

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

TESE

Histoplasmose felina - Caracterização clínica e análise de técnicas de diagnóstico pouco invasivas

Mariana Palha de Brito Jardim

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**HISTOPLASMOSE FELINA - CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E
ANÁLISE DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POUCO INVASIVAS**

MARIANA PALHA DE BRITO JARDIM

Sob orientação da professora
Heloisa Justen Moreira de Souza

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Março de 2023

J11h Jardim, Mariana Palha de Brito, 1992-
Histoplasmose felina - Caracterização clínica e
análise de técnicas de diagnóstico pouco invasivas /
Mariana Palha de Brito Jardim. - Rio de Janeiro, 2023.
70 f.: il.

Orientadora: Heloisa Justen Moreira de Souza.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Medicina
Veterinária, 2023.

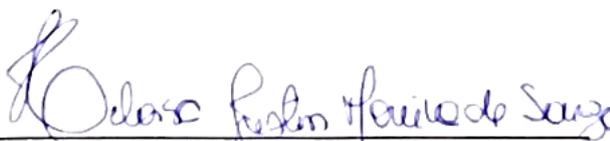
1. Ensaio imunoenzimático antigênico. 2.
Sorologia. 3. Ensaio de fluxo lateral. I. de Souza,
Heloisa Justen Moreira, 1962-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

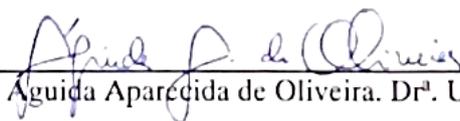
MARIANA PALHA DE BRITO JARDIM

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Ciências Clínicas.

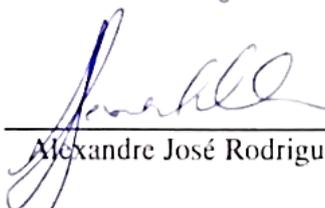
TESE APROVADA EM 30/03/2023



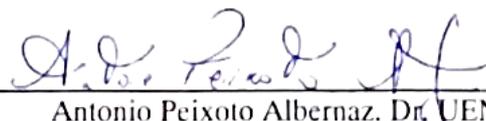
Heloisa Justen Moreira de Souza. Dr^a. UFRRJ
(Orientadora)



Aguida Aparecida de Oliveira. Dr^a. UFRRJ



Alexandre José Rodrigues Bendas. Dr. UFRRJ



Antonio Peixoto Albernaz. Dr. UENF



Olney Vieira da Motta. Dr. UENF

DEDICATÓRIA

Aos gatos, seres incríveis, pelos quais tenho profundo encanto e me motivaram a trilhar os caminhos da medicina veterinária.

AGRADECIMENTOS

A Deus, dentre todas as bênçãos, sobretudo por me dar força, garra e coragem para ir além do que imagino ser possível, me mostrando que seus sonhos são maiores do que os meus.

À minha mãe, Maria Marta Palha de Brito, principalmente pelas orações, pelos ensinamentos pautados em suas inúmeras virtudes e por embarcar comigo na missão de abreviar o sofrimento de tantos animais em situação de rua, os quais pudemos oferecer uma vida digna.

Ao meu pai Francisco Jardim, pelo apoio e por propiciar meios para que eu pudesse alcançar os meus objetivos, bem como aos demais familiares.

Ao meu namorado Mario Tatsuo Makita, pelo companheirismo e por me motivar.

Aos meus amigos, em especial a Ana Carolina Azevedo Meirelles e Gabriela de Carvalho Cid, pela irmandade sobre qualquer circunstância, o que transcende a amizade, agradeço ainda aos demais amigos por elas representados.

Aos meus animais felinos: Tesouro, Modelinho, Pentinha, Pretinha, Tigrinho, Nininha, Jack, Boquinha, Pipa, Pipinho, Marie, Cinzinha, Chuvinha, Butinha, Madeleine, Clotilde, Tom e Griça, bem como aos caninos: Salsicha, Floquinho e Madruguinha, pelo amor incondicional, convívio, bem como por me mostrarem diariamente com simples gestos, o quanto a vida pode ser mais fácil e leve. Agradeço ainda aos meus animais que hoje habitam o céu dos gatos/cães e lá exibem seus respectivos comportamentos únicos, que me fizeram enxergar os dias de outra forma e deixaram marcas inapagáveis na minha vida.

À minha orientadora Heloisa Justen Moreira de Souza, pelas oportunidades, inspiração e exemplos, em particular por lutar por cada animal com unhas e dentes, mesmo quando as chances parecem nulas, lição esta que busco carregar sempre comigo.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), meu berço acadêmico, onde iniciei minha trajetória e pude aprender e crescer tanto, bem como aos professores, especialmente Antonio Peixoto Albernaz, pela chance concedida para que eu desse os primeiros passos no percurso da pesquisa científica e a tantos outros que marcaram a minha jornada, como aos professores Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Paulo Marcelo de Souza, Adriana Jardim de Almeida e Ana Bárbara Rodrigues Freitas Godinho pelo exímio em ensinar e em muitas circunstâncias por irem além de suas obrigações, segurando na mão dos seus alunos e assim os apoiando a prosseguir, tenham a certeza que vocês fizeram a diferença e foram ímpares para muitos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde prossegui meus estudos pós-graduação e pude ver o horizonte sob novas perspectivas profissionais e científicas, local de grande adição na minha carreira.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

JARDIM, Mariana Palha de Brito. **Histoplasmose felina no Rio de Janeiro - Caracterização clínica e análise de técnicas de diagnóstico pouco invasivas**. 2023. 58f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* é o agente causador da histoplasmose felina. A abordagem diagnóstica da micose comumente é realizada por técnicas que requerem coleta de amostra de forma invasiva, o que em muitas circunstâncias não é compatível com o quadro clínico do animal. A aplicação do ensaio imunoenzimático antigênico (EIA) para *Histoplasma*, o qual pode ser realizado a partir do soro e da urina, necessita de maiores investigações, visto a eficácia limitada da análise urinária isolada e não existência de estudos que avaliem a antigenúria e antigenemia conjuntamente. Outros testes de diagnóstico, como o imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG para *Histoplasma*, realizado a partir do soro sanguíneo e o ensaio de fluxo lateral (LFA) para o mesmo agente fúngico, realizado a partir da urina, estão associados a resultados positivos na medicina humana, contudo são inexistentes pesquisas consistentes para gatos domésticos. Objetiva-se caracterizar dados clínicos de felinos com histoplasmose, bem como analisar o ensaio imunoenzimático antigênico para *Histoplasma*, na urina e no soro destes animais. Ademais avaliar o desempenho de outras técnicas de diagnóstico que requeiram coletas de amostras de forma pouco invasiva, como a análise de anticorpos da classe IgG a partir do soro sanguíneo e o LFA urinário, ambos para *Histoplasma*, a partir do diagnóstico prévio da micose. Foram selecionados 12 felinos domésticos com diagnóstico de histoplasmose por citologia, histopatologia, cultura fúngica, reação em cadeia da polimerase (PCR), ou resposta terapêutica. Destes animais foram coletados dados clínicos, laboratoriais e de imagem, bem como amostras de soro e/ou urina para realização do EIA sérico e urinário para *Histoplasma*, do imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG através do soro sanguíneo para *Histoplasma* e do ensaio de fluxo lateral (LFA) urinário para *Histoplasma*. Os gatos sem raça definida foram super-representados (8/12=66,7%) e a idade média dos felinos acometidos foi de 6.75 anos, os quais eram sobretudo domiciliados (8/12=83%). A alteração respiratória foi o achado histórico mais comumente relatado (12/12=100%), já o sinal clínico preponderante foi a dispneia (7/12=58,33%). Dentre os achados laboratoriais, a hipoalbuminemia e a linfocitopenia foram predominantes, enquanto a pneumonia foi a anomalia imagiológica majoritária, presente em todos os animais pesquisados (12/12=100%). A apresentação da doença na forma disseminada se fez presente em 8 gatos (66,67%), seguida da pulmonar, a qual acometeu 4 felinos (33,33%). Todos os animais doentes (12/12=100%) foram tratados com antifúngico, sobretudo com o itraconazol e com a anfotericina B, a qual foi associada a nefrotoxicidade. O prognóstico foi sumamente desfavorável, visto que sete gatos (58,3%) sucumbiram a doença. Dos 12 felinos com sangue disponível para análise antigênica 11 (91,67%) apresentaram antigenemia e dos 11 animais em que a urina foi passível de coleta 9 (81,82%) exibiam antígenos urinários, de forma que todos os gatos (12/12=100%) possuíam antígenos séricos ou na urina, assim destaca-se a eficácia desta análise pareada. Das oito amostras submetidas a análise de anticorpos IgG, 5 (62,5%) apresentaram positividade, bem como dos sete felinos avaliados quanto ao LFA, 5 (71,43%) foram positivos.

Palavras-chave: Ensaio imunoenzimático antigênico, Sorologia, Ensaio de fluxo lateral.

ABSTRACT

JARDIM, Mariana Palha de Brito. **Feline histoplasmosis in Rio de Janeiro - Clinical characterization and analysis of minimally invasive diagnostic techniques**. 2023. 58f. Thesis (Doctor of Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* is the causative agent of feline histoplasmosis. The diagnostic approach to mycosis is commonly performed using techniques that require invasive sample collection, which in many circumstances is not compatible with the clinical condition of the animal. The application of antigenic enzyme immunoassay (EIA) for *Histoplasma*, which can be performed using serum and urine, requires further investigation, given the limited effectiveness of isolated urinary analysis and the lack of studies that evaluate antigenuria and antigenemia together. Other diagnostic tests, such as the semi-quantitative indirect enzyme immunoassay of antibodies of the IgG class to *Histoplasma*, performed using blood serum and the lateral flow assay (LFA) for the same fungal agent, performed using urine, are associated with positive results in human medicine, however there is a lack of consistent research for domestic cats. The objective is to characterize clinical data of felines with histoplasmosis, as well as to analyze the immunoenzymatic antigenic assay for *Histoplasma*, in the urine and serum of these animals. Furthermore, to evaluate the performance of other diagnostic techniques that require minimally invasive sample collection, such as the analysis of antibodies of the IgG class from blood serum and urinary LFA, both for *Histoplasma*, based on a previous diagnosis of mycosis. Twelve domestic cats diagnosed with histoplasmosis by cytology, histopathology, fungal culture, polymerase chain reaction (PCR), or therapeutic response were selected. From these animals, clinical, laboratorial and imaging data were collected, as well as serum and/or urine samples for serum and urinary EIA for *Histoplasma*, semi-quantitative indirect enzymatic immunoassay of antibodies of the IgG class through blood serum for *Histoplasma* and the urinary lateral flow assay (LFA) for *Histoplasma*. Mixed breed cats were over-represented (8/12=66.7%) and the average age of affected cats was 6.75 years, which were mostly domiciled (8/12=83%). Respiratory alteration was the most commonly reported historical finding (12/12=100%), while the preponderant clinical sign was dyspnea (7/12=58.33%). Among the laboratory findings, hypoalbuminemia and lymphocytopenia were predominant, while pneumonia was the major imaging anomaly, present in all animals surveyed (12/12=100%). The presentation of the disease in the disseminated form was present in 8 cats (66.67%), followed by pulmonary, which affected 4 cats (33.33%). All sick animals (12/12=100%) were treated with antifungals, mainly with itraconazole and amphotericin B, which was associated with nephrotoxicity. The prognosis was extremely unfavorable, as seven cats (58.3%) succumbed to the disease. Of the 12 cats with blood available for antigenic analysis, 11 (91.67%) showed antigenemia and of the 11 animals in which urine could be collected, 9 (81.82%) showed urinary antigens, so that all cats (12/ 12=100%) had serum or urine antigens, thus highlighting the effectiveness of this paired analysis. Of the eight samples submitted to IgG antibody analysis, 5 (62.5%) were positive, as well as of the seven felines evaluated for LFA, 5 (71.43%) were positive.

Key words: Antigenic enzyme immunoassay, Serology, Lateral flow assay.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1- Resultado da antigenúria e antigenemia mediante EIA MiraVista Diagnostics para *Histoplasma*, de gatos domésticos com histoplasmose **18**

Tabela 2- Sinais clínicos de gatos com histoplasmose **20**

Tabela 3- Perfil laboratorial dos felinos domésticos com histoplasmose **21**

CAPÍTULO II

Tabela 1 Resultado do imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG realizado a partir do soro sanguíneo para *Histoplasma* e do ensaio de fluxo lateral (LFA) urinário para *Histoplasma*, de gatos domésticos com histoplasmose diagnosticada previamente **36**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa mundial com estimativa das regiões com maior probabilidade de ocorrência da histoplasmose. Adaptado de ASHRAF et al., 2020. **5**

Figura 2: Fase micelial da colônia de *Histoplasma capsulatum* no meio Ágar Sabouraud dextrose (KLANG et al., 2015) **9**

Figura 3: Exemplos de resultados de ensaio de fluxo lateral positivo negativo (A) e baixo (B), intermediário (C) e alto (D), com base no nível de antígeno correspondente medido pelo imunensaio enzimático. As setas pretas apontam para a linha de controle positivo (C), já as setas vermelhas para a linha de detecção (T), bem como a seta amarela corresponde a porta de amostra do dispositivo, onde a urina diluída deve ser colocada. Fonte: Adaptado de Abdallah e colaboradores 2021. **12**

CAPÍTULO I

Figura 1- Queixas clínicas relatadas pelos tutores de gatos com histoplasmose **19**

Figura 2- Técnicas diagnósticas empregadas em gatos com *Histoplasma*. A: Pulmão: parênquima com padrão micronodular difuso; B: Fígado: padrão lobular difuso evidenciado; C: Baço: parênquima esplênico exibindo nodulações difusas de coloração esbranquiçada; D: Citopatológico pulmonar, coloração rápida tipo Romanowsky: presença de macrófagos com inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma*; E: Colônia de *Histoplasma capsulatum*; F: Histopatológico de baço: moderado infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma*; G: Histopatológico de medula óssea: moderado infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma*; H: Histopatológico de pâncreas: leve infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma*; I: Método histoquímico para coloração Grocott positivo para estruturas intracitoplasmáticas em parênquima pulmonar. Fonte: Gabriela de Carvalho Cid, 2022 (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2F, 2G, 2H, 2I); Mario Tatsuo Makita (Figura 2E). **22**

Figura 3- Análise comparativa da creatinina sérica inicial e final por número de aplicações do antifúngico anfotericina B em gatos com histoplasmose. A=Anfotericina; IV= Intravenoso; SC= Subcutânea; n=número; Valor de referência da creatinina sérica: <1,6mg/dL³⁰ **23**

CAPÍTULO II

Figura 1 Resultados do ensaio de fluxo lateral urinário (LFA) em gatos previamente diagnosticados com histoplasmose. A: Negativo; B: Baixo positivo; C: Moderado positivo; D: Altamente positivo. **36**

Figura 2 Métodos diagnósticos empregados para a detecção da histoplasmose felina em gatos posteriormente submetidos ao imunensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG realizado a partir do soro sanguíneo para *Histoplasma* e do ensaio de fluxo lateral (LFA) urinário para *Histoplasma*. PCR: Reação em cadeia da polimerase **37**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PCR Reação em cadeia da polimerase
ID Imunodifusão
FC Fixação de complemento
EIA Ensaio imunoenzimático antigênico
IgG Imunoglobulina G
LFA Ensaio de fluxo lateral
EUA Estados Unidos da América
H.capsulatum Histoplasma capsulatum
Km Quilômetro
HIV Vírus da imunodeficiência humana
° Grau
C Celsius
Mm Milímetro
µm Micrômetro
α Alfa
B Beta
MAT Mating type
IL 12 Interleucina 12
IFN- γ Interferon-gama
TNF-α Fator de necrose tumoral-alfa
PAS ácido periódico de Schiff
UE Unidades enzimáticas
MV MiraVista
µL Microlitro
mg Miligrama
Kg Quilograma
mL Mililitro
TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido
CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
HVPA Hospital veterinário de pequenos animais
ALT Alanina Aminotransferase
ng Nanograma
BLQ Abaixo do limite de quantificação
ALQ Acima do limite de quantificação
SRD Sem raça definida
FeLV Vírus da leucemia felina
FIV Vírus da imunodeficiência felina
DNNE Desvio nuclear neutrofílico à esquerda
IV Intravenoso
SC Subcutâneo
dL Decilitro
CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
nm Nanômetro

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Dados Históricos | 3 |
| 2.2 Taxonomia | 3 |
| 2.3 Fonte de Infecção | 4 |
| 2.4 Epidemiologia e Prevalência | 4 |
| 2.5 Ciclo Biológico e Morfologia | 5 |
| 2.6 Patogênese | 6 |
| 2.7 Sinais Clínicos | 7 |
| 2.8 Achados Laboratoriais | 7 |
| 2.9 Achados Radiográficos e Ultrassonográficos | 7 |
| 2.10 Formas de Apresentação da Doença | 8 |
| 2.11 Técnicas Diagnósticas | 8 |
| 2.11.1 Cultura fúngica | 8 |
| 2.11.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 9 |
| 2.11.3 Citologia e histopatologia | 9 |
| 2.11.4 Teste sorológico para detecção de anticorpos | 10 |
| 2.11.5 Ensaio imunoenzimático antigênico | 11 |
| 2.11.6 Ensaio de fluxo lateral (LFA) do Antígeno <i>Histoplasma</i> | 11 |
| 2.12 Tratamento | 12 |
| CAPÍTULO I | 14 |
| CAPÍTULO II | 32 |
| 3 CONCLUSÕES GERAIS | 41 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |
| ANEXOS | 51 |
| A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 52 |
| B – Aceite – Comissão de ética e uso de animais (CEUA) | 53 |
| C - Ficha Clínica de Avaliação de Animais com Histoplasmosose | 54 |
| D - Fluxograma | 56 |
| E - Dados Clínicos de Felinos Domésticos com Histoplasmosose na Cidade do Rio de Janeiro-Brasil | 57 |

1 INTRODUÇÃO

Os felinos domésticos são susceptíveis a infecção ocasionada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, causador da histoplasmose, uma micose sistêmica, a qual é transmitida por inalação ou ingestão de propágulos fúngicos presentes no solo enriquecido com excretas oriundas de pássaros e morcegos (GRACE, 2018). A doença em gatos pode se manifestar na forma pulmonar, gastrointestinal ou disseminada (LLORET et al., 2013).

A apresentação clínica da afecção em felinos geralmente é inespecífica e culmina principalmente com fraqueza, letargia, perda de peso, diminuição ou falta de apetite, alterações respiratórias, linfadenopatia e alterações oculares (AULAKH et al., 2012; REINHART et al., 2012).

O diagnóstico dá-se por meio da citologia, histopatologia, cultura fúngica, reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaios para detecção de anticorpos, além possibilidade de execução dos testes antigênicos (COOK et al., 2012; KLANG et al., 2013; LLORET et al., 2013).

Os testes mais utilizados para fins diagnósticos são baseados na identificação do agente fúngico em células fagocíticas, a exemplo da citologia e histopatologia, muito embora haja limitações substanciais no que tange a falha na identificação do agente. A cultura fúngica é geralmente realizada para corroborar o resultado citológico/histopatológico e requer um tempo de no mínimo duas a quatro semanas para o isolamento e identificação do fungo, o que pode atrasar o diagnóstico e consequente tratamento do felino. Já a técnica de PCR, assim como as demais citadas anteriormente, tem como principal limitação diagnóstica, a forma de obtenção das amostras, visto comumente a necessidade de métodos invasivos de coleta, o que na maioria das vezes é incompatível com o estado clínico do animal. A sorologia baseada na detecção de anticorpos pelos métodos de imunodifusão (ID) e fixação de complemento (FC) é considerada não confiável por resultar em erros frequentes no que se refere a ocorrência de resultados falso positivos e negativos (JOHNSON et al., 2004; BROMEL & SYKES, 2005; COOK et al., 2012; BALAJEE et al., 2013; KLANG et al., 2013; LLORET et al., 2013; JARDIM et al., 2018).

O ensaio imunoenzimático antigênico (EIA) para *Histoplasma*, amplamente utilizado na medicina humana, constitui uma forma pouco invasiva de diagnóstico, visto que é

realizado por meio de amostras como soro e urina (SWARTZENTRUBER et al., 2009; COOK et al., 2012; HANZLICEK et al., 2016; PEREZ et al., 2021). Contudo, a aplicação do EIA na rotina clínica de felinos domésticos carece de mais pesquisas, para que de fato possa ser empregado em gatos suspeitos de histoplasmose, visto a eficácia limitada do emprego da urina de forma isolada, devido a presença de resultados falso negativos e não existência de estudos que avaliem a análise pareada da antigenemia e antigenúria em felinos com a referida micose (COOK et al., 2012; LLORET et al., 2013).

Ainda no que tange o emprego de técnicas que requeiram a colheita de amostras de forma pouco invasiva, o imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG para *Histoplasma*, realizado a partir do soro sanguíneo está relacionado a resultados promissores na medicina humana (AZAR et al., 2020), muito embora não tenha sido bem avaliado em felinos. Assim como o ensaio de fluxo lateral (LFA) para *Histoplasma*, o qual pode ser realizado à beira do leito, a partir da urina e está associado a desempenhos positivos em humanos (ANDREANI et al., 2022), contudo são ausentes dados sobre o emprego deste em gatos domésticos.

No continente americano a histoplasmose é considerada endêmica e corresponde a segunda micose sistêmica mais comum em gatos nos Estados Unidos da América (EUA) (DAVIES & TROY, 1996; FERREIRA & BORGES, 2009). A histoplasmose é uma doença ainda subdiagnosticada (ARAÚZ & PAPINENI, 2021) e poucos casos de histoplasmose felina foram relatados no Brasil. A baixa casuística pode estar atrelada a desafios diagnósticos (LOMONACO et al., 2020).

OBJETIVOS GERAIS

Têm-se como objetivo caracterizar dados clínicos de felinos com histoplasmose, bem como analisar o ensaio imunoenzimático antigênico para *Histoplasma*, na urina e no soro destes animais. Ademais avaliar o desempenho de outras técnicas de diagnóstico que requeiram coletas de amostras de forma pouco invasiva, como a análise de anticorpos da classe IgG a partir do soro sanguíneo e o LFA urinário, ambos para *Histoplasma*, a partir do diagnóstico prévio de tal micose.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compilar os principais dados clínicos relacionados a histoplasmose nos gatos avaliados;
- Correlacionar o número de gatos domésticos diagnosticados com histoplasmose pelas técnicas convencionais ou diagnóstico presuntivo com o resultado da antigenúria e antigenemia;
- Confrontar o número de felinos com histoplasmose previamente diagnosticada com o desfecho do LFA para *Histoplasma* e com a sorologia de anticorpos da classe IgG para o mesmo agente fúngico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dados Históricos

A primeira descrição da histoplasmose ocorreu em 1905 durante a construção do canal Panamá, onde o médico americano Samuel Darling notou a presença de organismos intracelulares em tecidos, como pulmão, fígado e baço, durante autopsia de um paciente humano proveniente da Martinica, o qual havia falecido por uma doença febril, de origem desconhecida, associada a anemia progressiva, além de hepatoesplenomegalia. Na ocasião o organismo foi descrito como semelhante ao plasmódio, o qual invadia o citoplasma de células similares a histiócitos e era envolto por uma cápsula, assim, acreditando se tratar de um protozoário, foi então denominado *Histoplasma capsulatum* (WANKE & LAZÉRA, 2010; ARAÚZ & PAPINENI, 2021).

Anos após, já em 1908 Darling pôde observar mais dois casos fatais da doença. Em 1912, o agente infeccioso foi então definido como um fungo, pelo patologista brasileiro Henrique da Rocha Lima e em 1934 DeMombreun reconheceu o dimorfismo de tal espécie, a partir do primeiro caso da micose diagnosticado em vida, onde o cultivo de *H. capsulatum* foi realizado e sua natureza fúngica confirmada. No ano de 1945, após os primeiros inquéritos epidemiológicos com histoplasmina, verificou-se que a histoplasmose é uma doença benigna, cosmopolita e de transmissão respiratória, visto que até então a histoplasmose era considerada rara, fatal e de transmissão desconhecida. Em 1947 foram caracterizadas as primeiras epidemias da histoplasmose pulmonar aguda humana. Emmons foi o primeiro a isolar *Histoplasma capsulatum* do solo em 1949, contudo somente em 1951 os isolados ambientais foram correlatos ao solo enriquecido com excretas de aves e morcegos por Ajello & Zeidberg (WANKE & LAZÉRA, 2010).

Por longos períodos somente o anamorfose (fase assexuada) do fungo era reconhecido, assim o mesmo era englobado no filo Deuteromycota, classe Hyphomycetes. A partir de 1972, com o trabalho de Kwon Chung houve a demonstração do teleomorfismo (fase sexuada), de forma que a espécie *Histoplasma capsulatum* passou a ser classificada como *Emmonsia capsulata*, na família *Gymnoascaceae*, filo *Ascomycota*. Contudo, McGinnis & Katz em 1979 verificaram que as espécies se reproduziam da mesma forma e faziam reprodução sexuada entre si, destarte indicaram a unificação das espécies em somente uma, assim, a fase fúngica assexuada, compreendida no gênero *Histoplasma*, passou a ser constituída por uma única espécie: *Histoplasma capsulatum*, com três variedades: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* e *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*. Ademais, os mesmos propuseram o remanejamento da espécie para o gênero *Ajellomyces*, família *Onygenaceae*, ordem *Onygenales*, classe *Ascomycetes*, filo *Ascomycota*, cabe ressaltar que tal gênero engloba uma única espécie teleomorfa (sexuada): *Ajellomyces capsulatus* (WANKE & LAZÉRA, 2010; CRUZ., 2010).

2.2 Taxonomia

A espécie *Histoplasma capsulatum* compreende três variedades taxonômicas baseadas na micromorfologia, distribuição geográfica, associação de hospedeiros e formas clínicas da doença, as quais são: *H. capsulatum* var. *capsulatum*; *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*. *H. capsulatum* var. *capsulatum* está associado a ocorrência de infecções em várias espécies hospedeiras, de forma cosmopolita, sobretudo nos EUA,

H. capsulatum var. *duboisii* é o agente causal da linfadenotopia, bem como de infecções cutâneas e ósseas em humanos e primatas, no oeste da África e em sua região central, já *H. capsulatum* var. *farcinosum* é patogênico para equídeos e assim ocasionador da histoplasmose farcínosa ou linfangite epizootica, muito embora dados moleculares apontem que tal espécie fúngica pode ter ampla gama de hospedeiros, inclusive humanos. Contudo, atualmente apoia-se o reconhecimento da existência de populações geográficas distintas geneticamente ou espécies filogenéticas (KASUGA et al.; 2003; WANKE & LAZÉRA, 2010; VITE-GARÍN et al., 2014; ASHRAF et al., 2020; ARAÚZ & PAPINENI, 2021).

Deste modo, oito clados diferentes de *H. capsulatum* foram identificados com base na filogenética: dois na América do Norte (Nam 1 e Nam 2), dois na América do Sul (LAm A e LAmB) e um em cada uma das seguintes regiões: África, Indonésia, Austrália e Eurásia, destes sete englobam espécies distintas geograficamente isoladas, com exceção do grupo eurasiático, o qual se originou da América Latina. Atualmente sete novas espécies filogenéticas foram propostas: LAm A1, LAm A2, LAm B1, LAm B2, LAm C, RJ, BAC1. Dados moleculares, sobretudo de sequenciamento genético permitem a identificação de casos autóctones e importados, bem como a interpretação da epidemiologia e avaliação de risco (KASUGA et al.; 2003; KLANG et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020.)

2.3 Fonte de infecção

O reservatório natural do fungo em questão é o solo, principalmente quando úmido e fertilizado por fezes de pássaros e morcegos. As atividades que podem gerar perturbação do solo contaminado e conseqüente inalação dos microconídios aerossolizados servem como fonte de infecção, a exemplo de casos de demolições, construção, reformas, limpeza de galinheiros, remoção de resíduos de pragas, o que pode gerar movimentação de grandes acumulações de excrementos de pássaros ou morcegos. Cavernas mal ventiladas, túneis e minas que tenham a presença de morcegos são locais clássicos de alta fonte de infecção, assim atividades como a espeleologia estão associadas a exposição a *H. capsulatum* (LEVISON, 2015, ARAÚZ & PAPINENI, 2021). Muito embora o fungo tenha capacidade de ser infectante em um raio de até 32 km ao redor de fontes de infecção em locais abertos (WANKE & LAZÉRA, 2010).

O alto teor de ácido úrico e outros compostos nitrogenados com baixo peso molecular encontrados nas excretas nitrogenadas dos animais supracitados inibem o crescimento da microbiota competidora e assim favorecem o crescimento e a proliferação do fungo, o qual usa esses componentes como fonte de nitrogênio. As aves devido a sua elevada temperatura corporal não estão sujeitas a infecção fúngica, já os morcegos são animais susceptíveis e atuam também como dispersores do fungo na natureza, já que podem eliminar o agente via fecal (CRUZ, 2010; WANKE & LAZÉRA, 2010).

Contudo, a micose acomete não somente felinos de vida livre ou semidomiciliados, mas também animais que vivem em ambientes estritamente internos, através do acesso a porões abandonados e vasos de plantas que possam servir de reservatório fúngico (REINHART et al., 2012).

2.4 Epidemiologia e Prevalência

O fungo *H. capsulatum* é endêmico nas Américas, com alta prevalência em grande parte dos Estados Unidos da América, sobretudo nos estados e regiões do Centro-Oeste e Sul, bem como ao longo dos rios Ohio, Missouri e Mississippi. Contudo a histoplasmose em gatos também ocorre esporadicamente fora de áreas endêmicas conhecidas, de forma que sua distribuição global além das Américas é cada vez mais reconhecida, principalmente em regiões com temperaturas moderadas e atravessadas por rios, onde o clima, a umidade e as

características do solo (como alto teor de nitrogênio) são favoráveis ao crescimento fúngico como pode ser visualizado na Figura 1 (KABLI et al., 1986; JOHNSON et al., 2004; BRÖMEL & SYKES, 2005; FERREIRA & BORGES, 2009; BALAJEE et al., 2013; KLANG et al., 2013; STOKES, 2016; LARSUPROM et al., 2017; ARAÚZ & PAPINENI, 2021; GRINSTEAD et al., 2021). No que se refere particularmente a medicina felina, a histoplasmose é por sua vez considerada a segunda micose sistêmica mais comum em gatos nos EUA (DAVIES & TROY, 1996).

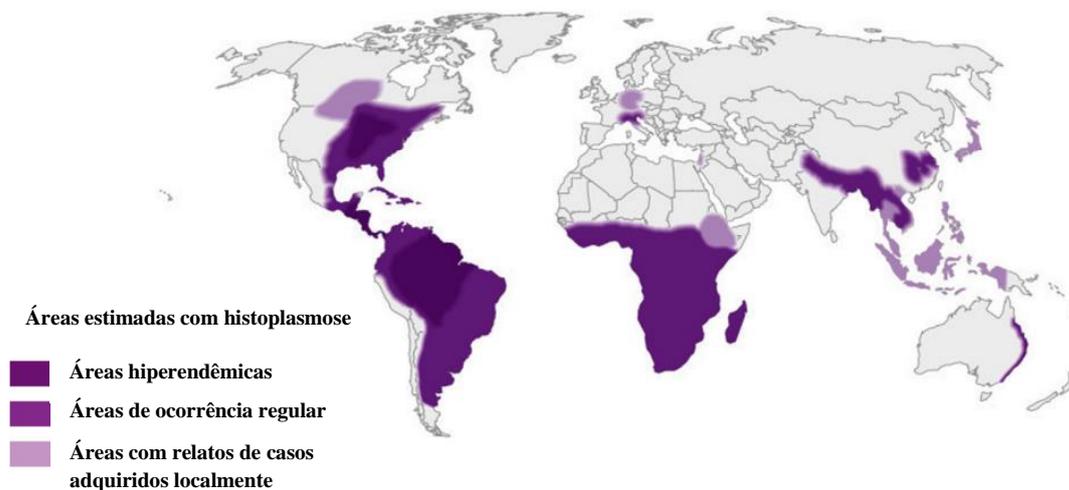


Figura 1: Mapa mundial com estimativa das regiões com maior probabilidade de ocorrência da histoplasmose. Adaptado de ASHRAF et al., 2020.

Na cidade do Rio de Janeiro (Brasil), foi verificado que os polimorfismos genéticos, considerando as cepas de *Histoplasma capsulatum* isoladas de animais (cães e ratos) e solos foram 100% semelhantes, o que sugere que o mesmo micronicho pode servir de infecção ambiental para a população humana e de animais (MUNIZ et al., 2001). Contudo apenas onze casos de histoplasmose felina foram registrados até o momento, assim, a escassez de dados pode refletir o subdiagnóstico da doença em âmbito nacional (LOMONACO et al., 2020). Já em pessoas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) no Brasil, aponta-se prevalência superior a 20% de histoplasmose comprovada/provável (FALCI et al., 2019).

Cabe pontuar que atualmente o Brasil passou a ser considerado um centro de dispersão de *Histoplasma* na América do Sul, devido à alta variabilidade genética encontrada entre os isolados brasileiros, somada a presença de espécies crípticas e/ou grupos genótipos divergentes (RODRIGUES et al., 2020).

2.5 Ciclo Biológico e Morfologia

H. capsulatum, encontra-se presente no meio ambiente de forma saprofítica e está amplamente distribuído em todo o mundo em climas temperados e subtropicais. O ciclo biológico desta espécie se assemelha ao de outros fungos dimórficos. Tal agente, causador da histoplasmose, sob temperaturas de 25° C cresce como um fungo filamentosos e multinuclear, assim, produz micélios no solo, principalmente em excretas nitrogenadas de aves e morcegos, onde apresenta-se de cor branca ou acastanhada, composto por hifas hialinas finas, septadas e ramificadas, de 1 a 2,5 mm de diâmetro. O estágio micelial, presente no ambiente é resistente a danos ambientais, com esporulação a temperaturas em torno de 22° C, onde os esporos são chamados de microconídeos ou macroconídeos, com tamanhos variáveis de 2 a 5 µm de

diâmetro e de 8 a 16 µm de diâmetro respectivamente, os microconídeos por sua vez são a forma infectante do fungo no ambiente e destarte formam novas colônias fúngicas sob condições favoráveis do solo (CRUZ., 2010; WANKE & LAZÉRA, 2010; STOKES, 2016; ARAÚZ & PAPINENI, 2021).

Assim, sob a temperatura corporal dos mamíferos de sangue quente, a exemplo dos felinos, ou *in vitro*, quando exposto a pelo menos 37°C, os microconídeos infectantes inalados assumem a fase leveduriforme (uninuclear) nos macrófagos pulmonares. Mudanças bioquímicas começam a surgir logo após alteração de temperatura, mas a morfotransformação só se completa entre quatro e sete dias. As leveduras são ovais, com tamanho médio de 2 a 3 por 3 a 4 µm, as quais se reproduzem por brotamento simples, as colônias formadas nessa fase são de aspecto úmido, liso, de coloração branco-amarelada, similar as formadas por outras leveduras. As formas micelial ou de levedura podem ser mantidas indefinidamente em laboratório ou podem ser revertidas com mudança de temperatura de incubação (CRUZ., 2010; WANKE & LAZÉRA, 2010; ARAÚZ & PAPINENI, 2021).

Cabe destacar que além do dimorfismo constituir uma característica fundamental para a identificação do gênero *Histoplasma*, também desempenha um importante fator de virulência (CRUZ, 2010).

Ademais é cabível de destaque a produção de melanina por *H. capsulatum* e a contribuição desta para a virulência fúngica, por meio da proteção as células fúngicas melanizadas no tecido contra a ação oxidativa de células do hospedeiro, redução à fagocitose e morte fagocítica, resistência a antimicrobianos (como a anfotericina B), influência à resposta imune do hospedeiro à infecção (através da inibição de citocinas, que interferem na mitigação da infecção e mediante a estimulação à inflamação), além do papel protetor que a melanina desempenha no meio ambiente (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003).

H.capsulatum possui elementos característicos de células eucariotas, contudo, exhibe também estruturas fúngicas diferenciadas, como parede celular quitinosa, organelas intracitoplasmáticas eletrodensas, chamadas de corpos de Woronin, que regulam o fluxo intracitoplasmático através de poros, presentes nos septos entre as hifas, além de apresentar um sistema membranoso intracitoplasmático complexo e diversificado. A parede celular quitinosa representa o primeiro componente de interação do fungo no hospedeiro e exhibe uma estrutura polissacarídica complexa formada por galactomanana, α-1,3-glucana, β-1,3-glucana e uma rede fibrilar de quitina, além de proteínas, complexo proteínas-carboidratos e lipídios (WANKE & LAZÉRA, 2010).

A forma sexuada do fungo, *Ajellomyces capsulatus*, se dá através dos isolados de “mating type” (MAT+ e MAT-), ou seja, quando dois micélios haplóides, sexualmente diferentes, se encontram em condições apropriadas de cultivo, por meio dos quais ocorre a plasmogamia, seguida da cariogamia e dessa união são formados os cleistotécios, os quais contêm em seu interior numerosos ascos, com oito ascósporos em cada um. O teleomorfismo ocorre tanto *in vitro* como na natureza (CRUZ, 2010; WANKE & LAZÉRA, 2010).

2.6 Patogênese

A infecção ocorre principalmente via inalação e ocasionalmente por ingestão dos microconídeos, os quais são pequenos suficientes para alcançar os bronquíolos e alvéolos terminais após a fagocitose por macrófagos, onde crescem como organismo intracelular facultativo. Destarte a infecção origina-se tipicamente dos pulmões e por vezes do trato gastrointestinal com disseminação hematogênica e linfática subsequente, o que resulta em doença multissistêmica. Em gatos, os pulmões, fígado, baço, rins, adrenais, linfonodos, olhos e medula óssea são comumente afetados. Cabe pontuar que em alguns casos a infecção é assintomática e autolimitante, contudo, a disseminação é comum e gatos e ocorre em até 95%

dos casos. Para pacientes humanos é bem estabelecido que após a exposição a doença pode se desenvolver por meio da infecção aguda, reativação ou reinfecção.

A transmissão de animal para animal ou de animais para humanos é improvável (DAVIES & TROY, 1996; BUSH et al., 2011; AULAKH et al., 2012; LLORET et al., 2013; GOLDSTEIN & ABRAHAMIAN 2015; STOKES, 2016; ARAÚZ & PAPINENI, 2021).

A imunidade mediada por células ao *H. capsulatum* envolve a produção de citocinas por parte dos linfócitos T CD4 e macrófagos ativados, os quais por sua vez induzem a formação dos granulomas. As principais citocinas envolvidas na resposta imunitária em questão são: interleucina 12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Assim, justifica-se a ocorrência da histoplasmose disseminada e grave, notada em muitos pacientes humanos HIV positivos, os quais em estágios avançados da virose possuem baixa contagem de CD4. É digno de nota que medicamentos imunossupressores como os glicocorticóides também podem aumentar o risco de histoplasmose disseminada grave (ARAÚZ & PAPINENI, 2021).

2.7 Sinais Clínicos

A forma disseminada da doença mostra-se mais presente em felinos, seguida da forma pulmonar e gastrointestinal respectivamente (AULAKH et al., 2012; COOK et al., 2012).

Os sinais clínicos de gatos com histoplasmose são geralmente inespecíficos, assim pode-se observar mais comumente fraqueza, linfadenopatia, perda de peso e hiporexia/anorexia. Demais sinais incluem letargia, vômito, diarreia, febre, membranas mucosas pálidas ou ictéricas, hepatomegalia, esplenomegalia, dor a palpação abdominal, cegueira, nódulos/lesões cutâneas ou em mucosas, únicos ou múltiplos, ulcerações, dor articular, efusão articular, claudicação, inchaço, linfadenopatia, uveíte e descolamento retiniano, sopros cardíacos. Quanto aos sinais respiratórios a dispnéia, taquipnéia, corrimento nasal e tosse mostram-se envolvidos (DAVIES & TROY, 1996; JOHNSON et al., 2004; BRÖMEL & SYKES, 2005; CARNEIRO et al., 2005; AULAKH et al., 2012; BRILHANTE et al., 2012; COOK et al., 2012; LLORET et al., 2013; SOUZA et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016; SMITH et al., 2017; FIELDER et al., 2018; SCHAEFER et al., 2019).

Vale ressaltar a similaridade da histoplasmose felina associada ao comprometimento nasal, com as lesões decorrentes da esporotricose, criptococose e aspergilose. Assim, a histoplasmose deve ser incluída dentre o diagnóstico diferencial de felinos com comprometimento morfológico desta região (CARNEIRO, et al., 2005; GRINSTEAD et al., 2021).

2.8 Achados Laboratoriais

Dentre os achados laboratoriais de felinos com histoplasmose destaca-se a anemia normocítica, normocrômica, não regenerativa, com ou sem pancitopenia. Contudo, de modo mais amplo, as citopenias em geral podem ocorrer. Já quanto às bioquímicas séricas a hipoalbuminemia e a hipocalcemia se mostram prevalentes, assim como a hiperbilirrubinemia e a hiperglobulinemia podem estar presentes em animais infectados sistemicamente (BRÖMEL & SYKES, 2005; AULAKH et al., 2012; FIELDER et al., 2018; SCHAEFER et al., 2019).

2.9 Achados Radiográficos e Ultrassonográficos

As anormalidades pulmonares estão dentre os achados radiográficos mais frequentes (SCHAEFER et al., 2019). O padrão radiográfico intersticial (difuso, fino, linear, miliar ou nodular) é visto como o mais predominante, seguido do padrão brônquico e alveolar. Padrões mistos também podem ser observados (WOLF & GREEN, 1987; JOHNSON et al., 2004; AULAKH et al., 2012; KLANG et al., 2013; SILVEIRA et al., 2016).

A osteomielite pode ser verificada em gatos com fungemia, bem como pode ser notada hepatomegalia e esplenomegalia, na presença ou não de efusão peritoneal, considerando as radiografias que envolvem a região toracoabdominal e/ou as ultrassonografias abdominais. Na ultrassonografia da região abdominal pode ainda se verificar linfadenopatia abdominal, derrame peritoneal e nódulos esplênicos (WOLF, 1987; BRÖMEL & SYKES, 2005; SCHAEFER et al., 2019).

2.10 Formas de Apresentação da Doença

A histoplasmose pode ser classificada como pulmonar quando o agente fúngico se restringe apenas ao sistema respiratório, bem como em disseminada quando ocorre acometimento de pelo menos um órgão fora da cavidade torácica, já a micose na forma gastrointestinal se dá quando a colonização do fungo acomete somente o trato gastrointestinal (AULAKH et al., 2012).

Poucos casos da apresentação da doença limitados a pele foram relatados, onde foi sugerida provável origem de infecção transcutânea, contudo a exclusão do acometimento de outros órgãos como o pulmão foi excluída apenas com base em exames de imagem, assim levanta-se como suspeita a rápida disseminação do fungo pós inalação, sem que lesões pulmonares significativas estivessem presentes na detecção imagiológica (FISCHER et al., 2013; LARSUPROM et al.; 2017).

2.11 Técnicas Diagnósticas

2.11.1 Cultura fúngica

A cultura fúngica é considerada técnica padrão ouro para o diagnóstico da histoplasmose, contudo está implicada em potenciais riscos para os laboratoristas, assim requer execução em laboratórios com níveis adequados de biossegurança. Além disso, é uma técnica considerada dispendiosa, por necessitar de longos períodos de incubação, que variam de duas a quatro semanas (COOK et al., 2012; LLORET et al., 2013).

A se considerar o dimorfismo fúngico, o isolamento do mesmo deve ser realizado com o cultivo do material patológico em dois meios de cultura, Sabouraud glicose ágar (cuja incubação deve ser realizada a 25°C com o cultivo inclinado em tubos de ensaio, a fim de se reduzir os riscos de inalação dos conídios) e ágar infusão cérebro coração (com incubação a 37°C), vale pontuar que ambos os meios devem ser acrescidos de cloranfenicol e cicloheximida (CRUZ., 2010).

Nos casos típicos, a fase micelial de *H. capsulatum* tem a taxa de crescimento mais lenta dentre os fungos dimórficos, nesta forma de apresentação as colônias são cotonosas e podem formar micélios delicados semelhantes a teias de aranhas ou pelos, inicialmente as colônias são de cor branca, mas podem se tornar cinzas ou castanho acinzentadas com o amadurecimento (Figura 2). Cultivos da fase filamentosa podem ser de dois tipos, conhecidos como tipo A (albino), o qual apresenta hifas aéreas brancas e macroconídios lisos e tipo B (Brown), que contém micélios finos e escassos, carregados de macroconídios tuberculados. Sob microscopia as estruturas diagnósticas encontradas nos micélios são macroconídios grandes e espiculados ou enrugados, que medem de 10 a 20 µm de diâmetro, contudo, em culturas mais jovens, microconídios ovais pequenos, originados de conidióforos, podem ser identificados (WANKE & LAZÉRA, 2010; PROCOP et al., 2018).

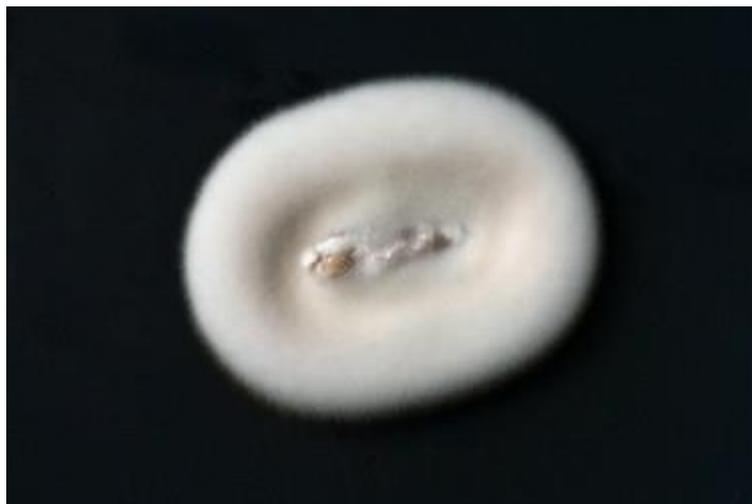


Figura 2: Fase micelial da colônia de *Histoplasma capsulatum* no meio ágar Sabouraud dextrose (KLANG et al., 2015)

Já a fase leveduriforme cultivada a partir das culturas primárias incubadas a 37 °C ou depois da conversão da forma micelial geralmente são lisas, branco-amareladas e um pouco brilhantes com consistência pastosa. À microscopia as leveduras são pequenas e assim medem de 2 a 4 µm de diâmetro, com possibilidade de apresentação de um único botão unipolar (PROCOPI et al., 2018).

O agente *H. capsulatum* foi isolado de culturas fúngicas a partir de secreções, lesões cutâneas, mucosas, fluido ocular, aspirados de pulmão, fígado, linfonodos, líquido pleural e cefalorraquidiano, ou seja, de amostras que geralmente são obtidas de forma invasiva HODGES et al., 1994; JOHNSON et al., 2004; BRÖMEL & SYKES, 2005; BRILHANTE et al., 2012; KLANG et al., 2013; SOUZA et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016; SMITH et al., 2017; FIELDER et al., 2018). A cultura pode ainda ser usada para confirmar a presença do patógeno a partir da citologia ou histopatologia (COOK et al., 2012).

2.11.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica considerada de rápida execução se comparada à cultura fúngica, bem como com maior grau de sensibilidade do que testes sorológicos e mais específica do que a simples visualização do organismo, tendo em vista a amplificação *in vitro* do material genético do organismo presente em células. A aplicação de protocolos de PCR para detecção de *H. capsulatum* em gatos pode ser realizada a partir de amostras cutâneas. Contudo, no geral a realização é relativamente desafiadora, devido a necessidade de coleta de amostras de forma invasiva, a exemplo dos órgãos onde o fungo já foi encontrado a partir da técnica molecular, como: coração, pulmão, intestino, rim, fígado, baço, geralmente obtidos para análise *post-mortem*, tecidos os quais podem ser analisados molecularmente também quando fixados em formol e embebidos em parafina (COOK et al., 2012; BALAJEE et al., 2013; FISCHER et al., 2013; KLANG et al., 2013; LARSUPROM et al., 2017).

2.11.3 Citologia e histopatologia

A citologia e a histopatologia possuem limitações substanciais de realização, tais como a identificação incorreta do agente etiológico e a necessidade de procedimentos invasivos para obtenção de amostras (BRÖMEL & SYKES, 2005; COOK et al., 2012).

O organismo pode ser identificado por exame citológico através de aspirado dos linfonodos, pulmão, fígado, baço, rins, medula óssea, bexiga, ossos, nódulos cutâneos, como também dos líquidos pleural, peritoneal, articular, cefalorraquidiano, além da possibilidade de

citologia de lavados traqueal e broncoalveolar, escovação, *imprint* ou *swabs* cutâneos e raspados retais (HODGES et al., 1994; JOHNSON et al., 2004; BRÖMEL & SYKES, 2005; CARNEIRO et al., 2005; AULAKH et al., 2012; TAYLOR et al., 2012; FISCHER et al., 2013; LLORET et al., 2013; POLF & BANGERT, 2014; JARCHOW & HANZLICEK 2015; SOUZA et al., 2015; LARSUPROM et al., 2017; RENSCHLER et al., 2017; FIELDER et al., 2018; JARDIM et al., 2018).

Da mesma forma, *H. capsulatum* pode ser identificado pelo exame histopatológico de biópsias de pulmão, intestinos, linfonodos mesentéricos, fígado, baço, rins, adrenais, cérebro, medula óssea, lesões e nódulos cutâneos ou mucocutâneos, lesões na língua, palato, ossos, conjuntivas e retina, entre outros. Geralmente ocorre inflamação granulomatosa crônica. Lesões patológicas macroscópicas podem apresentar-se de forma granular a nodular na superfície dos órgãos abdominais e como nódulos granulomatosos ou lesões pontuais nas vísceras, pode ainda ser observado espessamento das paredes intestinais com áreas de necrose, linfadenopatia mesentérica e derrame peritoneal (HODGES et al., 1994; BRÖMEL & SYKES, 2005; AULAKH et al., 2012; BRILHANTE et al., 2012; FISCHER et al., 2013; KLANG et al., 2013; LLORET et al., 2013; SILVEIRA et al., 2016; LARSUPROM et al., 2017; FIELDER et al., 2018).

Várias colorações podem ser usadas com sucesso em preparações citológicas, incluindo “Diff-Quik”, *Wright-Giemsa* e *Wright* modificado. Já as amostras teciduais podem ser coradas com preparações fúngicas especiais como o ácido periódico de Schiff (PAS), a prata de metenamina de Gomori ou *Grocott*. Os organismos são geralmente identificados no meio intracelular, dentro de macrófagos ou menos comumente livres em exsudatos piogranulomatosos. O agente se apresenta na forma de leveduras ovóides ou arredondadas, medindo de 2 a 5 µm de diâmetro, com corpo central, esférico e levemente basofílico, circundado por um halo claro/cápsula, responsável pelo nome atribuído a espécie fúngica *Histoplasma capsulatum*, muito embora não haja existência de uma cápsula verdadeira e sim de um artefato de retração ocasionado pelo processamento nos tecidos (BRÖMEL & SYKES, 2005; LLORET et al., 2013; PROCOP et al., 2018).

Ocasionalmente, *H. capsulatum* pode ser visto dentro de células fagocitárias em amostras de sangue periférico de felinos (BRÖMEL & SYKES, 2005).

2.11.4 Teste sorológico para detecção de anticorpos

A sorologia para detecção de anticorpos por imunodifusão (ID) ou fixação de complemento (FC) é abrangida como um método não confiável de diagnóstico, uma vez que em casos de infecção aguda, por ocorrência do período necessário a soroconversão o teste pode resultar em falso-negativo. Assim como em situações de exposição prévia e recuperação, onde o agente fúngico já foi debelado do organismo e em caso de reação cruzada com outros patógenos o método pode apresentar-se como falso-positivo (JOHNSON et al., 2004; BRÖMEL & SYKES, 2005; BRILHANTE et al., 2012; COOK et al., 2012; LLORET et al., 2013).

Contudo, uma nova metodologia, a qual engloba o imunoensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG para *Histoplasma*, está associada a resultados promissores na medicina humana, onde houve aumento da sensibilidade quando tal teste foi comparado a detecção por ID ou FC, além de melhoria no diagnóstico da histoplasmose ao se realizar um diagnóstico sorológico por IgG combinado ao teste de antígenos, tanto no que se refere a forma pulmonar da micose, quanto a disseminada. Muito embora possam ocorrer reações cruzadas com infecções fúngicas endêmicas, tais quais paracoccidiomicose, coccidiomicose e blastomicose (RICHER et al., 2016; LINDER & KAUFFMAN, 2020; AZAR et al., 2020).

Na medicina felina a técnica de detecção de anticorpos IgG também já foi empregada em um estudo, com resultado quantificado em unidades enzimáticas (UE), de forma que o intervalo de referência compreende a faixa de 0-9,9 UE (RENSHCLER et al., 2017).

2.11.5 Ensaio imunoenzimático antigênico (EIA)

Em pacientes com infecção ativa, antígenos da espécie *histoplasma* são liberados nos tecidos afetados e penetram conseqüentemente em fluidos orgânicos, incluindo plasma, urina e líquido cefalorraquidiano. O EIA comercializado pelo laboratório MiraVista Veterinary Diagnostics® (MV) a se considerar o agente *Histoplasma* pode ser uma ferramenta diagnóstica útil em gatos com sinais clínicos sugestivos de histoplasmose disseminada, visto que pode ser realizado a partir de amostras coletadas de uma maneira pouco invasiva (COOK et al., 2012).

O EIA sérico e da urina pode ser utilizado também para monitorar o tratamento, bem como a recidiva da histoplasmose felina (POLF & BANGERT, 2014; HANZLICEK et al., 2016, AZAR et al., 2020; GRINSTEAD, 2021).

Cook e colabores verificaram em seu estudo, no ano de 2012, que 17 de 18 gatos com histoplasmose disseminada (94%) foram positivos utilizando o EIA MV para *Histoplasma* a partir da urina, com base nos achados citológicos e histopatológicos, sugerindo a utilidade do teste por utilizar amostras obtidas através de métodos pouco invasivos.

Muito embora, McGill e colaboradores verificaram em 2018 que o comprometimento da função renal pode culminar na diminuição da liberação de antígenos na urina.

Estudos realizados em humanos e felinos mostram que a análise do soro e da urina considerando o ensaio imunoenzimático para histoplasmose aumentam a probabilidade de detecção do antígeno, visto que só a detecção da antigenúria pode culminar com resultados falso-negativos. No entanto a viabilidade dessa análise pareada não foi caracterizada em gatos até o momento (SWARTZENTRUBER et al., 2009; JARCHOW & HANZLICEK 2015; AZAR et al., 2020).

A metodologia do EIA disponibilizada pelo laboratório MiraVista Diagnostics consiste na detecção da galactomanana, presente na parede celular do fungo, com alta sensibilidade, sobretudo para casos de histoplasmose disseminada humana e também alta especificidade, no que se refere a diferenciação de doenças fúngicas “versus” não fúngicas, muito embora reações cruzadas principalmente com *Blastomyces dermatitidis* pode ocorrer (LINDER & KAUFFMAN, 2020). O EIA usa placas de microtitulação de 96 poços, que são mais adequados para grandes laboratórios de referência com grandes demandas, de forma que os testes são realizados uma a duas vezes na semana para otimizar a execução da metodologia (ABDALLAH et al., 2021)

Atualmente dois tipos de ensaios imunoenzimáticos de urina foram avaliados em felinos domésticos, o imunoensaio enzimático do antígeno *histoplasma* da urina disponível no mercado pelo laboratório MiraVista Diagnostics® (MV EIA), o qual também disponibiliza avaliação antigênica sérica e o imunoensaio enzimático do antígeno *histoplasma* da urina IMMY baseado em anticorpos monoclonais (IMMY EIA), contudo o MV EIA mostra-se superior quanto ao desempenho diagnóstico (ROTHENBURG et al., 2019).

2.11.6 Ensaio de fluxo lateral (LFA) do antígeno –*Histoplasma*

O LFA comercializado pelo laboratório MiraVista Veterinary Diagnostics®, realizado a partir da urina é utilizado na medicina humana e apresenta desempenho positivo quanto ao diagnóstico da histoplasmose, tal método permite rápido diagnóstico da doença e assim conseqüentemente possibilita emprego ágil da terapia adequada, com mínimos requisitos relacionados tanto a aspectos humanos quanto de infraestrutura e pode ser utilizado à beira de

leito (MARTÍNEZ-GAMBOA et al., 2020; ABDALLAH et al., 2021; CACERES et al., 2021; ANDREANI et al., 2022).

O imunoenensaio se baseia em uma metodologia qualitativa, baseada em fluxo lateral, onde anticorpos policlonais são utilizados para a detecção direta de *Histoplasma* spp. antígeno galactomanano na urina. Para tal 100 µL de urina são adicionados a 25 µL do diluente de amostra com uma pipeta disponível no kit, assim a amostra já diluída é disposta na porta de amostra do dispositivo (Figura 3). À medida que a amostra se move pelo dispositivo, caso o antígeno esteja presente ocorre a ligação deste a um anticorpo detector anti-histoplasma e produz-se uma linha visível. Um controle de ensaio, o qual indica um fluxo adequado da amostra no dispositivo teste e consequentemente um teste válido também produz uma linha visível. O LFA é lido por laboratoristas após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente para determinar se a linha controle está presente e se a linha do teste é visível, o que representa positividade. O teste é considerado inválido caso o controle não seja observado ou se a linha relacionada ao controle ou ao teste se apresentar obscurecida (ABDALLAH et al., 2021).

O LFA pode ainda ser realizado a partir do soro, o que já foi validado também na medicina humana, com associação a alta performance (CÁCERES et al., 2020).

Contudo reações cruzadas em pacientes humanos com criptococose, paracoccidioidomicose, blastomicose, talaromicose e coccidiomicose são prováveis (CÁCERES et al., 2020; CÁCERES et al., 2021; ABDALLAH et al., 2021).

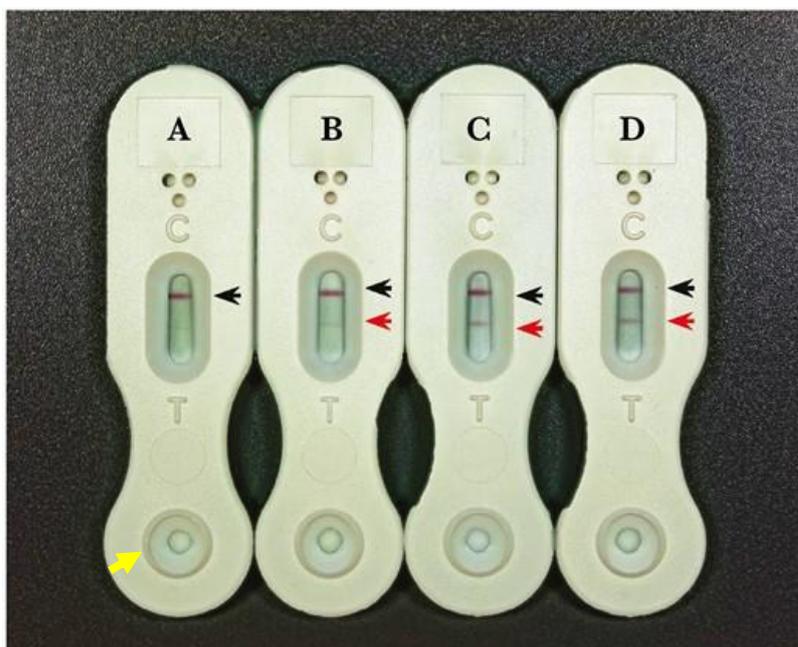


Figura 3: Exemplos de resultados de ensaio de fluxo lateral negativo (A), positivo baixo (B), positivo intermediário (C) e positivo alto (D), com base no nível de antígeno correspondente medido pelo imunoenensaio enzimático. As setas pretas apontam para a linha de controle positivo (C), já as setas vermelhas para a linha de detecção (T), bem como a seta amarela corresponde a porta de amostra do dispositivo, onde a urina diluída deve ser colocada. Fonte: Adaptado de Abdallah e colaboradores 2021.

2.12 Tratamento

A terapia antifúngica padrão para a abordagem da histoplasmose em gatos baseia-se no uso do itraconazol em monoterapia na dose de 10 mg/kg, por via oral, a cada 24 horas, bem como na associação deste com a anfotericina B em casos potencialmente graves da doença, a qual deve ser utilizada na dose de 0,25 mg/kg, por via intravenosa, a cada 48 horas

ou na dose de 0,5 mg/kg, por via subcutânea junto a 100 mL de cloreto de sódio 0,9% e 100 mL de glicose de 2,5 a 5%, para as ambas as vias de administração a dose cumulativa total é de 4 a 16 mg/kg (LLOREAT et al., 2013; LARSUPROM et al., 2017; JARDIM et al., 2018).

Cabe ressaltar que o itraconazol tem potencial hepatotóxico e a anfotericina B é potencial causadora de nefrotoxicidade em felinos (BROMEL & SYKES, 2005; REINHART et al., 2012; GREMIÃO, et al., 2021).

Outro antifúngico utilizado para o tratamento da micose em felinos é o fluconazol, o qual possui menor custo que o itraconazol e resulta em desfechos similares a este no que tange a mortalidade e taxa de recrudescência (REINHART et al., 2012), muito embora haja possibilidade de resistência medicamentosa adquirida associada ao fluconazol devido a susceptibilidade reduzida (RENSCHLER et al., 2017).

Já o cetonazol foi empregado para o tratamento da histoplasmoze felina com manifestação em plano nasal por Caneiro e colaboradores (2005), na dose de 10 mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante 15 dias e após na mesma dose e via de administração, a cada 24 horas, durante 10 dias, associado ao cetoconazol tópico, onde houve resposta satisfatória a terapia. Neste estudo a escolha da terapia se deveu a apresentação da micose aparentemente limitada a região de narinas e ao baixo custo da monoterapia.

A metodologia, bem como os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de capítulos, de forma que cada capítulo corresponda a um artigo científico. O capítulo I foi confeccionado nos moldes do periódico *Journal of the American Veterinary Medical Association* (ISSN 0003-1488) e o capítulo II nos moldes do periódico *Journal of Feline Medicine and Surgery* (ISSN 1098-612X).

Cabe destacar que o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), bem como o aceite da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) constam no Anexo A e Anexo B respectivamente. Já a ficha clínica de avaliação, utilizada para os animais selecionados e o fluxograma que resume a metodologia aplicada encontram-se no Anexo C e Anexo D, nesta ordem. Ademais aos dados clínicos compilados dos felinos analisados podem ser visualizados por meio do Anexo E.

CAPÍTULO I

Análise pareada da antigenemia e antigenúria para *Histoplasma* como forma alternativa de diagnóstico pouco invasivo em gatos com histoplasmose pulmonar e disseminada

Mariana P. de B. Jardim, M.¹; Andrew S. Hanzlicek, DVM, MS, DACVIM²; Gabriela de C. Cid, D.ra³; Heloisa J. M. de Souza, D.ra.⁴

¹Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, Brasil, bolsista CAPES.

²MiraVista Diagnostics, Indianapolis, IN, USA

³Doutora, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, Brasil

⁴ Prof. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Brasil

*Autor para correspondência: Msc. Mariana Jardim (jardim.marii@gmail.com)

20 **OBJETIVO**

21 Caracterizar dados clínicos de felinos com histoplasmose, bem como analisar o ensaio
22 imunoenzimático antigênico para *Histoplasma* na urina e no soro destes animais, a partir do
23 diagnóstico prévio de tal micose.

24

25 **ANIMAIS**

26 12 felinos domésticos (*Felis catus*) diagnosticados com histoplasmose pelas técnicas de
27 diagnóstico convencionais (citologia, histopatologia, cultura Fúngica, reação em cadeia da
28 polimerase) ou por resposta terapêutica.

29 **PROCEDIMENTOS**

30 Os gatos previamente diagnosticados com histoplasmose pelas técnicas convencionais foram
31 submetidos a caracterização clínica e a análise pareada do soro e da urina para realização do
32 ensaio imunoenzimático antigênico (EIA) do agente *Histoplasma*.

33

34 **RESULTADOS**

35 Dos 12 animais com sangue disponível para análise antigênica 11 (91,67%) apresentaram
36 antigenemia e dos 11 gatos em que a urina foi passível de coleta 9 (81,82%) exibiam
37 antígenos urinários, de forma que todos os animais possuíam antígenos séricos ou na urina. A
38 alteração respiratória foi a preponderante queixa relatada pelos tutores de animais com
39 histoplasmose, bem como a dispneia foi o majoritário sinal clínico.

40

41 **RELEVÂNCIA CLÍNICA**

42 O EIA para *Histoplasma* quando realizado de forma pareada do soro e urina dos felinos,
43 consiste em uma ferramenta diagnóstica pouco invasiva e confiável para a detecção da
44 micose. Assim, os veterinários devem ser encorajados a realização do EIA, visto a ocorrência
45 da dispneia e conseqüentemente a instabilidade clínica dos animais acometidos pelo fungo,
46 onde o emprego de técnicas diagnósticas invasivas representam desde agravamento do quadro
47 clínico a grande risco a vida.

48

49 **Introdução**

50 O fungo *Histoplasma capsulatum* é um agente de ampla distribuição global, endêmico
51 nas Américas e potencial causador da histoplasmose felina, a qual é considerada a segunda
52 micose sistêmica mais comum em gatos nos Estados Unidos da América (EUA).¹⁻³

53 O diagnóstico da doença em gatos é considerado desafiador, visto que os testes
54 diagnósticos convencionais, como citologia, histopatologia, cultura fúngica e reação em
55 cadeia da polimerase (PCR) geralmente requerem coleta de amostras de forma invasiva, o que
56 em muitas ocasiões é incompatível com a clínica do animal.⁴⁻⁸ A sorologia, realizada a partir
57 do sangue, pelas técnicas de imunodifusão ou fixação de complemento é considerada uma
58 forma não confiável de diagnóstico pela grande ocorrência de resultados falso positivos e
59 negativos^{4,5,7,9}. Contudo novos testes, como o ensaio imunoenzimático antigênico (EIA) para
60 *Histoplasma*, estão sendo ponderados para abordagem desta micose, visto como grande
61 vantagem a utilização de amostras colhidas de forma pouco invasiva. Em um estudo, o qual é
62 o único em que o EIA foi avaliado em uma série considerável de gatos, verificou-se a partir

63 da urina de animais com diagnóstico prévio de histoplasmose, que 94% deles eram positivos
64 quanto a antigenúria, o que revelou a utilidade do teste, contudo de forma a não ser realizado
65 como uma ferramenta diagnóstica isolada, visto que um felino do estudo, com histoplasmose,
66 não foi identificado a partir do ensaio realizado.⁵ Já outro revelou a presença de um animal
67 com histoplasmose associada a comprometimento renal, o qual possuía no EIA antígenos
68 séricos mas não urinários.¹⁰ Assim, pesquisas suplementares são requeridas para o emprego
69 confiável do EIA no diagnóstico da histoplasmose em felinos, como a análise pareada do soro
70 e urina, bem como para melhor caracterização clínica da micose nesta espécie animal, visto
71 possível subdiagnóstico¹¹.

72 Têm-se como objetivo caracterizar dados clínicos de felinos com histoplasmose, bem
73 como analisar o ensaio imunoenzimático antigênico para *Histoplasma* na urina e no soro
74 destes animais, a partir do diagnóstico prévio de tal micose.

75 **Materiais e Métodos**

77 Foram selecionados 12 felinos domésticos (*Felis catus*), independente do sexo,
78 gênero, raça ou idade com histoplasmose. Tais animais eram oriundos do atendimento
79 realizado no setor de clínica médica de gatos domésticos, do hospital veterinário de pequenos
80 animais (HVPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) ou de
81 atendimentos particulares no município do Rio de Janeiro-Brasil. Todos os tutores que
82 permitiram que seus respectivos animais fossem incluídos no projeto de pesquisa leram e
83 assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa foi submetida à
84 Comissão de Ética na Pesquisa em Uso de Animais (CEUA) da UFRRJ e aprovada sob o
85 número de protocolo nº 4895210619. O período de execução da pesquisa foi de agosto de
86 2019 a maio de 2022. Os felinos considerados com diagnóstico de histoplasmose e assim
87 incluídos na pesquisa foram aqueles que apresentavam: diagnóstico citológico,
88 histopatológico, micológico, molecular ou algum teste que pudesse confirmar a positividade
89 para histoplasmose, bem com aqueles com resposta clínica e/ou de imagem ao tratamento
90 antifúngico com remissão total dos sinais clínicos relacionados a micose. Os gatos que
91 atenderam aos critérios de inclusão e para os quais não foi possível a coleta de amostras de
92 sangue e/ou urina foram excluídos da pesquisa.

93 **Caracterização Clínica**

94 Para os animais com diagnóstico de histoplasmose foi realizada caracterização clínica
95 através do preenchimento de uma ficha de avaliação. Neste formulário constaram perguntas
96 direcionadas aos médicos veterinários que atenderam felinos com histoplasmose, sobre a
97 identificação do animal, sexo, raça, idade, estilo de vida e histórico com queixa clínica,
98 sinais clínicos, alterações laboratoriais e de imagem, além da forma de diagnóstico da
99 doença, forma de apresentação clínica da micose, bem como o tipo, duração do tratamento e
100 desfecho do quadro clínico. Foram realizadas, quando possível, radiografias torácicas nas
101 incidências latero-lateral e ventro-dorsal bem como propôs-se a execução da ultrassonografia
102 abdominal, para se investigar o acometimento de órgãos pelo agente fúngico *Histoplasma*
103 *capsulatum*. A histoplasmose foi classificada quanto a forma de apresentação da doença em:
104 disseminada, pulmonar ou gastrointestinal, para tal foram considerados exames de imagem
105 como a radiografia e a ultrassonografia e testes de diagnósticos convencionais, contudo, a
106 histopatologia *post mortem* foi soberana na classificação quando os órgãos previamente
107 suspeitos de acometimento foram analisados. Assim, a micose foi considerada disseminada
108 quando o organismo fosse identificado no pulmão e pelo menos um órgão fora da cavidade
109 torácica estivesse acometido por *Histoplasma*. Para a classificação da forma pulmonar, o
110 agente etiológico deveria se limitar somente ao sistema respiratório, bem como os gatos
111

112 inclusos no grupo gastrointestinal deveriam ter o agente fúngico restrito ao trato
113 gastrointestinal apenas. Os animais foram categorizados como curados clinicamente, caso
114 estivessem em remissão total dos sinais clínicos relacionados a doença no momento da
115 redação deste trabalho.

116

117 **Coleta de Amostras Biológicas**

118 De todos os animais com histoplasmose foram coletadas amostras sanguíneas para
119 realização do hemograma (2 mL), bioquímicas séricas (3 mL) e teste de antígeno sérico para
120 *Histoplasma*. Preconizou-se realizar as seguintes bioquímicas séricas para cada animal:
121 proteínas totais e frações, alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina. Parte do soro
122 obtido (mínimo 1 mL) foi congelado para execução do ensaio imunoenzimático antigênico
123 (EIA) para *Histoplasma*.

124 Os felinos com a micose foram também submetidos a coleta de urina, a qual se deu
125 por cistocentese ou micção natural, em um volume mínimo de 5mL. Posteriormente a urina
126 foi congelada para realização subsequente do EIA para *Histoplasma*.

127 Para a realização do EIA as amostras foram enviadas para o laboratório MiraVista
128 (MiraVista Veterinary Diagnostics, Indianapolis, EUA). Cabe pontuar que quaisquer
129 quantidades mensuráveis do antígeno no soro ou na urina foi classificado como resultado
130 positivo.

131

132 **Métodos estatísticos**

133 Para fins de análise descritiva foram empregues cálculos de frequência e frequência
134 relativa para variáveis categóricas e cálculos de média, desvio padrão, mínimo e máximo para
135 variáveis numéricas. Já para a comparação de proporções, foi utilizado o teste Z de igualdade
136 de proporções e teste Qui-quadrado de aderência a uma população uniforme (com todas as
137 frequências iguais), onde P-valores menores que 0.05 indicaram a existência de pelo menos
138 uma categoria com frequência diferente das demais, o que é válido para toda vez que tal
139 abordagem analítica foi realizada. Executou-se ainda análise de sensibilidade dos testes
140 avaliados e também se aplicaram cálculos de intervalo de confiança para as proporções como
141 ferramenta para fazer testes de comparação par-a-par.

142 Para comparar o número de doses de anfotericina B em função da creatinina sérica foi
143 empregue o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis devido à não normalidade dos dados, os
144 quais foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk. Com a finalidade de se verificar se
145 houve diferença entre a ALT inicial e final em função do uso do itraconazol, foi utilizado o
146 teste não paramétrico de Wilcoxon, mediante a rejeição da normalidade dos dados pelo teste
147 de Shapiro-Wilk.

148 Por fim, a associação entre o prognóstico e a corticoterapia antes da introdução dos
149 antifúngicos foi testada através do teste Qui-quadrado de independência.

150 As análises foram feitas pelo uso do software livre R (R versão 4.2.2 (2022-10-31
151 ucrt).

152

153 **Resultados**

154 Por meio da análise antigênica, a se considerar o ensaio imunoenzimático antigênico
155 (EIA) para *Histoplasma*, pode-se verificar que dos 12 gatos com soro disponível, 11 (91,67%)
156 apresentavam antigenemia e dos 11 animais em que a urina foi coletada, nove (81,82%)
157 exibiam antigenúria, de forma que todos os animais diagnosticados com histoplasmose
158 previamente possuíam pelo menos antígenos sanguíneos ou urinários, com intervalos
159 variando de $< 0,4$ a $>$ que 19 ng/mL (**Tabela 1**). Cabe pontuar que um animal não possuía
160 urina a ser analisada e deste foi realizada avaliação apenas do soro. Tanto a positividade no

161 que tange a antigenúria quanto a antigenemia apresentaram significância estatística, visto que
 162 o p-valor quanto a antigenemia foi de 0.004 e quanto a antigenúria de 0.035, o que indica que
 163 os gatos com a micose tendem a estes achados. A sensibilidade geral do EIA sérico e urinário
 164 foi de 100% ao se considerar os animais positivos para histoplasmose por algum método de
 165 diagnóstico (e para um onde foi realizado diagnóstico terapêutico).

166

167 **Tabela 1-** Resultado da antigenúria e antigenemia mediante EIA MiraVista Diagnostics para *Histoplasma*, de
 168 gatos domésticos com histoplasmose.

| Felino | EIA <i>Histoplasma</i> ng/mL - Soro | EIA <i>Histoplasma</i> ng/mL - Urina |
|---------------|--|---|
| 1 | BLQ | 0.88 |
| 2 | 0.64 | 2.85 |
| 3 | BLQ | Negativo |
| 4 | ALQ | ALQ |
| 5 | 16.2 | ALQ |
| 6 | BLQ | Negativo |
| 7 | 5.4 | 13.2 |
| 8 | 0.6 | 6.8 |
| 9 | 11.3 | 18.9 |
| 10 | ALQ | ALQ |
| 11 | Negativo | BLQ |
| 12 | 7.94 | Não realizado |

169 EIA = Ensaio imunoenzimático antigênico

170 EIA: Resultados relatados como ng/mL na faixa de 0,4 - 19,0 ng/mL;

171 Resultados acima do limite de detecção, mas abaixo de 0,4 ng/mL, são relatados como "Positivo, abaixo do
 172 limite de quantificação" (BLQ);

173 Resultados acima de 19,0 ng/mL são relatados como "Positivo, acima do limite de quantificação" (ALQ)

174

175 Os felinos com histoplasmose não apresentaram propensão de gênero, visto que oito
 176 (66,67%) eram machos e quatro (33,33%) fêmeas, (p-valor=0.248), contudo eram
 177 majoritariamente castrados (10/12=83,33%) (p-valor=0.021) e sem raça definida (SRD)
 178 (8/12=66,7%), (p-valor=0.010). Já a idade variou entre 2 e 11 anos, com média igual a 6.75
 179 anos (desvio padrão 2.83). Quanto ao estilo de vida os felinos com a doença fúngica
 180 mostraram-se preponderantemente (10/12=83%) domiciliados, (p-valor= 0.021).

181 A alteração respiratória foi predominante (12/12=100%) dentre os principais achados
 182 no que tange ao histórico dos animais com *Histoplasma*, (p-valor= < 0.001), (**Figura 1**).

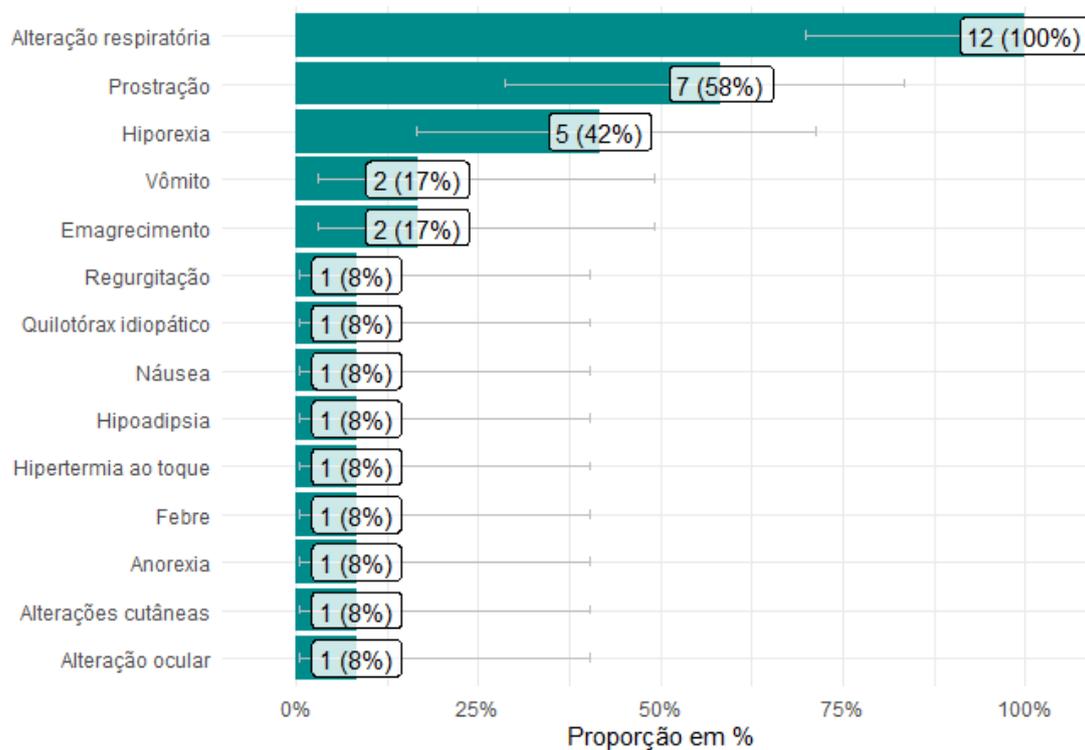


Figura 1- Queixas clínicas relatadas pelos tutores de gatos com histoplasmosose.

Já dentre os primordiais sinais clínicos, a dispneia foi verificada em 7 (58,33%) dos gatos com a doença fúngica (p-valor= <0.001), (Tabela 2).

183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211

| Variável | Frequência | Frequência relativa (%) | Intervalo de confiança 95% para frequência | p-valor |
|--|------------|-------------------------|--|---------|
| Dispneia | 7 | 58.33 | (28.6%, 83.5%) | <0.001* |
| Desidratação | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Febre | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Taquipneia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Emagrecimento | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Mucosas hipocoradas | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Ruído respiratório | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Doença periodontal | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Linfonomegalia | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Hipotermia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Esplenomegalia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Espirros | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Alterações cutâneas | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hepatomegalia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Rins irregulares | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Ausulta cardiopulmonar abafada | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Prolapso de terceira pálpebra | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Nódulo cutâneo | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Apatia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Quemose da conjuntiva superior do olho direito | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Efusão pleural | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Ausulta pulmonar abafada | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |

213 *Referente ao nível de significância, sendo significativa a 0,1%

214

215 Quanto aos achados pertinentes ao hemograma e bioquímica sérica, pôde se observar a
 216 tendência de ocorrência da hipoalbuminemia e linfocitopenia respectivamente (**Tabela 3**).
 217 Ademais no que se refere aos exames sanguíneos foi visualizado que dos 11 (91,67%) gatos
 218 domésticos que foram testados para o vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da
 219 imunodeficiência felina (FIV), nove (81,82%) eram negativos para FIV e 10 (90,91%) para
 220 FeLV, o que permitiu observar propensão estatística dos animais para negatividade quanto a
 221 ambos os vírus (p-valor=0.035 e 0.007 respectivamente). É digno de nota que foram
 222 identificados dois animais (18,18%) FIV positivos e um (9,09%) FeLV positivo.

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

Tabela 3- Perfil laboratorial dos felinos domésticos com histoplasmose.

| Variável | Frequência | Frequência relativa (%) | Intervalo de confiança 95% para frequência | p-valor |
|----------------------------|------------|-------------------------|--|---------|
| Hipoalbuminemia | 9 | 75 | (42.84%, 93.31%) | <0.001* |
| Linfocitopenia absoluta | 6 | 50 | (25.38%, 74.62%) | <0.001* |
| Hiperglobulinemia | 5 | 41,67 | (16.5%, 71.4%) | |
| Anemia | 5 | 41.67 | (16.5%, 71.4%) | |
| Hiperproteinemia | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Eosinopenia absoluta | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| DNNE leve | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Monocitopenia absoluta | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Hiperglicemia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Neutropenia absoluta | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Trombocitopenia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Leucopenia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Aumento de creatinina | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Monocitose absoluta | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Diminuição de creatinina | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hiperalbuminemia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Aumento de ALT | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hipofosfatemia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hipocalemia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hiperbilirrubinemia direta | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Leucocitose | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Neutrofilia absoluta | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |

236 ALT = Alanina Aminotransferase; DNNE = Desvio nuclear neutrofílico à esquerda

237 *Referente ao nível de significância, sendo significativa a 0,1%

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

O padrão radiográfico prevalente dentre os animais com pneumonia (12/12=100%) foi o infiltrado interstício alveolar (8/12=66,67%), seguido do broncointersticial (4/12=33%). Os demais achados super-representados consistem na verificação de hepatomegalia (8/12=66,67%). No que se refere a ultrassonografia abdominal uma grande parcela dos animais não realizou tal exame (5/12=41,67%), bem como as alterações relatadas não foram apontadas como tendenciosas aos felinos com a doença fúngica.

O diagnóstico da micose foi realizado principalmente por citologia do líquido pleural fisiológico (5/12=41,67%), seguido por histopatologia (4/12=33,33%), enquanto o diagnóstico por análise citológica da medula óssea, citologia cutânea, PCR, cultura fúngica, positividade para o imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG realizado a partir do soro sanguíneo para *Histoplasma* e presunção da doença por resposta terapêutica foi empregado uma vez cada (8,33%). Cabe ressaltar que para alguns animais (25%), técnicas de diagnóstico combinadas foram empregadas (**Figura 2**).

A forma de apresentação da doença foi sobretudo disseminada, a qual ocorreu para oito animais (66,67%), subseqüente a pulmonar, que se deu para 4 gatos (33,33%), muito embora não tenha havido tendência estatística de tal ocorrência.

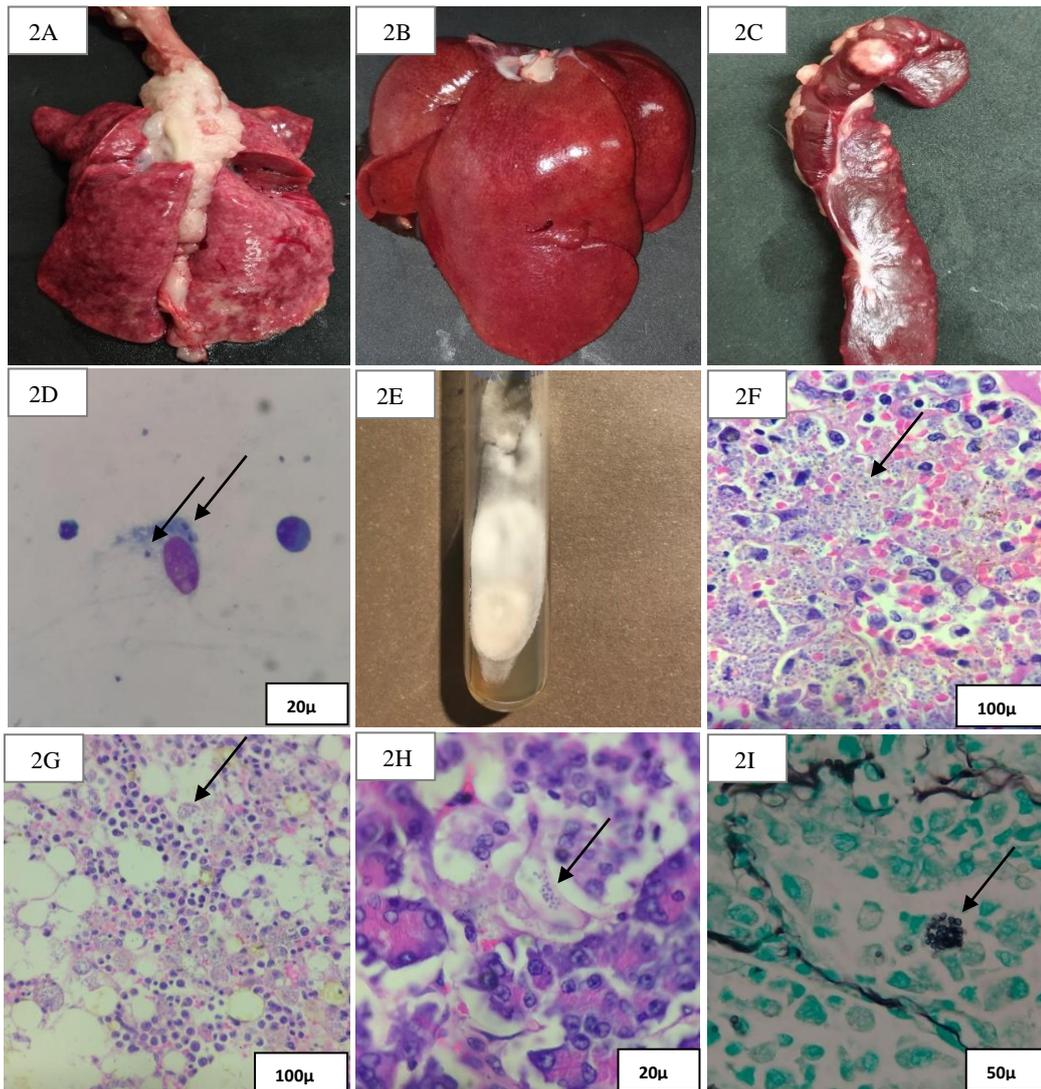
257
258

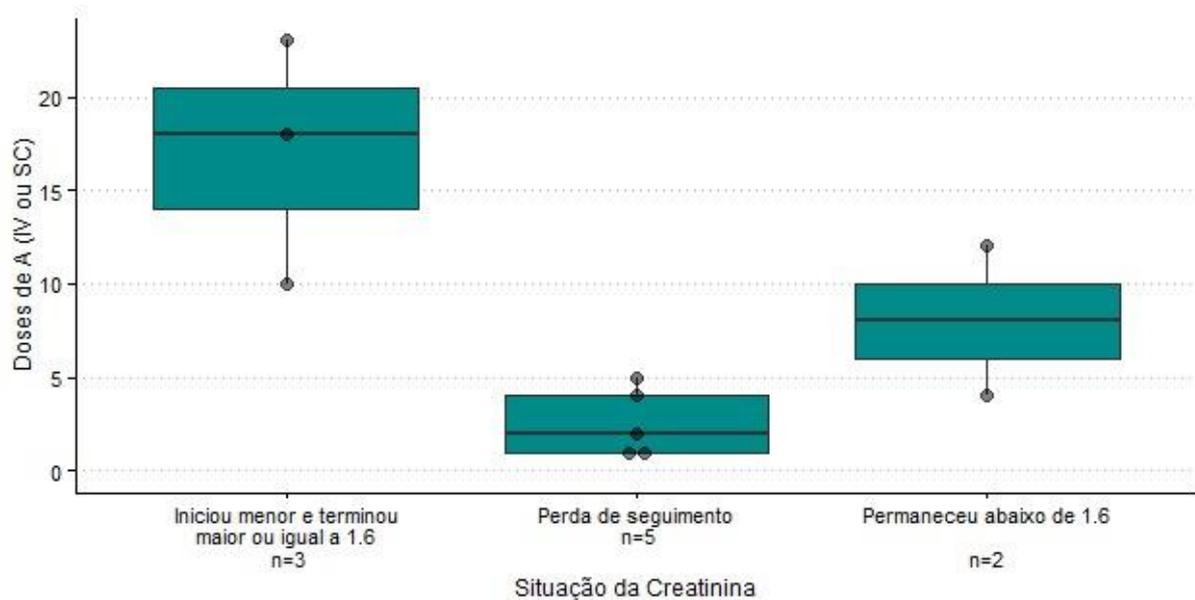
Figura 2- Imagens de técnicas diagnósticas empregadas em gatos com *Histoplasma*. A: Pulmão: parênquima com padrão micronodular difuso; B: Fígado: padrão lobular difuso evidenciado; C: Baço: parênquima esplênico exibindo nodulações difusas de coloração esbranquiçada; D: Citopatológico pulmonar, coloração rápida tipo Romanowsky: presença de macrófagos com inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma* (seta preta); E: Colônia de *Histoplasma capsulatum*; F: Histopatológico de baço: moderado infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma* (seta preta); G: Histopatológico de medula óssea: moderado infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma* (seta preta); H: Histopatológico de pâncreas: leve infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma* (seta preta); I: Método histoquímico para coloração Grocott positivo para estruturas intracitoplasmáticas em parênquima pulmonar (seta preta). Fonte: Gabriela de Carvalho Cid, 2022 (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2F, 2G, 2H, 2I); Mario Tatsuo Makita (Figura 2E).

O tratamento para todos os animais (12/12=100%) do estudo baseou-se no emprego de antifúngicos, a terapia consistiu no uso do itraconazol oral para 11 animais (91,67%), bem como na aplicação da anfotericina B por via subcutânea para oito gatos (67%), onde a mesma foi administrada junto a 100 mL de cloreto de sódio 0,9% e 100 mL de glicose 5%. A anfotericina B foi ainda aplicada por via intravenosa para cinco felinos (41,7%), é digno de nota que três gatos (25%) foram submetidos a terapia com anfotericina B tanto por via

279 subcutânea quanto por via intravenosa. Cabe ainda pontuar que um animal (8,33%) foi
280 abordado com o uso iodeto de potássio por via oral e que nove animais (75%) foram sujeitos a
281 utilização concomitante de dois ou três antifúngicos.

282 O tempo de duração de terapêutica com itraconazol variou entre 0 a 24 semanas, com
283 média de 7.58 semanas (desvio padrão 8.57), já quanto a dose desta terapia, a média utilizada
284 foi de 97,27 mg/gato (desvio padrão 16,79). Para os felinos que receberam anfotericina B por
285 via subcutânea as doses administradas variaram de 2 a 23, com média de uso de 0,5 mg/kg da
286 medicação, já quando o mesmo antifúngico foi empregado por via intravenosa, em três
287 animais foram aplicados uma dose e em dois, duas doses da medicação, a média da dose
288 empregada neste caso foi de 0,25 mg/kg. A maioria dos animais (9/12=75%) não apresentou
289 recaída (p-valor=0.083), ademais, dentre os que tiveram recidiva fúngica, um (11,11%), era
290 FIV e FeLV positivo.

291 Ao se comparar a mensuração da creatinina sérica inicial e final dos gatos de acordo com
292 as aplicações de anfotericina B por via subcutânea ou intravenosa, uma propensão de aumento
293 da creatinina se deu em função de um maior número de aplicações de anfotericina B, (p-
294 valor=0.047) (**Figura 3**). No que se refere à análise de Alanina Amino Transferase (ALT)
295 inicial e final, em função da administração do itraconazol, não foi estabelecida relação entre
296 as variáveis, de forma que o aumento de ALT não está relacionado ao maior tempo de terapia
297 com o composto azólico.



298 **Figura 3-** Análise comparativa da creatinina sérica inicial e final por número de aplicações do antifúngico
299 anfotericina B em gatos com histoplasmose.

300 A= Anfotericina; IV= Intravenoso; SC= Subcutâneo; n=número; Valor de referência da Creatinina sérica: <1,6
301 mg/dL³⁰

302
303
304 Foi avaliado também se o momento de introdução da corticoterapia (antes ou após a
305 instituição do tratamento antifúngico), quando empregada, impactava o desfecho clínico e
306 obteve-se como resultado que dos doze gatos infectados pelo agente, sete (58,33%) fizeram
307 uso de corticóides sistêmicos antes da terapia antifúngica e destes seis (85,71%) tiveram
308 conclusão desfavorável do caso (4 óbitos e 2 eutanásias). Já para os sete felinos (58,33%) que
309 foram abordados com corticosteroides após o início das medicações antifúngicas, cinco deles

310 (71,43%) fizeram uso de corticóide nos dois momentos avaliados, então foram excluídos
311 quanto a análise do prognóstico, assim, dos dois animais que utilizaram os corticosteróides
312 somente após antifúngicos, ambos evoluíram para cura clínica, o que aponta a propensão
313 significativa de um resultado clínico negativo, associado aos animais que foram submetidos a
314 corticoterapia antes da introdução dos antifúngicos. É digno de nota que os corticosteróides
315 utilizados foram a metilprednisolona, na dose média de 20 mg/gato, bem como a
316 dexametasona, com média de uso de 0,5 mg/kg e a prednisolona, onde a média de dose
317 empregada para tal fármaco foi de 1,13 mg/kg.

318 O desfecho clínico dos felinos com histoplasmose foi principalmente desfavorável, visto
319 que dos 12 animais, cinco (41,7%) evoluíram para óbito e 2 (16,7%) para eutanásia, enquanto
320 cinco (41,7%) obtiveram cura clínica.

321

322 Discussão

323 O ensaio imunoenzimático (EIA) para *Histoplasma* já foi apontado como útil para a
324 identificação da histoplasmose em gatos, com limitações, quando são utilizadas amostras
325 isoladas de soro ou urina.^{5,10} Muito embora, a combinação de amostras, com finalidade de se
326 aumentar a acurácia diagnóstica da doença, não foi avaliada em uma série de casos, até o
327 momento de redação desta pesquisa, o que torna o estudo de extrema relevância em âmbito
328 mundial, onde pôde-se verificar que todos os felinos (12/12=100%) com confirmação prévia
329 de histoplasmose, apresentaram antigenemia ou antigenúria. Tal dado comprova a eficácia do
330 teste no diagnóstico da micose se realizado de forma pareada, a se considerar os espécimes
331 utilizados (soro e urina), o que pode vir a encorajar clínicos veterinários quanto a abordagem
332 da micose, visto que tal análise pode ser realizada a partir de amostras obtidas de forma pouco
333 invasiva, como soro e urina. Ademais, não há relatos sobre o uso de técnicas para a detecção
334 de antígenos no país de origem da presente pesquisa (Brasil),¹¹ de forma que este é o primeiro
335 trabalho, onde o EIA foi empregado para o reconhecimento da histoplasmose em animais.

336 Cabe pontuar que um dos gatos, o qual possuía histoplasmose com acometimento ocular,
337 apresentou positividade quanto a presença de antígenos na urina, o que difere do que foi
338 observado por Smith e colaboradores em 2017¹², onde dos felinos com histoplasmose e
339 manifestação ocular associada, nenhum apresentou positividade no EIA para *Histoplasma*,
340 seja da urina, soro ou até mesmo de fluidos oculares. Contudo, a antigenúria verificada no
341 gato da atual pesquisa é concordante a outros estudos mais atuais, onde os animais com sinais
342 oculares apresentaram majoritariamente antígenos urinários.¹³⁻¹⁴ Assim, ressalta-se que
343 mesmo em casos de histoplasmose com envolvimento ocular, a antigenúria pode ser
344 verificada.

345 Apesar da sabida reação cruzada do EIA MiraVista com outros agentes fúngicos,
346 sobretudo o causador da blastomicose,¹⁵ exclui-se a possibilidade de falsos positivos neste
347 estudo, visto o diagnóstico prévio de histoplasmose por outras técnicas de diagnóstico para a
348 maioria dos gatos, já que apenas um dos 12 felinos foi diagnosticado com base na resposta
349 clínica e/ou de imagem a terapia instituída. Ademais ressalta-se que a blastomicose é
350 considerada uma micose rara para felinos,⁷ não havendo relatos de tal ocorrência no país de
351 origem do estudo. Muito embora, estudos prospectivos a nível nacional devam considerar a
352 reação cruzada do teste de antígenos com *Sporothrix shenckii*, a qual já foi documentada,¹⁶
353 dado a ocorrência endêmica da esporotricose no Brasil.¹⁷

354 A histoplasmose felina não está associada a predisposição de gênero, contudo, os gatos
355 sem raça definida (SRD) e castrados mostram-se como prevalentes em diversos estudos os
356 quais englobam uma série de casos^{4,11,14,18-21}, desta forma entende-se que não haja de fato
357 propensão racial para ocorrência da micose na espécie. Os felinos adultos jovens, faixa etária
358 que compreende animais de um a seis anos, são mais tendentes a doenças fúngicas sistêmicas

359 como a histoplasmose,^{19,22,23} entretanto, outros estudos, os quais envolvem um considerável
360 número amostral, apontam uma propensão de gatos mais velhos quanto ao desenvolvimento
361 da micose,^{18,21} o que pode se justificar pelo fato destes gatos estarem mais sujeitos a doenças
362 comórbidas, tais como enteropatias crônicas, doença renal crônica, hipertireoidismo, diabetes
363 mellitus, neoplasias, dentre outras,²³ as quais talvez possam predispor a infecção por
364 *Histoplasma*.

365 Felinos domiciliados podem se contaminar com *Histoplasma* principalmente através do
366 acesso a vasos de plantas e porões abandonados¹⁹, assim acredita-se que estas tenham sido
367 formas de exposição para a maioria dos animais analisados, os quais eram sobretudo
368 domiciliados. Destaca-se assim uma possível fonte comum do fungo e risco de histoplasmose
369 para os tutores, principalmente os imunocomprometidos, já que a doença não é considerada
370 zoonótica, muito embora os felinos possam atuar como sentinelas da micose.^{4,7,20} Ademais,
371 outro ponto de relevância de tal resultado baseia-se no fato do país de realização do estudo em
372 questão (Brasil), ter sido apontado atualmente como um centro de dispersão de *Histoplasma*
373 na América do Sul, com base em estudos moleculares realizados²⁴, o que embasa a
374 necessidade de identificação dos nichos fúngicos da doença.

375 A alteração respiratória é uma queixa clínica comumente relatada pelos tutores de gatos
376 com histoplasmose, ademais é um sinal clínico frequente pontuado pelos médicos
377 veterinários, como dispneia.^{4,18,19,21} Este achado confere fator prognóstico negativo aos
378 felinos com histoplasmose, conforme visto no estudo atual, onde dos sete animais com
379 dificuldade respiratória, quatro (57,14%) tiveram desfecho negativo (três óbito e uma
380 eutanásia) e no estudo de Reinhart e colaboradores, 2012¹⁹, onde destaca-se que a alteração
381 respiratória grave em gatos está associada a maior taxa de mortalidade devido a morte por
382 parada respiratória ou eutanásia, visto o mal prognóstico entendido pelos tutores.

383 As citopenias são ocorrentes na histoplasmose felina, as quais podem ser fundamentadas
384 na ocorrência da síndrome hemofagocítica, que causa desregulação imune, produção
385 excessiva de citocinas inflamatórias, ativação demasiada de macrófagos e infiltração de
386 linfócitos e macrófagos hemofagocíticos em vários órgãos.²¹ Desta forma justifica-se a
387 linfocitopenia como principal achado no hemograma dos animais com o fungo. Já a
388 hipoalbuminemia pode ocorrer devido ao déficit da síntese de albumina, perda proteica, bem
389 como inflamação, como visto em outros trabalhos, os quais estudam gatos com a doença
390 fúngica.^{18,19,22} O FIV não parece predispor os gatos a histoplasmose,^{4,19} já a FeLV é
391 presumivelmente apontada como uma infecção comum associada a doença fúngica em alguns
392 trabalhos,^{4,18} muito embora em outros não aparenta ter relação causal.¹⁹ Ademais, a ocorrência
393 do FeLV não está associada a piores desfechos clínicos,¹⁸ como visto no atual estudo, de
394 forma que um gato FIV/FeLV positivo (50%) evoluiu para cura clínica e outro gato FIV
395 positivo (50%) veio a óbito.

396 A pneumonia é um achado radiográfico comum na histoplasmose felina, muito embora o
397 padrão intersticial não misto seja mais comumente relatado.^{18,19,21,22} Os infiltrados alveolares
398 têm sido associados a piores prognósticos,¹⁸ o que é condizente ao observado através desta
399 pesquisa, onde dos oito animais com infiltrados interstício alveolar (66,67%), 4 deles (50%)
400 evoluíram para óbito ou eutanásia. Já outra anomalia recorrente nos exames de imagem é a
401 hepatomegalia.^{19,21,22}

402 A citologia pleural foi o método de diagnóstico mais empregado no estudo, o que conflita
403 com o histórico e sinal clínico dos animais, visto que tal técnica é invasiva quanto a coleta de
404 amostras e sua execução implica em riscos para um animal descompensado, o que pode estar
405 atrelado ao possível subdiagnóstico da doença, devido a desafios na abordagem.⁵

406 A forma disseminada é relatada como preponderante para histoplasmose em gatos, de
407 modo que a pele, fígado, baço, rins, pâncreas, olhos e medula óssea foram os principais alvos
408 do fungo a nível sistêmico, baseado no encontro do agente nos tecidos, o que assume

409 conformidade com o proposto em literatura.^{4,18,19} Entretanto, vale pontuar que até o momento,
410 no que tange o envolvimento do pâncreas na histoplasmose felina, apenas o estudo de Auger e
411 colaboradores em 2021²⁵ estabeleceu uma possível relação entre a histoplasmose disseminada
412 e a insuficiência pancreática exócrina em um gato, de modo que o fungo em si não foi
413 encontrado no órgão, apesar do animal ter sido diagnosticado com histoplasmose
414 disseminada. Assim destaca-se o envolvimento desta glândula, até então não apontada como
415 um tecido de tropismo para o patógeno.

416 Cinco dos sete felinos com dispneia (71,43%), foram abordados terapêuticamente com
417 itraconazol mais anfotericina B, justificado pela necessidade de associação destes antifúngicos
418 em casos potencialmente graves da histoplasmose.^{7,8,26} Cabe pontuar que dos gatos que
419 tiveram desfecho favorável, a maioria, (3/5=60%), foi submetida ao uso do itraconazol e
420 anfotericina B concomitantemente. Quanto a duração da terapia para os animais que
421 alcançaram cura clínica (5/12=41,7%) a média foi de 2,6 meses, o que é menor do que o
422 previsto em um estudo que avaliou uma série de casos de felinos com histoplasmose.¹⁸ É
423 passível de destaque que dois gatos, dos cinco curados clinicamente, não receberam alta
424 médica e assim foram subordinados a abandono de tratamento antes do período preconizado,
425 contudo sabe-se que os mesmos evoluíram para cura clínica mediante contato telefônico com
426 os respectivos tutores, os quais relataram não haver queixas clínicas relacionadas a doença,
427 com pelo menos seis meses pós abdicação da terapia. Tal fato pode ter resultado em uma
428 menor média de duração terapêutica, visto período de uso medicamentoso mais curto do que o
429 idealizado.

430 A recrudescência neste estudo, dentre os animais que tiveram um bom prognóstico foi de
431 40%, a mesma taxa de recaída foi observada no estudo de Reinhart e colaboradores em
432 2012.¹⁹

433 A creatinina final dos animais avaliados tendeu a aumento para além do limite máximo do
434 intervalo de referência (1,6 mg/dL),²⁷ de acordo com um maior número de doses de
435 anfotericina B, a qual tem potencial nefrotóxico e, portanto, seu uso deve ser realizado com
436 cautela.¹⁶

437 Os corticosteróides podem predispor a disseminação e agravamento das doenças fúngicas
438 devido a imunossupressão a se considerar a imunidade mediada por células, a qual é pedra
439 angular para proteção contra infecções fúngicas.²⁸ Desta forma, justifica-se a alta taxa de
440 mortalidade dos animais que foram submetidos a corticoterapia antes do início do tratamento
441 antifúngico, os quais possivelmente ficaram mais propensos a disseminação do agente pela
442 supressão imunitária ocasionada. Faz-se assim um alerta aos clínicos veterinários quanto ao
443 momento de instituição de corticóides sistêmicos para felinos com suspeita de histoplasmose,
444 visto a ausência de relatos anteriores envolvendo uma série de casos que comprovem esta
445 associação negativa.

446 A sobrevida no atual estudo foi baixa, o que pode estar atrelado a grande taxa de doentes
447 disseminados e ao acometimento grave dos animais,^{4,28} o qual pode associar-se ao diagnóstico
448 tardio, visto as problemáticas diagnósticas atuais.

449 O estudo aponta que a análise combinada da presença de antígenos séricos e urinários para
450 *Histoplasma* em felinos domésticos é uma ferramenta diagnóstica quem além de pouco
451 invasiva é confiável, o que possibilita maior segurança na abordagem de gatos com a micose,
452 visto comum ocorrência de sinais de instabilidade clínica nestes animais, como a dispneia, o
453 que conflita com a aplicação de técnicas de diagnóstico que requeiram colheita de amostras de
454 forma invasiva, como necessário para as abordagens convencionais.

455

456

457

458

459 **Agradecimentos**

460 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
461 de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores declaram que
462 não houve conflitos de interesse.

463 **Referências**

- 464 1. Grace, F.S. Histoplasmosis. In: NORSWORTHY, G.D. *The Feline Patient*. 5th ed.
465 Nova Jersey, EUA: Wiley-Blackwell; 2018: 272-275.
- 466 2. Grinstead CR, Hanzlicek AS, Largura HW, Wheat LJ. Invasive fungal rhinitis with
467 adnexal involvement caused by *Histoplasma capsulatum* in a cat from a non-enzootic
468 location. *JFMS Open Rep.* 2021; 7 (1):1-6. doi: 10.1177/2055116921993385
- 469 3. Davies C, Troy GC. Deep mycotic infections in cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1996 32
470 (5): 380-391.
- 471 4. Brömel C, Sykes JE. Histoplasmosis in Dogs and Cats. *Clin Tech Small Anim Pract.*
472 2005; 20 (4): 227-232. doi: 10.1053/j.ctsap.2005.07.003
- 473 5. Cook AK, Cunningham LY, Cowell AK, Wheat LJ. Clinical evaluation of urine
474 *Histoplasma capsulatum* antigen measurement in cats with suspected disseminated
475 histoplasmosis. *J Feline Med Surg.* 2012; 14 (8): 512-515. doi:
476 10.1177/1098612X12450121
- 477 6. Klang A, Loncaric I, Spargser J, Eigelsreiter S, Weissenböck H. Disseminated
478 histoplasmosis in a domestic cat imported from the USA to Austria. *Med Mycol Case*
479 *Rep.* 2013; 23 (2): 108-112. doi: 10.1016/j.mmcr.2013.04.004
- 480 7. Lloret A, Hartmann K, Pennisi MG, et al. Rare systemic mycoses in cats:
481 blastomycosis, histoplasmosis and coccidioidomycosis: ABCD guidelines on
482 prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2013; 15 (7): 624-627. doi:
483 10.1177/1098612X13489226
- 484 8. Jardim MPB, Silva ML, Jesus AC, et al. Histoplasmoze pulmonar grave em um gato
485 doméstico: tratamento com Anfotericina B e Itraconazol. *Acta Scientiae Veterinariae.*
486 2018; 46 (1): 1-8. doi.org/10.22456/1679-9216.88215
- 487 9. Johnson LR, Fry MM, Anez KL, Proctor BM, Jang SS. Histoplasmosis Infection in
488 Two Cats From California. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2004; 40 (2): 165-169. doi:
489 10.5326/0400165
- 490 10. Jarchow A, Hanzlicek A. Antigenemia without antigenuria in a cat with
491 histoplasmosis. *JFMS Open Rep.* 2015; 1 (2): 1-4. doi: 10.1177/2055116915618422
- 492 11. Lomonaco LLS, Waller SB, Cleff MB, et al. Disseminated histoplasmosis in a cat
493 rescued in Fortaleza, Brazil, and successfully treated with itraconazole – First case
494 report identified molecularly. *Med Mycol Case Rep.* 2020; 30: 29-34.
495 doi.org/10.1016/j.mmcr.2020.09.005
- 496 12. Smith KM, Strom AR, Gilmour RA, et al. Utility of antigen testing for the diagnosis
497 of ocular histoplasmosis in four cats: a case series and literature review. *J Feline Med*
498 *Surg.* 2017; 19 (10): 1110-1118. doi: 10.1177/1098612X16662310
- 499 13. Ewald MM, Rankin AJ, Meekins JM, Mccool ES. Disseminated histoplasmosis with
500 ocular adnexal involvement in seven cats. *Vet Ophthalmol.* 2020; 23 (5): 905-912. doi:
501 10.1111/vop.12811
- 502 14. Pucket JD, Fentiman KE, Mccool ES, Hanzlicek AS. Prevalence of ocular lesions in
503 cats newly diagnosed with histoplasmosis: 55 cases (2015–2022). *J Am Vet Med*
504 *Assoc.* 2022; 260 (11): 1330-1333. doi: 10.2460/javma.22.03.0142
- 505 15. Linder K, Kaufmann CA. Current and New Perspectives in the Diagnosis of
506 Blastomycosis and Histoplasmosis. *J Fungi.* 2020; 7 (1): 12. doi: 10.3390/jof7010012

507 16. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current Concepts in the
508 Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. *Semin*
509 *Respir Crit Care Med*. 2020; 41 (1):13-30. doi: 10.1055/s-0039-1698429

510 17. Gremião IDF, Rocha EMS, Montenegro H, et al. Guideline for the management of
511 feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Braz J*
512 *of Microbiol*. 2021; 52 (1): 107-124. doi: 10.1007/s42770-020-00365-3

513 18. Aulakh HK, Aulakh KS. Troy, G.C. Feline Histoplasmosis: A Retrospective Study of
514 22 Cases (1986–2009). *J Am Anim Hosp Assoc*. 2012;48 (3): 182-187. doi:
515 10.5326/JAAHA-MS-5758

516 19. Reinhart JM, Kukanich KS, Jackson T, Harkin KR. Feline histoplasmosis: fluconazole
517 therapy and identification of potential sources of *Histoplasma* species exposure. *J*
518 *Feline Med Surg*. 2012;14 (12): 841-848. doi: 10.1177/1098612X12452494

519 20. Goldstein EJ, Abrahamian FM. Diseases Transmitted by Cats. *Microbiol Spectr*. 2015;
520 3 (5):1-14. doi: 10.1128/microbiolspec.IOL5-0013-2015

521 21. Schaefer DMW, Rizzi TE, Royal AB. Hemophagocytosis and *Histoplasma*-like
522 Fungal Infection in 32 Cats. *Vet Clin Pathol*. 2019; 48 (2): 250-254. doi:
523 10.1111/vcp.12721

524 22. Fielder SE, Meinkoth JH, Rizzi TE, Hanzlicek AS, Hallman RM. Feline
525 histoplasmosis presenting with bone and joint involvement: clinical and diagnostic
526 findings in 25 cats. *J Feline Med Surg*. 2019; 21 (10): 887-892. doi:
527 10.1177/1098612X18806706

528 23. Quimby J, Gowland S, Carney HC, DePorter T, Plummer P, Westropp J. 2021
529 AAHA/AAFP Feline Life Stage Guidelines. *J Feline Med Surg*. 2021; 23 (3): 211-
530 233. doi: 10.1177/1098612X21993657

531 24. Rodrigues AM, Beale MA, Hagen F, et al. The global epidemiology of
532 emerging *Histoplasma* species in recent Years. *Stud Mycol*. 2020; 97 (100095): 1-21.
533 doi: 10.1016/j.simyco.2020.02.001

534 25. Auger M, Fazio C, Steiner JM, et al. Abdominal ultrasound and clinicopathologic
535 findings in 22 cats with exocrine pancreatic insufficiency. *J Vet Intern Med*. 2021; 35
536 (6): 2652-2661. doi: 10.1111/jvim.16267

537 26. Larsuprom L, Duangkaew L, Kasorndorkbua C, Chen C, Chindamporn A,
538 Worasilchai N. Feline cutaneous histoplasmosis: The first case report from Thailand.
539 *Med Mycol Case Rep*. 2017; 18: 28-30. doi: 10.1016/j.mmcr.2017.07.008

540 27. Sparkes AH, Caney S, Chalhoub S, et al. ISFM Consensus Guidelines on the
541 Diagnosis and Management of Feline Chronic Kidney Disease. *J Feline Med Surg*.
542 2016;18 (3): 219-239. doi: 10.1177/1098612X16631234

543 28. Kerl ME. Update on canine and feline fungal diseases. *Vet Clin North Am Small Anim*
544 *Pract*. 2003; 33 (4): 721-747. doi: 10.1016/s0195-5616(03)00035-4

545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556

557 **LEGENDAS DAS FIGURAS**

558 **Figura 1-** Queixas clínicas relatadas pelos tutores de gatos com histoplasmose.

559 **Figura 2-** Técnicas diagnósticas empregadas em gatos com *Histoplasma*. A: Pulmão: parênquima com padrão
 560 micronodular difuso; B: Fígado: padrão lobular difuso evidenciado; C: Baço: parênquima esplênico exibindo
 561 nodulações difusas de coloração esbranquiçada; D: Citopatológico pulmonar, coloração rápida tipo
 562 Romanowsky: presença de macrófagos com inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a
 563 ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma*; E: Colônia de
 564 *Histoplasma capsulatum*; F: Histopatológico de baço: moderado infiltrado inflamatório com predomínio de
 565 macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de
 566 aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma*; G: Histopatológico de medula
 567 óssea: moderado infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, associados a inúmeras estruturas
 568 leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas,
 569 compatíveis com *Histoplasma*; H: Histopatológico de pâncreas: leve infiltrado inflamatório com predomínio de
 570 macrófagos, associados a inúmeras estruturas leveduriformes de formato arredondado a ovalado, de
 571 aproximadamente 2 a 3 µm intracitoplasmáticas, compatíveis com *Histoplasma*; I: Método histoquímico para
 572 coloração Grocott positivo para estruturas intracitoplasmáticas em parênquima pulmonar. Fonte: Gabriela de
 573 Carvalho Cid, 2022 (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2F, 2G, 2H, 2I); Mario Tatsuo Makita (Figura 2E).

574 **Figura 3-** Análise comparativa da creatinina sérica inicial e final por número de aplicações do antifúngico
 575 anfotericina B em gatos com histoplasmose.

576 A= Anfotericina; IV= Intravenoso; SC= Subcutâneo; n=número; Valor de referência da Creatinina sérica: <1,6
 577 mg/dL³⁰

578

579

580 **TABELAS**

581 **Tabela 1-** Resultado da antigenúria e antigenemia mediante EIA MiraVista Diagnostics para *Histoplasma*, de
 582 gatos domésticos com histoplasmose.

| Felino | EIA <i>Histoplasma</i> ng/mL - Soro | EIA <i>Histoplasma</i> ng/mL - Urina |
|--------|--|---|
| 1 | BLQ | 0.88 |
| 2 | 0.64 | 2.85 |
| 3 | BLQ | Negativo |
| 4 | ALQ | ALQ |
| 5 | 16.2 | ALQ |
| 6 | BLQ | Negativo |
| 7 | 5.4 | 13.2 |
| 8 | 0.6 | 6.8 |
| 9 | 11.3 | 18.9 |
| 10 | ALQ | ALQ |
| 11 | Negativo | BLQ |
| 12 | 7.94 | Não realizado |

583 EIA = Ensaio imunoenzimático antigênico

584 EIA: Resultados relatados como ng/mL na faixa de 0,4 - 19,0 ng/mL;

585 Resultados acima do limite de detecção, mas abaixo de 0,4 ng/mL, são relatados como "Positivo, abaixo do
 586 limite de quantificação" (BLQ);

587 Resultados acima de 19,0 ng/mL são relatados como "Positivo, acima do limite de quantificação" (ALQ)

588

589

590

591

592

593

| Variável | Frequência | Frequência relativa (%) | Intervalo de confiança 95% para frequência | p-valor |
|--|------------|-------------------------|--|---------|
| Dispneia | 7 | 58.33 | (28.6%, 83.5%) | <0.001* |
| Desidratação | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Febre | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Taquipneia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Emagrecimento | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Mucosas hipocoradas | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Ruído respiratório | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Doença periodontal | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Linfonomegalia | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Hipotermia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Esplenomegalia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Espirros | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Alterações cutâneas | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hepatomegalia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Rins irregulares | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Auscultas cardiopulmonar abafada | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Prolapso de terceira pálpebra | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Nódulo cutâneo | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Apatia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Quemose da conjuntiva superior do olho direito | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Efusão pleural | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Auscultas pulmonar abafada | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |

595 *Referente ao nível de significância, sendo significativa a 0,1%

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609 **Tabela 3-** Perfil laboratorial dos felinos domésticos com histoplasmose.

| Variável | Frequência | Frequência relativa (%) | Intervalo de confiança 95% para frequência | p-valor |
|----------------------------|------------|-------------------------|--|---------|
| Hipoalbuminemia | 9 | 75 | (42.84%, 93.31%) | <0.001* |
| Linfocitopenia absoluta | 6 | 50 | (25.38%, 74.62%) | <0.001* |
| Hiperglobulinemia | 5 | 41,67 | (16.5%, 71.4%) | |
| Anemia | 5 | 41.67 | (16.5%, 71.4%) | |
| Hiperproteinemia | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Eosinopenia absoluta | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| DNNE leve | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Monocitopenia absoluta | 4 | 33.33 | (11.27%, 64.56%) | |
| Hiperglicemia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Neutropenia absoluta | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Trombocitopenia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Leucopenia | 3 | 25 | (6.69%, 57.16%) | |
| Aumento de creatinina | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Monocitose absoluta | 2 | 16.67 | (2.94%, 49.12%) | |
| Diminuição de creatinina | de 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hiperalbuminemia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Aumento de ALT | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hipofosfatemia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hipocalemia | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Hiperbilirrubinemia direta | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Leucocitose | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |
| Neutrofilia absoluta | 1 | 8.33 | (0.44%, 40.25%) | |

610 ALT = Alanina Aminotransferase; DNNE = Desvio nuclear neutrofílico à esquerda

611 *Referente ao nível de significância, sendo significativa a 0,1%

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

CAPÍTULO II

HISTOPLASMOSE EM FELINOS DOMÉSTICOS: ENCORAJAMENTO A ADOÇÃO DE NOVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POUCO INVASIVAS

MARIANA PALHA DE BRITO JARDIM¹; ANDREW S. HANZLICEK²; GABRIELA DE CARVALHO CID³; HELOISA JUSTEN MOREIRA DE SOUZA⁴

¹Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, Brasil, bolsista CAPES.

² DVM, MS, DACVIM, MiraVista Diagnostics, Indianapolis, IN, USA

³Doutora, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFRRJ, Brasil

⁴ Prof. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Brasil

Endereço de e-mail do autor correspondente: jardim.marii@gmail.com

Palavras-chave: Histoplasma, Imunoglobulina G, Sorologia, Ensaio de fluxo lateral

645 **Objetivos:** Avaliar o desempenho de técnicas de diagnóstico que requeiram coletas de
646 amostras de forma pouco invasiva, como o imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo
647 de anticorpos da classe IgG realizado a partir do soro sanguíneo para *Histoplasma* e do ensaio
648 de fluxo lateral (LFA) urinário para *Histoplasma*, a partir do diagnóstico prévio da
649 histoplasmose em gatos domésticos.

650 **Métodos:** Foram selecionados oito (8) felinos domésticos com diagnóstico de histoplasmose
651 por citologia, histopatologia, cultura fúngica, reação em cadeia da polimerase (PCR), ou
652 resposta terapêutica. Destes animais foram coletadas amostras de soro e urina para a
653 realização do imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG
654 para *Histoplasma* e do ensaio de fluxo lateral (LFA) para o antígeno *Histoplasma* sp
655 respectivamente.

656 **Resultados:** Das oito amostras de felinos submetidas a análise de anticorpos séricos IgG
657 cinco (62,5%) apresentaram positividade, bem como dos sete animais avaliados quanto ao
658 LFA urinário cinco (71,43%) foram positivos.

659 **Conclusões e relevância:** O LFA urinário e a análise de anticorpos IgG para *Histoplasma* são
660 ferramentas que requerem amostras coletadas de forma pouco invasiva e apresentam bom
661 desempenho para o diagnóstico de histoplasmose em felinos, o que pode tornar a abordagem
662 mais segura para esses animais e vir a encorajar médicos veterinários quanto ao diagnóstico
663 da histoplasmose. Contudo, ambas as técnicas não devem ser utilizadas de maneira isolada,
664 em razão da ocorrência de resultados falso negativos, devendo ser mais explorado o impacto
665 do uso de corticosteróides sistêmicos em gatos com a micose submetidos a análise sorológica,
666 devido a possível supressão imunitária gerada e impacto negativo na produção de anticorpos
667 que reagem no teste.

668

669 INTRODUÇÃO

670 Os felinos domésticos são susceptíveis a infecção ocasionada pelo fungo dimórfico
671 *Histoplasma capsulatum*, causador da histoplasmose, a qual é endêmica nas Américas, onde é
672 considerada a segunda micose sistêmica mais frequentes em gatos. A doença fúngica é
673 transmitida por inalação ou ingestão de excretas oriundas de pássaros e morcegos.¹⁻³

674 A histoplasmose é considerada subdiagnosticada na espécie felina em virtude de
675 dificuldades diagnósticas,⁴ já que os testes convencionais como a citologia, histopatologia,
676 cultura fúngica e a reação em cadeia da polimerase tem como principal desvantagem a coleta
677 de amostras de forma invasiva o que culmina em potenciais riscos ao animal.⁵⁻⁸ A sorologia, a
678 qual geralmente é realizada pelas técnicas de imunodifusão (ID) e fixação de complemento
679 (FC), é considerada como uma forma não confiável de diagnóstico, devido baixa sensibilidade
680 e especificidade associada.^{5-7,9}

681 Assim, novas técnicas de diagnóstico como o ensaio imunoenzimático antigênico
682 (EIA) para *Histoplasma*, realizado a partir do soro ou urina tem sido exploradas como novas
683 ferramentas de abordagem da micose, muito embora apesar de úteis, apresentem limitações e
684 não devam ser usadas como única como única ferramenta de diagnóstico,^{6,10} o que reforça a
685 necessidade de busca por novos testes.

686 O imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG para
687 *Histoplasma*, realizado a partir do soro sanguíneo, está relacionado a resultados promissores
688 na medicina humana,¹¹ muito embora não tenha sido bem avaliado em felinos. Assim como o
689 ensaio de fluxo lateral (LFA) para *Histoplasma*, o qual pode ser realizado à beira do leito, a

690 partir da urina e está associado a desempenhos positivos em humanos, contudo são ausentes
691 dados sobre o emprego deste em gatos domésticos.¹²

692 Tem-se como objetivo a partir do presente trabalho avaliar o desempenho de técnicas
693 de diagnóstico que requeiram coletas de amostras de forma pouco invasiva como a análise de
694 anticorpos da classe IgG a partir do soro sanguíneo e o LFA urinário, ambos para o agente
695 *Histoplasma*, a partir do diagnóstico prévio da histoplasmose em gatos domésticos.
696

697 **MATERIAIS E MÉTODOS**

698 Foram selecionados oito felinos domésticos (*Felis catus*), independente do sexo,
699 gênero, raça ou idade com histoplasmose. Tais animais eram oriundos do atendimento
700 realizado no setor de clínica médica de gatos domésticos, do hospital veterinário de pequenos
701 animais (HVPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) ou de
702 atendimentos particulares ocorrentes no Rio de Janeiro-Brasil. Todos os tutores que
703 permitiram que seus respectivos animais fossem incluídos no projeto de pesquisa leram e
704 assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa foi submetida à
705 Comissão de Ética na Pesquisa em Uso de Animais (CEUA) da UFRRJ e aprovada sob o
706 número de protocolo nº 4895210619. O período de realização do estudo foi de agosto de 2019
707 a maio de 2022. Os felinos incluídos no estudo foram aqueles que apresentavam diagnóstico
708 citológico, histopatológico, micológico ou molecular positivo para histoplasmose e ainda
709 aqueles que possuíam algum teste que pudesse indicar a ocorrência da micose. Os gatos que
710 atenderam aos critérios de inclusão e para os quais não foi possível a coleta de amostras de
711 sangue e/ou urina foram excluídos da pesquisa. Informações relevantes para a pesquisa
712 foram coletadas através do exame clínico, no que se refere ao histórico, exame físico, bem
713 como sobre a forma de diagnóstico da histoplasmose, ademais por intermédio dos exames de
714 imagem (radiografia torácica e ultrassonografia abdominal).

715 Categorizou-se a micose quanto a manifestação em: disseminada, pulmonar ou
716 gastrointestinal, de forma que a histoplasmose foi classificada como disseminada quando
717 *Histoplasma* foi identificado no tecido pulmonar e pelo menos um órgão fora do tórax
718 estivesse acometido pelo agente fúngico. Já para a classificação da forma pulmonar, o fungo
719 deveria estar restrito somente ao pulmão. Os felinos agrupados na forma gastrointestinal
720 deveriam ter restrição do organismo infeccioso no trato gastrointestinal. Para tais
721 classificações foram considerados exames de imagem como a radiografia e a ultrassonografia,
722 para se avaliar o acometimento do fungo nos segmentos orgânicos, bem como testes de
723 diagnósticos convencionais, contudo caso realizado histopatologia pós necropsia de todos os
724 órgãos suspeitos de acometimento, tal abordagem foi considerada majoritária sobre os
725 achados da radiografia e/ou ultrassonografia.

726 **Coleta de amostras biológicas**

727 De todos os animais com diagnóstico de histoplasmose foram coletadas amostras
728 sanguíneas, assim, após contenção do felino e antisepsia do local de coleta, utilizando-se
729 seringa de 5 mL (Descarpac®) e scalp número 23G (BD Asepto®), realizou-se coleta de 1
730 mL de sangue por venopunção cefálica, safena ou jugular, a depender do temperamento do
731 felino e grau de hidratação. A amostra sanguínea foi alocada em tubo contendo gel separador
732 e ativador de coágulo (BD Vacutainer®), para realização do imunoensaio enzimático indireto
733 semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG para *Histoplasma*. Assim, as amostras
734 sorológicas de oito gatos foram enviadas ao laboratório MiraVista (MiraVista Veterinary
735 Diagnostics, Indianapolis, EUA) para execução da análise de anticorpos da classe IgG para
736 *Histoplasma*.

737 Foram utilizados imunoenaios enzimáticos indiretos semiquantitativos desenvolvidos
738 em laboratório comercialmente disponíveis (MVista Histoplasma Feline). Microplacas de
739 noventa e seis poços foram revestidas com antígenos *Histoplasma* e tampão de bloqueio.
740 Soros de pacientes, padrões e controles foram adicionados aos poços. Após incubação a 37°C
741 durante uma hora, os poços foram lavados e IgG anti-felina biotinizada foi adicionada a cada
742 poço. A microplaca foi incubada a 37°C por uma hora. Os poços foram lavados e conjugado
743 estreptavidina-peroxidase de rábano foi adicionado a cada poço e então incubados a 37°C por
744 uma hora. Os poços foram lavados e a solução de cromogênio contendo substrato de
745 peroxidase foi adicionada e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. A reação
746 enzimática foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. A placa foi lida em um
747 comprimento de onda duplo de 450/620 nm. Animais com níveis de anticorpos IgG <8,0
748 unidades enzimáticas (UE) foram considerados negativos, com 8,0-9,9 UE foram
749 considerados com diagnóstico indeterminado e aqueles com taxas ≥10,0 UE foram
750 considerados positivos.

751 Os felinos com histoplasmose diagnosticada foram também submetidos a coleta de
752 urina, a qual se deu por cistocentese, utilizando-se agulha de 25mm x 7mm (Descarpack®) e
753 seringa de 10mL (DESCARPACK®), ou micção natural, em um volume mínimo de 5 mL. As
754 amostras urinárias foram armazenadas em frasco coletor universal de urina 50 mL (J.
755 Prolab®). Posteriormente a urina foi congelada para realização subsequente do LFA para
756 *Histoplasma*. De forma que as alíquotas urinárias de sete animais foram enviadas ao
757 laboratório MiraVista (MiraVista Veterinary Diagnostics, Indianapolis, EUA) e submetidas a
758 análise do LFA para *Histoplasma*.

759 O imunoensaio se baseia em uma metodologia qualitativa, baseada em fluxo lateral,
760 onde anticorpos policlonais são utilizados para a detecção direta de *Histoplasma* spp. antígeno
761 galactomanano na urina. Para a realização de tal, 100 µL de urina foram adicionados a 25 µL
762 de diluente de amostra com uma pipeta disponível no kit, assim, o espécime já diluído foi
763 disposto na porta de amostra do dispositivo. À medida que a amostra se movia pelo
764 dispositivo, caso o antígeno estivesse presente ocorria a ligação deste a um anticorpo detector
765 anti-histoplasma e produzia-se uma linha visível. Um controle de ensaio, o qual indicava um
766 fluxo adequado da amostra no dispositivo teste e conseqüentemente um teste válido também
767 produzia uma linha visível. O LFA foi lido por laboratoristas após 30 minutos de incubação a
768 temperatura ambiente para determinar se a linha controle estava presente e se a linha do teste
769 era visível, o que representava positividade. O teste foi considerado inválido caso o controle
770 não fosse observado ou se a linha relacionada ao controle ou ao teste se apresentasse
771 obscurecida.¹³

772 **Delineamento estatístico**

773 Para análise descritiva, foram utilizadas frequências e frequências relativas, ademais
774 cálculo de mínimo e máximo, bem como foi empregado cálculo de sensibilidade dos testes
775 avaliados. As análises foram feitas através do software livre R (R versão 4.2.2 (2022-10-31
776 ucert).

777

778 **RESULTADOS**

779 Dos oito animais que tiveram suas amostras sanguíneas submetidas ao teste IgG para
780 *Histoplasma* cinco (62,5%) apresentaram positividade, com concentrações variando de 13.2 a
781 70.1. Já no que tange o LFA urinário, dos sete animais que realizaram tal teste, cinco
782 (71,43%) foram positivos (Tabela 1).

783

784 **Tabela 1** Resultado do imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG realizado
 785 a partir do soro sanguíneo para *Histoplasma* e do ensaio de fluxo lateral (LFA) urinário para *Histoplasma*, de
 786 gatos domésticos com histoplasmose diagnosticada previamente
 787

| Felino | Sorologia IgG do soro sanguíneo em UE | Resultado sorologia IgG | LFA urinário <i>Histoplasma</i> |
|--------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1 | 40 | + | + |
| 2 | - | - | - |
| 3 | - | - | + |
| 4 | - | - | + |
| 5 | 70.1 | + | + |
| 6 | 13.2 | + | + |
| 7 | 40.9 | + | - |
| 8 | 14.2 | + | Não realizado |

788 UE: Unidades enzimáticas; LFA *Histoplasma*: Fluxo Lateral do Antígeno *Histoplasma*;
 789 Sorologia IgG: Faixa reportável: resultados abaixo de 8,0 são negativos; Resultados entre 8,0 e 9,9 são
 790 intermediários; Resultados 10.0 e superiores são positivos.
 791

792 Por meio da figura 1 pode-se observar alguns dos resultados obtidos com o ensaio de
 793 fluxo lateral urinário.

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

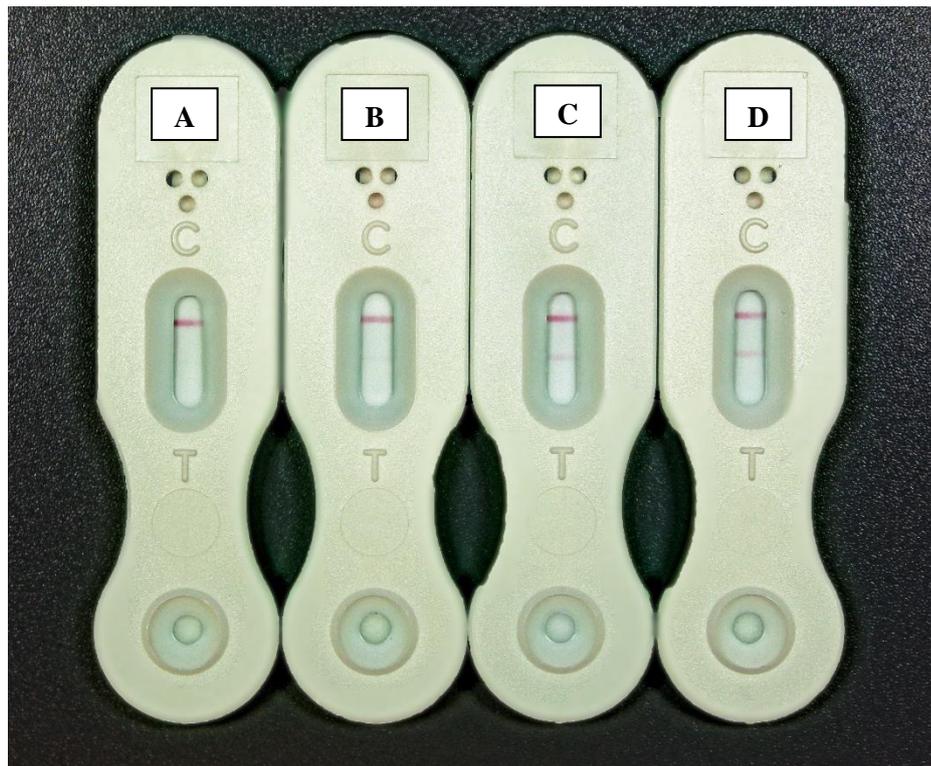
804

805

806

807

808

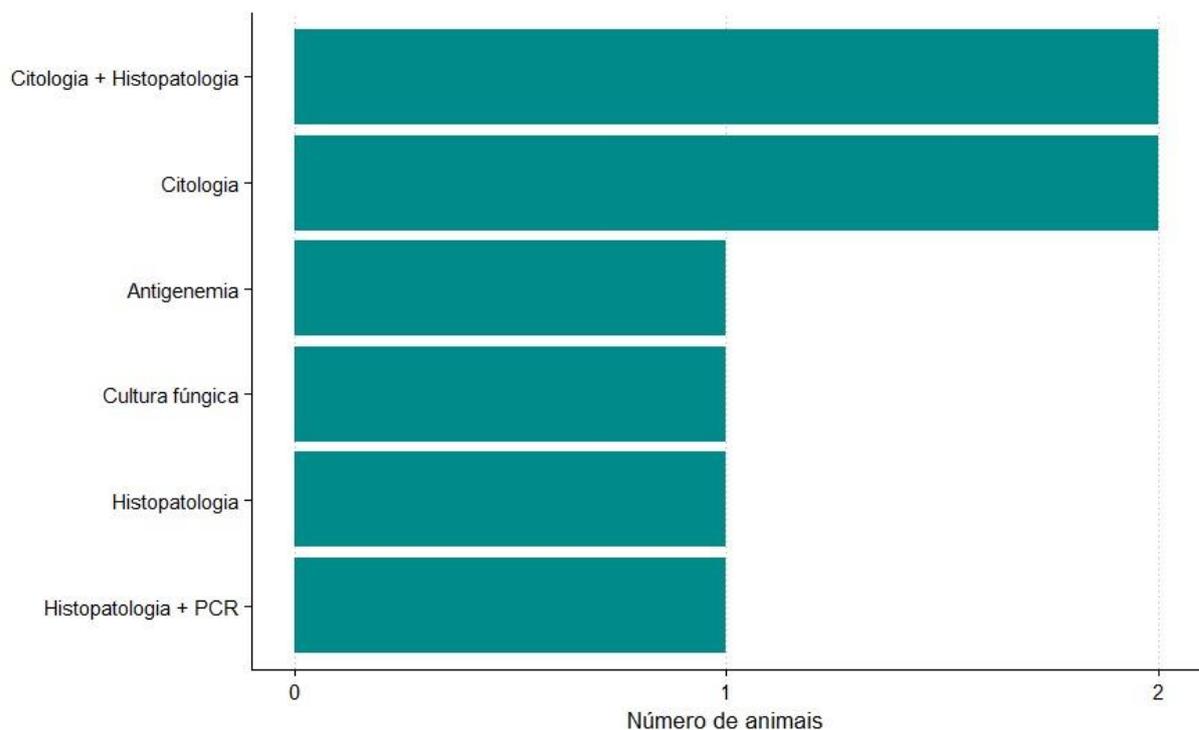


809 **Figura 1** Resultados do ensaio de fluxo lateral urinário (LFA) em gatos previamente diagnosticados com
 810 histoplasmose. A: Negativo; B: Baixo positivo; C: Moderado positivo; D: Altamente positivo.

811

812 Com base nesses resultados a sensibilidade geral para a sorologia sérica de IgG foi de
813 62,5% e a do LFA urinário foi de 71,42%, ao se comparar os dados obtidos com os animais
814 positivos. Já ao se considerar as duas técnicas em conjunto a sensibilidade foi de 87,5%.

815 Dos oito animais avaliados, quatro (50%) foram diagnosticados com histoplasmose
816 por citologia, outros quatro (50%) por histopatologia, um (12,5%) por cultura fúngica, outro
817 (12,5%) por PCR e um (12,5%) por diagnóstico não convencional, contudo este possuía
818 antigenemia considerando o ensaio imunoenzimático antigênico para *Histoplasma*, realizado a
819 partir do soro sanguíneo. Cabe ressaltar que três animais foram diagnosticados por dois
820 métodos distintos (Figura 2). O órgão de tropismo fúngico nesta pesquisa, mediante o
821 encontro do agente nos órgãos foi o pulmão (4/8=50%), seguido da pele, olhos, medula óssea,
822 pâncreas, rins, baço e fígado, (1/8=12,5% cada).



823

824 **Figura 2** Métodos diagnósticos empregados para a detecção da histoplasmose felina em gatos posteriormente
825 submetidos ao imunoenensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG realizado a partir
826 do soro sanguíneo para *Histoplasma* e do ensaio de fluxo lateral (LFA) urinário para *Histoplasma*. PCR: Reação
827 em cadeia da polimerase

828

829 A histoplasmose foi considerada na forma disseminada para cinco animais (62,5%) e
830 pulmonar para três deles (37,5%).

831

832 DISCUSSÃO

833 Foi visualizada alta correlação de gatos soropositivos pela sorologia IgG com
834 histoplasmose previamente diagnosticada. Estudos prévios não recomendam a utilização da
835 sorologia pelas técnicas de imunodifusão (ID) ou fixação de complemento (FC), como forma
836 de diagnóstico em felinos com a micose, visto que estes pontuaram tal teste como não

837 confiável, pela ocorrência de falsos positivos devido a exposição somada a recuperação
838 anterior e reação cruzada com outros agentes fúngicos, bem como pela possibilidade de
839 resultados falsos negativos devido ao tempo necessário para soroconversão.^{5-7,9}

840 Contudo, o estudo sorológico desempenhado na pesquisa em questão foi realizado a partir
841 de uma metodologia semiquantitativa, a qual também é empregada em medicina humana,
842 onde foi demonstrada como superior as técnicas de ID e FC.¹⁴ Todavia a possibilidade de
843 reação cruzada do teste de anticorpos igG anti-*histoplasma* com doentes por *Cryptococcus* foi
844 verificada, no entanto não se considera isto uma problemática a comprometer a eficácia do
845 teste na pesquisa em questão, já que os animais foram previamente diagnosticados com
846 histoplasmose por outras ferramentas diagnósticas.¹⁵

847 Assim, com base nos resultados obtidos, pontua-se que o teste de anticorpos da classe IgG
848 deve ser melhor avaliado quanto a sua empregabilidade em felinos como método
849 complementar de diagnóstico, de forma que não se aconselha o emprego de tal como única
850 forma de verificação da histoplasmose em gatos, visto resultados falsos negativos. Cabe
851 pontuar que tal teste foi avaliado somente em um felino até o momento de redação do atual
852 trabalho, onde se associou a resultado consistente com outras ferramentas diagnósticas como
853 citologia, cultura fúngica e histopatologia na abordagem da micose.¹⁶

854 É passível de destaque que o emprego de testes sorológicos tem uso limitado para
855 pacientes imunocomprometidos, sob efeito de drogas imunossupressoras ou recém
856 transplantados devido a resposta prejudicada quanto a produção de anticorpos^{11,17} no atual
857 estudo, dos três animais falsos negativos para a sorologia, 2 deles (66,67%) fizeram uso de
858 corticoterapia sistêmica antes da coleta de amostra diagnóstica, assim é cabível uma avaliação
859 futura sob o impacto do uso de corticosteróides quanto ao resultado de tal ensaio.

860 Já para o ensaio de fluxo lateral (LFA) para *Histoplasma*, realizado a partir da urina dos
861 animais com histoplasmose, foi demonstrada alta sensibilidade do mesmo. O LFA
862 comercializado pelo laboratório MiraVista, realizado a partir da urina é utilizado na medicina
863 humana e apresenta desempenho positivo quanto ao diagnóstico da histoplasmose, tal método
864 permite rápido diagnóstico da doença e assim consequentemente possibilita emprego ágil da
865 terapia adequada, com mínimos requisitos relacionados tanto a aspectos humanos, quanto de
866 infraestrutura, com possibilidade de utilização à beira de leito.^{12,13,18,19} Assim, ressalta-se
867 como principais vantagens desta ferramenta de abordagem diagnóstica, tanto a eficácia,
868 comprovada a partir deste estudo, quanto a facilidade de execução, sem necessidade de envio
869 do material para laboratórios de referência, como necessário para o ensaio imunoenzimático
870 antigênico para *Histoplasma*⁶, o que pode facilitar e agilizar o diagnóstico da micose.

871 Encoraja-se então o emprego do LFA urinário como forma de diagnóstico da
872 histoplasmose felina, muito embora, cautela deva ser considerada em sua utilização, devido a
873 presença de uma minoria de animais com resultados falsos negativos (2/8=28,57%). Tal
874 ferramenta não havia sido até o momento avaliada em felinos, de forma que esta é a primeira
875 pesquisa a empregar tal metodologia no diagnóstico da micose em gatos.

876 O LFA pode ainda ser realizado a partir do soro sanguíneo, o que já foi validado também
877 na medicina humana, com associação a alta performance.²⁰ Ademais, foi verificado que a
878 realização combinada de ambos os testes realizados nesta pesquisa pôde prover maior
879 sensibilidade, de forma que a análise pareada do LFA urinário junto a sorologia de anticorpos
880 IgG é então associada a maior desempenho diagnóstico ao se abordar gatos com
881 histoplasmose.

882 Reações cruzadas em pacientes humanos com criptococose, paracoccidiodomicose,
883 blastomicose, talaromicose e coccidiomicose são prováveis^{13,18,20} e devem ser avaliadas
884 prospectivamente em felinos.

885 Como principal limitação deste estudo destaca-se o pequeno número de animais avaliados,
886 contudo, se faz relevante visto desafios diagnósticos que permeiam a histoplasmose felina e
887 abre portas para que grandes estudos prospectivos sejam realizados. Por outro lado, o
888 recrutamento de animais sabidamente negativos não foi realizado, o que poderia permitir a
889 avaliação da especificidade de ambos os testes avaliados.

890

891 **CONCLUSÕES**

892 O imunoensaio enzimático indireto semi-quantitativo de anticorpos da classe IgG
893 realizado a partir do soro sanguíneo para *Histoplasma* e do ensaio de fluxo lateral (LFA)
894 urinário para *Histoplasma* surgem como novas técnicas de diagnóstico pouco invasivas que
895 podem auxiliar na abordagem da histoplasmose felina disseminada e pulmonar devido ao seu
896 alto desempenho. Contudo, o diagnóstico da micose não deve ser descartado com base em
897 resultados negativos.

898

899 **CONFLITO DE INTERESSES**

900 Os autores declararam não haver conflitos potenciais de interesse com relação à pesquisa,
901 autoria e/ou publicação deste artigo

902 **FINANCIAMENTO**

903 *Os autores informam ter recebido o seguinte apoio financeiro para a pesquisa, autoria e/ou*
904 *publicação deste artigo:* O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
905 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – [Código
906 de Financiamento 001.]

907 **APROVAÇÃO ÉTICA**

908 O trabalho descrito neste manuscrito envolveu o uso de animais experimentais e, portanto, o
909 estudo teve aprovação ética prévia de um comitê estabelecido (ou ad hoc), conforme
910 declarado no manuscrito.

911 **DECLARAÇÕES DE CONSETIMENTOS INFORMADO**

912 O consentimento informado (verbal ou escrito) foi obtido do proprietário ou responsável legal
913 de todos os animais descritos neste trabalho (animais experimentais ou não experimentais,
914 incluindo cadáveres) para todos os procedimentos realizados (estudos prospectivos ou
915 retrospectivos).

916 Nenhum animal ou pessoa é identificável nesta publicação e, portanto, consentimento
917 informado adicional para publicação não foi necessário.

918

919 **REFERÊNCIAS**

- 920 1. Davies C, Troy GC. Deep mycotic infections in cats. *J Am Anim Hosp Assoc.*1996 32
921 (5): 380-391.
922 2. Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009; 42 (2):
923 192-198.

- 924 3. Grace, F.S. Histoplasmosis. In: NORSWORTHY, G.D. *The Feline Patient*. 5th ed.
925 Nova Jersey, EUA: Wiley-Blackwell; 2018: 272-275.
- 926 4. Lomonaco LLS, Waller SB, Cleff MB, et al. Disseminated histoplasmosis in a cat
927 rescued in Fortaleza, Brazil, and successfully treated with itraconazole – First case
928 report identified molecularly. *Med Mycol Case Rep*. 2020; 30: 29-34.
- 929 5. Brömel C, Sykes JE. Histoplasmosis in Dogs and Cats. *Clin Tech Small Anim Pract*.
930 2005; 20 (4): 227-232.
- 931 6. Cook AK, Cunningham LY, Cowell AK et al. Clinical evaluation of urine
932 *Histoplasma capsulatum* antigen measurement in cats with suspected disseminated
933 histoplasmosis. *J Feline Med Surg*. 2012; 14 (8): 512-515.
- 934 7. Lloret A, Hartmann K, Pennisi MG, et al. Rare systemic mycoses in cats:
935 blastomycosis, histoplasmosis and coccidioidomycosis: ABCD guidelines on
936 prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2013; 15 (7): 624-627.
- 937 8. Klang A, Loncaric I, Spersger J, et al. Disseminated histoplasmosis in a domestic cat
938 imported from the USA to Austria. *Med Mycol Case Rep*. 2013; 23 (2): 108-112
- 939 9. Johnson LR, Fry MM, Anez KL, et al. Histoplasmosis Infection in Two Cats From
940 California. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2004; 40 (2): 165-169
- 941 10. Jarchow A, Hanzlicek A. Antigenemia without antigenuria in a cat with
942 histoplasmosis. *JFMS Open Rep*. 2015; 1 (2): 1-4.
- 943 11. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, et al. Current Concepts in the Epidemiology,
944 Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. *Semin Respir Crit Care*
945 *Med*. 2020; 41 (1):13-30.
- 946 12. Andreani M, Frola CE, Caceres DH et al. Validation of a Lateral Flow Assay for
947 Rapid Diagnosis of Histoplasmosis in Advanced HIV Disease, Buenos Aires,
948 Argentina. *Appl. Microbiol*. 2022; 2 (4): 950-955.
- 949 13. Abdallah W, Myint T, Larue R, et al. Diagnosis of Histoplasmosis Using the
950 MVista *Histoplasma* Galactomannan Antigen Qualitative Lateral Flow-Based
951 Immunoassay: A Multicenter Study. *Open Forum Infect Dis*. 2021; 8 (9): 1-6.
- 952 14. Richer SM, Smedema ML, Durkin MM, et al. Improved Diagnosis of Acute
953 Pulmonary Histoplasmosis by Combining Antigen and Antibody Detection. *Clin*
954 *Infect Dis*. 2016; 62 (7): 896-902.
- 955 15. Bahr NC, Panackal AA, Durkin MM, ET AL. Cryptococcal meningitis is a cause for
956 cross-reactivity in cerebrospinal fluid assays for anti-*Histoplasma*, anti-*Coccidioides*
957 and anti-*Blastomyces* antibodies. *Mycoses*, 2019; 62 (3): 268-273.
- 958 16. Renschler JS, Norsworthy GD, Rakian RA, et al. Reduced susceptibility to
959 fluconazole in a cat with histoplasmosis. *J Feline Med Surg*. 2017; 3 (2): 1-9.
- 960 17. Linder K, Kaufmann CA. Current and New Perspectives in the Diagnosis of
961 Blastomycosis and Histoplasmosis. *J Fungi*. 2020; 7 (1): 12.
- 962 18. Cáceres DH, Gómez BL, Tobón AM, et al. Validation and Concordance Analysis of a
963 New Lateral Flow Assay for Detection of *Histoplasma* Antigen in Urine. *J Fungi*.
964 2021; 7 (10): 799.
- 965 19. Martínez-Gamboa AM, Niembro-Ortega MD, Torres-González P, et al. Diagnostic
966 accuracy of antigen detection in urine and molecular assays testing in different clinical
967 samples for the diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in patients living
968 with HIV/AIDS: A prospective multicenter study in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*.
969 2021; 15 (3): 1-26.
- 970 20. Cáceres DH, Gómez BL, Tobón AM, et al. Evaluation of a *Histoplasma* antigen
971 lateral flow assay for the rapid diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis
972 in Colombian patients with AIDS. *Mycoses* 2020; 63 (2): 139-144.

3 CONCLUSÕES GERAIS

Os felinos com histoplasmose são sobretudo sem raça definida e adultos jovens, além de apresentarem essencialmente estilo de vida domiciliado, o que os coloca no importante papel de sentinelas da doença no ambiente doméstico. A alteração respiratória foi a queixa clínica mais comum dentre o histórico, presente em todos os animais acometidos pelo fungo, bem como a dispneia foi associada como principal sinal clínico, a qual foi apontada como um fato prognóstico negativo. No que se refere as alterações de laboratório, a hipoalbuminemia e a linfocitopenia foram super-representadas e estão associadas a deficiência na síntese de albumina, perda proteica e inflamação, bem como a síndrome hemofagocítica respectivamente. Já no que tange aos achados de imagem a ocorrência de pneumonia foi visualizada em todos os animais estudados, onde o padrão interstício alveolar foi associado a piores desfechos. A citologia pleural foi o método de diagnóstico mais empregado para abordagem da micose, o que conflita com o quadro clínico instável apresentado pela maioria dos animais. Ademais, a forma de apresentação disseminada foi majoritária, com evidenciação do encontro do agente fúngico no pâncreas, órgão até então não evidenciado como tecido de tropismo para *Histoplasma* em gatos. Todos os gatos do estudo receberam terapia antifúngica, principalmente com itraconazol e anfotericina B, a qual deve ser utilizada com cautela por estar associada a injúria renal. Ressalta-se ainda necessário cuidado quanto à introdução da corticoterapia para animais com histoplasmose antes da instituição do tratamento antifúngico, visto resultados clínicos negativos. O prognóstico dos animais avaliados foi preponderantemente desfavorável, visto a maioria ter evoluído para óbito ou eutanásia. O EIA para *Histoplasma*, a se considerar a análise pareada do soro e da urina mostrou-se extremamente útil para o diagnóstico da histoplasmose, visto sensibilidade igual a 100%. Já o LFA urinário e o teste sorológico de anticorpos da classe IgG também podem apoiar o diagnóstico da doença fúngica em felinos, muito embora, ambos não devam ser utilizados de forma isolada, devido a ocorrência de animais falso negativos. Tais dados inéditos quanto a análise de técnicas de diagnóstico pouco invasivas pode auxiliar a abordagem da afecção e conseqüentemente encorajar os veterinários quanto a detecção da micose.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, W.; MYINT, T.; LARUE, R.; MINDERMAN, M.; GUNN, S.; WHEAT, L.J.; HAGE, C.A. Diagnosis of Histoplasmosis Using the MVista *Histoplasma* Galactomannan Antigen Qualitative Lateral Flow-Based Immunoassay: A Multicenter Study. **Open Forum Infectious Diseases**, v.8, n.9, p.1-6, 2021.

ANDREANI, M.; FROLA, C.E.; CACERES, D.H.; CANTEROS, C.E.; ROLÓN, M.J.; CHILLER, T.; GUELFAND, L. Validation of a Lateral Flow Assay for Rapid Diagnosis of Histoplasmosis in Advanced HIV Disease, Buenos Aires, Argentina. **Applied Microbiology**, v.2, n.4, p.950-955, 2022.

ARAÚZ, A.B & PAPINENI, P. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.35, n.2, p.471-491, 2021.

ASHRAF, N.; KUBAT, R.C.; POPLIN, V.; ADENIS, A.A.; DENNING, D.W.; WRIGHT, L.; MCCOTTER, O.; SCHWARTZ, I.S.; JACKSON, B.R.; CHILLER, T.; BAHR, N.C. Redrawing the Maps for Endemic Mycoses. **Mycopathologia**, v.185, n.5, p.843-865, 2020.

AULAKH, H.K.; AULAKH, K.S.; TROY, G.C. Feline Histoplasmosis: A Retrospective Study of 22 Cases (1986–2009). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.48, n.3, p.182-187, 2012.

AUGER, M.; FAZIO, C.; STEINER, J.M.; PENNINCK, D.G.; LEVINE, G.J.; GRIFFIN IV, J.F.; SPRINGER, C.M. Abdominal ultrasound and clinicopathologic findings in 22 cats with exocrine pancreatic insufficiency. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.35, n.6, p.2652-2661, 2021.

AZAR, M.M.; LOYD, J.L.; RELICH, R.F.; WHEAT, L.J.; HAGE, C.A. Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.41, n.1, p.13-30, 2020.

BALAJEE, S.A.; HURST, S.F.; CHANG, L.S.; MILES, M., BEELER, E.; HALE, C.; KASUGA, T.; BENEDICT, K.; CHILLER, T.; LINDSLEY, M.D. Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade. **Medical Micology**, v.51, n.4, p.345-351, 2013.

BRILHANTE, R.S.N.; COELHO, C.G.V.; SIDRIM, J.J.C.; LIMA, R.A.C.; RIBEIRO, J.F.; CORDEIRO, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; GOMES, J.M.F.; SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; BESERRA, H.E.O.; NOGUEIRA, G.C.; PINHEIRO, A.Q.; ROCHA M.F.G. Feline Histoplasmosis in Brazil: Clinical and Laboratory Aspects and a Comparative Approach of Published Reports. **Mycopathologia**. v.173, n.2-3, p.193-197, 2012.

BRÖMEL, C.; SYKES, J.E. Histoplasmosis in Dogs and Cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.20, n.4, p.227-232, 2005.

BUSH, J.M.; SPEER, B.; OPITZ, N. Disease Transmission from Companion Parrots to Dogs and Cats: What is the Real Risk?. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.41, n.6, p.1261-1272, 2011.

CÁCERES, D.H.; GÓMEZ, B.L.; TOBÓN, A.M.; CHILLER, T.M.; LINDSLEY, M.D. Evaluation of a *Histoplasma* antigen lateral flow assay for the rapid diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in Colombian patients with AIDS. **Mycoses**, v.63, n.2, p.139-144, 2020.

CÁCERES, D.H.; GÓMEZ, B.L.; TOBÓN, A.M.; MIDERMAN, M.; BRIDGES, N.; CHILLER, T.; LINDSLEY, M.D. Validation and Concordance Analysis of a New Lateral Flow Assay for Detection of *Histoplasma* Antigen in Urine. **Journal of Fungi**, v.7, n.10, p.1-9, 2021.

CARNEIRO, R.A.; LAVALLE, G.E.; ARAÚJO, R.B. Histoplasmosse cutânea em gato: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57, n.2, p.158-161, 2005.

CRUZ, L.C.H. *Histoplasma*. In: CRUZ, L.C.H. **Micologia veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro, Brasil: Revinter; 2010: 153-161.

COOK, A.K.; CUNNINGHAM, L.Y.; COWELL, A.K.; WHEAT, L.J. Clinical evaluation of urine *Histoplasma capsulatum* antigen measurement in cats with suspected disseminated histoplasmosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.14, n.8, p.512-515, 2012.

DAVIES, C.; TROY, G.C. Deep mycotic infections in cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n.5, p.380-391, 1996.

EWALD, M.M.; RANKIN, A.J.; MEEKINS, J.M.; MCCOL, E.S. Disseminated histoplasmosis with ocular adnexal involvement in seven cats. **Veterinary Ophthalmology**, v.23, n.5, p.905-912, 2020.

FALCI, D.R.; MONTEIRO, A.A.; CAURIO, C.F.B.; MAGALHÃES, T.C.O.; XAVIER, M.O.; BASSO, R.P.; MELO, M.; SCHWARZBOLD, A.V.; FERREIRA, P.R.A.; VIDAL, J.E.; MAROCHI, J.P.; GODOY, S.C.M.; SOARES, R.B.A.; PASTE, A.; BAY, M.B.; PEREIRA-CHICOLLA, V.L.; DAMASCENO, L.S.; LEITÃO, T.M.J.S.; PASQUALOTTO, A.C. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and *Histoplasma* Urine Antigen Detection. **Open Forum Infectious Diseases**, v.6, n.4, p.1-22, 2019.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.192-19, 2009.

FIELDER, S.E.; MEINKOTH, J.H.; RIZZI, T.E.; HANZLICEK, A.S.; HALLMAN R.M. Feline histoplasmosis presenting with bone and joint involvement: clinical and diagnostic findings in 25 cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.21, n.10, p. 887-892, 2019.

FISCHER, N.M.; FAVROT, C.; MONOD, M.; GREY, P.; RECH, K.; WILHELM, S. A case in Europe of feline histoplasmosis apparently limited to the skin. **Veterinary Dermatology**, v.24, n.6, p.635-638, 2013.

GOLDSTEIN, E.J.; ABRAHAMIAN, F.M. **Diseases Transmitted by Cats. Microbiology Spectrum**, v.3, n.5, p.1-14, 2015.

GRACE, F.S. Histoplasmosis. In: NORSWORTHY, G.D. **The Feline Patient**. 5th ed. Nova Jersey, EUA: Wiley-Blackwell; 2018: 272-275.

GREMIÃO, I.D.F.; ROCHA, E.M.S.; MONTENEGRO, H.; CARNEIRO, A.J.B.; XAVIER, M.O.; FARIAS, M.R.; MONTI, F.; MANSO, W.; PEREIRA, R.H.M.A.; PEREIRA, S.A.; LOPES-BEZERRA, L.M. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 107-124, 2021.

GRINSTEAD, C.R.; HANZLICEK, A.S.; LARGURA, H.W.; WHEAT L.J. Invasive fungal rhinitis with adnexal involvement caused by *Histoplasma capsulatum* in a cat from a non-zoonotic location. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v.7, n.1, p.1-6, 2021.

HANZLICEK, A.S.; MEINKOTH, J.H.; RENSCHLER, J.S.; GOAD, C.; WHEAT, L.J. Antigen concentrations as an indicator of clinical remission and disease relapse in cats with histoplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**.v.30, n.4, p.1065-1073, 2016.

HODGES, R.D.; LEGENDRE, A.M.; ADAMS, L.G.; WILLARD, M.D.; PITTS, R.P.; MONCE, K.; NEEDELS, C.C.; WARD, H. Itraconazole for the Treatment of Histoplasmosis in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.8, n.6, p.409-413, 1994.

JARCHOW, A.; HANZLICEK A. Antigenemia without antigenuria in a cat with histoplasmosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v.1, n.2, p.1-4, 2015.

JARDIM, M.P.B.; SILVA, M.L.; JESUS, A.C.; CID, G.C.; DAMICO, C.B; SANTOS, C.R.G.R.; SOUZA, H.J.M. Histoplasmosse pulmonar grave em um gato doméstico: tratamento com Anfotericina B e Itraconazol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.46, n.1, p. 1-8, 2018.

JOHNSON, L.R.; FRY, M.M.; ANEZ, K.L.; PROCTOR, B.M.; JANG, S.S. Histoplasmosis Infection in Two Cats From California. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n.2, p.165-169, 2004.

KABLI, S.; KOSCHMANN, J.R.; ROBERTSTAD, G.W.; LAWRENCE, J.; AJELLO, L.; REDETZKE, K. Endemic canine and feline histoplasmosis in El Paso, Texas. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.24, n.1, p.41-50, 1986.

KASUGA, T.; BRANCO, T.J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A.; CASTANEDA, E.; LACAZ, C.S.; HEINS-VACCARI, E.M.; FREITAS, R.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; QIN, Z.; NEGRONI, R.; CARTER, D.A.; MIKAMI, Y.; TAMURA, M.;

TAYLOR, M.L.; MILLER, G.F.; POONWAN, N.; TAYLOR, J.W. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, v.12, n.12, p.3383-3401, 2003.

KERL, M.E. Update on canine and feline fungal diseases. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.33, n.4, p.721-747. 2003.

KLANG, A.; LONCARIC, I.; SPERGSE, J.; EIGELSREITER, S.; WEISSENBOCK, H. Disseminated histoplasmosis in a domestic cat imported from the USA to Austria. **Medicinal Mycology Case Reports**. v.23, n.2, p.108-112, 2013.

LARSUPROM, L.; DUANGKAEW, L.; KASORNDORKBUA, C.; CHEN, C.; CHINDAMPORN, A.; WORASILCHAI, N. Feline cutaneous histoplasmosis: The first case report from Thailand. **Medical Mycology Case Reports**, n.18, p.28-30, 2017.

LEVISON, M.E. Diseases Transmitted by Birds. **Microbiology Spectrum**, v.3, n.4, p.1-16, 2015.

LINDER, K.; KAUFMANN, C.A. Current and New Perspectives in the Diagnosis of Blastomycosis and Histoplasmosis. **Journal of Fungi**, v.7, n.1, p.1-10, 2020.

LLORET, A., HARTMANN, K., PENNISI, M.G., FERRER, L., ADDIE, D., BELÁK, S., BOUCRAT-BARALON, C., EGBERINK, H., FRYMUS, T., GRUFFYDD-JONES, T., HOSIE, M.J., LUTZ, H., MARSILIO, F., MÖSTL, K., RADFORD, A.D., THIRY, E., TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Rare systemic mycoses in cats: blastomycosis, histoplasmosis and coccidioidomycosis: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.15, n.7, p. 624-627, 2013.

LOMONACO, L.L.S.; WALLER, S.B.; CLEFF, M.B.; GOMES, A.R.; SILVA, B.W.L.; CRUZ, R.O.; ALMEIDA, T.M.; SILVA, B.W.L.; CRUZ, R.O.; ALMEIDA, T.M.; VASCONCELLOS, A.L.; RIBEIRO, W.L.C.; FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A.; PINHEIRO, A.Q.; COSTA, P.P.C. Disseminated histoplasmosis in a cat rescued in Fortaleza, Brazil, and successfully treated with itraconazole – First case report identified molecularly. **Medical Mycology Case Reports**, v.30, p.29-24, 2020.

MARTÍNEZ-GAMBOA, A.M.; NIEMBRO-ORTEGA, M.D.; TORRES-GONZÁLEZ, P.; SANTIAGO-CRUZ, J.; VELÁZQUEZ-ZAVALAH, N.G.; RANGEL-CORDERO, A.; CABTREE-RAMÍREZ, B.; GAMBOA-DOMÍNGUEZ, A.; REYES-GUTIÉRREZ, E.; REYES-TERÁN, G.; LOZANO-FERNANDEZ, V.H.; AHUMADA-TOPETE, V.H.; MARTÍNEZ-AYALA, P.; MANRÍQUEZ-REYES, M.; RAMÍREZ-HINOSOJA, P.; RODRÍGUEZ-ZULUETA, P.; HERNÁNDEZ-LEÓN, C.; RUÍZ-QUIÑONES, J.; RIVERA-MARTÍNEZ, N.E.; CHAPARRO-SÁNCHEZ, A.; ANDRADE-VILLANUEVA, J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, L.A.; CRUZ-MARTÍNEZ, S.; FLORES-BARRIENTOS, O.; GAYTÁN-MARTÍNEZ, J.E.; MAGAÑA-AQUINO, M.; CERVANTES-SÁNCHEZ, A.; OLIVAS-MARTÍNEZ, A.; ARAUJO-MELÉNDEZ, J.; REYES-MONTES, M.R.; DUARTE-ESCALANTE, E.; FRÍAS-DE-LEÓN, M.G.; RAMÍREZ, J.A.; TAYLOR, M.L.; LEÓN-GARDUÑO, A.P.; SIFUENTES-OSORNIO, J. Diagnostic accuracy of antigen detection in urine and molecular assays testing in different clinical samples for the diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in patients living with HIV/AIDS: A prospective multicenter study in Mexico. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.15, n.3, p.1-26, 2021.

MCGILL, J.E.; HANZLICEK, A.S.; KUKANICH, K.S.; NORSWORTHY, G.D.; COOK, A.K. Pretreatment *Histoplasma capsulatum* urine enzymatic immunoassay concentrations do not correlate with outcome but may be influenced by renal function in cats with histoplasmosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.20, n.12, p.1177-1179, 2018.

MUNIZ, M.M.; PIZZINI, C.V.; PERALTA, J.M.; REISS, E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Genetic Diversity of *Histoplasma capsulatum* Strains Isolated from Soil, Animals, and Clinical Specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-Based Random Amplified Polymorphic DNA Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.12, p.4487-4494, 2001.

NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v.5, n.4, p.203-223, 2003.

PEREZ, F.; CACERES, D.H.; FORD, N.; RAVASI, G.; GOMEZ, B.L.; PASQUALOTTO, A.C.; HINE, P.; ADENIS, A.A.; NACHER, M.; CHILLER, T.; BADDLEY, J. Summary of Guidelines for Managing Histoplasmosis among People Living with HIV. **Journal of Fungi**, v.7, n.134, p.1-8, 2021.

POLF, H.D.; BANGERT, A.L. What is your diagnosis? Histoplasmosis. **Journal of the Amrecian Veterinary Medical Association**, v. 245, n.7, p.763-765, 2014.

PROCOP, G, W.; CHURCH, D.L.; HALL, G.S.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G, L. Micologia. In: PROCOP, G, W.; CHURCH, D.L.; HALL, G.S.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G, L. KONEMAN. **DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**. 7.ed. Rio de Janeiro, Brasil:Guanabara Koogan; 2018:1926-1931.

STOCKS, J. Doenças Infeciosas. In: LITTLE, S.E. **O gato**. 1.ed. Rio de Janeiro, Brasil: Rocca; 2016: 980-982.

PUCKET, J.D.; FENTIMAN, K.E.; MCCOOL, E.S.; HANZLICEK, A.S. Prevalence of ocular lesions in cats newly diagnosed with histoplasmosis: 55 cases (2015–2022). **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v.260, n.11, p.1330-1333, 2022.

QUIMBY, J.; GOWLAND, S.; CARNEY, H.C.; DEPORTER, T.; PLUMMER, P.; WESTROPP, J. 2021 AAHA/AAFP Feline Life Stage Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.23, n.3, p.211-233, 2021.

REINHART, J.M.; KUKANICH, K.S.; JACKSON, T.; HARKIN, K.R. Feline histoplasmosis: fluconazole therapy and identification of potential sources of *Histoplasma* species exposure. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.14, n.12, p.841-848, 2012.

RENSCHLER, J.S.; NORSWORTHY, G.D.; RAKIAN, R.A.; RAKIAN, A.L.; WHEAT, L.J.; HANZLICEK, A.S. Reduced susceptibility to fluconazole in a cat with histoplasmosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.3, n.2, p.1-9, 2017.

RICHER, S.M.; SMEDEMA, M.L.; DURKIN, M.M.; HERMAN, K.M.; HAGE, C.A.; FULLER, D.; WHEAT, L.J. Improved Diagnosis of Acute Pulmonary Histoplasmosis by Combining Antigen and Antibody Detection. **Clinical Infectious Diseases**, v.62, n.7, p.896-902, 2016.

RODRIGUES, A.M.; BEALE, M.A.; HAGEN, F.; FISHER, M.C.; TERRA, P.P.D.; HOOG, S.; BRILHANTE, R.S.N.; AGUIAR CRODEIRO, R.; SOUZA COLLARES MAIA CASTELO-BRANCO, D.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; CAMARGO, Z.P. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent Years. **Studies in Micology**, v.97, n.100095, p.121, 2020.

ROTHENBURG, L.; HANZLICEK, A.S.; PAYTON, M.E. A Monoclonal Antibody-Based Urine *Histoplasma* Antigen Enzyme Immunoassay (IMMY®) for the Diagnosis of Histoplasmosis in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.33, n.2, p.603-610, 2019.

SCHAEFER, D.M.W.; RIZZI, T.E.; ROYAL, A.B. Hemophagocytosis and *Histoplasma*-like Fungal Infection in 32 Cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v.48, n.2, p.250-254, 2019.

SMITH, K.M.; STROM, A.R.; GILMOUR, R.A.; LADOUCEUR, E. REILLY, C.M.; BYRNE, B.A.; AFFOLTER, V.K. SYKES, J.E.; MAGGS, D.J. Utility of antigen testing for the diagnosis of ocular histoplasmosis in four cats: a case series and literature review. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.19, n.10, p.1110-1118, 2017.

SILVEIRA, E.; MOTTIN, I.B.; EHLERS, A.; MARQUES, S.M.T. Histoplasmosse felina disseminada: relato de um caso. **PUBVET**, v.10, n.3, p.207-211, 2016.

SOUZA, E.W.; GREMIÃO, I.D.F.; PEREIRA, S.A.; CUNHA, S.C.S.; BORBA, C.M. Feline histoplasmosis: a case of supraorbital involvement. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.22, n.2, p.77-80, 2015.

SPARKES, A.H.; CANEY, S.; CHALHOUB, S.; ELLIOTT, J.; FINCH, N.; GAJANAYAKE, I.; LAGSTON, C.; LEFEBVRE, H.P.; WHITE, J.; QUIMBY, J. ISFM Consensus Guidelines on the Diagnosis and Management of Feline Chronic Kidney Disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.18, n.3, p.219-239, 2016.

STOCKS, J. Doenças Infeciosas. In: LITTLE, S.E. **O gato**. 1.ed. Rio de Janeiro, Brasil: Rocca; 2016: 980-982.

SWARTZENTRUBER, S.; RHODES, L.; KURKJIAN, K.; ZAHN, M.; BRANDT, M.E.; CONNOLLY, P.; WHEAT, L.J. Diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by antigen detection. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, n.12, p.1878-1882, 2009.

TAYLOR, A.R.; BARR, J.W.; HOKAMP, J.A.; JOHNSON, M.C.; YOUNG, B.D. Cytologic Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis in the Wall of the Urinary Bladder of a Cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 48, n.3, p.203-208, 2012.

TEIXEIRA, M.M.; PATANÉ, J.S.L.; TAYLOR, M.L.; GÓMEZ, B.L.; THEODORO, R.C.; HOOG, S.; ENGELTHALER, D.M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; FELIPE, M.S.S.; BARKER, B.M. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.6, p.1-20, 2016.

VITE-GARÍN, T.; ESTRADA-BÁRCENAS, D.A.; CIFUENTES, J.; TAYLOR, M.L. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: An overview. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, n.1, p.11-15, 2014.

WANKE, B; LAZÉRA, M. Histoplasmose clássica e Africana. In: SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanaba Koogan; 2010: 222-236.

WOLF, A.M. *Histoplasma capsulatum* Osteomyelitis in the Cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.1, n.4, p.158-162, 1987.

WOLF, A.M.; GREEN, R.W. The radiographic appearance of pulmonary histoplasmosis in the cat. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.28, n.1, p.34-37, 1987.

ANEXOS

| | |
|----------------|--|
| ANEXO A | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| ANEXO B | Aceite - Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) |
| ANEXO C | Ficha Clínica de Avaliação de Animais com Histoplasmosse |
| ANEXO D | Fluxograma |
| ANEXO E | Dados Clínicos de Felinos Domésticos com Histoplasmosse na Cidade do Rio de Janeiro-Brasil. |

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE VETERINÁRIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TUTORES

Título da Pesquisa: Histoplasmose felina no Rio de Janeiro - Caracterização clínica e análise antigênica

Responsável Docente: Heloisa Justen Moreira de Sousa

Responsável Discente: Mariana Palha de Brito Jardim

- 1. Natureza da pesquisa:** O Sr./Sra. está sendo solicitado(a) a permitir que o seu animal participe de um projeto de pesquisa que busca caracterizar dados clínicos de felinos com histoplasmose, bem como analisar o ensaio imunoenzimático antigênico na urina e no soro destes animais, a partir do diagnóstico de histoplasmose pelas técnicas convencionais.
- 2. Envolvimento na pesquisa:** Ao participar deste estudo o Sr./Sra. permitirá que a responsável discente utilize dados clínicos e amostras biológicas do seu animal no projeto de pesquisa.
- 3. Riscos e desconforto:** A participação nesta pesquisa não acarretará em complicações legais para o tutor, bem como para os animais, visto que estes serão submetidos à coleta de amostras sem que haja risco potencial de óbito.
- 4. Confidencialidade:** Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais, somente os pesquisadores envolvidos terão acesso às mesmas, não haverá vinculação do nome do tutor nem mesmo do animal aos resultados obtidos.
- 5. Benefícios:** A partir dos resultados desta pesquisa poderá se utilizar com segurança e confiabilidade novas formas de diagnóstico em gatos com histoplasmose, o que será útil para a área da medicina felina, visto o subdiagnóstico da doença.
Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre e esclarecida para a participação no projeto de pesquisa. Preencher por gentileza os itens que se seguem:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens supracitados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do Tutor: _____

Assinatura do Tutor

Assinatura do Pesquisador

ANEXO B

Aceite - Comissão de ética e uso de animais (CEUA)



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Histoplasmose felina no Rio de Janeiro - Caracterização clínica e análise antigênica", protocolada sob o CEUA nº 4895210619 (ID 001510), sob a responsabilidade de **Heloisa Justen Moreira de Souza e equipe; Mariana Palha de Brito Jardim** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 25/10/2019.

We certify that the proposal "Histoplasmosis felina in Rio de Janeiro - Clinical characterization and antigenic analysis", utilizing 50 Cats (males and females), protocol number CEUA 4895210619 (ID 001510), under the responsibility of **Heloisa Justen Moreira de Souza and team; Mariana Palha de Brito Jardim** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/25/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 11/2019 a 11/2021 Área: Clínica Médica

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Gatos

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 0 a 25 anos

Quantidade: 50

Linhagem: Não se aplica

Peso: 0 a 20 kg

Seropédica, 09 de fevereiro de 2023

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro

Viviane de Souza Magalhães

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro



ANEXO C

Ficha Clínica de Avaliação de Animais com Histoplasmose

FELINO:

SEXO: ()M ()F ()MC ()FC

IDADE:

RAÇA: ()Sem raça definida ()Persa ()Siamês ()Maine coon ()Birmanês

()Norueguês da Floresta ()Sphynx ()Outro - Qual? _____

ESTILO DE VIDA: ()Domiciliado ()Semi domiciliado ()Não domiciliado

HISTÓRICO/QUEIXA CLÍNICA:

FORMA DE DIAGNÓSTICO DA HISTOPLASMOSE:

() Citologia () Histopatologia () Cultura fúngica () PCR

() Outra-Qual? _____

| SINAIS CLÍNICOS | PRESENÇA (P) OU AUSÊNCIA (A) |
|------------------|------------------------------|
| Fraqueza | |
| Linfadenopatia | |
| Perda de Peso | |
| Anorexia | |
| Lesão Cutânea | |
| Alteração Ocular | |
| Claudicação | |

DEMAIS SINAIS CLÍNICOS: _____

| ACHADOS RADIOGRÁFICOS/ULTRASSONOGRÁFICOS | PRESENÇA (P) OU AUSÊNCIA (A) |
|--|-------------------------------------|
| Pneumonia | |
| <input type="checkbox"/> Padrão Intersticial | |
| <input type="checkbox"/> Difuso | |
| <input type="checkbox"/> Fino | |
| <input type="checkbox"/> Linear | |
| <input type="checkbox"/> Nodular/Miliar | |
| <input type="checkbox"/> Padrão Brônquico | |
| <input type="checkbox"/> Padrão Alveolar | |
| <input type="checkbox"/> Padrão Misto – Qual? _____ | |
| Hepatomegalia | |
| Esplenomegalia | |

CLASSIFICAÇÃO DA APRESENTAÇÃO DA DOENÇA:

Disseminada Pulmonar Gastrointestinal

RESULTADO FIV/FeLV:

FIV/FeLV negativo FIV /FeLV positivo
 FIV positivo/FeLV negativo FIV negativo/FeLV positivo

ALTERAÇÕES DE EXAMES LABORATORIAIS (HEMOGRAMA):

Anemia Leucopenia Eosinopenia absoluta Neutropenia absoluta
 Linfocitopenia absoluta Monocitopenia absoluta
Outros – Quais? _____

ALTERAÇÕES DE EXAMES LABORATORIAIS (BIOQUÍMICA):

Aumento de Ureia Aumento de creatinina Aumento de ALT Hiperproteinemia
 Hipoalbuminemia
Outros – Quais? _____

TRATAMENTO:

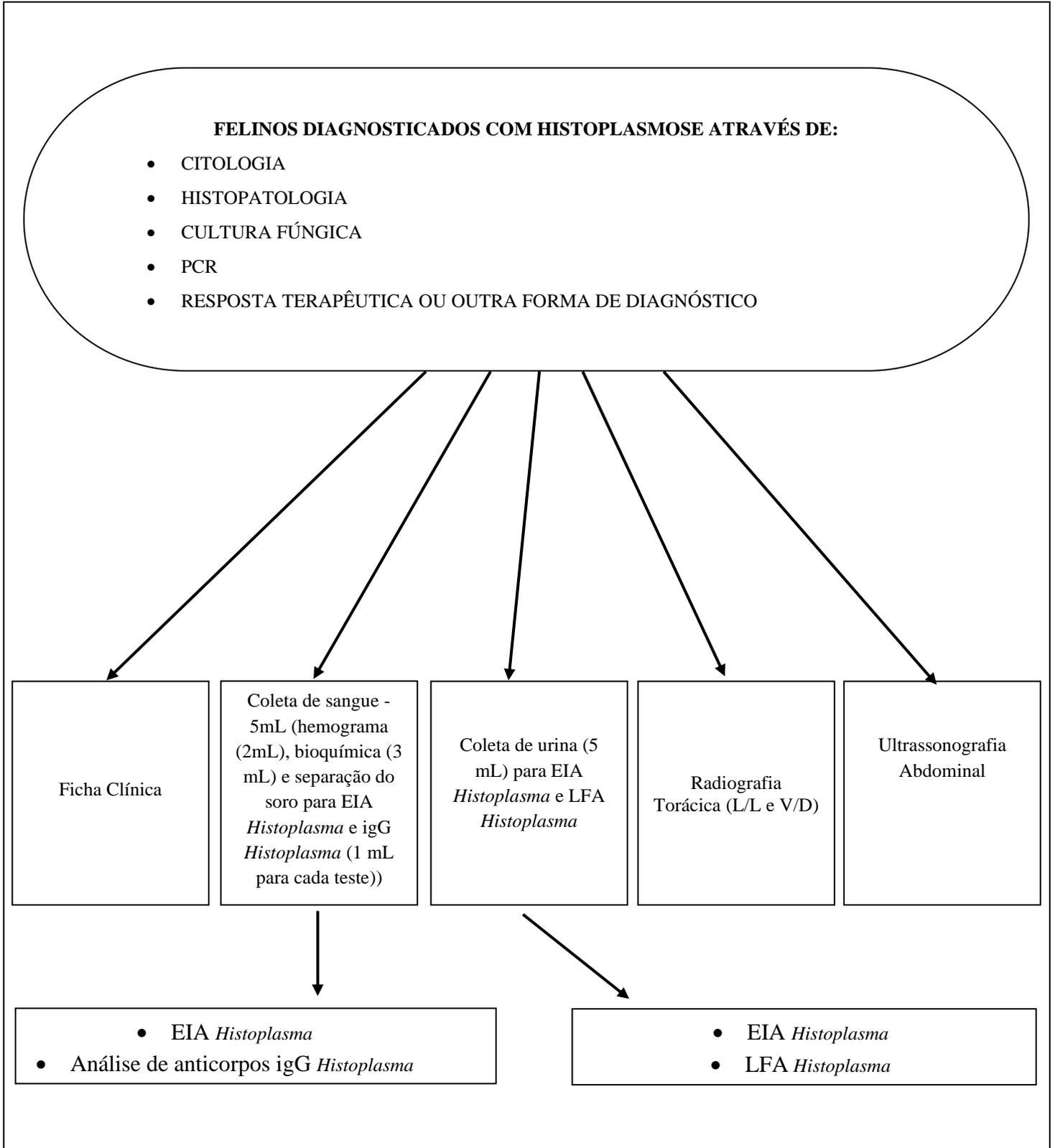
Itraconazol Anfotericina B Fluconazol
Tempo de tratamento: 1 mês 2 meses 3 meses
 Mais de 3 meses - Quantos meses ? _____

Mariana Palha de Brito Jardim

Doutoranda em Ciências Clínicas pelo Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

ANEXO D

Fluxograma



ANEXO E
Dados Clínicos de Gatos com Histoplasmose na Cidade do Rio de Janeiro-Brasil. (Continua)

| Felino | Sexo/ SR | Raça | Idade (anos) | Estilo de vida | Histórico e Sinal Clínico | R | Forma de diagnóstico | Tratamento | Corticosteróide | Duração do tratamento | Desfecho |
|--------|-------------|--------|-----------------|-----------------|---|-----|-------------------------|--|---|---|--------------|
| 1 | FC | SRD | 5 | Semidomiciliado | H: Alteração respiratória SC: Dispneia | Sim | Citologia pleural | I (100 mg/gato VO) | Não | I- 6 sem | Cura clínica |
| 2 | MC | SRD | 11 | Semidomiciliado | H: Tosse; Hiporexia, SC: Emagrecimento | Não | Citologia pleural | I (100 mg/gato VO) + A (0,5 mg/kg SC) + A (0,25 mg/kg IV) + | Sim – Antes e após tratamento antifúngico | I – 12 sem A SC – 8 doses (2x na sem por 2 sem, 1x na sem por 4 semanas A IV – 2 doses (1 x na sem por 2 sem) | Óbito |
| 3 | M | Persa | 9 | Domiciliado | H: Alteração respiratória SC: Dispneia; Desidratação; Hipotermia; | Sim | Terapêutico | I (50 mg/gato VO) A (0,5 mg/kg SC) + A (0,25 mg/kg IV) + | Sim – Antes e após tratamento antifúngico | I – 8 sem A SC – 2 doses (1 x na sem por 2 sem) A IV – 2 doses (1x ao dia por 2 dias) | Cura clínica |
| 4 | MC | Siamês | 6 | Domiciliado | H: Gripe; Náusea; Emagrecimento; Prostração; Hiporexia; Tosse; SC: Taquipneia; Dispneia; Mucosas hipocoradas; Febre | Não | Citologia pleural | I (100 mg/gato VO) + A (0,5 mg/kg SC) + A (0,25 mg/kg IV) + | Sim – Antes e após tratamento antifúngico | I – > 1 sem (10 dias) A SC – 4 doses (3 x na sem por 2 sem) A IV – 1 dose | Óbito |
| 5 | MC | Siamês | 3 | Domiciliado | H: Prostração; Anorexia; Vômitos; Alteração respiratória SC: Desidratação; Esplenomegalia; Ruído respiratório; Febre | Não | Citologia pleural | I (100 mg/gato VO) + A (0,5 mg/kg SC) | Sim – Após tratamento antifúngico | I – 6 sem A SC – 18 doses (3x na sem por 5 sem, 2 x na sem por 1 sem e 1 x na sem por 1 sem) | Cura clínica |
| 6 | FC | SRD | 10 | Domiciliado | H: Alterações cutâneas; Espirros; Prostração; Regurgitação; SC: Espirros; Alterações cutâneas; Hepatomegalia; Rins irregulares; Doença Periodontal | Sim | Citologia Cutânea | I (120 mg/gato VO) + A (0,5 mg/kg SC) + IK (30 mg/gato VO) | Sim – Antes e após tratamento antifúngico | I – 24 sem A SC – 23 doses (3 x na sem por 5 sem com retorno do protocolo após 14 dias, após 2 x na sem por 4 sem e 1 x na sem por 1 sem) IK – 4 sem intervalo de 1 mês e tratamento por mais 4 sem | Eutanásia |

ANEXO E. Continuação

| | | | | | | | | | | | |
|----|----|-----------------------|---|-------------|--|-----|---|--|---|---|--------------|
| 7 | FC | SRD | 9 | Domiciliado | H: Alteração respiratória; Hiporexia; Prostração; SC: Linfonodomegalia; Taquipneia; Dispneia | Não | Citologia pleural e Histopatologia pulmonar | I (100 mg/gato VO) + A (0,5 mg/kg SC) | Sim – Antes e após tratamento antifúngico | I – < 1 sem (4 dias) A SC – 4 doses (1 dose por dia) | Eutanásia |
| 8 | F | SRD | 5 | Domiciliado | H: Alteração respiratória; Tosse SC: Dispneia; Ausculta cardiopulmonar abafada | Não | Histopatologia e PCR pulmonar | I (100 mg/gato VO) + A (0,25 mg/kg IV) | Não | I – < 1 sem (4 dias) A – 1 dose (1 dose por dia) | Óbito |
| 9 | MC | Noruegues da floresta | 8 | Domiciliado | H: Prostração; Hiporexia; Hipoadipsia; Vômito; Tosse; Espirro; Secreção nasal; Alteração respiratória SC: Taquipneia; Dispneia; Ruído respiratório; Febre; Prolapso de terceira pálpebra; Linfonodomegalia; Nódulo cutâneo | Não | Histopatologia pulmonar | A (0,25 mg/kg IV) | Sim – Antes e do tratamento antifúngico | A IV – 1 dose (1 dose por dia) | Óbito |
| 10 | MC | SRD | 5 | Domiciliado | H: Prostração; Alteração respiratória; Hiporexia; Espirros; Emagrecimento; Febre; SC: Mucosas hipocoradas; Desidratação; Apatia | Não | Análise medular e Histopatologia de pâncreas, rins, baço, fígado e medula óssea | I (100 mg/gato VO) + A (0,5 mg/kg SC) | Sim – Antes e do tratamento antifúngico | I – < 1 sem (3 dias) A SC – 2 doses (1 dose a cada 48 horas) | Óbito |
| 11 | MC | SRD | 2 | Domiciliado | H: Quilotórax Idiopático; Alteração respiratória; Hipertermia ao toque; Alteração ocular (olho direito) SC: Quemose da conjuntiva superior do olho direito; Efusão pleural | Não | Cultura fúngica (amostra conjuntival) | I (100 mg/gato VO) | Não | I – 8 sem | Cura clínica |
| 12 | MC | SRD | 8 | Domiciliado | H: Prostração; Alteração respiratória; SC: Emagrecimento; Febre; Ausculta pulmonar abafada; Dispneia; Desidratação; Doença periodontal | Não | Terapêutico | I (100 mg/gato VO) + A (0,5 mg/kg SC) | Sim, após tratamento antifúngico | I – 24 sem A SC – 12 doses (3 x na sem por 4 sem) | Cura clínica |

SR: Status reprodutivo; R: Recaída; M: Macho; F: Fêmea; MC: Macho castrado; FC: Fêmea castrada; SRD: Sem raça definida; H: Histórico; SC: Sinal Clínico; PCR: Reação em cadeia da polimerase; I: Itraconazol; A: Anfotericina; IK: Iodeto de Potássio; VO: Via oral; SC: Subcutâneo; IV: Intravenoso; Sem: Semana (s)