



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE



FACULTAD
DE MEDICINA

Maestría en Micología Médica

UTILIDAD DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO EN HISTOPLASMOSIS Y CRIPTOCOCOSIS EN PACIENTES CON INFECCIÓN AVANZADA POR HIV

Maestrando

Claudia Elizabeth Frola

Directora

Dra. Liliana Guelfand

Co-Director

Dr. Omar Sued

-AÑO 2019-

SITIO DEL ESTUDIO:

División Infectología, Hospital General de Agudos "Juan A. Fernández",
Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

"Cuida tus pensamientos, porque se convertirán en tus palabras. Cuida tus palabras, porque se convertirán en tus actos. Cuida tus actos, porque se convertirán en tus hábitos. Cuida tus hábitos, porque se convertirán en tu destino"

Mahatma Gandhi

A Maxi, por caminar a mi lado, sostenerme y guiarme siempre, con amor.

A mis padres, que me brindaron la mejor herramienta, una educación... aunque implicara estar a varios kilómetros de casa. Por el amor constante, para poder construir la mejor versión de la medicina. A mi hermano, por alegrar aquel comienzo del transitar académico, haciendo más fácil las horas de estudio.

A mis amigos/as por todo el tiempo que les quité durante este proceso, pero que respetaron sin cuestionarme.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo Negroni, por despertar el interés y una pasión creciente durante mi etapa formativa, hacia el mundo micológico. Por sus enseñanzas continuas que me permiten ser cada día una mejor profesional.

A la Dra. Liliana Guelfand, por ser mi guía en este camino que estoy transitando, por su confianza y su solidaridad infinita. Gracias Lili por tu apoyo constante, en lo profesional pero sobre todo en lo personal. Por darme la mano siempre.

Al Dr. Omar Sued, por su confianza, su energía y apoyo desinteresado. Gracias Omar por permitirme hacer posible este trabajo, fuiste quien me dio el empujón.

Al Dr. Héctor Pérez, por sus consejos constantes, por las oportunidades brindadas y por su confianza ciega en este proyecto. A través de él, a todo el equipo del Hospital Fernández, en particular a la residencia, el personal de enfermería y todo el equipo administrativo que hicieron posible este trabajo, siempre con una sonrisa.

Al Dr. Pedro Cahn, por confiar en mi capacidad de trabajo y permitirme ingresar al mundo de la investigación. A todo el equipo de la Fundación Huésped, en especial mis colegas, que cubrieron mis espaldas en cada viaje de esta maestría.

A los pacientes, que permiten que el conocimiento avance.

INDICE

Resumen	5
1. Introducción	8
1.1. Antecedentes del tema: Infección avanzada por HIV	8
1.2. Antecedentes del tema: Criptococosis	11
1.3. Antecedentes del tema: Histoplasmosis	15
2. Planteamiento del problema y justificación	20
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	23
4.1. Objetivo Primario.....	23
4.2. Objetivos Secundarios	23
5. Descripción y diseño del estudio	24
5.1. Población del estudio	24
5.2. Criterios de inclusión.....	24
5.3. Criterios de exclusión	24
5.4. Duración del estudio	25
5.5. Metodología	25
5.6. Análisis estadístico	36
5.7. Consideraciones éticas	37
6. Resultados	38
6.1. Criptococosis.....	40
6.2. Histoplasmosis	43
7. Discusión	45
7.1. Discusión general.....	45
7.2. Criptococosis.....	46
7.3. Histoplasmosis	49
7.4. Limitaciones del estudio	53
7.5. Financiación.....	54
8. Conclusiones	55
9. Bibliografía	56
10. Anexos.....	68
10.1. Determinación de estadio clínico de la infección por HIV de la OMS	68
10.2. Ficha para valoración inicial	70
10.3. Trabajos científicos.....	71
10.3.1. Modalidad POSTER	71
10.3.2. Modalidad PRESENTACION ORAL.....	73
10.3.3. Modalidad PUBLICACIÓN.....	76
10.3.4. Modalidad RECOMENDACIÓN NACIONAL	85

Resumen

Introducción: La criptococosis meníngea es una infección fúngica grave, potencialmente mortal, entre los pacientes con infección avanzada por HIV. La detección del antígeno criptocócico (AgCr) en sangre periférica es posible antes del inicio de los síntomas neurológicos. Debido a que el mismo es positivo tanto en infecciones meníngeas como no meníngeas, es necesario descartar compromiso del sistema nervioso central. El valor predictivo negativo del 100% del antígeno apoya su utilidad como estrategia de cribado y terapia preventiva.

La histoplasmosis asociada al sida es la segunda micosis sistémica en frecuencia en la Argentina, después de la criptococosis. Su forma diseminada es común en pacientes con bajos recuento de células T CD4+. El examen microscópico y los cultivos continúan siendo los métodos de referencia para el diagnóstico, aunque estos últimos suelen demorar semanas hasta su resultado y ambos presentan una sensibilidad menor al 100%. En este escenario, la detección del antígeno en orina (AgU) de *Histoplasma capsulatum* podría representar un avance importante para el diagnóstico.

Objetivo: Explorar la validez de las pruebas rápidas de diagnóstico para criptococosis e histoplasmosis (AgCr y AgU, respectivamente), en contexto de una estrategia de cribado, en pacientes con infección avanzada por HIV. Determinar prevalencia de ambas patologías en esta población y establecer costo-beneficio de la implementación de dichas metodologías, en nuestro hospital.

Materiales y métodos: Entre abril de 2014 y enero de 2015, se solicitó AgCr con técnica de flujo lateral por inmunocromatografía (LFA) en suero y detección del AgU por ELISA, a todos los pacientes adultos con infección avanzada por HIV y sin terapia antirretroviral (TARV) o mala adherencia a la misma. En caso de lesiones mucocutáneas u otros tejidos/órganos, se extrajo material para el examen microscópico y posterior cultivo. Se

realizó hemocultivo por técnica de lisis centrifugación y detección de anticuerpos para histoplasmosis mediante inmunodifusión.

Si la detección de AgCr en suero fue positiva, se efectuó una punción lumbar para descartar compromiso meníngeo. Aquellos pacientes con criptococosis meníngea fueron tratados con anfotericina B desoxicolato y fluconazol intravenoso con una fase de inducción de 14 días. Los pacientes con AgCr positivo sin diagnóstico, por examen directo o cultivo, de afección meníngea o criptococosis diseminada fueron tratados durante el mismo período de tiempo con fluconazol vía oral 800 mg/día de manera ambulatoria (terapia preventiva). Se calculó el número necesario a tratar para detectar un paciente con AgCr positivo y se comparó el costo estimado de esta estrategia vs el estándar de cuidado en nuestro centro.

En histoplasmosis el cálculo de su prevalencia se estableció de acuerdo al diagnóstico definitivo según las definiciones de enfermedad micótica probable o probada. Se realizó el cálculo de la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivos y negativos del método de detección de AgU. El tratamiento fue instaurado, según gravedad, de acuerdo a las recomendaciones internacionales.

Resultados: Se incluyeron 123 pacientes, de los cuales 14 fallecieron durante el periodo de estudio.

La prevalencia de infección criptocócica utilizando el AgCr por LFA fue de 8.1%. Entre los 10 pacientes positivos para AgCr, 6 tenían compromiso meníngeo detectado a través del análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR), aunque solo 3 de ellos tenían síntomas neurológicos al inicio del estudio. Todos recibieron tratamiento estándar inmediato. Dos de los 6 pacientes con criptococosis meníngea murieron durante la hospitalización. Los 4 pacientes restantes con AgCr positivo recibieron terapia preventiva dirigida con fluconazol vía oral de manera ambulatoria. El número necesario a tratar para detectar un AgCr positivo por LFA fue de 12 pacientes.

Con respecto a la histoplasmosis, con la metodología habitual (excluyendo AgU) se diagnosticaron 8 casos que fueron considerados como histoplasmosis probada. Los 4 casos que presentaban solo resultado positivo al AgU se consideraron como diagnósticos probables de histoplasmosis.

La sensibilidad y especificidad del AgU fueron de 63% y 97%, respectivamente. Al incluir las muestras positivas de AgU como casos de histoplasmosis, la prevalencia aumentó del 6.5%(n=8) al 9.7% (n=12).

Conclusiones: La detección rutinaria del AgCr por LFA en suero a todos los pacientes con infección avanzada por HIV proporcionó un diagnóstico rápido con una prevalencia elevada (8.1%). Así mismo, la presencia del AgCr en pacientes sin enfermedad diseminada, pero con terapia antifúngica preventiva, evitó un potencial compromiso meníngeo. Por su parte, la detección del AgU aumentó en un 50% el diagnóstico de histoplasmosis (prevalencia de 9.7%) considerando casos probables y probados, en el contexto de una población altamente susceptible. Por lo tanto, este estudio valida las recomendaciones de la OMS de solicitar el AgCr en toda persona HIV positiva sin TARV efectiva y un recuento de linfocitos T CD4+ menor a 100 células/ μ L, y adiciona la necesidad de realizar el AgU para diagnóstico de histoplasmosis en la misma población.

1. Introducción

1.1. Antecedentes del tema: Infección avanzada por HIV

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida –sida- comprende la etapa clínica final de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés), con la evidencia de un estado inmunitario comprometido (a menudo con un recuento de linfocitos T CD4+ <200 células/ μ L) y la presencia de múltiples infecciones oportunistas concomitantes (1). Su primera descripción se realizó en 1981 en los Estados Unidos a través de la notificación de cinco casos de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en hombres previamente sanos, y desde entonces ésta ha sido una de las principales enfermedades fúngicas definitorias de sida (2).

A pesar de los avances mundiales en el acceso a la atención, una proporción significativa de adultos acude a centros de salud con enfermedad avanzada por HIV, definida como estadio 3-4 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), categoría B-C del Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) o un recuento de linfocitos T CD4+ \leq 200 células/ μ L (3). En Argentina el diagnóstico de HIV en etapas tardías, medido con la combinación de estas características clínicas e inmunológicas, se ubica en un 35% (4). La presentación en este período incrementa las posibilidades de un deterioro del estado de salud al inicio de la terapia antirretroviral (TARV), ya que representa menos probabilidades de responder al tratamiento por mayor intolerancia, toxicidad y posibilidad de interacciones medicamentosas. Esto se asocia con tasas de mortalidad más elevadas, al comparar con aquellos pacientes que la inician de manera oportuna (5).

La destrucción gradual de las poblaciones de linfocitos T CD4+ es el sello distintivo de la infección por HIV debido a su replicación dinámica durante toda la enfermedad, a pesar de la frecuente ausencia de síntomas durante la fase crónica (6). En este sentido, aunque la TARV disminuya la tasa de infecciones oportunistas, la presencia de bajos linfocitos T CD4+ y una carga viral de HIV no suprimida en contexto de mala adherencia,

se relaciona con falla virológica y el consiguiente riesgo de enfermedades marcadoras (7). Desde el advenimiento de la TARV en los países desarrollados, la prevalencia de micosis en pacientes con sida ha disminuido de forma importante, debido al control de la replicación viral y la recuperación inmunológica. Sin embargo, no ocurre lo mismo en los países en desarrollo, donde por fallas en el diagnóstico y tratamiento oportuno, aún las infecciones por hongos asociadas a HIV/sida siguen siendo un importante problema de salud pública (8). De este modo representan un gran impacto clínico en el paciente, que contribuye a su gravedad y a la estimación del deterioro inmunológico presente, aún en ausencia de un recuento de linfocitos T CD4+ de manera objetiva.

Si bien algunas micosis como aquellas producidas por *Candida* spp. o *Cryptococcus* spp. son de distribución global, la histoplasmosis representa una infección fúngica cosmopolita con áreas de alta endemicidad, como en nuestro país (9).

La rápida restauración de una respuesta inflamatoria inmune específica de manera excesiva y no controlada, una vez iniciada la TARV, conduce a un subgrupo de pacientes a un deterioro clínico denominado síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (SIRI). De esta manera puede decirse que el SIRI es la consecuencia de una exagerada activación del sistema inmune contra antígenos persistentes (SIRI paradójico), o de patógenos viables, donde su presencia es desconocida o subclínica (SIRI desenmascarador) (10). El SIRI puede ser desencadenado por una amplia variedad de microorganismos, entre ellos los hongos, que lleva a la reactivación de una infección clínica silente o el empeoramiento de una infección oportunista previamente diagnosticada (11). En este último escenario, entre un 15-45% de los pacientes desarrollan SIRI, y en la mayoría se manifiestan dentro de los 60 días de inicio de la TARV (12) (13). Dentro de las infecciones micóticas, *Cryptococcus neoformans* es el microorganismo que se asocia con más frecuencia con este fenómeno. Las manifestaciones clínicas pueden ser inespecíficas, aunque en la criptococosis se focalizan principalmente con compromiso del sistema nervioso central (SNC) (14).

El SIRS ocurre con mayor frecuencia en aquellos pacientes que inician la TARV con una marcada inmunosupresión. Dentro de los factores de riesgo implicados en su desarrollo, juegan un rol relevante el bajo recuento de linfocitos T CD4+, el bajo recuento de glóbulos blancos en el líquido cefalorraquídeo (LCR), y la alta carga fúngica al inicio (15) (16) (17). La mortalidad asociada al SIRS, es de alrededor del 4%, y este valor asciende cuando se relaciona particularmente con la meningitis criptocócica (18).

El reconocimiento oportuno y precoz de los pacientes con alto riesgo de desarrollar estas infecciones fúngicas, en especial en quienes se presentan de manera silente, es una de las principales herramientas para prevenir el desarrollo de un SIRS.

1.2. Antecedentes del tema: Criptococosis

Los hongos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* son levaduras encapsuladas que originan una enfermedad fúngica potencialmente mortal denominada criptococosis (19). Son saprófitos ambientales cuyo hábitat natural se encuentra en general asociado con los excrementos de las aves y la madera en descomposición (20). La infección es adquirida por la inhalación de pequeñas levaduras o basidiosporas. Su presentación pulmonar primaria con frecuencia es asintomática y puede resolverse o permanecer contenida dentro de los granulomas. Sin embargo, según la combinación de factores del huésped, de la magnitud del inóculo y de su virulencia, el organismo puede diseminarse de manera aguda o después de un período de latencia, a sitios extrapulmonares (21) (22). Aunque prácticamente todos los órganos del cuerpo pueden estar involucrados, la infección del SNC es la manifestación clínica más común y principal causa de muerte de la criptococosis (20).

La mayoría de los casos de meningitis criptocócica se observan en pacientes con un recuento de linfocitos T CD4+ <100 células/ μ L. De esta manera se reconoce como una infección oportunista frecuente y marcadora de sida en pacientes con infección por HIV en etapa tardía (21) (23).

En un estudio de nuestro país, el complejo de especies de *C. neoformans* fue la causa principal de criptococosis en pacientes con y sin enfermedad inmunosupresora, siendo la población con HIV/sida la más susceptible (24). En concordancia con los informes mundiales, la infección meníngea asociada al HIV fue la manifestación clínica más frecuente (25).

En estos pacientes predominan los síntomas neurológicos, como cefalea y alteración del estado mental, acompañados de fiebre, náuseas y vómitos. Sin tratamiento, la enfermedad progresa y los síntomas se extienden hasta provocar la muerte (26).

Los parámetros característicos del LCR en la criptococosis meníngea incluyen un recuento elevado de glóbulos blancos (con predominio linfocitario), proteínas elevadas y bajo nivel de glucosa. Sin embargo, cuando se asocia al HIV, el recuento de glóbulos blancos en el LCR es más bajo y con frecuencia puede ser normal (27).

Desde el punto de vista del laboratorio, el diagnóstico microbiológico de la meningitis criptocócica asociada al HIV no debería plantear una problemática por la alta carga fúngica con la que se presentan. El examen de tinta china del LCR tiene una sensibilidad de un 70-90%, e incluso aquellos casos negativos con dicha prueba pueden diagnosticarse de manera confiable mediante la detección del antígeno criptocócico (AgCr) y el cultivo. Hasta hace poco, la detección de antígenos se basaba en pruebas de aglutinación de látex, que, aunque sensibles y específicas, estaban limitadas en los entornos con alta prevalencia pero con recursos limitados. En este contexto, el desarrollo de un ensayo de flujo lateral ha sido una importante contribución, debido a que cumple con los criterios para ser utilizado en el punto de atención (28). Estos avances en el diagnóstico de la criptococosis, han permitido implementar estrategias de detección y tratamiento preventivo, dirigidas a evitar el desarrollo de infecciones clínicas en pacientes con infección por HIV en etapa avanzada (25).

La infección criptocócica se diagnostica en forma temprana mediante la detección del AgCr en la sangre. En el estudio de French y col. dicho antígeno fue detectable, a través de pruebas de aglutinación de partículas de látex, con una mediana de 22 días antes del desarrollo de los síntomas neurológicos (29). Debido a que el AgCr sérico es positivo tanto en infecciones meníngeas como no meníngeas, debería realizarse una punción lumbar para descartar compromiso del SNC (7). Por otra parte, en un estudio de cohorte retrospectivo de más de 700 pacientes en Sudáfrica, se evaluaron muestras de sangre con AgCr antes del inicio de la TARV. El valor predictivo negativo del 100% del antígeno apoyó su utilidad como estrategia de cribado y terapia preventiva. De este modo, los pacientes en riesgo (recuentos de células T CD4+ <100 células/ μ l) deben ser analizados

en busca de AgCr y en los casos positivos, deben recibir terapia preventiva con fluconazol oral ampliamente disponible y seguro (30). Aunque el fluconazol puede ser una terapia suficiente para muchos pacientes con AgCr positivo, es importante remarcar que en aquellos casos donde se evidencia compromiso meníngeo, se recomienda una terapia antimicótica más agresiva (31).

La identificación de las especies de *Cryptococcus* se realiza por pruebas bioquímicas fenotípicas y/o por el método de ionización/desorción mediante láser asistida por matriz y espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), con su confirmación genómica posterior (19).

A pesar de la mejora global en el acceso a la TARV, el número de personas HIV positivas con un recuento de linfocitos T CD4+ <100 células/ μ L sigue siendo considerable, representando alrededor del 20-25% de las personas que acuden a recibir atención médica (32). De este modo, la prevalencia de la infección criptocócica asociada al sida, se mantiene prácticamente sin cambios en los países de bajos ingresos, a diferencia de los países desarrollados.

La prevención de la enfermedad criptocócica ha demostrado un beneficio de supervivencia y ahorro en los costos para los sistemas de atención de salud cuando se combina con una mejor adherencia a la TARV. El costo de los programas de detección de AgCr debe apreciarse en el contexto de costos de tratamiento para pacientes con meningitis criptocócica en países de bajos ingresos como sería nuestro país y gran parte de Latinoamérica (33) (34).

El SIRI asociado a la criptococosis meníngea es otra complicación común y potencialmente mortal (35) (18). Determinar cuándo debe iniciarse la TARV después de un diagnóstico de meningitis criptocócica implica equilibrar el beneficio de supervivencia conferido por la misma, con el riesgo de SIRI. El estudio Cryptococcal Optimal ART Timing (COAT) sugirió que el exceso de muertes en la rama de estudio con TARV de

inicio temprano podría haber sido inmunomediado. Por lo tanto, las pautas actuales sugieren que la TARV se debe iniciar a las 4-6 semanas del diagnóstico de criptococosis meníngea para prevenir el tan temido SIRS (36).

La meningitis criptocócica es una excelente medida para demostrar el fracaso del programa de tratamiento del HIV. Actualmente, ninguna persona con HIV debería desarrollar enfermedad criptocócica. Sin embargo, debido a desafíos que implican el diagnóstico tardío, la vinculación y retención en la atención, el acceso a la TARV y la falla virológica, el evento final en una cascada fallida de atención del HIV es a menudo, el desarrollo de la meningitis criptocócica. Hasta que se pueda mejorar el vínculo con la atención integral del HIV, los programas de detección criptocócica son una inversión valiosa que identifica a las poblaciones con alto riesgo de muerte. Para reducir aquellas relacionadas con el sida, es crucial asegurar que las personas con recuentos de linfocitos T CD4+ <100 células/ μ L se examinen para detectar antigenemia criptocócica, se traten de forma preventiva (si el AgCr es positivo) y se inicie la TARV (34). En esta línea, la detección de AgCr junto con una terapia antimicótica preventiva tiene un beneficio de supervivencia comprobado (37).

1.3. Antecedentes del tema: Histoplasmosis

Histoplasma capsulatum es un hongo patógeno dimorfo, cosmopolita, que causa un amplio espectro de formas clínicas, las que dependen del estado inmunitario del paciente y del tamaño del inóculo infectante (38). Entre las razones para definir el patrón de distribución de la endemidad, influyen en gran medida el clima moderado, la humedad y las características del suelo (39). Predomina en el continente americano, en especial a lo largo de las grandes cuencas fluviales o en la proximidad de los lagos, con alta humedad de suelo, temperaturas medias anuales de 15 a 20 °C y pluviometrías de 800 a 1.200 mm por año (40). El excremento de las aves y los murciélagos aumenta el crecimiento del organismo en el medio ambiente mediante la aceleración de la esporulación (39). Por este motivo las cuevas que presentan condiciones estables de temperatura y humedad, sin la exposición directa de las radiaciones solares y con acumulación de guano, representan un nicho ecológico satisfactorio (41).

La infección humana ocurre luego de la inhalación de esporas de *H. capsulatum* transportadas por el aire. Los elementos infectantes (microaleuriosporas) ingresan a las vías respiratorias hasta los alvéolos y, una vez en el interior del hospedero, pasan a la fase levaduriforme que es la responsable de su patogenicidad. La transición de la fase micelial a la levaduriforme es el determinante fundamental para establecer la infección. El hongo puede luego diseminarse, a través de la sangre, a cualquier órgano o sistema. Este tipo de infección primaria, que se resuelve de manera espontánea, generalmente ocurre en individuos inmunocompetentes. En huéspedes inmunocomprometidos, la infección primaria y las reinfecciones pueden asumir un carácter progresivo de variable gravedad (42) (38) (43), afectando los órganos ricos del sistema monocítico histiocitario y las estructuras linfáticas del tubo digestivo. Si bien todos los órganos son susceptibles, los comprometidos con mayor frecuencia son los pulmones y el sistema hematopoyético. Sin tratamiento, esta enfermedad tiene un curso rápidamente fatal (44) (45) (46).

La histoplasmosis asociada al sida representa en la actualidad el 90% de los casos de histoplasmosis diseminada progresiva observados en Latinoamérica. Es más frecuente en aquellos pacientes que no reciben TARV o en los primeros meses de su inicio, y afecta cuatro veces más a los hombres que a las mujeres (45).

Desde 1987, la histoplasmosis diseminada ha sido incluida entre las infecciones definitorias de sida (47). Ocurre en aproximadamente el 2-5% de los pacientes con sida que viven en áreas endémicas (48). Es la primera manifestación de este estadio entre el 50-75% de los pacientes con HIV (49) (50) y hasta el 80% de los casos se presentan cuando el recuento de linfocitos T CD4+ es <100 células/ μ L (46) (45).

Los síntomas de la histoplasmosis diseminada incluyen fiebre, malestar general, anorexia y/o pérdida de peso. Es común la participación del sistema reticuloendotelial, la piel, el tracto gastrointestinal, las glándulas suprarrenales y el SNC (49).

En América Latina, entre un 70-80% de los pacientes con esta patología presentan lesiones mucocutáneas, característica distintiva de la histoplasmosis asociada al sida en nuestra región, a diferencia de los Estados Unidos donde la frecuencia de lesiones cutáneas es de sólo un 6%. Las pápulas cutáneas ulceradas o de aspecto "moluscoide" y las ulceraciones de la mucosa oral, son las manifestaciones tegumentarias más comunes (45).

Desde finales de la década de 1990, la prevalencia de histoplasmosis diseminada ha disminuido en poblaciones HIV positivas con acceso a la TARV, pero sigue siendo alta en poblaciones que por diferentes motivos no la reciben o no pueden cumplir con estos regímenes (51).

En Latinoamérica predominan las formas respiratorias agudas, que corresponden a infecciones primarias sintomáticas, y las formas diseminadas progresivas relacionadas con el sida (45). En esta región, la micosis sistémica por *H. capsulatum* se encuentra en la parte superior de la lista de enfermedades que definen el sida y las muertes relacionadas. Sin embargo, la histoplasmosis no está identificada en el algoritmo de

diagnóstico utilizado por una proporción significativa de médicos que se enfrentan a un paciente febril gravemente inmunodeprimido (52).

Por tratarse de una enfermedad que carece de notificación obligatoria, su incidencia real es desconocida, y la ausencia de una prueba de diagnóstico simple, confiable y accesible, ha dificultado por largo tiempo determinar la prevalencia en pacientes infectados por HIV.

El estándar de oro para el diagnóstico es el aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas. La identificación se realiza a través del cultivo en los medios apropiados y con temperaturas de incubación diferenciadas (28 y 37°C) para demostrar su dimorfismo; o bien, mediante microscopía directa de fluidos corporales y tejidos con diferentes tinciones (53). Cuando las manifestaciones mucocutáneas están presentes, el diagnóstico puede realizarse de manera rápida a través del material extraído mediante una escarificación o biopsia de la lesión, y de la observación microscópica de levaduras intramacrófagos coloreadas con Giemsa. En estos casos, la sensibilidad pasa a estar limitada por la calidad de la muestra clínica y el entrenamiento del operador. Por el contrario, si las lesiones en la piel o en las mucosas están ausentes, se puede recurrir a otras herramientas diagnósticas como el hemocultivo por el método de lisis centrifugación, el cual posee una sensibilidad de alrededor de un 70%. En el resto de los casos se requieren investigaciones invasivas, como el lavado broncoalveolar o las biopsias quirúrgicas (54). Desde la perspectiva del laboratorio, el examen directo acelera el diagnóstico, en cambio, el cultivo puede llevar semanas hasta desarrollar y requiere el uso de instalaciones y prácticas correspondientes a un tercer nivel de bioseguridad (55). Por otra parte, aunque la especificidad del método de cultivo es del 100%, la sensibilidad depende de la carga fúngica, la presentación clínica y la posibilidad de una toma de muestra adecuada (56).

Otro desafío que se presenta durante la identificación microscópica, es la morfología de las levaduras de *H. capsulatum* que al ser muy similar a la de otros patógenos pueden llevar a una confusión durante este proceso. En este sentido, la diferenciación con

Leishmania spp. puede ofrecer dificultades, del mismo modo las levaduras del género *Candida*, formas pequeñas e intracelulares de *Paracoccidioides* spp. o *Blastomyces dermatitis* (57) (53).

Existen métodos alternativos de diagnóstico basados en la detección de antígenos y anticuerpos. La determinación de anticuerpos anti-*H. capsulatum* en suero presenta baja sensibilidad, porque dependerá del estado inmunológico del hospedero y del tiempo transcurrido desde el primer contacto con el agente (54). Por lo tanto, en inmunocomprometidos, la detección de los mismos es menos sensible, ya sea por el método de inmunodifusión, contrainmunoelectroforesis o fijación del complemento (58) (59). En cambio, la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA) dirigida a la detección del antígeno glicoproteico de *H. capsulatum* en suero y particularmente en orina, ha demostrado ser la más sensible (60) (52), sobre todo en los casos de histoplasmosis diseminada asociada a pacientes inmunocomprometidos (61).

Dentro de las técnicas descritas, en especial la detección de antígenos en suero y orina, la visualización microscópica de las levaduras características por la coloración de Giemsa en muestras clínicas y la observación histopatológica de *H. capsulatum* en tejidos, son las pruebas de diagnóstico rápido más importantes para la histoplasmosis en pacientes inmunosuprimidos.

En los últimos años se han diseñado métodos moleculares basados en la amplificación de ADN tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*) dirigidas a diferentes genes específicos de *H. capsulatum* (62) (63). Tanto la PCR anidada como la PCR en tiempo real fueron probadas sobre diferentes especímenes clínicos. La aplicación de técnicas moleculares ha generado una herramienta adicional para el diagnóstico rápido de esta micosis. Además, poseen un menor riesgo biológico para el personal de laboratorio y permitiría su implementación en lugares donde las condiciones de bioseguridad no permiten trabajar con aislamientos de *H. capsulatum* (63) (64) (60).

Actualmente el diagnóstico comprobado depende del desarrollo del hongo en el cultivo o en la visualización histopatológica, mientras que un diagnóstico probable se basa en la presencia de una clínica apropiada, una condición predisponente y evidencia micológica, como puede ser la presencia de antigenuria (53).

La detección del antígeno de *H. capsulatum* en orina (AgU), por tratarse de una técnica sensible y rápida, útil en la búsqueda de la histoplasmosis, la posiciona como una técnica complementaria al examen directo, al cultivo y la serología, sobre todo en pacientes HIV positivos que presentan grandes desafíos diagnósticos.

2. Planteamiento del problema y justificación

A pesar de la disponibilidad de la TARV las infecciones oportunistas continúan siendo causa de importante morbilidad y mortalidad (7). Mientras que los mecanismos patogénicos subyacentes de pérdida de células T CD4+ por el HIV han sido ampliamente debatidos, una simple regla sigue siendo válida: cuanto menor sea el número de células T CD4+, mayor será el riesgo de infecciones oportunistas (65). Entre estas infecciones encontramos las dos micosis sistémicas de mayor prevalencia en pacientes con infección avanzada por el HIV. La criptococosis meníngea, infección oportunista tardía que suele observarse cuando el recuento de linfocitos T CD4+ cae por debajo 50-100 células/ μ L (66) y la histoplasmosis, segunda micosis sistémica en frecuencia en la Argentina (67), que generalmente se manifiesta como enfermedad diseminada cuando el recuento de linfocitos T CD4+ es <100 células/ μ L (46).

Ambas micosis son consideradas un importante problema de salud pública, ya que la población frecuentemente afectada es aquella con acceso limitado a servicios de salud, aumentando considerablemente su mortalidad y llegando, en el caso de la criptococosis meníngea, a valores inaceptablemente elevados de alrededor de un 55% (68) (69).

En lo que respecta al diagnóstico de las diferentes infecciones oportunistas, y particularmente las infecciones fúngicas que mencionamos, el examen microscópico y el cultivo continúan siendo actualmente los métodos de referencia. Sin embargo, su sensibilidad es limitada para un diagnóstico rápido, ya que el examen directo depende de la calidad de la muestra y del entrenamiento del observador, y el cultivo necesita varios días de incubación para su desarrollo, por lo tanto no pueden considerarse técnicas de diagnóstico precoz. Estas limitaciones han llevado a desarrollar técnicas alternativas al cultivo basadas en la cuantificación de antígenos, ácidos nucleicos y otros componentes fúngicos (70).

La criptococosis puede diagnosticarse a través de la detección del AgCr en suero, el cual suele ser positivo tanto en la infección meníngea como no meníngea y puede estar

presente semanas o meses antes de la aparición de síntomas (29). Las pruebas basadas en esta metodología son una herramienta de cribado inicial útil en el diagnóstico de criptococosis en pacientes infectados por el HIV, y particularmente cuando la realización de una punción lumbar se retrasa (7).

Con respecto a la histoplasmosis la detección del AgU es un método sensible para el diagnóstico rápido de histoplasmosis diseminada. Durante su evaluación en un ensayo cuantitativo, se detectó antígeno en la orina en un 100% de los pacientes con sida con histoplasmosis diseminada (71) (72).

Los métodos descritos plantean ventajas con respecto a las pruebas serológicas que detectan anticuerpos, ya que estas son menos útiles que los ensayos de antígenos en dichos pacientes (73). La incorporación de nuevas metodologías diagnósticas es necesaria, no sólo para un diagnóstico oportuno de criptococosis e histoplasmosis en pacientes HIV/sida, sino para conocer datos a cerca de prevalencia en personas asintomáticas.

3. Hipótesis

En pacientes con infección por HIV, con carga viral detectable y un recuento de linfocitos T CD4+ <100 células/ μ L, el cribado con pruebas rápidas para criptococosis e histoplasmosis permite identificar casos en forma más temprana, un tratamiento oportuno, reduce el riesgo de SIRS y se asocia a menor mortalidad.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Primario

- Explorar la validez de las pruebas rápidas de diagnóstico para criptococosis e histoplasmosis, en contexto de una estrategia de cribado, en pacientes con infección avanzada por HIV.

4.2. Objetivos Secundarios

- Determinar prevalencia de criptococosis (meníngea y extrameningea) e histoplasmosis diseminada en pacientes con infección por HIV avanzada, en nuestro hospital, en este mismo contexto.
- Establecer costo-beneficio de la implementación de dichas metodologías de diagnóstico rápido.

5. Descripción y diseño del estudio

Estudio prospectivo de cohorte basado en la recolección de diferentes muestras clínicas en pacientes que recibieron atención en el Hospital General de Agudos “Juan A. Fernández”, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, desde el 01 de abril de 2014 hasta el 31 de enero de 2015.

5.1. Población del estudio

Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico confirmado de infección por HIV que presentaban enfermedad en estadio avanzado (≤ 100 CD4/ μ L o estadios clínicos 3-4 de la OMS).

5.2. Criterios de inclusión

El sujeto fue elegido para la participación en el estudio si cumplía con TODOS los siguientes criterios:

1. Edad ≥ 18 años.
2. Infección por HIV documentada.
3. Registro de recuento de CD4 dentro de los 3 meses con un valor ≤ 100 células/ μ L o estadio clínico 3-4 de la OMS (*Anexo 1*).
4. Firma voluntaria del consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética.

5.3. Criterios de exclusión

Los pacientes NO fueron elegibles para participar en este estudio si cumplieron con CUALQUIERA de los siguientes criterios:

1. Edad < 18 años.
2. TARV con carga viral indetectable en los últimos 3 meses.
3. Antecedentes de enfermedad por *H. capsulatum*, y/o *C. neoformans* en el último año.

4. Hallazgos en la historia clínica o examen físico durante la selección que, en opinión del investigador, podría comprometer el resultado del estudio.
5. Imposibilidad para firmar el consentimiento informado.
6. Uso de antimicóticos sistémicos en los últimos 14 días.

5.4. Duración del estudio

La duración total del estudio fue de 10 meses, desde el 1 de abril de 2014 hasta el 31 de enero de 2015.

5.5. Metodología

Todo paciente que cumplió los criterios de inclusión y exclusión fue invitado a participar, se le explicó el estudio y si estaba de acuerdo se le solicitó que firmara el consentimiento informado, posteriormente, se realizaron los siguientes procedimientos:

1. Se recolectó información de la evaluación clínica inicial, incluyendo motivo de consulta, síntomas y signos, datos de laboratorio, TARV, antecedentes de infecciones micóticas y uso de otra medicación de relevancia (ejemplo, trimetoprima-sulfametoxazol o fluconazol), en una ficha prediseñada (*Anexo 2*).
2. Se obtuvieron en el inicio las siguientes muestras:
 - **Sangre para cultivo de hongos:** los hemocultivos se realizaron por la técnica de lisis centrifugación. Se recolectaron 9 ml de sangre en un tubo estéril con 1 ml de una solución de saponina al 0,5% (concentración final) como agente lisante y polianetolsulfonato de sodio como anticoagulante (solución de trabajo: saponina 5 gr, PSS 0,5 gr y 100 ml de solución fisiológica). Técnica: se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm, se sembró el sedimento en 2 tubos de agar Sabouraud y 2 tubos de agar infusión cerebro corazón, ambos medios con cloranfenicol (100 µg/mL). Se incubó un tubo de cada uno a 28°C y 35°C respectivamente, durante 3 semanas.

- **Sangre para estudios serológicos:** se extrajo 5 ml de sangre en un tubo sin ningún anticoagulante. Se centrifugó a 3000 rpm y se separó el suero. Las muestras fueron utilizadas el mismo día de extracción para realizar las diferentes técnicas, o almacenadas a 2-8°C hasta 72hs.

a. **Detección de anticuerpos circulantes de *H. capsulatum*:** se realizó por método de inmunodifusión en agar (ID). Para realizar esta técnica, se preparó el agar fenolizado utilizando los siguientes reactivos:

Agua destilada----- 99,0 ml

Solución buffer de fosfatos*----- 1,0 ml

Cloruro de sodio (NaCl) ----- 0,85 g

Fenol ----- 0,3 ml

Agar purificado----- 1,0 g

Propilenglicol (PEG) 6000----- 1,0 g

*Solución buffer fosfatos pH 7.4

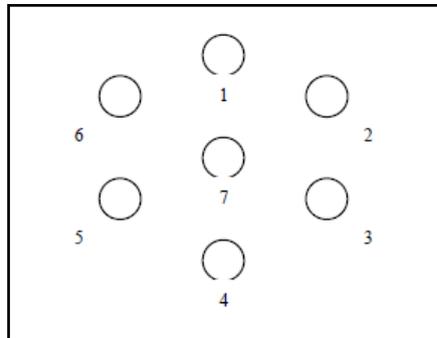
M/15 Na₂HPO₄----- 80,8 ml

M/15 NaH₂PO₄----- 19,2 ml

Al agua destilada se le agregó el NaCl y el fenol; luego el agar y el PEG y se mezclaron durante 5 minutos. Se llevó a baño de agua a 100 °C hasta su disolución completa y se distribuyó en tubos con tapa a rosca con 15 ml del medio. Se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Para la realización de las placas, se fundió el agar de un tubo en baño de agua a ebullición; se dejó enfriar hasta 55-60 °C; se volcó en una placa estéril y se dejó

solidificar. Luego se cortó el agar con perforador de metal de 4 mm de diámetro según el siguiente esquema:



Se retiraron los cilindros del gel con aguja, sin dañar las paredes (para que la difusión fuese pareja y las bandas de precipitación se pudieran interpretar fácilmente). Se enumeraron los hoyos con marcador indeleble como se indicó en el esquema anterior y se llenaron con una pipeta automática, sin sobrepasar el límite del hoyo.

La disposición de los sueros y antígeno en los hoyos fue la siguiente: en 1 y 4 se les colocó suero control positivo de referencia; y en 2, 3, 5 y 6 sueros de distintos pacientes que se ensayaron. Se tapó la placa y se incubó en cámara húmeda por una hora a temperatura ambiente y luego, en el hoyo 7 se colocó el antígeno de referencia. Se mantuvo la placa a temperatura ambiente (entre 24 y 25 °C); a las 72 hs. se cubrió el gel con buffer citrato de sodio**, durante 2-3 hs. para eliminar bandas inespecíficas.

** Solución buffer de citrato-cloruro de sodio pH 8,2: citrato trisódico 5 gr y solución salina isotónica 100 ml. Se mezcló bien hasta la disolución total del citrato, se envasó en un frasco con tapa a rosca y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

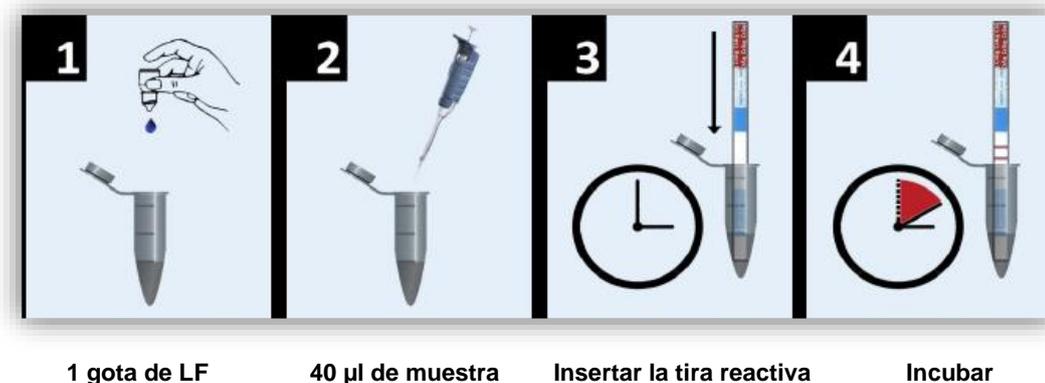
Se realizó la lectura buscando la presencia y el número de arcos de precipitación entre el suero problema y el extracto antigénico. Las líneas de precipitación específica (antígeno-suero control), se utilizaron como patrones de referencia en

cada prueba. La aparición de una o más bandas de identidad por la interacción del suero del paciente con el antígeno constituyó una “reacción positiva” y la ausencia de bandas de precipitación se consideró una “reacción negativa”.

Los antígenos y antisueros fueron provistos por el Servicio Micosis Profundas del Departamento Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI - ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán” (Argentina).

b. Antígeno polisacárido capsular de *Cryptococcus* (AgCr): se realizó la técnica de flujo lateral (LFA) por inmunocromatografía (IMMY®, Inc., Norman, Oklahoma, USA). El procedimiento se llevó a cabo, de acuerdo al esquema I: se agregó una gota del reactivo diluyente LF a un eppendorf (1), se añadió 40 µl de suero del paciente (2); se sumergió la tira reactiva (3) y se esperó 10 minutos (4) a temperatura ambiente.

Esquema I: Realización de la técnica



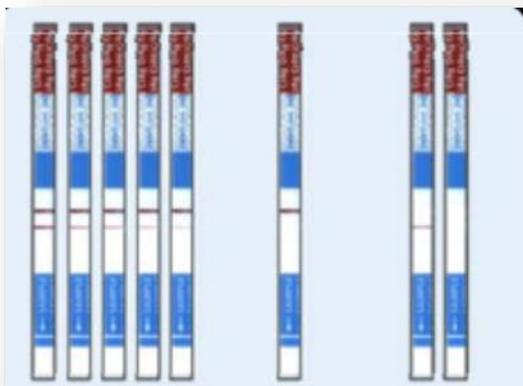
La lectura se realizó de forma visual y se registraron los resultados de acuerdo al esquema II:

-*Positivo:* presencia de dos líneas (control y muestra del paciente), independientemente de la intensidad de línea de la muestra.

-*Negativo:* presencia única de la línea de control.

-*Invalidado*: ausencia de la línea de control. Los resultados no son válidos y debe repetirse la prueba.

Esquema II: lectura de la prueba



Positivo Negativo Invalidado

- **Orina para antígeno de *H. capsulatum* (AgU)**: de cada paciente se tomó una muestra de orina. Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) tipo sándwich (ALPHA *Histoplasma* EIA Test Kit, IMMY®, Inc., Norman, Oklahoma, USA) en microplaca para la detección de antígenos de *H. capsulatum* en muestras de orina. Las muestras de orinas fueron procesadas en equipo automatizado EVOLIS™ TWIN PLUS SYSTEM, BIORAD® según las instrucciones del fabricante.

Reactivos:

- Placa de ELISA con 96 pocillos de poliestireno recubiertos con anticuerpos policlonales anti-*Histoplasma* de conejo (IgG).
- Estándares de antígeno de *Histoplasma*: 100 unidades de ELISA, 30 unidades de ELISA, 10 unidades de ELISA y 2 unidades de ELISA, para realizar la curva estándar.
- Control positivo

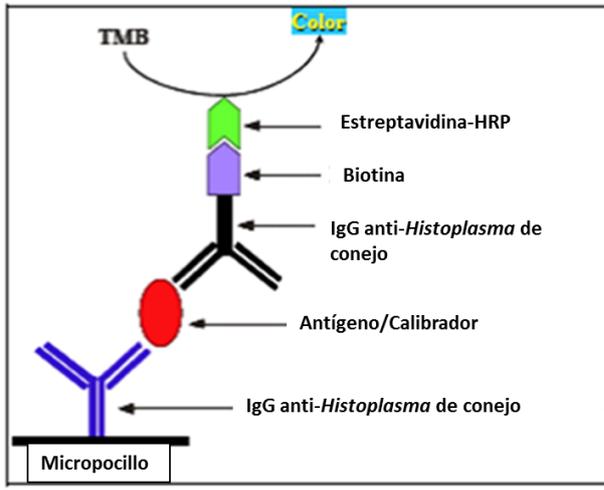
- Control negativo
- Buffer de lavado
- Anticuerpo detector: anticuerpo policlonal anti-*Histoplasma* (IgG) de conejo biotinilado.
- Estreptavidina-HRP: estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP)
- Sustrato: 3,3',5' tetrametilbenzidina (TMB).
- Solución de parada: ácido sulfúrico 2N

Principio biológico

EL ALPHA es un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich en microplaca para la detección de antígeno de *H. capsulatum* en muestras de orina. Los anticuerpos policlonales anti-*Histoplasma* IgG de conejo son utilizados para recubrir los pocillos de las microplacas actuando como anticuerpos de captura; y los anticuerpos policlonales IgG anti-*Histoplasma* de conejo biotinilados, son utilizados para la detección. Las muestras de orina se ensayan sin diluir y sin ningún tratamiento previo. Si la muestra de orina del paciente presenta antígenos de *Histoplasma*, éstos son reconocidos y capturados por los anticuerpos, quedando unidos a los pocillos de la microplaca de ELISA. Después del período de incubación, los pocillos son lavados con el buffer de lavado para eliminar cualquier material que no se haya unido y, posteriormente se agregan los anticuerpos policlonales IgG anti-*Histoplasma* de conejo biotinilados. Se procede a realizar otro lavado para remover aquellos anticuerpos que no se hayan unido.

Para la detección de los antígenos se utilizan los siguientes reactivos: biotina-estreptavidina, TMB y solución de parada. La estreptavidina-HRP se agrega a los pocillos y en presencia de los anticuerpos biotinilados, quedará unida a éstos. Si algún antígeno está presente en el espécimen del paciente, se forma una solución de color azul al añadir el TMB. La reacción es interrumpida con la solución de parada,

observándose la formación de color amarillo en los pocillos. La densidad óptica se determina solo a 450 nm o a 450 nm y 630 nm. Las unidades de ELISA son calculadas utilizando una curva de cuatro parámetros.



Procedimiento:

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente.
2. Adicionar 100 μ L de buffer de lavado a los pocillos (blanco de reacción).
3. Adicionar 100 μ L de cada uno de los estándares de la curva a los pocillos (100 unidades de ELISA 30 unidades de ELISA, 10 unidades de ELISA y 2 unidades de ELISA).
4. Agregar 100 μ L del control positivo y 100 μ L del control negativo a los pocillos.
5. Agregar 100 μ L de las muestras de orina a los pocillos.
6. Mezclar por agitación durante 10-15 segundos.
7. Incubar la placa a 37°C +/- 1 por 60 minutos +/- 5 minutos.
8. Aspirar el contenido de los pocillos.
9. Adicionar 200 μ L de buffer de lavado a los pocillos y aspirar completamente el contenido. Repetir este paso dos veces más.
10. Agregar 100 μ L del anticuerpo detector a los pocillos.
11. Mezclar por agitación durante 10-15 segundos.
12. Incubar la placa a 37°C +/- 1 por 60 minutos +/- 5 minutos.
13. Repetir paso 9.
14. Agregar 100 μ L de estrepavidina-HRP a los pocillos.
15. Mezclar por agitación durante 10-15 segundos.
16. Incubar la placa con agitación a 25°C +/- 3 °C por 30 minutos +/- 2 minutos.
17. Repetir paso 9.
18. Agregar 100 μ L de sustrato TMB a cada pocillo.
19. Mezclar por agitación durante 10-15 segundos.
20. Incubar la placa a temperatura ambiente (22-25°C) por 10 minutos +/- 1 minuto.
21. Adicionar 100 μ L de la solución de parada a cada pocillo.
22. Mezclar por agitación durante 10-15 segundos.
23. Leer a 450 nm o a 450 nm y 630 nm, la lectura debe realizarse dentro de los 15 minutos de finalizado el ensayo.

Resultados:

Los resultados se obtienen utilizando una curva de 4 parámetros y se expresan en unidades de ELISA.

$$EIA\ Value = C \left[\frac{(A - D)}{(Blanked\ OD - D)} - 1 \right]^{(1/B)}$$

Control de calidad – Curva estándar

Standard	Acceptable Blanked OD
100	0.80 ± 0.3 (1.1-0.5)
30	0.40 ± 0.15 (0.55-0.25)
10	0.20 ± 0.1 (0.3-0.1)
2	0.04 ± 0.02 (0.06-0.02)
Positive Control	0.20 ± 0.1 (0.3-0.1)
Negative Control	< 0.02

Interpretación de los resultados:

-*Negativo*: $x < 2.0$ unidades de ELISA.

-*Positivo*: $x \geq 2.0$ unidades de ELISA.

- **Escarificación y/o biopsias cutáneas, de tejidos u órganos:** en caso de lesiones mucocutáneas u otros tejidos/órganos, se extrajo material para el examen microscópico y posterior cultivo.

La toma de muestra de tejido se obtuvo mediante cirugía, biopsia transcutánea o autopsia, aplicando medidas de asepsia. Las piezas de tejidos/biopsias se dividieron en dos partes, una se introdujo en un frasco con formol al 10% para la sección de Anatomía Patológica y otra porción, se colocó en un tubo o frasco estéril con 1 ml. de solución fisiológica o agua estéril (hasta cubrir el material) para el Laboratorio de Microbiología/Micología.

La toma de material por la técnica de escarificación de piel o mucosas, se realizó desinfectando la zona con alcohol 70% o solución de yodo-povidona por 30-60 segundos. Se removieron las costras o secreciones que cubrían la lesión y se raspó con bisturí estéril. Con el material obtenido, se realizaron extendidos sobre

portaobjetos esterilizados para la coloración de Giemsa y se colocó la otra porción de la muestra en solución fisiológica o agua destilada estéril para el cultivo. Las muestras se enviaron rápidamente al laboratorio, y si no se pudieron procesar en el día, se almacenaron en la heladera durante 24-48 hs.

Para el procesamiento de los tejidos/biopsias, se colocó la muestra en una placa de Petri y se seccionó en varios trozos con pinza y bisturí estériles. Se efectuaron improntas para la coloración de Giemsa y examen en fresco. El resto del material se homogenizó en un mortero con solución fisiológica estéril y el material se sembró en tubos de agar Sabouraud miel y agar Infusión de cerebro y corazón. Con las muestras de escarificaciones de piel/mucosas se efectuaron extendidos para la coloración de Giemsa y el resto de la muestra, se sembró en tubos de agar Sabouraud glucosado y agar infusión de cerebro y corazón. Todos los tubos se incubaron a 28 °C y 37 °C, durante 3 a 4 semanas.

- **Se solicitaron estudios de linfocitos T CD4+ y carga viral de HIV.**

Con respecto a la criptococosis, cuando la detección del AgCr en suero fue positiva, se efectuó una punción lumbar para descartar compromiso meníngeo a través de pruebas de tinta china, AgCr y cultivo del LCR (74). La afectación meníngeo se definió cuando uno de los últimos métodos descritos fue positivo. De acuerdo a las recomendaciones internacionales vigentes al momento del estudio, para los países donde no se dispone de 5-flucitosina, los pacientes con criptococosis meníngeo fueron tratados con anfotericina B desoxicolato (0.7 ± 1 mg/kg/día) y fluconazol intravenoso (800 mg/día) con una fase de inducción de 14 días (75) (76). Los pacientes con AgCr positivo sin evidencia de afectación meníngeo o criptococosis diseminada fueron tratados durante el mismo período de tiempo con fluconazol vía oral 800 mg/día de manera ambulatoria (terapia preventiva). En ambos casos, la fase de consolidación se completó con fluconazol 400-800 mg/día, según criterio médico (*Figura 1*).

Se calculó el número necesario a tratar para detectar un paciente con AgCr positivo y se comparó el costo estimado de esta estrategia vs el estándar de cuidado en nuestro centro presente hasta el momento de inicio de este protocolo.

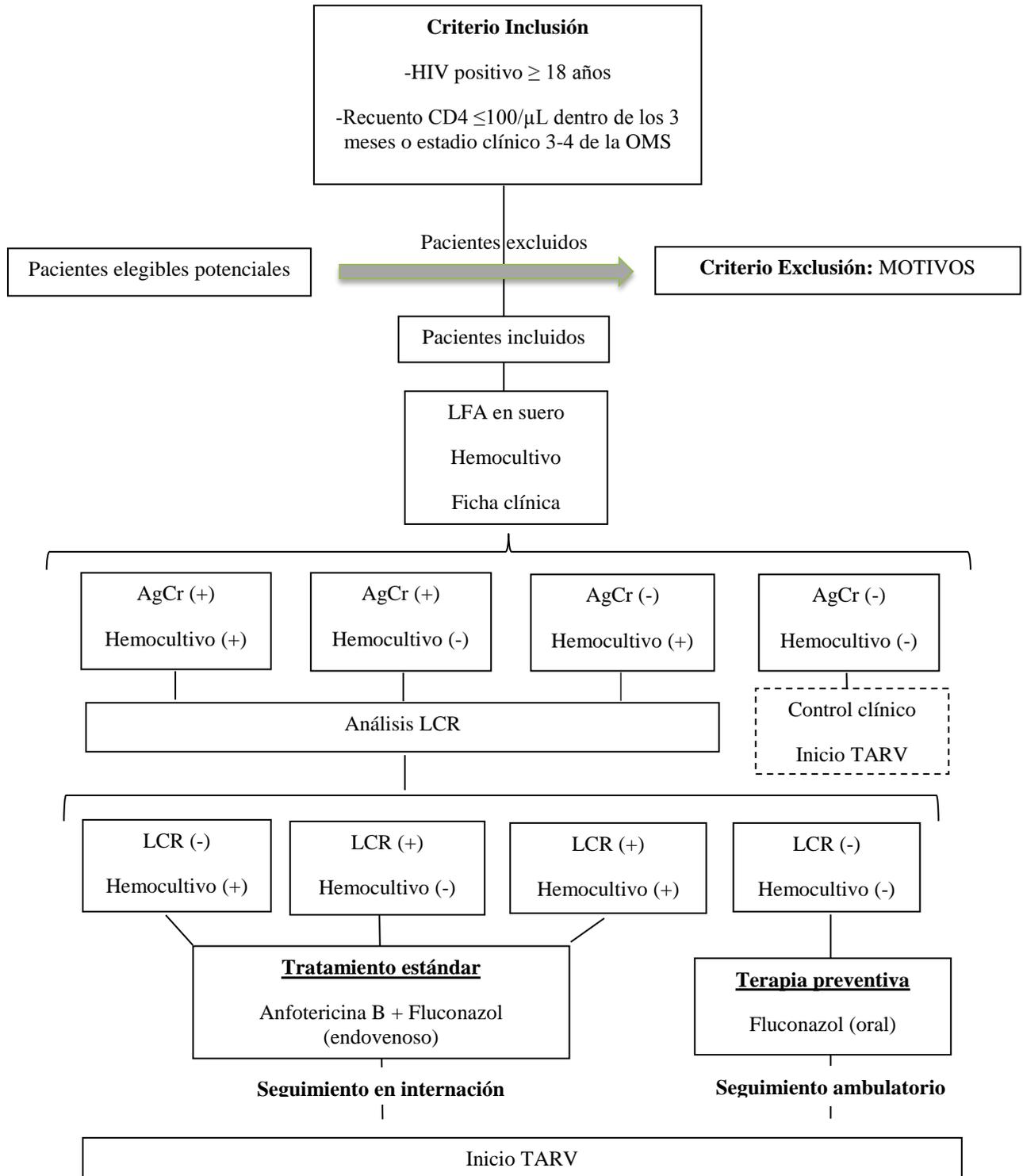
-Escenario habitual (estándar de cuidado en nuestro centro): detección de AgCr dirigida a pacientes con síntomas neurológicos compatibles o con sospecha clínica de meningitis criptocócica.

-Escenario de intervención (incorporación de cribado): detección de AgCr a todos los pacientes con infección avanzada por HIV, independientemente del motivo de consulta o clínica presente.

Los costos del escenario habitual se plantearon de manera hipotética estimando que aquellos pacientes con AgCr positivo identificados por la estrategia de cribado (escenario de intervención), principalmente los asintomáticos, presentarían síntomas de criptococosis dentro del mes siguiente a la detección. Ante la no existencia de esta estrategia hubieran sido identificados ya como casos de criptococosis meníngeas.

La diferencia de costos se planteó en el total de meses que duró este estudio y luego una diferencia anual estimada junto con el porcentaje de disminución de gastos para una lectura más objetiva.

Figura 1: Diagrama de flujo del algoritmo diagnóstico



En el caso de la histoplasmosis se utilizaron los siguientes parámetros para instaurar un tratamiento según criterio médico y guías vigentes.

-Histoplasmosis PROBABLE: paciente con AgU positivo o con evidencia serológicas por inmunodifusión de anticuerpos contra *H. capsulatum* en suero y un cuadro clínico compatible (fiebre, pancitopenia, pérdida de peso, lesiones cutáneas o mucosas, y/o afectación pulmonar).

-Histoplasmosis PROBADA: aislamiento en cultivo de *H. capsulatum* en cualquier muestra biológica proveniente del paciente o visualización de levaduras intracelulares a través de coloraciones especiales (Wright o Giemsa) (77).

El cálculo de prevalencia se estableció de acuerdo al diagnóstico definitivo de histoplasmosis según estas definiciones.

El tratamiento fue instaurado, según gravedad, de acuerdo a las recomendaciones internacionales. Se inició anfotericina B desoxicolato (0.7 ± 1 mg/kg/día) en aquellos casos con enfermedad moderada a grave durante 1 a 2 semanas, seguido de itraconazol oral (200 mg 3 veces al día durante 3 días y luego 200 mg dos veces al día) o itraconazol oral de inicio para aquellos casos con enfermedad leve a moderada (39).

5.6. Análisis estadístico

Se realizó un protocolo inicial para evaluar la prevalencia de estas enfermedades oportunistas en personas con HIV avanzado en el hospital "Juan A. Fernández". Dado que se trataba de un estudio exploratorio no se determinó un tamaño muestral y se estableció enrolar las personas en etapa avanzada que concurrieran al servicio en el período estipulado, con los que se estimó de 100 a 150 participantes. Según estudios en otros países, entre un 2 y 11% de los pacientes con CD4 <100 células/ μ L podían tener AgCr positivo y hasta un 5% de las personas con HIV/sida presentar histoplasmosis (51) por tanto, se estimó la identificación entre 10 y 15 personas con alguna de las dos infecciones micóticas durante este periodo.

Se utilizó estadística descriptiva para resumir las características basales de los participantes, así como las tasas de prevalencia. Se utilizaron métodos paramétricos o no paramétricos dependiendo de la distribución de las variables cuantitativas (T de Student o test de Wilcoxon). Todos los test estadísticos se consideraron significativos si el nivel alfa era menor al 5%. Niveles alfa menores a 10% se los consideró indicativos de tendencias.

Se realizó el cálculo de la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) del método de detección de AgU mediante técnica de ELISA. Estos análisis fueron realizados comparando dicha metodología con el examen microscópico y el cultivo que continúan siendo actualmente los métodos de referencia para el diagnóstico.

5.7. Consideraciones éticas

El protocolo final fue aprobado por el Comité de Ética en investigación del hospital “Juan A. Fernández”. Se documentó en la historia clínica del sujeto que el consentimiento informado se obtuvo previo a la realización de cualquier procedimiento relacionado con el protocolo y se archivó un original del mismo con los documentos del estudio. Un original firmado y fechado en el mismo momento se entregó al participante.

El estudio fue conducido de acuerdo con el protocolo y las normas de buenas prácticas clínicas, aplicando las regulaciones y guías de investigaciones clínicas, y todas las regulaciones locales aplicables (Disposición 6677 del ANMAT y ley 3301 del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires) además de las disposiciones internacionales (Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones; así como también la Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO, del 11 de noviembre de 1997).

6. Resultados

Entre abril de 2014 y enero de 2015 se detectaron 236 candidatos potenciales para la inclusión en este estudio, de los cuales 113 (47.8%) fueron excluidos por las siguientes razones: 43 por presentar carga viral de HIV indetectable, 33 pacientes fueron atendidos por otras áreas del hospital por lo que no fueron alcanzados por el equipo de investigación, 19 pacientes estaban bajo terapia antifúngica y 18 por otras causas menores.

Se incluyeron 123 pacientes con una mediana de tiempo de seguimiento de 9 meses (RIC de 6 ± 12 meses) después de que se tomaron las muestras; de los cuales el 64.2% eran hombres, la media de edad fue de 38 años (DS 9.7) y la mediana de CD4 fue de 46 células/ μ L (RIC 18-85).

En el 27.8% de los pacientes el diagnóstico de HIV se realizó durante el tiempo del estudio. La mayoría (77.2%) no recibía TARV al momento de la inclusión y el resto presentaba mala adherencia o fallo virológico (*Tabla 1*).

Del total de pacientes analizados, 14 (11.4%) fallecieron durante el periodo de estudio. Dentro de las causas identificadas, 5 pacientes presentaron algún tipo de neoplasia asociada al HIV, 2 criptococosis meníngeas, 1 histoplasmosis diseminada, 2 fallas respiratorias y 1 insuficiencia hepática sin etiología, 1 hemorragia digestiva alta masiva y 2 pacientes sin diagnóstico final.

Tabla 1: Características basales de los pacientes incluidos en el estudio, n=123

Género, n (%)	
Hombres	79 (64.2)
Mujeres	38 (30.9)
Mujeres Trans	6 (4.9)
Edad en años, media (DS)	
	38 (9.7)
Tiempo de diagnóstico de HIV desde la inclusión, n (%) (#)	
<1 año	34 (27.8)
1-5 años	20 (16.4)
5-10 años	27 (22.1)
>10 años	41 (33.6)
CD4 en células/μL, mediana (RIC)	
	46 (18-85)
HIV-RNA en copias /mL, mediana (RIC)	
	65.609 (21.943- 156.299)
Sin terapia antirretroviral (TARV), n (%)	
	95 (77.2) (*)

(*) Los pacientes bajo TARV debían tener, según los criterios de inclusión, pobre adherencia o falla virológica.

(#) En 5 pacientes la infección de HIV fue por transmisión vertical.

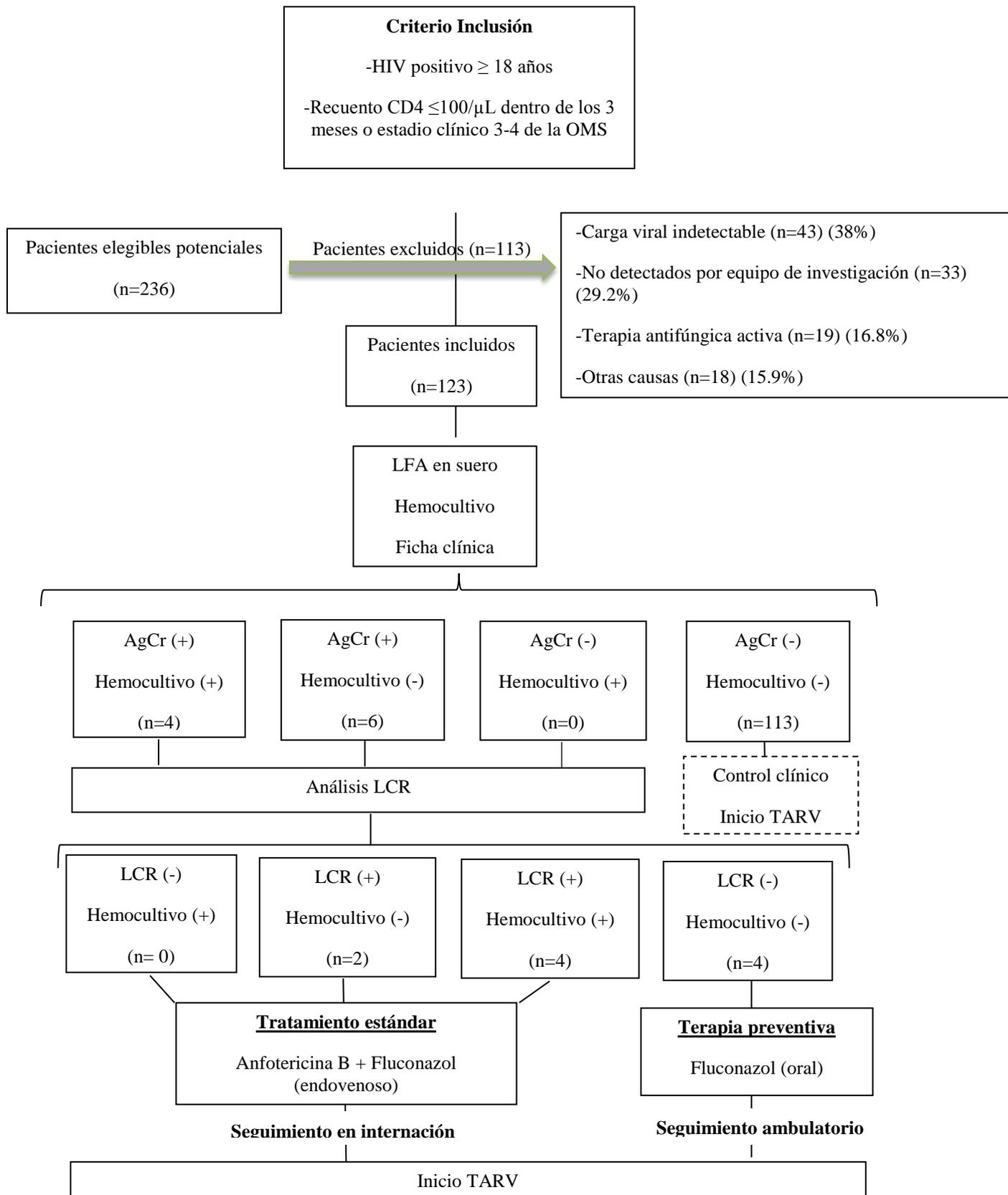
6.1. Criptococosis

Prevalencia de infección por *Cryptococcus spp.*

La prevalencia de infección utilizando la detección del AgCr por LFA fue de 8.1% (n=10, IC95% 3.3±13.0). Ninguno de los casos con AgCr positivo tenía antecedentes de criptococosis. Entre los 10 pacientes positivos para AgCr, 6 tenían compromiso meníngeo detectado a través del análisis del LCR (*Figura 2*), aunque solo 3 de ellos tenían síntomas neurológicos al inicio del estudio. Todos recibieron tratamiento estándar inmediato con anfotericina B desoxicolato y fluconazol intravenoso, según lo detallado previamente. Dos de los 6 pacientes con criptococosis meníngea murieron durante la hospitalización.

Los 4 pacientes restantes con AgCr positivo recibieron tratamiento preventivo dirigido con fluconazol vía oral de manera ambulatoria, estaban libres de enfermedad meníngea y bajo TARV luego de una media de 7 meses de seguimiento. Así mismo, ninguno de los 113 pacientes con AgCr negativo desarrolló enfermedad criptocócica durante este período.

Figura 2: Diagrama de flujo del algoritmo diagnóstico y resultados



Costos de la estrategia

El número necesario a tratar para detectar un AgCr positivo por LFA fue de 12 pacientes.

Los costos de la intervención vs el estándar de cuidado, estimando que aquellos pacientes con AgCr positivo asintomáticos presentaran síntomas de criptococosis dentro del mes siguiente a la detección, se presentan en la *Tabla 2*.

Tabla 2: Costos comparativos entre escenario habitual vs escenario de intervención real (\$)

Escenario Habitual (*) Criptococosis meníngea n= 10		Escenario de Intervención (#) Criptococosis meníngea n= 6 AgCr (+) sin criptococosis meníngea n= 4	
-LFA x 10	\$600	-LFA x 123	\$7.380
-Hemocultivo por lisis x 10	\$50	-Hemocultivo por lisis x 123	\$615
-Anfotericina B deoxicolato EV (x 14 días x 10)	\$80.136	-Anfotericina B deoxicolato EV (x 14 días x 6 pacientes con CM)	\$48.081
-Fluconazol 800mg EV (x 14 días x 10)	\$202.816	-Fluconazol 800mg EV (x 14 días x 6 pacientes con CM)	\$121.690
-Internación en Clínica Médica (x 14 días x 10)	\$227.640	-Fluconazol 800mg VO (x 14 días x 4 pacientes sin CM)	\$5.742
		-Internación en Clínica Médica (x 14 días x 6 pacientes con CM)	\$136.584
Total	\$511.842		\$320.092
Diferencia de costo en 10 meses		-\$191.750	
Diferencia anual estimada		-\$230.100	
Porcentaje de disminución de gastos		37.5%	
(\$) Se incluyen en el análisis únicamente los costos que resultaron diferentes entre ambos escenarios. (*) Detección de AgCr en pacientes con síntomas neurológicos compatibles con meningitis criptocócica. (#) Detección de AgCr a todos los pacientes con IA HIV, independientemente del motivo de consulta.			

6.2. Histoplasmosis

Prevalencia de infección por *Histoplasma capsulatum*

De un total de 123 participantes, 12 presentaron algunas de las pruebas diagnósticas positivas (Tabla 3). Con la metodología habitual (excluyendo AgU) se diagnosticaron 8 casos que fueron considerados como histoplasmosis probada (3 con hemocultivos más examen microscópico, 2 sólo microscopía y 3 sólo hemocultivos). La serología por método de inmunodifusión fue positiva en un sólo paciente.

Tabla 3: Pacientes con pruebas diagnósticas con resultados positivos para histoplasmosis.

PACIENTES/TEST	AgU	HEMOCULTIVO	HISTOPATOLOGÍA	SEROLOGÍA
1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	-
3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	-
4	-	-	POSITIVO	-
5	POSITIVO	-	POSITIVO	-
6	-	POSITIVO	-	-
7	POSITIVO	POSITIVO	-	-
8	-	POSITIVO	-	-
9	POSITIVO	-	-	-
10	POSITIVO	-	-	-
11	POSITIVO	-	-	-
12	POSITIVO	-	-	-

El tratamiento fue instaurado de acuerdo a las recomendaciones internacionales y la gravedad del cuadro. Se inició anfotericina B desoxicolato durante 2 semanas seguido de itraconazol vía oral, en 5 de estos pacientes. Uno de ellos falleció dentro de este periodo inicial, atribuible a la histoplasmosis diseminada. Los 4 restantes completaron tratamiento de consolidación e iniciaron TARV sin complicaciones.

En 2 pacientes se inició el tratamiento con itraconazol vía oral por no presentar enfermedad con parámetros de gravedad y buena tolerancia a esta vía, con manejo ambulatorio, inicio de TARV y buena evolución posterior.

Un paciente no regresó a la consulta luego de haber sido informado del aislamiento en el hemocultivo.

Los 4 casos que presentaban solo resultado positivo al AgU se consideraron como diagnósticos probables de histoplasmosis. De estos, 2 estaban sintomáticos y mejoraron con itraconazol, los 2 restantes se perdieron en el seguimiento y no pudo determinarse su evolución, aunque presentaban clínica compatible.

La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del AgU con sus intervalos de confianza (IC95%) fueron de 63% (29-96), 97% (93-100), 56% (23-88) y 98% (94-100), respectivamente.

La prevalencia considerando solo los casos probados fue de 6.5% (n=8). Al incluir las muestras positivas de AgU como casos de histoplasmosis probable adicionales, la prevalencia aumentó al 9.7% (n=12).

Costos de la estrategia

Debido a que la metodología para realizar la detección del AgU de *H. capsulatum* aún no se encontraba autorizada para su comercialización en nuestro país, al momento de efectuar el análisis del estudio, no se pudo realizar estimaciones de costos de su implementación.

7. Discusión

7.1. Discusión general

Actualmente no existe discusión que las personas que viven con HIV pueden alcanzar el máximo beneficio de la TARV si son diagnosticadas y reciben un tratamiento precoz en el curso de su infección (78). Sin embargo, el diagnóstico tardío sigue siendo un problema en toda América Latina (79). De acuerdo con los resultados mostrados en la *Tabla 1*, una cuarta parte de los individuos descubrieron su infección por HIV durante el tiempo del protocolo, en una etapa ya avanzada de la enfermedad. En el otro extremo, un 33.6% conocía su diagnóstico de HIV hacía más de 10 años y por motivos no identificados en este estudio, no se encontraban bajo TARV y si lo estaban, la misma era de manera irregular o con mala adherencia, justificando el fallo virológico presente. Diferentes factores se vinculan con estos escenarios, pero principalmente el estigma, las barreras administrativas y económicas, determinan, no sólo el diagnóstico tardío, sino la falta de vinculación y retención posterior en la atención (80).

Nuestra muestra estuvo representada es su mayoría por hombres con una media de edad que coincide con los datos generales de la población HIV afectada en Argentina (4). El valor de la mediana de CD4+ fue <50 células/ μ L, lo cual reflejó el gran inmunocompromiso de la población estudiada, y probablemente asociado con el desenlace de los 14 pacientes que fallecieron durante el periodo de seguimiento.

Si bien nuestro estudio estaba dirigido a la búsqueda de histoplasmosis y criptococosis, es importante aclarar que no se identificó co-infección de ambas micosis en un mismo paciente. Por otra parte, es imperioso en el manejo de este tipo de población, instaurar las pautas eficaces de profilaxis primaria y descartar otras infecciones oportunistas concomitantes según las recomendaciones locales (81). Así mismo, iniciar de manera precoz la TARV, ya que disminuye significativamente el riesgo de padecer tanto eventos graves relacionados al HIV/sida como no relacionados, mejorando la supervivencia (82).

7.2. Criptococosis

La tasa de prevalencia del AgCr en pacientes con infección avanzada por HIV fue del 8.1%. La prevalencia general informada en nuestro estudio es similar a la informada por otros autores en Uganda, con una tasa de prevalencia del 8.8% entre los pacientes con un recuento de células CD4+ <100 células/ μ L (37). Sin embargo, al comparar con otros estudios, estos valores son menores que los reportados en Camboya y Sudáfrica entre pacientes con características demográficas similares (83) (30) y son tres veces mayores que las informadas en los Estados Unidos, utilizando los mismos métodos de evaluación (84).

La estrategia de cribado de AgCr en pacientes con infección avanzada por HIV, independientemente de la presencia o no de clínica asociada, proporcionó la detección temprana de 10 casos positivos, incluidos 6 con compromiso meníngeo. Es de destacar que la mitad de los casos de criptococosis meníngeo no presentaban síntomas neurológicos al momento del diagnóstico, y es posible que sin una estrategia de cribado, el mismo se hubiera diferido. El diagnóstico basado en síntomas no es un predictor confiable del compromiso del SNC en la criptococosis (85). En nuestro estudio a través de la realización de una punción lumbar en todos los pacientes con AgCr positivo en suero, se arribó a la criptococosis meníngeo en 3 pacientes asintomáticos, apoyando las recomendaciones latinoamericanas dirigidas a disminuir la mortalidad asociada a esta patología (33). Si hubiéramos realizado AgCr solo en los participantes que presentaban fiebre o cefalea, podríamos haber omitido el 50% del diagnóstico.

Además, el bajo número necesario para detectar un caso positivo favorece el uso rutinario de AgCr entre pacientes HIV positivo con infección avanzada. Este número fue similar al reportado en un estudio observacional llevado a cabo en Uganda entre pacientes infectados por el HIV con TARV, con un recuento de células T CD4+ <100 células/ μ L (37).

Diferentes estudios han reportado el valor diagnóstico del LFA en la detección de AgCr. Un artículo publicado hace pocos años demuestra que esta metodología realizada en suero y en LCR es altamente predictiva de criptococosis entre los pacientes con riesgo de desarrollarla (86).

Por otra parte, la presencia de AgCr positivo de manera asintomática es un factor de riesgo reconocido para el desarrollo del SIRS (87) y de la criptococosis asociada con la TARV, ya que los pacientes con antigenemia no tratada tienen más probabilidades de desarrollar una criptococosis clínica (35).

Aunque la estrategia de detección utilizada en nuestro estudio no se ha evaluado formalmente en América Latina, los datos epidemiológicos sugieren su posible beneficio y ahorro de costos como los detallados en los resultados (33).

Confirmamos la utilidad clínica del LFA para el diagnóstico rápido de la criptococosis y su uso potencial como prueba en el punto de atención. Aunque el examen microscópico y el cultivo siguen siendo esenciales para el diagnóstico de esta infección, su sensibilidad es limitada. La prueba de tinta china depende de la calidad y cantidad de la muestra así como de la capacitación del observador. Los cultivos requieren varios días de incubación para su desarrollo, por lo que su uso como técnicas de diagnóstico precoz no es práctico (70). El LFA es una prueba ideal para el punto de atención, ya que puede ser realizada por personal con una mínima capacitación, sin equipamiento de alta complejidad y con solo una gota de fluido corporal, sin requerir refrigeración (88).

El diagnóstico temprano de la criptococosis meníngea da lugar a una reducción de las muertes relacionadas a la misma, ya que los pacientes que reciben tratamiento antifúngico temprano tienen mejores resultados que los que reciben tratamiento diferido (29). Los pacientes con AgCr positivo sin afectación meníngea ni enfermedad diseminada que recibieron terapia preventiva con fluconazol oral, no solo evitaron la progresión de su enfermedad, sino también la hospitalización y administración de fármacos intravenosos, con la correspondiente reducción de costos. Solo cuatro pacientes fueron positivos para AgCr, sin evidencia de compromiso pulmonar,

diseminación o afectación meníngea, que no presentaron enfermedad con terapia preventiva en el período de seguimiento. Diferentes estudios apoyan la implementación de la detección y el tratamiento rutinario de la antigenemia criptocócica asintomática entre individuos que inician TARV, que muestran una reducción de la mortalidad (37) (89) (90).

La alta prevalencia en nuestro estudio no solo respalda las pautas de la OMS (76) (31) sino que permitió la incorporación de la detección de AgCr de rutina entre pacientes con HIV avanzado, en las recomendaciones locales, durante el proceso de difusión de estos resultados en congresos académicos (81).

7.3. Histoplasmosis

A pesar de los avances en la terapéutica disponible para las personas que viven con HIV, la histoplasmosis se encuentra aún en el listado de las micosis endémicas con mayor frecuencia en América Latina, con un importante impacto en la salud pública. En general, se ha informado que su presentación diseminada ocurre en un 2-5% de los pacientes con HIV/sida de áreas endémicas (69) y en entornos con recursos limitados la mortalidad asociada puede variar entre un 13-48% (91). En nuestros resultados durante el período estudiado se diagnosticaron 8 casos de histoplasmosis probada en pacientes con infección avanzada por HIV, determinando una prevalencia de 6.5%. La misma fue superior a los estudios regionales referidos con anterioridad y similar a lo reportado en Colombia (92).

Si bien el diagnóstico de la histoplasmosis se realiza por medio de diversas técnicas tradicionales, como el cultivo en medios especiales, las biopsias y los exámenes directos con diferentes coloraciones, el mismo también puede realizarse por métodos inmunológicos que detectan anticuerpos o antígenos específicos. Sin embargo, en presencia de inmunodeficiencia franca por HIV, los valores de sensibilidad de estos métodos pueden ser muy variables, y es necesario la combinación de herramientas diagnósticas (91) (55). Como se mencionó en los resultados de nuestro estudio, la serología con búsqueda de anticuerpos por método de inmunodifusión fue positiva en un sólo paciente, lo que demuestra su uso limitado en pacientes con inmunosupresión celular, ya que presentan una respuesta deficiente (49). En un estudio de más de 10 años de vigencia, ya se planteaba la necesidad de un método de diagnóstico más rápido y sensible, como la búsqueda de antígeno de *Histoplasma* a través de la prueba de AgU (48). La mayor experiencia de la utilización de esta metodología se obtuvo precisamente en pacientes con HIV/sida con histoplasmosis diseminada y alta carga fúngica, donde la detección del AgU fue del 95% de los pacientes (49).

Al incorporar la detección del AgU como parte del algoritmo diagnóstico en pacientes HIV positivos en estadio avanzado de su infección en nuestro hospital, se obtuvieron 4 casos adicionales de histoplasmosis probable, incrementando la prevalencia a un 9.7%. Si bien en estos 4 pacientes solo se detectó un resultado positivo para AgU y no se obtuvo el aislamiento del *H. capsulatum* en ningún otro rescate, las reacciones falsas positivas reportadas en la literatura, no coincidían con la epidemiología ni la clínica predominante con la que se manifestaron estos pacientes (58) (49).

El aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de histoplasmosis (53). Siguiendo esta línea se utilizó el examen microscópico y el cultivo como comparador para realizar los cálculos de sensibilidad y especificidad de la detección del AgU, cuyos valores fueron un 63% y un 97%, respectivamente.

Los informes en los Estados Unidos que utilizaron la misma metodología para la detección del antígeno de *Histoplasma* en muestras urinarias, reportaron una sensibilidad variable entre 44-71% (93). En este contexto los resultados obtenidos en nuestro estudio evidenciaron una sensibilidad acorde con estos resultados con un porcentaje aceptable comparado con el resto de las metodologías disponibles en la práctica diaria. Sin embargo, en otro estudio del mismo país utilizando un ELISA de tercera generación, la sensibilidad en muestras de orina de pacientes con HIV/sida e histoplasmosis diseminada fue del 100% (71). Por otra parte en la experiencia realizada en Guatemala con un ELISA policlonal, como el utilizado en nuestro estudio, demostró una sensibilidad del 81% y una especificidad del 95% en la detección del antígeno de *H. capsulatum* en la orina (94).

En comparación con los Estados Unidos nuestra sensibilidad fue menor y, si bien la población HIV en estadios avanzados comparte muchas características con poblaciones de diferentes orígenes, esa disparidad puede estar dada por motivos inherentes a los aislamientos de *H. capsulatum*. En este sentido se ha asociado como un posible

determinante a los diferentes perfiles genéticos de los aislamientos descritos en América Latina en comparación con los Estados Unidos (61). Se ha postulado incluso que estas disparidades genéticas podrían ser responsables de las manifestaciones clínicas diferenciadas entre ambas regiones (45). Sin embargo, se desconoce si las diferencias genéticas en aislamientos latinoamericanos afectan realmente la sensibilidad en el diagnóstico por medio de la detección de AgU. Para confirmar esta hipótesis son necesarios estudios con metodología que incorpore la producción local de antígenos.

Con respecto a los dos casos con histoplasmosis probada pero con prueba de AgU negativa descrita en los resultados (*Tabla 3*), al tratarse de una población gravemente inmunosuprimida, es probable que hayan recibido otros fármacos. Si bien los pacientes que estaban bajo tratamiento antifúngico fueron excluidos del estudio, no se puede descartar la interferencia de otros medicamentos en los resultados falsos negativos obtenidos (95).

En nuestro estudio, al incluir en el diagnóstico final tanto las histoplasmosis probables como las probadas, la detección del AgU de *H. capsulatum* aumentó en un 50% su diagnóstico en una población altamente susceptible para esta patología. Si bien esta metodología ha demostrado tener elevada sensibilidad no se encuentra disponible en la mayoría de los países latinoamericanos (96). Conocer resultados alentadores a nivel local permitirá planificar estrategias para incorporar esta metodología a la práctica habitual. Por otra parte, aunque no fue objetivo de estudio en este trabajo, otra ventaja importante en la detección de AgU es su capacidad para monitorear la respuesta terapéutica de un paciente. La cuantificación expresada en un nivel por debajo de la detección se correlaciona con una respuesta exitosa, mientras que se ha observado un aumento posterior en aquellos pacientes con mala evolución (95) (97).

Como se detalló en la metodología de este estudio, se utilizó para la detección del AgU de *Histoplasma* un ELISA con anticuerpo policlonal, sin embargo en la actualidad se ha

desarrollado una metodología basada en anticuerpos monoclonales que impresiona ser más sensible incluso en suero (49). En un estudio publicado por Cáceres *D. et al.* utilizando esta metodología con la prueba comercial cuantitativa, la sensibilidad fue del 98% y la especificidad fue del 97% con un punto de corte de 0.5 ng/ml. (96).

Los métodos de laboratorios disponibles en los países con escasos recursos, en particular en nuestra región, a menudo requieren de varias semanas para el crecimiento del hongo, lo cual los aleja de permitir un diagnóstico oportuno. Incluso muchas veces se arriba al mismo cuando el paciente ya presentó un desenlace fatal.

Aunque el análisis de costo de la incorporación de esta metodología no pudo realizarse por no estar comercializada al momento del estudio, la implementación de un método rápido y simple para detectar la infección por *H. capsulatum*, sin duda que impacta en la morbi-mortalidad y con ello la reducción en los gastos hospitalarios asociados. Por otra parte, contar con una herramienta confiable y accesible para el diagnóstico, permite determinar la carga real de histoplasmosis diseminada en pacientes infectados por HIV en nuestro país y gran parte de Sudamérica.

7.4. Limitaciones del estudio

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Aproximadamente el 30% de los sujetos que podían haber sido elegibles no fueron abordados. Estas oportunidades de detección perdidas pueden haber resultado en una estimación baja de la tasa de prevalencia real tanto de la criptococosis como de la histoplasmosis en pacientes HIV positivos con enfermedad avanzada.

Otra limitación del estudio incluye el tamaño muestral relativamente pequeño. Sin embargo, este es el primer protocolo en Argentina, según nuestro conocimiento, que describe la prevalencia de la criptococosis en el contexto de una estrategia de cribado, independientemente de las manifestaciones clínicas, y la utilización de AgU para diagnóstico precoz de histoplasmosis en el mismo escenario.

7.5. Financiación

Este trabajo fue apoyado por la Fundación Florencio Fiorini, a través del otorgamiento de una beca de investigación correspondiente al año 2014 (<http://www.fff.org.ar>). Por otra parte los kit diagnóstico para histoplasmosis a través de la detección del AgU por medio de un ELISA policlonal fue suministrado como parte de una donación del laboratorio IMMY[®], de Norman, Oklahoma, Estados Unidos.

Los financiadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

8. Conclusiones:

Ambas metodologías basadas en la detección de antígenos son una estrategia eficaz en nuestro medio para mejorar el diagnóstico y posterior tratamiento oportuno de la criptococosis y la histoplasmosis en población HIV positiva, justificando su implementación. La detección rutinaria del AgCr por LFA en suero a todos los pacientes con infección avanzada por HIV proporcionó un diagnóstico rápido con una prevalencia elevada (8.1%). Así mismo, la presencia del AgCr en pacientes sin enfermedad diseminada, pero con terapia antifúngica preventiva, evitó un potencial compromiso meníngeo. Esta intervención de cribado fue menos costosa que el estándar de cuidado actual en nuestro centro. Por su parte, la detección del AgU aumentó en un 50% el diagnóstico de histoplasmosis (prevalencia de 9.7%) considerando casos probables y probados, en el contexto de una población altamente susceptible. Sin embargo no pudo determinarse el costo-beneficio de su implementación.

Por lo tanto, este estudio valida las recomendaciones de la OMS de solicitar el AgCr en toda persona HIV positiva sin TARV efectiva y un recuento de linfocitos T CD4+ menor a 100 células/ μ L, y adiciona la necesidad de realizar el AgU para diagnóstico de histoplasmosis en la misma población. En nuestro país, donde el acceso a la TARV está universalmente disponible, pero los diagnósticos de HIV aún están retrasados, el desarrollo de pruebas rápidas, sensibles y específicas, permiten un diagnóstico y tratamiento tempranos de ambas patologías. Por consiguiente, una menor carga fúngica y en una reducción de la mortalidad en población HIV de riesgo.

9. Bibliografía

1. Mukolo A, Villegas R, Aliyu M, Wallston KA. Predictors of Late Presentation for HIV Diagnosis: A Literature Review and Suggested Way Forward. *AIDS Behav.* 2013;17(1):5–30. doi: 10.1007/s10461-011-0097-6.
2. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis Pneumonia -- Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981 Jun 5;30(21):250-2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6265753>.
3. Kigozi IM, Dobkin LM, Martin JN, Geng EH, Muyindike W, Emenyonu NI, et al. Late disease stage at presentation to an HIV clinic in the era of free antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;52(2):280. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181ab6eab.
4. Dirección de Sida y ETS. Boletín sobre el VIH, sida e ITS en la Argentina. Buenos Aires, Argentina. 2017. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001070cnt-2018-03_boletin-epidemio-vih-sida.pdf.
5. Moreira AL, Fronteira I, Augusto GF, Martins MRO. Unmatched Case-Control Study on Late Presentation of HIV Infection in Santiago, Cape Verde (2004–2011). *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(3):320. doi: 10.3390/ijerph13030320.
6. Simon V, Ho DD, Karim QA. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet.* 2006;368(9534):489–504. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69157-5.
7. Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. 2018 Disponible en: http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf.

8. Warnock DW. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Jpn J Med Mycol.* 2007;48(1):1–12.
9. Marques SA, Robles AM, Tortorano AM, Tuculet M., Negróni R, Mendes RP. Mycoses associated with AIDS in the Third World. *Med Mycol.* 2000;38:269–79.
10. French MA. Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome : A Reappraisal. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):101–7. doi: 10.1086/595006.
11. Hidrón A, González Á. Síndrome inflamatorio de reconstitución inmune en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana y afecciones fúngicas. *Infectio.* 2012;16:51–8. doi: 10.1016/S0123-9392(12)70027-9.
12. Shelburne SA, Montes M, Hamill RJ. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:167–70. doi: 10.1093/jac/dki444.
13. Hirsch HH, Kaufmann G, Sendi P, Battegay M. Immune Reconstitution in HIV-Infected Patients. *Clin Infect Dis.* 2004;38(8):1159–66. doi: 10.1086/383034.
14. Lehloenya R, Meintjes G. Dermatologic Manifestations of the Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. *Dermatol Clin.* 2006;24:549–70. doi: 10.1016/j.det.2006.06.007.
15. Longley N, Harrison T, Jarvis J. Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(1):26–34. doi: 10.1097/QCO.0b013e32835c21d1.
16. Meya DB, Manabe YC, Boulware DR, Janoff EN. The Immunopathogenesis of Cryptococcal Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome: Understanding a Conundrum. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(1):10–22. doi: 10.1097/QCO.0000000000000224.
17. Reyes-Corcho A, Bouza-Jiménez Y. Síndrome de reconstitución inmunológica asociado al virus de la inmunodeficiencia humana y sida . Estado del arte. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(2):110–21. doi: 10.1016/j.eimc.2009.03.007.
18. Müller M, Wandel S, Colebunders R, Attia S, Furrer H, Egger M. Immune

- Reconstitution Inflammatory Syndrome in Patients Starting Antiretroviral Therapy for HIV Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(4):251–61. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70026-8.
19. Hagen F, Lumbsch HT, Arsic Arsenijevich V, Badali H, Bertout S, Billmyre RB, et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. *mSphere.* 2017;2:e00238-17. doi: 10.1128/mSphere.00238-17.
 20. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4:a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760.
 21. Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin.* 2004; 72(1):99-118. doi: 10.1093/bmb/ldh043.
 22. Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclère A, Dromer F. *Cryptococcus neoformans* Host Adaptation: Toward Biological Evidence of Dormancy. *mBio.* 2015;6(2):e02580-14. doi: 10.1128/mBio.02580-14.
 23. Jarvis JN, Meintjes G, Williams A, Brown Y, Crede T, Harrison TS. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. *BMC Infect Dis.* 2010;10:67. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/67>.
 24. Mazza M, Davel GO, Taverna CG, Refojo N, Canteros CE, Bueno NS, et al. Contribution of the National Mycology Laboratory Network to Surveillance of Cryptococcosis in Argentina. *Curr Fungal Infect Rep.* 2017;11:209. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12281-017-0301-x>.
 25. Williamson PR, Jarvis JN, Panackal AA, Fisher MC, Molloy SF, Loyse A, et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2017. 13(1):13-24. doi: 10.1038/nrneurol.2016.167.
 26. Subramanian S, Mathai D. Clinical manifestations and management of

- cryptococcal infection. *J Postgrad Med.* 2005;51(S1):21-6. Disponible en: <http://www.jpgmonline.com/text.asp?2005/51/5/21/19810>.
27. Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, et al. Determinants of Mortality in a Combined Cohort of 501 Patients With HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: Implications for Improving Outcomes. *Clin Infect Dis.* 2014;58(5):736–45. doi: 10.1093/cid/cit794.
 28. Jarvis JN, Percival A, Bauman S, Pelfrey J, Meintjes G, Williams GN, et al. Evaluation of a Novel Point-of-Care Cryptococcal Antigen Test on Serum, Plasma, and Urine From Patients With HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. *Clin Infect Dis.* 2011;53(10):1019–23. doi: 10.1093/cid/cir613.
 29. French N, Gray K, Watera C, Nakiyingi J, Lugada E, Moore M, et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS.* 2002;16(7):1031–8. doi: 10.1097/00002030-200205030-00009.
 30. Jarvis JN, Lawn SD, Vogt M, Bangani N, Wood R, Harrison TS. Screening for Cryptococcal Antigenemia in Patients Accessing an Antiretroviral Treatment Program in South Africa. *Clin Infect Dis.* 2009;48(7):856–62. doi: 10.1086/597262.
 31. Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children, March 2018. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260399>.
 32. Lahuerta M, Wu Y, Hoffman S, Elul B, Gorrell Kulkarni S, Remien RH, et al. Advanced HIV Disease at Entry into HIV Care and Initiation of Antiretroviral Therapy During 2006 – 2011: Findings From Four Sub-Saharan African Countries. *Clin Infect Dis.* 2014;58(3):432–41. doi: 10.1093/cid/cit724.
 33. Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(3):353–62. doi: 10.1016/j.bjid.2012.10.020.
 34. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al.

- Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):873-881. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
35. Haddow LJ, Colebunders R, Meintjes G, Lawn SD, Elliott JH, Manabe YC, et al. Cryptococcal Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in HIV-1–infected individuals: Literature Review and Proposed Clinical Case Definitions. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(11):791–802. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70170-5.
 36. Boulware DR, Meya DB, Muzoora C, Rolfes MA, Huppler Hullsiek K, Musubire A, et al. Timing of Antiretroviral Therapy after Diagnosis of Cryptococcal Meningitis. *N Engl J Med.* 2014;370(26):2487–98. doi: 10.1056/NEJMoa1312884.
 37. Meya DB, Manabe YC, Castelnuovo B, Cook BA, Elbireer AM, Kambugu A, et al. Cost- effectiveness of serum cryptococcal antigen screening to prevent death among HIV- infected persons with CD4 + cell count ≤ 100 cells/ μ L who start HIV therapy in resource-limited settings. *Clin Infect Dis.* 2010;51(4):448-55. doi: 10.1086/655143.
 38. López CE. Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38(4):235–42. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016794012>.
 39. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2007;45(7):807–25. doi: 10.1086/521259.
 40. Negroni R. Clinical spectrum and treatment of classic histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000;17: 159-67.
 41. Fernández Andreu CCM, Illnait Zaragoza MT, Martínez Machín G, Perurena Lancha MR, Monroy Vaca E. Una actualización acerca de histoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(3):189–205.
 42. Woods JP. Knocking on the right door and making a comfortable home:

- Histoplasma capsulatum intracellular pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(4):327–31. doi: 10.1016/s1369-5274(03)00080-8.
43. Medoff G, Kobayashi GS, Painter A, Travis S. Morphogenesis and Pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 1987;55(6):1355–8.
 44. Negroni R. Histoplasmosis. En: Cecchini E, Gonzalez Ayala S, editores. *Infectologia y Enfermedades Infecciosas*. Ediciones Journal. 2008. Pp. 472–6.
 45. Negroni R. Histoplasmosis en América Latina. *Biomédica.* 2011;31(3):301–4. Disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.597>.
 46. Couppe P, Sobesky M, Aznar C, Bichat S, Clyti E, Bissuel F, et al. Histoplasmosis and Acquired Immunodeficiency Syndrome: A Study of Prognostic Factors. *Clin Infect Dis.* 2004;38(1):134–8. doi: 10.1086/379770.
 47. Centers for Disease Control. Revision of the CDC Surveillance Case Definition for Acquired Immunodeficiency Syndrome. *MMWR.* 1987;36 (suppl 1S). Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/other/mmsu3601.pdf>.
 48. Gutierrez ME, Canton A, Sosa N, Puga E, Talavera L. Disseminated Histoplasmosis in Patients with AIDS in Panama: A Review of 104 Cases. *Clin Infect Dis.* 2005;40(8):1199–202. doi: 10.1086/428842.
 49. Kauffman CA. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):115–32. doi: 10.1128/CMR.00027-06.
 50. Frola C, Bermejo V, Spadaccini L, Guelfand L, Pérez H. Impacto de la histoplasmosis diseminada en pacientes HIV positivos. *Actual en sida e Infectol.* 2013;21(80):1–5.
 51. Mora DJ, dos Santos TC, Silva-Vergara ML. Disseminated histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome patients in Uberaba, MG, Brazil. *Mycoses.* 2008;51(2):136–40. doi: 10.1111/j.1439-0507.2007.01459.x.
 52. Nacher M, Adenis A, Mc Donald S, Do Socorro Mendonca Gomes M, Singh S, Lopes Lima I, et al. Disseminated Histoplasmosis in HIV-Infected Patients in South America: A Neglected Killer Continues on Its Rampage. *PLoS Negl Trop*

- Dis. 2013;7(11):e2319. doi: 10.1371/journal.pntd.0002319.
53. Azar MM, Hage CA. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1612–20. doi: 10.1128/JCM.02430-16.
 54. Negroni R. Micosis sistémicas tropicales asociadas al sida. *Enf Emerg.* 2003;5(1):27–40.
 55. Muñoz CO, Cano LE, González A. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio.* 2010;14(S2):S145–58.
 56. Unis G, Barroso da Silva V, Severo LC. Histoplasmosis disseminada e SIDA . Importância do meio de cultivo para o espécime clínico-broncoscópico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37(3):234–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000300008>.
 57. Guimarães AJ, de Cerqueira MD, Nosanchuk JD. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. *Front Microbiol.* 2011;2:225. doi: 10.3389/fmicb.2011.00225.
 58. Wheat LJ. Improvements in diagnosis of histoplasmosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(11):1207–21. doi: 10.1517/14712598.6.11.1207.
 59. Canteros CE, Rivas MC, Soria M, Lee W, Perrota D, Rodero L, et al. Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: Estudio multicéntrico en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2004;36:68–74.
 60. Toranzo AI, Tiraboschi IN, Fernández N, Ibarra-Camaou B, Rivas MC, Lee W, et al. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera. *Rev Argent Microbiol.* 2009;41:20–6. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v41n1/v41n1a04.pdf>.
 61. Gutierrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat LJ. Detection of *Histoplasma capsulatum* Antigen in Panamanian Patients with Disseminated Histoplasmosis and AIDS. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(4):681–3. doi:

10.1128/CVI.00358-07.

62. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of Two Nested PCR Assays for Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in Human Tissue. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1644–7. doi: 10.1128/jcm.40.5.1644-1647.2002.
63. Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, et al. Validation and Clinical Application of a Molecular Method for Identification of *Histoplasma capsulatum* in Human Specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(1):62–7. doi: 10.1128/CVI.00332-09.
64. Simon S, Veron V, Boukhari R, Blanchet D, Aznar C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66(3):268–73. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.010.
65. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev.* 2013;254(1):54–64. doi: 10.1111/imr.12066.
66. Antinori S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *ISRN AIDS.* 2013: 471363. doi: 10.1155/2013/471363.
67. Negroni R, Arechavala AI, Maiolo EI. Histoplasmosis clásica en pacientes inmunocomprometidos. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2010;38(2):59–69.
68. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS.* 2009;23(4):525–30. doi: 10.1097/QAD.0b013e328322ffac.
69. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011;49(8):785–98. doi: 10.3109/13693786.2011.577821.
70. Ayats J, Martín-Manzuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad

- fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(1):39.e1–15. doi: 10.1016/j.eimc.2010.08.005.
71. Connolly PA, Durkin MM, LeMonte AM, Hackett EJ, Wheat LJ. Detection of *Histoplasma* Antigen by a Quantitative Enzyme Immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(12):1587–91. doi: 10.1128/CVI.00071-07.
 72. Theel ES, Jespersen DJ, Harring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of *Histoplasma capsulatum* Antigen from Urine Specimens. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3555–9. doi: 10.1128/JCM.01868-13.
 73. Tobón AM, Agudelo CA, Rosero DS, Ochoa JE, De Bedout C, Zuluaga A, et al. Disseminated histoplasmosis: a comparative study between patients with acquired immunodeficiency syndrome and non-human immunodeficiency virus – infected individuals. *Am J Trop Hyg*. 2005;73(3):576–82.
 74. Kozel TR, Bauman SK. CrAg Lateral Flow Assay for Cryptococcosis. *Expert Opin Med Diagn*. 2012;6(3):245–51. doi: 10.1517/17530059.2012.681300.
 75. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):291-322. doi: 10.1086/649858.
 76. World Health Organization. Rapid Advice: Diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. 2011. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502979_eng.pdf.
 77. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813–21. doi: 10.1086/588660.

78. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493–505. doi: 10.1056/NEJMoa1105243.
79. Crabtree-Ramírez B, Caro-Vega Y, Shepherd BE, Wehbe F, Cesar C, Cortés C, et al. Cross-Sectional Analysis of Late HAART Initiation in Latin America and the Caribbean: Late Testers and Late Presenters. *PLoS One.* 2011;6(5):e20272. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020272>.
80. Piñeirúa A, Sierra-Madero J, Cahn P, Guevara Palmero RN, Martínez Buitrago E, Young B, et al. The HIV care continuum in Latin America: challenges and opportunities. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(07):833–9. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00108-5.
81. Sociedad Argentina de Infectología. Recomendaciones sobre el Manejo de Infecciones Oportunistas en Pacientes con Infección por HIV. Buenos Aires, Argentina. 2016. Disponible en: <https://www.sadi.org.ar/guias-recomendaciones-y-consensos/item/392-recomendaciones-sobre-el-manejo-de-infecciones-oportunistas-en-pacientes-con-infeccion-por-hiv>.
82. Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med.* 2015;373(9):795–807. doi: 10.1056/NEJMoa1506816.
83. Micol R, Lortholary O, Sar B, Laureillard D, Ngeth C, Dousset JP, et al. Prevalence, Determinants of Positivity, and Clinical Utility of Cryptococcal Antigenemia in Cambodian HIV-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(5):555–9. doi: 10.1097/QAI.0b013e31811ed32c.
84. McKenney J, Bauman S, Neary B, Detels R, French A, Margolick J, et al. Prevalence, Correlates, and Outcomes of Cryptococcal Antigen Positivity Among Patients with AIDS, United States, 1986-2012. *Clin Infect Dis.* 2015;60(6):959–65. doi: 10.1093/cid/ciu937.
85. Williams DA, Kiiza T, Kwizera R, Kiggundu R, Velamakanni S, Meya DB, et al.

- Evaluation of Fingerstick Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay in HIV-Infected Persons: A Diagnostic Accuracy Study. *Clin Infect Dis*. 2015;61(3):464–7. doi: 10.1093/cid/civ263.
86. Huang HR, Fan LC, Rajbanshi B, Xu JF. Evaluation of a New Cryptococcal Antigen Lateral Flow Immunoassay in Serum, Cerebrospinal Fluid and Urine for the Diagnosis of Cryptococcosis: A Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127117. doi: 10.1371/journal.pone.0127117.
87. Lawn SD, Meintjes G. Pathogenesis and prevention of immune reconstitution disease during antiretroviral therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(4):415–30. doi: 10.1586/eri.11.21.
88. Rajasingham R, Meya DB, Boulware DR. Integrating Cryptococcal Antigen Screening and Preemptive Treatment into Routine HIV care. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;59(5):85–91. doi: 10.1097/QAI.0b013e31824c837e.
89. Pongsai P, Atamasirikul K, Sungkanuparph S. The role of serum cryptococcal antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. *J Infect*. 2010;60(6):474–7. doi: 10.1016/j.jinf.2010.03.015.
90. Butler EK, Boulware DR, Bohjanen PR, Meya DB. Long Term 5-Year Survival of Persons with Cryptococcal Meningitis or Asymptomatic Subclinical Antigenemia in Uganda. *PLoS One*. 2012;7(12):e51291. doi: 10.1371/journal.pone.0051291.
91. Cáceres DH, Gómez BL, Restrepo Á, Tobón ÁM. Histoplasmosis y sida: factores de riesgo clínicos y de laboratorio asociados al pronóstico de la enfermedad. *Infectio*. 2012;16(S3):44–50. doi: 10.1016/S0123-9392(12)70026-7.
92. Velásquez Uribe G, Rueda ZV, Vélez LA, Aguirre DC, Gómez-Arias RD. Histoplasmosis en pacientes con sida. Un estudio de cohorte en Medellín, Colombia. *Infectio*. 2010;14(S2):S99–106. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a02.pdf>.
93. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY

- ALPHA Histoplasma Antigen Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Histoplasmosis Marked by Antigenuria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(6):802–3. doi: 10.1128/CVI.00035-07.
94. Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Reed Y, et al. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect *Histoplasma capsulatum* Antigenuria in Immunocompromised Patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(6):852–8. doi: 10.1128/CVI.00066-09.
95. Wheat LJ, Connolly P, Haddad N, Le Monte A, Brizendine E, Hafner R. Antigen Clearance during Treatment of Disseminated Histoplasmosis with Itraconazole versus Fluconazole in Patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):248–50. doi: 10.1128/aac.46.1.248-250.2002.
96. Cáceres DH, Samayoa BE, Medina NG, Tobón AM, Guzmán BJ, Mercado D, et al. Multicenter Validation of Commercial Antigenuria Reagents To Diagnose Progressive Disseminated Histoplasmosis in People Living with HIV / AIDS in Two Latin American Countries. *J Clin Microbiol.* 2018;56(6):e01959–17. doi: 10.1128/JCM.01959-17.
97. Hage CA, Kirsch EJ, Stump TE, Kauffman CA, Goldman M, Connolly P, et al. *Histoplasma* Antigen Clearance during Treatment of Histoplasmosis in Patients with AIDS Determined by a Quantitative Antigen Enzyme Immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(4):661–6. doi: 10.1128/CVI.00389-10.

10. Anexos

10.1. Determinación de estadio clínico de la infección por HIV de la OMS

Estadio clínico 1
Asintomática
Linfadenopatía persistente generalizada
Estadio clínico 2
Pérdida moderada de peso sin explicación (menos del 10% del peso corporal presumido o medido) (1)
Infecciones recurrentes de las vías respiratorias (sinusitis, otitis media, amigdalitis, faringitis)
Herpes zoster
Queilitis angular
Ulceraciones bucales recurrentes
Erupciones pruríticas papulares
Dermatitis seborreica
Infecciones fúngicas ungueales
Estadio clínico 3
Pérdida grave de peso de causa desconocida (más del 10% del peso corporal presumido o medido)
Diarrea crónica de origen desconocido durante más de un mes
Fiebre persistente de causa desconocida (intermitente o constante durante más de un mes)
Candiasis oral persistente
Leucoplasia vellosa oral
Tuberculosis pulmonar
Infecciones bacterianas graves (como neumonía, empiema, piomiositis, infección en huesos o articulaciones, meningitis, bacteriemia)
Estomatitis aguda necrotizante, gingivitis o periodonitis
Anemia sin explicación (menos de 8 g/dl), neutropenia (menos de $0.5 \times 10^9/l$) y/o trombocitopenia crónica (menos de $50 \times 10^9/l$)

Estadio clínico 4
Síndrome de consunción del VIH
Neumonía por Pneumocystis
Neumonía bacteriana grave recurrente
Infección crónica de herpes simplex (orolabial, genital o anorrectal de más de un mes de duración o visceral en cualquier lugar)
Candiasis esofágica (o candidiasis de la tráquea, los bronquios o los pulmones)
Tuberculosis extra pulmonar
Sarcoma de Kaposi
Infección por citomegalovirus (retinitis o infección de otros órganos)
Toxoplasmosis del Sistema Nervioso Central
Encefalopatía por VIH
Criptococosis extrapulmonar, incluida la meningitis
Infección diseminada por micobacteria no tuberculosa
Leucoencefalopatía multifocal progresiva
Criptosporidiasis crónica
Isosporiasis crónica
Micosis sistémica (histoplasmosis extrapulmonar, coccidioidomicosis)
Septicemia recurrente (incluida la <i>Salmonella</i> no tifoidea)
Linfoma (cerebral o de células B no- Hodgkin)
Carcinoma cervical invasivo
Leishmaniasis atípica diseminada
Neuropatía sintomática asociada al VIH o cardiomiopatía asociada al VIH

Fuente: Adaptación del texto “Antiretroviral therapy for HIV infection in Adults and Adolescent. Word Health Organizations”. Revisión 2006

10.2. Ficha para valoración inicial

Ficha para valoración clínica y laboratorio inicial

UTILIDAD DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO EN HISTOPLASMOSIS Y CRIPTOCOCOSIS EN PACIENTES CON INFECCIÓN AVANZADA POR HIV

EVALUACIÓN INICIAL

Fecha visita inicial: .../.../... Código del paciente:.....

Edad:..... DNI:.....

Ocupación:..... Diagnóstico de VIH:.....

CD4 últimos: Fecha:..... CV última:..... Fecha:.....

Antecedentes de infecciones oportunistas: NO..... SI.....

Cuáles?.....

TARV: NO..... SI..... Fecha de inicio del último esquema:.....

Profilaxis con TMS trisemanal: NO..... SI..... Desde que fecha?.....

Profilaxis con Fluconazol: NO..... SI..... Desde que fecha?.....

Otra medicación en los últimos 14 días? NO..... SI.....

Cuál?.....

Motivo de consulta:

Síntomas y signos de ingreso:

Fiebre	Déficit neurológico	Disnea	Adenomegalias
Cefalea	Convulsiones	Tos	Hepatomegalia
Fotofobia	Náuseas/Vómitos	Diarrea	Esplenomegalia
Rigidez de nuca	Lesiones cutáneas	Dolor abdominal	Pérdida peso
Deterioro sensorio	Hiperpigmentación	Astenia	Otro:

Laboratorio de ingreso:

GB	Hto	BT	Cr	Glu	TP
Neu%	Hb	TGO	Ur	Col	KPTT
Lin%	Plaq	TGP	Na	Alb	LDH
Eos%	VSG	FAL	K	Prot	

Radiografía de tórax (descripción):.....

10.3. Trabajos científicos

Esta línea de trabajo permitió realizar cuatro presentaciones en congresos nacionales e internacionales, una publicación en una revista internacional y además propició la incorporación de la estrategia de cribado para antigenemia de *Cryptococcus* spp. en pacientes HIV positivos en la guía nacional de la Sociedad Argentina de Infectología en su edición del 2016:

10.3.1. Modalidad POSTER

- UTILITY OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTS *HISTOPLASMA CAPSULATUM* ANTIGENURIA LIKE SCREENING IN PATIENTS WITH HIV/AIDS. Presentado en “HIV Drug Therapy Congress in the Americas”. Ciudad de México, México. Abril de 2015.

UTILITY OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTS *HISTOPLASMA CAPSULATUM* ANTIGENURIA LIKE SCREENING IN PATIENTS WITH HIV/AIDS

FROLA C¹⁻³, SUED O³, STRAMINSKY F², GUELFAND L², PÉREZ H¹, CAHN P³

1- Hospital Juan A Fernández, Infectious Disease Service, Buenos Aires, Argentina

2- Hospital Juan A Fernández, Microbiology Laboratory, Buenos Aires, Argentina

3- Fundación Huésped, Buenos Aires, Argentina

Background: Histoplasmosis is the second most frequently diagnosed systemic fungal infection in Argentina. Among people living with HIV (PLWH) and low CD4 counts (i.e. <100 cells/mm³) it presents as a disseminated disease. Microscopic examination and culture remain today as the reference methods for diagnosis. However, their sensitivity is limited and culture might take some weeks. In this context the detection of urinary antigen (UAg) for *Histoplasma capsulatum* might represent an important advance for the diagnosis. The goal of our study was to explore the aggregated value of the routine detection of UAg among HIV patients with advanced infection, without ART or failing the current regimen.

Methods: Between April and December 2014, PLWH with ≤ 100 CD4/ μ L on follow-up in a major public HIV center in Buenos Aires, Argentina, underwent routine screening of UAg through of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, IMMY). A cutoff of 0.5 units was considered positive for histoplasmosis. In addition, lysis-centrifugation fungal blood culture and antibodies detection using immunodiffusion were performed. For patients with skin lesions direct examination and culture was also performed.

Results: In total, 114 patients were included: 63.1% were male, the majority was currently off ART (78.9%) and the median CD4 count was 44 cells/ μ L (IQR 18-81). With the standard algorithm 7 patients were diagnosed as having histoplasmosis (3 had positive blood culture plus histopathological diagnosis, 2 had only histopathological diagnosis while the other 2 had only blood culture diagnosis). Only 1 sample had positive serology. Four additional patients were identified with UAg positive. Two of them were symptomatic and improved with itraconazole, the remaining two were lost to follow up. When we included UAg positive samples as cases the prevalence of histoplasmosis increased from 6.1% to 9.6%. Sensitivity, specificity, VPP and VPN were 71%, 96%, 63% and 98%, respectively.

Conclusions: UAg increased the diagnosis rate of histoplasmosis and has higher sensitivity than other serological tests based on antibodies. These preliminary findings suggest that screening for histoplasmosis infection among PLWH and advanced disease in our setting might be an effective strategy to improve clinical care of PLWH.

10.3.2. Modalidad PRESENTACION ORAL

- PREVALENCIA DEL ANTÍGENO DE *CRYPTOCOCCUS* Y VALORACIÓN DE SU DETECCIÓN COMO MÉTODO DE TAMIZAJE EN PACIENTES CON INFECCIÓN AVANZADA POR HIV. Presentado en el “XVII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología”. Quito, Ecuador. Mayo de 2015.

PREVALENCIA DEL ANTÍGENO DE *CRYPTOCOCCUS* Y VALORACIÓN DE SU DETECCIÓN COMO MÉTODO DE TAMIZAJE EN PACIENTES CON INFECCIÓN AVANZADA POR HIV

Autores: Frola C, Guelfand L, Socias E, Sued O, Pérez H, Cahn P

Introducción: La mortalidad por criptococosis meníngea (CM) en personas HIV positivas (PVVS), a pesar del tratamiento antifúngico adecuado, sigue siendo alta. La detección del antígeno del *Cryptococcus* en suero (CrAg) entre las PVVS con infección avanzada y el tratamiento antifúngico preventivo para las que resultan positivas, podría prevenir muchos casos de CM. Sin embargo, en la región esta práctica no es habitual.

Objetivos: Evaluar la prevalencia del CrAg en PVVS con infección avanzada y determinar el valor de su implementación como tamizaje.

Métodos: Se realizó detección del CrAg por técnica de flujo lateral (LFA) a PVVS con CD4 ≤ 100 cél/ μ l o estadios clínicos 3-4 de la OMS que consultaron en un hospital público de Buenos Aires, Argentina, entre abril y diciembre de 2014. A los casos positivos se le realizó punción lumbar para descartar CM.

Resultados: De 114 pacientes incluidos, la prevalencia utilizando LFA como cribado fue del 8.8% (10 pacientes). En 4 de ellos se descartó CM y se inició tratamiento preventivo con fluconazol vía oral, con evolución favorable. Hombres 5/10. Edad, media: 38 años (DS 12.9). Mediana de CD4: 38 cél/ μ l (RIC 14-170). En 9/10 no estaban bajo terapia antirretroviral, el restante presentaba fallo virológico.

Conclusiones: La prevalencia de positividad del CrAg en esta muestra fue alta. El diagnóstico precoz del CrAg permitió un tratamiento rápido y prevención de la morbi-mortalidad, así como la hospitalización innecesaria. Estos resultados preliminares sugieren que el cribado con LFA en PVVS con enfermedad avanzada en nuestro medio, podría ser una estrategia eficaz.

- ANTIGENURIA PARA *HISTOPLASMA CAPSULATUM* COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON INFECCIÓN AVANZADA POR HIV. Presentado en el “XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología”. Buenos Aires, Argentina. Mayo de 2015.

Trabajos libres

3. Infección por HIV y otros retrovirus

{ABS}-338

ANTIGENURIA PARA HISTOPLASMA CAPSULATUM COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON INFECCIÓN AVANZADA POR HIV

C. Frola¹, F. Straminsky¹, L. Guelfand¹, S. Kaufman¹, P. Cahn², O. Sued², H. Pérez¹

¹Hospital Fernández, ²Fundación Huésped, Buenos Aires, Argentina

PREFERENCIA DE PRESENTACIÓN: Presentación oral

Opción a premio: 1. No deseo aplicar para premio

Introducción: En personas viviendo con HIV (PVHIV) la histoplasmosis es la segunda micosis sistémica en frecuencia en la Argentina, después de la criptococosis. En nuestro país se reportó una prevalencia de histoplasmosis en PVHIV entre 5,3 y 6%, siendo diseminada en aquellas con bajo recuento de células CD4 (<100 cél/μL). El examen microscópico y los cultivos continúan siendo los métodos de referencia para el diagnóstico, aunque estos últimos suelen demorar semanas hasta su resultado y ambos presentan una sensibilidad limitada. En este escenario, la detección del antígeno en orina (UAg) de *Histoplasma capsulatum* podría representar un avance importante para el diagnóstico.

Objetivo: Explorar el valor agregado de la detección rutinaria de UAg en PVHIV con enfermedad avanzada, sin tratamiento antirretroviral estable.

Materiales y Métodos: Entre abril de 2014 y enero de 2015, se realizó la detección del UAg mediante ensayo inmunoenzimático de captura (ELISA, IMMY) en todas las PVHIV con ≤ 100 CD4/μL o estadio clínico III/IV de la OMS, sin tratamiento antirretroviral o en falla virológica, que aceptaron participar en el estudio. Se consideró positivo para histoplasmosis un punto de corte de 0.5 unidades. Simultáneamente se realizaron hemocultivos por técnica de lisis-centrifugación y detección de anticuerpos en suero por inmunodifusión. En caso de lesiones muco-cutáneas se realizaron examen microscópico y cultivos de tejidos.

Resultados: Se incluyeron 123 pacientes: hombres, 64,2%; mujeres, 31%; mujeres trans 4,8%; media de edad, 38 años (DS 9,7) y mediana de CD4, 46 cél/μL (RIC 18-85). Con la metodología habitual se diagnosticaron 7 casos de histoplasmosis (3 con hemocultivos más examen microscópico, 2 sólo microscopía y 2 sólo hemocultivos). La serología fue positiva en un sólo paciente. Los 4 casos positivos sólo al UAg se consideraron diagnósticos adicionales. De estos, 2 estaban sintomáticos y mejoraron con itraconazol, los 2 restantes se perdieron en el seguimiento. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron de 77%, 96%, 63% y 98%, respectivamente. Al incluir las muestras positivas de UAg como casos de histoplasmosis, la incidencia aumentó del 5,7% al 8,9%.

Conclusiones: La detección del UAg aumentó en un 57% el diagnóstico de histoplasmosis. Estos resultados preliminares sugieren que dicha metodología podría ser una estrategia eficaz en nuestro medio para mejorar el diagnóstico y posterior tratamiento oportuno en esta población.

- DETECCIÓN RUTINARIA EN SUERO DE ANTÍGENO CRIPTOCÓCCICO COMO ESTRATEGIA DE PREVENCIÓN DE CRIPTOCOCOSIS MENÍNGEA ASOCIADA AL HIV/SIDA. Presentado en el “XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología”. Buenos Aires, Argentina. Mayo de 2015.

Trabajos libres

3. Infección por HIV y otros retrovirus

{ABS}-320

DETECCIÓN RUTINARIA EN SUERO DE ANTÍGENO CRIPTOCÓCCICO COMO ESTRATEGIA DE PREVENCIÓN DE CRIPTOCOCOSIS MENÍNGEA ASOCIADA AL HIV/SIDA

C. Frola¹, L. Guelfand¹, S. Kaufman¹, G. Blugerman¹, P. Cahn², O. Sued², H. Pérez¹

¹Hospital Fernández, ²Fundación Huésped, Buenos Aires, Argentina

PREFERENCIA DE PRESENTACIÓN: Presentación oral

Opción a premio: 2. Deseo aplicar para premio

Presentación Previa: No Hubo Presentación Previa

Lugar donde se realizó el trabajo: Hospital Fernández, Ciudad Autónoma De Buenos Aires, 1425.

Introducción: La criptococosis meníngea (CM) es una infección fúngica grave, potencialmente mortal sin tratamiento (tto) entre los pacientes con infección avanzada por HIV (IAHIV). En los infectados es posible detectar el antígeno criptocóccico (AgCr) en suero en promedio 22 días antes de los síntomas, como manifestación de enfermedad extrapulmonar, según estudios en animales. La prueba inmunocromatográfica de flujo lateral (LFA) IMMY posee una sensibilidad de 100% para detectar AgCr en LCR y suero comparada con el cultivo.

Objetivo: Estimar utilidad y costo de implementar la detección rutinaria de AgCr en suero en pacientes con IAHIV y tto preventivo de los casos positivos en comparación con el estándar de cuidado.

Materiales y Métodos: Entre abril de 2014 y enero de 2015, se solicitó AgCr LFA en suero a pacientes adultos con IAHIV (≤ 100 CD4/ μ L o estadio clínico III/IV de la OMS) y sin tto antirretroviral estable que accedieron a participar en el estudio. Si el AgCr fue (+) se realizó punción lumbar para descartar CM. Las CM recibieron tto estándar con anfotericina B deoxicolato y fluconazol (FCZ) endovenoso con una inducción de 14 días. Los pacientes con AgCr (+) sin afección meníngea la recibieron por vía oral con FCZ en forma ambulatoria. Se calculó el número necesario a tratar (NNT) para detectar un paciente con AgCr (+) y se comparó el costo estimado de esta estrategia vs el estándar de cuidado en nuestro centro.

Resultados: De 123 pacientes incluidos: hombres, 64,2%; media de edad, 38 años (DS 9,7) y mediana de CD4, 46 cél/ μ L (RIC 18-85). El diagnóstico de HIV se realizó durante el tiempo del estudio en el 27,6%. La prevalencia de infección criptocóccica utilizando el AgCr por LFA fue de 8,1% (n=10), similar a la reportada. Considerando sólo pacientes sintomáticos se hubiera estimado una prevalencia de 4,8% (n=6). Todos los pacientes tratados con FCZ oral (n=4) se encontraron libres de CM luego de una media de 7 meses de seguimiento. Dos de los 6 pacientes con CM murieron durante el tto por enfermedad criptocóccica diseminada. El NNT para detectar un AgCr (+) por LFA fue de 12 pacientes. Los costos de la intervención vs el estándar de cuidado, estimando que aquellos pacientes con AgCr (+) asintomáticos presentarían síntomas de CM dentro del mes siguiente a la detección, se presentan en la Tabla.

Escenario Habitual (LFA en pacientes con cuadro clínico compatible con CM, n= 10/123)	Escenario Intervención (LFA a todos los pacientes con IAHIV, n= 123, CM= 6, AgCr (+) sin CM= 4)
LFA x 10:\$600	LFA x 123:\$7.380
Hemocultivo x 10:\$50	Hemocultivo x 123:\$615
Anfotericina B EV x 14 días x 10:\$80.136	Anfotericina B EV x 14 días x 6 CM:\$48.081
FCZ 800mg EV x 14 días x 10:\$202.816	FCZ 800mg EV x 14 días x 6 CM:\$121.690
Internación x 14 días x 10: \$227.640	FCZ 800mg VO x 14 días x 4 sin CM:\$5.742
	Internación x 14 días x 6 CM:\$136.584
Total:\$511.842	\$320.092

Diferencia anual estimada:-\$230.100

Conclusiones: La detección rutinaria de AgCr en suero a todos los pacientes con IAHIV y tto a aquellos con AgCr (+) demostró ser útil para diagnosticar tempranamente la criptococosis diseminada y sustancialmente menos costosa que el estándar de cuidado actual en nuestro centro.

10.3.3. Modalidad PUBLICACIÓN

- Frola C, Guelfand L, Blugerman G, Szyld E, Kaufman S, Cahn P, et al. (2017) Prevalence of cryptococcal infection among advanced HIV patients in Argentina using lateral flow immunoassay. PLoS ONE 12(6): e0178721.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178721>



RESEARCH ARTICLE

Prevalence of cryptococcal infection among advanced HIV patients in Argentina using lateral flow immunoassay

Claudia Frola^{1,2*}, Liliana Guelfand³, Gabriela Blugerman¹, Edgardo Szyld^{2,4}, Sara Kaufman³, Pedro Cahn², Omar Sued², Héctor Pérez¹

1 Service of Infectious Diseases, Juan A. Fernández Hospital, Buenos Aires, Argentina, **2** Clinical Research Department, Fundación Huesped, Buenos Aires, Argentina, **3** Microbiology Laboratory, Juan A. Fernández Hospital, Buenos Aires, Argentina, **4** Oklahoma University Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma, United States of America

* claudia.frola@huesped.org.ar



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Frola C, Guelfand L, Blugerman G, Szyld E, Kaufman S, Cahn P, et al. (2017) Prevalence of cryptococcal infection among advanced HIV patients in Argentina using lateral flow immunoassay. PLoS ONE 12(6): e0178721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178721>

Editor: Guy AM Berbers, RIVM, NETHERLANDS

Received: December 18, 2016

Accepted: May 17, 2017

Published: June 15, 2017

Copyright: © 2017 Frola et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The minimal underlying data set necessary for replication of our study is available within the paper and its Supporting Information file.

Funding: This work is supported by Fundacion Florencio Fiorini grant year 2014 (<http://www.fff.org.ar>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: Co-author Omar Sued is a PLOS ONE Editorial Board member. However, this

Background

Globally, Latin America ranks third among regions with most cases of AIDS related cryptococcal meningitis. In 2009, a lateral flow immunoassay (LFA) for the detection of cryptococcal antigen (CrAg) was developed as a potential point-of-care test for diagnosis of cryptococcal infection. In 2011 World Health Organizations recommended on CrAg screening for HIV positive persons with CD4 below 100 cells/ μ L, followed by preemptive fluconazole treatment. However, in Argentina no formal recommendations for CrAg screening have been issued.

Methods

HIV positive patients \geq 18 years with advanced immunosuppression (CD4 counts \leq 100 cells/ μ L within 3 months or WHO stage III/IV), who visited the hospital between April 1, 2014 and January 31, 2015, were included. The LFA was performed according to the manufacturer's instructions on all serum samples. When CrAg detection was positive, a lumbar puncture was performed to rule out cryptococcal meningitis. Patients without evidence of meningeal involvement were treated with preemptive oral fluconazole in ambulatory care.

Results

We included 123 patients. Prevalence of CrAg-positivity was 8.1%. Among the 10 CrAg-positive patients, 6 had meningeal involvement detected through the CSF analysis (CSF India-ink testing, CSF CrAg and culture). The remaining 4 patients with positive CrAg received targeted preemptive treatment with oral fluconazole and were free of cryptococcal disease during the follow-up period. None of the 113 patients with a negative CrAg test result developed cryptococcal disease.

does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Conclusions

This is the first study in Argentina, to our knowledge, describing the prevalence of cryptococcosis and usefulness of CrAg screening. LFA provided early diagnosis to determine a high prevalence of CrAg in our hospital, and that screening for subclinical infection with preemptive antifungal treatment, prevented a substantial proportion of meningeal disease.

Introduction

Globally, Latin America ranks third among regions with the most cases of AIDS related cryptococcal meningitis (CM) [1].

The HIV epidemic is currently stable in Argentina, with an estimated 126,000 infected people of which, 30% are unaware of their serostatus. The most recent epidemiological report showed changes in the distribution of new cases with a trend toward an increase of delayed diagnosis and the risk for subsequent opportunistic infections [2].

High fungal burden and altered mental status are the most important drivers of acute cryptococcal-related mortality, events that often occur in patients with late diagnosis [3,4]. The diagnosis of CM is usually made by lumbar puncture and India-ink testing of cerebrospinal fluid (CSF). However, the presenting symptoms of headache and fever are nonspecific, and lumbar puncture is often deferred until the disease progressed, resulting in worsening prognosis [5]. In 2009, a lateral flow immunoassay (LFA) for the detection of cryptococcal antigen (CrAg) was developed by IMMY (Immuno-Mycologics, Inc., OK, USA) as a potential point-of-care test for diagnosis of cryptococcal infection. This test is stable at room temperature (20–25°C), has a rapid turnaround time, requires very little technical skills and can be performed with minimal laboratory infrastructure. Its sensitivity is almost 100% with both serum and CSF samples [6].

The use of preemptive therapy in asymptomatic cases with positive antigenemia is not well defined, but international recommendation suggest its use based on expert opinion [7]. In 2011 World Health Organizations (WHO) recommended on CrAg screening for HIV positive persons with CD4 below 100 cells/ μL , followed by preemptive fluconazole treatment in settings with high prevalence [8]. However, in Argentina no formal recommendations for CrAg screening have been issued.

CM management require complex treatments and usually prolonged hospitalizations, representing a significant increase in health costs. Treatment of asymptomatic or latent cryptococcal infection with oral fluconazole is a much less expensive and highly available option compared to standard-of-care for meningitis [5,9].

Our hypothesis is that routine serological testing would allow early detection of asymptomatic infected subjects. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of routine CrAg screening in patients with advanced HIV infection and to assess the benefits of preemptive treatment for the positive cases.

Materials and methods

Ethics statement

This study was approved by the institutional ethics committee of Juan A. Fernandez Hospital.

Participants and study design

This prospective cohort study was conducted at Juan A. Fernandez Hospital, one of the main referral centers for HIV care in Buenos Aires City, Argentina with 3,951 HIV positive patients in active follow-up. After obtaining written informed consent, blood samples were drawn from eligible patients who visited the hospital between April 1, 2014 and January 31, 2015.

Included subjects were HIV positive, at least 18 years of age and presenting with advanced immunosuppression (CD4 counts ≤ 100 cells/ μ L within 3 months or WHO stage III/IV). We excluded patients with undetectable viral load within the previous 3 months, those with a diagnosis of cryptococcal disease within the previous year, or those receiving antifungal treatment within the last 14 days.

The following variables were collected from medical records and/or patient interviews and recorded on a case report form and transcribed to an Excel[®] spreadsheet: age, gender, time of HIV diagnosis at enrolment, CD4 cell count, highly active antiretroviral therapy (HAART) status, viral load, WHO clinical stage, previous opportunistic infection, current or previous medication and current neurologic symptoms (e.g., headache, suspected meningitis). Clinical information of those patients with cryptococcosis was also collected with regard to site of cryptococcal infection (i.e. meningeal vs extra-meningeal), type of specimen, whether samples were collected at diagnosis or follow-up and when post-diagnosis follow-up occurred.

Subjects were tested as outlined in Fig 1. The blood samples were centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm and the LFA was performed according to the manufacturer's instructions on all serum samples [10]. Additionally, 10 ml of blood was collected in a sterile syringe with heparin and 9 ml was aseptically transferred in a lysis centrifugation tube, containing 1 ml of 0.5% saponin. The tube was gently agitated to mix the contents with the inoculated blood, and was centrifuged to 3,000 rpm for 30 minutes. Pathogen identification of isolates from positive blood cultures was performed using standard microbiology methods (morphological and biochemical tests).

When serum CrAg detection was positive, a lumbar puncture was performed to rule out CM through India-ink testing on the CSF, CSF CrAg and culture [10]. Meningeal involvement was defined when one of the latter described methods was positive. Following current recommendations for countries where flucytosine is unavailable, patients with CM were treated with amphotericin B deoxycholate (0.7–1 mg/kg/day) and intravenous fluconazole (800 mg/day) with an induction phase of 14 days [7,8]. CrAg positive patients without evidence of meningeal involvement or disseminated cryptococcosis were treated for the same period of time with oral fluconazole 800 mg/day in ambulatory care. In both cases, the consolidation phase was completed with fluconazole 400–800 mg/day.

Statistical analysis

Since this was an exploratory study, sample size was not determined in advance, and subject enrollment was set to include all eligible patients seen within a 10 month period, resulting in an estimated recruitment of 150 participants based on foreign and local studies [11–15]. Descriptive statistics were used to summarize the baseline characteristics of participants and prevalence rates. Categorical variables were described with n (%) and quantitative variables with mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR) as appropriate. Parametric or non-parametric methods were used depending on the distribution of quantitative variables (Student's *t*-test or Mann-Whitney-Wilcoxon test). For categorical variables Chi squared or Fisher exact test was used, whichever was more appropriate. All statistical tests were considered significant if the alpha level was lower than 5%. Alpha levels below 10% were considered indicative of trends.

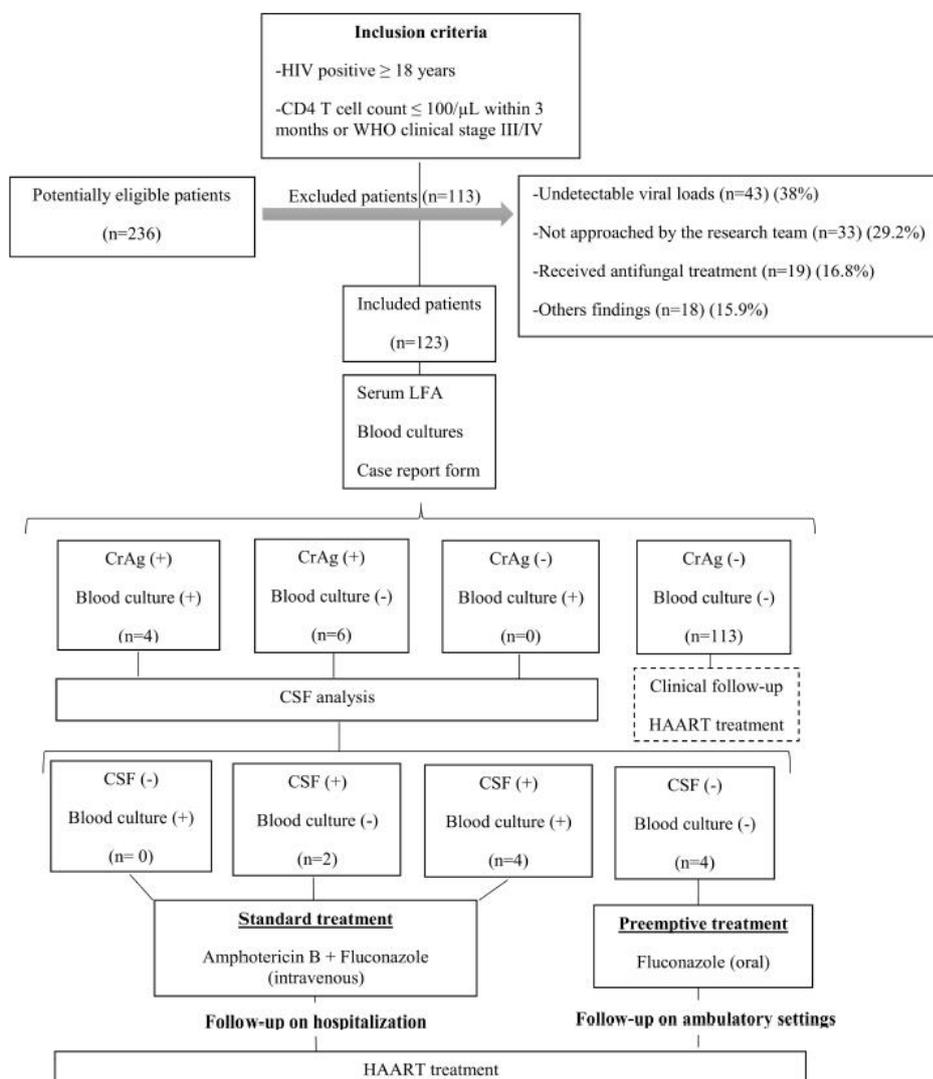


Fig 1. Flow chart of the specimen testing algorithm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178721.g001>

Table 1. Baseline characteristics of the cohort^a.

Variable	Total	CrAg (+)	CrAg (-)	P-value
N	123	10	113 ^b	
Gender				0.403
Male	79 (64.2%)	5 (50%)	74 (65.5%)	
Female	38 (30.9%)	5 (50%)	33 (29.2%)	
Transwomen	6 (4.9%)		6 (5.3%)	
Age, mean years (SD)	38 (9.7)	38 (12.9)	38 (9.4)	0.958
Time of HIV Diagnosis at Enrolment				0.029
< 1 year	34 (27.8%)		34 (30.4%)	
1–5 years	20 (16.4%)	2 (20%)	18 (16%)	
5–10 years	27 (22.1%)	1 (10%)	26 (23.2%)	
>10 years	41 (33.6%)	7 (70%)	34 (30.4%)	
Laboratory Finding				
CD4 cell count, median cells/mL (IQR)	46 (18–85)	38 (14–105)	46 (19–84)	0.672
Viral load, median copies/mL (IQR)	65,609 (21,943–156,299)	126,468 (32,220–268,637)	65,609 (21,943–146,883)	0.371
WHO stage II/IV	98 (79.6%)	9 (90%)	91 (80.5%)	0.462
Previous opportunistic infection	60 (48.7%)	8 (80%)	52 (46%)	0.039
Without HAART	95 (77.2%)	9 (90%)	86 (76.1%)	0.315

Abbreviations: HAART, highly active antiretroviral therapy; CrAg, cryptococcal antigenemia; IQR, interquartile; SD, standard deviation; WHO, World Health Organization.

^a Data are presented as n (%) or median (IQR) or mean (SD).

^b Data was missing for time of HIV diagnosis at enrolment (n = 1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178721.t001>

The number needed to screen was calculated to detect one patient with positive CrAg. All data were anonymized and analyzed using the software EPI-Info 7.

Results

Of the 236 patients who were likely potentially candidates for inclusion in this study, 113 (47.8%) were excluded for the reasons described in Fig 1.

We included 123 patients that were followed by a median time of 9 months (IQR 6–12 months) after the samples were taken. All of them completed the follow-up period set. Baseline characteristics of the patients tested are shown in Table 1. Prevalence of CrAg-positivity among included patients was 8.1% (CI95% 3.3–13.0) (Fig 1). As required by exclusion criteria, none of the CrAg-positive cases has history of CM. Among the 10 CrAg-positive patients, 6 had meningeal involvement detected through the CSF analysis though only 3 of them had neurologic symptoms at baseline. All received immediate standard treatment with amphotericin B deoxycholate and intravenous fluconazole. Two of these patients died during hospitalization. The remaining 4 patients with positive CrAg received targeted preemptive treatment with oral fluconazole and were free of cryptococcal disease and receiving HAART at the end of the follow-up period. None of the 113 patients with a negative CrAg test result developed cryptococcal disease.

The number needed to screen for detecting one positive patient for CrAg LFA was 12.

Discussion

In this prospective study we report a prevalence rate 8.1% of CrAg among patients with advanced HIV infection. Routine screening provided the early detection of 10 cases, including 6 cases of CM, half of them without neurological symptoms.

Despite the advent of HAART, *Cryptococcus* remain a significant disease among HIV-infected persons, primarily in low and middle-income countries [16]. Data about the burden of cryptococcal disease in Latin America and Argentina are scarce. The overall prevalence of positive serum CrAg in the present study is similar to that reported by other authors in Uganda, with a prevalence rate of 8.8%, among patients with a CD4+ cell count <100 cells/mL [12]. These prevalence rates are lower than to those from Cambodia and South Africa among patients with similar demographic characteristics [17,18] and are three times greater than those reported from the United States, using the same assessment methods [19].

Routine screening might identify asymptomatic CM. Symptom-based diagnosis is not a reliable predictor of central nervous system involvement [20]. In our study through performing lumbar puncture in all patients with CrAg positive, we identified CM in 3 asymptomatic patients, supporting the recommendations of Vidal [1]. If we had performed CrAg only in those with symptoms such as fever or headache, we could have missed 50% of the diagnosis. In addition, the low number needed to screen to identify a positive case favors the routine use of CrAg among advanced patients. This number was similar to that reported in an observational study conducted in Uganda among HAART-naïve, HIV-infected patients with a CD4 T-cell count <100 cells/ μ L [12].

According to the results showed in the table, one quarter of individuals were recently diagnosed at such advanced stage. Late HIV diagnosis remains a problem in all Latin America [21].

Many studies have reported the diagnostic value of the LFA in detecting CrAg. A recently published paper demonstrates that LFA in serum and CSF is highly predictive of cryptococcosis among patients at risk for this diagnosis [22]. The presence of asymptomatic antigenemia is a recognized risk factor for the developing of immune reconstitution inflammatory syndrome [23] and the overwhelming risk factor for HAART-associated cryptococcosis, as patients with untreated antigenemia are more likely to develop clinical cryptococcosis [24].

In the HIV-positive patient, CM is a late opportunistic infection, usually observed when the T lymphocyte CD4+ cell count falls below 50–100/ μ L, leading to an acute mortality in the developing world of about 13% to 55% [4,9,25]. In patients with cryptococcal disease, CrAg is detectable a median of 22 days before symptoms onset [11]. This antigenemia is rare in patients with CD4 > 100/ μ L and the evidence from animal studies suggests that the presence of serum CrAg is a manifestation of extrapulmonary disease [18,26].

Although the screening strategy used in our study has not been formally evaluated in Latin America, epidemiological data suggest its potential benefit and cost-savings [1]. We confirmed the clinical utility of LFA for the rapid diagnosis of cryptococcosis and assessed its potential use as a point of care test. Although direct microscopic examination and culture, remain essential for the diagnosis of this infection, its sensitivity is limited. India-ink testing depends on the quality and quantity of the sample and intensive observer training. Cultures requires several days of incubation for development, making their use as early diagnostic techniques impractical [27]. The LFA is an ideal point of care test, as it can be performed by providers with minimal training, and without any additional laboratory equipment other than a tube to hold the specimen. Only 1 drop of bodily fluid is required, and the assay can be performed at room temperature, not requiring refrigeration or heat inactivation [28]. Another advantage of LFA is that it can be performed on remanent blood samples used for routine testing, reducing the need of additional visits. Prices varies according demand, competition and other market dynamics. While in Africa the price for the CrAg LFA is about USD 2.5 in our country the price is USD 6 per test. It is expectable that, if implemented widely, the price should drop, increasing cost-effectiveness analysis.

Early diagnosis of CM would result in a reduction in CM-related deaths as patients who receive early antifungal treatment have been shown to have better outcomes than those who receive delayed treatment [12]. CrAg positive patients without meningeal involvement and disseminated disease who received induction therapy with fluconazole preventive oral, not only prevent the progression of their disease, but also the hospitalization and administration of intravenous drugs, with a corresponding reduction in costs.

Only four patients were CrAg positive, without evidence of spread or meningeal involvement, who were free of disease with preemptive therapy in the follow-up period.

Different studies support the implementation of routinely detect and treat asymptomatic cryptococcal antigenemia among individuals initiating HAART, even with low doses of fluconazole treatment, showing a reduction of the mortality [12,29,30].

The high prevalence in our study supports the WHO guidelines [8] and call for a local recommendation for routine CrAg screening among HIV advanced patients followed by preemptive fluconazole therapy.

Our study had some limitations. About 30% of potentially eligible subjects were not approached. These missed screening opportunities may have resulted in an under estimation of the actual prevalence rate. Other potential limitation of our study include its relatively small sample size. However, this is the first study in Argentina, to our knowledge, describing the prevalence of cryptococcosis and usefulness of their screening.

We conclude that LFA provided rapid diagnosis to determine a high prevalence of CrAg in our hospital, and that screening for subclinical infection with preemptive antifungal treatment, prevented a substantial proportion of meningeal disease. The use of point-of-care tests like LFA played an important role in early diagnosis of cryptococcosis in advanced HIV patients, justifying its implementation. We expect that earlier diagnosis would result in lower fungal loads and a reduction in mortality. In countries like Argentina, where resources and access to HAART are universally available but HIV diagnoses are still delayed, the development of a rapid, sensitive and specific point-of-care test to detect cryptococcal infection will allow its early diagnosis and treatment.

Supporting information

S1 File. Database.
(DOCX)

Acknowledgments

We want to express our sincere acknowledgment to all the participants and to all the staff, including nurses and residents of Juan A. Fernandez Hospital. We thank Paul Kerston for their critical reading and English review of this manuscript. This work was supported by a Fundación Florencio Fiorini Grant number 2014.

Author Contributions

Conceptualization: CF OSLG.

Data curation: GB.

Formal analysis: GB ES.

Funding acquisition: CF OS.

Investigation: CF LG.

Methodology: CF LG SK PC OS HP.

Project administration: OS PC HP.

Supervision: ES OS PC HP.

Visualization: ES OS.

Writing – original draft: CF LG ES SK PC OS HP.

Writing – review & editing: CF LG GB ES SK PC OS HP.

References

1. Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz J Infect Dis*. Elsevier Editora Ltda; 2013; 17(3):353–62.
2. Dirección de Sida y ETS. Boletín sobre el VIH-sida e ITS en la Argentina 2015. Buenos Aires. 2015.
3. Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Launay O, Lortholary O, Achard J, Chabasse D, et al. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: The CryptoA/D study. *PLoS Med*. 2007; 4(2):0297–308.
4. Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, et al. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated cryptococcal meningitis: Implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis*. 2014; 58(5):736–45. <https://doi.org/10.1093/cid/cit794> PMID: 24319084
5. Jarvis JN, Percival A, Bauman S, Pelfrey J, Meintjes G, Williams GN, et al. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(10):1019–23. <https://doi.org/10.1093/cid/cir613> PMID: 21940419
6. Lindsley MD, Mekha N, Baggett HC, Surinthon Y, Autthateinchai R, Sawatwong P, et al. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(4):321–5. <https://doi.org/10.1093/cid/cir379> PMID: 21810743
7. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(3):291–322. <https://doi.org/10.1086/649858> PMID: 20047480
8. Group WHOCGW. Rapid advice: Diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. WHO Press World Heal Organ. 2011.
9. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*. 2009; 23(4):525–30. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac> PMID: 19182676
10. Koziel TR, Bauman SK. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert Opin Med Diagn*. 2012; 6(3):245–51. <https://doi.org/10.1517/17530059.2012.681300> PMID: 23480688
11. French N, Gray K, Watera C, Nakiyingi J, Lugada E, Moore M, et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS*. 2002; 16:1031–8. PMID: 11953469
12. Meya DB, Manabe YC, Castelnuovo B, Cook BA, Elbireer AM, Kambugu A, et al. Cost-Effectiveness of Serum Cryptococcal Antigen Screening to Prevent Deaths among HIV-Infected Persons with a CD4⁺ Cell Count \leq 100 Cells/ μ L Who Start HIV Therapy in Resource-Limited Settings. *Clin Infect Dis*. 2010; 51(4):448–55. <https://doi.org/10.1086/655143> PMID: 20597693
13. Dhana A. Diagnosis of Cryptococcosis and Prevention of Cryptococcal Meningitis Using a Novel Point-of-Care Lateral Flow Assay. *Case Rep Med*. 2013.
14. Bava AJ, Robles AM, Negroni R, Arechavala A, Bianchi M. Estudio de algunos aspectos epidemiológicos de 253 casos de criptococosis. *Rev Iberoam Micol*. 1997; 14:111–4.
15. Metta HA, Corti ME, Negroni R, Helou S, Arechavala A, Soto I, et al. Disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. Clinical, microbiological, and immunological analysis of 51 patients. *Rev Argent Microbiol*. 2002; 117–23. PMID: 12415893
16. Warkentien T, Crum-Cianflone NF. An Update on Cryptococcosis Among HIV-Infected Persons Tyler. *Int J STD AIDS*. 2010; 21(10):679–84. <https://doi.org/10.1258/ijsa.2010.010182> PMID: 21139145
17. Micol R, Lortholary O, Sar B, Laureillard D, Ngeth C, Douset J-P, et al. Prevalence, determinants of positivity, and clinical utility of cryptococcal antigenemia in Cambodian HIV-infected patients. *J Acquir*

- Immune Defic Syndr. 2007; 45(5):555–9. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31811ed32c> PMID: [17577124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17577124/)
18. Jarvis JN, Lawn SD, Vogt M, Bangani N, Wood R, Harrison TS. Screening for cryptococcal antigenemia in patients accessing an antiretroviral treatment program in South Africa. *Clin Infect Dis*. 2009; 48(7):856–62. <https://doi.org/10.1086/597262> PMID: [19222372](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19222372/)
 19. McKenney J, Bauman S, Neary B, Detels R, French A, Margolick J, et al. Prevalence, correlates, and outcomes of cryptococcal antigen positivity among patients with AIDS, United States, 1986–2012. *Clin Infect Dis*. 2015; 60(6):959–65. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu937> PMID: [25422390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25422390/)
 20. Williams DA, Kiiza T, Kwizera R, Kiggundu R, Velamakanni S, Meya DB, et al. Evaluation of Fingerstick Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay in HIV-Infected Persons: A Diagnostic Accuracy Study. *Clin Infect Dis*. 2015; 61(3):464–7. <https://doi.org/10.1093/cid/civ263> PMID: [25838287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25838287/)
 21. Crabtree-Ramírez B, Caro-vega Y, Shepherd BE, Wehbe F, Cesar C, Cortés C, et al. Cross-Sectional Analysis of Late HAART Initiation in Latin America and the Caribbean: Late Testers and Late Presenters. *PLoS One*. 2011; 6(5).
 22. Huang HR, Fan LC, Rajbanshi B, Xu JF. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of cryptococcosis: A meta-analysis and systematic review. *PLoS One*. 2015; 10(5):1–10.
 23. Lawn SD, Meintjes G. Pathogenesis and prevention of immune reconstitution disease during antiretroviral therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012; 9(4):415–30.
 24. Haddow LJ, Colebunders R, Meintjes G, Lawn SD, Elliott JH, Yukari C. Cryptococcal Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in HIV-1-infected individuals: Literature Review and Proposed Clinical Case Definitions. *Lancet Infect Dis*. 2011; 10(11):791–802.
 25. Antinori S. New Insights into HIV / AIDS-Associated Cryptococcosis. *Rev Artic New*. 2013.
 26. Feldmesser M, Harris C, Reichberg S, Khan S, Casadevall A. Serum cryptococcal antigen in patients with AIDS [editorial]. *Clin Infect Dis*. 1996; 23(4):827–30. PMID: [8909854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8909854/)
 27. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(1).
 28. Rajasingham R, Meya DB, Boulware D. Integrating Cryptococcal Antigen Screening and Preemptive Treatment into Routine HIV care. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; 59(5):85–91.
 29. Pongsai P, Atamasirikul K, Sungkanuparph S. The role of serum cryptococcal antigen screening for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV-infected patients with different ranges of CD4 cell counts. *J Infect*. 2010; 60(6):474–7. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.03.015> PMID: [20347868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20347868/)
 30. Butler EK, Boulware DR, Bohjanen PR, Meya DB. Long Term 5-Year Survival of Persons with Cryptococcal Meningitis or Asymptomatic Subclinical Antigenemia in Uganda. *PLoS One*. 2012; 7(12):5–9.

10.3.4. Modalidad RECOMENDACIÓN NACIONAL

- Sociedad Argentina de Infectología. Comisión de SIDA y ETS. Recomendaciones sobre el manejo de Infecciones Oportunistas en Pacientes con Infección por HIV. Capítulo Criptococosis Diseminada. Página 49. 2016.



Recomendaciones sobre el manejo de Infecciones Oportunistas en Pacientes con Infección por HIV

*Comisión de SIDA y ETS
2016*

DIAGNÓSTICO

El análisis del LCR habitualmente muestra moderado aumento de proteínas, glucorraquia normal o baja, y pleocitosis moderada a predominio linfocitario. La presión de apertura del LCR puede estar elevada, con valores ≥ 25 cm H₂O en el 60%-80% de los pacientes. Los métodos diagnósticos muestran la siguiente sensibilidad:

▪ Hemocultivo	55%
▪ Cultivo de LCR (colonias visibles dentro de los 7 días)	95%
▪ Tinción con Tinta China en LCR	60%-80%
▪ Antigenemia (precede a los síntomas neurológicos)	95%
▪ Antigenorraquia (por aglutinación del látex, EIA o dipstick test)	~ 100%

Otras consideraciones de diagnóstico

El uso rutinario de la antigenemia como tamizaje de la enfermedad previo al inicio del TARV en adultos infectados con HIV y recuento de CD4 < 100 cél./mm³, debería ser considerado en poblaciones con elevada prevalencia de antigenemia ($>3\%$) (CII). En nuestro país algunos estudios dan cuenta de valores de prevalencia cercanos al 8%. La antigenemia positiva asintomática es una condición bien descrita en SIDA y puede preceder a los síntomas de ME. Ha sido asociada con mayor mortalidad entre pacientes que inician el TARV, con un riesgo teórico de SRI (del tipo de SRI que desenmascara). Por lo tanto, frente a casos de antigenemia positiva asintomática se recomienda realizar PL y hemocultivos. Si los resultados son positivos se tratará al paciente como enfermedad diseminada. De lo contrario, se recomienda tratamiento preventivo con fluconazol hasta su reconstitución inmune (BIII) (ver más adelante).

24. Boulware DR, Bonham SC, Meya DB et al. Paucity of initial cerebrospinal fluid inflammation in Cryptococcal meningitis is associated with subsequent immune reconstitution inflammatory syndrome. *J Infect Dis* 2010;202:963.
25. Zolopa A, Andersen J, Powderly W. et al. Early antiretroviral therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial. *PloSone* 2009;4 (5):e5575.
26. Bisson GP, Molefi M, Bellamy S et al. Early versus delayed antiretroviral therapy and cerebrospinal fluid fungal clearance in adults with HIV and cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 2013;56(8):1165-73.
27. Makadzange AT, Ndhlovu CE, Takarinda K et al. Early versus delayed initiation of antiretroviral therapy for concurrent HIV infection and Cryptococcal meningitis in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis* 2010;50(11): 1532-8.
28. Lawn SD, Torok ME, Wood R. Optimum time to start antiretroviral therapy during HIV-associated opportunistic infections. *Curr Opin in Infect Dis* 2011;24:34-42.
29. Sloan DJ, Parris V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin Epidemiol* 2014;6: 169-182.
30. Boulware DR, Meya DB, Muzoora C et al. for the COAT trial Team. Timing of antiretroviral therapy after diagnosis of cryptococcal meningitis. *N Engl J Med* 2014;370(26):2487-98.
31. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 2014; 312 (4):410-25.
32. Armstrong-James D, Meintjes G, Brown G. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in Microbiol* 2014;22:120-7.
33. Meya D et al. Cost-effectiveness of serum cryptococcal antigen screening to prevent deaths among HIV-infected persons with CD4+ cells. count < 100 cells/ul who start HIV therapy in resource-limited setting; *Clin Infect Dis* 2010;51:448-55.
34. Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF et al. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related Cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz J Infect Dis* 2013;17(3):353-62.
35. Frola C, Guelfand L, Socías M et al. Prevalencia del antígeno de *Cryptococcus* y valoración de su detección como método de tamizaje en pacientes con infección avanzada por VIH. Congreso Asociación Panamericana de Infectología. Mayo 2015.
36. Frola C, Guelfand L, Kaufman S et al. Detección rutinaria en suero de antígeno criptocócico como estrategia de prevención de criptococosis meníngea asociada al VIH/SIDA. XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología. Mayo 2015. Resumen 320.