tuvo dos biopsias de diferentes sitios positivas para *H. capsulatum*). El 25.4% (44/173) de las muestras para análisis histopatológico fue compatible con histoplasmosis (un paciente tuvo dos biopsias de diferentes sitios compatibles con histoplasmosis).

La distribución de positividad por tipo de prueba diagnóstica exclusivamente en los 107 pacientes con diagnóstico de histoplasmosis diseminada probada, se muestra en la siguiente tabla.

	Hemocultivo por lisis	Mielocultivo	Cultivo biopsia	Biopsia patología
n/N (%)	73/409	83/378	12/116	44/173
412 pacientes ingresados al protocolo	(17.8)	(22)	(10.3)	(25.4)
n/N (%)	72/101	83/99	11/31	43/60
107 casos HDP	(71.3)	(83.8)	(35.5)	(71.7)

Tabla 4. Distribución de positividad por tipo de prueba diagnóstica.

n = Número de cultivos y/o biopsias positivas para *Histoplasma capsulatum*.

N = Total de cultivos y/o biopsias tomadas.

Los sitios de las doce biopsias de cultivos positivas son: ganglio linfático (5), piel (5), hueso (1), pulmón (1). Y los sitios de las 44 muestras de biopsias positivas por patología son: hueso/médula ósea (24), piel (12), ganglio linfático (5), pulmón (2), íleon/colon (1).

SITIO ANATÓMICO	CULTIVOS POSITIVOS PARA <i>H. CAPSULATUM</i>	HISTOPATOLOGÍA POSITIVA PARA HISTOPLASMOSIS
	No./N (%)	No./N (%)
SANGRE	73/409 (17.8)	-
MÉDULA ÓSEA	83/378 (22)	-
PIEL Y TEJIDOS BLANDOS	5/24 (20.8)	12/28 (42.9)
TRACTO GASTROINTESTINAL	0/21 (0)	1/35 (2.9)
HUESO / BIOPSIA MÉDULA ÓSEA	1/26 (3.8)	24/70 (34.3)
GANGLIOS LINFÁTICOS	5/23 (21.7)	5/16 (31.3)
HÍGADO O BAZO	0/11 (0)	0/12 (0)
PULMÓN	1/6 (16.7)	2/9 (22.2)
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	0/3 (0)	0/1 (0)
NO ESPECÍFICADA	0/2 (0)	Riñón y testículo 0/2 (0)
TOTAL	168/903 (18.6)	44/173 (25.4)

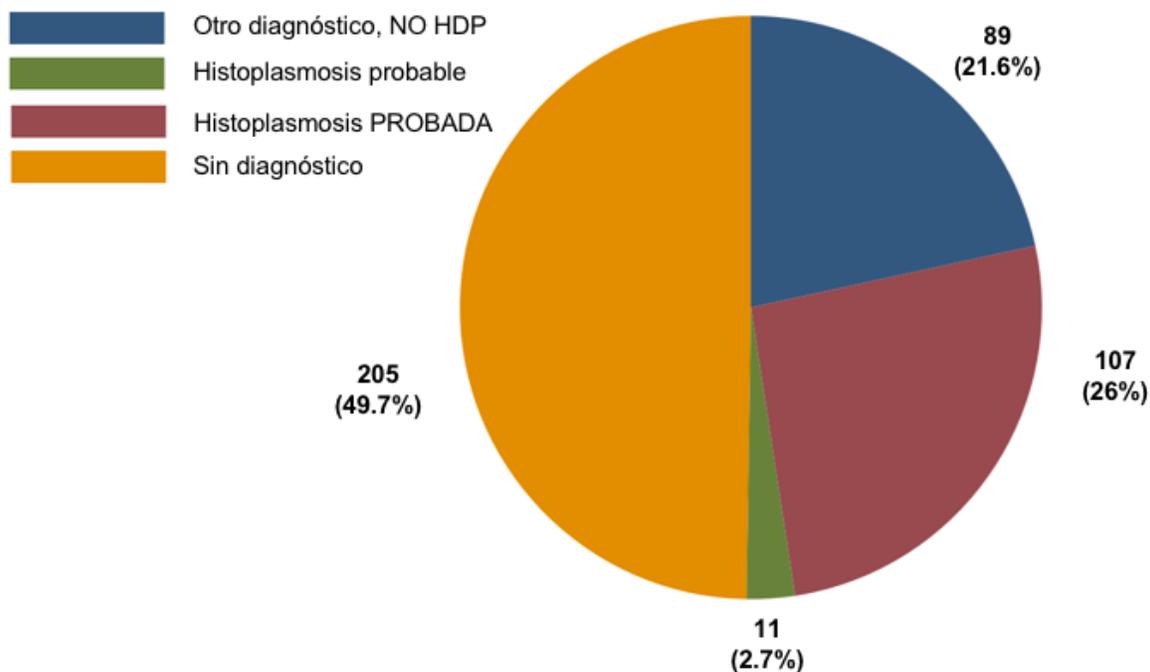
Tabla 5. Muestras positivas por microbiología e histopatología para *Histoplasma capsulatum* del total de muestras procesadas para los 412 pacientes con sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva.

El diagnóstico establecido de manera más frecuente entre los participantes fue precisamente el de histoplasmosis diseminada y progresiva en un total de 107 pacientes (de éstos, 22 pacientes además de histoplasmosis tuvieron al menos otro diagnóstico agregado).

El segundo diagnóstico más común fue la infección por micobacterias en 66 pacientes: 34 pacientes con infección por MAC (de éstos, cinco pacientes tuvieron enfermedad concomitante con *H. capsulatum*); 29 pacientes con infección por *M. tuberculosis*; y tres pacientes con otras micobacterias (*M. fortuitum*, *M. simiae* y *M. chelonae*) con un caso de cada uno.

Otros diagnósticos establecidos fueron: sarcoma de Kaposi (9 pacientes), linfoma (10 pacientes), *Cryptococcus neoformans* (7 pacientes), bacteriemia por *Salmonella* spp. (5 pacientes), enfermedad por CMV (5 pacientes), y otros diagnósticos (37 pacientes) (ver gráfico).

No se logró llegar a un diagnóstico con base en las muestras clínicas analizadas dentro del protocolo en el 50% (205/412) de los pacientes participantes.



Gráfica 3. Número de pacientes por tipo de diagnóstico definitivo. Un total de 107 pacientes fueron diagnosticados con Histoplasmosis Diseminada y Progresiva.

Otro diagnóstico, NO HDP= se identificó una etiología diferente a *Histoplasma capsulatum*.

Histoplasmosis PROBADA= se confirmó el diagnóstico de histoplasmosis por cultivo y/o patología.

Histoplasmosis PROBABLE= Antígeno urinario de histoplasma positivo, pero sin evidencia de positividad por cultivo y/o patología.

Sin diagnóstico= no se llegó a un diagnóstico con las muestras clínicas analizadas.

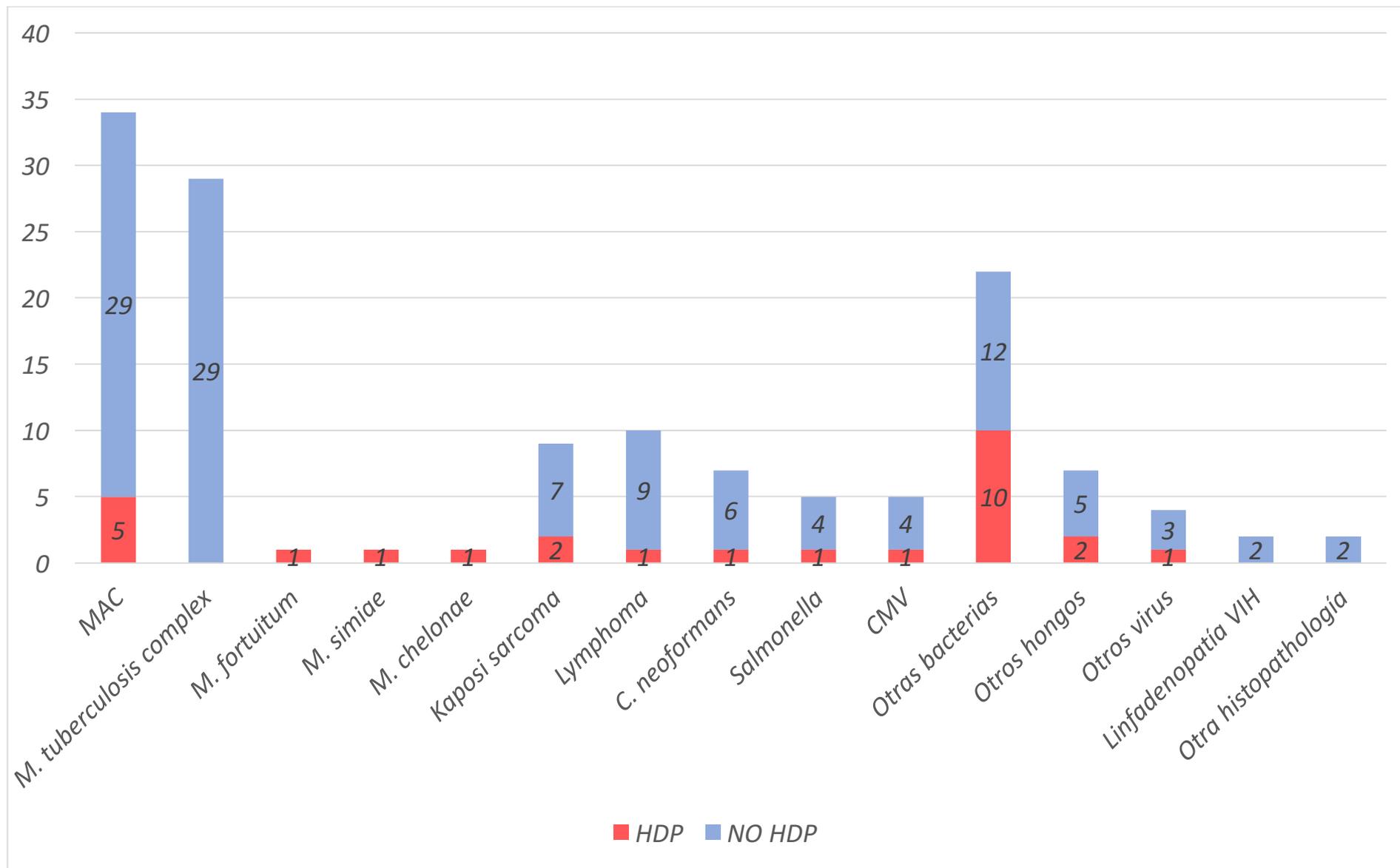


Tabla 6. Diagnósticos establecidos en los pacientes ingresados en el protocolo. Otras bacterias: *Escherichia coli* (9), *Enterobacter cloacae* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Staphylococcus aureus* (3), *Rhodococcus equi* (1); *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Pseudomonas fluorescens* (1), *Pseudomonas putida* (1), *Serratia marcescens* (1), *Streptococcus pyogenes* (1), *Enterococcus faecium* (1), *Roseomonas* sp. (1). Otros hongos: *Candida albicans* (4); *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Candida tropicalis* (1), *Malbranchea* sp. (1). Otros virus: VPH (1); Herpes virus (1), VZV (1), VPH (1). Otra histopatología: HIVAN (1), angioinvasión pulmonar fúngica (1)

Características clínicas y demográficas de los pacientes con HDP en comparación con los que tuvieron infección por micobacterias (MTB/MAC)

En ambos grupos el sexo predominante fue el masculino, con un promedio de edad de 34 años. El grupo de HDP tenía menos tiempo (mediana de 2 meses) con el diagnóstico de infección por VIH en comparación con el grupo de los pacientes infectados con micobacterias (mediana 4 meses). Sin embargo, ambos grupos tienen una mediana de cuenta de linfocitos T CD4+ de 50 cel./mm³. De igual manera aproximadamente la mitad de los pacientes en ambos grupos son vírgenes a tratamiento antirretroviral.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, los pacientes con HDP se manifestaron más frecuentemente con fiebre y elevación de AST y DHL. Por su parte los pacientes infectados con micobacterias (MAC/MTB) tuvieron más frecuentemente hepatomegalia, esplenomegalia, adenopatías periféricas, tanto a la exploración física como por estudios de imagen.

El 10% (11/107) de los pacientes con HDP probada fueron diagnosticados con al menos otra infección oportunistas o una malignidad definitiva de SIDA, siendo lo más frecuente infección por MAC, *C. neoformans*, *Salmonella* spp., sarcoma de Kaposi, enfermedad por CMV, y linfomas.

Carácterística	Total n=412 (%)	HDP Probada n=102 (%)	MTB/MAC n=58 (%)	p
Género (hombre), n(%)	357 (86.6)	84 (82.4)	51 (87.9)	0.35
Edad (años), media (DS)	35.8 (±9.9)	34.0 (±9.5)	33.6 (±8.7)	0.81
Infección por VIH				
Meses desde el diagnóstico con VIH, mediana (RIQ)	2 (0-35.3)	2 (0-32)	4 (0.25-73.75)	0.09
Cuenta de linfocitos T CD4+ (cel/mm ³), mediana (min-max)	70.2 (0-1493)	50.0 (0-340)	47.5 (1-369)	0.60
Vírgenes a TARAA	226/411 (55.0)	60/102 (58.8)	29/58 (50)	0.28
Signos y síntomas				
Fiebre	391/411 (95.1)	101/102 (99.0)	53/58 (91.4)	0.01
Pérdida de peso	371/412 (90.1)	93/102 (91.2)	56/58 (96.6)	0.19
Hepatomegalia	290/412 (70.4)	68/102 (66.7)	50/58 (86.2)	0.01
Esplenomegalia	223/412 (54.1)	50/102 (49.0)	41/58 (70.7)	0.01
Adenopatías periféricas	260/412 (63.1)	49/102 (48.0)	44/58 (75.9)	0.01
Lesiones cutáneas	97/412 (23.5)	33/102 (32.4)	14/58 (24.1)	0.27
Úlceras mucosas	52/412 (12.6)	12/102 (11.8)	11/58 (19.0)	0.21
Sangrado tubo digestivo	50/412 (12.1)	10/102 (9.8)	6/58 (10.3)	0.91
Bicitopenia o Pancitopenia	170/404 (42.1)	51/101 (50.5)	22/58 (37.9)	0.12
Elevación de AST	143/384 (37.2)	60/98 (61.2)	19/53 (35.9)	0.01
Elevación de DHL	126/339 (37.2)	66/90 (73.3)	9/48 (18.8)	<0.001
Elevación de ferritina	56/62 (90.3)	13/14 (92.9)	10/10 (100)	0.38
Involucro radiográfico extrapulmonar	283/410 (69.0)	49/101 (48.5)	47/58 (81.0)	<0.001

Tabla 7. Comparación de información clínica y demográfica de los pacientes con HDP vs los que tuvieron infección por MTB/MAC.

Sensibilidad y especificidad de la PCR Hc100 y del Antígeno Histoplasma IMMY ALPHA EIA para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada y progresiva en pacientes con VIH/SIDA

La PCR Hc100 fue positiva en el 23.2% (91/392) de las muestras de sangre periférica; en el 24.9% (85/341) de las muestras de médula ósea; y en el 38.1% (32/84) de las muestras de biopsia para cultivo.

La sensibilidad para la PCR Hc100 en muestras de sangre periférica, médula ósea y biopsias fue del 65.2% (95% IC, 54.1-74.9), 76.7% (95% IC, 76.0-77.4), 90.9% (95% IC, 59.4-99.5), en comparación con los hemocultivos por lisis, mielocultivos y cultivos de biopsias respectivamente; con una especificidad para las mismas muestras del 85.3% (95% IC, 83.0-87.3), 89.2% (95% IC, 89.0-89.4), 69.9% (95% IC, 65.1-71.2) respectivamente. Resaltan los valores predictivos negativos (VPN) de la PCR Hc100 alcanzando valores del 92.4% (95% IC, 88.8-95.1) en muestras de sangre periférica; del 93.4% (95% IC, 89.6-96.1) en muestras de médula ósea; y del 98.1% (95% IC, 89.7-100) en muestras de biopsias de tejido.

Por su parte, el 20.3% (80/395) de los pacientes tuvieron antígeno urinario positivo. La sensibilidad del antígeno urinario para el diagnóstico de HDP probada fue del 66.3% (95% IC, 65.9-66.8) y la especificidad del 96.2% (95% IC, 96.0-96.4); su valor predictivo positivo es del 86.3 (95% IC, 76.7-92.9) y el valor predictivo negativo (VPN) del 88.9% (95% IC, 84.9-92.1); el likelihood ratio positivo de 17.6 (95% IC, 9.9-33.1) y el likelihood ratio negativo de 0.4 (95% IC, 0.3-0.4). (Ver tablas)

PCR SANGRE PERIFÉRICA	HISTOPLASMOSIS PROBADA			HEMOCULTIVO POR LISIS POSITIVO		
	Positivo, No. (%)	Negativo, No. (%)	Total, No. (%)	Positivo, No. (%)	Negativo, No. (%)	Total, No. (%)
Positivo	60 (15.3)	31 (7.9)	91 (23.2)	43 (11)	48 (12.2)	91 (23.2)
Negativo	36 (9.2)	265 (67.6)	301 (76.8)	23 (5.9)	278 (70.9)	301 (76.8)
Total	96 (24.5)	296 (75.5)	392 (100)	66 (16.9)	326 (83.1)	392 (100)
Sensibilidad % (95% IC)	62.5 (54.4-69.7)			65.2 (54.1-74.9)		
Especificidad % (95% IC)	89.5 (86.9-91.9)			85.3 (83.0-87.3)		
Valor predictivo positivo % (95% IC)	65.9 (55.3-75.6)			47.3 (36.7-58.0)		
Valor predictivo negativo % (95% IC)	88.0 (83.8-91.5)			92.4 (88.8-95.1)		
Likelihood ratio positivo % (95% IC)	6.0 (4.1-8.5)			4.4 (3.2-5.9)		
Likelihood ratio negativo % (95% IC)	0.4 (0.3-0.5)			0.4 (0.3-0.6)		

Tabla 8. Rendimiento diagnóstico de la PCR Hc100 en muestras de sangre periférica en comparación con la definición de caso probado (cultivo y/o histopatología compatible con histoplasmosis) y en comparación con el hemocultivo por lisis de sangre periférica, en pacientes con infección por VIH/SIDA.

PCR MÉDULA ÓSEA	HISTOPLASMOSIS PROBADA			MIELOCULTIVO POSITIVO		
	Positivo, No. (%)	Negativo, No. (%)	Total, No. (%)	Positivo, No. (%)	Negativo, No. (%)	Total, No. (%)
Positivo	57 (16.7)	28 (8.2)	85 (24.9)	56 (16.4)	29 (8.5)	85 (24.9)
Negativo	30 (8.8)	226 (66.3)	256 (75.1)	17 (5.0)	239 (70.1)	256 (75.1)
Total	87 (25.5)	254 (74.5)	341 (100)	73 (21.4)	268 (78.6)	341 (100)
Sensibilidad % (95% IC)	65.5 (57.0-72.9)			76.7 (76.0-77.4)		
Especificidad % (95% IC)	89.0 (86.0-91.5)			89.2 (89.0-89.4)		
Valor predictivo positivo % (95% IC)	67.1 (56.0-76.9)			65.9 (54.8-75.8)		
Valor predictivo negativo % (95% IC)	88.3 (83.7-92.0)			93.4 (89.6-96.1)		
Likelihood ratio positivo % (95% IC)	5.9 (4.1-8.6)			7.1 (5.0-9.6)		
Likelihood ratio negativo % (95% IC)	0.4 (0.3-0.5)			0.3 (0.2-0.4)		

Tabla 9. Rendimiento diagnóstico de la PCR Hc100 en muestras de médula ósea en comparación con la definición de caso probado (cultivo y/o histopatología compatible con histoplasmosis) y en comparación con el mielocultivo, en pacientes con infección por VIH/SIDA.

PCR BIOPSIA CULTIVO	HISTOPLASMOSIS PROBADA			CULTIVO DE BIOPSIA POSITIVO		
	Positivo, No. (%)	Negativo, No. (%)	Total, No. (%)	Positivo, No. (%)	Negativo, No. (%)	Total, No. (%)
Positivo	21 (25)	11 (13.1)	32 (38.1)	10 (11.9)	22 (26.2)	32 (38.1)
Negativo	10 (11.9)	42 (50)	52 (61.9)	1 (1.2)	51 (60.7)	52 (61.9)
Total	31 (36.9)	53 (63.1)	84 (100)	11 (13.1)	73 (86.9)	84 (100)
Sensibilidad % (95% IC)	67.7 (52.6-79.9)			90.9 (59.4-99.5)		
Especificidad % (95% IC)	79.2 (70.4-86.3)			69.9 (65.1-71.2)		
Valor predictivo positivo % (95% IC)	65.6 (46.8-81.4)			31.3 (16.1-50.0)		
Valor predictivo negativo % (95% IC)	80.7 (67.5-90.4)			98.1 (89.7-100)		
Likelihood ratio positivo % (95% IC)	3.3 (1.8-5.9)			3.0 (1.7-3.5)		
Likelihood ratio negativo % (95% IC)	0.4 (0.2-0.7)			0.1 (0.0-0.6)		

Tabla 10. Rendimiento diagnóstico de la PCR Hc100 en muestras de biopsias de tejido en comparación con la definición de caso probado (cultivo y/o histopatología compatible con histoplasmosis) y en comparación con el cultivo de biopsias de tejido, en pacientes con infección por VIH/SIDA.

ANTÍGENO URINARIO	HISTOPLASMOSIS PROBADA		
	Positivo, No. (%)	Negativo, No. (%)	Total, No. (%)
Positivo	69 (17.5)	11 (2.8)	80 (20.3)
Negativo	35 (8.8)	280 (70.9)	315 (79.7)
Total	104 (26.3)	291 (73.7)	395 (100)
Sensibilidad % (95% IC)	66.3 (65.9-66.8)		
Especificidad % (95% IC)	96.2 (96.0-96.4)		
Valor predictivo positivo % (95% IC)	86.3 (76.7-92.9)		
Valor predictivo negativo % (95% IC)	88.9 (84.9-92.1)		
Likelihood ratio positivo % (95% IC)	17.6 (9.9-33.1)		
Likelihood ratio negativo % (95% IC)	0.4 (0.3-0.4)		

Tabla 11. Rendimiento diagnóstico del antígeno urinario de *Histoplasma* IMMY ALPHA EIA en comparación con la definición de caso probado (cultivo y/o histopatología compatible con histoplasmosis) en pacientes con infección por VIH/SIDA.

Desenlaces de los pacientes

Con el fin de conocer el desenlace de los pacientes se les solicitó a los médicos infectólogos de cada centro contestaran cuatro preguntas al término del manejo de cada paciente.

1. ¿El paciente recibió tratamiento antifúngico empírico?
2. En caso afirmativo a la pregunta anterior, ¿presentó respuesta clínica al tratamiento empírico?
3. ¿El paciente murió?
4. En caso afirmativo a la pregunta anterior, ¿atribuye usted la causa de muerte a histoplasmosis?

Contamos con la información de la mayoría de los pacientes en todos los centros, excepto del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y del Hospital de Alta Especialidad de Veracruz “Virgilio Uribe” que está pendiente. En la tabla a continuación se muestran los desenlaces de acuerdo al tipo de diagnóstico definitivo establecido. La “n” es el total de pacientes en cada grupo, y el denominador muestra el total de pacientes de los que se cuenta con información.

Un total de 161 pacientes (53.3%) recibieron tratamiento antifúngico empírico. El 96.8% de los pacientes con diagnóstico definitivo de HDP lo recibieron, así como el 77.8% de los casos probables y el 43.3% de los casos que no se tuvo un diagnóstico definitivo.

Llama la atención que cerca de un tercio de los pacientes en cada grupo de “casos probables/Ag. Urinario positivo”, “otro diagnóstico NO HDP” y del grupo “sin diagnóstico”, los médicos reportaron que si presentaron respuesta clínica al tratamiento antifúngico empírico empleado.

Con la información que se cuenta hasta el momento se calculó una mortalidad global del 31.7%. Siendo la más alta en el grupo de pacientes catalogados como “casos probables/Ag. Urinario positivo” con 54.5%, seguida del grupo de “casos probados HDP” con una mortalidad del 44%.

En el grupo de pacientes de “casos probables/Ag. Urinario positivo” y en los pacientes “sin diagnóstico” se atribuyó la causa de la muerte a histoplasmosis en 1/3 de los casos.

	Total n=412	Casos probados HDP n=107	Casos probables (Ag. Urinario positivo) n=11	Otro diagnóstico (No HDP) n=89	Sin diagnóstico n=205	p
¿Recibió tratamiento antifúngico empírico?						<0.001
Si	161/302 (53.3)	61/63 (96.8)	7/9 (77.8)	25/73 (34.2)	68/157 (43.3)	
No	141/302 (46.7)	2/63 (3.2)	2/9 (22.2)	48/73 (65.8)	89/157 (56.7)	
¿Presentó respuesta clínica al tratamiento empírico?						<0.001
Si	84/161 (52.2)	49/61 (80.3)	2/7 (28.6)	9/25 (36)	24/68 (35.3)	
No	77/161 (47.8)	12/61 (19.7)	5/7 (71.4)	16/25 (64)	44/68 (64.7)	
¿El paciente murió?						0.002
Si	110/347 (31.7)	33/75 (44)	6/11 (54.5)	30/83 (36.1)	41/178 (23)	
No	237/347 (68.3)	42/75 (56)	5/11 (45.5)	53/83 (63.9)	137/178 (77)	
¿El paciente murió a causa de histoplasmosis?						<0.001
Si	43/110 (39)	28/33 (84.8)	2/6 (33.3)	1/30 (3.3)	12/41 (29.3)	
No	67/110 (61)	5/33 (15.2)	4/6 (66.7)	29/30 (96.7)	29/41 (70.7)	

Tabla 12. Desenlaces de los pacientes de acuerdo a diagnóstico definitivo.

Casos probables histoplasmosis

Se identificaron 11 pacientes como “casos probables de histoplasmosis” ya que tuvieron un antígeno urinario de histoplasma positivo sin evidencia de crecimiento del hongo en cultivo o datos compatibles en biopsia de patología. Las características demográficas y clínicas se muestran en la tabla siguiente.

Llama la atención que en tres de los once casos se identificó *Cryptococcus neoformans* tanto en cultivo de hemocultivo por lisis de sangre periférica como en mielocultivo. Los tres casos tuvieron un desenlace fatal, a pesar de que en dos de ellos se reportó que recibieron tratamiento antifúngico; se desconoce que tratamiento recibió el tercer caso.

En el documento original publicado por el fabricante del antígeno urinario de histoplasma IMMY ALPHA se reportó reacción cruzada con *Blastomyces dermatiditis*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis* en orina. Sin embargo, se reportó que la prueba no presentaba reacción cruzada con *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* o *Aspergillus* spp. en orina.

Recientemente se publicó un artículo donde se informó que la meningitis por *Cryptococcus neoformans* con anticuerpos positivos para cryptococo en LCR puede causar resultados falsos positivos en un inmunoensayo enzimático de anticuerpos IgG anti-*Histoplasma* hasta en el 34.8% de los casos (8/23 casos).

Por lo anterior pudiéramos considerar como una posibilidad que la presencia de cryptococosis diseminada pudiera ser una causa de reacción cruzada y tener resultados falsos positivos en la prueba de antígeno urinario no reportados previamente¹⁰¹.

#	Edad / Género	Hospital de Ingreso	Tiempo de diagnóstico de VIH (meses) / Otros diagnósticos establecidos en hospital de origen	Cuenta de CD4+ (cel/ml) / CV VIH en plasma (copias/ml)	Tratamiento ARV	Síntomas / Alteraciones de laboratorio	Evidencia radiológica de involucro pulmonar	Tratamiento anfotericina B empírico >72 hr previo a toma de muestras clínicas	Muestras tomadas para cultivo o patología	Diagnóstico final / tratamiento / Desenlace
1	39/M	Hospital Civil de Guadalajara	39/-	266/20	TDF + FTC + EFV	P.P., fiebre / anemia, plaquetopenia, elevación 2 VLSN de AST y DHL	No	No	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	Sin aislamientos / recibió tratamiento antifúngico empírico y presentó respuesta clínica/ vivo
2	28/M	Hospital Civil de Guadalajara	0/-	- /-	Naive	P.P., fiebre, tos, adenopatías, lesiones cutáneas / elevación 2 VLSN de AST y DHL	Si	No	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	<i>Cryptococcus neoformans</i> / recibió tratamiento antifúngico, tuvo respuesta clínica inicial / muerto
3	43/M	CAPASITS-COECIDA, HRAEO, Oaxaca	190 / Tuberculosis, PCP	8/20,300	ABC + 3TC + AZT + ATV/r	P.P., fiebre, disnea, tos, náusea, diarrea, adenopatías, hepatomegalia / anemia, neutropenia, elevación 2 VLSN de AST y DHL	Si	No / Itraconazol > 72 h	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	Sin aislamientos/se desconoce tratamiento posterior/muerto
4	38/M	Hospital General, Dr. Manuel Gea González	0/-	68/-	Naive	P.P., fiebre, disnea, náusea, vómito, adenopatías, hepatomegalia, LRA / anemia, plaquetopenia, elevación 2 VLSN de AST y DHL	No	No	Mielocultivo	Sin aislamientos / recibió tratamiento antifúngico empírico, no tuvo respuesta clínica / vivo
5	33/M	INER	80/ PCP	5/360,747	TDF + AZT + LPV/R	P.P., fiebre, tos, diarrea, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, LRA / elevación 2 VLSN de DHL	Si	No	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> / se desconoce tratamiento / vivo

6	27/M	INER	82/-	3/130,474	LPV/r + FTC + TDF + EFV	P.P., fiebre, diarrea, STD / anemia, plaquetopenia	Si	No	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	<i>Cryptococcus neoformans</i> / recibió tratamiento antifúngico, no tuvo respuesta clínica / muerto
7	52/M	INER	0/ PCP	13/4,884,278	Naive	P.P., fiebre, disnea, tos, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia / -	Si	No	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	Sin aislamientos / se desconoce tratamiento / muerto
8	40/M	INER	2/-	30/2,757,021	Naive	P.P., fiebre, disnea, tos, vómito, hepatomegalia, esplenomegalia / pancitopenia	Si	No	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	Sin aislamientos / recibió tratamiento antifúngico empírico, no tuvo respuesta clínica / vivo
9	46/M	Hospital Regional de Alta Especialidad, Tabasco	0/-	93/1,480,000	Naive	P.P., fiebre, disnea, tos, adenopatías / pancitopenia, elevación 2 VLSN de AST	Si	No / Itraconazol > 72 h	Hemocultivo por lisis, mielocultivo, Biopsia patología médula ósea	<i>Cryptococcus neoformans</i> / se desconoce tratamiento posterior / muerto
10	29/F	Hospital General, Dr. Manuel Gea González	106 / Tuberculosis, herpes simple	2/40	3TC + AZT + LPV/r	P.P., fiebre, disnea, tos, diarrea, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia / anemia, plaquetopenia, elevación de ferritina	Si	No	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	Sin aislamientos / recibió tratamiento antifúngico empírico, no tuvo respuesta clínica / vivo
11	53/M	Hospital General, Dr. Manuel Gea González	0/ Bacteriemia por <i>Salmonella</i> spp.	64/764,793	Naive	P.P., fiebre, disnea, tos, adenopatías, hepatomegalia / pancitopenia, elevación de ferritina	Si	No / Fluconazol > 72 h	Hemocultivo por lisis, mielocultivo	Sin aislamientos / recibió tratamiento antifúngico empírico, no tuvo respuesta clínica / muerto

Tabla 13. Características clínicas de los 11 pacientes catalogados como “casos probables de histoplasmosis”, sin evidencia de histoplasmosis por cultivo y/o patología, pero con antígeno urinario positivo. M=masculino, F=femenino. PCP= neumonía por *Pneumocystis carinii/jirovecii*. TDF=tenofovir, FTC=emtricitabina, EFV=efavirenz, ABC=abacavir, 3TC=lamivudina, AZT=zidovudina, ATV/r=atazanavir/ritonavir, LPV/r=lopinavir/ritonavir. P.P.= pérdida de peso, 2 VLSN= 2 veces límite superior normal, AST= aspartato aminotransferasa, DHL=deshidrogenasa láctica, LRA=lesión renal aguda, STD=sangrado de tubo digestivo.

	Ag. Urinario Falso Negativo	Ag. Urinario Verdadero Positivo
Cuenta de linfocitos T CD4+ (cel/mL), mediana (95% IC)	82.2 (53.2-111.2)	30.5 (21-40)
AST (UI/L) Mediana (95% IC)	139.7 (76.8-202.6)	199 (153.1-244.9)
DHL (mg/dL) Mediana (95% IC)	1170.4 (692.9-1647.9)	2608.8 (1682.6-3535.0)

Tabla 14. Comparación de pacientes con resultados falsos negativos y verdaderos positivos de la prueba de antígeno urinario.

IX. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio el cual fue prospectivo, multicéntrico, doble ciego y cuyo objetivo fue el evaluar la sensibilidad y especificidad de dos métodos diagnósticos distintos (PCR Hc100 y antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA EIA), en zonas endémicas de México, para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada y progresiva en pacientes con VIH/SIDA, mostró que la PCR tiene una buena sensibilidad (90.9%) en muestras de biopsias de tejido, y valores predictivos negativos altos (que van del 92.4% en muestras de sangre periférica, de 93.4% en médula ósea y hasta el 98.1% en biopsias de tejido). Por su parte, el antígeno urinario mostró una alta especificidad del 96.2% y VPN del 88.9%. Ambas pruebas son fáciles de realizar de forma local en cada centro, sin requerir de equipo sofisticado para su elaboración y obteniendo resultados en poco tiempo.

Sin embargo, la sensibilidad de ambos métodos en general es baja (excepto la PCR Hc100 en biopsias de tejido). La sensibilidad para el antígeno urinario fue del 66.3%, y para la PCR Hc100 en sangre periférica del 65.2% y en médula ósea del 76.7%.

El likelihood ratio positivo más alto fue la del antígeno urinario que mostró que un resultado positivo de esta prueba es 17.6 veces más probable en un paciente con histoplasmosis que en un paciente sin la enfermedad.

Estudios retrospectivos previos han mostrado sensibilidad más alta del antígeno urinario IMMY ALPHA (79.3%) pero con menor especificidad (75.7), incluyendo pacientes con diversos tipos de inmunosupresión y usando como estándar de referencia otro antígeno urinario (MiraVista) y pacientes sanos.

Un estudio realizado en Brasil, en pacientes con VIH, demostraron una sensibilidad del antígeno urinario del 100% y una especificidad del 92.9%, sin embargo usaron pocas muestras (n=8).

Los valores de sensibilidad y especificidad que nosotros encontramos son mayores a los encontrados en un estudio realizado por los investigadores de MiraVista (sensibilidad del 44% y especificidad del 84%), donde usaron 50 muestras positivas, 25 muestras de voluntarios sanos y 25 muestras de pacientes en los que se descartó la enfermedad, pero usando como estándar de referencia su propio antígeno (MiraVista).

Si bien ya existe disponible una nueva generación de antígeno urinario IMMY (IMMY *H. capsulatum* GM EIA), ésta recién salió al mercado y no cuenta con la aprobación de la FDA aún, por lo que decidimos trabajar con el único método diagnóstico que si cuenta con la aprobación de la FDA y está disponible de forma comercial, ya que es más probable que pueda ser adaptado en otros centros que así lo requieran.

Considero que los resultados obtenidos en este estudio son difíciles de comparar con lo publicado previamente, debido al diseño de nuestro proyecto. Hasta donde sabemos, es el primer estudio realizado de forma prospectiva, en población específica de pacientes viviendo con VIH/SIDA, en el que se cuenta con la información clínica y demográfica relevante de los pacientes, realizado en México de manera multicéntrica y con un número alto de pacientes ingresados al protocolo. Además, participaron médicos infectólogos quienes estuvieron a cargo de los pacientes en cada centro, tratando de semejar las situaciones cotidianas y reales a las que se enfrentan los médicos responsables de la atención de estos pacientes.

Creemos que la sensibilidad más baja en este estudio en comparación con estudios previos, se debe, principalmente al kit comercial en sí mismo y a que comparamos con el estándar de referencia (cultivo y/o patología). Otros factores pudieron haber contribuido, como son la gran diversidad de cepas de *H. capsulatum* en nuestra región, como fue demostrado en un estudio previo, donde la prueba de MiraVista falló en identificar la enfermedad durante un brote de histoplasmosis ocasionado por el clado A de América Latina. Sin embargo, no contamos con estudios en México que analicen esta posible variabilidad en los clados existentes.

Por otro lado, al comparar las características clínicas de los pacientes con resultados del antígeno urinario como falsos negativos con los verdaderos positivos, encontramos que los primeros tenían una cuenta más alta de CD4, menor nivel de transaminasas y DHL; lo que pudiera estar en relación a la presencia de carga fúngica más baja y por lo tanto menos invasión fúngica hacia los tejidos. Más aún, estos pacientes más frecuentemente tuvieron otras infecciones fúngicas oportunistas lo cual pudo haber interferido con el desempeño de la prueba.

En este estudio encontramos una alta prevalencia de histoplasmosis probada 26%, usando la definición de “sospecha de HDP” y una búsqueda exhaustiva por medio de estudios de laboratorio y gabinete, lo que se ve reflejado en los valores predictivos altos. Esto debe tomarse en cuenta, ya que los resultados pueden ser variables en otras poblaciones, dependiendo de la prevalencia de la enfermedad en cada sitio en específico y el índice de sospecha de cada médico que solicite la prueba.

Al analizar las técnicas que usamos como estándar de referencia, resultó que el cultivo de médula ósea y las biopsias de hueso mostraron la sensibilidad más alta para el diagnóstico, coincidiendo con lo reportado en la literatura. Estas pruebas son de gran valor tanto para establecer el diagnóstico de HDP como el de otras infecciones oportunistas en el diagnóstico diferencial (MAC o tuberculosis diseminada).

A pesar de contar con los recursos para tratar de establecer un diagnóstico etiológico, la mortalidad aún continúa siendo alta en esta población (mortalidad global del 31.7%; en pacientes con diagnóstico de histoplasmosis probable 54.5% y de HDP del 44%). En mi opinión, asociado principalmente a que los pacientes acuden de manera tardía en búsqueda de atención médica y son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad de VIH/SIDA. Además, llamó la atención la alta mortalidad asociada a infección diseminada por *Cryptococcus neoformans*. Sin

embargo, considero que en términos generales, el protocolo logró apoyar a un gran número de pacientes para que se pudiera establecer un diagnóstico oportuno y se iniciara de forma temprana el tratamiento, logrando probablemente mejorar el pronóstico de los pacientes participantes.

Dentro de las fortalezas del estudio, se encuentra el hecho que nos enfocamos en una población de inmunosuprimidos en particular ya que la mayoría de los estudios previos mezclan diferentes poblaciones. Además, nuestros casos de histoplasmosis fueron todos catalogados como enfermedad diseminada, ya que estudios previos han incluido pacientes con enfermedad pulmonar donde la sensibilidad tanto de la PCR como del antígeno pueden verse disminuida. Como tercer punto, la alta especificidad del antígeno urinario y los valores predictivos negativos de las PCR son la información más valiosa, pues a diferencia de otros estudios previos, estos valores se calcularon con base en pacientes negativos para HDP en lugar de controles sanos.

Finalmente, considero que el poder combinar ambas pruebas (tanto la PCR como el antígeno urinario) valiéndonos de la buena sensibilidad de la primera y la excelente especificidad de la segunda pudieran lograr ser una buena combinación como parte del abordaje diagnóstico en estos pacientes. Al respecto, se podría solicitar una muestra de sangre periférica para PCR Hc100 y una muestra de orina para antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA, la toma de la muestra de orina no representa riesgo y la de sangre es poco invasiva, además no se requiere de equipo sofisticado y se podrían obtener los resultados en unas horas.

Entre las limitaciones de nuestro estudio se encuentran el hecho de que no controlamos la ingesta de alimentos que producen coloración en la orina, cremas vaginales, cafeína, ácido ascórbico, paracetamol o ácido acetilsalicílico, los cuales pudieran interferir en el desempeño del antígeno urinario IMMY ALPHA *Histoplasma* EIA.

Como perspectiva, se realizará confirmación de todos los casos positivos para HDP detectados por cultivo mediante el análisis de secuencia para descartar la posible confusión con *Sepedonium* spp. y *Chrysosporium* spp., sin embargo, cabe mencionar que estos hongos no son endémicos en nuestro país.

X. CONCLUSIONES.

La PCR Hc100 y el antígeno *Histoplasma* IMMY ALPHA son pruebas útiles para el diagnóstico de HDP, sobre todo en pacientes en los que se tiene alta sospecha clínica y se encuentran en zonas endémicas de *H. capsulatum*, lo cual podría acelerar el diagnóstico y tratamiento tempranos en pacientes críticamente enfermos, mejorando así su pronóstico. Por otro lado, el tener resultados negativos en ambas pruebas sugiere fuertemente que se consideren otros diagnósticos diferenciales en la población con VIH como son las infecciones diseminadas por micobacterias (MTB y *M. tuberculosis*).

Es importante mencionar que estas pruebas deben de utilizarse como auxiliares en el diagnóstico y no sustituyen al cultivo y/o análisis histopatológico.

Finalmente, pero no menos importante, me gustaría señalar el valor agregado de este trabajo que permitió establecer una red de colaboración entre 10 hospitales de referencia a nivel nacional, a cargo de médicos infectólogos entrenados en el manejo de los pacientes con VIH, siguiendo todos una misma metodología y permitiendo que hospitales remotos con recursos limitados pudieran tener los medios para establecer diagnósticos de gran relevancia para el pronóstico de estos pacientes. Desgraciadamente en nuestro país los pacientes que viven con VIH siguen sin ser diagnosticados de manera temprana y continúan acudiendo en búsqueda de atención médica por infecciones oportunistas cuando los cuadros clínicos son ya muy avanzados.

Se espera, que la red de trabajo que se pudo establecer como el “Consortio Mexicano para el Estudio de Infecciones Fúngicas Invasivas” continúe realizando proyectos de colaboración que permitan aumentar el conocimiento de estas enfermedades en nuestro país, así como un diagnóstico temprano y acceso a tratamiento oportuno para mejorar el pronóstico de nuestros pacientes.

XI. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIÓN

RESEARCH ARTICLE

Diagnostic accuracy cohort study and clinical value of the Histoplasma urine antigen (ALPHA Histoplasma EIA) for disseminated histoplasmosis among HIV infected patients: A multicenter study

Pedro Torres-González¹, María Dolores Niembro-Ortega¹, Areli Martínez-Gamboa¹, Víctor Hugo Ahumada-Topete², Jaime Andrade-Villanueva³, Javier Araujo-Meléndez⁴, Alberto Chaparro-Sánchez⁵, Brenda Crabtree-Ramírez¹, Sofia Cruz-Martínez⁶, Armando Gamboa-Domínguez⁷, Oscar I. Flores-Barrientos⁸, Jesús Enrique Gaytán-Martínez⁵, Luz Alicia González-Hernández⁹, Christian Hernández-León⁹, Víctor Hugo Lozano-Fernández², Marisol Manríquez-Reyes¹⁰, Martín Magaña-Aquino⁴, Pedro Martínez-Ayala³, Juan Pablo Ramírez-Hinojosa¹¹, Andrea Rangel-Cordero¹, Norma Erendira Rivera-Martínez⁶, Edgardo Reyes-Gutiérrez⁷, Gustavo Reyes-Terán², Patricia Rodríguez-Zulueta¹¹, Jesús Ruíz-Quiñones⁸, Janeth Santiago-Cruz¹, Nancy Guadalupe Velázquez-Zavala¹, José Sifuentes-Osornio¹², Alfredo Ponce de León^{1*}



OPEN ACCESS

Citation: Torres-González P, Niembro-Ortega MD, Martínez-Gamboa A, Ahumada-Topete VH, Andrade-Villanueva J, Araujo-Meléndez J, et al. (2018) Diagnostic accuracy cohort study and clinical value of the Histoplasma urine antigen (ALPHA Histoplasma EIA) for disseminated histoplasmosis among HIV infected patients: A multicenter study. *PLoS Negl Trop Dis* 12(11): e0006872. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006872>

Editor: Angel Gonzalez, Universidad de Antioquia, COLOMBIA

Received: April 4, 2018

Accepted: September 25, 2018

Published: November 5, 2018

Copyright: © 2018 Torres-González et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All database will be available in figshare repository <https://figshare.com/s/c8afeb35b58831699692>.

Funding: This work was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) [FOSISS 2015-1 261482]. The funder had no role in study design, data collection and analysis,

1 Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, Mexico, **2** Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Tlalpan, Mexico City, Mexico, **3** HIV Unit, Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, Guadalajara, Jalisco, Mexico, **4** Department of Internal Medicine, Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico, **5** Adult Infectious Diseases Department, Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del Seguro Social, Atzacapotzalco, Mexico City, Mexico, **6** Department of Infectious Diseases, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca, HRAEO, San Bartolo Coyotepec, Oaxaca, Mexico, **7** Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, Mexico, **8** Intensive Care Unit, Department of Internal Medicine, Hospital “Dr. Juan Graham Casassus”, Villahermosa, Tabasco, Mexico, **9** Area of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Hospital General de Puebla “Dr. Eduardo Vazquez Navarro”, Puebla, Puebla, Mexico, **10** Department of Internal Medicine, Hospital de Alta Especialidad de Veracruz, Veracruz, Veracruz, Mexico, **11** Infectious Diseases Department, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Tlalpan, Mexico City, Mexico, **12** Department of Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, Mexico

☯ These authors contributed equally to this work.
* alf.poncedeleon@gmail.com

Abstract

Background

The Histoplasma urine antigen (HUAg) is the preferred method to diagnose progressive disseminated histoplasmosis (PDH) in HIV patients. In 2007, IMMY ALPHA Histoplasma EIA was approved for clinical for on-site use, and therefore useful for regions outside the United States. However, ALPHA-HUAg is considered inferior to the MVista-HUAg which is only available on referral. We aim to evaluate the diagnostic accuracy of ALPHA-HUAg.

decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Methodology/Principal findings

We conducted a multicenter, prospective, diagnostic test study in two secondary and eight tertiary-care facilities in Mexico. We included HIV patient with PDH suspicion and evaluated ALPHA-HUAg diagnostic accuracy using as reference standard the *Histoplasma capsulatum* growth on blood, bone marrow, and tissue cultures or compatible histopathologic exam (PDH-proven). We evaluated the results of 288 patients, 29.5% (85/288; 95% confidence interval [CI], 24.3–35.1) had PDH. The sensitivity of ALPHA-HUAg was 67.1% (95% CI, 56–76.8%) and the specificity was 97.5% (95% CI, 94.3%–99.1%). The positive likelihood ratio was 27.2 (95% CI; 11.6–74.4). In 10.5% of the PDH-proven patients, a co-existing opportunistic infection was diagnosed, mostly disseminated *Mycobacterium avium* complex infection.

Conclusions/Significance

We observed a high specificity but low sensitivity of IMMY-HUAg. The test may be useful to start early antifungals, but a culture-based approach is necessary since co-infections are frequent and a negative IMMY-HUAg result does not rule out PDH.

Author summary

Histoplasmosis is an endemic mycosis in many regions of Latin America. In the HIV population it manifests as progressive disseminated histoplasmosis (PDH), an entity hard to diagnose since the causative fungi—*Histoplasma capsulatum*—is slow growing and requires advance biosafety for its handling. As an alternative, the diagnosis can be made by detecting the histoplasma urinary antigen, but only one kit is commercially available outside the US. We evaluated this kit (IMMY ALPHA Histoplasma EIA) among HIV patients with suspected and found a high specificity but low sensitivity (i.e., a positive histoplasma urine antigen is almost unequivocal, but a negative result does not rule out the PDH). However, we believe the test is useful since the positive likelihood rates show that a patient with PDH is 27 times more likely to have an IMMY-HUAg positive result; this may allow early targeted treatment.

Introduction

Histoplasmosis is a mycosis endemic to many parts of Latin America, including Mexico. [1] The clinical presentation varies depending on the host's immune status; for HIV-infected patients in advanced stages of the disease, it usually presents as progressive disseminated histoplasmosis (PDH), and it is fatal unless timely diagnosed and treated.[2] The standard of reference for PDH diagnosis is the isolation of *Histoplasma capsulatum* from a non-respiratory sample—typically bone marrow or peripheral blood—or the visualization of yeast-like structures in the histopathologic examination.[3] Unfortunately, *H. capsulatum* is a slow-growing fungus, and cultures may require up to six weeks of incubation.[4] Moreover, the handling of *H. capsulatum* isolates requires advanced biosafety facilities which are scarce in Latin America. [5] Because of this, and the absence of reliable and simple methods to establish the diagnosis, some have advocated that histoplasmosis is underreported in Latin America and since, a

neglected disease. [6] In the United States, histoplasmosis is also endemic, and its PDH presentation is commonly diagnosed by the detection of Histoplasma urine antigen (HUAg). This test, introduced in the late 80's was performed, until recently, by a single central laboratory (MiraVista Diagnostics).[7] In 2007, a new HUAg detection kit was released approved by the Food and Drug Administration (FDA) for clinical use and commercialized for on-site use (IMMY ALPHA Histoplasma EIA Test Kit, IMMY, Inc.). [8] Nevertheless, the diagnostic accuracy of ALPHA-HUAg is considered inferior to the centralized test (MiraVista Urine Antigen test).[9] However, multicenter comparisons of these tests against fungal cultures and histopathology are lacking. For regions outside the United States, an on-site HUAg test is preferred for logistics, costs and turn-around time of results. Therefore, we decided to prospectively and independently evaluate the diagnostic accuracy of ALPHA-HUAg for the PDH diagnosis among HIV-infected patients.

Methods

Patients and settings

We conducted a multicenter, prospective, diagnostic test study in two secondary and eight tertiary-care facilities from seven states of Mexico. From December 2015 to October 2017, patients older than 18 years with previous HIV diagnosis—or confirmation of diagnosis during the hospital stay—and suspicion of PDH were identified by the study's physicians—all of them Infectious Diseases specialists experienced in the management of HIV-infected patients—from each center, and hospitalized for study. Suspected PDH was defined as the presence of at least three of the following clinical signs and symptoms: fever, unintentional weight loss (>5% usual body weight over 6–12 months), diarrhea, peripheral lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly and skin lesions, mucosal lesions and at least one laboratory abnormality. We defined laboratory abnormalities as the presence of elevated aspartate aminotransferase (AST) (2-fold the upper limit), lactic dehydrogenase (2-fold the upper limit), elevated ferritin, bicytopenia or pancytopenia. For inclusion, at least a blood or a bone marrow culture in media supporting *H. capsulatum* growth (Bactec Myco F/ Lytic) and 20 ml of urine were required; according to the on-site physician's criteria, additional tissue samples from diverse anatomical sites were obtained for culture and histopathology. Demographic and clinical data—history of other opportunistic infections (OI), HIV diagnosis date, antiretroviral drug treatment, CD4+ lymphocytes count and plasma HIV RNA—, were collected in a case report form and sent along the biological samples to the study's central laboratory in Mexico City. Preliminary and definitive results were informed to the on-site physician as soon as possible. We defined proven PDH cases as the growth *H. capsulatum* or the observation of yeast cells intracellularly or extracellular and massive macrophage infiltration and scattered lymphocytes by Grocott's methamine and Periodic acid-Schiff stains during the histopathology exam, in any sample besides the lungs. In accordance with the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group definitions, [10] we classified as PDH-negative cases as the absence of *H. capsulatum* growth in cultures or the absence of yeast-like structures in the histopathology exam regardless of whether other OI or AIDS-defining malignancies were diagnosed. Since we are testing HUAg, cases with a positive test in absence proven PDH were considered as false positives—instead of possible PDH—and cases with a negative result of HUAg in the presence of proven PDH, as false negatives. Simultaneous diagnosis of HIV and PDH was considered whenever both infections were diagnosed within the same month.

Microbiologic methods

Every center was provided with the materials for samples collection, and these were shipped to the study's central laboratory for processing. At least 5 mL of peripheral blood were inoculated in a BD BACTEC Myco F/ Lytic (Becton Dickinson, and Company, Franklin Lakes New Jersey, USA) vial; for bone marrow aspirates, a similar amount (5 mL) was inoculated in a Bactec Myco F/ Lytic and a Bactec Peds Plus F (Becton Dickinson, and Company) (3 ml), and 1 ml in a Löwenstein-Jensen and Sabouraud solid media. Biopsies for culture were transported in Stuart media and for histopathological analysis, in 10% formaldehyde. Bactec Peds Plus F and Bactec Myco F/Lytic vials were incubated in the semi-automated FX apparatus (Becton Dickinson, and Company, Franklin Lakes New Jersey, USA) for seven and 42 days, respectively. If determined positive by the apparatus, vials were retrieved for Ziehl-Neelsen and Gram staining and sub-cultured in MGIT liquid media (Becton Dickinson, and Company), Sabouraud solid media and blood sheep agar. Biopsies for culture were macerated, suspended in saline solution 0.9% and distributed in four vials (Bactec Aerobic/F, Bactec Anaerobic/F, Bactec Peds Plus/F and Bactec Myco F/Lytic) and incubated for seven, 21, 30 and 42 days respectively. All isolates were fully characterized by conventional methods and in mycobacterial species using DNA probes (HAIN Lifescience GmbH, Nehren, GER). The *H. capsulatum* isolates were identified by colony morphology at 25–30°C: white to brown or pinkish with fine, dense cottony texture and microscopically: the presence of large thick-walled, round macroconidia (7 to 15 μm in diameter) with tuberculate, knobby or short cylindrical projections. The central laboratory of this study is accredited by the College of American Pathology for bacterial, fungal and mycobacterial identification. Urine samples—collected upon inclusion to the study by any method and at time of the day—were transported at 4°C and upon arrival to the central laboratory, frozen at -20°C and processed for HUAg in batches every two weeks. The HUAg was performed using the IMMY ALPHA Histoplasma EIA test kit (IMMY, Inc. Norman OK)—currently, the only Food Drugs Administration approved kit for on-site use—following the manufacturer's instructions. These kits were purchased from the manufacturer. Laboratory technicians responsible for the HUAg reading and culture processing were blinded to the result of the rest of the samples. The pathologists in charge of the histopathologic examination were also blinded to the microbiology results and the HUAg. Incident HIV cases were diagnosed using the kit ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo (Abbot, Wiesbaden, Germany).

Statistical analysis

We described and compared the patient's characteristics and clinical variables between PDH-proven patients, PDH-negative patients and the characteristics of the patients with HUAg false negative results. We used median and interquartile range (IQR) for continuous variables and frequencies and percentages for categorical variables and Mann-Whitney U and Pearson's χ^2 or Fisher's exact test as statistical tests accordingly. A p -value ≤ 0.05 was determined as significant. We calculated sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and positive likelihood ratio and their 95% confidence intervals (95% CI) of HUAg using as a standard of reference the cases classified as PDH-proven. We used the STATA 11.0 software (StataCorp LLC, College Station, TX) to perform the statistical analysis.

Ethical considerations

This protocol was reviewed and approved by the Institutional Review Board of the coordinator center (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Comisión Institucional para la Investigación Biomédica en Humanos REF: 1626) and by the institutional review boards in each center. The study was conducted according to the principles expressed

in the Declaration of Helsinki. Physicians collaborating in the study invited patients with suspected PDH to participate and, after explaining the aims of the study, if agreed, patients (or their relatives in the case of mental impairment or critical illness) signed an informed consent form.

Results

During the study period (23 months), 336 potentially eligible patients were assessed in the participant centers, 30 refused to participate in the study and three did not fulfill the inclusion criteria. The remainder 303 patients with suspected PDH signed the informed consent, but 15 were excluded because the urine sample was not available. We finally included 288 cases for this analysis. (Fig 1) From these patients, the central laboratory processed 1,068 samples: 277 blood cultures, 252 bone marrow aspirate cultures, 104 biopsies for tissue culture, 147 biopsies for the histopathologic exam, and 288 urine samples for HUAg detection. (Table 1).

H. capsulatum grew in 20.2% (56/277) of the blood cultures, and in 25.4% (64/252) of the bone marrow aspirate cultures. From 82 patients we acquired at least one tissue culture, and *H. capsulatum* grew in 13.4% (11/82) from at least one sample per patient. From 103 patients, we also processed at least one biopsy for the histopathologic exam, and in 33.9% (35/103) we observed changes consistent with histoplasmosis from at least one sample per patient.

We classified 85/288 (29.5%) patients as PDH-proven, 28.2% (24/85) based on positive histopathologic exam and positive culture, 58.8% (50/85) by positive culture only and 12.9% (11/85) by positive histopathologic exam only.

Clinical characteristics of proven and negative progressive disseminated histoplasmosis patients

The PDH-proven patients, were significantly younger and more frequently received more than 72 hrs of antifungal treatment before obtaining samples for the study in comparison with PDH-negative patients. They also presented a significantly larger proportion of weight loss, skin lesions, anemia, leukopenia, and thrombocytopenia while PDH-negative patients presented more frequently with peripheral lymphadenopathy. The median levels of total bilirubin, aspartate transaminase, lactic dehydrogenase, and ferritin were significantly higher among patients with proven PDH. Ten percent (9/85) of the proven PDH patients, were diagnosed with at least an additional OI or AIDS-defining malignancy, more frequently disseminated *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection and Kaposi Sarcoma. Among the PDH-negative patients, we identified the presence of OI or AIDS-defining malignancy in 28% (57/203) of the cases, more frequently disseminated MAC infection and *M. tuberculosis* complex. (Table 2).

Sensitivity and specificity of Histoplasma urine antigen for the diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis

Twenty-one percent of the patients (62/288) had a positive HUAg. The sensitivity of HUAg for the diagnosis of proven PDH was 67.1% (95% CI, 56%-76.8%) and the specificity 97.5% (95% CI, 94.3%-99.1%). The positive likelihood ratio was 27.2 (95% CI; 11.6-74.4), and the negative likelihood ratio was 0.33 (95% CI; 0.29-0.41). The sensitivity of HUAg for the diagnosis of culture-proven PDH was 73.9% (95% CI, 62.3%-83.5%) and the specificity 96% (95% CI, 92.8%-98.3%). The positive likelihood ratio was 19.8 (95% CI; 10.3-41.5) and the negative likelihood ratio of 0.27 (0.21-0.36). (Table 3). The sensitivity was 69.1% (95% CI; 64.1-69.1) for blood

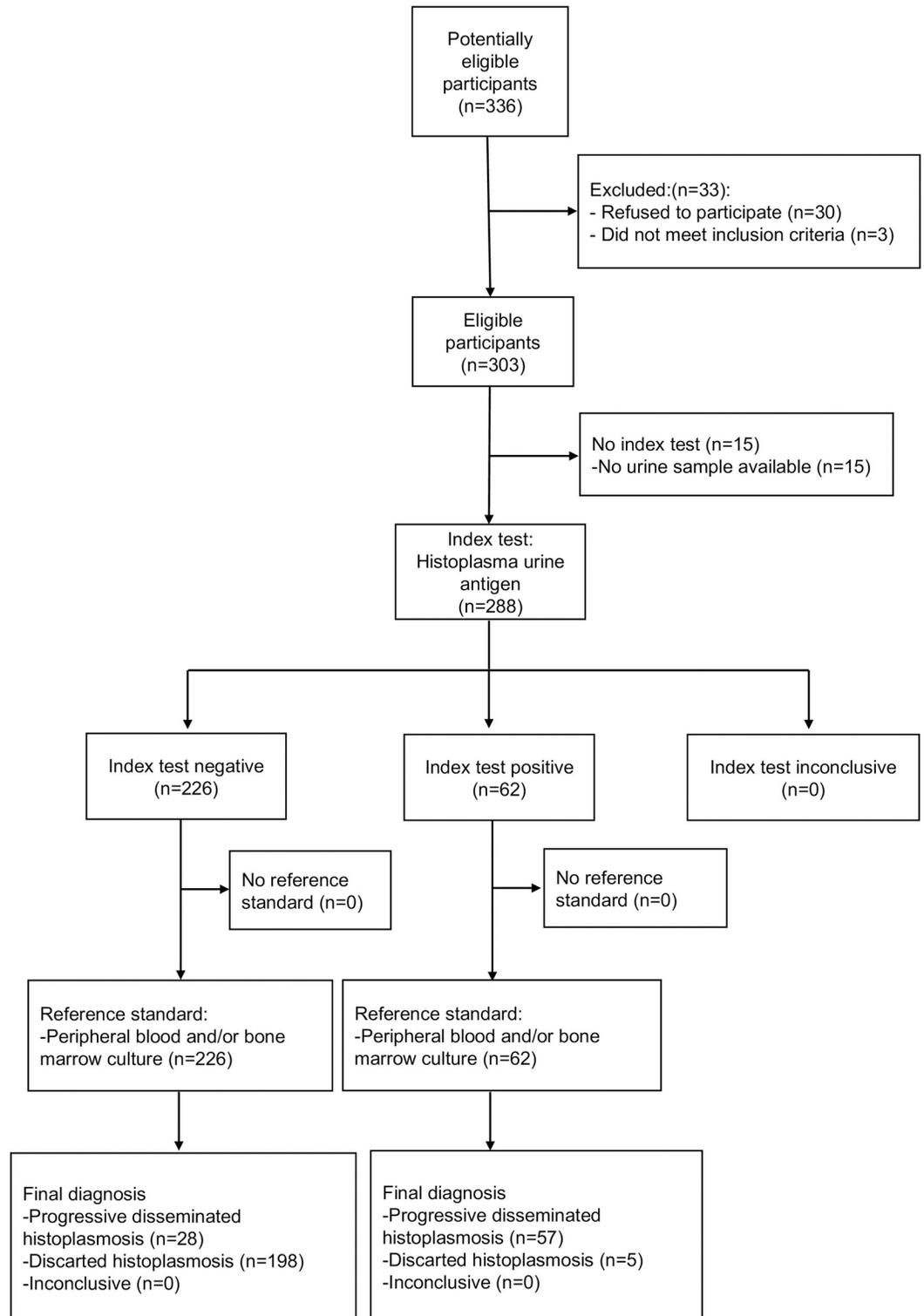


Fig 1. Study flowchart.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006872.g001>

Table 1. Microbiological and histopathological positivity for *Histoplasma capsulatum* of the samples processed from 288 patients with progressive disseminated histoplasmosis suspicion.

Anatomical site	<i>H. capsulatum</i> positive cultures	Histopathology positive for histoplasmosis
	No./N (%)	No./N (%)
Blood	56/277 (20.2)	-
Bone marrow aspirate	64/252 (25.4)	-
Skin and soft tissues	5/23 (22.7)	11/30 (36.6)
Gastrointestinal tract	0/20 (0)	1/30 (3.3)
Bone/bone marrow biopsy	1/21 (4.7)	17/50 (34)
Lymph nodes	5/21 (23.8)	5/16 (31.2)
Liver or spleen	0/10 (0)	0/10 (0)
Lung	1/6 (16.6)	2/8 (25)
Central nervous system	0/3 (0)	0/3 (0)
Total	132/633(20.8)	36/147 (24.4)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006872.t001>

cultures; 82.1% (95% CI; 77.1–82.1) for bone marrow cultures and 72.9% (95% CI; 65.3–72.9) for the histopathological exam, in comparison with our standard of reference.

Clinical characteristics of proven progressive disseminated histoplasmosis cases with a *Histoplasma* urine antigen false negative result

Thirty-three percent (28/85) of the patients with proven PDH presented a false negative HUAg result. Among these, 21.4% (6/28) were diagnosed by culture and histopathology, 46.4% (13/28) by culture only, and 32.1% (9/28) by histopathology only. These patients were similar in age, the frequency of presenting symptoms, plasma HIV RNA, antiretroviral treatment, time since HIV diagnosis, and exposure to antifungal before obtaining the samples, but had a significantly higher median of CD4+ lymphocytes count and lower median of alanine transaminase, aspartate transaminase, and lactic dehydrogenase. Patients with a false negative result of HUAg also presented more frequently with an additional OI or AIDS-defining malignancy besides PDH. (Table 4).

Clinical characteristics of cases with progressive disseminated histoplasmosis– negative patients with *Histoplasma* urinary antigen false positive results

The HUAg was positive in 5/203 (2.4%) of the PDH–negative patients; one of them was diagnosed with HIV simultaneously, and four had ART at the time of enrollment. All patients had blood and bone marrow cultures available. Three of these cases had radiographic pulmonary involvement. In only one case, the antifungal treatment was started ≥ 72 before obtaining the samples. Three patients had an alternative diagnosis: one was diagnosed with disseminated tuberculosis and two with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. Two patients remained without a diagnosis, one received empirical antifungals and survived, and the other died hours after enrollment. (Table 5).

Discussion

The results from this prospective multicenter and independent study evaluating the performance of the ALPHA-HUAg test in an endemic region for *H. capsulatum*, show that the test has a very high specificity (97%), it is easy to perform on-site without the need of sophisticated laboratory equipment and therefore faster than other methods. However, it lacks overall

Table 2. Clinical characteristics of 85 proven progressive disseminated histoplasmosis patients among 288 suspected cases.

Characteristic	PDH-proven, No./N (%)	PDH-negative, No./N (%)	p-value
	n = 85	n = 203	
Demographics and HIV evolution			
Age; median (IQR)	33 (27–38)	36 (29–44)	0.031 ^b
Gender (male)	68/85 (80)	176/203 (86.7)	0.149
Simultaneous HIV diagnosis	40/85 (47)	100/203 (49.2)	0.733
Months since HIV diagnosis ^a , median (IQR)	25.5 (5.2–75.8)	47 (8–110)	0.125 ^b
Previous OI and HIV-treatment			
Previous tuberculosis	8/85 (9.4)	31/203 (15.2)	0.185
Previous disseminated MAC	2/85 (2.3)	6/203 (2.9)	0.776
Previous disseminated histoplasmosis	4/85 (4.7)	5/203 (2.4)	0.318
CD4+ lymphocytes (cells/mm ³); median (IQR)	30 (9–62)	41.5 (14–86)	0.084 ^b
Plasma HIV RNA (copies/mm ³); median (IQR)	141,607 (38,669–474,905)	238,834 (31,237–808,567)	0.327
ART naïve	50/85 (58.8)	110/203 (54.1)	0.470
2 NRTI + 1 NNRTI	21/35 (60)	49/93 (52.6)	0.459
2 NRTI + 1IP/r	8/35 (22.8)	26/93 (27.9)	0.560
Other ART	6/35 (17.1)	18/93 (19.3)	0.775
Empirical antifungal ≥ 72 hrs. previous to samples	20/85 (23.5)	28/203 (13.7)	0.043 ^b
Initial admission to critical care	4/83 (4.8)	7/196 (3.5)	0.624
Symptoms			
Fever	81/85 (95.2)	180/203 (88.6)	0.079
Weight loss	80/85 (94.1)	172/203 (84.7)	0.028
Diarrhea	47/85 (55.2)	90/203 (44.3)	0.089
Peripheral lymphadenopathy	41/85 (48.2)	130/203 (64)	0.013
Hepatomegaly	55/85 (64.7)	123/203 (60.5)	0.512
Splenomegaly	40/85 (47)	93/203 (45.8)	0.847
Mucosal lesion	10/85 (11.7)	35/203 (17.2)	0.243
Skin or soft tissue lesion	28/85 (32.9)	40/203 (19.7)	0.016
Laboratory abnormalities			
Anemia	61/85 (71.7)	119/203 (58.6)	0.036
Leukopenia	50/85 (58.8)	87/203 (42.8)	0.013
Thrombocytopenia	46/85 (54.1)	73/203 (35.9)	0.004
Total bilirubin (mg/dL); median (IQR)	0.7 (0.5–1.5)	0.6 (0.4–1.1)	0.033 ^b
Alanine transaminase (UI/L); median (IQR)	42 (26–70)	37 (20–58)	0.084 ^b
Aspartate transaminase (UI/L); median (IQR)	102 (57–258)	47 (28–98)	<0.001 ^b
Lactic dehydrogenase (UI/L); median (IQR)	985.5 (562.5–2,042.5)	300.5 (193–551)	<0.001 ^b
Ferritin (ng/mL), media (IQR)	1,948.5 (1,367.8–10,203.8)	788.1 (432–2084.3)	0.045 ^b
Radiographic Pulmonary Involvement	63/85 (74.1)	141/203 (69.4)	0.427
Other opportunistic infection/neoplasia diagnosed			
Disseminated MAC	4/85 (4.7)	24/203 (11.8)	–
Disseminated tuberculosis	0/75 (0)	20/203 (9.8)	–
Disseminated <i>Cryptococcus neoformans</i>	1/85 (1.1)	3/203 (1.4)	–
Kaposi Sarcoma	2/85 (2.3)	9/203 (4.4)	–
HIV lymphadenopathy	0/85 (0)	2/203 (0.9)	–
Lymphoma	1/85 (1.1)	6/203 (2.9)	–
Disseminated Citomegalovirus	1/85 (1.1)	4/203 (1.9)	–

(Continued)

Table 2. (Continued)

Characteristic	PDH-proven, No./N (%)	PDH-negative, No./N (%)	p-value
	n = 85	n = 203	
Extraintestinal <i>Salmonella</i> spp infection	1/85 (1.1)	2/203 (0.9)	–

Abbreviation: PDH, progressive disseminated histoplasmosis; IQR, Interquartile Range; MAC, *Mycobacterium avium* complex; ART, Antiretroviral therapy; NRTI, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NNRTI, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; PI/r, Protease Inhibitor/ritonavir. If not otherwise indicated X² test was applied.

^{a)} Excluding simultaneous HIV/disseminated histoplasmosis diagnosis;

^{b)} Mann-Whitney U-test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006872.t002>

sensitivity (67%) when compared to the centralized latter generations of HUAg. [5] However, likelihood ratios obtained from our data show that HIV patients with and PDH are 27 times more likely to present a positive ALPHA-HUAg.

A higher sensitivity (79.3%) but lower specificity (75.7%) for ALPHA-HUAg was reported in a retrospective study including a mixed immunosuppressed population and used as a standard of reference urine samples deemed as positive by MiraVista-HUAg test and healthy controls. [9] Another study in Brazil reported a sensitivity of 100% and a specificity of 92.9% for ALPHA-HUAg in 8/78 proven PDH cases among AIDS patients.[11] The sensitivity and specificity of the ALPHA-HUAg found in this study are higher than in a previous report (sensitivity 22.7% and specificity 30%) from a subset of patients with culture-proven or positive histopathology cases of histoplasmosis and healthy controls.[12, 13] We also found a higher sensitivity and specificity of ALPHA-HUAg than in a study performed by MiraVista (sensitivity 44% and specificity 84%) using 50 positive urine samples with their assay, 25 urines from healthy volunteers and 25 from patients with discarded histoplasmosis as a standard of reference.[12] Another study, using a more recent kit from IMMY (IMMY *H. capsulatum* GM EIA), commercially available but to our knowledge not FDA approved, used as standard of reference urines determined as positive by MiraVista-HUAg and reported a similar sensitivity and specificity (64.5% and 99.8%) to the present study and also reported an improvement of the sensitivity (80.7%) by lowering the diagnostic cut-off. [14, 15] We acknowledge that by using the IMMY *H. capsulatum* GM EIA we could have observed a higher sensitivity of the HUAg, but we chose to test ALPHA Histoplasma EIA since it is FDA-approved and therefore likely to be approved in our and other regions.

Table 3. Diagnostic accuracy of Histoplasma urine antigen among proven and culture-proven cases of progressive disseminated histoplasmosis.

Histoplasma Urine Antigen	Proven PDH			Culture-proven PDH		
	Positive, No. (%)	Negative, No. (%)	Total, No. (%)	Positive, No. (%)	Negative, No. (%)	Total No. (%)
Positive	57 (19.8)	5 (1.7)	62 (21.5)	54 (18.8)	8 (2.8)	62 (21.5)
Negative	28 (9.7)	198 (68.8)	226 (78.5)	19 (6.6)	207 (71.9)	226 (78.5)
Total	85 (29.5)	203 (70.5)	288 (100)	73 (25.3)	215 (74.7)	288 (100)
Sensitivity % (95% CI)	67.1 (56–76.8)			73.9 (62.3–83.5)		
Specificity % (95% CI)	97.5 (94.3–99.1)			96 (92.8–98.3)		
Positive predictive value % (95% CI)	91.9 (82.1–97.3)			87.1 (76.1–94.2)		
Negative predictive value % (95% CI)	87.6 (82.5–91.6)			91.6 (87.1–94.8)		
Positive likelihood ratio (95% CI)	27.2 (11.6–74.4)			19.8 (10.3–41.5)		
Negative likelihood ratio (95% CI)	0.33 (0.29–0.41)			0.27 (0.21–0.36)		

Abbreviation: PDH, progressive disseminated histoplasmosis, CI, confidence interval

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006872.t003>

Table 4. Comparison of clinical characteristics of proven progressive disseminated histoplasmosis with false negative results of Histoplasma urine antigen in HIV patients.

Characteristic	False negative, HUAg No./N (%)	True positive HUAg, No./N (%)	p-value
	n = 28	n = 57	
Demographics and HIV evolution			
Age; median (IQR)	31.5 (26–36.5)	34 (28–39)	0.199 ^b
Gender (male)	24/28 (85.7)	44/57 (77.1)	0.356
Simultaneous HIV diagnosis	10/28 (35.7)	30/57 (52.6)	0.142
Months since HIV diagnosis ^a ; median (IQR)	18.1 (5.6–70.7)	28.1 (5.1–102.7)	0.622 ^b
Previous OI and HIV-treatment			
Previous tuberculosis	4/28 (14.2)	4/57 (7)	0.281
Previous disseminated MAC	1/28 (3.5)	1/57 (1.7)	0.603
Previous disseminated histoplasmosis	1/28 (3.5)	3/57 (5.2)	0.729
CD4 count (cells/mm ³); median (IQR)	71 (24–120.5)	19 (7–34)	<0.001 ^b
Plasma HIV RNA (copies/mm ³); median (IQR)	101,821 (2266.5–731,393)	159,000 (61,600–409,000)	0.199 ^b
ART naïve	13/28 (46.4)	37/57 (64.9)	0.104
2 NRTI +1 NNRTI	8/15 (53.3)	13/20 (65)	0.486
2 NRTI + 1PI/r	3/15 (20)	5/20 (25)	0.527 ^c
Other ART	4/15 (26.6)	2/20 (10)	0.367 ^c
Empirical antifungal ≥ 72 hrs. before samples	7/28 (25)	13/57 (22.8)	0.823
Initial admission to critical care	2/27 (7.4)	2/56 (3.5)	0.445
Symptoms			
Fever	27/28 (96.4)	54/57 (94.7)	0.729
Weight loss	28/28 (100)	52/57 (91.2)	0.106
Diarrhea	17/28 (60.7)	30/57 (52.6)	0.481
Peripheral lymphadenopathy	14/28 (50)	27/57 (47.3)	0.819
Hepatomegaly	20/28 (71.4)	35/57 (61.4)	0.363
Splenomegaly	14/28 (50)	26/57 (45.6)	0.703
Mucosal lesion	3/28 (10.7)	7/57 (12.2)	0.833
Skin or soft tissue lesion	9/28 (32.1)	19/57 (33.3)	0.913
Laboratory abnormalities			
Anemia	20/28 (71.4)	41/57 (71.9)	0.962
Leukopenia	18/28 (64.2)	32/57 (56.1)	0.473
Thrombocytopenia	14/28 (50)	32/57 (56.1)	0.593
Total bilirubin (mg/dL), median (IQR)	0.8 (0.5–1.5)	0.7 (0.4–1.8)	0.643 ^b
Alanine transaminase (UI/L), median (IQR)	33 (19–47)	46.5 (29–81)	0.024 ^b
Aspartate transaminase UI/L, median (IQR)	67.5 (50–129)	152.5 (70–318)	0.008 ^b
Lactic dehydrogenase (UI/L), median (IQR)	706 (325–1,249)	1,465 (742–2,894)	0.001 ^b
Ferritin (ng/mL), median (IQR)	1,837.1 (976.7–2,060)	5,407.6 (1,759–15,000)	0.368 ^b
Radiographic Pulmonary Involvement	18/28 (64.2)	45/57 (78.9)	0.147
Other opportunistic infection/neoplasia diagnosed			
Disseminated MAC	2/28 (7.1)	2/57 (3.5)	–
Disseminated <i>Cryptococcus neoformans</i> infection	1/28 (3.5)	0/57 (0)	–
Kaposi Sarcoma	1/28 (3.5)	1/57 (1.7)	–
Lymphoma	1/28 (3.5)	0/57 (0)	–
Disseminated Citomegalovirus	1/28 (3.5)	0/57 (0)	–

(Continued)

Table 4. (Continued)

Characteristic	False negative, HUAg No./N (%)	True positive HUAg, No./N (%)	p-value
	n = 28	n = 57	
Extraintestinal <i>Salmonella</i> spp	1/28 (3.5)	0/57 (0)	–

Abbreviation: HUAg, histoplasma urine antigen; IQR, Interquartile Range; MAC, *Mycobacterium avium* complex; ART, Antiretroviral therapy; NRTI, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NNRTI, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; PI/r, Protease Inhibitor/ritonavir. If not otherwise indicated X² test was applied.

a) Excluding simultaneous HIV/disseminated histoplasmosis diagnosis;

b) Mann-Whitney U-test;

c) Fisher’s exact test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006872.t004>

In comparison with studies using different HUAg kits for the diagnosis of PDH the sensitivity found in ours is lower. Recently a multicenter report showed a sensitivity of 92.4% in 38 AIDS patients with PDH using the latest generation HUAg from MiraVista and a specificity of 99% estimated from healthy subjects and non-fungal infected patient urine samples.[16] The Centers for Disease Control and Prevention in the US developed a urinary antigen assay which was validated in an AIDS population in Colombia encompassing 28/106 patients with culture-

Table 5. Clinical characteristics of patients with discarded progressive disseminated histoplasmosis with a false positive Histoplasma urine antigen.

Age/gender/ Enrollment date	Time since HIV diagnosis/ Relevant medical history	CD4 +(cells/ml)/ Plasma RNA HIV (copies/ml)	Antirretroviral treatment	Symptoms	Radiographic pulmonary involment	Empirical antifungal ≥72 hrs. before samples	Sites sampled for culture	Final diagnosis/ treatment/ evolution
39/Male/ Sept-2016	39 mo./No	266/20	FTC+TDF+EFV	Weight loss, fever, anemia, thrombocytopenia, leukopenia, AST>2x, LDH >2x.	No	Yes	Blood culture (negative); Bone marrow culture (negative)	None/Empirical amphotericin/ survived
28/Male/ Dec-2016	Simultaneous/ No	NA	None	Weight loss, fever, peripheral adenopathy, skin lesions, LDH >2x, AST > 2x	Yes	Yes	Blood culture (<i>Cryptococcus neoformans</i>); Bone marrow culture (<i>C. neoformans</i>)	Disseminated cryptococcosis/ amphotericin and fluconazole/ survived
43/Male/ Oct-2016	193 mo./ Tuberculosis, Pneumocystis;	8/20,300	ABC + 3TC + AZT + ATV/r	Weight loss, fever, diarrhea, hepatomegaly, peripheral adenopathy, bicytopenia, LDH >2x.	Yes	No	Blood culture (negative)+ Bone Marrow culture (negative)	None/Died without a diagnosis
33/Male/ Aug-2017	80 mo./ <i>P. jirovecii</i> suspected	5/212,801	TDF + AZT + LPV/r	Weight loss, cough, diarrhea, fever, peripheral adenopathy, hepatomegaly, splenomegaly, AST >2x, LDH >2x.	Yes (budding tree)	No	Blood culture (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)+ Bone marrow culture (<i>M. tuberculosis</i>)	Disseminated tuberculosis/ antituberculosis drugs /survived
27/male/ Oct -2017	82 mo./No	3/130,474	LPV/r+FTC +TDF+EFV	Diarrhea, weight loss fever, digestive tract bleeding, bicytopenia	Yes (Cavities)	No	Blood culture (<i>C. neoformans</i>) + Bone marrow culture (<i>C. neoformans</i>)	Disseminated cryptococcosis/ amphotericin and fluconazole/ survived

Abbreviation: FTC, emtricitabine; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; AST, aspartate transaminase; LDH, lactic dehydrogenase; ABC, abacavir; 3TC, lamivudine; AZT, zidovudine; ATV/r, atazanavir/ritonavir; LPV/r lopinavir/ritonavir

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006872.t005>

proven histoplasmosis and showed a sensitivity of 84% and a specificity of 94% using samples from healthy volunteers or diagnosed with other infectious diseases. [17]

Irrespective of the HUAg kit used, our results are difficult to compare with previous studies, mainly due to our study design. Aforementioned studies use healthy subject's urine as control, does not specify why the disease was suspected and often mix immunosuppressed population and offer almost none clinical information. However, we believe that the low sensitivity of ALPHA-HUAg found in this study is largely explained by the kit itself, the distinctive study design, and the use of a different standard of reference to estimate the diagnostic accuracy. However, other factors may have contributed as it is the great diversity of the *H. capsulatum* strains in our region, thus the different performance of the test outside North America. [18] This possibility has been previously approached during an outbreak of histoplasmosis due to a Latin America clade A class 6 strain in a colony of fruit bats which tested negative to the MiraVista antigen but further detected experimentally in mice infected by the same strain. [19] The same authors previously confirmed the utility of the MiraVista antigen in patients from Panama infected by the same Latin America clade A class 6 strain. [20] However, the performance of the ALPHA-HUAg is less studied in this region; although the report from Brazil informed 100% sensitivity, no information was provided regarding the infecting strains. [11] Additionally, while comparing the clinical characteristics of patients with IMMY-HUAg false-negative results with those considered true positives, we found a higher CD4 count, lower hepatic transaminases, and lactic dehydrogenase; this may be related to lower fungal burden, and somehow less tissue invasion. On the contrary, IMMY-HUAg false-negative cases, presented more frequently with other OI's or AIDS-related malignancy (6/28, four of them in culture-proven PDH) which may have interfered with the HUAg performance, although not previously reported.

In this study, we found a high prevalence of proven-PDH (29.5%), using our suspected case definition and an extensive clinical and laboratory assessment, this is reflected by high positive predictive values of our test in our study. This should be considered while interpreting the results, since the usefulness of the test may vary depending on the disease prevalence and the suspect index of the physician requesting the test.

We analyzed the individual components of our standard of reference, of note bone marrow, showed a higher sensitivity than the IMMY-HUAg, while blood cultures and histopathological examination were similar. Bone marrow cultures are a valuable sample for the diagnosis of PDH and other resembling diseases (disseminated tuberculosis or disseminated MAC), but unfortunately—although complications are rare, and pain classified as low to moderate—physicians and patients perceive it as a painful, invasive procedure. We may have observed a higher sensitivity because we included many patients with hematological abnormalities, the situation in which is considered more useful.

We consider among the strengths of this study, the fact that we focused on a single immunosuppressed population since most of the studies mix transplant recipients, and immunocompetent patients. Additionally, our cases were mostly PDH since the majority resulted positive from blood and bone marrow cultures, while previous studies included more localized disease as pulmonary affection in which cases the sensitivity of the HUAg diminishes. [16] Additionally, we departed from a clinical definition of suspected PDH cases that reflects the daily clinical reasoning that triggers the diagnostic approach and allowed us to evaluate ALPHA-HUAg in a real-life scenario. Finally, we believe the high specificity of ALPHA-HUAg observed in this study is the most valuable information, since unlike many previous evaluations, were calculated specificity from PDH-negative instead of healthy controls. This challenged the ALPHA-HUAg to differentiate PDH from other resembling OI and even co-infections; these clinical scenarios are very frequent and challenging when treating HIV

patients. In this regard, we consider that majority of five patients with discarded PDH presenting a positive HUAg were indeed false-positives because we found an alternative diagnosis in three of them and directed treatment lead to the clinical resolution. Of note, two of these cases were diagnosed with culture-proven disseminated cryptococcosis. Although cross-reactions with other fungal infections have been reported for the HUAg, *Cryptococcus neoformans* infection is not reported among them. [21] This warrants further study since both OIs are frequent among the HIV patients and targeted antifungal consolidation treatment is needed to avoid treatment failures. [22]

During the diagnostic approach of this study, we found 66 patients with other OIs and AIDS-defining malignancy, in nine instances co-infecting or co-existing patients with proven-PDH. Therefore, it should be advised that although non-culture technics as HUAg are non-invasive and provide faster results, in the HIV population, the culture-based approach and the tissue sampling for the histopathologic examination should not be replaced.

Our study has some limitations: despite an aggressive diagnostic workup, we may have missed some cases due to the biology of the disease and the lack of sensitivity of current fungal cultures. [4] Additionally, we did not perform molecular probe testing as recommended for positive cultures in order to distinguish from *Sepedonium* spp and *Chrysosporium* spp, fungi with similar macroconidia to *H. capsulatum*. [23] However, these saprophytic fungi rarely cause disseminated infection in humans, and most of the reports are from respiratory samples or considered as contaminants. [24, 25] Finally, although suggested as part of the diagnostic approach, we did not perform Histoplasma antibody testing, since it was not readily available, and we expected a low sensitivity in the HIV population. [23] Additionally, we failed to assess the history of food causing coloration of the urine, caffeine intake and the consumption of acetaminophen and acetylsalicylic acid; this is relevant since the manufacturer cites these substances as eliciting an “unknown” effect on the performance of the test. Finally, we did not assess the turnaround time for results, since the ALPHA-HUAg testing was performed in the central laboratory and processed in batches. However, our experience with the on-site use of the test was positive; it was easy to standardize, required only a short technician training and the turnaround result time for an entire batch was about four hours. Thus, we believe it can be performed in most of the second and third level hospitals in Latin America.

In conclusion, ALPHA-HUAg is a useful test for the diagnosis of PDH—in patients with high level of suspicion in endemic regions for *H. capsulatum*—and may favor early targeted-antifungal treatment, thus improving the prognosis of these frail HIV-patients. Nevertheless, the culture-based approach should ensue simultaneously since co-infections are frequent and a negative result of ALPHA-HUAg does not discard PDH in patients from endemic regions for *H. capsulatum*.

Supporting information

S1 Checklist. STARD checklist.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank, Paulette Guadalupe Díaz-Lomeli and the personnel of the Laboratorio Nacional de Máxima Seguridad para el Estudio de la Tuberculosis y Enfermedades Emergentes, CONACYT/Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán for their invaluable help with sample’s processing.

Author Contributions

Conceptualization: Pedro Torres-González, Areli Martínez-Gamboa, Brenda Crabtree-Ramírez, Pedro Martínez-Ayala, José Sifuentes-Osornio, Alfredo Ponce de León.

Data curation: María Dolores Niembro-Ortega, Areli Martínez-Gamboa, Víctor Hugo Ahumada-Topete, Jaime Andrade-Villanueva, Edgardo Reyes-Gutiérrez.

Formal analysis: Pedro Torres-González, María Dolores Niembro-Ortega, Areli Martínez-Gamboa, Patricia Rodríguez-Zulueta.

Funding acquisition: Areli Martínez-Gamboa, Jaime Andrade-Villanueva, Alfredo Ponce de León.

Investigation: Pedro Torres-González, Víctor Hugo Ahumada-Topete, Javier Araujo-Meléndez, Alberto Chaparro-Sánchez, Sofia Cruz-Martínez, Armando Gamboa-Domínguez, Oscar I. Flores-Barrientos, Jesús Enrique Gaytán-Martínez, Luz Alicia González-Hernández, Christian Hernández-León, Víctor Hugo Lozano-Fernandez, Marisol Manríquez-Reyes, Martin Magaña-Aquino, Pedro Martínez-Ayala, Juan Pablo Ramírez-Hinojosa, Andrea Rangel-Cordero, Norma Erendira Rivera-Martínez, Gustavo Reyes-Terán, Jesús Ruíz-Quiñones.

Methodology: Pedro Torres-González, María Dolores Niembro-Ortega, Jaime Andrade-Villanueva, Janeth Santiago-Cruz, Nancy Guadalupe Velázquez-Zavala.

Supervision: Alfredo Ponce de León.

Writing – original draft: Pedro Torres-González, Areli Martínez-Gamboa, Alberto Chaparro-Sánchez, Brenda Crabtree-Ramírez, Sofia Cruz-Martínez, Armando Gamboa-Domínguez, Christian Hernández-León, Pedro Martínez-Ayala, Juan Pablo Ramírez-Hinojosa, Nancy Guadalupe Velázquez-Zavala.

Writing – review & editing: María Dolores Niembro-Ortega, Víctor Hugo Ahumada-Topete, Jaime Andrade-Villanueva, Javier Araujo-Meléndez, Oscar I. Flores-Barrientos, Jesús Enrique Gaytán-Martínez, Luz Alicia González-Hernández, Víctor Hugo Lozano-Fernandez, Marisol Manríquez-Reyes, Martin Magaña-Aquino, Andrea Rangel-Cordero, Norma Erendira Rivera-Martínez, Edgardo Reyes-Gutiérrez, Gustavo Reyes-Terán, Patricia Rodríguez-Zulueta, Jesús Ruíz-Quiñones, Janeth Santiago-Cruz, José Sifuentes-Osornio, Alfredo Ponce de León.

References

1. Sifuentes-Osornio J, Corzo-Leon DE, Ponce-de-Leon LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012; 6(1):23–34. Epub 2012/03/01. <https://doi.org/10.1007/s12281-011-0081-7> PMID: 22363832.
2. Baddley JW, Sankara IR, Rodriguez JM, Pappas PG, Many WJ Jr. Histoplasmosis in HIV-infected patients in a southern regional medical center: poor prognosis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62(2):151–6. Epub 2008/07/04. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.006> PMID: 18597967.
3. Sifuentes-Osornio J, Torres-Gonzalez P, Ponce-de-Leon A. Diagnosis and Treatment of Non-European Fungal Infections. *Current Fungal Infection Reports*. 2014; 8(4):343–52. <https://doi.org/10.1007/s12281-014-0202-1>
4. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1):115–32. Epub 2007/01/16. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-06> PMID: 17223625.
5. Astuto-Gribble LM, Gaudioso JM, Caskey SA, Zemlo TR. A Survey of Bioscience Research and Biosafety and Biosecurity Practices in Asia, Eastern Europe, Latin America, and the Middle East. *Applied Biosafety*. 2009; 14(4):181–96. <https://doi.org/10.1177/153567600901400404>

6. Nacher M, Adenis A, Mc Donald S, Do Socorro Mendonca Gomes M, Singh S, Lopes Lima I, et al. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients in South America: a neglected killer continues on its rampage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(11):e2319. Epub 2013/11/28. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002319> PMID: 24278485.
7. Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *N Engl J Med*. 1986; 314(2):83–8. Epub 1986/01/09. <https://doi.org/10.1056/NEJM198601093140205> PMID: 3941695.
8. Cloud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER. Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the quantitation of *Histoplasma* antigen in human urine samples. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128(1):18–22. Epub 2007/06/21. <https://doi.org/10.1309/Q7879TYDW5D93QK7> PMID: 17580268.
9. Zhang X, Gibson B Jr., Daly TM. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(12):4095–101. Epub 2013/10/04. <https://doi.org/10.1128/JCM.02298-13> PMID: 24088857.
10. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(12):1813–21. Epub 2008/05/09. <https://doi.org/10.1086/588660> PMID: 18462102.
11. Hoffmann ER, Daboit TC, Paskulin DD, Monteiro AA, Falci DR, Linhares T, et al. Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicentre study to evaluate the performance of different diagnostic tests. *Mycoses*. 2017; 60(1):20–4. Epub 2016/07/23. <https://doi.org/10.1111/myc.12536> PMID: 27443422.
12. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14(6):802–3. Epub 2007/04/06. <https://doi.org/10.1128/CVI.00035-07> PMID: 17409220.
13. Zhang C, Lei GS, Lee CH, Hage CA. Evaluation of two new enzyme immunoassay reagents for diagnosis of histoplasmosis in a cohort of clinically characterized patients. *Med Mycol*. 2015; 53(8):868–73. Epub 2015/09/05. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv062> PMID: 26337088.
14. Theel ES, Jespersen DJ, Harring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(11):3555–9. Epub 2013/08/24. <https://doi.org/10.1128/JCM.01868-13> PMID: 23966508.
15. Theel ES, Harring JA, Dababneh AS, Rollins LO, Bestrom JE, Jespersen DJ. Reevaluation of commercial reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in urine. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(4):1198–203. Epub 2015/01/30. <https://doi.org/10.1128/JCM.03175-14> PMID: 25631806.
16. Hage CA, Ribes JA, Wengenack NL, Baddour LM, Assi M, McKinsey DS, et al. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(5):448–54. Epub 2011/08/04. <https://doi.org/10.1093/cid/cir435> PMID: 21810734.
17. Caceres DH, Scheel CM, Tobon AM, Ahlquist Cleveland A, Restrepo A, Brandt ME, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay that detects *Histoplasma capsulatum* antigenuria in Colombian patients with AIDS for diagnosis and follow-up during therapy. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21(9):1364–8. Epub 2014/07/11. <https://doi.org/10.1128/CVI.00101-14> PMID: 25008902.
18. Teixeira Mde M, Patane JS, Taylor ML, Gomez BL, Theodoro RC, de Hoog S, et al. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(6):e0004732. Epub 2016/06/02. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004732> PMID: 27248851.
19. Allton DR, Rivard RG, Connolly PA, McCall S, Durkin MM, Boyd TM, et al. Detection of Latin American strains of *Histoplasma* in a murine model by use of a commercially available antigen test. *Clin Vaccine Immunol*. 2010; 17(5):802–6. Epub 2010/04/02. <https://doi.org/10.1128/CVI.00043-10> PMID: 20357054.
20. Gutierrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat LJ. Detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in Panamanian patients with disseminated histoplasmosis and AIDS. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(4):681–3. Epub 2008/02/22. <https://doi.org/10.1128/CVI.00358-07> PMID: 18287576.
21. Zhuang D, Hage C, De Jesus M, Hackett E, Durkin M, Davis TE, et al. Cryptococcal glucoylomannan does not exhibit cross-reactivity in the MVista *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(2):392–3. Epub 2007/12/14. <https://doi.org/10.1128/CVI.00383-07> PMID: 18077616.
22. Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183(1):96–128. Epub 2011/01/05. <https://doi.org/10.1164/rccm.2008-740ST> PMID: 21193785.

23. Azar MM, Hage CA. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2017; 55(6):1612–20. Epub 2017/03/10. <https://doi.org/10.1128/JCM.02430-16> PMID: 28275076.
24. Arellano-Galindo J, Eugenio VM, Elva JH, Jesus RS, Maria de Los Angeles MR, Rodolfo Norberto JJ, et al. A saprophytic fungus (*Sepedonium*) associated with fatal pneumonia in a patient undergoing stem cell transplantation. *J Int Med Res.* 2017; 45(4):1430–4. Epub 2017/06/14. <https://doi.org/10.1177/0300060517708103> PMID: 28606018.
25. Anstead GM, Sutton DA, Graybill JR. Adiaspiromycosis causing respiratory failure and a review of human infections due to *Emmonsia* and *Chrysosporium* spp. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4):1346–54. Epub 2012/01/20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00226-11> PMID: 22259200.

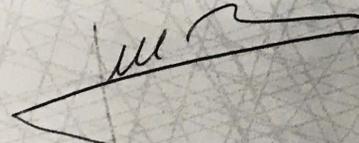
Otorga la siguiente constancia a la:

Dra. María Dolores Niembro Ortega

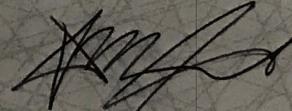
Por su ponencia en los seminarios semanales de la Dirección de Investigación:

“Evaluación de marcadores moleculares para el diagnóstico de la histoplasmosis en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida”

México, Ciudad de México a 27 de enero de 2017



Dr. José Moreno Rodríguez
Director de Investigación y Enseñanza



Dr. Mario Adán Moreno Eutimio
Jefe de la División de Investigación



15th Infocus

CURITIBA, BRAZIL
16-18 November 2017

Managing Fungal Infections in Latin America / Promoting Science and Innovation

CERTIFICATE

We Certify That

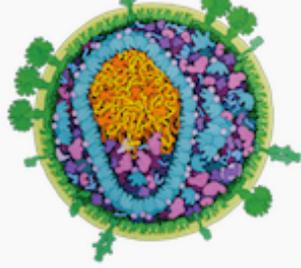
MARÍA DOLORES NIEMBRO-ORTEGA, ROSA ARELI MARTÍNEZ-GAMBOA, BRENDA ELOISA CRABTREE-RAMÍREZ, PEDRO MARTÍNEZ-AYALA, MICHELLE ELISA DE LOURDES MARVIN-HUERGO , GUSTAVO REYES-TERÁN, MEXICAN CONSORTIUM FOR THE STUDY OF INVASIVE FUNGAL INFECTIONS , PEDRO TORRES-GONZÁLEZ, JOSÉ SIFUENTES-OSORNIO, ALFREDO PONCE DE LEÓN-GARDUÑO

Attended the 15^o INFOCUS - Managing Fungal Infections in Latin America - Promoting Science and Innovation, held from November 16th to 18th, 2017 in Curitiba - Paraná - Brazil.

As Author(s) of the Paper: DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS, CLINICAL MANIFESTATIONS AND MICROBIOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS IN FEBRILE PATIENTS WITH AIDS IN MEXICO


Flavio Queiroz-Telles
President of INFOCUS 2017


Arnaldo Lopes Colombo MD
President of INFOCUS 2017



About



Information



Abstracts



Who Can Attend

Registration and Housing



Scientific Program



Scholarships



Quick Links

[How to Claim CME Credits](#)



[Electronic Materials](#)



[Search Abstracts/e-Posters](#)



[Webcasts](#)



[Information for Invited
Speakers](#)



[Frequently Asked Questions](#)



[Contact Us](#)



Conference Dates and Location:

March 4-7, 2018 | Boston, Massachusetts

Abstract Number:

793

PCR AND URINE ANTIGEN FOR DIAGNOSIS OF DISSEMINATED HISTOPLASMOSIS IN AIDS PATIENTS

Author(s):

Maria D. Niembro-Ortega¹, Rosa A. Martínez-Gamboa¹, Brenda Crabtree-Ramírez¹, Pedro Martínez-Ayala², Andrea Rangel-Cordero¹, Nancy G. Velázquez-Zavala¹, Janet Santiago-Cruz¹, Paulette G. Díaz-Lomelí¹, Armando Gamboa-Domínguez¹, Edgardo F. Reyes-Gutiérrez¹, Pedro Torres-González¹, José Sifuentes-Osornio¹, Luis A. Ponce de Leon-Garduño¹

¹Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ²Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, Guadalajara, Mexico

Abstract Body:

Disseminated histoplasmosis (DH) is an AIDS-defining infection and the most common endemic fungal infection in North America. The current diagnostic tests for DH are time-consuming, expensive and not widely available. Recently a nested PCR targeting a 100-kDa protein (Hc100) from *H. capsulatum* was described for DH diagnosis. Additionally an urine antigen for DH diagnosis (IMMY alpha) is recently available for in-site use. We aim to determine the diagnostic performance of Hc100 PCR and IMMY alpha urine antigen in comparison with culture for DH in HIV infected patients.

We conducted a double-blind, multicenter, prospective, diagnostic tests study from December 2015 to June 2017. Adult HIV-positive patients presenting with fever and at least two of the following criteria: lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly, mucosal ulcers, dermatologic lesions, gastrointestinal bleeding; cytopenias, elevation of AST, LDH or ferritin levels; or radiographic findings suggestive of extrapulmonary infection were included from 10 hospitals in Mexico. At least a BACTEC MYCO/F Lytic blood culture and a blood sample for Hc100 amplification were required for inclusion. Additional samples (bone marrow, urine, tissue) for each case were obtained according with the in-site physician's criteria. Fungal culture and Hc100 were performed to every additional sample. All clinical specimens were analyzed at a central laboratory.

270 patients with probable DH were included in the study. Fifty-four patients resulted in an alternative diagnosis (50% had mycobacterial infection). Seventy-seven cases were confirmed with DH (67 of them through culture isolation and 10 by histopathology only); 218 blood cultures, 171 bone marrow cultures and 53 cultures of tissue were compared with its corresponding Hc100 nested PCR, and 246 urine samples for the IMMY ALPHA Antigen EIA. (Table 1). The positivity rate of Hc100 PCR varied depending on the sample. The highest sensitivity (90%) and negative predictive value (96.7%) were observed from tissue samples. Specificity of the IMMY ALPHA Histoplasma antigen EIA when compared to any positive culture was 95% (95% CI 91.8-97.3).

In HIV patients with suspected DH, Hc100 PCR and IMMY ALPHA Histoplasma antigen EIA had a good diagnostic performance in terms of sensitivity and negative predictive value. Both tests were rapid and accessible to implement in endemic areas where mycology laboratories are not available.

Session Number:
P-04

Session Title:
CRYPTOCOCCAL MENINGITIS AND OTHER FUNGAL INFECTIONS

Presenting Author:
Maria Niembro-Ortega

Presenter Institution:
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición 'Salvador Zubirán'

Poster:
 [1430_NiembroOrtega_793.pdf](#)

- 792 CUSTOMIZED AMPHOTERICIN DURATION FOR CRYPTOCOCCAL MENINGITIS BASED ON FUNGAL BURDEN**
Darlisha A. Williams, Kathy Huppler Hullsiek, Andrew Akampurira, Tonny Luggya, Edwin Nuwagira, Lillian Tugume, Edward Mpoza, Reuben Kiggundu, Kenneth Ssebambulidde, Mahsa Abbasi, Conrad Muzoora, David Meya, David R. Boulware, Joshua Rhein, for the ASTRO-CM Trial
- 793 PCR AND URINE ANTIGEN FOR DIAGNOSIS OF DISSEMINATED HISTOPLASMOSIS IN AIDS PATIENTS**
Maria D. Niembro-Ortega, Rosa A. Martínez-Gamboa, Brenda Crabtree-Ramírez, Pedro Martínez-Ayala, Andrea Rangel-Cordero, Nancy G. Velázquez-Zavala, Janet Santiago-Cruz, Paulette G. Díaz-Lomeli, Armando Gamboa-Domínguez, Edgardo F. Reyes-Gutiérrez, Pedro Torres-González, José Sifuentes-Osorio, Luis A. Ponce de León-Garduño, for the Mexican Consortium for the Study of Invasive Fungal Infections
- 794 ANTIFUNGAL DRUG SUSCEPTIBILITY OF TALAROMYCES MARNEFFEI CLINICAL ISOLATES, GUANGDONG**
Linghua Li, Wanshan Chen, Fengyu Hu, Xiejie Chen, Weiping Cai, Xiaoping Tang
- 795 RISK FACTORS FOR IRIS IN HIV-ASSOCIATED PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA AFTER ART INITIATION**
Gerrit Kann, Hannah Bielke, Philipp De Leuw, Gundolf Schuettfort, Annette E. Haberl, Junaid Owasil, Claus P. Kuepper-Tetzel, Nils Wetzstein, Imke Wieters, Johanna Kessel, Markus Bickel, Pavel Khaykin, Christoph Stephan

Poster P-P3 INFANT HIV INFECTION AND DIAGNOSIS IN THE ERA OF OPTION B+

Poster Hall D

2:30 PM – 4:00 PM

- 821 MATERNAL VIRAL LOAD SUPPRESSION AND VERTICAL TRANSMISSION IN MALAWI'S PMTCT PROGRAM**
 Ernest Nkhoma, Monique van Lettow, Beth A. Tippet Barr, Joep J. van Oosterhout, Eunice Mwandira, Lloyd Chilikutali, Annie Kanyemba, Zinenani T. Truwah, Andrew F. Auld, **Megan Landes**
- 822 INFANT HIV-FREE SURVIVAL IN THE ERA OF "OPTION B+" SERVICES IN RURAL ZAMBIA**
Benjamin H. Chi, Wilbrod Mutale, Jennifer Winston, Winifreda Phiri, Joan T. Price, Charles Y. Msiska, Helen Ayles, Jeffrey S. Stringer
- 823 HIV-POSITIVITY AMONG HIV-EXPOSED INFANTS IN LESOTHO IN THE ERA OF OPTION B+**
 Tsigereda G. Belachew, Kieran Hartsough, Andrea Schaaf, Mahlompho Ntholeng, **Tiffany G. Harris**
- 824 HIGH HIV BURDEN AMONG CHILDREN IN LESOTHO: FINDINGS FROM A POPULATION BASED SURVEY**
Koen Frederix, Stefania Davia, Keletso Ntene-Sealliete, Stephen M. Arpadi, Stephen McCracken, Kyaw Thin, Hetal Patel, Mosilinyane Letsie, Andrea Low
- 825 IMPACT OF BIRTH TESTING ON EARLY INFANT DIAGNOSIS IN KWAZULU-NATAL, SOUTH AFRICA**
Shayla Smith, Louise Kuhn, Moherndran Archary, Pravi Moodley, Phillip LaRussa, Kerusha Govender

PCR AND URINE ANTIGEN FOR DIAGNOSIS OF DISSEMINATED HISTOPLASMOSIS IN AIDS PATIENTS

María D. Niembro-Ortega¹, Rosa A. Martínez-Gamboa¹, Brenda Crabtree-Ramírez¹, Pedro Martínez-Ayala², Andrea Rangel-Cordero¹, Nancy G. Velázquez-Zavala¹, Janet Santiago-Cruz¹, Paulette G. Díaz-Lomeli¹, Armando Gamboa-Domínguez¹, Edgardo F. Reyes-Gutiérrez¹, Pedro Torres-González¹, José Sifuentes-Osornio¹, Luis A. Ponce de León-Garduño¹, for the Mexican Consortium for the Study of Invasive Fungal Infections

1. Infectious Diseases Department, Clinical Microbiology Laboratory and Pathology Department, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México City, México. 2. Unidad de VIH, Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde", Guadalajara, México

FUNDER: "Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social" GRANT Number 0261482, CONACyT

Poster Presentation Number 793

Introduction

- Disseminated histoplasmosis (DH) is an AIDS-defining condition and the most common endemic fungal infection in North America.¹
- The current diagnostic tests for DH are time-consuming, expensive and not widely available.²
- Recently a nested PCR targeting a 100-kDa protein (Hc100) from *Histoplasma capsulatum* was described for DH diagnosis.³
- Additionally the IMMY ALPHA Histoplasma Antigen EIA, an immunoenzymatic, sandwich microplate assay used for the qualitative detection of histoplasma antigens in urine was FDA approved for in-site use.⁴
- Multicenter comparisons of these two tests against fungal culture and histopathology analysis in HIV population are lacking.
- Primary outcome:** to determine the sensitivity and specificity of PCR Hc100 in peripheral blood samples vs peripheral blood culture for the diagnosis of DH in HIV infected patients
- Secondary outcomes:**
 - Determine the sensitivity and specificity of PCR Hc100 in:
 - Bone marrow vs bone marrow culture
 - Biopsy vs biopsy culture
 - Determine the sensitivity and specificity of IMMY ALPHA Histoplasma Antigen EIA vs "Proven disseminated histoplasmosis" definition

Methods

- Double-blind, multicenter, prospective, diagnostic test study
- 10 referral hospitals from seven different states of México

- From November 2015 to December 2017

- The research was approved at each hospital by their own Ethics and Investigation committee

Inclusion criteria:

- HIV infected patients with "**Suspicion of DH**" identified by an Infectious diseases specialist in each center

- "**Suspicion of DH**" = Any 3 of the following or fever + any 2 of the following criteria:

- Weight loss
- Lymphadenopathy
- Hepatomegaly
- Splenomegaly
- Mucosal ulcers
- Skin lesions
- Gastrointestinal bleeding
- Bicytopenia or pancytopenia (Hb <10 g/dL, total neutrophil count <1.8 x 10³/μL, platelets <100,000 /μL)
- Elevation of two times de upper limit of normal of AST, DHL or ferritin
- Radiographic findings suggestive of extrapulmonary infection

- Proven disseminated histoplasmosis:** culture positive for *Histoplasma capsulatum* and/or histopathology compatible with histoplasmosis

- Statistical analysis:** Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and positive likelihood ratio and their 95% confidence intervals (95% CI) for PCR Hc100 and the IMMY ALPHA Histoplasma Antigen EIA using as standard of reference the positivity of cultures and/or histopathology results from biopsies in non-pulmonary samples

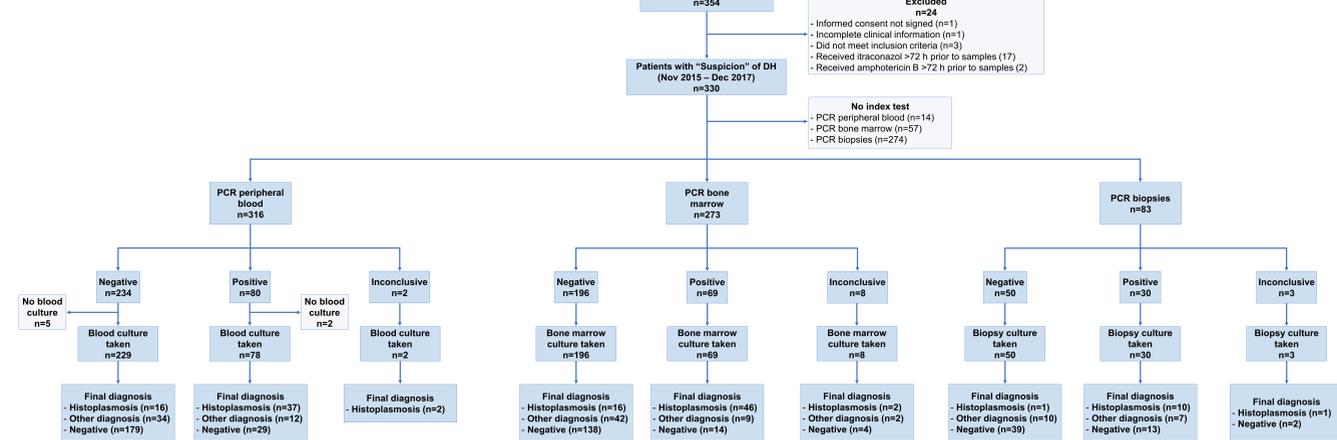
- STATA 14.1 Software (College Station, TX)

Participating sites: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), México City; Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México City; Hospital General "Dr. Manuel Gea González", México City; Hospital Dr. Gaudencio González "La Raza", México City; Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde", Unidad de VIH, Guadalajara, Jalisco; Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, S.L.P.; Hospital General de Puebla "Dr. Eduardo Vázquez Navarro", Puebla; Hospital de Alta Especialidad de Veracruz, Veracruz; Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús", Villahermosa, Tabasco; CAPASITS-COEICIDA Oaxaca, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO, Oaxaca

Acknowledgement for the Mexican Consortium for the Study of Invasive Fungal Infections: Víctor Hugo Ahumada-Topete, Jaime Andrade-Villanueva, Javier Araujo-Meléndez, Alberto Chaparro-Sánchez, Sofía Cruz-Martínez, Luz Alicia González-Hernández, Christian Hernández-Leon, Víctor Hugo Lozano-Fernández, Marisol Manríquez-Reyes, Pedro Martínez-Ayala, Juan Pablo Ramírez-Hinojosa, Gustavo Reyes-Terán, Norma Erendira Rivera-Martínez, Patricia Rodríguez-Zulueta, Jesús Ruíz-Quinoénes

Results

Graphic 1. Study flow chart of participants through the study.

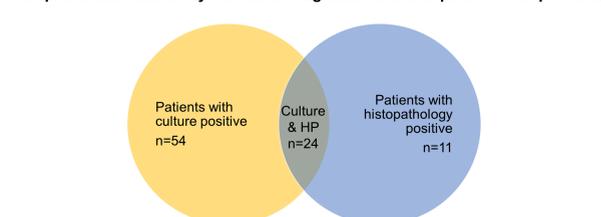


Inconclusive = insufficient sample, coagulated sample, did not amplify beta-globin.

Table 1. Comparison of demographic and clinical information of enrolled patients.

Characteristic	Total n=330 (%)	Proven DH n=89 (%)	Not DH n=241 (%)	p
Gender (male), n (%)	282/330 (85.4)	72/89 (80.9)	210/241 (87.1)	0.15
Age (years), mean (SD)	35 (±9.7)	33.9 (±9.0)	36.3 (±9.9)	0.04
HIV infection				
Months since HIV diagnosis, median (IQR)	3 (0-52)	2 (0-27)	3 (0-64)	0.24
CD4 count (cells/mm ³), median (min-max)	34 (0-1493)	26 (0-340)	36 (0-1493)	0.10
Number of patients with virological failure (>200 copies/mm ³)	262/292 (89.7)	66/72 (91.7)	196/220 (89.1)	0.53
ART naïve	184/330 (55.8)	54/89 (60.7)	130/241 (53.9)	0.27
ART treatment ever	146/330 (44.2)	35/89 (39.3)	111/241 (46.1)	0.27
Based on NRTI	84/146 (57.5)	22/35 (62.9)	62/111 (55.9)	0.46
Based on PI	35/146 (24)	6/35 (22.9)	27/111 (24.3)	0.86
Based on INSTI	5/146 (3.4)	0/35 (0)	5/111 (4.5)	0.20
Risk factors for histoplasmosis*	172/329 (52.3)	42/89 (47.2)	130/240 (54.2)	0.26
Signs and Symptoms				
Fever	315/330 (95.5)	88/89 (98.9)	227/241 (94.2)	0.07
Weight loss (>5% of total weight in the last 6 months)	295/330 (89.4)	85/89 (95.5)	210/241 (87.1)	0.02
Hepatomegaly	224/330 (67.9)	58/89 (65.2)	166/241 (68.9)	0.52
Peripheral Lymphadenopathy	210/330 (63.6)	46/89 (51.7)	164/241 (68)	<0.01
Cough	198/330 (60)	50/89 (56.1)	148/241 (61.4)	0.39
Dyspnea	176/330 (53.3)	48/89 (53.9)	128/241 (53.1)	0.89
Splenomegaly	175/330 (53)	45/89 (50.6)	130/241 (53.9)	0.59
Diarrhea	161/330 (48.8)	47/89 (52.8)	114/241 (47.3)	0.37
Nausea	69/330 (21)	26/89 (29.2)	43/241 (18)	0.58
Cutaneous lesions	77/330 (23.3)	29/89 (32.6)	48/241 (19.9)	0.01
Vomit	66/330 (20)	26/89 (29.2)	40/241 (16.6)	0.01
Acute renal failure	54/330 (16.4)	21/89 (23.6)	33/241 (13.7)	0.03
Mucosal ulcers	48/330 (14.6)	11/89 (12.4)	37/241 (15.4)	0.49
Gastrointestinal bleeding	41/330 (12.4)	10/89 (11.2)	31/241 (12.9)	0.69
Laboratory abnormalities				
Leucocyte count (cells x10 ⁹ /ml), median (IQR)	3.9 (2.48-6.44)	3.4 (2.1-4.6)	4.2 (2.7-7.1)	0.02
Platelet count (cells x10 ⁹ /ml), median (IQR)	143 (65.5-238)	91 (62.5-190.5)	154.5 (72.3-255)	<0.01
Aspartate aminotransferase (U/L), median (IQR)	57.5 (31-121)	97 (57-258)	47 (27-89)	<0.001
Alkaline phosphatase (U/L), median (IQR)	139 (89-261.5)	218 (102-406)	129 (88-218)	<0.001
C-Reactive Protein (mg/dL), median (IQR)	12.3 (6.4-23.4)	23.8 (9.7-169.5)	9.48 (4.2-19)	<0.01
Lactic dehydrogenase (mg/dL), median (IQR)	358 (206-838)	1065 (474-2244)	297 (194-530)	<0.001
Extrapulmonary radiographic involvement	227/329 (69)	46/88 (52.3)	181/241 (75.1)	<0.001
Lymphadenopathy	139/329 (42.3)	24/88 (27.3)	115/241 (47.7)	<0.01
Hepatomegaly	177/329 (53.8)	35/88 (39.8)	142/241 (58.9)	<0.01
Splenomegaly	147/329 (44.7)	28/88 (31.8)	119/241 (49.4)	<0.01
Fluconazole treatment >72 h before samples taken	33/328 (10.1)	4/88 (4.5)	29/240 (12.1)	0.04

Graphic 5. Distribution by method of diagnosis for the 89 patients with proven DH.



Graphic 4. Diagnosis established in enrolled patients.

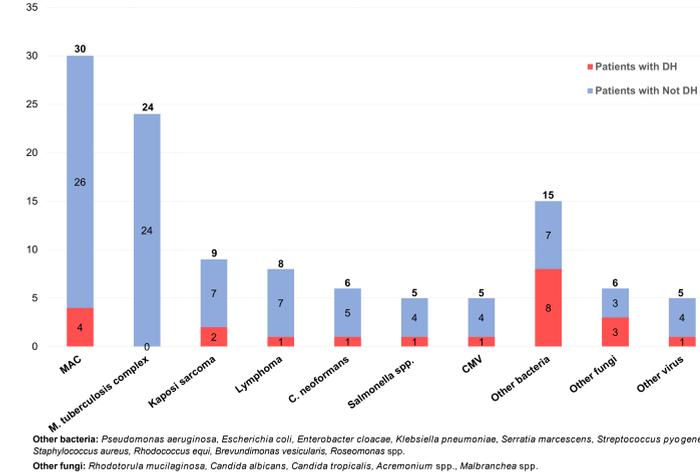


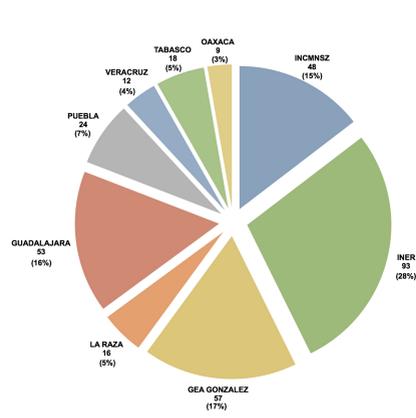
Table 2. Rate of diagnosis of DH through microbiological and histopathological samples processed.

Anatomical site	Histoplasma capsulatum positive cultures n/N (%)	Histopathology positive for histoplasmosis n/N (%)
Blood	58/314 (18.5)	-
Bone marrow aspirate	68/296 (23)	-
Biopsies	12/108 (11.1)	37/146 (25.3)
Skin and soft tissues	5/23 (21.7)	11/27 (40.7)
Gastrointestinal tract	0/19 (0)	1/22 (4.5)
Bone/bone marrow biopsy	1/24 (4.1)	18/49 (36.7)
Lymph nodes	5/23 (21.7)	5/16 (31.3)
Liver or spleen	0/10 (0)	0/11 (0)
Lung	1/6 (16.7)	2/8 (25)
Kidney	0/1 (0)	0/1 (0)
Testicle	0/1 (0)	0/1 (0)
Central nervous system	0/3 (0)	0/1 (0)
Total	151/828 (18.3)	37/146 (25.3)

Map. Localization of proven DH cases according to residence.



Graphic 2. Distribution of eligible participants in the study by hospital of enrollment.



Graphic 3. Proportion of patients by final diagnosis.

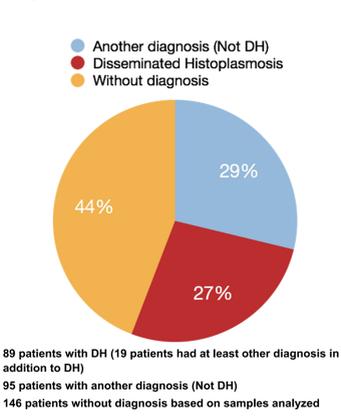


Table 3. Diagnostic accuracy of PCR in peripheral blood, bone marrow and biopsies samples and of the IMMY ALPHA Histoplasma Urine Antigen.

	PCR peripheral blood	PCR bone marrow	PCR biopsy	Urine Antigen IMMY ALPHA
Sensitivity % (95% CI)	69.8 (55.7-81.7)	74.2 (61.5-84.5)	91.0 (58.7-99.8)	64.8 (53.9-74.7)
Specificity % (95% CI)	83.9 (78.7-88.2)	88.7 (83.5-92.7)	71.0 (58.8-81.3)	95.6 (92.1-97.9)
Positive predictive value % (95% CI)	47.4 (36.0-59.1)	66.7 (54.3-77.6)	33.3 (17.3-52.8)	85.1 (74.3-92.6)
Negative predictive value % (95% CI)	93.0 (88.9-96.0)	91.8 (87.1-95.3)	98.0 (89.4-99.9)	87.5 (82.7-91.4)
Positive likelihood ratio (95% CI)	4.3 (3.1-5.7)	6.5 (4.4-9.4)	3.1 (1.8-3.6)	14.7 (8.0-28.8)
Negative likelihood ratio (95% CI)	0.4 (0.2-0.5)	0.3 (0.2-0.4)	0.1 (0.007-0.6)	0.4 (0.3-0.5)

Conclusions

- To our knowledge this is the largest, national, multicenter and standardized study in HIV population for the performance of different diagnostic tests in disseminated histoplasmosis in México

- Of all patients included in the study, 56% had an established diagnosis. Disseminated histoplasmosis was the single most common diagnosis (89 patients, 27%), followed by mycobacterial infection (MAC and/or *M. tuberculosis*) in 54 patients (16.4%)

- In our population, Hc100 PCR and IMMY ALPHA Histoplasma Antigen had a good diagnostic performance for disseminated histoplasmosis in terms of high negative predictive value and specificity respectively. Both tests can be available within hours, are easy to perform and accessible for resource limited laboratories in developing countries

References

- Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(1): 207-227. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.009.
- Azar MM, Hage CA. 2017. Laboratory diagnostics for histoplasmosis. J Clin Microbiol 55:1612-1620. <https://doi.org/10.1128/JCM.02430-16>
- Bialek R, et al. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. J. Clin. Microbiol. 40: 1644-1647.
- LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA *Histoplasma* Antigen Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Histoplasmosis Marked by Antigenuria. Clinical and Vaccine Immunology. CVI. 2007;14(6):802-803. doi:10.1128/CVI.00035-07.

E-mail contact: doloresniembro@gmail.com



Asociación Mexicana de Infectología
y Microbiología Clínica, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

por su presentación de Trabajo Libre

Cartel **B57**

Título DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES DE FIEBRE PACIENTES CON VIH/SIDA EN
MÉXICO ESTUDIO MULTICÉNTRICO, PROSPECTIVO, DOBLE CIEGO

Autores

**Niembro-Ortega M1, Martínez-Gamboa R1, Crabtree-Ramírez B1, Rangel-Cordero A1, Velázquez-Zavala N1, Santiago-Cruz J1, Díaz-Lomelí P1, Méndez-Ramos S1, Gamboa-Domínguez A1, Reyes-Gutiérrez E1, Jandete-Medina M1, Ahumada-Topete V2, Andrade-Villanueva J3, Araujo-Meléndez J4, Chaparro-Sánchez A5, Cruz-Martínez S6, Flores-Barrientos O7, Gaytán-Martínez J5, González-Hernández L8, Hernández-León C9, Lozano-Fernández V2, Manríquez-Reyes M10, Magaña-Aquino M4, Martínez-Ayala P8, Ramírez-Hinojosa J11, Rivera-Martínez N12, Reyes-Terán G2, Rodríguez-Zulueta P11, Ruiz-Quiñones J7, Torres-González P1, Sifuentes-Sornio J1, Ponce de León-Garduño A13, (1) Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México; (2) Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México; (3) Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, México; (4) Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto, México; (5) Hospital Dr Gaudencio González La Raza, México; (6) COPASITSCOECIDA Oaxaca Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO, México; (7) Hospital Regional de Alta Especialidad Dr Juan Graham Casasus, México; (8) Hospital Civil Fray Antonio Alcalde Unidad de VIH, México; (9) Hospital General de Puebla Dr Eduardo Vázquez Navarro, México; (10) Hospital de Alta Especialidad de Veracruz, México; (11) Hospital General Dr Manuel Gea González, México; (12) OPASITSCOECIDA Oaxaca Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO, México; (13) Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México.

Durante el **XLIII Congreso Nacional de Infectología
y Microbiología Clínica** del 23 al 27 de Mayo del 2018
en el Centro Internacional de Congresos de Yucatán,
Mérida, Yucatán, México.

Noris M. Pavía Ruz.

Dra. Noris Marlene Pavía Ruz
Presidente AMIMC A.C.

Dra. Patricia Cornejo Juárez
Secretario Académico



XLIII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica

“Premio Gerhard Domagk”

Otorga 1° Lugar
Investigación Clínica en Infectología

Cartel n°: B57

Título: Diagnósticos diferenciales de fiebre pacientes con VIH/SIDA en México Estudio multicéntrico, prospectivo, doble ciego.

Autores:

Niembro-Ortega M1, Martínez-Gamboa R1, Crabtree-Ramírez B1, Rangel-Cordero A1, Velázquez-Zavala N1, Santiago-Cruz J1, Díaz-Lomeli, P1, Méndez-Ramos S1, Gamboa-Domínguez A1, Reyes-Gutiérrez E1, Jandete-Medina M1, Ahumada-Topete V2, Andrade-Villanueva J3, Araujo-Meléndez J4, Chaparro-Sánchez A5, Cruz-Martínez S6, Flores-Barrientos O7, Gaytán-Martínez J5, González-Hernández L8, Hernández-León C9, Lozano-Fernández V2, Manríquez-Reyes M10, Magaña-Aquino M4, Martínez-Ayala P8, Ramírez-Hinojosa J11, Rivera-Martínez N12, Reyes-Terán G2, Rodríguez-Zulueta P11, Ruiz-Quirónes J7, Torres-González P1, Sifuentes-Osorio J1, Ponce de León-Garduño A13, (1) Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México; (2) Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México; (3) Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, México; (4) Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto, México; (5) Hospital Dr Gaudencio González La Raza, México; (6) COPASITSCOECIDA Oaxaca Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO, México; (7) Hospital Regional de Alta Especialidad Dr Juan Graham Casaus, México; (8) Hospital Civil Fray Antonio Alcalde Unidad de VIH, México; (9) Hospital General de Puebla Dr Eduardo Vázquez Navarro, México; (10) Hospital de Alta Especialidad de Veracruz, México; (11) Hospital General Dr Manuel Gea González, México; (12) OPASITSCOECIDA Oaxaca Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO, México; (13) Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México.

Noris M. Pavia Ruz

Dra. Noris Marlene del Socorro Pavia Ruz
Presidenta
AMIMC A.C.

Mérida, Yucatán, 26 de Mayo de 2018

Patricia Cornejo Juárez

Dra. Patricia Cornejo Juárez
Secretario Académico
AMIMC A.C.

Diagnósticos diferenciales de fiebre en pacientes con sospecha de histoplasmosis e infección por VIH/SIDA en México: Estudio multicéntrico



**Niembro-Ortega M¹, Crabtree-Ramírez B¹, Martínez-Gamboa R¹, Rangel-Cordero A¹, Velázquez-Zavala N¹, Santiago-Cruz J¹, Díaz-Lomelí P¹, Méndez-Ramos S¹, Gamboa-Domínguez A¹, Reyes-Gutiérrez E¹, Jandete-Medina M¹, Ahumada-Topete V², Andrade-Villanueva J³, Araujo-Meléndez J⁴, Chaparro-Sánchez A⁵, Cruz-Martínez S⁶, Flores-Barrientos O⁷, Gaytán-Martínez J⁵, González-Hernández L³, Hernández-León C⁸, Lozano-Fernández V², Manríquez-Reyes M⁹, Magaña-Aquino M⁴, Martínez-Ayala P³, Ramírez-Hinojosa J¹⁰, Rivera-Martínez N¹², Reyes-Terán G², Rodríguez-Zulueta P¹⁰, Ruiz-Quiñones J⁷, Torres-González P¹, Sifuentes-Osornio J¹, Ponce de León-Garduño A¹, a nombre del Consorcio Mexicano para el Estudio de Infecciones Fúngicas Invasivas

(1) Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Ciudad de México; (2) Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ciudad de México; (3) Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, Unidad de VIH, Guadalajara, Jalisco; (4) Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, S.L.P.; (5) Hospital Dr. Gaudencio González "La Raza", Ciudad de México; (6) CAPASITS COECIDA Oaxaca Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO, Oaxaca; (7) Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús", Villahermosa, Tabasco; (8) Hospital General de Puebla "Dr. Eduardo Vázquez Navarro", Puebla; (9) Hospital de Alta Especialidad de Veracruz, Veracruz; (10) Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Ciudad de México

Antecedentes

- La fiebre es un signo común entre los pacientes con VIH/SIDA y generalmente la causa es de origen infeccioso
- Las infecciones oportunistas ocurren únicamente en la presencia de inmunodeficiencia severa
 - Estudio pacientes en SALVAR¹: el 4.6% (n=1885) de los pacientes registrados entre 2008-2012 murieron en los primeros 6 meses; el 87.3% tenían CD4 <200 cel/mm³
- La histoplasmosis diseminada y progresiva (HDP) es mortal si no se establece un diagnóstico oportuno y se inicia tratamiento
 - Los síntomas clínicos son inespecíficos y simulan los de tuberculosis
- En México no contamos con información sobre la incidencia de esta infección en pacientes con VIH

Objetivo

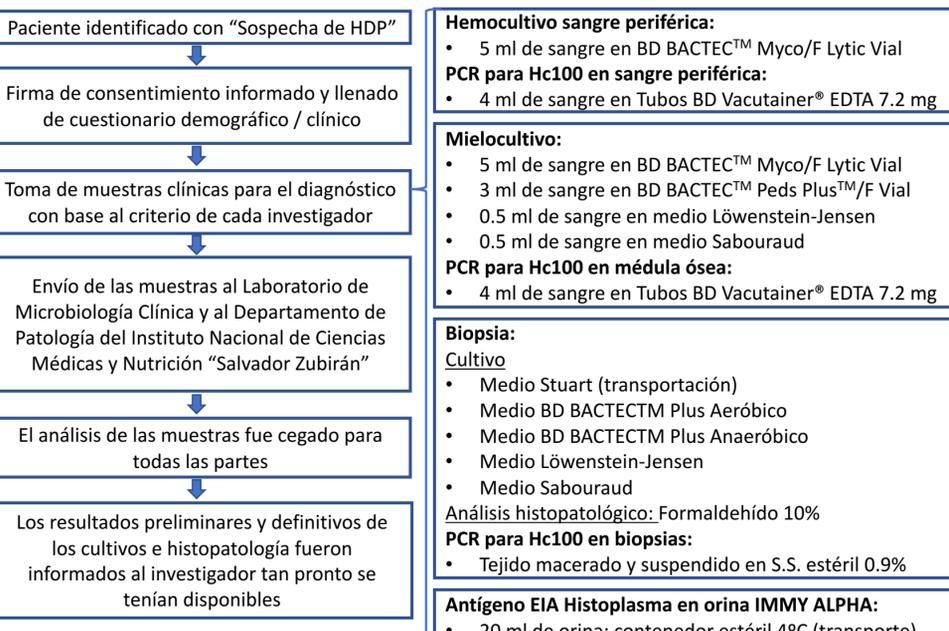
- Definir las causas de fiebre en pacientes con "Sospecha de Histoplasmosis" e infección por VIH/SIDA en México, como parte de un estudio de pruebas diagnósticas de HDP

Material y Métodos

- Estudio doble ciego, multicéntrico, prospectivo, de pruebas diagnósticas
- 10 hospitales de referencia en siete estados de la República Mexicana
- Del 01 de noviembre de 2015 al 31 de enero de 2018
- El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de cada hospital

Criterios de inclusión:

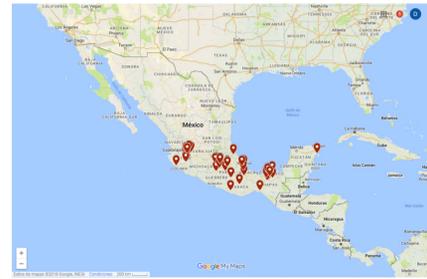
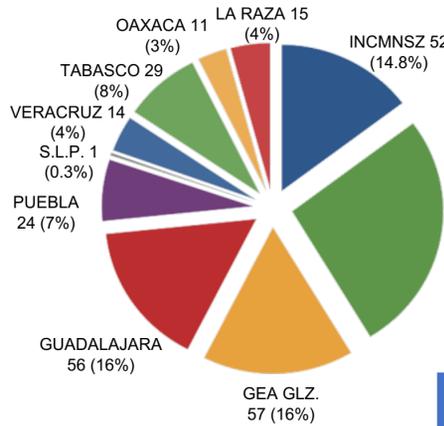
- Pacientes con infección por VIH con "**Sospecha de HDP**" identificado por un médico Infectólogo en cada centro
- "**Sospecha de HDP**": Fiebre + 2 de los siguientes criterios:
 - Pérdida de peso
 - Linfadenopatías
 - Hepatomegalia
 - Esplenomegalia
 - Úlceras en mucosas
 - Lesiones en piel
 - Sagrado GI
 - Bicitopenia o pancitopenia (Hb <10 g/dL, cuenta total de neutrófilos <1.8 x 10³/μL, plaquetas <100,000 /μL)
 - Elevación de 2 veces el límite superior normal de AST, DHL y/o ferritina
 - Evidencia radiográfica de involucro extrapulmonar
- "**Histoplasmosis probada**": Cultivo positivo para *Histoplasma capsulatum* y/o histopatología compatible con histoplasmosis



Instituciones participantes: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Hospital Dr. Gaudencio González "La Raza", Ciudad de México; Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde", Unidad de VIH, Guadalajara, Jalisco; Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, S.L.P.; Hospital General de Puebla "Dr. Eduardo Vázquez Navarro", Puebla; Hospital de Alta Especialidad de Veracruz, Veracruz; Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús", Villahermosa, Tabasco; CAPASITS-COECIDA Oaxaca, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca HRAEO, Oaxaca

Resultados

- Ingresaron 386 pacientes, de los cuales se eliminaron 34 por no cumplir con los criterios de inclusión. De los 352 pacientes a analizar la distribución por centro se muestra en la gráfica 1.



MAPA. Localización de casos probados de HDP de acuerdo a lugar de residencia.

INCM NSZ	INER	GEA GLZ	LA RAZA	GDL	PUE	VER	TAB	OAX
8/52 (15.4)	12/94 (12.8)	7/57 (12.3)	3/15 (20)	28/56 (50)	7/24 (29.2)	10/14 (71.4)	19/29 (65.5)	6/11 (54.5)

TABLA 1. Tasa de positividad para HDP por centro.

	TODOS n=352	REGIÓN SURESTE n=54	GUADALAJARA n=56	CENTRO n=242	P
Género (masculino), n (%)	304 (86.4)	44 (81.5)	50 (89.3)	207 (86.6)	0.47
Edad (años), media (DS)	35.6 (±9.8)	32.4 (±9.7)	36.7 (±8.4)	36.0 (±10.0)	<0.001
Infección por VIH					
Meses desde el diagnóstico mediana (RIQ)	3 (0-49)	2 (0-8)	5 (0-49)	2.5 (0-67)	0.02
Cuenta de CD4 (cél/mm ³) mediana (RIQ)	37 (15-83)	44 (17-93)	34 (17-105)	36 (14-78)	0.85
Número de pacientes con CV>200 copias/mm ³	257 (73)	43 (79.6)	40 (71.4)	174 (71.9)	0.49
Vírgenes a tratamiento ARV	195 (55.7)	33 (61.1)	29 (51.8)	133 (55.4)	0.61
Recibió ARV alguna vez	155 (44.3)	21 (38.9)	27 (48.2)	107 (44.6)	0.61
Basados en ITIN	90 (25.6)	15 (27.8)	14 (25)	61 (25.2)	0.92
Basados en IP	35 (10)	4 (7.4)	9 (16.1)	22 (9.1)	0.23
Basados en II	6 (1.7)	1 (1.8)	1 (1.8)	4 (1.6)	0.99
Signos y Síntomas					
Pérdida de peso (>5% del peso total en los últimos 6 meses)	318 (90.6)	49 (90.7)	48 (85.7)	221 (91.7)	0.38
Hepatomegalia	241 (68.5)	46 (85.2)	17 (30.3)	178 (73.5)	<0.01
Linfadenopatía periférica	230 (65.3)	22 (40.7)	37 (66.1)	171 (70.6)	<0.01
Tos	213 (60.7)	40 (74.1)	26 (46.4)	147 (61)	0.01
Esplenomegalia	188 (53.4)	28 (51.8)	14 (25)	146 (60.3)	<0.01
Diarrea	173 (49.3)	23 (42.6)	28 (50)	122 (50.6)	0.56
Lesiones cutáneas	82 (23.4)	17 (31.5)	16 (28.6)	49 (20.3)	0.13
Úlceras en mucosas	47 (13.4)	5 (9.3)	3 (5.3)	39 (16.2)	0.06
Sangrado gastrointestinal	42 (12)	10 (18.5)	1 (1.79)	31 (12.9)	0.02
Laboratorio					
Cuenta de plaquetas (cél x 10 ³ /ml), mediana (RIQ)	139.5 (67-240)	105.5 (51-184)	91 (59.8-142.4)	168 (73-259)	<0.001
Aspartato aminotransferasa (U/L), mediana (RIQ)	59 (31.5-120)	70 (49-131)	128 (84-236)	47 (27-84)	<0.001
Fosfatasa alcalina (U/L), mediana (RIQ)	147.5 (89-276.5)	276 (154-458)	170 (94-302)	128 (81-218)	<0.001
Deshidrogenasa láctica (mg/dL), mediana (RIQ)	436 (219-867)	867 (633-1658)	726.5 (476-1549)	303.5 (188.5-544)	<0.001
Evidencia radiográfica de involucro extrapulmonar	241 (68.7)	25 (46.3)	19 (34.5)	197 (81.4)	<0.001

TABLA 2. Comparación por regiones de datos clínicos, de laboratorio y radiográficos de los pacientes ingresados al estudio. Sureste (Veracruz, Tabasco y Oaxaca); Guadalajara; Centro (INCMNSZ, INER, Gea Glz., La Raza, Puebla).

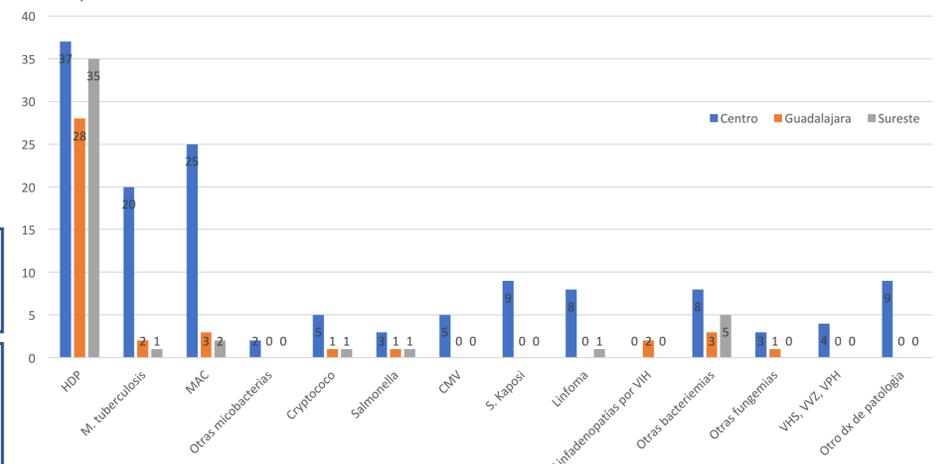


GRÁFICO 2. Distribución de diagnósticos establecidos por regiones en los pacientes ingresados al estudio.

Conclusiones

- El diagnóstico más frecuente entre los pacientes ingresados fue HDP, demostrando que la definición de "Sospecha de HDP" como criterio de inclusión tuvo un buen desempeño
- La segunda causa más frecuente de fiebre fue infección por micobacterias (*M. tuberculosis* y MAC) con mayor número de casos en los hospitales de la "Región Centro" del país
- Los pacientes fueron identificados por infectólogos lo cual puede contribuir al rendimiento diagnóstico
- No se pudo establecer un diagnóstico definitivo en 157 pacientes (44.6%)

Santiago de Cali, enero 09 de 2018

El 16th INFOCUS "Forum on Fungal Infection in the Clinical Practice"

Certifica que la autora principal:

María Dolores Niembro Ortega

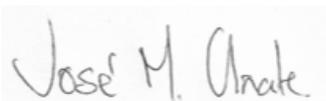
Y los coautores:

Alfredo Ponce De León Garduño, Rosa Areli Martínez Gamboa, Pedro Torres González, Brenda E. Crabtree Ramírez, Andrea Rangel Cordero, Nancy G. Velázquez Zavala, José Sifuentes Osornio

Participaron en la Agenda Académica Oficial con su trabajo de Investigación:

"PCR AND URINE ANTIGEN FOR THE DIAGNOSIS OF DISSEMINATED HISTOPLASMOSIS IN AIDS PATIENTS IN MEXICO"

Atentamente,



José M. Oñate



Pilar Rivas P.

Presidentes INFOCUS 2018

PCR AND URINE ANTIGEN FOR THE DIAGNOSIS OF DISSEMINATED HISTOPLASMOSIS IN AIDS PATIENTS IN MEXICO

María D. Niembro-Ortega¹, Rosa Areli Martínez-Gamboa¹, Pedro Torres-González¹, Brenda E. Crabtree-Ramírez¹, Andrea Rangel-Cordero¹, Nancy G. Velázquez-Zavala¹, José Sifuentes-Osorio¹, Alfredo Ponce de León-Garduño¹, for the Mexican Consortium for the Study of Invasive Fungal Infections

1. Infectious Diseases Department, Clinical Microbiology Laboratory, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga 15, Secc. XVI, Tlalpan C.P.14080, Mexico City, Mexico; doloresniembro@gmail.com; tel. 00525554870900. FUNDING ENTITY: "Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social" GRANT Number 0261482, CONACyT

Introduction

- Disseminated histoplasmosis (DH) is an AIDS-defining condition and the most common endemic fungal infection in North America. The current diagnostic tests for DH are time-consuming, expensive and not widely available.¹
- Recently a nested PCR targeting a 100-kDa protein (Hc100) from *Histoplasma capsulatum* was described for DH diagnosis.²
- Additionally the IMMY ALPHA Histoplasma Antigen EIA, an immunoenzymatic, sandwich microplate assay used for the qualitative detection of histoplasma antigens in urine was FDA approved for in-site use.³
- Multicenter comparisons of these two tests against fungal culture and histopathology analysis in HIV population are lacking.
- Primary outcome:** to determine the sensitivity and specificity of PCR Hc100 in peripheral blood samples vs peripheral blood culture for the diagnosis of DH in HIV infected patients

Secondary outcomes:

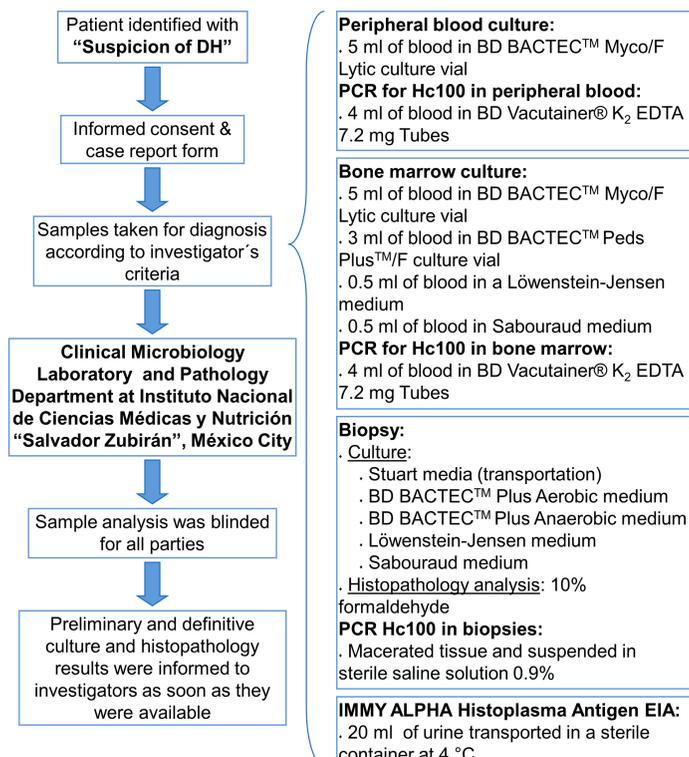
- Determine the sensitivity and specificity of PCR Hc100 in:
 - Bone marrow vs bone marrow culture
 - Biopsy vs biopsy culture
- Determine the sensitivity and specificity of IMMY ALPHA Histoplasma Antigen EIA vs "**Proven disseminated histoplasmosis**" definition

Methodology

- Double-blind, multicenter, prospective, diagnostic test study
- 10 referral hospitals from seven different states of Mexico
- November 2015 to April 2018
- The research was approved at each hospital by their own Ethics and Investigation committee
- Inclusion criteria:** HIV infected patients with "**Suspicion of DH**" identified by an Infectious diseases specialist in each center
- Proven disseminated histoplasmosis:** culture positive for *Histoplasma capsulatum* and/or histopathology compatible with histoplasmosis
- "Suspicion of DH"** = Any 3 of the following or fever + any 2 of the following criteria:

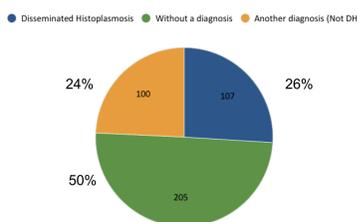
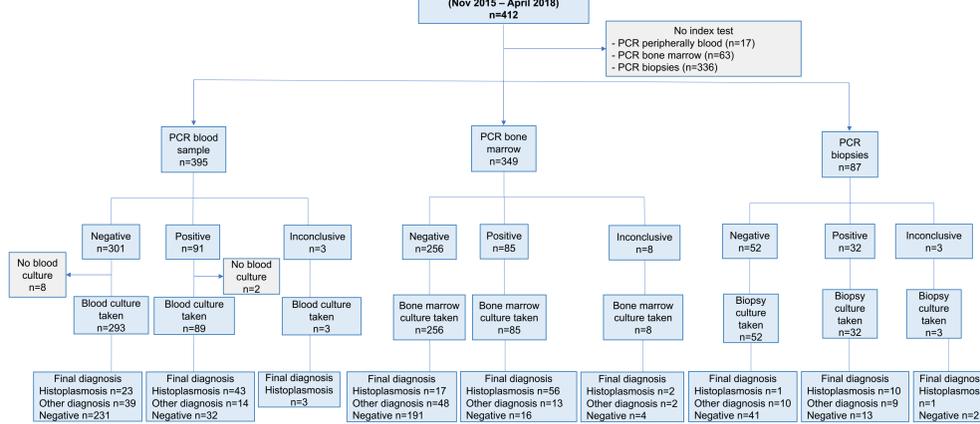
Weight loss Lymphadenopathy Hepatomegaly Splenohegaly Mucosal ulcers Skin lesions Gastrointestinal bleeding	Bicytopenia or pancytopenia (Hb <10 g/dL, total neutrophil count <1.8 x 10 ³ /μL, platelets <100,000/μL) Elevation of two times the upper limit of normal of AST, DHL or ferritin Radiographic findings suggestive of extrapulmonary infection
---	---

- Statistical analysis:** Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and positive likelihood ratio and their 95% confidence intervals (95% CI) for PCR Hc100 and the IMMY ALPHA Histoplasma Antigen EIA using as standard of reference the positivity of cultures and/or histopathology results from biopsies in non-pulmonary samples. STATA 14.1 Software (College Station, TX)



Results

Graphic 1. Study flow chart of participants through the study (STARD diagram)



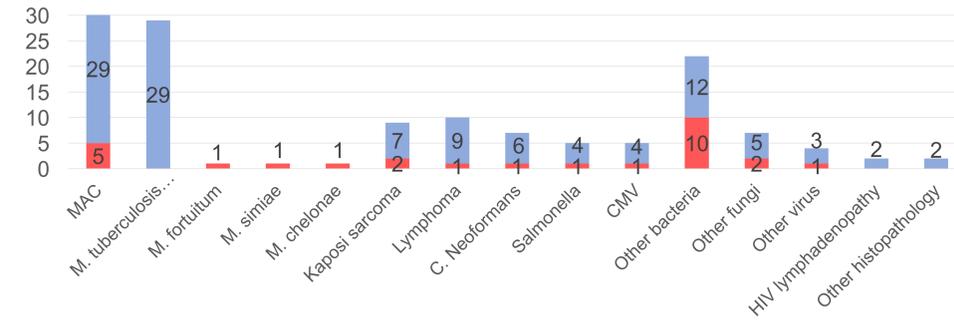
Graphic 2. Numer of patients by final diagnosis. Total of 107 patients with DH (22 patients had at least other diagnosis in addition to DH).



Map. Localization of proven DH cases according to residence.

Characteristic	Total n=412 (%)	Proven DH n=102 (%)	MTB/MAC n=58 (%)	p
Gender (male), n(%)	357 (86.6)	84 (82.4)	51 (87.9)	0.35
Age (years), mean (SD)	35.8 (±9.9)	34.0 (±9.5)	33.6 (±8.7)	0.81
HIV infection				
Months since HIV diagnosis, median (IQR)	2 (0-35.3)	2 (0-32)	4 (0.25-73.75)	0.09
CD4 count (cells/mm ³), median (min-max)	70.2 (0-1493)	50.0 (0-340)	47.5 (1-369)	0.60
ART naive	226/411 (55.0)	60/102 (58.8)	29/58 (50)	0.28
Signs and Symptoms				
Fever	391/411 (95.1)	101/102 (99.0)	53/58 (91.4)	0.01
Weight loss	371/412 (90.1)	93/102 (91.2)	56/58 (96.6)	0.19
Hepatomegaly	290/412 (70.4)	68/102 (66.7)	50/58 (86.2)	0.01
Splenohegaly	223/412 (54.1)	50/102 (49.0)	41/58 (70.7)	0.01
Peripheral adenopathy	260/412 (63.1)	49/102 (48.0)	44/58 (75.9)	0.01
Cutaneous lesions	97/412 (23.5)	33/102 (32.4)	14/58 (24.1)	0.27
Mucosal ulcers	52/412 (12.6)	12/102 (11.8)	11/58 (19.0)	0.21
GI bleeding	50/412 (12.1)	10/102 (9.8)	6/58 (10.3)	0.91
Bi or pancytopenia	170/404 (42.1)	51/101 (50.5)	22/58 (37.9)	0.12
Elevation of AST	143/384 (37.2)	60/98 (61.2)	19/53 (35.9)	0.01
Elevation of LDH	126/339 (37.2)	66/90 (73.3)	9/48 (18.8)	<0.001
Elevation of ferritin	56/62 (90.3)	13/14 (92.9)	10/10 (100)	0.38
Extrapulmonary radiographic involve	283/410 (69.0)	49/101 (48.5)	47/58 (81.0)	<0.001

Table 1. Comparison of demographic and clinical information of patients with DH vs MTB/MAC.



Graphic 3. Diagnosis established in enrolled patients. ■ DH ■ Not DH

	PCR Hc100 peripheral blood	PCR Hc100 bone marrow	PCR Hc100 biopsy	Urine Antigen IMMY ALPHA
Sensitivity % (95% CI)	65.2 (54.1-74.9)	76.7 (67.3-84.3)	91.0 (59.4-99.5)	66.3 (60.0-71.0)
Specificity % (95% CI)	85.4 (83.1-87.5)	89.2 (86.6-91.3)	70.0 (65.1-71.2)	96.2 (94.0-98.0)
Positive predictive value % (95% CI)	48.3 (37.6-59.2)	65.9 (54.8-75.8)	31.3 (16.1-50.0)	86.3 (76.7-93.0)
Negative predictive value % (95% CI)	92.2 (88.5-95.0)	93.4 (89.6-96.1)	98.1 (89.7-100)	89.0 (85.0-92.1)
Positive likelihood ratio (95% CI)	4.5 (3.2-6.0)	7.1 (5.0-9.6)	3.0 (1.7-3.5)	17.6 (9.9-33.1)
Negative likelihood ratio (95% CI)	0.4 (0.3-0.6)	0.3 (0.2-0.4)	0.1 (0.01-0.6)	0.4 (0.3-0.4)

Table 2. Diagnostic accuracy of PCR in peripheral blood, bone marrow and biopsies samples and of the IMMY ALPHA Histoplasma Urine Antigen.

Discussion and Conclusions

To our knowledge this is the largest, national, multicenter and standardized study in HIV population for the performance of different diagnostic tests in disseminated histoplasmosis in México.

In our population, Hc100 PCR and IMMY ALPHA Histoplasma Antigen had a good diagnostic performance for disseminated histoplasmosis in terms of high negative predictive value and specificity respectively. Although the usefulness of the test may vary depending on the disease prevalence and the suspect index of the physician requesting the test. Both tests can be available within hours, are easy to perform and accesible for resource limited laboratories in developing countries.

Nevertheless, the culture-based approach should ensue simultaneously since co-infections are frequent and a negative result of IMMY ALPHA does not discard DH in patients from endemic regions. We acknowledge that there is a more recent kit from IMMY (*IMMY H. capsulatum* GM EIA) commercially available but not FDA approved.

Limitations to our study: despite an intensive diagnostic workup, 50% of the patients could not reach a definite diagnosis. Additionally, we did not perform molecular probe testing for positive cultures to distinguish from other fungi with similar macroconidia to *H. capsulatum*.

1. Azar MM, Hage CA. 2017. Laboratory diagnostics for histoplasmosis. J Clin Microbiol 55:1612-1620. <https://doi.org/10.1128/JCM.02430-16>
 2. Bialek R, et al. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of Histoplasma capsulatum DNA in human tissue. J. Clin. Microbiol. 40: 1644-1647.
 3. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat L.J. Evaluation of the IMMY ALPHA Histoplasma Antigen Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Histoplasmosis Marked by Antigenuria. Clinical and Vaccine Immunology : CVI. 2007;14(6):802-803. doi:10.1128/CVI.00035-07.

XII. ANEXOS

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS POR CADA PACIENTE

"Evaluación de Marcadores Moleculares (PCR para las secuencias 1281-1283220 SCAR y Hc100) para el Diagnóstico de Histoplasmosis Diseminada en Pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida"

I. Marque con una "X" en la casilla correspondiente al centro participante:

<input type="checkbox"/>	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"	<input type="checkbox"/>	Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, S.L.P.
<input type="checkbox"/>	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)	<input type="checkbox"/>	Hospital de Alta Especialidad de Veracruz "Virgilio Uribe"
<input type="checkbox"/>	Hospital General "Dr. Manuel Gea González"	<input type="checkbox"/>	Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca (HRAEO)
<input type="checkbox"/>	Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde", Unidad de VIH, Guadalajara, Jalisco	<input type="checkbox"/>	Hospital Regional de Alta Especialidad de Villa Hermosa, Tabasco
<input type="checkbox"/>	Hospital General de Puebla "Dr. Eduardo Vázquez Navarro"		

II. Datos demográficos:

Registro: _____ Nombre: _____ Edad (años): _____

Género:

<input type="checkbox"/>	Femenino
<input type="checkbox"/>	Masculino

 Ocupación: _____

Servicio de ingreso a:

<input type="checkbox"/>	Urgencias
<input type="checkbox"/>	Hospitalización
<input type="checkbox"/>	Unidad de terapia intensiva

 Fecha de ingreso (dd/mm/aaaa): _____

LUGAR de residencia ACTUAL (ciudad y estado): _____

LUGARES de residencia PREVIA (ciudad y estado): _____

Viajes en los últimos 6 meses:

<input type="checkbox"/>	Si
<input type="checkbox"/>	No

 Especifique lugar: _____

Marque con una "X" si el paciente ha tenido algún factor epidemiológico importante:

<input type="checkbox"/>	Contacto con aves o con sus excretas	<input type="checkbox"/>	Trabaja o haber trabajado en un laboratorio que manipulen cepas de histoplasma
<input type="checkbox"/>	Contacto con murciélagos o con sus excretas	<input type="checkbox"/>	Haber realizado ecoturismo (entrar a cuevas, zonas arqueológicas)
<input type="checkbox"/>	Trabaja o haber trabajado en bodegas	<input type="checkbox"/>	Diagnóstico de histoplasmosis previamente
<input type="checkbox"/>	Exposición laboral (geólogos, mineros, campesinos, trabajar en la construcción, arqueólogos, trabajadores de guano)		

Fecha de diagnóstico de VIH (mm/aaaa): _____

El paciente es virgen a tratamiento antirretroviral:

<input type="checkbox"/>	Si
<input type="checkbox"/>	No

En caso de responder "No" a la pregunta anterior, anote el tratamiento antirretroviral actual o el último que ha recibido el paciente:

Nombre genérico	

Anote los valores más recientes:

CD4+ (cel. /uL) de: _____ Fecha (dd/mm/aaaa): _____

Carga viral VIH (copias/mL) de: _____ Fecha (dd/mm/aaaa): _____

III. Marque con una "X" si el paciente cuenta con alguna de las siguientes comorbilidades:

Infarto agudo miocárdico	EPOC	Diabetes mellitus con lesión a órgano blanco	Linfoma
Insuficiencia cardíaca congestiva	Enfermedad de tejido conectivo	Hemiplejía	Hepatopatía crónica moderada / severa
Enfermedad vascular periférica	Úlcera gastroduodenal	Insuficiencia renal crónica	Tumor o neoplasia sólida con metástasis
Evento vascular cerebral	Hepatopatía crónica leve	Tumor o neoplasia sólida sin metástasis	SIDA
Demencia	Diabetes mellitus sin lesión a órgano blanco	Leucemia	Receptor de trasplante:
Virus Hepatitis B	Virus Hepatitis C		órgano sólido <input type="checkbox"/>
			médula ósea <input type="checkbox"/>

Otro: _____

IV. Marque con una "X" los fármacos que ha consumido el paciente en el último año:

Glucocorticoides	Micofenolato
Inhibidores de TNF- α	Metotrexate
Azatioprina	Quimioterapia
Hidroxicloroquina	Agentes biológicos
Tacrolimus	Otro:
Ciclosporina	Ninguno de los anteriores

V. Marque con una "X" si el paciente tiene otras infecciones oportunistas diagnosticadas de manera concurrente y que el paciente presente actualmente o se encuentre en tratamiento para:

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium avium complex</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>	Cryptococosis
Candida esofágica	Coccidioidomicosis
Herpes simple	Enfermedad por CMV
Toxoplasmosis	Criptosporidiosis
Septicemia por <i>Salmonella</i>	Isosporiasis
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Otro:
Sarcoma de Kaposi	
Sífilis	Ninguno de los anteriores

VI. Marque con una "X" si el paciente actualmente ha recibido tratamiento antifúngico por cualquier causa, en caso de ser afirmativa su respuesta especifique el tiempo de uso y el fármaco:

<input type="checkbox"/>	Si
<input type="checkbox"/>	No

<input type="checkbox"/>	Uso de anti fúngicos por < 72 hr
<input type="checkbox"/>	Uso de anti fúngicos por >72 hr

<input type="checkbox"/>	Fluconazol
<input type="checkbox"/>	Itraconazol
<input type="checkbox"/>	Voriconazol
<input type="checkbox"/>	Anfotericina B
<input type="checkbox"/>	Equinocandinas

VI. Marque con una "X" los datos que presente el paciente en relación a su padecimiento actual:

Signos y Síntomas		Laboratorio		Estudios radiológicos		Tratamiento																																									
	Pérdida de peso		Hemoglobina <10 g/dL	Evidencia radiográfica de involucro pulmonar:		<p>Respuesta clínica a tratamiento empírico con antifúngico en las siguientes dos semanas</p> <table border="1"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Si</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No</td> </tr> </table> <p>Especifique medicamento:</p> <table border="1"> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Fluconazol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Itraconazol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Ketoconazol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Voriconazol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Posaconazol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Anfotericina B deoxicolato</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Anfotericina B complejo lipídico</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Anfotericina B liposomal</td></tr> </table>		<input type="checkbox"/>	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	Fluconazol	<input type="checkbox"/>	Itraconazol	<input type="checkbox"/>	Ketoconazol	<input type="checkbox"/>	Voriconazol	<input type="checkbox"/>	Posaconazol	<input type="checkbox"/>	Anfotericina B deoxicolato	<input type="checkbox"/>	Anfotericina B complejo lipídico	<input type="checkbox"/>	Anfotericina B liposomal																				
<input type="checkbox"/>	Si	<input type="checkbox"/>	No																																												
<input type="checkbox"/>	Fluconazol																																														
<input type="checkbox"/>	Itraconazol																																														
<input type="checkbox"/>	Ketoconazol																																														
<input type="checkbox"/>	Voriconazol																																														
<input type="checkbox"/>	Posaconazol																																														
<input type="checkbox"/>	Anfotericina B deoxicolato																																														
<input type="checkbox"/>	Anfotericina B complejo lipídico																																														
<input type="checkbox"/>	Anfotericina B liposomal																																														
	Disnea		Cuenta total de neutrófilos <1.8 x10 ⁹ /L (<1800/μL)	<table border="1"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Si</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	Si	<input type="checkbox"/>	No																																						
<input type="checkbox"/>	Si	<input type="checkbox"/>	No																																												
	Tos		Plaquetas <100 x10 ⁹ /L (100,000/μL)	<table border="1"> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Consolidaciones</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Infiltrados micronodulares</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Patrón de árbol en gemación</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Nódulos pulmonares</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Lesiones cavitadas</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Derrame pleural</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Adenopatías mediastinales</td></tr> </table>		<input type="checkbox"/>	Consolidaciones	<input type="checkbox"/>	Infiltrados micronodulares	<input type="checkbox"/>	Patrón de árbol en gemación	<input type="checkbox"/>	Nódulos pulmonares	<input type="checkbox"/>	Lesiones cavitadas	<input type="checkbox"/>	Derrame pleural	<input type="checkbox"/>	Adenopatías mediastinales																												
<input type="checkbox"/>	Consolidaciones																																														
<input type="checkbox"/>	Infiltrados micronodulares																																														
<input type="checkbox"/>	Patrón de árbol en gemación																																														
<input type="checkbox"/>	Nódulos pulmonares																																														
<input type="checkbox"/>	Lesiones cavitadas																																														
<input type="checkbox"/>	Derrame pleural																																														
<input type="checkbox"/>	Adenopatías mediastinales																																														
	Náusea		Elevación de AST (>2 veces el límite superior de referencia)	Evidencia radiográfica de involucro extrapulmonar:																																											
	Vómito		Elevación de DHL (>2 veces el límite superior normal)	<table border="1"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Si</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	Si	<input type="checkbox"/>	No																																						
<input type="checkbox"/>	Si	<input type="checkbox"/>	No																																												
	Diarrea		Elevación de ferritina	<p>Tipo de estudio y hallazgos:</p> <table border="1"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Ultrasonido</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>TAC</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	Ultrasonido	<input type="checkbox"/>	TAC																																						
<input type="checkbox"/>	Ultrasonido	<input type="checkbox"/>	TAC																																												
	Fiebre			<table border="1"> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Adenopatías cervicales</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Adenopatías axilares</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Adenopatías mediastinales</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Adenopatías abdominales</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Adenopatías retroperitoneales</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Adenopatías inguinales</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Hepatomegalia</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Abscesos hepáticos</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Esplenomegalia</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Abscesos esplénicos</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Pancreatitis</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Colecistitis</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Lesiones adrenales</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Lesiones en colon o intestino delgado</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Lesiones en SNC</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Pericarditis</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Endocarditis</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Osteomielitis</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Artritis séptica</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Prostatitis</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Epididimitis</td></tr> </table>		<input type="checkbox"/>	Adenopatías cervicales	<input type="checkbox"/>	Adenopatías axilares	<input type="checkbox"/>	Adenopatías mediastinales	<input type="checkbox"/>	Adenopatías abdominales	<input type="checkbox"/>	Adenopatías retroperitoneales	<input type="checkbox"/>	Adenopatías inguinales	<input type="checkbox"/>	Hepatomegalia	<input type="checkbox"/>	Abscesos hepáticos	<input type="checkbox"/>	Esplenomegalia	<input type="checkbox"/>	Abscesos esplénicos	<input type="checkbox"/>	Pancreatitis	<input type="checkbox"/>	Colecistitis	<input type="checkbox"/>	Lesiones adrenales	<input type="checkbox"/>	Lesiones en colon o intestino delgado	<input type="checkbox"/>	Lesiones en SNC	<input type="checkbox"/>	Pericarditis	<input type="checkbox"/>	Endocarditis	<input type="checkbox"/>	Osteomielitis	<input type="checkbox"/>	Artritis séptica	<input type="checkbox"/>	Prostatitis	<input type="checkbox"/>	Epididimitis
<input type="checkbox"/>	Adenopatías cervicales																																														
<input type="checkbox"/>	Adenopatías axilares																																														
<input type="checkbox"/>	Adenopatías mediastinales																																														
<input type="checkbox"/>	Adenopatías abdominales																																														
<input type="checkbox"/>	Adenopatías retroperitoneales																																														
<input type="checkbox"/>	Adenopatías inguinales																																														
<input type="checkbox"/>	Hepatomegalia																																														
<input type="checkbox"/>	Abscesos hepáticos																																														
<input type="checkbox"/>	Esplenomegalia																																														
<input type="checkbox"/>	Abscesos esplénicos																																														
<input type="checkbox"/>	Pancreatitis																																														
<input type="checkbox"/>	Colecistitis																																														
<input type="checkbox"/>	Lesiones adrenales																																														
<input type="checkbox"/>	Lesiones en colon o intestino delgado																																														
<input type="checkbox"/>	Lesiones en SNC																																														
<input type="checkbox"/>	Pericarditis																																														
<input type="checkbox"/>	Endocarditis																																														
<input type="checkbox"/>	Osteomielitis																																														
<input type="checkbox"/>	Artritis séptica																																														
<input type="checkbox"/>	Prostatitis																																														
<input type="checkbox"/>	Epididimitis																																														
	Adenopatías																																														
	Hepatomegalia																																														
	Esplenomegalia																																														
	Úlceras en mucosas																																														
	Lesiones cutáneas																																														
	Sangrado o úlceras en tubo digestivo																																														
	Lesión renal aguda																																														

VII. Solo si se cuentan con los siguientes datos favor de anotar los resultados de los laboratorios al ingreso del paciente:

LABORATORIOS	RESULTADO
Hemoglobina (g/dl)	
Hematocrito (%)	
Leucocitos (cel. x 1000/mm ³)	
Neutrófilos (%)	
Linfocitos (%)	
Plaquetas (cel. x 1000/mm ³)	
Glucosa (mg/dl)	
Creatinina (mg/dl)	
BUN (mg/dl)	
Sodio (mEq/l)	
Potasio (mEq/l)	
Cloro (mEq/l)	
CO2 (mEq/l)	
ALT (TGP) (UI/L)	
AST (TGO) (UI/L)	
Bilirrubina total (mg/dl)	
Bilirrubina directa (mg/dl)	
Bilirrubina indirecta (mg/dl)	
Fosfatasa alcalina (mg/dl)	
Gamaglutamiltranspeptidasa (mg/dl)	
Proteínas totales (g/dl)	
Albúmina (g/dl)	
Globulina (g/dl)	
VSG (mm/hr)	
PCR (mg/dl)	
DHL (mg/dl)	
Ferritina (ng/ml)	

VIII. Marque con una "X" las muestras que se tomaron al paciente y serán enviadas al "Laboratorio de Microbiología del INCMNSZ" para su análisis:

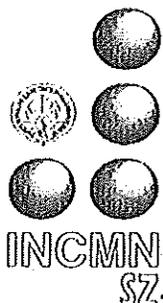
<p>A) 1-5 mL de sangre periférica para el cultivo por lisis</p> <p><input type="checkbox"/> Frasco BACTEC Myco/F Lytic Culture Vials)</p>	<p>E) 7-14 mL de médula ósea para cultivo y PCR para 1281-1283₂₂₀ SCAR y del gene Hc100</p> <table border="1" data-bbox="737 394 1390 1115"> <tr> <td data-bbox="737 394 812 485"></td> <td data-bbox="812 394 1390 485">Frasco BACTEC Myco/F Lytic Culture Vials (1-5ml)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 485 812 575"></td> <td data-bbox="812 485 1390 575">Frasco BACTEC peds Plus/F Culture Vials (1-3 ml)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 575 812 646"></td> <td data-bbox="812 575 1390 646">Tubo con agar Sabouraud (0.5-1 ml)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 646 812 718"></td> <td data-bbox="812 646 1390 718">Tubo con agar Lowenstein-Jensen (0.5-1 ml)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 718 812 842"></td> <td data-bbox="812 718 1390 842">4 mL de sangre de médula ósea para PCR para 1281-1283₂₂₀ SCAR y del gene Hc100 en tubo EDTA</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 842 812 913"></td> <td data-bbox="812 842 1390 913">Laminilla para tinción de Gram</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 913 812 984"></td> <td data-bbox="812 913 1390 984">Laminilla para tinción ZN</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 984 812 1056"></td> <td data-bbox="812 984 1390 1056">Laminilla para tinción de Grocott</td> </tr> <tr> <td data-bbox="737 1056 812 1115"></td> <td data-bbox="812 1056 1390 1115">Laminilla para tinción de Wright</td> </tr> </table>		Frasco BACTEC Myco/F Lytic Culture Vials (1-5ml)		Frasco BACTEC peds Plus/F Culture Vials (1-3 ml)		Tubo con agar Sabouraud (0.5-1 ml)		Tubo con agar Lowenstein-Jensen (0.5-1 ml)		4 mL de sangre de médula ósea para PCR para 1281-1283 ₂₂₀ SCAR y del gene Hc100 en tubo EDTA		Laminilla para tinción de Gram		Laminilla para tinción ZN		Laminilla para tinción de Grocott		Laminilla para tinción de Wright
	Frasco BACTEC Myco/F Lytic Culture Vials (1-5ml)																		
	Frasco BACTEC peds Plus/F Culture Vials (1-3 ml)																		
	Tubo con agar Sabouraud (0.5-1 ml)																		
	Tubo con agar Lowenstein-Jensen (0.5-1 ml)																		
	4 mL de sangre de médula ósea para PCR para 1281-1283 ₂₂₀ SCAR y del gene Hc100 en tubo EDTA																		
	Laminilla para tinción de Gram																		
	Laminilla para tinción ZN																		
	Laminilla para tinción de Grocott																		
	Laminilla para tinción de Wright																		
<p>B) 4 mL de sangre periférica para obtener concentrado leucocitario para tinción</p> <p><input type="checkbox"/> En tubo de EDTA</p>	<p>F) Biopsia de tejido para cultivo</p> <p><input type="checkbox"/> En medio de transporte de Stuart</p> <p>Especifique sitio anatómico:</p> <p>_____</p>																		
<p>C) 4 mL de sangre periférica para realizar PCR 1281-1283₂₂₀ SCAR y del gene Hc100</p> <p><input type="checkbox"/> En tubo de EDTA</p>	<p>G) Biopsia de tejido para patología</p> <p><input type="checkbox"/> En frasco con formol</p> <p>Especifique sitio anatómico:</p> <p>_____</p>																		
<p>D) 20 mL de orina para detectar antígeno de <i>H. capsulatum</i></p> <p><input type="checkbox"/> En frasco estéril para recolección de orina</p>																			

IX. Marque con una "X" como clasificaría al paciente con la información que cuenta hasta el momento:

<p>SOSPECHA DE HISTOPLASMOSIS DISEMINADA:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermo conocido con infección por VIH con o sin tratamiento antirretroviral que presente FIEBRE y al menos dos de las siguientes manifestaciones: <ul style="list-style-type: none"> ○ Adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, úlceras en mucosas, lesiones cutáneas, sangrado o úlceras en tubo digestivo ○ Bicitopenia o pancitopenia*, elevación de AST (>2 veces el límite superior de referencia), elevación DHL (>2 veces el límite superior de referencia), elevación de ferritina <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bicitopenia o pancitopenia*: Hemoglobina <10 g/dL (100 g/L); cuenta total de neutrófilos <1.8 x10⁹/L (<1800/μL); plaquetas <100 x10⁹/L (<100,000/μL) <p>Evidencia radiográfica de involucro extrapulmonar</p>
<p>CASO PROBABLE DE HISTOPLASMOSIS DISEMIANADA:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA para VIH positivo + 2 de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ○ Antígeno urinario para histoplasma positivo y/o ○ Concentrado leucocitario con levaduras intracelulares, y/o ○ Citopenias sin otra explicación y/o ○ Respuesta clínica a tratamiento empírico en las siguientes dos semanas
<p>RESPUESTA CLÍNICA A TRATAMIENTO EMPÍRICO:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El paciente deberá cumplir todas las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ○ Temperatura máxima diaria menor a 37.8 °C por 72 h consecutivas sin uso de antipiréticos ○ No presentar incremento en la gravedad de signos, síntomas o anormalidades en el laboratorio atribuibles a histoplasmosis ○ Resolución de al menos un signo o síntoma de histoplasmosis que calificó al paciente para ingresar al protocolo
<p>CASO PROBADO DE HISTOPLASMOSIS DISEMINADA:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA para VIH positivo y uno o más de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ○ Cultivo positivo (Hemocultivo por lisis, mielocultivo, cultivo de tejido) ○ Histopatología compatible con histoplasma (levaduras intracelulares) en cualquier muestra clínica de tejidos
<p>CASO DESCARTADO DE HISTOPLASMOSIS DISEMIANDA:</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes en los cuales posterior a transcurrido el periodo de incubación del cultivo no exista evidencia de crecimiento de histoplasma, o bien que se haya identificado otra causa de los signos y síntomas iniciales con antígeno urinario negativo y que no haya requerido tratamiento anti fúngico.

Nombre de quien llenó el cuestionario: _____

Fecha de llenado: _____



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO: "Evaluación de Marcadores Moleculares (PCR para las secuencias 1281-1283₂₂₀ SCAR y Hc100) para el Diagnóstico de Histoplasmosis Diseminada en Pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida"

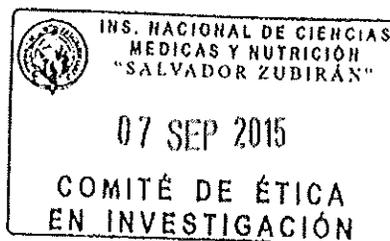
Investigador principal: Dra. Rosa Areli Martínez Gamboa

Dirección del investigador: Avenida Vasco de Quiroga, Número15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan, Código Postal 14080, México, Distrito Federal.

Teléfono de contacto del investigador (incluyendo uno para emergencias): 54870900 Ext. 5867, Celular: 044 55 31174210

Investigadores participantes:

- Luis Alfredo Ponce de León Garduño
- Pedro Torres González
- Miriam Bobadilla del Valle
- Andrea Rangel Cordero
- Brenda Crabtree Ramírez
- José Sifuentes Osornio
- María Dolores Niembro Ortega



Nombre del patrocinador del estudio: Laboratorio de Microbiología Clínica, INCMNSZ

Dirección del patrocinador: Avenida Vasco de Quiroga, Número15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan, Código Postal 14080, México, Distrito Federal.

Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación: Primera Versión, 23 de Junio de 2015.

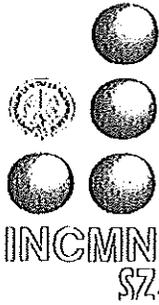
INTRODUCCIÓN:

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, la Declaración de Helsinki y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

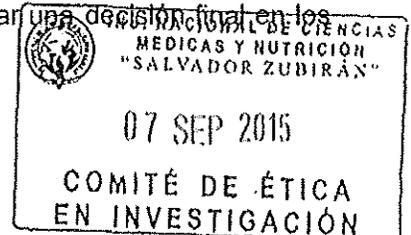
Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios con el fin tomar una decisión informada. Este formato de consentimiento informado le dará información detallada acerca del estudio de investigación que podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Procedimiento para dar su consentimiento: Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar en esta investigación, y se puede solicitar todo el tiempo que requiera para considerar esta invitación. El investigador le explicará ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y tendrá todo el tiempo que requiera para pensar solo o con usted decida consultarlo para decirle al investigador acerca de su decisión. Esta decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto. Al final de esta explicación, usted debe entender los puntos siguientes:



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de que son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.
- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
- VII. La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello los prejuicios se cree que continuar con la atención y el tratamiento.
- VIII. La seguridad de que no va a identificar al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
- IX. El compromiso de proporcionar información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esto podría afectar a la disposición para continuar su participación.
- X. La disponibilidad de tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación. Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de dar una decisión final en los días futuros.



INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado Sr.(a) _____

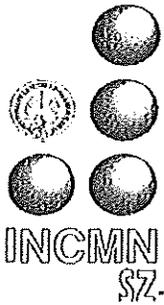
El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición le invitan a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo: Determinar la utilidad que tienen dos estudios que se realizan en sangre llamados "PCR dirigida a la región 1281-1283₂₂₀ SCAR" y "PCR dirigida al gene Hc100" para compararlos con otros estudios que se hacen de manera habitual en el diagnóstico de una infección diseminada causada por un hongo llamado *Histoplasma capsulatum* que puede afectar de forma común a personas que viven con la infección producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA) y que puede poner en riesgo su vida si no se diagnostica de forma oportuna y se inicia el tratamiento adecuado.

La duración del estudio será de dos años o hasta que se tenga el número suficiente de pacientes para evaluar las nuevas pruebas diagnósticas.

El número aproximado de participantes será: 200 pacientes.

Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características:

- Enfermo conocido con infección por VIH con o sin tratamiento antirretroviral y que presenta FIEBRE y al menos dos de las siguientes manifestaciones:
 - Crecimiento generalizado de ganglios, aumento en el tamaño del hígado y/o el bazo, úlceras en mucosas, lesiones en la piel, sangrado o úlceras en tubo digestivo



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

- Alguna alteración en los siguientes laboratorios: disminución de los niveles de leucocitos, hemoglobina y/o plaquetas; elevación de los niveles de enzimas hepáticas, DHL y/o ferritina
- Evidencia por estudios de imagen de alguna alteración radiográfica en pulmón o en algún otro órgano que sugieran infección por el hongo llamado *Histoplasma capsulatum*

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

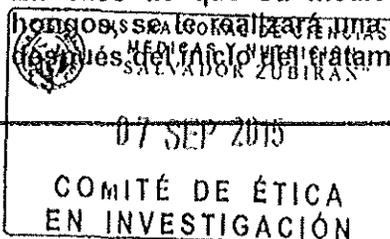
El procedimiento que será evaluado es: Una prueba de laboratorio llamada PCR para 1281-1283²²⁰ SCAR y del gene Hc100 en sangre para el diagnóstico de infección por *Histoplasma capsulatum*

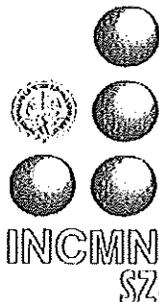
Será comparado contra: Las pruebas que se hacen habitualmente en estos casos cuando se sospecha infección por *Histoplasma capsulatum*, es decir, cultivos de sangre, médula ósea, tejidos; biopsias evaluadas por patología, estudios de sangre y una prueba en orina para la detección del hongo.

Su probabilidad para ser asignado a uno de los grupos antes mencionado es: A todos los pacientes que acepten participar en el protocolo se les realizará todas las pruebas que se hacen habitualmente para el diagnóstico de infección por *Histoplasma capsulatum* y también se les realizará la PCR en muestras de sangre y/o tejidos.

Su participación en el estudio consiste en:

1. En el momento que acepte participar se le realizará una entrevista detallada (Historia Clínica) para recabar información importante acerca de sus antecedentes familiares, viajes, exposiciones de riesgo (exposición a tóxicos, tabaquismo, consumo de alcohol, otras drogas, lugares de residencia previos, entre otras), consumo de medicamentos de manera crónica, enfermedades conocidas, etc. Además se le realizará una evaluación médica completa.
2. Como parte del abordaje diagnóstico de rutina que se realiza de manera habitual en todo paciente que se tenga sospecha de infección por *Histoplasma capsulatum* se le tomarán muestras de sangre y orina.
3. En caso que su médico tratante así lo considere también se le realizará cultivo de médula ósea (tejido donde se producen las células de la sangre y que se encuentra recubierto por los huesos grandes) y/o biopsia de tejidos, según los hallazgos clínicos.
4. En caso de que su médico tratante decida iniciar tratamiento con cobertura para hongos, se le realizará una visita para evaluar la respuesta clínica a los 14 a 21 días después del inicio del tratamiento.





INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN"

Los procedimientos del estudio incluyen la realización de:

Las siguientes muestras se toman de manera habitual en cualquier paciente con sospecha de infección por *Histoplasma capsulatum* como abordaje diagnóstico, aún cuando usted no decida participar en el estudio:

- 10 mL de sangre periférica para el cultivo por lisis
- 10 mL de orina para detectar antígeno de *H. capsulatum*
- 4 mL de sangre periférica para obtener concentrado leucocitario para tinción

Además en caso de que su médico tratante así lo decida también se tomarán las siguientes muestras, independientemente de que decida participar o no el estudio:

- Se tomarán de 12-20 mL de médula ósea para cultivo
- Toma de biopsias de tejidos según amerite el caso

Las siguientes pruebas se obtendrán durante la misma punción que se realice para obtener las muestras anteriores, y representan la única muestra adicional a tomar como parte del estudio:

- 4 mL de sangre periférica en tubo de EDTA para realizar PCR 1281-1283₂₂₀ SCAR y del gene Hc100

A estas muestras adicionales se les:

- Realizará una prueba molecular que consiste en la amplificación de genes del hongo que detecta la secuencia 1281-1283₂₂₀ SCAR y del gene Hc100 en su sangre y en caso de que se cuente con muestras clínicas de médula ósea y en biopsias de tejido se realizará también.

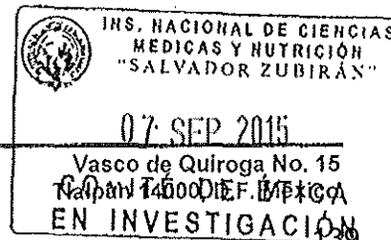
Las intervenciones incluidas en el estudio que son parte de su tratamiento estándar son:

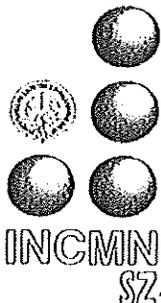
- Cultivo de sangre y médula ósea; muestra de sangre para su análisis microscópico en búsqueda de datos sugestivos de histoplasma; toma de biopsias para análisis histopatológico y cultivo; búsqueda de antígeno de histoplasma en orina.

RIESGOS E INCONVENIENTES

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones.

No existe riesgo de ningún tipo en la obtención de la muestra de orina.





INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

Con la toma de biopsias el riesgo es variable dependiendo de las características del pacientes y del sitio de donde se obtendrá el tejido, sin embargo en general incluyen los siguientes riesgos: sangrado, hipotensión, infección local o sistémica, lesión de estructuras vasculares o nerviosas. Esto no es un riesgo adicional por participar en este estudio ya que sólo se llevarán a cabo si su médico lo considera necesario en el abordaje diagnóstico de la molestia que lo aqueja.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

BENEFICIOS POTENCIALES

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda de tener una prueba accesible y barata que permita confirmar el diagnóstico de histoplasmosis, podría ser muy útil para otros pacientes en el futuro. Además gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender esta complicación médica.

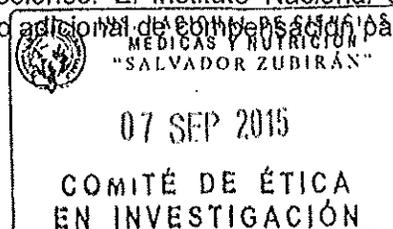
CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

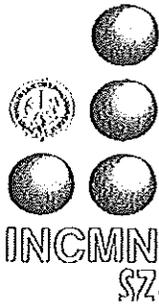
No se cobrará ninguna tarifa por la participación en el estudio, sin embargo, los costos de su atención médica (consulta, hospitalización, medicamentos, estudios de rayos X, ultrasonido, tomografías, gamagramas, resonancia magnética y estudios de PET) no serán cubiertas por el estudio. Al decidir participar en el mismo no se le cobrará los siguientes estudios tomados por sospecha de histoplasmosis diseminada y progresiva:

- PCR 1281-1283₂₂₀ SCAR y del gene Hc100 en sangre
- Hemocultivo por lisis
- Antígeno de histoplasma en orina
- Mielocultivo
- Concentrado leucocitario
- Análisis histopatológico de biopsias de tejidos tomadas

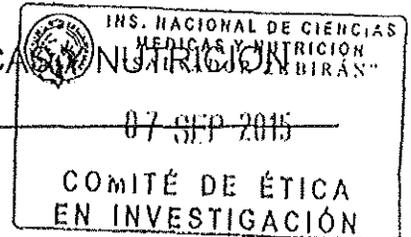
COMPENSACION

Si sufre lesiones como resultado de su participación en este estudio, nosotros le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, en caso de ameritarlo, al especialista médico que requiera. No contamos con presupuesto para financiar compensaciones por lesiones. El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán no brinda ningún tipo adicional de compensación para cubrir el daño.





INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"



ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:

Su participación es voluntaria. Sin embargo, usted puede elegir no participar en el estudio sin que esto condicione su tratamiento o atención como paciente en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:

Los materiales serán propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ). Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero.

ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio a la Dra. Areli Martínez Gamboa del INCMNSZ (tel 5554870900 x 5867). La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:

Su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se le informará a tiempo si nueva información es obtenida que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

El investigador o el patrocinador del estudio puede excluirlo del estudio si:

- No se cuenta con información completa en su expediente clínico que sea necesaria para el estudio
- Si la muestra de sangre que se le tome para el análisis de la PCR para 1281-1283220 SCAR y Hc100 tiene algún contaminante que no permita su análisis

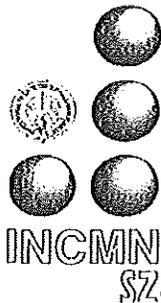
El estudio puede ser terminado en forma prematura si:

- Durante el análisis interino se identifica una diferencia importante en los resultados en comparación con las pruebas diagnósticas habituales o bien si se agotan los fondos destinados para llevar a cabo este estudio.

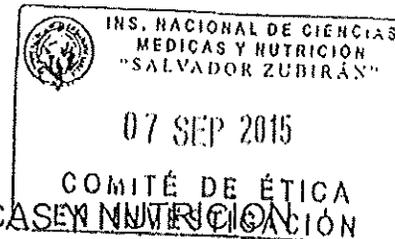
Si usted decide ya no participar en el estudio solo requiere informarlo al investigador responsable.

CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas así como



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"



su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que no estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por diez años.

Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Solo los investigadores tendrán acceso. Existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio. Su confidencialidad será protegida como lo marca la ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o
- Es solicitado por la ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes. Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

El Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición aprobaron la realización de éste estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de ética que supervisan este estudio para que decidamos la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice recontactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

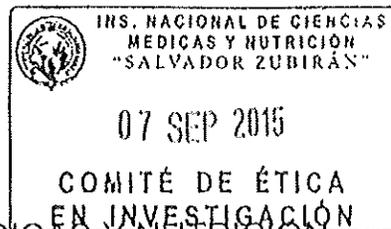
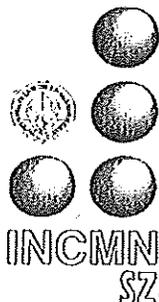
Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio

IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con Dra. Areli Martínez Gamboa en el INCMNSZ (teléfono: 54870900, Ext. 5867).

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con Dra. María Dolores Niembro Ortega en el INCMNSZ (teléfono: 54870900, Ext. 5869).

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga. Teléfono: 54870900 ext. 6101).



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRAN"

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

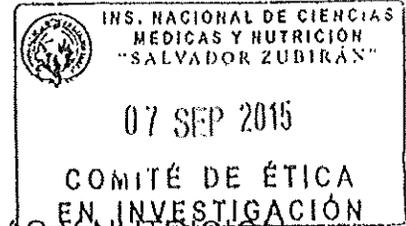
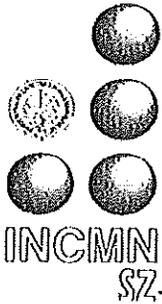
Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas de sangre, orina, médula ósea o tejido para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas

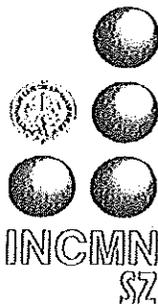
- | | SÍ
(marque
por
favor) | NO
(marque
por
favor) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| f. Autoriza se dé acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios al INCMNSZ, sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio, otras agencias gubernamentales de la salud en México y posiblemente otras agencias gubernamentales de la salud en otros países en donde se pueda considerar al fármaco en estudio para la aprobación de su comercialización? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| g. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |



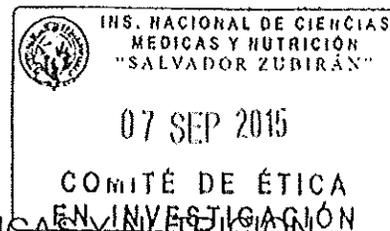
**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRAN"**

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
desconocidos, de participar en este estudio?		
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. <i>Si aplica</i> ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Declaración del paciente: Yo, _____ declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si los solicito. Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con la **Dra. Areli Martínez gamboa y/o María Dolores Niembro Ortega, teléfono 54870900 Ext. 5867 y 5869.** Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante en el estudio, problemas, preocupaciones o preguntas, obtener información, y ofrecer información que puede hablar con el coordinador del Comité de Ética de Investigación de INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga Tel: 54870900. ext 6101). Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco) o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible. He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRAN"



preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Nombre del Participante Firma del Participante Fecha

Coloque su huella digital si no sabe escribir

Nombre del representante legal (si aplica) Firma del representante legal Fecha

Nombre del Investigador que explicó el documento Firma del Investigador Fecha

Nombre del Testigo 1 Firma del Testigo 1 Fecha
Relación con el participante: _____

Dirección: _____

Nombre del Testigo 2 Firma del Testigo 2 Fecha

Dirección: _____

Relación que guarda con el participante: _____

Lugar y Fecha: _____
(El presente documento es original y consta de 10 páginas)

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Darling ST. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymph nodes. *JAMA* 1906; 46: 1283-1285.
2. Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, et al. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River Valley. *Curr Trop Med Rep* 2015; 2(2): 70-80.
3. Chu JH, Feudtner C, Heydon K, et al. Hospitalizations for endemic mycoses: a population-based national study. *Clin Infect Dis* 2006;42(6):822–5.
4. Hammerman KJ, Powell KE, Tosh FE. The incidence of hospitalized cases of systemic mycotic infections. *Sabouraudia* 1974;12:33–45.
5. Edwards LB, Acquaviva FA, Livesay VT, et al. An atlas of sensitivity to tuberculin, PPD-B and histoplasmin in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1969;99:1–18.
6. Aguirre-Pequeño E. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del noreste de México. *Gac Méd Méx* 1959; 4: 243-253.
7. Perrín TG, Martínez-Báez M. Nota sobre el primer caso de histoplasmosis en México. *Rev Inst Salubr Enferm Trop* 1943; 4:79-80.
8. Valle del J, Pedroza S, Alcántara R, Weber R. Histoplasmosis pulmonar en la Laguna. *Rev Méx Tuberc* 1957; 18: 521-532.
9. Martínez-Báez M. Histoplasmosis pulmonar aguda primaria (comentario al trabajo del Dr. González-Ochoa). *Gac Méd Méx* 1957; 87: 751-753.
10. Skinner JB. Newer occupational diseases. *New Engl J Med* 1950; 243: 482-486.
11. González-Ochoa A. Epidemiología de la histoplasmosis primaria en México. *Rev Inst Salubr Enferm Trop Mex.* 1963; 23: 65-80.
12. González-Ochoa A., Félix D. Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmina en México. *Rev. Invest Salud Publ* 1971; 31: 74-77.

13. González-Ochoa A., Medina EE, Cáceres M. Investigación de la reactividad cutánea a la histoplasmina, tuberculina y coccidioidina, relacionada con catastro en Yucatán. *Rev Inst Salubr Enferm Trop Méx* 1948; 9: 55-63.
14. González-Ochoa A., Geografía de las micosis profundas. *Rev Invest Salud Publ* 1975; 35: 85-96.
15. Pedroza-Serés M, Quiroz-Mercado H, Granados J, Taylor ML. The syndrome of presumed ocular histoplasmosis in Mexico: A preliminary study. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 83-92.
16. Taylor ML, Granados J, Toriello C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis, in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 1996; 39: 375-379.
17. Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* 1997; 138: 137-141.
18. Vaca-Marín MA, Martínez-Rivera MA, Flores-Estrada JJ. Histoplasmosis en México. Aspectos históricos y epidemiológicos. *Rev Inst nal Enf Resp Mex* 1998; 11: 208-215.
19. Adenis AA, Aznar C, Couppie P. Histoplasmosis in HIV-infected patients: a review of new developments and remaining gaps. *Curr Trop Med Rep* 2014; 1: 119–28.
20. Adenis A, Nacher M, Hanf M, et al. Tuberculosis and histoplasmosis among human immunodeficiency virus–infected patients: a comparative study. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 90: 216–23.
21. Nacher M, Adenis A, Arathoon E, et al. Disseminated histoplasmosis in Central and South America, the invisible elephant: the lethal blind spot of international health organizations *AIDS* 2016; 30: 167–70.
22. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. Contract No.: UNAIDS / JC2502/1/E. Geneva: UNAIDS, 2013.
23. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, Kauffman CA. Clinical practice guidelines for the management of patients with

- histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2007; 45:807–825.
24. Gutierrez ME, Canton A, Sosa N, Puga E, Talavera L. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1199–1202.
 25. Samoya B, Mercado E, Argueta D, Scheel C, Guzman B, Amado I, et al. Disseminated histoplasmosis (DH) before and after the implementation of urine antigen detection ELISA (UADE) in an HIV clinic in Guatemala. ICCAC, San Francisco, 9 September 2012.
 26. Redondo MC. Disseminated histoplasmosis in Venezuelan AIDS patients. *Infect Dis Clin Pract* 1995; 4:300–303.
 27. Daher EF, Silva GB, Barros FA, Takeda CF, Mota RM, Ferreira MT, et al. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis in HIV patients from Brazil. *Trop Med Int Health* 2007; 12:1108–1115.
 28. Nacher M, Adenis A, Adriouch L, Dufour J, Papot E, Hanf M, et al. What is AIDS in the Amazon and the Guianas? Establishing the burden of disseminated histoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84:239–240.
 29. Vantilcke V, Sobesky M, Cabie´ A, Couppie´ P, Boulard F, Bissuel F. Fever in hospitalized HIV-infected patients in Western French Guiana: first think histoplasmosis. *Int J STD AIDS* 2014; 25:656–661.
 30. Adenis, A. A., Valdes, A., Cropet, C., McCotter, O. Z., Derado, G., Couppie, P., Nacher, M. (2018). Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*. doi:10.1016/s1473-3099(18)30354-2.
 31. B Maresca, G S Kobayashi. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Jun 1989, 53 (2) 186-209.
 32. Kasuga, T. , White, T. J., Koenig, G. , Mcewen, J. , Restrepo, A. , Castañeda, E. , Da Silva Lacaz, C. , Heins-Vaccari, E. M., De Freitas, R. S., Zancopé-Oliveira, R. M., Qin, Z. , Negroni, R. , Carter, D. A., Mikami, Y. , Tamura, M. , Taylor, M. L., Miller, . G., Poonwan, N. and Taylor, J. W. (2003),

- Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Ecology*, 12: 3383-3401. doi:[10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x)
33. Emmons CW, "Histoplasmosis: Animal Reservoirs and Other Sources in Nature of Pathogenic Fungus, Histoplasma" *American journal of public health and the nation's health* vol. 40,4 (1950): 436-40.
 34. Cottle LE, Gkrania-Klotsas E, Williams HJ, et al. A multinational outbreak of histoplasmosis following a biology field trip in the Ugandan rainforest. *J Travel Med* 2013; 20(2): 83-7.
 35. Medeiros AA, Marty SD, Tosh FE, et al. Erythema nodosum and erythema multiforme as clinical manifestations of histoplasmosis in a community outbreak. *N Engl J Med* 1966; 274: 415-20. Leads from the MMWR. Cave-associated histoplasmosis-Costa Rica. *JAMA* 1988; 259(24): 3535-6.
 36. Edwards MR, Hazen EL, Edwards GA. The micromorphology of the tuberculate spores of *Histoplasma capsulatum*. *Can J Microbiol.* 1960 Feb; 6:65-70.
 37. Smith, C. D. (1971a). "Nutritional factors that are required for the growth and sporulation of *Histoplasma capsulatum*," in *Histoplasmosis. Proceedings of the Second National Conference*, eds L. Ajello, E. W. Chick, and M. L. Furcolow (Springfield, IL: C Thomas), 64–70.
 38. Kwon-Chung, K. H. 1972. *Emmonsia capsulata*: Perfect State of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 204:368-369.
 39. Loulergue P, Bastides F, Baudouin V, et al. Literature Review and Case Histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* Infections in HIV-infected Patients. *Emerging Infectious Diseases.* 2007;13(11):1647-1652. doi:10.3201/eid1311.070665.
 40. Horwath MC, Fecher ra, Deepe GS Jr. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. *Future Microbiol* 2015; 10:967-75.
 41. Kwon-Chung, K. J., and Bennett, J. E. (1992). *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger.
 42. Hempel, H., and N. L. Goodman. 1975. Rapid conversion of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Sporothrix schenckii* in tissue

- culture. *J. Clin. Microbiol.* 1:420-424.
43. Medoff, G., G. S. Kobayashi, A. Painter, and S. Travis. 1987. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 55:1355-1358.
 44. Maresca, B., A. M. Lambowitz, V. B. Kumar, G. A. Grant, G. S. Kobayashi, and G. Medoff. 1981. Role of cysteine in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4596-4600.
 45. Howard, D. H. 1964. Intracellular behavior of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 87:33-38.
 46. Groppe, L., Goldman W.E. *Histoplasma* Variation and Adaptive Strategies for Parasitism: New Perspectives on Histoplasmosis. *Clin Microb Rev* 1991, 4: 411-421.
 47. Groppe, L., Goldman W.E. *Histoplasma* Variation and Adaptive Strategies for Parasitism: New Perspectives on Histoplasmosis. *Clin Microb Rev* 1991, 4: 411-421.
 48. Eissenberg LG, Goldman WE, Schlesinger PH: *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J Exp Med.* 177:1605-1611 1993 [8496679](#)
 49. Newman SL: Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum* . *Trends Microbiol.* 7:67-71 1999 [10081083](#)
 50. Lawrence J. Wheat, Marwan M. Azar, Nathan C. Bahr, Andrej Spec, Ryan F. Relich, Chadi Hage, *Histoplasmosis, Infectious Disease Clinics of North America*, Volume 30, Issue 1, 2016, Pages 207-227.
 51. Kauffman, C. A. (2007). *Histoplasmosis: a clinical and laboratory update.* *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 115–132.
 52. Wheat, L. J., Freifeld, A. G., Kleiman, M. B., Baddley, J. W., McKinsey, D. S., Loyd, J. E., and Kauffman, C. A. (2007). Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 45, 807–825.
 53. Centers for Disease Control and Prevention. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC,

- the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53(No. RR-15):34–35.
54. Wheat LJ, Slama TG, Norton JA, et al.: Risk factors for disseminated or fatal histoplasmosis. *Ann Intern Med.* 96:159-163 1982 [7059062](#)
 55. Lee JH, Slifman NR, Gershon SK, et al.: Life-threatening histoplasmosis complicating immunotherapy with tumor necrosis factor α antagonists infliximab and etanercept. *Arthritis Rheum.* 46:2565-2570 2002 [12384912](#)
 56. Laboratory Update. *Clinical Microbiology Reviews* Jan 2007, 20 (1) 115-132; DOI: 10.1128/CMR.00027-06
 57. McKinsey DS, Spiegel RA, Hutwagner L, et al.: Prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: incidence, risk factors, and pathophysiology. *Clin Infect Dis.* 24:1195-1203 1997 [9195082](#)
 58. Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, et al. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J Infect Dis* 2002; 186 (11): 1655-60.
 59. Conces DJ, Stockberger SM, Tarver RD, et al.: Disseminated histoplasmosis in AIDS: findings on chest radiographs. *AJR.* 160:15-19 1993
 60. Ben De Pauw, Thomas J. Walsh, J. Peter Donnelly, David A. Stevens, John E. Edwards, Thierry Calandra, Peter G. Pappas, Johan Maertens, Olivier Lortholary, Carol A. Kauffman, David W. Denning, Thomas F. Patterson, Georg Maschmeyer, Jacques Bille, William E. Dismukes, Raoul Herbrecht, William W. Hope, Christopher C. Kibbler, Bart Jan Kullberg, Kieren A. Marr, Patricia Muñoz, Frank C. Odds, John R. Perfect, Angela Restrepo, Markus Ruhnke, Brahm H. Segal, Jack D. Sobel, Tania C. Sorrell, Claudio Viscoli, John R. Wingard, Theoklis Zaoutis, John E. Bennett; Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 46,

- Issue 12, 15 June 2008, Pages 1813–1821, <https://doi.org/10.1086/588660>
61. Couppié P., Aznar C., Carme B., et al. “American histoplasmosis in developing countries with a special focus on patients with HIV: diagnosis, treatment, and prognosis”, *Curr Opin Infect Dis* 19:443-449. PMID: 16940867
 62. Chadi A. Hage, Julie A. Ribes, Nancy L. Wengenack, Larry M. Baddour, Maha Assi, David S. McKinsey, Kassem Hammoud, Daisy Alapat, N. Esther Babady, Michelle Parker, DeAnna Fuller, Aliya Noor, Thomas E. Davis, Mark Rodgers, Patricia A. Connolly, Boutros El Haddad, L. Joseph Wheat; A Multicenter Evaluation of Tests for Diagnosis of Histoplasmosis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 53, Issue 5, 1 September 2011, Pages 448–454, <https://doi.org/10.1093/cid/cir435>
 63. Santiago AR, Hernandez B, Rodriguez M, et al. A comparative study of blood culture convention method vs a modified lysis/centrifugation technique for the diagnosis of fungemias. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 198-201. PMID: 15709801.
 64. Horsburg Jr., C.R. 1991. Mycobacterium avium Complex Infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* 324:1332-1338. PMID:2017230.
 65. BD BACTECTM Myco/F Lytic Culture Vials Supplemented Middlebrook 7H9 and Brain Heart Infusion Broth For Use with BACTEC Fluorescent Series Instruments.
 66. Marwan M. Azar, Chadi A. Hage. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* May 2017, 55 (6) 1612-1620; DOI: 10.1128/JCM.02430-16.
 67. Sathapatayavongs B., Batteiger BE, Wheat J, et al. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis during two large urban outbreaks. *Medicine (Baltimore)* 1983; 62: 263-270. PMID: 6312246.
 68. Wheat, Lawrence J., Kohler, Richard B., Tewari, Ram P. Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis by Detection of Histoplasma capsulatum Antigen in Serum and Urine Specimens. 1986. *N Engl J Med*; 314: 83-88. 10.1056/NEJM198601093140205 [doi].

69. Wheat LJ, Witt J 3rd, Durkin M, Connolly P. Reduction in false antigenemia in the second generation *Histoplasma* antigen assay. *Med Mycol* 2007; 45:169–71.
70. Wheat, L. J., G. Cloud, P. C. Johnson, P. Connolly, M. Goldman, A. Le Monte, D. E. Fuller, T. E. Davis, and R. Hafner. 2001. Clearance of fungal burden during treatment of disseminated histoplasmosis with liposomal amphotericin B versus itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2354–2357.
71. Wheat, L. J., P. Connolly, N. Haddad, A. Le Monte, E. Brizendine, and R. Hafner. 2002. Antigen clearance during treatment of disseminated histoplasmosis with itraconazole versus fluconazole in patients with AIDS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:248–250.
72. Wheat, L. J., P. Connolly-Stringfield, R. Blair, K. Connolly, T. Garringer, and B. P. Katz. 1991. Histoplasmosis relapse in patients with AIDS: detection using *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen levels. *Ann. Intern. Med.* 115:936–941.
73. Connolly PA, Durkin MM, Lemonte AM, Hackett EJ, Wheat LJ. Detection of histoplasma antigen by a quantitative enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14:1587–91.
74. Myint T, Anderson AM, Sanchez A, Farabi A, Hage C, Baddley JW, Jhaveri M, Greenberg RN, Bamberger DM, Rodgers M, Crawford TN, Wheat LJ. 2014. Histoplasmosis in patients with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS): multicenter study of outcomes and factors associated with relapse. *Medicine (Baltimore)* 93:11–18. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000016>.
75. Theel ES, Ramanan P. 2014. Clinical significance of low-positive *Histoplasma* urine antigen results. *J Clin Microbiol* 52:3444 –3446. <https://doi.org/10.1128/JCM.01598-14>.
76. Chadi A. Hage, Julie A. Ribes, Nancy L. Wengenack, Larry M. Baddour, Maha Assi, David S. McKinsey, Kassem Hammoud, Daisy Alapat, N. Esther Babady, Michelle Parker, DeAnna Fuller, Aliya Noor, Thomas E. Davis, Mark Rodgers, Patricia A. Connolly, Boutros El Haddad, L. Joseph Wheat; A

Multicenter Evaluation of Tests for Diagnosis of Histoplasmosis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 53, Issue 5, 1 September 2011, Pages 448–454, <https://doi.org/10.1093/cid/cir435>

77. Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Williams B, Connolly K, Blair R, Bartlett M, Durkin M. 1992. Diagnosis of histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome by detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 145:1421–1424. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/145.6.1421>.
78. Hage CA, Davis TE, Fuller D, Egan L, Witt JR, III, Wheat LJ, Knox KS. 2010. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection in BAL fluid. *Chest* 137:623–628. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1702>.
79. Ioud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER. 2007. Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the quantitation of *Histoplasma* antigen in human urine samples. *Am. J. Clin. Pathol.* 128:18–22.
80. Michaela Lackner and Cornelia Lass-Flörl, Thomas Lion (ed.), *Human Fungal Pathogen Identification; Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1508, DOI 10.1007/978-1-4939-6515-1_4
81. Zhang X, Gibson B, Jr, Daly TM. 2013. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 51:4095–4101. <https://doi.org/10.1128/JCM.02298-13>.
82. Joann L. Cloud, Sean K. Bauman, Joy M. Pelfrey, Edward R. Ashwood. Biased Report on the IMMY ALPHA *Histoplasma* Antigen Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Histoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* Oct 2007, 14 (10) 1389–1391; DOI: 10.1128/CVI.00280-07.
83. Hoffmann, E. R., Daboit, T. C., Paskulin, D. D., Monteiro, A. A., Falci, D. R., Linhares, T., Flores, J. M., Goldani, L. Z., Melo, M. G., Behar, P. R. and Pasqualotto, A. C. (2017), Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicentre study to evaluate the performance of different diagnostic tests. *Mycoses*, 60: 20–24. doi:[10.1111/myc.12536](https://doi.org/10.1111/myc.12536)

84. Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Reed Y, Hart J, Lima S, Rivera BE, Raxcaco G, Chiller T, Arathoon E, Gomez BL. 2009. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Histoplasma capsulatum* antigenuria in immunocompromised patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:852–858.
85. Diego H. Cáceres, Christina M. Scheel, Ángela M. Tobón, Angela Ahlquist Cleveland, Ángela Restrepo, Mary E. Brandt, Tom Chiller, Beatriz L. Gómez. Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Detects *Histoplasma capsulatum* Antigenuria in Colombian Patients with AIDS for Diagnosis and Follow-Up during Therapy. *Clin. Vaccine Immunol.* Aug 2014, 21 (9) 1364-1368; DOI: 10.1128/CVI.00101-14
86. Hoffmann, E. R., Daboit, T. C., Paskulin, D. D., Monteiro, A. A., Falci, D. R., Linhares, T. , Flores, J. M., Goldani, L. Z., Melo, M. G., Behar, P. R. and Pasqualotto, A. C. (2017), Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicentre study to evaluate the performance of different diagnostic tests. *Mycoses*, 60: 20-24. doi:[10.1111/myc.12536](https://doi.org/10.1111/myc.12536)
87. Zhang C, Lei GS, Lee CH, Hage CA. 2015. Evaluation of two new enzyme immunoassay reagents for diagnosis of histoplasmosis in a cohort of clinically characterized patients. *Med Mycol* 53:868–873. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv062>.
88. Chen Zhang, Guang-Sheng Lei, Chao-Hung Lee, Chadi A. Hage; Evaluation of two new enzyme immunoassay reagents for diagnosis of histoplasmosis in a cohort of clinically characterized patients, *Medical Mycology*, Volume 53, Issue 8, 1 November 2015, Pages 868–873, <https://doi.org/10.1093/mmy/myv062>
89. Elitza S. Theel, Deborah J. Jespersen, Julie Haring, Jay Mndrekar, Matthew J. Binnicker. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of *Histoplasma capsulatum* Antigen from Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* Oct 2013, 51 (11) 3555–3559; DOI: 10.1128/JCM.01868-13.
90. Diego H. Cáceres, Blanca E. Samayoa, Narda G. Medina, Angela M. Tobón, Brenda Guzmán, Danicela Mercado, Angela Restrepo, Tom Chill

- er, Eduardo E. Arathoon, Beatriz L. Gómez. Multicenter Validation of Commercial Antigenuria Reagents To Diagnose Progressive Disseminated Histoplasmosis in People Living with HIV/AIDS in Two Latin American Countries *Journal of Clinical Microbiology* May 2018, 56 (6) e01959 17; DOI: 10.1128/JCM.01959-17.
91. Nacher M, Blanchet D, Bongomin F, Chakrabarti A, Couppié P, et al. (2018) *Histoplasma capsulatum* antigen detection tests as an essential diagnostic tool for patients with advanced HIV disease in low and middle income countries: A systematic review of diagnostic accuracy studies. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12(10):e0006802. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006802>
92. Bialek, R., A. Feucht, C. Aepinus, G. Just-Nu"bling, V. J. Robertson, J. Knobloch, and R. Hohle. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* 40:1644–1647.
93. Cesar Muñoz, Beatriz L. Gómez, Angela Tobón, Karen Arango, Angela Restrepo, Margarita M. Correa, Carlos Muskus, Luz Elena Cano, Angel González. Validation and Clinical Application of a Molecular Method for Identification of *Histoplasma capsulatum* in Human Specimens in Colombia, South America. *Clin. Vaccine Immunol.* Dec 2009, 17 (1) 62-67; DOI: 10.1128/CVI.00332-09.
94. Stephane Simon, Vincent Veron, Rachida Boukhari, Denis Blanchet, Christine Aznar. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 66, Issue 3, 2010, Pages 268-273.
95. María Guadalupe Frías De León, Gabina Arenas López, María Lucía Taylor, Gustavo Acosta Altamirano, María del Rocío Reyes-Montes. Development of Specific Sequence-Characterized Amplified Region Markers for Detecting *Histoplasma capsulatum* in Clinical and Environmental Samples. *Journal of Clinical Microbiology* Feb 2012, 50 (3) 673-679; DOI: 10.1128/JCM.05271-11.

96. María José Buitrago, Cristina Elena Canteros, Guadalupe Frías De León, Ángel González, Manoel Marques-Evangelista De Oliveira, César O. Muñoz, José Antonio Ramirez, Adriana Isabel Toranzo, Rosely Zancope-Oliveira, Manuel Cuenca-Estrella. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study, *Revista Iberoamericana de Micología*. Volume 30, Issue 4, 2013, Pages 256-260.
97. Frías-De-León, M.G., Ramírez-Bárcenas, J.A., Rodríguez-Arellanes, G. et al. *Folia Microbiol* (2017) 62: 111. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0477-4>.
98. López LF, Muñoz CO, Cáceres DH, Tobón ÁM, Loparev V, et al. (2017) Standardization and validation of real time PCR assays for the diagnosis of histoplasmosis using three molecular targets in an animal model. *PLOS ONE* 12(12), e0190311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190311>
99. Furcolow ML. Comparison of treated and untreated severe histoplasmosis. *JAMA* 1963;183:121–7.
100. Lawrence J. Wheat, Marwan M. Azar, Nathan C. Bahr, Andrej Spec, Ryan F. Relich, Chadi Hage. Histoplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, Vol 30, Issue 1, 2016, Pages 207-227.
101. Bahr NC, Panackal AA, Durkin MM, et al. Cryptococcal meningitis is a cause for cross-reactivity in cerebrospinal fluid assays for anti-*Histoplasma*, anti-*Coccidioides* and anti-*Blastomyces* antibodies. *Mycoses*. 2019;00:16. <https://doi.org/10.1111/myc.12882>