











Artigo original

Elucidação de um surto de histoplasmose: a importância dos ensaios sorológicos na ausência de evidências micológicas

Elucidation of a histoplasmosis outbreak: the importance of serological assays in the absence of mycological evidence

Camila Mika Kamikawa Boldo^[1] , Plínio Trabasso^[2] , Rose Clélia Grion Trevisane^[3] , Josefa Maria da Hora Silva Lima^[4] , Maria Helena Postal Pavan^[5] , Edite Kazue Taninaga^[3] , Hamilton Bertan^[3] , Inajara de Cassia Guerreiro^[3] , Mayara de Freitas Pereira^[3] , Adriana Pardini Vicentini^[1] 

^[1]Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia, São Paulo, São Paulo, Brasil

^[2]Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, São Paulo, Brasil

^[3]Universidade Estadual de Campinas, Centro de Saúde da Comunidade, Campinas, São Paulo, Brasil

^[4]Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Instituto do Coração, São Paulo, São Paulo, Brasil

^[5]Universidade Estadual de Campinas, Hospital das Clínicas, Campinas, São Paulo, Brasil

Autor para correspondência

Adriana Pardini Vicentini

E-mail: adriana.vicentini@ial.sp.gov.br

Instituição: instituto Adolfo Lutz

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP: 01242-902. São Paulo, São Paulo, Brasil

Como citar

Boldo CMK, Trabasso P, Trevisane RCG, Lima JMHS, Pavan MHP, Taninaga EK et al. Elucidação de um surto de histoplasmose: A importância dos ensaios sorológicos na ausência de evidências micológicas. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2025; 22: e41601. DOI: <https://doi.org/10.57148/bepa.2025.v.22.41601>

Primeira submissão: 06/06/2025 • Aceito para publicação: 25/09/2025 • Publicação: 29/10/2025

Editora-chefe: Regiane Cardoso de Paula

Resumo

Introdução: Surto de histoplasmose ocorrem devido à exposição a uma fonte comum com altas concentrações de conídios. Em geral, estão associadas a atividades de trabalho ou recreativas. A internação de dois indivíduos com sinais clínicos sugestivos de histoplasmose pulmonar aguda levou à investigação sorológica dos demais participantes da visita à mina abandonada e à caverna. **Métodos e Resultados:** Por imunodifusão dupla (ID) observamos, na primeira coleta, reatividade contra o antígeno de *H. capsulatum* em 88,4%. Entre as amostras reagentes, observou-se que o título de anticorpos variou de puro (não diluído) a 128. Por outro lado, a avaliação da imunoreatividade das amostras por *immunoblotting* revelou 100% de reatividade frente às frações H e M, marcadores sorológicos da micose e indicadores de infecção pulmonar aguda. **Conclusões:** Este estudo destaca a importância dos ensaios sorológicos, em especial o *immunoblotting*, no diagnóstico precoce da histoplasmose pulmonar aguda, especialmente nos casos em que há ausência de reatividade sorológica por imunodifusão dupla e ausência de confirmação micológica.

Palavras-Chaves: histoplasmose, *H. capsulatum*, surtos de doença, diagnóstico.

Abstract

Introduction: Outbreaks of histoplasmosis occur due to exposure to a common source with high concentrations of conidia. In general, they are associated with occupational or recreational activities. The hospitalization of two individuals with clinical signs suggestive of acute pulmonary histoplasmosis prompted serological investigation of the other individuals who participated in the visit to the abandoned mine and cave. **Methods and Results:** Using double immunodiffusion (ID), we observed reactivity to *H. capsulatum* antigen in 88,4% of cases at the first collection. Among the reactive samples, antibody titers ranged from neat (undiluted) to 128. On the other hand, evaluation of the samples by *immunoblotting* revealed 100% reactivity to both H and M fractions, serological markers of histoplasmosis and indicators of acute pulmonary infection. **Conclusions:** This study highlights the importance of serological assays, particularly *immunoblotting*, in the early diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis, especially in cases lacking reactivity by double immunodiffusion and in the absence of mycological confirmation.

Keywords: histoplasmosis, *H. capsulatum*, disease outbreaks, diagnosis.

Introdução

A histoplasmose clássica (HP) é uma micose sistêmica e endêmica causada pelo fungo termodimórfico *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*). A enfermidade apresenta ampla distribuição geográfica, com casos descritos nos seis continentes do globo terrestre.¹⁻³

No Brasil, apresenta alta prevalência entre as micoses endêmicas; entretanto, assim como as demais infecções causadas por outras espécies fúngicas patogênicas, o fato de não ser doença de notificação compulsória torna extremamente difícil o mapeamento de sua real magnitude no território nacional.^{4,5} Sua incidência tem sido demonstrada pela observação de casos autóctones tanto isolados quanto em surtos localizados e, com menor frequência, por meio da realização de inquéritos epidemiológicos empregando-se o teste cutâneo de histoplasmina.⁶ Segundo Guimarães et al.,⁷ as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país apresentaram, em inquéritos epidemiológicos, as maiores taxas de positividade em teste cutâneo: de 3,0 a 93,2%, de 4,4 a 63,1% e de 12,8 a 43,4% respectivamente. Posteriormente, Almeida et al.,⁸ em revisão sistemática, relataram que os estados do Amapá, Ceará, Mato Grosso e Pará apresentaram a maior média de positividade no teste cutâneo de histoplasmina. Surtos ou microepidemias de HP têm sido relatados desde 1958, com casos registrados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Distrito Federal, entre outros, sendo a maioria deles relacionada a visitas a locais habitados por morcegos.^{4,8-15}

A instalação do processo infeccioso ocorre como consequência da inalação de microconídios aerossolizados presentes nos ambientes, especialmente naqueles com quantidade abundante de excretas de morcegos e aves, como os encontrados em cavernas, grutas, galinheiros, celeiros, sótãos, porões, casas, minas e construções abandonadas.^{1-3,14} A micose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam de infecção pulmonar assintomática a infecção disseminada grave com envolvimento do sistema nervoso central.^{1,16} Para a maioria das pessoas, o processo infeccioso por *H. capsulatum* não resulta em doença clínica. A doença sintomática ocorre em uma proporção muito pequena de pessoas infectadas, segundo os dados derivados de testes cutâneos realizados em grandes populações de pessoas saudáveis.¹⁶

O diagnóstico definitivo da doença baseia-se na identificação do agente etiológico por processos histológicos, pelo exame a fresco e/ou pelo isolamento do fungo em cultura.^{1,2,16} Apesar de tais métodos encontrarem-se bem estabelecidos, eles apresentam algumas desvantagens, dentre as quais o tempo necessário para o crescimento do patógeno, o desempenho analítico variável e a necessidade de treinamento e infraestrutura laboratorial especializada para a contenção biológica do *H. capsulatum*.^{1,2,17,18}

Diante do exposto, a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* atua como ferramenta fundamental no diagnóstico presuntivo desta patologia.¹⁹ A imunodifusão dupla em gel de agarose (ID) é a técnica sorológica mais utilizada para o diagnóstico da HP pulmonar aguda,¹ por ser de fácil execução e oferecer baixo custo operacional, apresentar alta especificidade (90-100%) e valores preditivos próximos de 100%, enquanto sua sensibilidade fica em torno de 70 a 100%.^{19,23} Outro ensaio sorológico que pode ser utilizado é o *immunoblotting*, com sensibilidade de 95% e especificidade de 94%.¹⁹⁻²³

Este trabalho teve como objetivo principal a comprovação de um surto de histoplasmose em um grupo de 22 universitários, dois pós-graduandos e dois professores, por meio da pesquisa de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum*, na ausência de evidências micológicas.

Métodos

Amostras de soro

Foram avaliadas amostras de soro de 22 graduandos, dois pós-graduandos e dois professores, dias após participarem de atividade de campo na Mina de Canoas, localidade de João Pessoa, nas proximidades de Adrianópolis, estado do Paraná, no dia 09 de maio de 2024, e na Caverna do Petar, cidade de Itaoca, Vale do Ribeira, estado de São Paulo, no dia 10 de maio de 2024.

Intervalo entre coletas de amostras

Foram analisadas 56 amostras de soro, distribuídas conforme o tempo de coleta, a saber: 1ª coleta: aproximadamente 30 dias pós-exposição (25/26, 96% participantes); 2ª coleta: aproximadamente 60 dias pós-exposição (19/26; 73%); 3ª coleta: aproximadamente 90 dias pós-exposição (11/26, 42%); e 4ª coleta: aproximadamente 120 dias pós-exposição (1/26, 4%).

Definição de caso provável de histoplasmose

Considerou-se caso provável de histoplasmose o indivíduo que, após exposição comum documentada (visita à mina e à caverna em 09 e 10/05/2024, respectivamente) apresentou: a) sintomas clínicos compatíveis com histoplasmose pulmonar aguda e/ou b) reatividade sorológica, por imunodifusão dupla e/ou *immunoblotting*, para *H. capsulatum* verificada em amostras coletadas até 90 dias após a exposição.

Pesquisa de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum*

Ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID)

O ensaio de imunodifusão dupla foi realizado de acordo com o método de Ouchterlony²⁴ modificado. Lâminas de vidro foram cobertas primeiramente com 1,0mL de ágar a 1% (p/v) e levadas à estufa a 60°C para secarem por 24 horas. Na sequência, foram recobertas com 3,0mL de agarose tipo II a 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluídos em uma solução salina tamponada de pH 6,9, contendo 0,4% de citrato de sódio e 7,5% de glicina. Antígenos de *H. capsulatum* (10µL) foram colocados no poço central, enquanto os soros controle positivo e dos pacientes (10µL) foram adicionados nos poços circundantes. As lâminas foram incubadas em uma câmara úmida à temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, foram lavadas com solução salina, com várias trocas ao longo de um período de 24 horas. As lâminas foram secas e coradas com 0,4% de azul brilhante de Coomassie R-250® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em uma mistura de etanol-ácido acético e água como solvente.

O padrão de reatividade foi determinado de acordo com a presença ou não de linhas de precipitação. A intensidade dos níveis séricos de anticorpos foi adaptada de Moreto,²⁵ a saber: a) baixo: soro não diluído (puro) a soro diluído a 1:4, b) moderado: soro diluído 1:8 a soro diluído a 1:16 e c) elevado: soro com diluição maior ou igual a 1:32.

Ensaio de *immunoblotting*

O ensaio de *immunoblotting* foi realizado segundo Passos et al.²¹ Após a eletrotransferência do antígeno de *H. capsulatum* do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose (0,22µm, Bio-Rad Laboratories, Inc, Germany), as membranas foram bloqueadas com PBS-T-BSA 1%, à temperatura ambiente, por 60 minutos. As membranas de nitrocelulose contendo antígeno de *H. capsulatum* imobilizado foram cortadas verticalmente, colocadas em canaletas e incubadas com 2,0mL de amostra de soro teste e soro controle-positivo, ambos diluídos na proporção de 1:100 em tampão PBS-T-BSA 1%, à temperatura ambiente e sob agitação constante por duas horas. Finalizado o período de incubação, as fitas de nitrocelulose foram lavadas seis vezes, por dez minutos cada, em solução PBS-T 0,1%. Posteriormente, as membranas foram incubadas com 2,0mL de anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), diluídos a 1:2.000 em solução PBS-T-BSA 1%, sendo mantidas por uma hora e 30 minutos sob agitação constante, à temperatura ambiente, protegidas da luz e em seguida novamente lavadas como descrito anteriormente. A reação foi revelada empregando-se solução de 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) e o bloqueio foi feito por lavagens sucessivas em água destilada.

Antígeno de *H. capsulatum*

Para a produção de antígenos, seguimos o protocolo proposto por Freitas et al.²⁶ Resumidamente, células miceliais do isolado 200 de *H. capsulatum* foram cultivadas em meio sólido Sabouraud-dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) a 27°C durante 33 dias. Após o período de incubação, as culturas foram tratadas com uma solução aquosa de timerosal-borato 1:5.000 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) e incubadas à temperatura ambiente por 24h. Ao fim desta etapa, os sobrenadantes foram filtrados através de papel Whatman® nº 1 (Whatman, Brentford, Reino Unido). As soluções de antígeno foram concentradas dez vezes por meio de liofilização. Após a dosagem de proteína usando-se o método de Bradford, as preparações antigênicas foram armazenadas a -20°C até o uso.

Análise estatística

A análise estatística dos títulos de anticorpos anti-*H. capsulatum* obtidos nas diferentes coletas foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 10.4.x (GraphPad Prism® Software, San Diego, CA, EUA).

O teste Qui-quadrado de Pearson foi aplicado em dois contextos distintos: i) para avaliar a associação entre a presença de sintomas e a reatividade sorológica, e ii) para comparar as proporções de indivíduos reagentes nas diferentes coletas sorológicas (aproximadamente 30, 60, 90 e 120 dias após a exposição).

Embora os testes sejam metodologicamente iguais, os objetivos analíticos foram distintos: no primeiro buscou-se verificar uma possível associação entre variáveis clínicas e laboratoriais; no segundo, avaliar alterações na frequência de positividade ao longo do tempo.

Para se comparar os títulos sorológicos entre a primeira e segunda coletas, empregou-se o Teste de Wilcoxon para amostras pareadas, adequado a dados não paramétricos e amostras relacionadas. Já a comparação dos títulos entre as três coletas foi realizada pelo Teste de Friedman, indicado para medidas repetidas com distribuição não paramétrica.

O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CAAE no 91110625.7.0000.0059/2025; Parecer no. 7.786.237/2025 de 2025).

Resultados

Cinquenta e quatro por cento (14/26) dos pacientes eram do sexo masculino e 46% (12/26), do feminino. A faixa etária variou de 20 a 62 anos, com mediana de 26 anos. Em relação à cor da pele, 84,6% (22/26) declararam-se brancos, 11,5% (3/26), pardos e 4% (1/26), pretos (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos que visitaram a Mina de Canoas (PR) e a Caverna do Petar (SP) em maio de 2024

Variáveis	N
Sexo	
Masculino	14
Feminino	12
Raça/cor	
Branca	22
Parda	3
Preta	1
Escolaridade	
Ensino superior completo	4
Graduando	22
Idade	Mediana (min-máx)
Anos	26 (20-62)

Fonte: elaborada pelos autores.

Do total de pacientes avaliados, 27% (7/26) afirmaram ser assintomáticos enquanto 73% (19/26) relataram múltiplos sintomas, sendo os mais citados: cefaleia (50%), dor torácica (34,6%), febre (30,7%), mialgia (26,9%), e náusea e tosse seca (11,5%) ([Tabela 2](#)).

Tabela 2. Sintomas relatados pelos pacientes compatíveis com as manifestações clínicas de histoplasmose pulmonar aguda

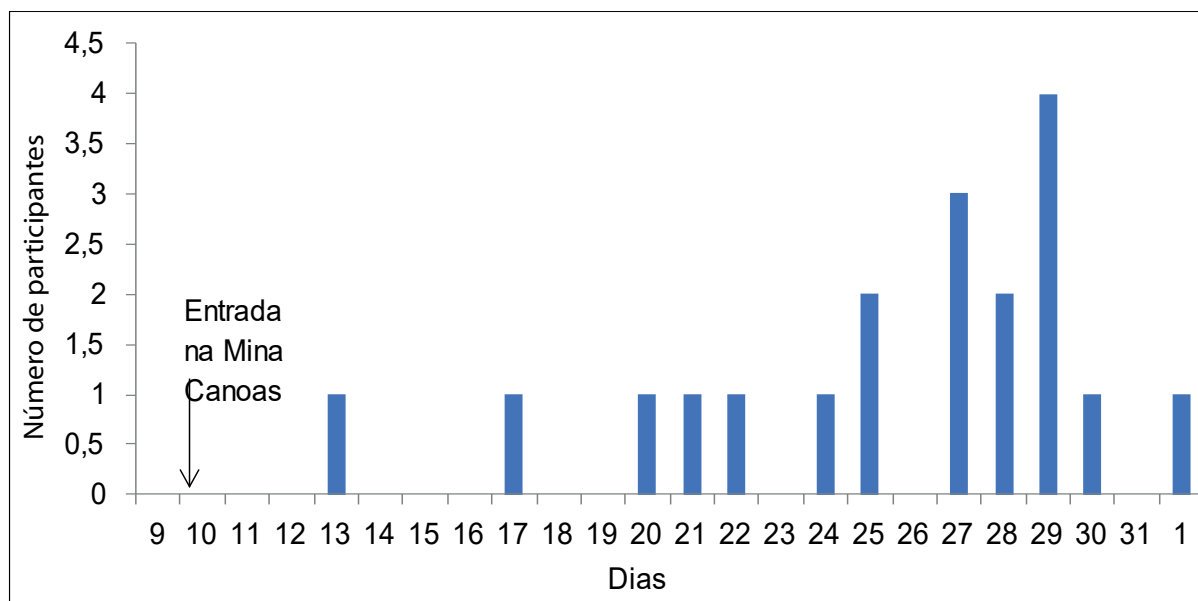
Sintoma (n=26)	n	%
Cefaleia	13	50
Dor Torácica	9	34,6
Febre	8	30,7
Mialgia	7	26,9
Cansaço	5	19,2
Dispneia	3	11,5
Tosse Seca	3	11,5
Náusea	3	11,5
Diarreia	2	7,7
Dor ao Respirar	2	7,7
Dor Abdominal	1	3,8
Vômito	1	3,8
Coriza	1	3,8
Desconforto Torácico	1	3,8
Sudorese Noturna	1	3,8
Tontura	1	3,8
Dor de Estômago	1	3,8
Fraqueza	1	3,8
Assintomáticos	7	27

Fonte: elaborada pelos autores.

Oito por cento (2/26) dos indivíduos foram hospitalizados e 92% (24/26) foram acompanhados ambulatorialmente; sessenta e nove por cento (18/26) dos indivíduos fizeram uso de itraconazol como medicação antifúngica.

Considerando o dia 09 de maio de 2024 como a data de primeira exposição do grupo ao *H. capsulatum*, pôde-se observar que um paciente relatou sintomas quatro dias após a entrada na Mina Canoas. Por outro lado, a maioria dos pacientes relatou início dos sintomas a partir do 25º dia de exposição ([Gráfico 1](#)).

Gráfico 1. Curva epidêmica, considerando-se a primeira exposição dos pacientes ao *H. capsulatum* no dia 09/05/2024 após visita a Mina Canoas, Paraná, Brasil



Fonte: elaborada pelos autores.

Dada a ausência de coleta de material para a realização dos ensaios micológicos (exame direto e/ou cultura), o diagnóstico presuntivo da micose foi realizado por ensaios sorológicos. Observou-se, por imunodifusão dupla, que 88,4% (23/26) dos indivíduos que tiveram suas amostras avaliadas aproximadamente 30 dias pós-exposição apresentaram reatividade e 11,5% (3/26) não apresentaram reatividade sorológica frente à preparação antigênica de *H. capsulatum*.

Na segunda coleta, realizada em 73% (19/26) dos indivíduos, verificou-se que 89,4% (17/19) apresentaram reatividade sorológica.

Na terceira coleta, realizada em 42,3% (11/26) dos indivíduos, observou-se que 82% (9/11) reconheceram a preparação antigênica de *H. capsulatum*.

Apenas um paciente realizou a quarta coleta, apresentando reatividade apenas com a amostra não diluída ([Tabela 3](#)).

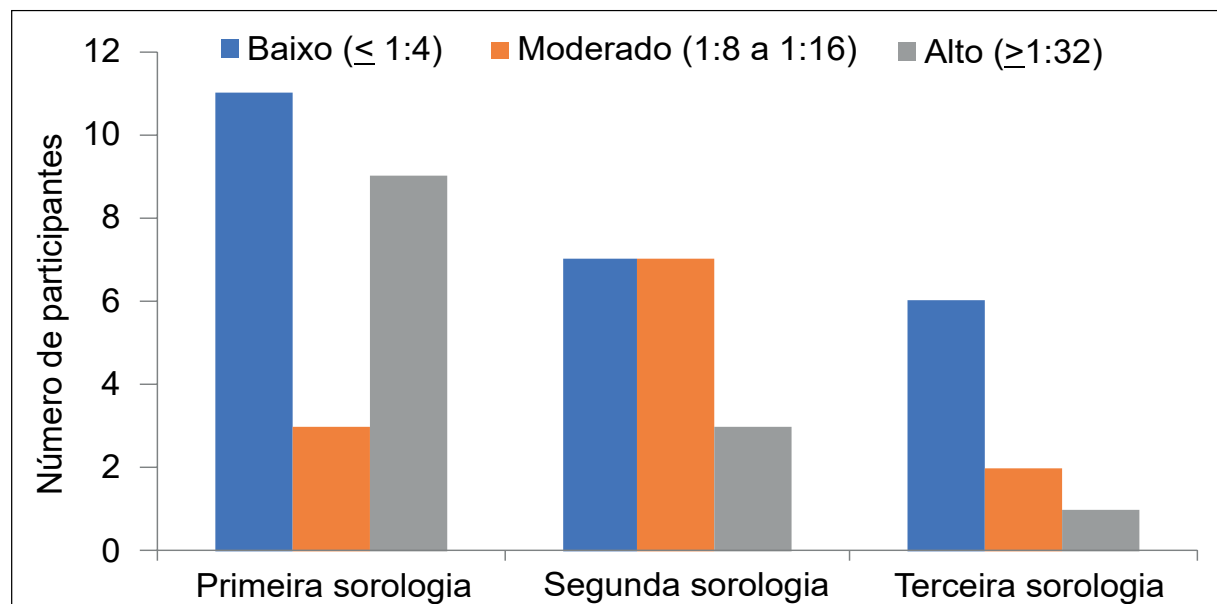
A análise pelo teste Qui-quadrado não revelou associação estatisticamente significativa entre a presença de sintomas e a reatividade sorológica ($p>0,05$).

Entre as amostras reagentes por ID, observou-se que o título de anticorpos circulantes variou de puro (não diluído) a 128 ([Tabela 3](#) e [Gráfico 2](#)). Com base nos critérios adaptados de Moreto²⁵ para a classificação da intensidade de títulos de anticorpos séricos, observou-se que, na primeira coleta, 11 indivíduos apresentaram títulos baixos

($\leq 1:4$); três, títulos moderados (1:8 a 1:16); e nove, títulos elevados ($\geq 1:32$). Na segunda coleta, sete indivíduos mantiveram títulos baixos, sete apresentaram títulos moderados e três, títulos elevados. Já na terceira coleta, houve aumento de indivíduos com títulos baixos ($n=6$), apenas dois com títulos moderados e um com título elevado (Gráfico 2 e [Tabela 3](#)).

A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os títulos das primeira e segunda coletas (teste de Wilcoxon, $p=0,374$), tampouco entre as três coletas (teste de Friedman, $p=0,286$; teste Qui-quadrado, $p=0,368$). Esses dados sugerem estabilidade nos títulos de anticorpos ao longo do tempo, sem tendência significativa de aumento ou redução. Tal achado pode refletir resposta imune persistente, variabilidade individual ou limitações amostrais.

Gráfico 2. Distribuição dos níveis de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* nas três avaliações sorológicas segundo categoria de reatividade (baixa, moderada e alta)



Fonte: elaborada pelos autores.

A fim de confirmarmos a ausência de reatividade sorológica em três indivíduos, empregamos uma metodologia mais sensível (*immunoblotting*), observando que, além destas, 100% (26/26) das amostras avaliadas apresentaram reatividade sorológica para *H. capsulatum* ([Gráfico 3](#)).

Entre os reagentes, 88,4% (23/26) reconheceram as frações H e M, indicando infecção aguda, e 4% (1/26) reconheceram apenas a fração M, comprovando a exposição ao patógeno ([Gráfico 4](#)). Quarenta e seis por cento (12/26) dos pacientes com reatividade sorológica foram acompanhados pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses ([Tabela 3](#)).

Em relação aos três pacientes com ausência de reatividade sorológica por ocasião da avaliação da primeira amostra de soro, um indivíduo apresentou soroconversão, inclusive com um título elevado de anticorpos (128), e os outros dois não tiveram as amostras avaliadas nas coletas subsequentes (Tabela 3).

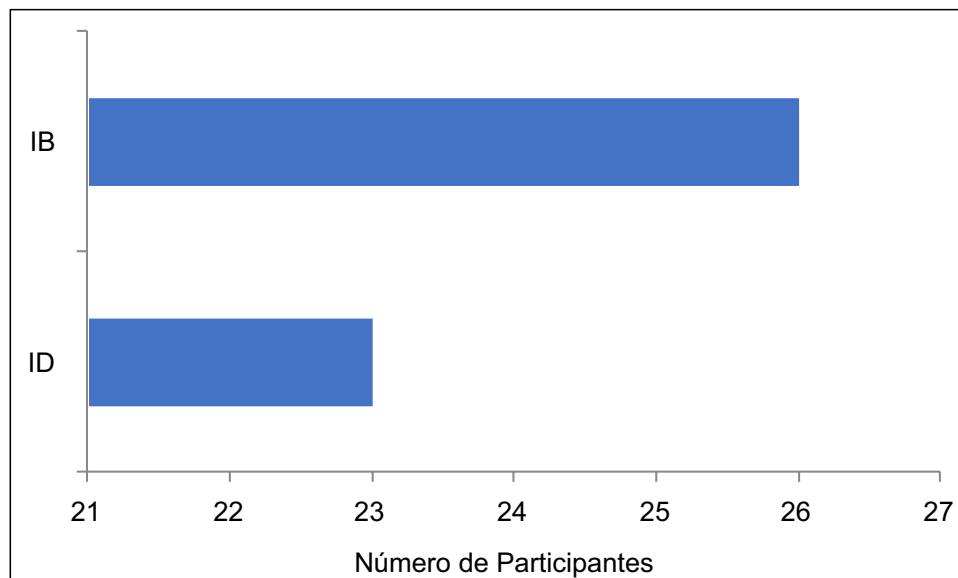
Tabela 3. Seguimento sorológico, por imunodifusão dupla, dos pacientes com suspeita clínica de histoplasmose

Ensaio de Imunodifusão Dupla em Gel de Agarose (título dos anticorpos circulantes)				
Pacientes	1ª Sorologia	2ª Sorologia	3ª Sorologia	4ª Sorologia
1	Não Reagente	**	**	**
2	**	2	**	**
3	16	16	Puro	**
4	2	2	**	**
5	4	8	**	**
6	128	4	2	Puro
7	Puro	8	Não Reagente	**
8	4	16	32	**
9	128	Puro	Puro	**
10	64	16	2	**
11	64	8	16	**
12	64	64	16	**
13	8	**	**	**
14	Não Reagente	128	2	**
15	64	**	**	**
16	2	**	**	**
17	4	2	**	**
18	Não Reagente	**	**	**
19	4	**	**	**
20	4	Não Reagente	**	**
21	4	16	**	**
22	64	**	**	**
23	4	Não Reagente	**	**
24	16	32	2	**
25	2	4	Puro	**
26	64	32	Não Reagente	**

Fonte: elaborada pelos autores.

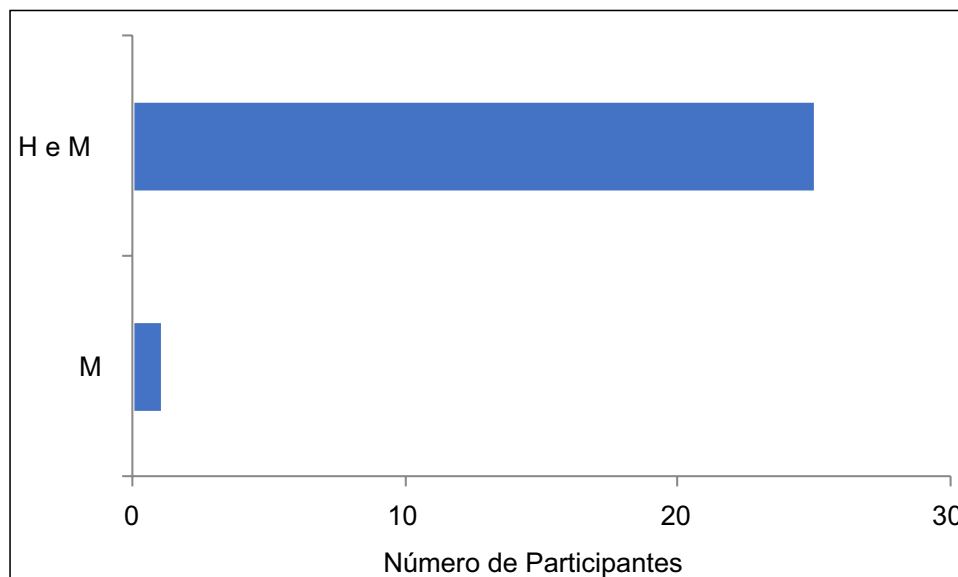
**Não realizado; Puro: soro não diluído.

Gráfico 3. Desempenho dos ensaios de imunodifusão dupla (ID) e *immunoblotting* na detecção de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* da primeira amostra de soro dos pacientes com suspeita de infecção por *H. capsulatum*



Fonte: elaborada pelos autores.

Gráfico 4. Reconhecimento por *immunoblotting* dos marcadores sorológicos da histoplasmose na pesquisa de anticorpos circulantes da primeira amostra de soro dos pacientes com suspeita de infecção por *H. capsulatum*



Fonte: elaborada pelos autores.

Discussão

H. capsulatum causa micose sistêmica endêmica que depende da suscetibilidade do hospedeiro, da quantidade e frequência das partículas infectantes inaladas e do grau de virulência do agente etiológico.²⁷ O patógeno cresce particularmente bem em matéria orgânica enriquecida com excrementos de pássaros ou morcegos. A perturbação ambiental dos habitats de *Histoplasma* está intimamente relacionada à ocorrência de surtos ou microepidemias de histoplasmose. Esses surtos geralmente estão associados a atividades de trabalho, como construção de estradas, limpeza de parques, galinheiros ou viveiros de aves e demolição de prédios, ou recreativas, como visitas a cavernas ou grutas e outras atividades ligadas ao ecoturismo.²⁸⁻³⁰

No presente estudo, 73% dos participantes relataram múltiplos sintomas, sendo a cefaleia a manifestação clínica apontada com maior frequência, seguida pela febre; esses achados são consistentes com os descritos por Alves et al.¹⁵ ao investigarem um surto de HP ocorrido em 2017, em Brazilândia, Distrito Federal. Por outro lado, 27% dos participantes deste estudo se declararam assintomáticos, refletindo possivelmente estarem com imunidade melhor do que os demais integrantes do grupo.

De acordo com a literatura, as manifestações clínicas da infecção aguda causada por *H. capsulatum* surgem de uma a três semanas após a inalação das formas infectantes, no entanto um dos indivíduos relatou sintomas apenas quatro dias após as visitas à Mina Canoas e à Caverna Petar. Tal antecipação do quadro clínico pode ser explicada por diferentes fatores, como imunossupressão pré-existente, elevada virulência do patógeno, elevada carga de conídio inalado, tempo prolongado de exposição ou, ainda, um episódio de reinfecção, o que poderia reduzir o tempo de incubação para 3 a 7 dias.³¹ É importante destacar que, neste estudo, não foram realizadas coletas de amostras clínicas visando à realização de exames micológicos diretos, histopatológicos ou de culturas, métodos fundamentais para o diagnóstico definitivo desta micose; a única abordagem laboratorial empregada foi a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum*, por imunodifusão dupla (ID), com o objetivo de avaliar o possível contato do grupo com o agente etiológico.

Diferentemente dos estudos de Olivera et al.¹² e Rocha-Silva et al.,¹⁴ que, ao avaliarem sorologicamente indivíduos que tiveram contato com fezes de morcego, não conseguiram detectar a presença de anticorpos circulantes, neste estudo observou-se um alto percentual de reatividade, por imunodifusão dupla, das amostras de soro avaliadas aproximadamente 30 dias pós-exposição ao agente causal da micose. Observou-se que 88,4% dos indivíduos apresentaram reatividade e 11,6% (3/26) ausência de reatividade sorológica frente à preparação antigênica de *H. capsulatum*, sendo que os títulos de anticorpos circulantes entre os reagentes variaram de puro (não diluído) a 128. O percentual de reatividade e os títulos observados neste estudo foram superiores aos registrados em 2008 pelo mesmo

laboratório, quando apenas um indivíduo, dentre 39 expostos durante visita a uma caverna no município de Arapeí (SP), apresentou reatividade sorológica com título de 4.⁹ Cury et al.³² ao investigarem um surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, também observaram títulos baixos de anticorpos (não diluído a 4).

O ensaio de *immunoblotting* confirmou que todos os integrantes do grupo avaliados estavam com a doença em atividade, visto que todos reagiram frente aos marcadores sorológicos, ou seja, frações H e M, indicadores de infecção aguda. Resultados semelhantes foram demonstrados por Passos et al.²¹ ao utilizarem o ensaio de *immunoblotting* na investigação da microepidemia de Arapeí, verificando que 51% dos soros reagiram frente às frações H e M, 11% frente à fração M, 34% apresentaram ausência de reatividade frente às frações H e/ou M e um (3%) indivíduo não foi avaliado por insuficiência de material. Erkens et al.³³ também relataram a presença de anticorpos circulantes da classe IgG anti-*H. capsulatum*, empregando a técnica de *immunoblotting*, em cinco dos oito pesquisadores que realizaram trabalho de campo em Cuba, estudando os hábitos de morcegos.

A combinação dos resultados obtidos por imunodifusão dupla e *immunoblotting* permite afirmar com elevado grau de certeza que os participantes deste estudo estiveram expostos ao patógeno nos ambientes visitados, desenvolvendo quadro compatível com histoplasmose pulmonar aguda. Na ausência de métodos micológicos confirmatórios, os ensaios sorológicos, especialmente quando incluem coletas pareadas (fase aguda e convalescente), são ferramentas valiosas para o diagnóstico presuntivo da histoplasmose, principalmente em casos leves, conforme demonstrado por Huhn et al.³⁴

Esse estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, a ausência de exames micológicos convencionais, como exame direto e cultura, impossibilitou a confirmação definitiva dos casos. Em segundo, não foram realizadas coletas e análises ambientais, o que impediu a identificação da fonte exata de exposição ao patógeno. Também houve perdas no seguimento sorológico, com apenas 46% dos participantes completando a terceira coleta, o que limitou a análise longitudinal dos títulos dos anticorpos. Da mesma forma, o fato de um participante ter realizado a quarta coleta impossibilitou a análise estatística deste ponto adicional. Outros fatores que podem ter influenciado a variabilidade dos títulos sorológicos incluem a ausência de informações detalhadas sobre comorbidades, estado imunológico e intensidade de exposição aos propágulos fúngicos. Apesar das limitações, os achados desse estudo reforçam a importância dos ensaios sorológicos, especialmente do *immunoblotting*, como ferramenta diagnóstica valiosa na elucidação de surtos de histoplasmose, sobretudo quando a informação micológica não é viável.

Do ponto de vista da saúde pública, recomenda-se fortemente a adoção de medidas de prevenção em áreas de risco. Visitantes de cavernas e profissionais envolvidos em atividades associadas devem utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados, como máscaras, luvas, toucas descartáveis, proteção para os sapatos (propés) e vestimentas protetoras, que devem ser corretamente descartados após uso único. Além disso, deve-se evitar levar as mãos à boca, nariz ou olhos, assim como consumir água de minas e nascentes ou se alimentar e acampar no interior das cavernas. A coleta de solo, rochas, plantas ou animais, exceto para fins científicos autorizados, também deve ser evitada, uma vez que esses materiais se constituem em potenciais fontes de infecção. Recomenda-se que as unidades de saúde notifiquem casos confirmados ou suspeitos de histoplasmose à vigilância epidemiológica, a fim de permitir a adoção de ações preventivas, como a interdição temporária dos locais contaminados e o reforço de orientações acerca dos riscos associados à exposição ambiental.

Conclusões

Além das implicações diagnósticas, os achados do estudo evidenciam a necessidade de estabelecer protocolos específicos de vigilância, investigação e resposta rápida a surtos de histoplasmose, sobretudo em regiões turísticas como áreas naturais conhecidas por abrigarem morcegos. Para surtos ou microepidemias semelhantes às descritas neste trabalho, recomenda-se a adoção das seguintes ações coordenadas: notificação obrigatória e comunicação imediata mesmo quando o diagnóstico é presuntivo, investigação epidemiológica ativa, coleta e análise de amostras clínicas, medidas de contenção e controle ambiental, educação em saúde, prevenção e monitoramento clínico e sorológico pós-exposição dos indivíduos expostos por pelo menos 6 a 8 semanas, com coletas seriadas para detecção de soroconversão ou elevação de títulos.

Por fim, a integração entre saúde, meio ambiente e turismo é essencial para mitigar os riscos associados à histoplasmose bem como a outras micoses de origem ambiental. Esse estudo demonstra a relevância de estratégias diagnósticas sorológicas, especialmente o uso de *immunoblotting*, em cenários de surto onde métodos micológicos não são viáveis, e reforça a necessidade de políticas de vigilância específicas para micoses endêmicas negligenciadas no Brasil.

Referências

1. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020;41(1):13-30. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1698429>.
2. Toscanini MA, Nusblat AD, Cuestas ML. Diagnosis of histoplasmosis: current status and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(5):1837-59. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11170-9>.
3. Galgiani JN, Kauffman CA. Coccidioidomycosis and Histoplasmosis in Immunocompetent Persons. *N Engl J Med*. 2024;390(6):536-47. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra2306821>.
4. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC; Association With The LIFE Program. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 2016; 59(3):145-50. DOI: <https://doi.org/10.1111/myc.12427>.
5. Caterino-de-Araujo A, Campos KR, Alves IC, Vicentini AP. HTLV-1 and HTLV-2 infections in patients with endemic mycoses in São Paulo, Brazil: A cross-sectional, observational study. *Lancet Reg Health Am*. 2022 29;15:100339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100339>.
6. Santos MCP e Pedrosa CMS. Inquérito epidemiológico com histoplasmina e paracoccidioidina em Arapiraca – Alagoas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1990;23(4):213-5. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86821990000400006>.
7. Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of Histoplasmosis. *Braz J Microbiol*. 2006;37(1):1-13. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100001>.
8. Almeida MA, Almeida-Silva F, Guimarães AJ, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. *Int J Infect Dis*. 2019;86:147-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.009>.
9. Vicentini AP, Kohara VS, Passos AN, Feliciano RS, Barreto LC, Freitas RS, et al. Microepidemia de histoplasmose no município de Arapeí, São Paulo. *BEPA*. 2008;5(58):4.
10. Martins EML, Marchiori E, Damato SD, Pozes AS, Silva ACG, Dalston M. Histoplasmose pulmonar aguda: relato de uma microepidemia. *Radiol Bras*. 2003;36(3):5.
11. Lima HCAV, Barrado JCS, Rocha S, Muniz MV, Braga FF, Millington A et al. Investigação de surto de Histoplasmose após curso de captura de morcegos hematatófagos, Cáceres, Mato Grosso, 2007. *Mostra Nacional de Experiências Bem-sucedidas em Epidemiologia, Prevenção e Controle de Doenças; Brasília-DF, Brazil* 2008.
12. Oliveira FdM, Unis G, Severo LC. Microepidemia de histoplasmose em Blumenau, Santa Catarina. *J Bras Pneumol*. 2006;32:375-8.
13. Unis G, Roesch EW, Severo LC. Histoplasmose pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. *J Bras Pneumol*. 2005;31:52-9.

14. Rocha-Silva F, Figueiredo SM, Silveira TT, Assuncao CB, Campolina SS, Pena-Barbosa JP, et al. Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave–Minas Gerais state, Brazil. *Med Mycol Case Rep.* 2014;4:1-4.
15. Alves AJS, Figueiredo JA, Millington MA, Segatto TCV, Cardoso AV, Von Glehn M de P, et al. Investigação de surto de Histoplasmose pulmonar aguda entre bombeiros em Brazlândia, Distrito Federal, 2017. *J Health Biol Sci. J Health Biol Sci.* 2021;9(1):1-7.
16. Guerra BT, Almeida-Silva F, Almeida-Paes R, Basso RP, Bernardes JPRA, Almeida MA, Damasceno LS et al. Histoplasmosis Outbreaks in Brazil: Lessons to Learn About Preventing Exposure. *Mycopathologia.* 2020;185(5):881-892. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00389-w>.
17. Eichenberger EM Little JS, Baddley JW. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2025;39(1):145-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2024.11.009>.
18. Cáceres DH, Gómez BL, Tobón AM, Chiller TM, Lindsley MD. Evaluation of a Histoplasma antigen lateral flow assay for the rapid diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in Colombian patients with AIDS. *Mycoses.* 2020;63(2):139-44. DOI: <https://doi.org/10.1111/myc.13023>.
19. Alvarado P, Pérez-Rojas Y, Zambrano EA, Gonzatti MI, Roschman-González A. Improved serodiagnosis of histoplasmosis by use of deglycosylated extracellular released antigens of Histoplasma capsulatum. *J Microbiol Methods.* 2020;175:105981. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105981>.
20. Fida M, Misra A, Harring JA, Kubbara A, Theel ES. Histoplasma capsulatum Complement Fixation and Immunodiffusion Assay Sensitivity in Culture-Confirmed Cases of Histoplasmosis: a 10-Year Retrospective Review (2011 to 2020). *J Clin Microbiol.* 2022 19;60(10):e0105722. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01057-22>.
21. Passos AN, Kohara VS, de Freitas RS, Vicentini AP. Immunological assays employed for the elucidation of an histoplasmosis outbreak in Sao Paulo, SP. *Braz J Microbiol.* 2014;45(4):1357-61. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400028>.
22. Almeida M de A, Pizzini CV, Damasceno LS, Muniz Mde M, Almeida-Paes R, Peralta RH, Peralta JM et al. Validation of western blot for Histoplasma capsulatum antibody detection assay. *BMC Infect Dis.* 2016 24;16:87. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1427-0>.
23. Almeida-Paes R, Bernardes-Engemann AR, da Silva Motta B, Pizzini CV, de Abreu Almeida M, de Medeiros Muniz M, Dias RAB, Zancopé-Oliveira RM. Immunologic Diagnosis of Endemic Mycoses. *J Fungi (Basel).* 2022 22;8(10):993. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8100993>.
24. Ouchterlony O. Antigen – Antibody reactions in gels. *Acta Path Microbiol Scand.* 1949;26(4):507-15.
25. Moreto TC. Diagnóstico da paracoccidioidomicose em pacientes atendidos em serviços de rotina de hospital universitário [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2010.
26. Freitas RS, Kamikawa CM, Vicentini AP. Fast protocol for the production of Histoplasma capsulatum antigens for antibody detection in the immunodiagnosis of histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(1):27-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.04.004>.

27. Freitas-Xavier RS, Maciel, IAF; Freitas, Teixeira VL, Vicentini AP. Factors interfering with the production of *Histoplasma capsulatum* antigens Rev Inst Adolfo Lutz. 2023;82:e39242. DOI: <https://doi.org/10.53393/rial.2023.v.82.39242>.
28. Benedict K, Mody RK. Epidemiology of Histoplasmosis Outbreaks, United States, 1938-2013. Emerg Infect Dis. 2016;22(3):370-8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2203.151117>.
29. Calanni LM, Pérez RA, Brasili S, Schmidt NG, Iovannitti CA, Zuiani MF, Negroni R, Finkelievich J, Canteros CE. Brote de histoplasmosis en la provincia de Neuquén, Patagonia Argentina. Rev Iberoam Micol. 2013;30(3):193-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.12.007>.
30. Diaz JH. Environmental and Wilderness-Related Risk Factors for Histoplasmosis: More Than Bats in Caves. Wilderness & Environmental Medicine. 2018;29(4):531-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wem.2018.06.008>.
31. Rossini TF, Goulart LS. Histoplasmose clássica: Revisão. RBAC. 2006;38(4):275-79. Disponível em: https://lume-re-demonstracao.ufrgs.br/atlasmicologia/files/Link_Caso_16.pdf.
32. Cury GC, Diniz Filho A, Cruz AGdCe, Hobaika ABdS. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34:483-6.
33. Erkens K, Lademann M, Tintelnot K, Lafrenz M, Kaben U, Reisinger EC. Histoplasmosis group disease in bat researchers returning from Cuba. Dtsch Med Wochenschr. 2002;127(1-2):21-5. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2002-19428>.
34. Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, Eimen T, Lindsley MD, Cali S, Conover CS, Dworkin MS. Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. Environ Health Perspect. 2005;113(5):585-9. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.7484>.

Contribuição dos autores

Todos os autores participaram ativamente da coleta de dados, elaboração e revisão final do manuscrito. Camila Mika Kamikawa Boldo, Plinio Trabasso, Rose Clélia Grion Trevisane, Maria Helena Postal Pavan, Edite Kazue Taninaga e Adriana Pardini Vicentini: concepção e delineamento das análises laboratoriais; análise crítica e interpretação dos resultados obtidos. Camila Mika Kamikawa Boldo, Plinio Trabasso, Rose Clélia Grion Trevisane, Maria Helena Postal Pavan, Edite Kazue Taninaga e Adriana Pardini Vicentini: análise crítica e interpretação dos resultados obtidos e elaboração da redação. Camila Mika Kamikawa Boldo e Josefa Maria da Hora Silva e Lima: realização dos ensaios sorológicos, tabulação dos dados. Hamilton Bertan, Inajara de Cassia Guerreiro, Mayara de Freitas Pereira: responsáveis pelas entrevistas dos indivíduos, coleta de amostras. Todos os autores foram responsáveis pela revisão e aprovação final do texto. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Preprint

O manuscrito não foi previamente publicado em servidores preprint.

Aprovação dos autores

Os autores participaram efetivamente do trabalho, aprovam a versão final do manuscrito para publicação e assumem total responsabilidade por todos os seus aspectos, garantindo que as informações sejam precisas e confiáveis.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesse de natureza política, comercial e financeira no manuscrito.

Financiamento

Os autores declaram que não houve fontes de financiamento.