



Universidade de Brasília
Campus Darcy Ribeiro, Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da
Faculdade de Medicina

**Epidemiologia Molecular da histoplasmose: Uma visão
ampla no Centro-Oeste do Brasil e nos Estados Unidos**

Bernardo Guerra Tenório

Tese de Doutorado

Brasília,
2024

Bernardo Guerra Tenório

Epidemiologia Molecular da histoplasmose: Uma visão ampla no Centro-Oeste do Brasil e nos Estados Unidos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Marcus de Melo Teixeira

Brasília,
2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GG934Ee Guerra Tenório, Bernardo
Epidemiologia Molecular da histoplasmose: Uma visão ampla no Centro-Oeste do Brasil e nos Estados Unidos / Bernardo Guerra Tenório; orientador Marcus de Melo Teixeira; co-orientador - -. -- Brasília, 2024.
157 p.

Tese(Doutorado em Patologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2024.

1. Epidemiologia molecular. 2. Histoplasmose. 3. Histoplasma. 4. Distrito Federal. 5. Estados Unidos. I. de Melo Teixeira, Marcus, orient. II. -, -, co-orient. III. Título.

Bernardo Guerra Tenório

Epidemiologia Molecular da histoplasmose: Uma visão ampla no Centro-Oeste do Brasil e nos Estados Unidos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Dr. Marcus de Melo Teixeira

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wildo Navegantes Araújo
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Rio de Janeiro

Prof. Dr. Joaquim Lucas Júnior
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Brasília

Prof. Dr. Marcus de Melo Teixeira (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves (Suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à minha família, meu pilar de sustentação física, emocional e espiritual.

Agradeço profundamente aos meus pais, André e Pollyanna, pelo suor e sangue derramados para me proporcionarem um ensino de qualidade, foi o fator determinante para que eu alcançasse este momento. Dedico este texto à minha esposa e companheira até a morte, Ana Carolina, pela oportunidade de demonstrar meu valor e honra como homem. Por último e não menos importante, à minha filha, Lumi, que me ensinou a ser pai e despertou a vontade de ser uma pessoa melhor a cada dia para servir de exemplo a ela.

Agradecimentos

Agradeço ao (à):

Minha família e aos parentes espalhados pelo Brasil e pelo mundo, vocês, em algum momento, fizeram, fazem ou ainda farão parte da minha vida. Com vocês eu aprendi a ser um cidadão exemplar, que segue os valores de um homem que anseia e luta por um futuro melhor.

Minha família de Uberlândia, Belo Horizonte e Monte Alegre, obrigado pela melhor infância que uma criança poderia ter!

Minha família de Recife e João Pessoa, obrigado por sempre me acolher em suas casas durante nossas viagens ao Nordeste, terra de gente sofrida e que não se deixa abalar pelas adversidades.

Minha família de São João d'Aliança, obrigado por cuidarem bem das minhas meninas e por me receberem de braços abertos quando souberam da vinda da Lumi ao mundo.

Minha família de Brasília, que sempre me convida para datas importantes e que se preocupa comigo não importa quanto tempo passe.

Meus falecidos avós, José Domingues Guerra, que era um cara excepcional em todos os sentidos, pena que era vascaíno, e Myriam Machado de Sá, uma pessoa que sempre cuidou de mim independente da situação, descansem em paz, seu legado está garantido.

Meu pai, André Ricardo Tenório Pinto, rapaz que saiu cedo de casa pra tentar a vida em outro lugar e que passou por muitas situações difíceis. Nunca deixou nada faltar em casa apesar da rotina cansativa, estresses no trabalho e vida pessoal. Saiba que eu o observei desde quando me entendo por gente, seus erros e acertos. Hoje sou pai e compreendo tudo o que aconteceu, os dias bons e os dias ruins. Você é o exemplo de pai que todos os filhos deveriam ter e sei que nem todos têm esse privilégio. Por isso, agradeço pai, ao teu esforço e coragem em lutar por sua família até a exaustão.

Minha mãe, Pollyanna Machado de Sá Guerra, eu agradeço pelo toque materno, carinho, apoio, cafunés e entrega sem igual. O amor de uma mãe pelo filho é algo inexplicável e recíproco. Eu seria capaz de tudo pela senhora. Você é a base de toda a família. Você faz parte de algo muito maior, divino, pois és capaz de conceder a vida. E assim tu fizeste, concebeu três vidas das quais eu me orgulho muito. Eu te amo.

Meu irmão Otávio, fa (piada interna). À minha irmã Alice, você ainda terá um longo caminho pela frente, mas é uma criança esperta e cheia de energia. Siga os meus passos e os passos dos seus pais e você se tornará uma grande mulher. Ao Luy, meu padrasto, obrigado por cuidar da minha mãe e fazê-la feliz, admiro muito a família que você formou.

Minha sogra, Alice, agradeço eternamente por toda ajuda e suporte desde que soube da gravidez da Lumi. Sem você eu não sei onde estaria. Ao Alexandre, meu cunhado, tu é um cara muito legal e um homem decente, um amigo que levarei pra vida.

Minha esposa, Ana Carolina Dieter Chrisostomo, desde o momento em que te conheci, soube que você era a pessoa certa pra mim. Tivemos nossas desavenças como todos os casais tem, mas passamos por isso. A chegada da nossa pequena nos trouxe dúvidas e angústias, passamos por maus bocados e olha onde estamos hoje. Você é e sempre será a viga que sustenta nossa casa e nossos sonhos. Eu permaneço envolto pelas chamas pois sua luz significa tudo para mim. Mesmo que a morte nos separe, eu te amarei e sei que sentes o mesmo. À minha filha e princesinha, Lumi Dieter Guerra, papai não consegue expressar em palavras a alegria que você me traz todos os dias. Sua voz, seu olhar, seu sorriso, seus cabelos, sua inteligência fora da curva. Tudo isso eu amo. Me empenharei para que você cresça saudável e se torne uma mulher digna e que tenha mais oportunidades do que eu tive, pois esse é o papel de um pai.

Meus amigos, e aqui precisarei de algumas páginas porque são muitos. João Paulo, vulgo Boy, ao longo desses quase 10 anos de amizade, passamos por muitas aventuras juntos. Considero-te como um irmão de outra mãe. Apesar do péssimo

gosto musical, você é um amigo incrível. Seja me ajudando no laboratório ou na vida pessoal, você sempre se mostrou disposto e prestativo, apesar de eu preferir que me mandasse mensagem ao invés de ligar. Eu estava lá quando você não conseguiu segurar seus sentimentos, tamanha confiança que você tem em mim, e esse sentimento é recíproco. Aos 80 anos, se chegarmos até lá, sei que seremos os mesmos de hoje e isso não tem valor material que pague. Te amo, amigo.

Meu orientador, Marcus de Melo Teixeira, que me acolheu em seu laboratório lá em 2019, após apresentarmos um projeto escrito em um mês e eu ingressar no mestrado (com bolsa!). Hoje, muito mais que isso, um amigo e companheiro de pesquisa. Sempre foi compreensivo, um orientador muito presente, o que é raro, que tem a paciência de ensinar do zero e que respeitou meus limites, mas me pressionou pra que eu crescesse profissionalmente. As reuniões sempre foram descontraídas, mas sem perder a seriedade e foco no trabalho, as músicas durante as sessões de produtividade tiveram altos e baixos, e ainda bem que você largou o cigarro! Brincadeiras à parte, você foi o melhor orientador que eu poderia ter. Agradeço todos os dias por contribuir com a ciência do nosso país em publicações de alto nível ao seu lado. Sinto que a relação orientador-orientando já não se trata mais de uma hierarquia, pois você quer me ver crescer e me tornar um pesquisador que te superará. Apesar de toda a carga que você acumula no trabalho e na vida pessoal, sempre manteve o respeito e a humildade como se eu fosse um pesquisador do mesmo nível e isso é um diferencial que me faz sentir disposto a continuar. Obrigado. Espero continuarmos juntos nesse caminho até quando for possível.

Outros membros do Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biotecnologia (LabMIB) e do grupo do Laboratório de Ecologia e Evolução e Micoses Endêmicas (LEEME) Lucas Alves, Luz Chamorro, Luíza Alves, Gustavo Soares, Nathalia Rodrigues, Ana Luiza, Carlos Molano e aos futuros integrantes, obrigado pelos momentos que o mundo acadêmico nos proporciona dentro e fora do laboratório. É um prazer muito grande compartilhar o mesmo espaço com jovens pesquisadores empenhados e decididos como vocês. Estou aqui para trilhar esse caminho e trocar experiências para que um dia sejamos referências internacionais.

Meu primeiro orientador, Luís Isamu Barros Kanzaki (Kanzaki-sensei), que abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse adquirir a experiência para me tornar um grande pesquisador. Através dele, sempre humilde e atencioso, pude aprender sobre o funcionamento de um laboratório, os reagentes, a preparar soluções, testar equipamentos, utilizar um fluxo laminar, cultivar células, extrair DNA, dentre muitas outras coisas. Obrigado pela paciência e investimento que o senhor fez em mim. Não será desperdiçado. Aproveito ainda para agradecer aos antigos membros deste laboratório Sarah Napoleão, Munnah e Sheyla Rocha, por me permitirem aprender com os projetos de vocês.

Meus amigos Ana Luíza, Eduardo e Isadora, obrigado pelas experiências durante a graduação. Vocês me conhecem muito bem e sabem que eu estimo a nossa amizade como se fosse algo sagrado. Luana Honório, você é o brinde que veio junto com o Boy, e que brinde inesperado e agradável! Estou muito tranquilo em saber que meu melhor amigo divide a vida com uma mulher tão incrível como você, que além de cozinhar muito bem, cuida da casa e tenho certeza que será uma excelente mãe.

Meus amigos de Brasília, Titi, Lex, Victor (a velha), Rafael, Dario Pato (Pario Dato), Thaís, Matheus (Embrião), Matheus (Avelã), Daniel (Minibau), Samara, Letícia, Pereirinha (Pegueguinha) e Lindomar, obrigado pelos dias de Orgutal, às jogatinas nas respectivas casas, às memórias reconfortantes de dias em que ainda não havíamos atingido a vida adulta. Entendo que todos crescemos e que cada um tem a sua vida pra cuidar agora, mas gostaria que nos reuníssemos em um futuro próximo para revivermos os dias de plena amizade.

Meus amigos Luis, Michael, João Pedro, Geanne, João Lucas, Artie, Bruna e Jade, agradeço por me acolherem mesmo com diversas opiniões controversas, principalmente no campo político, futebolístico e dos games. Saibam que em momento algum eu senti raiva de algum de vocês por discordarem de mim e fico feliz em saber que são pessoas civilizadas e democráticas que só almejam viver em um país melhor.

Aos meus amigos virtuais Tiago Scatolini, João Henrique, Marcus, Wendel, Marckellys, Adinho, Maverick, Dudu, Edgar, Douglas, Diones, Olinda, com quem compartilho uma profunda amizade de uma década. Obrigado pelos momentos de

diversão, pelas risadas, péssimo inglês, alemão e russo, zoeiras, frases marcantes e distração desse mundo difícil.

Pessoal do LACEN-DF, Amabel Fernandes, Adair, Patrícia Midori, Jorge, Marinilda, dentre outros, por me receberem tão bem e possibilitarem meu crescimento profissional em um dos centros de referência para as micoses no DF.

Professores que coordenam os diversos laboratórios da UnB e que participaram da minha formação acadêmica, André Nicola, Hugo Paes, Patrícia Albuquerque, Maria Sueli Soares Felipe, Sebastien Charneau, Anamélia Lorenzetti, Ildinete Pereira, Fernando Araripe, Lídia Pepe, Nádia Parachin, Gandulfo, Ruviano, Márcia Mortari, Elizabeth Ferroni, Lorena Derengowski, Fernando Lucas de Melo, Amarilis Neder, Werner Treptow, Talita Souza, Thomas Williams, Sonia Maria, Marlene Teixeira, Marcelo Hermes, Carlos André Ornelas, Marcelo Valle, Élide Campos, Andrea Maranhão, Bergmann Ribeiro, Tatsuya Nagata, Cecília Favali, Daniel Ardisson, Edivaldo Ximenes, Georgios Pappas, Izabela Charneau, Jose Raimundo Correa, Kelly Grace, Luis Henrique Vale, Marcelo Brígido, Vicente Martins, Cristina Castro, João Paulo Longo, Lúcio Flávio, Osmindo Rodrigues, Mariana Hecht, Andreza Fabro, Lilian Gimenes, Renato Caparroz, Nadjar Nitz, Paulo César Motta, e a tantos outros que eventualmente participaram dessa jornada.

Todos os colaboradores externos, especialmente à Dra. Bridget Barker, Dra. Lalitha Gade, ao Dr. Daniel Matute e ao Dr. Jason Stajich por contribuírem com seus conhecimentos científicos e disponibilizarem suas estruturas computacionais para o desenvolvimento das análises de bioinformática.

Universidade de Brasília, por manter a infraestrutura necessária para viabilizar a execução dos projetos.

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina que garantiu o respaldo ético para que pudéssemos conduzir esta pesquisa legalmente.

Agências de fomento: Departamento de Serviços de Saúde do Arizona [número da concessão ADHS14-082975]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [número da concessão 434640/2018-2], [140427/2022-8];

Programas e Iniciativas de Pesquisa Multicampi da UC e Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) [número da concessão 5U19AI 166058]; Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [número da concessão 88887.343296/2019-00]. Agradeço pelo auxílio financeiro, incluindo a concessão de bolsas de estudo das quais pude usufruir, bem como financiamento de insumos e reagentes e passagens/diárias para congressos científicos.

Integrantes da banca, que se disponibilizaram a presenciar e contribuir com esta pesquisa.

TENÓRIO, B. G. **Epidemiologia Molecular da histoplasmose: Uma visão ampla no Centro-Oeste do Brasil e nos Estados Unidos**. 2024. 157 páginas. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

Resumo

A histoplasmose, doença fúngica invasiva e endêmica nas Américas, é causada pelo fungo termodimórfico *Histoplasma* sp. A infecção, subclínica ou assintomática na maioria dos imunocompetentes, apresenta alta taxa de mortalidade em imunocomprometidos. No Brasil, observa-se alta incidência nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e é causada majoritariamente pela espécie *Histoplasma suramericanum*. Esta micose incorpora a lista de doenças tropicais negligenciadas, e possui notificação compulsória apenas nos estados de Goiás e Rio de Janeiro. Em contrapartida, o Distrito Federal, inserido geograficamente em Goiás, apresenta poucos casos relatados e epidemiologia escassa. Já nos Estados Unidos, a histoplasmose está concentrada no centro-leste, causada pelas espécies *H. ohiense* e *H. mississippiense*, mas isolados ambientais já foram encontrados em áreas não endêmicas. Este estudo retrospectivo identificou, entre casos confirmados e prováveis, 34 casos de histoplasmose entre 1994 e 2022, no Distrito Federal e Goiás. Análises filogenômicas revelaram *H. suramericanum* e *H. capsulatum* LamB como agentes etiológicos. Uma letalidade de aproximadamente 43% foi observada em pacientes HIV positivos, incluindo seis casos de coinfeções com outras doenças. Nos Estados Unidos, o sequenciamento de 62 novos genomas por plataforma Illumina confirmou que a histoplasmose é causada por duas principais espécies, *H. ohiense* e *H. mississippiense*, com casos esporádicos causados por *H. suramericanum* na Califórnia e no Texas. Enquanto *H. ohiense* prevalece nos estados do leste, *H. mississippiense* foi observado predominantemente nas regiões central e oeste dos Estados Unidos, mas também com sobreposição geográfica em algumas áreas, sugerindo a possibilidade de co-ocorrência dessas espécies. O Modelamento de Distribuição de Espécies revelou que *H. ohiense* prospera em locais com condições mais quentes e secas, enquanto *H. mississippiense* é endêmico em áreas com temperaturas mais baixas e com maior precipitação. Além disso, previmos múltiplas

áreas de zonas de contato secundário, onde as duas espécies coocorrem, com a possibilidade de intercâmbio gênico e hibridização. Esses resultados destacam a incidência e diversidade da histoplasmose em duas áreas endêmicas do continente Americano, evidenciando a necessidade de maior atenção das autoridades de saúde, especialmente considerando o aumento de casos de pessoas vivendo com HIV e relatos de histoplasmose em regiões não tradicionalmente endêmicas. O estudo retrospectivo e molecular no Distrito Federal contribui para a compreensão local da epidemiologia, enquanto a análise nos Estados Unidos oferece informações valiosas sobre a distribuição geográfica das espécies, sendo essenciais para estratégias preventivas e de controle.

Palavras-chave: *Histoplasma*; histoplasmose; epidemiologia molecular; Distrito Federal, Estados Unidos

TENÓRIO, B. G. **Molecular Epidemiology of histoplasmosis: a broad overview in the Midwest of Brazil and the United States.** 2024. 157 pages. Thesis (Ph.D. in Molecular Pathology) – University of Brasília, Brasília, 2024."

Abstract

Histoplasmosis, an invasive fungal disease endemic to the Americas, is caused by the thermodimorphic fungus *Histoplasma* sp. The infection, often subclinical or asymptomatic in most immunocompetent individuals, presents a high mortality rate in immunocompromised patients. In Brazil, there is a high incidence in the South, Southeast, and Central-West regions, primarily caused by the species *Histoplasma suramericanum*. This mycosis is listed among neglected tropical diseases and is subject to mandatory reporting only in the states of Goiás and Rio de Janeiro. In contrast, the Federal District, geographically located within Goiás, reports few cases, with limited epidemiological data. In the United States, histoplasmosis is concentrated in the central-eastern region and caused by the species *H. ohioense* and *H. mississippiense*, although environmental isolates have been identified in non-endemic areas. This retrospective study identified 34 cases of histoplasmosis (confirmed and probable) between 1994 and 2022 in the Federal District and Goiás. Phylogenomic analyses revealed *H. suramericanum* and *H. capsulatum* LamB as the etiological agents. A lethality rate of approximately 43% was observed among HIV-positive patients, including six cases of coinfections with other diseases. In the United States, the sequencing of 62 new genomes using the Illumina platform confirmed that histoplasmosis is caused by two primary species, *H. ohioense* and *H. mississippiense*, with sporadic cases caused by *H. suramericanum* in California and Texas. While *H. ohioense* predominates in the eastern states, *H. mississippiense* is observed primarily in central and western regions, with some geographical overlap suggesting possible co-occurrence of these species. Species Distribution Modeling revealed that *H. ohioense* thrives in warmer and drier conditions, whereas *H. mississippiense* is endemic to cooler areas with higher precipitation. Additionally, multiple zones of secondary contact were predicted, where both species coexist, suggesting potential genetic exchange and hybridization. These findings highlight the incidence and diversity of

histoplasmosis in two endemic areas of the Americas, emphasizing the need for greater attention from health authorities, particularly given the increasing cases among people living with HIV and reports of histoplasmosis in traditionally non-endemic regions. The retrospective and molecular study in the Federal District contributes to local epidemiological understanding, while the analysis in the United States provides valuable insights into species' geographic distribution, essential for preventive and control strategies.

Key-words: *Histoplasma*, histoplasmosis, molecular epidemiology, Federal District, United States

Índice de Ilustrações

Figura 1. Pesquisadores que contribuíram diretamente para a história e caracterização do <i>Histoplasma</i> e da histoplasmose no Brasil e nos Estados Unidos.	26
Figura 2 - Morfologia da fase leveduriforme dos fungos <i>Cryptococcus farciminosus</i> (A) e (B), <i>Histoplasma</i> sp. (C) e células de <i>Leishmania</i> sp. na forma amastigota fagocitadas por um histiócito (D).....	27
Figura 3. Epidemiologia mundial estimada da histoplasmose.	29
Figura 4. Casos de histoplasmose relatados no Brasil desde a primeira notificação em 1939.	33
Figura 5. Incidência de histoplasmose de 2007 a 2016, acima de 65 anos e beneficiários do Medicare service por estado.	36
Figura 6. Áreas dos Estados Unidos onde o ambiente é provavelmente adequado para o crescimento do fungo <i>Histoplasma</i> sp..	38
Figura 7. Árvore filogenética de gêneros de fungos do Filo Ascomycetos.	42
Figura 8. Eventos de radiação das espécies crípticas de <i>Histoplasma</i>	44
Figura 9. Árvore filogenética do gênero <i>Histoplasma</i>	45
Figura 10. Árvore filogenética sem raiz das espécies de <i>Histoplasma</i>	46
Figura 11. Um exemplo de introgressão de <i>H. mississippiense</i> para <i>H. ohioense</i>	47
Figura 12. Processo de infecção por <i>Histoplasma</i> sp.	49
Figura 13. Morfologia das colônias de <i>Histoplasma</i> sp. e suas respectivas microscopias.	51
Figura 14. Métodos disponíveis para o diagnóstico da histoplasmose.	60
Figura 15. Fluxograma do processo de recuperação, extração e análises filogenéticas dos 18 isolados de <i>Histoplasma</i> sp. da micoteca do Hospital Universitário de Brasília, Brasília-DF.	66
Figura 16. Fluxograma do processo de recuperação, extração e análises filogenéticas e de genética de populações dos isolados de <i>Histoplasma</i> sp. da micoteca do <i>Center for Control and Diseases Prevention</i>	66
Figura 17. Distribuição geográfica da residência de pacientes com histoplasmose nos municípios do estado de Goiás (A) e no Distrito Federal (B).	75
Figura 18. Amostras biológicas que possibilitaram o diagnóstico da histoplasmose.	75
Figura 19. Métodos de diagnóstico descritos para identificação dos casos de histoplasmose no HUB e no LACEN-DF.	76
Figura 20. Distribuição de coinfeções por resultado da sorologia para HIV.	77
Figura 21. Árvore filogenética de isolados de <i>Histoplasma</i> sequenciados na América Latina.	78
Figura 22. Fluxograma do diagnóstico da histoplasmose adotado nos EUA (CDC).	84
Figura 23. Fluxograma para rastreio de histoplasmose em pessoa vivendo com HIV/Aids (PVHA).	85

Índice de Tabelas

Tabela 1. Dados sumarizados do estudo retrospectivo da histoplasnose no DF e entorno.....	64
Tabela 2. Dados sociodemográficos dos pacientes com histoplasnose no Distrito Federal e em Goiás de 1994 a 2022.....	65
Tabela 3. Óbitos de histoplasnose no Centro-Oeste obtidos via SIM.....	73

Abreviaturas e Siglas

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

BA - Bahia

BHI - Infusão cérebro-coração (*Brain-heart infusion*)

BLAST - Ferramenta para Busca de Alinhamento Local (*Basic Local Alignment Search Tool*)

CE - Ceará

DF – Distrito Federal

DNA - ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio enzimático por imunoabsorção (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

EPI - equipamento de proteção individual

EUA - Estados Unidos da América

GAL - Gerenciador de Ambiente Laboratorial

GM-CSF - Fatores estimuladores de colônias de granulócitos e macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factors*)

GMS - Gomori *methamine silver*

GO - Goiás

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Syndrome*)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ - Interferon γ

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 - Interleucina 17

IL-33 - Interleucina 33

LAmA - América latina A (*Latin America A*)

LAmB - América Latina B (*Latin America B*)

LBA - Lavado broncoalveolar

MAT – *Mating-type locus*

MG – Minas Gerais

MHC-I - *Major Histocompatibility Complex I*

MHC-II - *Major Histocompatibility Complex II*

ML - Máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*)

MYC – Mycosel

MT – Mato Grosso

NAm1 - América do Norte 1 (*North American 1*)

NAm2 - América do Norte 2 (*North American 2*)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

OK - Oklahoma

PAM - macrófagos alveolares pulmonares (*pulmonary alveolar macrophages*)

PAS - *periodic acid-Schiff*

PCA - Análise de componentes principais (*Principal components analysis*)

PCM - Paracoccidiodomicose

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

pH – potencial de Hidrogênio (*Hydrogen potential*)

PVHA – Pessoa vivendo com HIV/AIDS

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

(*Quantitative real-time polymerase chain reaction*)

RPM - Rotações por minuto

RJ – Rio de Janeiro

SAB – Sabouraud

SP – São Paulo

SBE - Sociedade Brasileira de Espeleologia

SH – Shimodaira-Hasegawa

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-nucleotide polymorphism*)

SUS - Sistema Único de Saúde

Ta1 - linfócito T auxiliar do tipo 1

Ta2 - linfócito T auxiliar do tipo 2

Ta17 - linfócito T auxiliar do tipo 17

TARV - tratamento antirretroviral

TGF- β – Fator de crescimento tumoral β (*Tumor Growth Factor β*)

TLR - Receptores *Toll-like* (*Toll-like receptors*)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

T reg. - linfócito T regulatório

VLA-5 - *Very Late Antigen-5*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. CONTEXTO GERAL DA HISTOPLASMOSE	23
1.1 INTRODUÇÃO AOS FUNGOS PATÓGENOS	23
1.1.1 O Reino Fungi	23
1.1.2 Histórico da histoplasmose	25
1.1.3 Epidemiologia	28
2. CARACTERÍSTICAS DO FUNGO <i>HISTOPLASMA</i> E DOENÇA	42
2.1 TAXONOMIA	42
2.2 CICLO DE VIDA	49
2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO FUNGO <i>HISTOPLASMA</i>	50
2.4 FORMAS CLÍNICAS DA HISTOPLASMOSE	52
2.5 IMUNOLOGIA DA INFECÇÃO POR <i>HISTOPLASMA</i>	54
2.6 DIAGNÓSTICO	56
2.6.1 Clínico-epidemiológico	57
2.6.2 Diagnóstico microbiológico	58
2.6.3 Diagnóstico Histopatológico	58
2.6.4 Diagnóstico Citopatológico	59
2.6.5 Diagnóstico Sorológico	59
2.6.6 Diagnósticos Moleculares	60
2.7 TRATAMENTO	61
3. JUSTIFICATIVA	62
4. OBJETIVOS	62
4.1 OBJETIVO GERAL	62
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63

5. MATERIAIS E MÉTODOS	63
5.1 ESTUDO RETROSPECTIVO DE SURTOS DE HISTOPLASMOSE NO BRASIL.....	63
5.2 GEORREFERENCIAMENTO E CARTOGRAFIA DOS SURTOS DE HISTOPLASMOSE NO BRASIL.....	64
5.3 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS DE PACIENTES COM HISTOPLASMOSE – ESTUDO RETROSPECTIVO NO DISTRITO FEDERAL.....	64
5.4 RECUPERAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>HISTOPLASMA</i> SP. DA MICOTECA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA E DOS ESTADOS UNIDOS.....	65
5.5 EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>HISTOPLASMA</i> DO DISTRITO FEDERAL E DOS ESTADOS UNIDOS.....	68
5.6 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>HISTOPLASMA</i> DO DISTRITO FEDERAL E DOS ESTADOS UNIDOS.....	68
5.7 MODELAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES <i>H. MISSISSIPPIENSE</i> E <i>H. OHIENSE</i> NOS ESTADOS UNIDOS.....	70
6. RESULTADOS	72
6.1 REVISÃO DOS SURTOS DE HISTOPLASMOSE NO BRASIL.....	72
6.2 ESTUDO RETROSPECTIVO DA HISTOPLASMOSE NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO.....	72
6.3 RECUPERAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS, SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E ANÁLISES DE FILOGENÉTICA.....	79
7. DISCUSSÃO	80
7.1 HISTOPLASMOSE NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO.....	80
7.2 HISTOPLASMOSE NOS ESTADOS UNIDOS (APÊNDICE 4).....	95
8. CONCLUSÕES	100
9. REFERÊNCIAS	101
10. APÊNDICES	121
APÊNDICE 1 – SURTOS DE HISTOPLASMOSE NO BRASIL: LIÇÕES PARA APRENDER SOBRE COMO PREVENIR EXPOSIÇÃO.....	121
APÊNDICE 2 – CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES COM HISTOPLASMOSE NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO.....	134
APÊNDICE 3 – ARTIGO EM PRODUÇÃO – EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE HISTOPLASMOSE NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL.....	139
APÊNDICE 4 – RASTREANDO A EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA HISTOPLASMOSE E A OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES NOS ESTADOS UNIDOS-	151

1. Contexto geral da histoplasmose

1.1 Introdução aos fungos patógenos

1.1.1 O Reino Fungi

Este reino contém uma estimativa de mais de 4 milhões de espécies distribuídas globalmente (mais de 10 milhões se considerarmos também as espécies crípticas) (Janbon *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019). Com indícios de divergência há aproximadamente 1,35 bilhões de anos, os fungos estão, atualmente, distribuídos em 13 Filos principais: Chytridiomycota, Neo-callimastigomycota, Olpidiomycota, Sanchytriomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Mortierellomycota, Glomeromycota, Aphelidiomycota, Rozellomycota, Ascomycota e Basidiomycota (Naranjo-Ortiz e Gabaldon, 2019; Strasser *et al.*, 2021; Strasser e Monaghan, 2022).

A extraordinária variedade morfológica e fisiológica dos fungos é evidente em suas formas unicelulares, como leveduras, e nas complexas estruturas multicelulares dos cogumelos (Corbu *et al.*, 2023). Estes podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, aquáticos e terrestres, nas mais extremas temperaturas e são peças fundamentais para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas em que habitam, principalmente por sua função de degradação de material orgânico, interações com plantas, fixação de nitrogênio, biorremediação, dentre outras funções (Choi e Kim, 2017; Strasser e Monaghan, 2022).

A diversidade genética e metabólica dos fungos também é evidente em sua capacidade de produzir uma ampla gama de compostos bioativos, incluindo antibióticos e enzimas industriais, portanto, compreender e preservar a diversidade dos fungos é essencial para a sustentabilidade dos ecossistemas e oferece oportunidades significativas para avanços em biotecnologia e medicina (Niego *et al.*, 2023). Ainda, há uma grande motivação em compreender os fungos de interesse médico, capazes de infectar e causar doenças em humanos, os chamados fungos patógenos humanos, pertencentes aos Filos Zigomicetos, Microsporidia, Ascomycetos e Basidiomicetos (Kohler *et al.*, 2014; Kohler *et al.*, 2017). Estes fungos invasivos são

responsáveis por diversas doenças fúngicas que afetam mais 6,5 milhões de pessoas no mundo e causam cerca de 3,8 milhões mortes por ano (Denning, 2024).

Dentro destes quatro Filos, as doenças fúngicas podem ser agrupadas em micoses superficiais/de mucosas, como as causadas por dermatófitos (ex.: *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton* spp.), e micoses invasivas, que geralmente se estabelecem primariamente nos pulmões ou são causadas por microrganismos da própria microbiota do hospedeiro (Kirkland e Fierer, 2020). Ainda, podemos separar as micoses sistêmicas em oportunistas, geralmente responsáveis por acometer indivíduos imunocomprometidos, como a aspergilose, candidíase, criptococose, mucormicose, pneumocistose e as verdadeiramente patogênicas ou primárias, que podem infectar indivíduos imunocompetentes e geralmente possuem alta letalidade entre os indivíduos imunocomprometidos (Rautemaa-Richardson e Richardson, 2017).

As micoses primárias são causadas pelos fungos endêmicos, ou seja, que estão restritos a regiões geográficas específicas (Queiroz-Telles *et al.*, 2017; Sil e Andrianopoulos, 2014). Este grupo pode ser subdividido em micoses por implantação, ou seja, de infecção por trauma subcutâneo, como a esporotricose, cromoblastomicose, Doença de Jorge Lobo, zigomicose subcutânea e micetoma; e as sistêmicas, representadas pela blastomicose, coccidioidomicose, paracoccidioidomicose (PCM), e histoplasmose, sendo esta última, o objeto de estudo desta pesquisa (Queiroz-Telles *et al.*, 2017; Sil e Andrianopoulos, 2014; Van Dyke *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que os fungos causadores de doenças em humanos são negligenciados em termos de gerenciamento de riscos biológicos para catástrofes globais quando comparados a políticas de preparo à pandemias causadas por vírus e bactérias enfrentadas previamente (Casadevall, 2017). Embora em humanos as doenças fúngicas não sejam consideradas como uma grande ameaça, em outros hospedeiros, os fungos são responsáveis por uma imensa devastação de ecossistemas, causando danos massivos a plantas, anfíbios, morcegos e répteis (Casadevall, 2017).

Entretanto, o cenário atual com relação a elevada prevalência de fungos patógenos humanos como a criptococose, aspergilose, candidíase e histoplasiose em indivíduos imunodeprimidos é alarmante e frente a alterações ambientais, principalmente climáticas, a emergência de novas espécies a partir da adaptação a condições extremas pode ser catastrófica (Cachera *et al.*, 2021; Nnadi e Carter, 2021).

Conseqüentemente, diversos autores ressaltam o papel ambiental como essencial na emergência de fungos patógenos, e, no caso dos fungos termotolerantes, podemos citar as alterações climáticas como um fator chave considerando a influência direta que exerce sobre a temperatura global na superfície terrestre e, conseqüentemente, sobre estes microrganismos (Nnadi e Carter, 2021). Estas variações climáticas, principalmente as relacionadas ao aquecimento da superfície global, implicam em seleção natural de espécies termotolerantes e com mecanismos de adaptação mais refinados e acabam por gerar descendentes mais resistentes e possivelmente com fatores de virulência mais agressivos (van Rhijn e Bromley, 2021).

1.1.2 Histórico da histoplasiose

Durante a construção do Canal do Panamá em meados de 1905, trabalhadores eram frequentemente diagnosticados com doenças tropicais, em específico as infecções por malária e leishmaniose (disponível em: https://www.cdc.gov/malaria/about/history/panama_canal.html). Em razão disso, um dos médicos locais, Samuel Taylor Darling, enquanto realizava autópsias destes trabalhadores buscando por traços de leishmaniose, encontrou peculiaridades nas mesmas e indagou a possibilidade de uma nova doença que assolava o Canal do Panamá (Darling, 1906) (Figura 1).

Darling observou em 3 pacientes distintos uma doença semelhante à tuberculose, porém que apresentava alguns pontos diferenciais como a grande infiltração de microrganismos arredondados com formação de granulomas em tecidos diversos: pulmões, baço, fígado, e medula óssea (Darling, 1906; Darling, 1908; Darling, 1909). Nesta ocasião, Darling caracterizou a doença como sendo causada por um protozoário no primeiro artigo de uma série, publicado em 1906.

Em 1912, Henrique Da Rocha-Lima observou que o “protozoário” descrito por Darling era, na verdade, mais próximo dos fungos, devido à identificação de leveduras similares às de *Cryptococcus farciminosus*, inicialmente descrito por Rivolta e Micellone em 1883, e que conseqüentemente se tornaria o fungo *H. capsulatum var. farciminosum* após mudanças na nomenclatura (Rocha-Lima, 1912; Bullen, 1949) (Figuras 1 e 2).

Décadas depois, em 1934, Katherine Dodd e Edna Tompkins isolaram com sucesso o fungo *Histoplasma* a partir de biópsias, seguido de William De Monbreun que conseguiu cultivar o fungo em ágar sangue a partir de autópsias de baço (1934), assim como identificou o primeiro caso de histoplasmose canina (1939) (de Monbreun, 1934; de Monbreun, 1939; Dodd e Tompkins, 1934) (Figura 1).

Estudos pioneiros como os do Dr. Chester Wilson Emmons e Dr. Libero Ajello mostraram uma gama de hospedeiros mamíferos passíveis de infecção por *Histoplasma* spp., incluindo animais silvestres, animais domésticos e foram os primeiros a isolar *Histoplasma* a partir de amostras de ambientais (Ajello e Zeidberg, 1951; Emmons, 1949; Emmons, 1950; Seyedmousavi *et al.*, 2018; Zeidberg *et al.*, 1952) (Figura 1).

No Brasil, o primeiro caso de histoplasmose foi relatado em 1939, 34 anos após o relato de Darling (Almeida e Lacaz, 1939). O primeiro surto foi registrado em 1946, envolvendo um cão e um humano (Pará, 1946). Desde então, casos isolados e surtos vêm sendo reportados em diferentes regiões do país, mas ainda não se conhece a real incidência da histoplasmose em território brasileiro (Almeida *et al.*, 2019) (Figura 1).

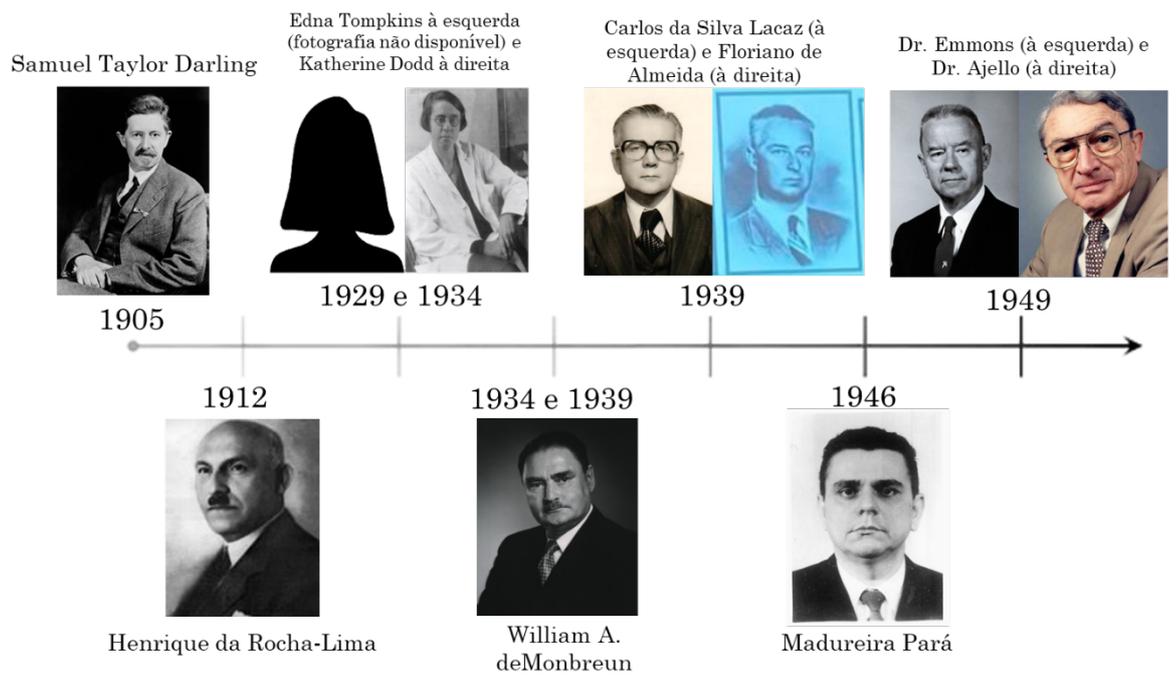


Figura 1. Pesquisadores que contribuíram diretamente para a história e caracterização do fungo *Histoplasma* e da histoplasmose no Brasil e nos Estados Unidos.

Fonte: autoria própria com imagens retiradas do banco de dados do Google Imagens.

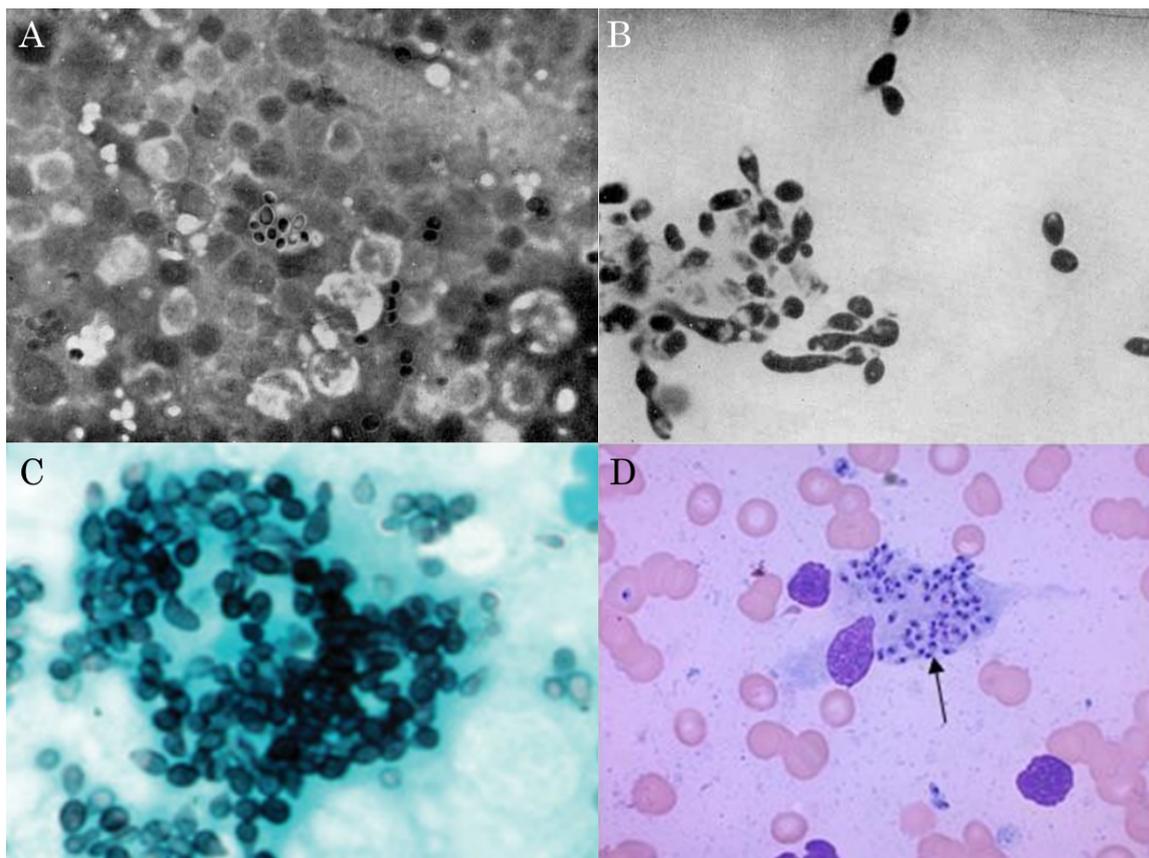


Figura 2 - Morfologia da fase leveduriforme dos fungos *Cryptococcus farciminosus* (A) e (B), *Histoplasma* sp. (C) e células de *Leishmania* sp. na forma amastigota fagocitadas por um histiócito (D).

Fonte: A e B foram adaptados de Bullen (1949), C foi adaptado de Azar *et al.* (2020), D foi adaptado de Torres-Vélez *et al.* (2022).

1.1.3 Epidemiologia

1.1.3.1 A histoplasmose no mundo

Seja de origens clínicas ou veterinárias, a histoplasmose já foi reportada em todos os continentes, com exceção da Antártica, onde foi apenas detectado por métodos moleculares em fezes de pinguim (Ashraf *et al.*, 2020; Linder e Kauffman, 2019; Moreira *et al.*, 2022). Ashraf e colaboradores compilaram o panorama epidemiológico estimado dos países afetados pela histoplasmose em escala mundial, demonstrando uma boa noção da distribuição de casos por continente (Ashraf *et al.*, 2020).

Observa-se uma maior incidência da doença em áreas de clima tropical e subtropical, como nos continentes americanos, porém este cenário vem alterando-se

à medida que novos casos autóctones são relatados em outras localidades consideradas não endêmicas (Figura 3). Na América do Sul, a histoplasmosose apresenta-se prevalente em pelo menos 10 países, com destaque no Brasil, Argentina, Colômbia, Venezuela e Guiana Francesa. Na América do Norte/Central a maior incidência de casos é reportada nos Estados Unidos da América (EUA), México, Panamá e Cuba. Além disso, o Canadá, um país considerado não endêmico da doença por décadas, apresentou novos casos autóctones relatados na província de Alberta e isolamento ambiental em um galinheiro próximo a uma universidade canadense (Dingle *et al.*, 2021).

Na África, a histoplasmosose já foi relatada em ao menos 31 países e concentra-se na África do Sul, Nigéria e Zimbábwe (Oladele *et al.*, 2018). Já na Europa, poucos casos foram reportados, mas há relatos de isolamento do fungo na Itália, Alemanha, Turquia, Espanha, Suíça e França, inclusive de animais silvestres (Antinori *et al.*, 2021; Ashbee *et al.*, 2008). Na Ásia, os casos concentram-se na Índia, China e Tailândia, sendo reportados casos esporádicos em outros países asiáticos (Goswami *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2007). Na Oceania, mais especificamente na Austrália, há relatos de infecções autóctones (McLeod *et al.*, 2011; Ralph *et al.*, 2006).

Para climas temperados, o coeficiente de incidência de histoplasmosose é estimada em 0.1-1 casos por 100.000 habitantes por ano, 10-100 casos por 100.000 habitantes por ano em trópicos úmidos, e superior a 100 casos em situações de surtos e grupos de risco (Adenis *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2011).

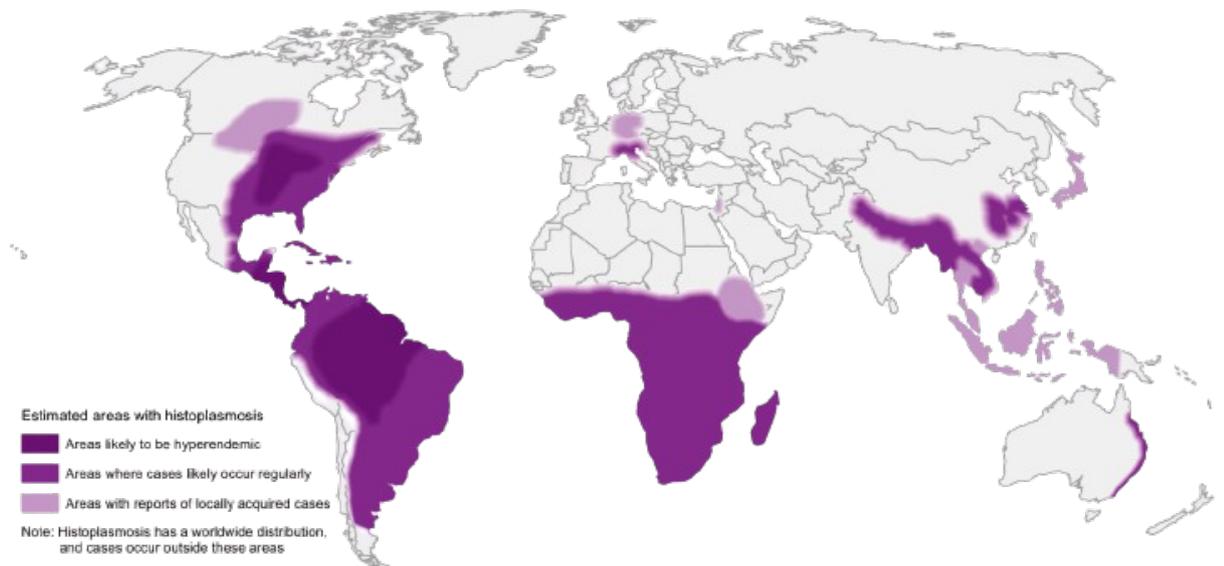


Figura 3. Epidemiologia mundial estimada da histoplasmose.

Fonte: adaptado de Ashraf *et al.* (2020).

A histoplasmose, assim como outras doenças fúngicas sistêmicas, começou a ganhar notoriedade simultaneamente ao surgimento dos casos de AIDS ao redor do mundo, em 1980 (Myint *et al.*, 2020). Além disso, essas micoses manifestam-se clinicamente quando relacionadas a outras comorbidades ligadas a imunossupressão primária e secundária como transplantes, terapia com imunobiológicos por corticoides e atualmente são consideradas como doenças definidoras do quadro de AIDS (Lortholary *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017).

A histoplasmose é responsável por grande parte dos óbitos em pacientes imunocomprometidos em vários países da América Latina, incluindo o Brasil (Cano-Torres *et al.*, 2019). Ainda, Adenis e colegas mostraram que as taxas de incidência e mortalidade para a histoplasmose em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) na América Latina podem ser superiores às da tuberculose (Adenis *et al.*, 2018).

As fontes mais comuns de infecção por *Histoplasma* são cavernas, grutas, construções abandonadas, minas e galinheiros (Benedict e Mody, 2016; Guerra *et al.*, 2019). Isto ocorre, pois, estes ambientes podem apresentar um grande acúmulo de fezes de morcegos e aves (matéria orgânica) e condições abióticas apropriadas para

o desenvolvimento do fungo (temperatura estável, pH, luminosidade e umidade) e para sua propagação (Taylor *et al.*, 2022).

Além de correntes de ar, um dos fatores sugeridos por auxiliar na dispersão do fungo *Histoplasma* para novos ambientes é justamente a interação com os hospedeiros mamíferos, em especial os quirópteros, que estão distribuídos por todos os continentes com exceção da Antártica (Hoff e Bigler, 1981; Kasso e Balakrishnan, 2013; Teixeira *et al.*, 2016).

A epidemiologia de vários patógenos está diretamente ligada com a ecologia de mamíferos e, no caso da histoplasmose, estudos descrevem a relação íntima e longínqua de adaptação que o fungo *Histoplasma* possui com os morcegos e a possível dispersão do fungo causada por padrões de migratórios desses mamíferos, podendo contaminar também o solo de novos ambientes através de fezes contaminadas (Da Paz *et al.*, 2018; Damasceno *et al.*, 2016).

Outra maneira de dispersão de fungos patógenos humanos ocorre através de desastres naturais, considerando o potencial de deslocamento a grande distâncias e introdução destes a novos ecossistemas, resultando em um grande número de infecções repentinas e com alta taxa de mortalidade, embora surtos sejam incomuns nestes casos (Benedict e Park, 2014; Smith e Casadevall, 2022).

Logo, vários trabalhos descreveram a ocorrência de surtos de histoplasmose ao redor do mundo (Benedict e Mody, 2016; Cottle *et al.*, 2013; Deepe, 2018; Guerra *et al.*, 2019; Ohno *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019). Ainda, um surto pode ser definido como a infecção de um número de indivíduos acima do esperado a partir de um mesmo evento de exposição, com espaço e tempo bem definidos (Houlihan e Whitworth, 2019).

1.1.3.2 Epidemiologia no Brasil

Dados epidemiológicos sobre a histoplasmose são extremamente escassos na maior parte do país, especialmente nas regiões Norte e Nordeste (Almeida *et al.*, 2019). Não existem disponíveis na literatura, dados sobre a histoplasmose para quatro estados da região Norte (Roraima, Rondônia, Acre e Tocantins) e para dois estados

da região Nordeste (Sergipe e Maranhão), sendo que os três primeiros casos autóctones nessas regiões só vieram a público em 2009 (Filho *et al.*, 2009).

As macrorregiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, embora distantes de um perfil epidemiológico ideal para a histoplasmose, possuem dados mais robustos. Nestas regiões foram publicados estudos de isolamento do fungo em amostras de solo, casos isolados e surtos da doença. Além disso, o estado do Goiás (GO) e, recentemente, o Rio de Janeiro são as únicas unidades federativas em que a histoplasmose é uma doença de notificação compulsória (Almeida *et al.*, 2019; Guerra *et al.*, 2019). Esta notificação ocorre devido à alta incidência de casos na região e à gravidade da infecção, principalmente em pacientes imunocomprometidos e foi instaurada a partir da Portaria SES-GO nº 004/2013 e Resolução 2485 de 18 de outubro de 2021, pelos respectivos governos dos estados, englobando também outras micoses endêmicas (Nascimento e Gomes, 2019).

Os dados disponíveis em território brasileiro são majoritariamente compostos por inquéritos epidemiológicos de reação intradérmica à histoplasmina (Colombo *et al.*, 2011; Londero e Ramos, 1978). Este método indica se o indivíduo já teve em contato com o patógeno e desenvolveu uma reação imunológica para ele, mesmo que assintomática ou subclínica (Ferreira e Borges, 2009).

Entretanto, uma grande desvantagem deste teste envolve reações cruzadas com outros fungos dimórficos (*Blastomyces* sp. e *Paracoccidioides* sp.) e a impossibilidade de determinar o evento de infecção, ou seja, quando e onde ocorreu a infecção e, desta maneira, dificulta a identificação de casos autóctones (Raina *et al.*, 2016).

Dito isto, a literatura disponibiliza estudos baseados nessa metodologia em cidades do Alagoas, Pará, Amapá, Piauí, Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Amazonas (AM), Pernambuco (PE), Paraíba (PA), Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS), Mato Grosso (MT), GO e no DF (Fava e Netto, 1998). Para o restante dos estados não citados, não há dados disponíveis publicamente acerca de inquéritos epidemiológicos intradermais de reação à histoplasmina (Almeida *et al.*, 2019).

No Brasil, *Histoplasma* sp. já foi isolado do solo na BA (Silva, 1956); SP (Fava Netto *et al.*, 1967); Minas Gerais (MG) (Araujo, 1970); MT (Moraes e Almeida, 1976); RS (Severo *et al.*, 1986); RJ (Zancoppe-Oliveira e Wanke, 1987).

Com relação ao cenário clínico, Almeida e colaboradores compilaram, em uma excelente revisão sistemática, os casos publicados de histoplasmose adquiridos no Brasil entre 1939 e 2018 (Figura 4). Em território brasileiro, o fungo possui ampla distribuição e já foram relatados casos em todas as macrorregiões. Sudeste, Centro-Oeste e Sul são as regiões com mais casos reportados desde a identificação do primeiro caso no Brasil. As maiores incidências de histoplasmose são observadas nos estados de GO, MG, SP, RJ, CE e RS. A histoplasmose ocorre, majoritariamente, em zonas rurais, em atividades relacionadas à agricultura e em cavernas com as condições previamente descritas (Almeida *et al.*, 2019; Guerra *et al.*, 2019).

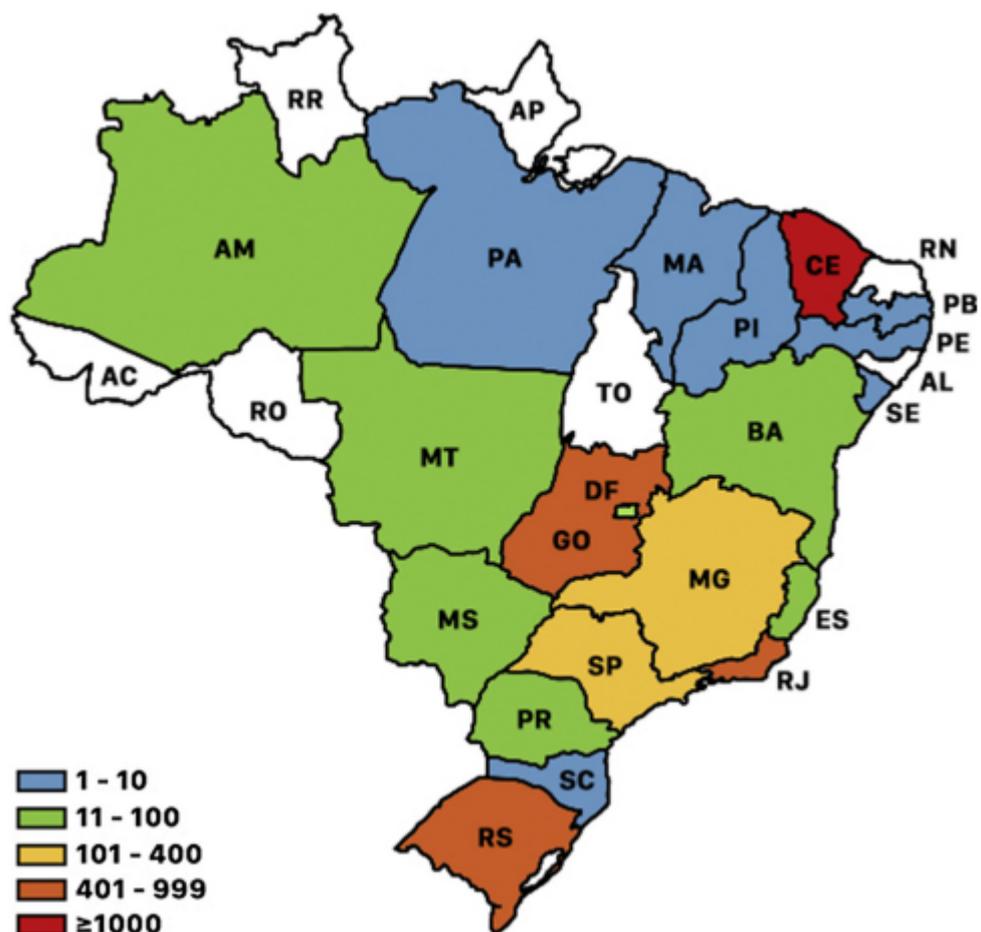


Figura 4. Casos de histoplasmose relatados no Brasil desde a primeira notificação em 1939. Os autores optaram por registrar na legenda apenas os estados com 1 ou mais casos.

Fonte: adaptado de Almeida *et al.* (2019).

Na literatura, no que tange os artigos científicos de âmbito nacional e internacional e, desta maneira, principal meio para a comunicação de novos casos da doença, são escassos os dados epidemiológicos da histoplasmose nas regiões Nordeste e Norte do Brasil (Fava e Netto, 1998). Entretanto, vale a pena destacar que o CE possui uma alta incidência da doença, provavelmente devido ao estabelecimento de um serviço de micologia no hospital universitário da Universidade Federal do Ceará.

Ao pesquisar a fundo e extensivamente, é possível encontrar, principalmente em anais de congressos relacionados à micologia, dermatologia, odontologia e pneumologia, vários casos de histoplasmose em centros de referência locais. Estes dados não publicados são de extrema importância para compreender a epidemiologia da histoplasmose no Brasil e implica no estabelecimento de políticas públicas mais eficientes para o tratamento de micoses endêmicas nessas regiões.

Apesar de todas estas evidências, até o presente momento, a histoplasmose ainda não foi enquadrada como uma doença de notificação compulsória nacional, com exceção dos estados de GO e RJ. Em contrapartida, o DF, com território delimitado por questões político-administrativas, está geograficamente inserido em GO e, portanto, possui o mesmo bioma com características climáticas similares. Apesar disto, apresenta uma baixa incidência da histoplasmose e conta com apenas dois surtos relatados (Alves *et al.*, 2021; Schmidt *et al.*, 1973).

Contudo, um estudo metagenômico recente demonstrou a presença de diversos fungos de interesse agrícola e médico nativos do cerrado no solo da Região Administrativa de Planaltina-DF, incluindo a identificação de amostras contendo *Histoplasma* sp. (Costa *et al.*, 2022). Estes fatos apontam para a potencial existência de focos da doença no DF e entorno que são desconhecidos pelas autoridades públicas de saúde, entretanto, a presença destes focos só pode ser confirmada através de dados de mortalidade associados à histoplasmose utilizando a ferramenta TabNet,

do Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) provida pelo DATASUS e pelo Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN).

Por outro lado, o DF apresenta 58 cavernas cadastradas na Sociedade Brasileira de Espeleologia (SBE). Embora em minoria, o fungo *Histoplasma* já foi identificado em amostras de solo de algumas destas cavernas ou outros fungos patógenos. Além disso, estudos como o de Schmidt *et al.*, 1973 mostram a presença da histoplasmose no solo de zonas rurais desde a década de 1960 (Schmidt *et al.*, 1973). Recentemente, em junho de 2017, foi reportado que 28 bombeiros realizavam um treinamento em uma caverna de Brazlândia-DF, infectaram-se com *Histoplasma* sp., através do guano de morcego presente em grande quantidade no local (Alves *et al.*, 2018). De acordo com o Boletim Epidemiológico de HIV/Aids (2023), entre 2007 e 2023, 7.741 PVHA são residentes no DF.

Logo, a identificação e descrição de possíveis focos de histoplasmose são imprescindíveis para o monitoramento e estabelecimento de medidas de segurança e saúde pública necessários para controlar a doença e evitar possíveis fatalidades (de Perio *et al.*, 2021).

1.1.3.3 Epidemiologia nos Estados Unidos

Nos EUA, é amplamente conhecida a alta incidência da histoplasmose em torno dos Vales dos Rios Ohio e Mississippi, comumente reportada nos estados ao centro-leste do país (Bahr *et al.*, 2015). A área endêmica foi estabelecida entre 1940 e 1970, por meio de inquéritos epidemiológicos intradérmicos de reação à histoplasmina em jovens adultos da marinha (Benedict e Mody, 2016; Manos *et al.*, 1956).

Entretanto, estudos recentes indicam que o perfil epidemiológico nos EUA pode estar equivocado considerando os inúmeros casos reportados fora da zona endêmica (Benedict *et al.*, 2015). Desde então, pesquisadores buscam atualizar este mapa com dados mais robustos, baseados em métodos de diagnóstico mais confiáveis (Ashraf *et al.*, 2020).

Apesar dos casos autóctones registrados recorrentemente fora da zona endêmica, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (U.S. CDC) declara a histoplasmose como sendo de notificação compulsória apenas em 15 estados, sendo eles: Arkansas, Colorado, Connecticut, Delaware, Illinois, Indiana, Kansas, Kentucky, Louisiana, Michigan, Minnesota, Nebraska, Pennsylvania, Rhode Island e Wisconsin (Smith *et al.*, 2022; CDC).

Deste modo, pesquisadores deste campo incluem a histoplasmose como uma doença negligenciada nos EUA, levando em consideração a incompletude dos dados epidemiológicos ainda baseados nos testes intradérmicos realizados há mais de 50 anos; o subdiagnóstico da doença em estados fora da zona endêmica e diretrizes clínicas desatualizadas para o manejo da histoplasmose (Benedict *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2022; Mazi *et al.*, 2022).

Dados atuais reforçam a alta prevalência da histoplasmose em solo norte-americano, considerada como a micose sistêmica mais comum no país, seguida pela coccidioidomicose e blastomicose (Mazi *et al.*, 2023). Em um relatório de 2019 foram identificados 1.124 casos prováveis/confirmados de histoplasmose em estados endêmicos, reportados pelo Sistema Nacional de Vigilância de Doenças de Notificação Obrigatória (Smith *et al.*, 2022).

Além disso, em outro trabalho que incorporou dados de 2007 à 2016, desta vez baseado em dados do *Centers for Medicare & Medicaid Services Chronic Condition Warehouse*, foram identificados quase 80 mil casos de histoplasmose em indivíduos acima de 65 anos, desta vez, distribuídos em áreas além da zona endêmica, com alta prevalência no oeste dos EUA (Figura 5).

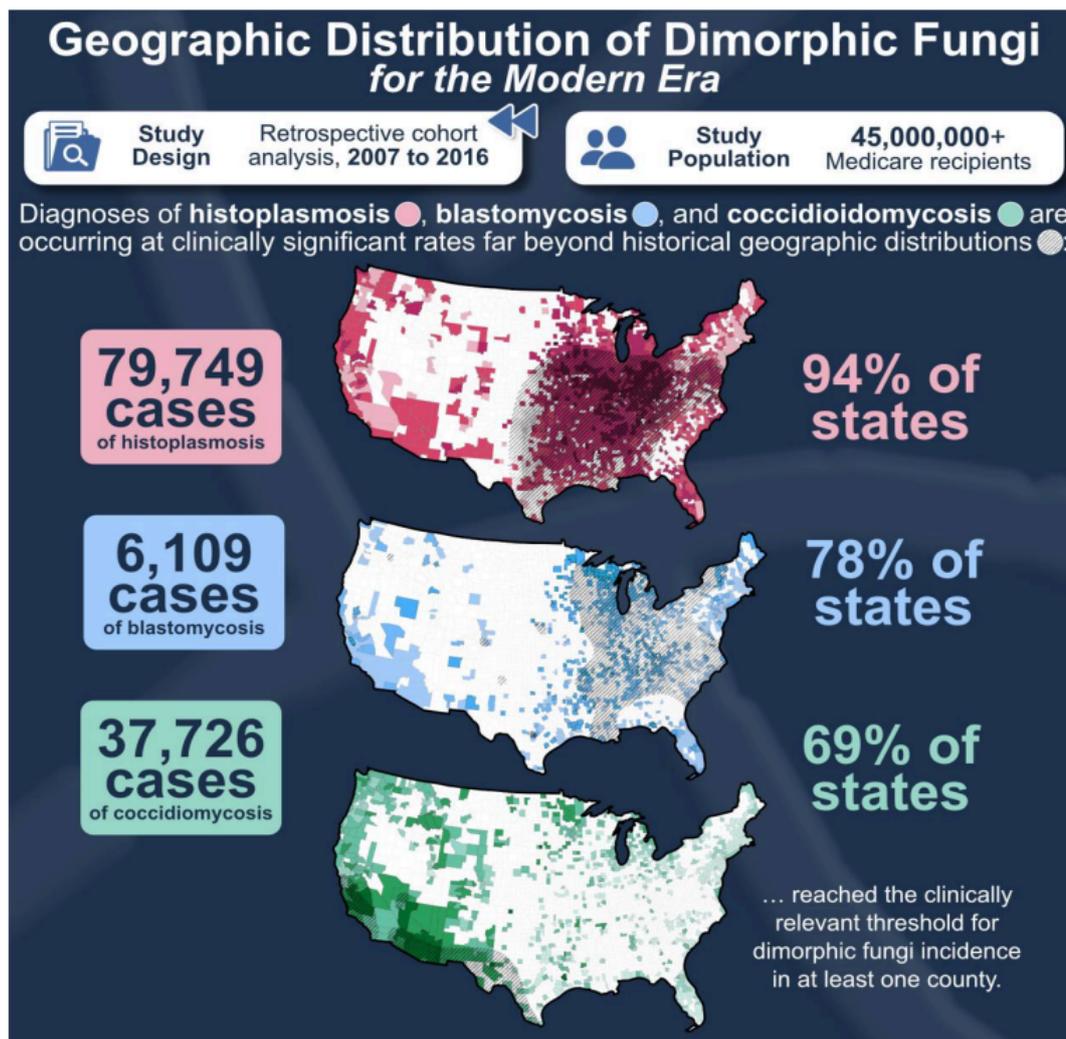


Figura 5. Incidência de histoplasmose de 2007 a 2016, acima de 65 anos e beneficiários do *Medicare service* por estado.

Fonte: adaptado de Mazi *et al.* (2023).

Em 2016 foi publicado um artigo de revisão acerca dos surtos e micro epidemias ocorridos nos EUA, totalizando 108 registros e mostrando que os surtos se concentravam nos estados ao centro-leste do país, sem indicação de casos ao oeste (Benedict e Mody, 2016). O primeiro surto foi descrito em 1938, em Plattsburgh, Nova Iorque, relacionado ao manejo de fezes de pombo (Lehan e Furcolow, 1957). O maior surto descrito ocorreu em Indianápolis, Indiana, com suspeita de mais de 100.000 envolvidos, onde apenas 435 casos foram reportados (Wheat *et al.*, 1981).

O primeiro isolamento ambiental do fungo *Histoplasma sp.* foi realizado entre 1946 e 1948, na Virgínia, EUA, por C. W. Emmons (Emmons, 1949). Desde então,

isolamentos do fungo em solo ocorreram nos estados de Washington (Emmons, 1961), Maryland (Sorley *et al.*, 1979); Tennessee (Zeidberg *et al.*, 1952).

Com relação ao isolamento do fungo a partir de animais silvestres, foram descritas infecções em diversos tipos de mamíferos, diagnosticadas através de histopatologia e/ou sorologia, incluindo camundongos, ratos, esquilos, marmotas, guaxinins (Menges *et al.*, 1967); golfinho, foca, cachorro, gato, morcegos (Guillot *et al.*, 2018). Os casos clínicos foram surgindo ao longo dos surtos em 1940, em recrutas que apresentavam calcificações pulmonares, mas negativos para tuberculose (Benedict e Mody, 2016).

Diversos estudos buscam compreender as características ambientais que possam explicar a epidemiologia observada para a histoplasmose. De acordo com o *National Centers for Environmental Information*, a área endêmica (centro-leste) propicia a faixa de temperatura adequada para o crescimento da fase saprófita do fungo *Histoplasma* sp. pois apresenta as zonas climáticas subtropical e temperada, caracterizadas por temperaturas mais brandas quando comparadas à região Oeste, que por sua vez apresenta uma combinação majoritária dos climas montanhoso, pradaria, desértico, sendo a costa oeste composta também por clima subtropical e temperado.

Maiga e colaboradores reuniram características ambientais num modelo de adequação de sítio para *Histoplasma* sp. e, baseado no mapa territorial dos EUA, demonstraram as áreas com maior probabilidade de se encontrar o fungo no ambiente (Figura 6) (Maiga *et al.*, 2018). Através desta projeção, é possível notar que os estados ao oeste do país possuem regiões de possível endemicidade para a histoplasmose e que, inclusive, possuem diversos relatos da doença (CDC, 2013).

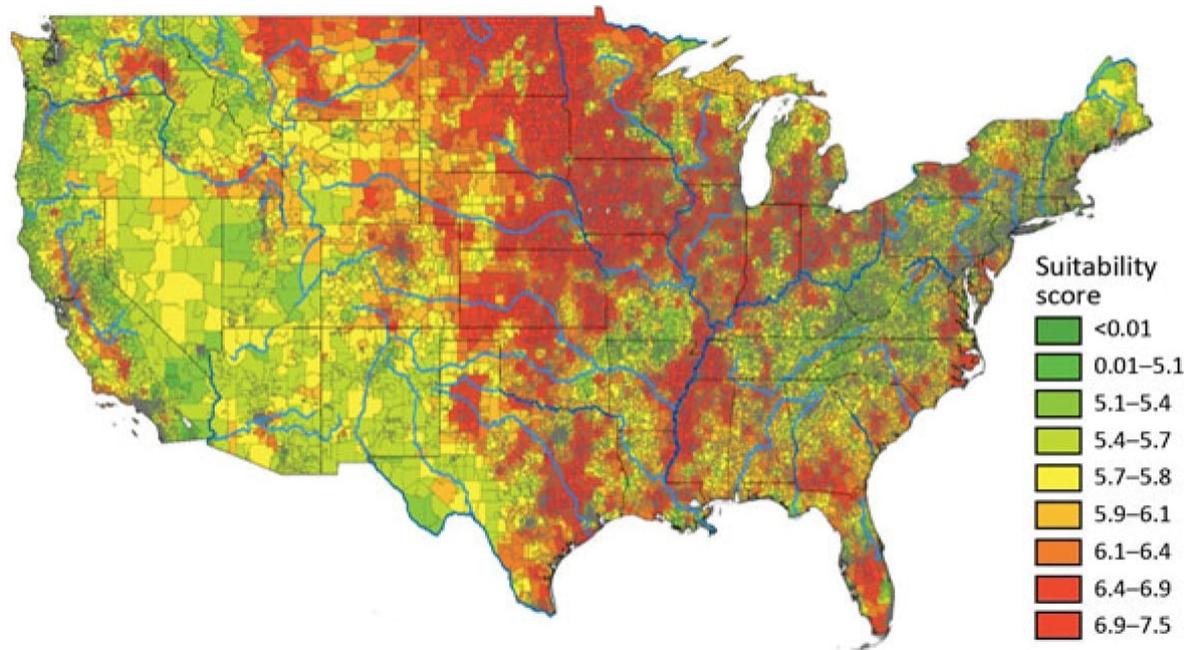


Figura 6. Áreas dos Estados Unidos onde o ambiente é provavelmente adequado para o crescimento do fungo *Histoplasma* sp. Áreas com maior índice de adequação (na escala, em vermelho) indicam áreas com melhores condições ambientais para o fungo *Histoplasma*.

Fonte: adaptado de Maiga *et al.* (2018).

Outros estudos investigaram a incidência real da histoplasmose no país, considerando os casos fora da zona endêmica. Em um deles, desenvolve-se um modelamento de ocupação espaço-temporal, incorporando características ambientais como vegetação, níveis de nitrogênio, elevação e latitude e longitude (Hepler *et al.*, 2022).

Ainda pouco explorado para o fungo *Histoplasma*, mas amplamente utilizado em ecologia e conservação de espécies, o modelamento de nicho ecológico, ou modelamento de distribuição de espécies é uma abordagem que permite inferir a probabilidade de ocorrência de uma espécie baseada em dados bioclimáticos e ambientais para, neste caso, prever a diversidade e distribuição de doenças (Escobar, 2020). Estudos como esse já foram realizados para outros fungos endêmicos, como *Coccidioides* spp. (Eulálio *et al.*, 2024; Weaver *et al.*, 2020) e *Blastomyces* spp. (Jackson Katrina M. *et al.*, 2021; Reed *et al.*, 2008), ambos endêmicos nos EUA.

Através de características climáticas como pluviosidade, temperatura, velocidade dos ventos, somados a vegetação da área, condição do solo e uso da

terra, é possível gerar um modelo computacional que permite prever onde uma espécie poderia se estabelecer em condições ambientais específicas. Isso é valioso em áreas onde a presença da espécie não foi confirmada, mas que possuem condições adequadas. Além disso, é possível prever como as mudanças climáticas podem afetar a distribuição das espécies ao longo do tempo, discussão relevante no cenário atual de aquecimento global. O ENM também ajuda a mapear áreas de risco para a ocorrência dessas espécies e potenciais surtos (Thuiller, 2024); Escobar, 2020).

Dentre os métodos disponíveis para realizar o modelamento, podemos destacar o método de Máxima Entropia (MaxEnt). Considerado como um dos mais populares por sua facilidade de uso e performance superior frente a outros modelos, este método utiliza apenas dados de presença das espécies de interesse associados a predições ambientais como as mencionadas acima. Com base nessas informações de presença, o modelo extrai amostras do plano de fundo, contrastantes com as amostras de presença para definir áreas de pseudo-ausência, ou seja, áreas onde a espécie não foi relatada, mas pode ocorrer de acordo com a similaridade de características bioclimáticas (Merow et al., 2013).

1.1.3.4 O “*demos*” da histoplasmose

Derivado do grego, o termo “epidemiologia” combina os elementos “*epi*” (sobre), “*demos*” (povo) e “*logos*” (estudo), traduzindo-se como o estudo sobre o povo. Ao longo do tempo, o termo adquiriu um significado técnico na medicina e saúde pública, referindo-se ao estudo de padrões, causas e efeitos de doenças e outros eventos de saúde na população (disponível em: <https://archive.cdc.gov>). Atualmente, a epidemiologia tem como objetivos centrais avaliar três dimensões fundamentais: pessoa, tempo e lugar.

Características sociodemográficas como idade, sexo, etnia, nível socioeconômico e educacional, bem como fatores ocupacionais, são fundamentais para identificar populações em maior risco. Por exemplo, a exposição a ambientes ricos em material orgânico contaminado, como solos com fezes de morcegos ou aves e cavernas, é um importante fator de risco para infecções fúngicas como a

histoplasmose. Trabalhadores rurais, espeleólogos e indivíduos imunocomprometidos estão entre os principais grupos de risco para a exposição ao fungo *Histoplasma* (Rayens et al., 2022).

A literatura aponta predominância de casos em indivíduos do sexo masculino, especialmente entre pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) ((Armstrong et al., 2018); ALMEIDA *et al.*, 2019). Estudos retrospectivos e prospectivos situam a faixa etária predominante entre 18 e 64 anos (Chang et al., 2007; Karimi et al., 2002; Rayens et al., 2022). Embora dados sobre escolaridade sejam menos frequentes, pesquisas sugerem que a maioria dos casos ocorre entre indivíduos com apenas ensino primário ou secundário completo (Castellanos Reynosa et al., 2024; Ramos et al., 2018).

Em relação à etnia, um estudo abrangente em estados norte-americanos (2011-2014) encontrou maior prevalência de histoplasmose entre pessoas de etnia branca (62,4%) (Armstrong *et al.* 2018). Estudos similares no sul do Brasil confirmaram uma predominância de brancos nos casos diagnosticados (Unis et al., 2004).

Em publicações que incluem o termo “epidemiologia” como tema principal, o *demografia* é comumente direcionado às PVHA, já que a doença é prevalente nesse grupo. Isto ocorre devido à natureza oportunista da infecção, que se manifesta mais facilmente em pessoas com sistema imune comprometido. Além disso, as taxas de incidência e morbidade são maiores em regiões endêmicas, principalmente em países subdesenvolvidos, considerando o acesso limitado à diagnósticos e tratamento adequados (Denning *et al.*, 2024; (Smith et al., 2024)). Um maior número de hospitalizações também é observado para pessoas de baixa renda, chegando a duas vezes mais hospitalizações em idosos contratantes do plano de saúde Medicare nos EUA, quando comparados a planos de saúde privados (Rayens et al., 2022)

Entre PVHA, coinfeções são frequentes e incluem doenças oportunistas como tuberculose, criptococose e infecção por citomegalovírus (CMV) (Boigues et al., 2018; Caceres & Valdes, 2019; Gonzales Zamora & Espinoza, 2017).

2. Características do fungo *Histoplasma* e doença

2.1 Taxonomia

Atualmente, o gênero *Histoplasma* é classificado no Filo Ascomycota, Ordem Onygenales e Família Onygenaceae/Ajellomycetaceae (Kandemir *et al.*, 2022; Vite-Garín *et al.*, 2014). Este gênero encontra-se agrupado próximo à outras espécies de fungos termodimórfico, como *Paracoccidioides*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Emergomyces* (Figura 7).

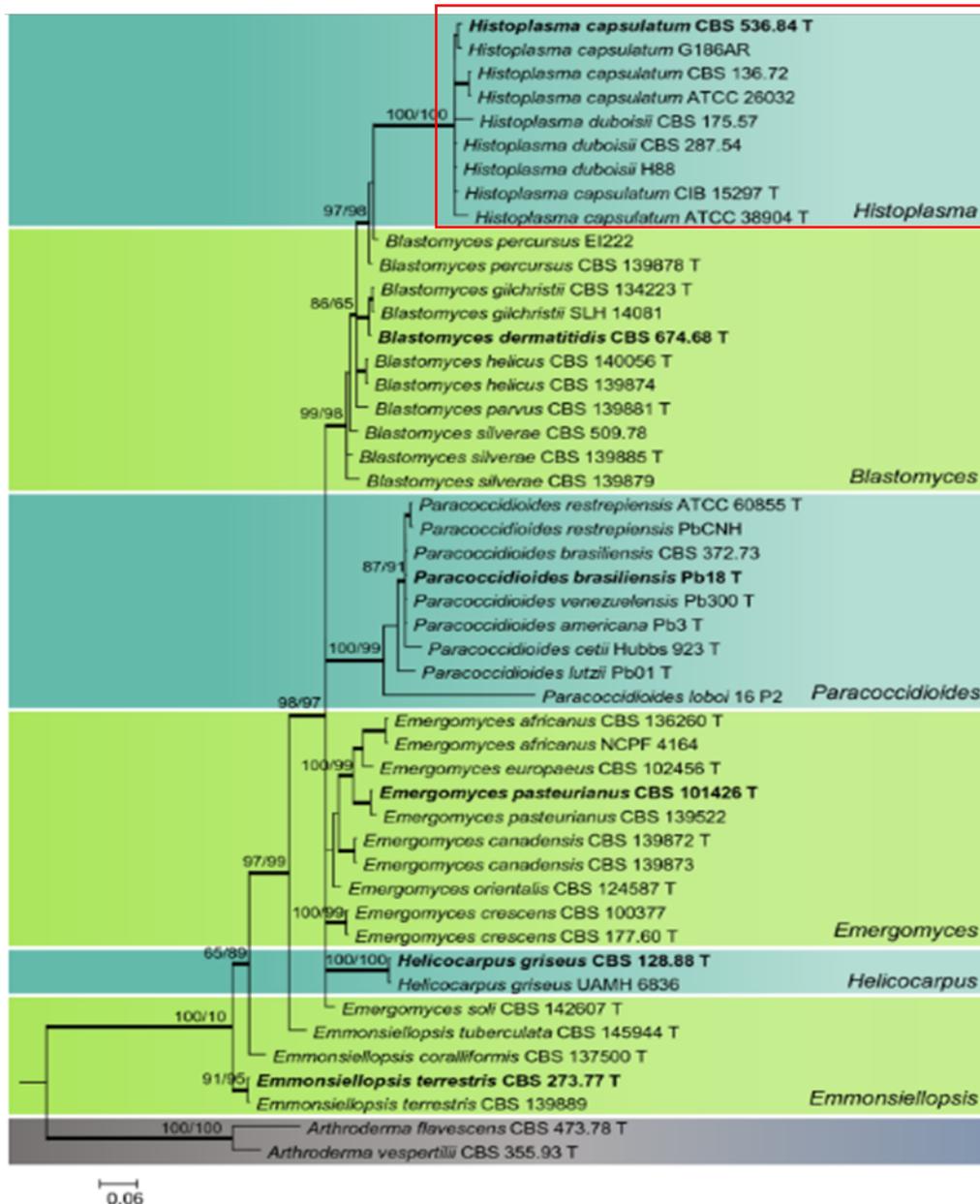


Figura 7. Árvore filogenética de gêneros de fungos do Filo Ascomycetos.

Fonte: adaptado de Kandemir *et al.* (2022)

Antigamente, acreditava-se que a histoplasmose era causada por 3 espécies distintas: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, variante originalmente descrita por Darling (1906), *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, responsável pela histoplasmose africana e descrita em 1960, e *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, originalmente descrito como *Cryptococcus farciminosus* e responsável

pela infecção de equinos (Bullen, 1949; Moraes, 2022; Schwarz e Baum, 1957; Vanbreuseghem, 1957).

Em 1999 houve a primeira tentativa de diferenciação filogenética para além destas 3 variantes, a partir da análise parcial das sequências de DNA de 4 genes codificadores de proteínas de 46 isolados geograficamente distintos e, foi proposto a existência de 6 espécies ao invés de apenas 3 variedades (Kasuga *et al.*, 1999).

Em 2003, a representatividade de isolados foi ampliada para 137 (45 isolados de Kasuga *et al.*, 1999 somados a 92 novos isolados) e, através do refinamento das análises de estrutura populacional e filogenia, pela técnica de *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST), foi possível identificar 8 clados, ao invés de apenas 6 descritos anteriormente (Kasuga *et al.*, 2003).

Anos depois, Teixeira *et al.*, 2016 abordaram esta questão ampliando ainda mais o número de isolados analisados (n=234), conseguiram identificar pelo menos 17 espécies crípticas, sugerindo 6 novas espécies filogenéticas: LAm A1, LAm A2, LAm B1, LAm B2, RJ e BAC-1 (Teixeira *et al.*, 2016). Nesta ocasião foi gerada uma árvore dos eventos de radiação destas mesmas espécies crípticas, demonstrando uma estimativa de quando estas espécies surgiram (Figura 8).

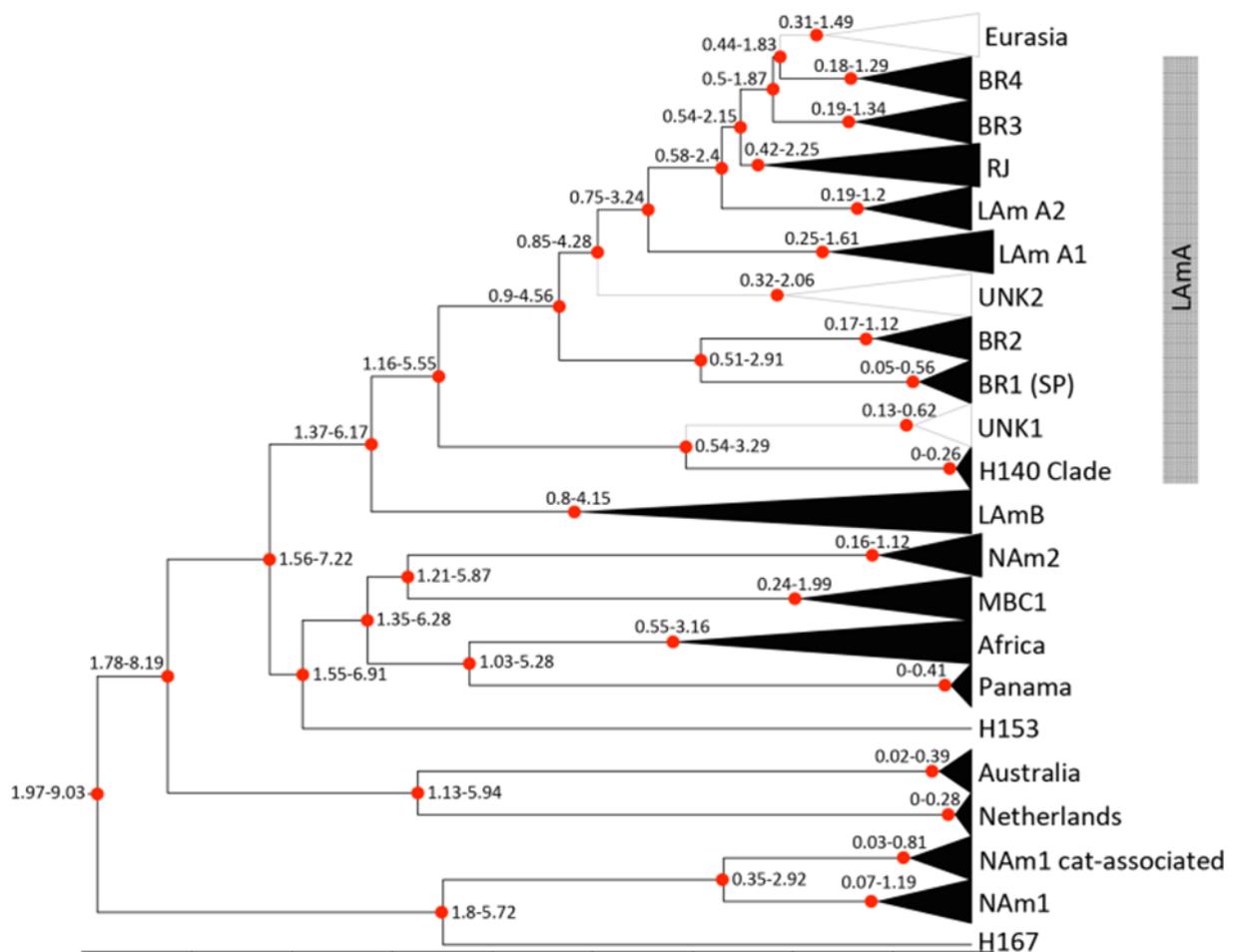


Figura 8. Eventos de radiação das espécies crípticas de *Histoplasma*.

Fonte: adaptado de Teixeira *et al.* (2016).

A classificação filogenética mais aceita atualmente sugere que há 5 genótipos a nível de espécies de *Histoplasma*: Nam 1 (*H. mississippiense*), Nam 2 (*H. ohioense*), LAm A (*H. suramericanum*), Panama (*H. capsulatum stricto sensu*), Africa (Sepulveda *et al.*, 2017) (Figura 9). Estes estudos foram baseados na comparação genômica e concordância genealógica em diferentes loci analisados.

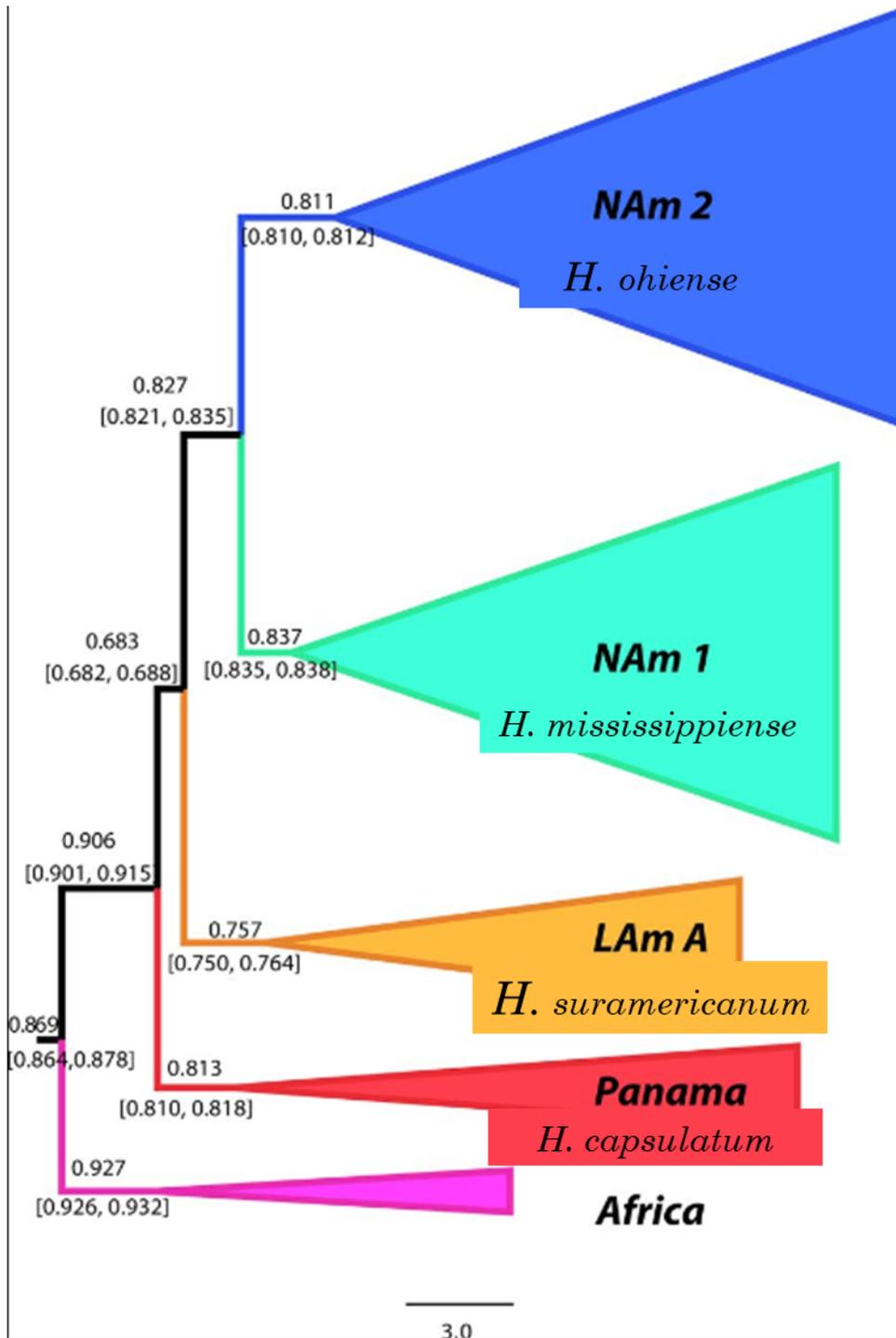


Figura 9. Árvore filogenética do gênero *Histoplasma*, mostrando que todas as espécies têm altos níveis de concordância genômica. Os valores acima de cada ramo mostram o fator de concordância (CF) para cada nó, e os valores abaixo dos ramos mostram os intervalos de credibilidade bayesiana de 95% para essa estatística.

Fonte: adaptado de Sepulveda *et al.* (2017).

No Brasil e em outros países da América Latina, a espécie predominante é *H. suramericanum*, que engloba diversas espécies crípticas (Figura 10).

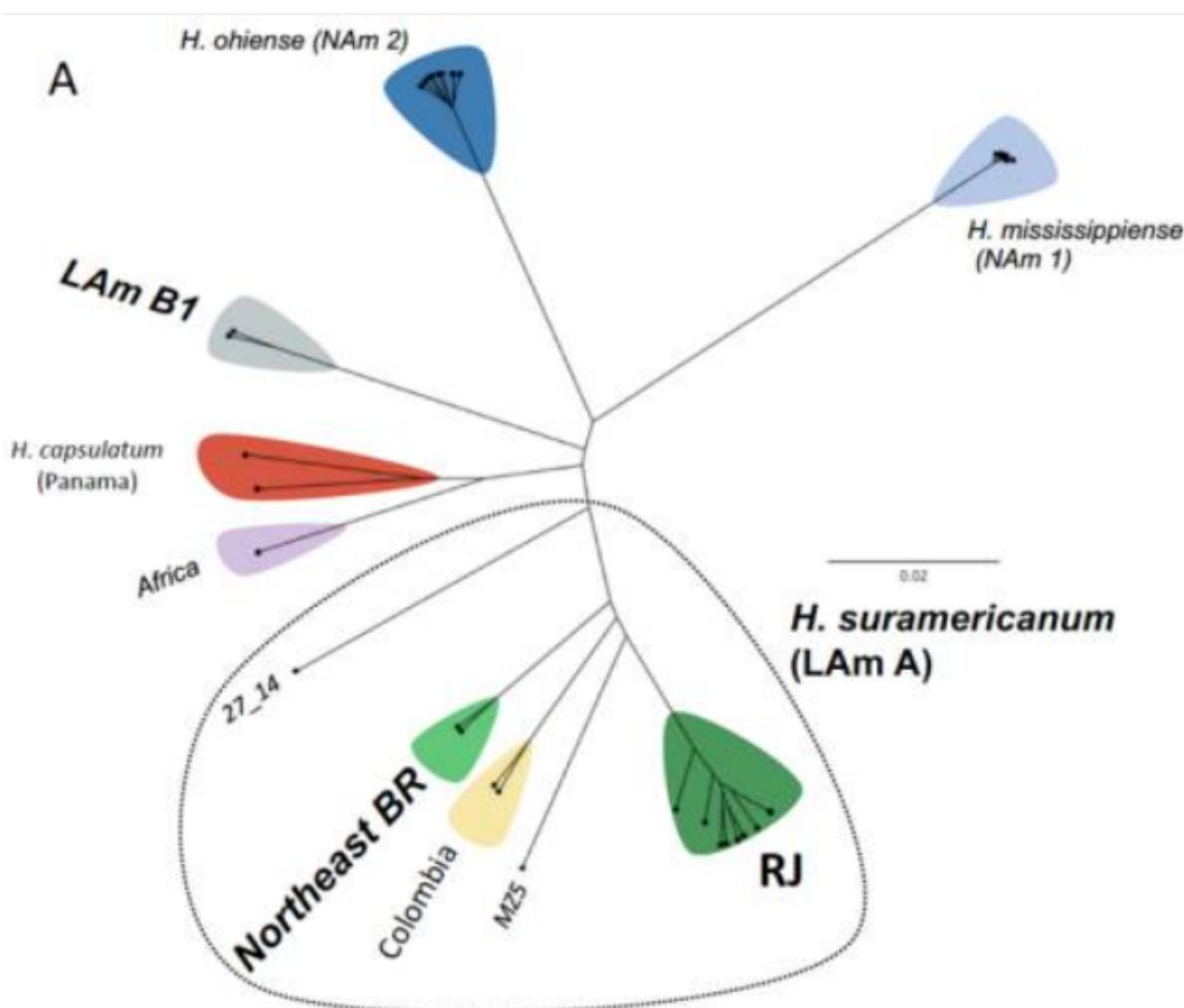


Figura 10. Árvore filogenética sem raiz das espécies de *Histoplasma*. Em destaque estão as linhagens que compõem o clado *H. suramericanum*, endêmico no Brasil e em outros países da América Latina.

Fonte: adaptado de (Almeida-Silva et al., 2021).

Na América do Norte, mais especificamente nos EUA, destacam-se as espécies *H. ohiense* e *H. mississippiense*, encontradas ao longo dos vales dos rios Ohio e Mississippi, respectivamente, e ocorrem em sintopia, embora suas distribuições ainda não sejam bem definidas (Sepulveda et al., 2017).

Entretanto, não há uma barreira geográfica evidente que impeça a hibridização entre as duas espécies, que ocorrem simpatricamente. Inclusive, traços de introgressão já foram identificados entre 2 isolados, WU24 e G217B, que são os

genomas de referência para *H. mississippiense* e *H. ohiense*, respectivamente (Maxwell *et al.*, 2018) (Figura 11).

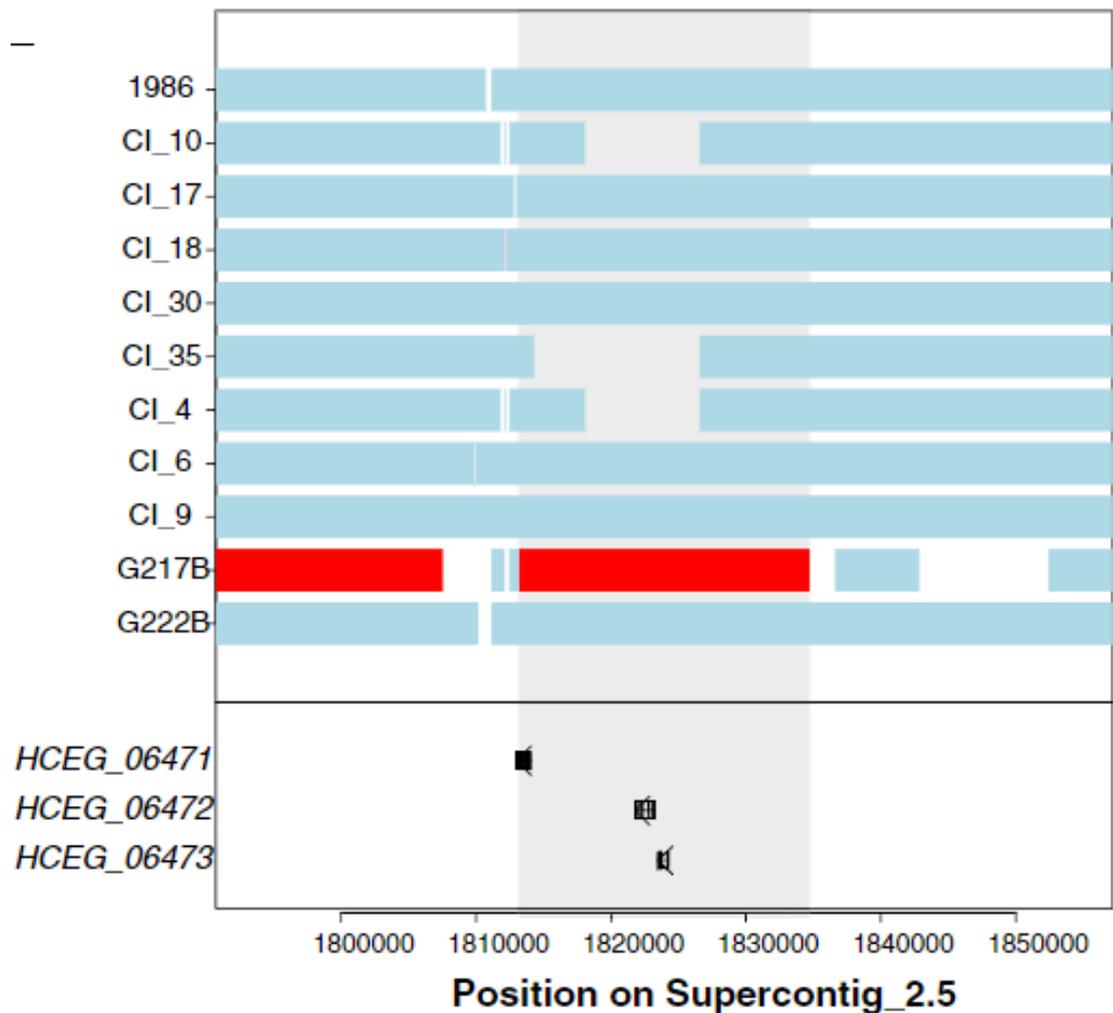


Figura 11. Um exemplo de introgressão de *H. mississippiense* para *H. ohiense* que contém três genes (HCEG06471, HCEG06472 e HCEG06473) presentes apenas no isolado G217B (*H. ohiense*).

Fonte: adaptado de Maxwell *et al.* (2018)

A África é afetada por espécies do clado Africa (*H. capsulatum* var. *duboisii*) e a América do Sul é majoritariamente afetada por espécies do clado *H. suramericanum*, com exceção da Colômbia, em que espécies *H. suramericanum* e *H. capsulatum sensu stricto* ocorrem simpatricamente (Gomez *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020; Sahaza *et al.*, 2019; Sepulveda *et al.*, 2017).

A evolução de ferramentas taxonômicas cada vez mais robustas permite a diferenciação e agrupamento das espécies fúngicas, incluindo *Histoplasma*, com

maior precisão dos pontos de vista genômico e fenotípico (Borman e Johnson, 2023). A biologia molecular possui maior destaque no cenário atual pois permite abordagens mais complexas e, conseqüentemente uma análise mais aprofundada dos dados do fungo estudado (Stengel *et al.*, 2022).

Logo, o desenvolvimento de metodologias moleculares é de extrema importância na elucidação de fatores epidemiológicos e genotípicos de microrganismos patógenos humanos que culminam na expressão de fatores observáveis, fenotípicos, que podem inclusive variar entre espécies de diferentes regiões, como resistência a medicamentos, adaptação ao ambiente, mecanismo de infecção e virulência (Damasceno *et al.*, 2016).

2.2 Ciclo de vida

A fase filamentosa/miceliana do fungo desenvolve-se no solo de ambientes com alta concentração de fezes de aves e guano de morcego, ricos em compostos nitrogenados e fósforo, com pH levemente ácido (pH 6,5), com temperaturas amenas, entre 22°C e 29°C, nas redondezas de cursos d'água ou com precipitação anual na faixa de 880mm a 1270mm, umidade relativa do acima de 60% (Damasceno *et al.*, 2019; Gomez, 2011).

Ainda, desenvolvem-se durante esta fase, as estruturas infectivas do fungo, denominadas de conídios (micro e macroconídios). Estas estruturas são facilmente suspensas ao ar por distúrbios no solo contaminado e podem ser inaladas, sendo esta, a principal porta de entrada para a infecção de hospedeiros mamíferos presentes no local (Sil, 2019) (Figura 12). Apesar de raros, podem ocorrer casos de inoculação cutânea através de feridas abertas (Guimaraes *et al.*, 2011).

Após a inalação, os propágulos instalam-se nos pulmões e, devido à temperatura corporal do hospedeiro mamífero, em torno de 37°C, e outras alterações metabólicas, transitam para a fase parasitária, leveduriforme, estabelecendo assim a infecção pulmonar primária (Kauffman, 2007). Em sequência, as leveduras são transportadas por macrófagos até os linfonodos e podem se disseminar através do

sistema reticuloendotelial e infectar outros órgãos e sistemas (Ferreira e Borges, 2009) (Figura 12).

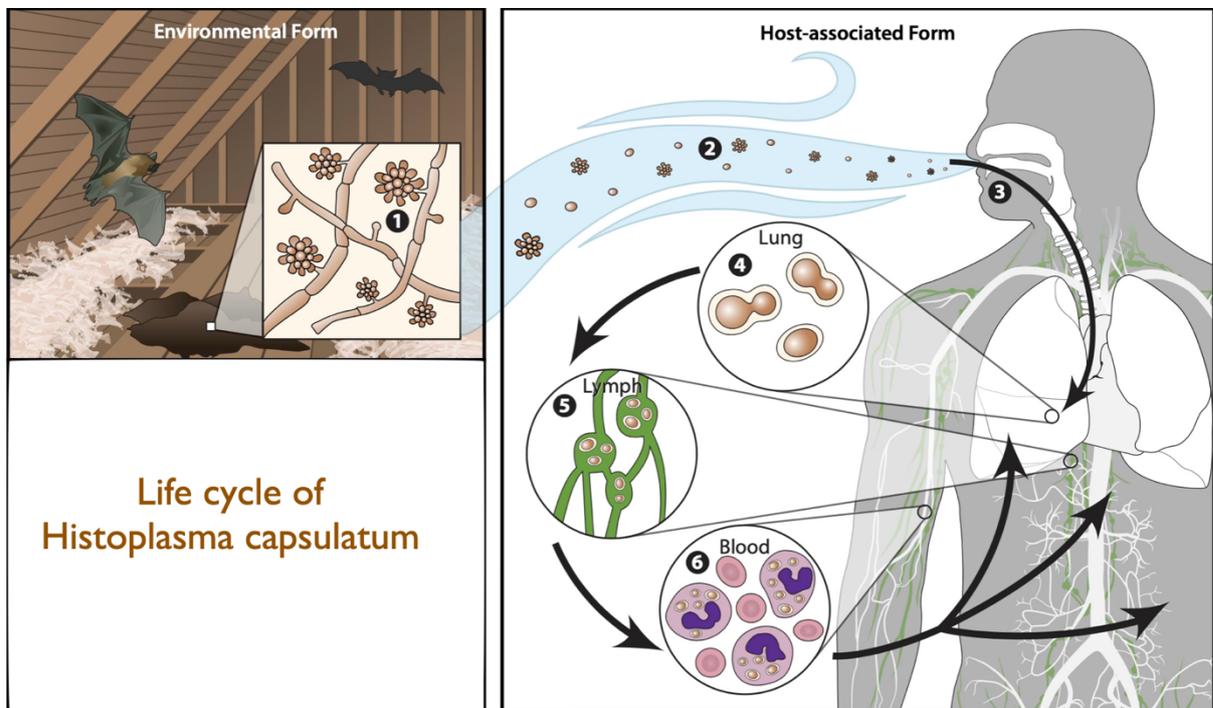


Figura 12. Processo de infecção por *Histoplasma* sp. No ambiente, o fungo habita o solo na forma saprófita (1) com hifas aéreas. As hifas produzem macroconídios e microconídios (2), esporos que são aerossolizados e dispersos. Os microconídios são inalados pelos pulmões de um hospedeiro suscetível (3). A temperatura mais quente dentro do hospedeiro sinaliza uma transformação para uma levedura oval em brotamento (4). As leveduras são fagocitadas por células imunes e transportadas para os linfonodos regionais (5). A partir daí, elas viajam pelo sangue para outras partes do corpo (6).

Fonte: adaptado do Centro de Controle e Prevenção de Doenças.

2.3 Características morfológicas do fungo *Histoplasma*

O microrganismo *Histoplasma* sp. é caracterizado como um fungo termodimórfico devido à diferenciação morfológica, entre micélio e levedura, em condições específicas do ambiente e do hospedeiro, respectivamente (Sil e Andrianopoulos, 2014).

Durante a fase saprofítica, há o desenvolvimento de hifas hialinas septadas (1 a 2,5 µm de diâmetro) e a partir destas, são produzidas duas estruturas de reprodução assexual: macroconídios (estruturas arredondadas de 7 a 15 µm de diâmetro) e microconídios (estruturas piriformes de 2 a 6 µm de diâmetro), sendo estas, além de

fragmentos das hifas, as estruturas responsáveis pela infecção de hospedeiros mamíferos (Guimaraes *et al.*, 2011) (Figura 13).

Além disso, esta fase é evidenciada por células arredondadas ou ovais de 1 a 4 μm de diâmetro envoltas por uma parede celular com espessura de 1/6 do diâmetro da célula (Darling, 1909; Guimaraes *et al.*, 2011). A fase leveduriforme é caracterizada por células únicas e nucleadas, de estrutura oval ou arredondada, em brotamento de aproximadamente 2-5 μm , apresentando tamanho aumentado no caso da espécie *H. duboisii*, predominante na África (8-15 μm) (Guimaraes *et al.*, 2011) (Figura 13).

A parede celular da fase leveduriforme é composta majoritariamente por sacarídeos (glicose, manose e galactose), uma camada externa de α -1,3-glucano e manoproteínas, uma camada intermediária composta por glucanos β -1,3 e β -1,6 e uma camada adjacente à membrana lipídica de quitina fibrilar, enquanto que a parede da fase miceliana possui maior concentração de sacarídeos e menor densidade de quitina (Domer, 1971; Valdez *et al.*, 2022).

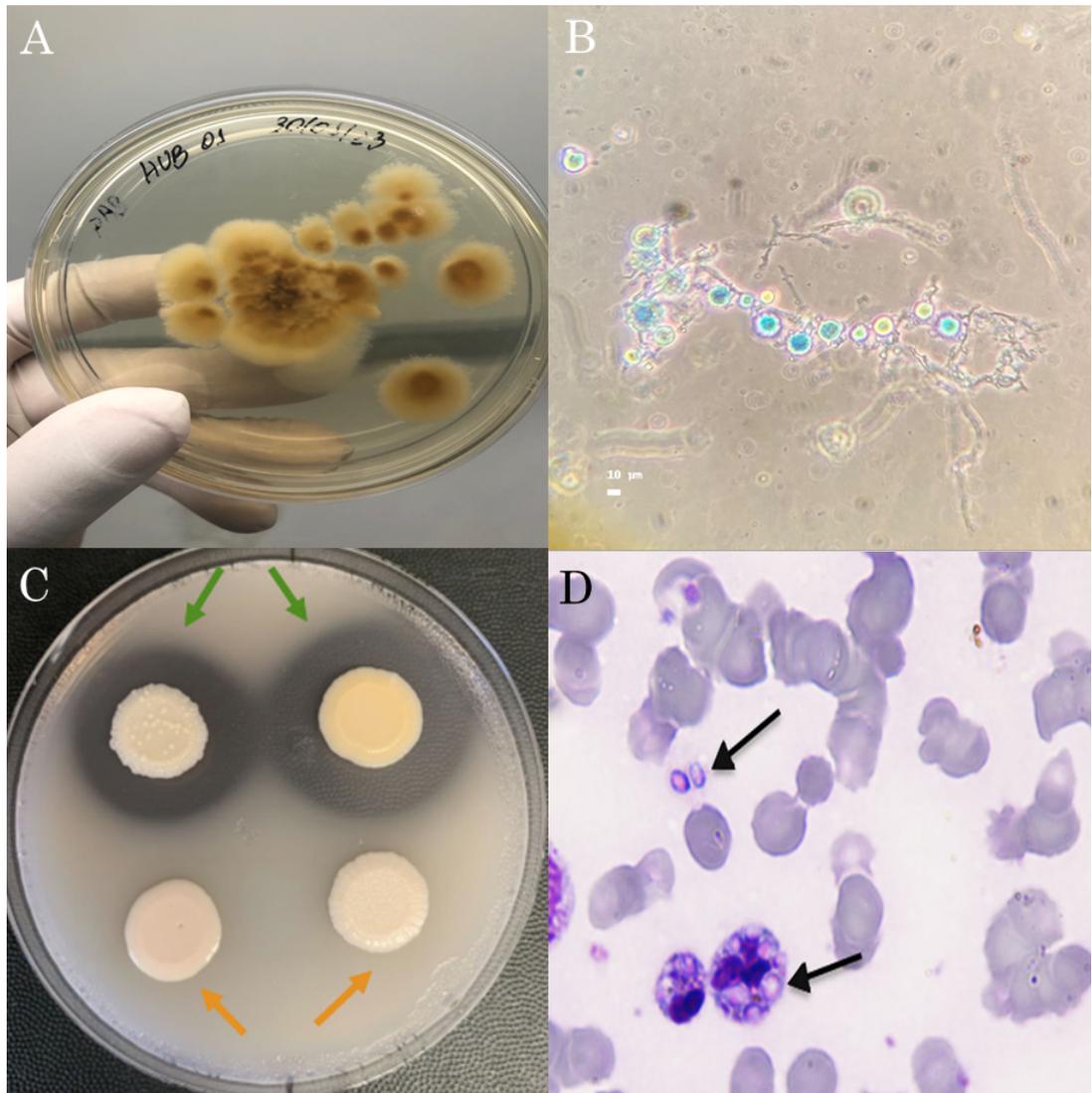


Figura 13. Morfologia das colônias de *Histoplasma* sp. e suas respectivas microscopias. (A) colônia de *Histoplasma* sp. na fase miceliana; (B) estruturas fúngicas da fase miceliana; (C) colônias de *Histoplasma* na fase leveduriforme; (D) leveduras intra- e extracelulares de *Histoplasma* sp.

Fonte: (A) e (B) foram elaboradas pelo próprio autor, (C) foi adaptado de Sepúlveda *et al.* (2024), (D) foi adaptado de Salgado *et al.* (2016)

2.4 Formas clínicas da histoplasmose

A apresentação clínica da histoplasmose depende, principalmente, de fatores como a carga fúngica inalada, fatores de virulência da espécie de *Histoplasma* que infectou o indivíduo, e eficiência do sistema imune do hospedeiro em realizar o controle da infecção (Barros *et al.*, 2023). Grande parte dos indivíduos

imunocompetentes infectados por *Histoplasma* sp. apresentam a forma assintomática da doença (90% dos casos) e o sistema imune por si só é suficiente para controlar e resolver a infecção, porém as leveduras podem entrar em estado de latência e persistir no interior de granulomas em órgãos viscerais dos hospedeiros (Porta e Maresca, 2000; Wheat *et al.*, 2016).

Em contraste, indivíduos imunocompetentes que inalarem alta carga fúngica, podem desenvolver a histoplasmose pulmonar aguda com um quadro clínico inespecífico e erroneamente diagnosticado como outras doenças pulmonares como a gripe e a tuberculose, cujos sintomas descritos mais comuns envolvem febre, tosse, perda de peso, fadiga, dores no corpo, dor de cabeça, calafrios (Kauffman, 2007). Isso se dá principalmente após a visita de locais com alta deposição de fezes de morcegos ou pássaros como mencionado anteriormente. Em regiões endêmicas, a histoplasmose, junto a outras micoses sistêmicas causadas por fungos dimórficos são responsáveis por até 30% das pneumonias adquiridas na comunidade (Azar *et al.*, 2020).

A histoplasmose crônica, embora incomum, pode ser causada por uma evolução da fase aguda, resultado de uma resposta imune ineficiente em eliminar o patógeno. Nesta fase, podem ser observadas cavitações persistentes nos pulmões, levando à fibrose pulmonar e conseqüentemente à insuficiência cardíaca. Esta apresentação clínica é ainda imprecisamente diagnosticada como tuberculose pulmonar ou aspergilose pulmonar crônica (Baker *et al.*, 2020).

No pior dos cenários, quando a resposta imune não é suficiente para eliminar o fungo, a doença progride para a histoplasmose disseminada, espalhando-se através da corrente sanguínea e comprometendo outros órgãos e tecidos além dos pulmões (Barros *et al.*, 2023). A forma disseminada é observada principalmente em pacientes em estado de imunossupressão como na AIDS (cerca de 95%), cuja contagem de linfócitos TCD4+ encontra-se abaixo de 200 células/mm³ de sangue; transplantados ou em tratamento para doenças autoimunes, cujo uso de corticoides é necessário para evitar uma resposta exacerbada do sistema imune e prejudicial ao paciente (Kauffman, 2007; Wheat *et al.*, 2000).

Além da infecção primária, pacientes imunocomprometidos são passíveis de reativação por alterações na homeostase do hospedeiro (Lucey *et al.*, 2018). Ainda não há casos relatados de transmissão zoonótica ou de pessoa-pessoa para a histoplasmose, entretanto, há casos documentados de transmissão vertical (Carlucci *et al.*, 2016; Guimarães *et al.*, 2011).

2.5 Imunologia da infecção por *Histoplasma*

Considerando uma infecção por *Histoplasma* sp. em um paciente imunocompetente, os neutrófilos, células dendríticas e, as células-alvo no caso da histoplasmose, os macrófagos alveolares pulmonares (PAM) não-ativados, são as primeiras células a interagirem com as leveduras de *Histoplasma* sp. (Porta e Maresca, 2000).

Através do reconhecimento de estruturas fúngicas constituintes da parede celular (β -glucanos) pelos receptores Toll-like (TLR) e/ou lecitina do tipo C, os fagócitos são capazes de internalizar as leveduras. A internalização é realizada por fagocitose ou endocitose através da interação dos receptores CD11/CD18 com a *heat shock protein* 60 no caso dos macrófagos, e a *Very Late Antigen-5* (VLA-5) com a ciclofilina A no caso das células dendríticas. O papel das células da imunidade inata é processar os antígenos a partir das leveduras e transitar até os linfonodos para apresentá-los aos linfócitos TCD4⁺ e desencadear a imunidade adaptativa (Ray e Rappleye, 2019).

Naturalmente, as leveduras de *Histoplasma* são capazes de infectar eficientemente os macrófagos alveolares não-ativados e sobreviver no ambiente intracelular a partir da modulação deste, tornando as condições favoráveis para o crescimento do fungo (Boyce and Andrianopoulos, 2015). Para evadir dos mecanismos de degradação dos fagócitos, adaptaram (e provavelmente continuam adaptando) seus próprios mecanismos de modulação do ambiente intracelular dos PAM não-ativados, sendo alguns deles a degradação de espécies reativas de oxigênio (ROS), regulação do pH fagolisossomal para manter o ambiente ácido (pH 6,0 – 6,5)

e inativar hidrolases lisossomais e até impedir a fusão entre o fagossomo e o lisossomo (Brechtig e Rappleye, 2019; Eissenberg *et al.*, 1993; Holbrook *et al.*, 2013).

Por outro lado, as leveduras de *Histoplasma* são pouco adaptadas para lidar com o ambiente intracelular de células dendríticas, sendo degradadas por hidrolases lisossomais, e têm o crescimento comprometido por neutrófilos, que possuem apenas ação fungistática (Ray e Rappleye, 2019). A apresentação de antígenos por células dendríticas de forma direta através do *Major Histocompatibility Complex II* (MHC-II) e de macrófagos apoptóticos através do *Major Histocompatibility Complex I* (MHC-I) são responsáveis, respectivamente, pela proliferação da população de linfócitos TCD4+, sendo que também há um desvio para um padrão de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Ta1) mediada pela presença de Interleucina 12 (IL-12) e de linfócitos TCD8+ (Horwath *et al.*, 2015).

A resposta à infecção primária por *Histoplasma* sp. também é marcada pela diferenciação dos PAM não-ativados em macrófagos com perfil M1, influenciados por citocinas secretadas por linfócitos TCD4+ ativados (McDermott e Klein, 2018). Apesar de não possuírem ação tão significativa de maneira geral, os linfócitos T auxiliares do tipo 17 (Ta17) podem ser benéficos durante a infecção primária pois secretam as citocinas pró-inflamatórias envolvidas, por exemplo, na adesão de leucócitos e modulação da secreção de outras citocinas como Interleucina 17 (IL-17), Interleucina 6 (IL-6) e *granulocyte-macrophage colony-stimulating factors* (GM-CSF) (Heung, 2020; Porta e Maresca, 2000).

Um dos mecanismos de contenção da histoplasmose implica na captação, por parte de células e proteínas do hospedeiro, de metais essenciais para o crescimento do fungo *Histoplasma*, como o ferro e o zinco, levando à baixas disponibilidades e impedindo a progressão da infecção (Brechtig and Rappleye, 2019; Horwath *et al.*, 2015).

Seguindo o curso natural da infecção, macrófagos infectados por leveduras de *Histoplasma* e um aumento nas concentrações de Interleucinas pró-inflamatórias, Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), Interferon γ (IFN- γ) induzido por linfócitos Ta1 coordenam a formação do granuloma enquanto os linfócitos TCD8+ modulam a

resposta pró-inflamatória para conter eventuais danos aos tecidos do hospedeiro causados por inflamação exacerbada (Heung, 2020).

Entretanto, nestes granulomas, algumas células podem sobreviver em estado de latência, assim como ocorre numa infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, podendo assim funcionar como reservatórios do fungo *Histoplasma* sp. passíveis de reativação no caso de uma reinfecção futura ou até em pacientes transplantados (Guimarães *et al.*, 2011; Horwath *et al.*, 2015; Limaye *et al.*, 2000).

Após um certo período de infecção primária, a resposta imune do hospedeiro pode transitar para um perfil de imunossupressão e de reparo tecidual, marcado pelo desvio de linfócitos Ta1 para T auxiliar do tipo 2 (Ta2) e T regulatório (Treg), macrófagos M1 para M2, e expressão de citocinas anti-inflamatórias Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 33 (IL-33), *Tumor Growth Factor* β (TGF- β), conseqüentemente levando à diminuição da concentração de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (Heung, 2020; Horwath *et al.*, 2015). Caso a infecção persista na fase pró-inflamatória, a doença passa a ser crônica e o dano tecidual aumenta, causando fibrose pulmonar e insuficiência respiratória (Baker *et al.*, 2020).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de histoplasmose pode ser feito de diversas maneiras, e a confirmação geralmente ocorre por mais de um método, considerando que nem todos são conclusivos (Azar e Hage, 2017) (Figura 9). O histórico do paciente é extremamente importante pois pode fornecer indícios, como a atividade de risco ou locais visitados, e direcionar a equipe médica a realizar os exames necessários para um diagnóstico preciso (Govindarajan *et al.*, 2023). Considerando que o pulmão é o órgão de infecção primária, um dos primeiros exames a serem realizados é a radiografia de tórax que visa identificar nódulos cálcicos, ainda que não seja o diagnóstico definitivo, mas sim de direcionamento para exames laboratoriais subsequentes (Ferreira e Borges, 2009).

Em 2008, a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer / Grupo Cooperativo de Infecções Fúngicas Invasivas e Grupo de Estudo de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (EORTC/MSG) estabeleceu os critérios que definem um caso provado e um caso possível para micoses endêmicas, incluindo a histoplasmose (De Pauw *et al.*, 2008).

Segundo este documento, um caso provado é definido como um paciente que contém sintomas compatíveis com a micose endêmica somado ao isolamento do fungo em cultivo, ou exame histopatológico ou exame direto evidenciando a presença de leveduras intracelulares em fagócitos de sangue periférico ou macrófagos teciduais.

Alternativamente, um caso provável assume uma condição associada ao hospedeiro, como um quadro de imunossupressão por causas diversas, além de critérios clínicos como acometimento das vias aéreas ou do sistema nervoso central. A evidência micológica é obtida por testes sorológicos positivos para antígenos de *Histoplasma* na urina, sangue ou líquido, indicando alta suspeita da micose endêmica, mas ainda sendo necessária a comprovação por cultivo ou visualização microscópica. O caso possível foi desconsiderado devido à inespecificidade do quadro clínico e de características do hospedeiro.

2.6.1 Clínico-epidemiológico

Além dos sintomas apresentados pelo paciente, o diagnóstico diferencial para a histoplasmose ocorre, principalmente, a partir de uma boa anamnese. O foco no histórico do paciente proveniente de uma zona endêmica ou com histórico de viagem para locais com alta incidência de histoplasmose pode direcionar o diagnóstico de forma mais efetiva. Conseqüentemente, esta abordagem possibilita o início imediato do tratamento preventivo em caso de suspeita de micose sistêmica, sem necessidade de espera por diagnóstico conclusivo.

Tomemos como exemplo um indivíduo que visitou uma caverna no estado de GO há 1 mês. Este relata alta atividade de morcegos e acúmulo de fezes desses animais pelo trajeto percorrido sem o uso de equipamento de proteção individual

(EPI), como uso da máscara N95. Além disso, apresenta sintomas como perda de peso sem alteração na rotina, fadiga, tosse, desconforto no peito, dificuldade para respirar e febres esporádicas. Ainda, o indivíduo apresentou, há 3 anos, sorologia positiva para HIV, entretanto, descontinuou o tratamento antiretroviral (TARV) há pelo menos 1 ano. Com esse histórico, é possível incluir a histoplasmose como possível causa do quadro clínico deste paciente devido à similaridade de características apresentadas, tanto ambientais como clínicas.

2.6.2 Diagnóstico microbiológico

Um dos diagnósticos considerados como conclusivo e, atualmente, o padrão ouro, é o isolamento de *Histoplasma* sp. a partir do inóculo de amostra de tecido ou fluido corporal do paciente (ex.: biópsia, lavado broncoalveolar - LBA, escarro) em determinados meios de cultivo (Kauffman, 2007). Para este fungo, recomenda-se o cultivo em meio Sabouraud (SAB), Mycosel (MYC) e *Brain-heart infusion* (BHI) (Xavier *et al.*, 2009).

Para este método de diagnóstico, no cultivo da amostra a 25°C observa-se o crescimento lento da fase miceliana (de 2 a 8 semanas) caracterizada por colônias brancas, cotonosas e que adquirem um tom amarronzado à medida que envelhecem, indicando a produção de micro- e macroconídios, e da fase leveduriforme a 35-37°C em ágar sangue, chocolate e SAB (María e Clara, 2020; Xavier *et al.*, 2009).

O diagnóstico padrão ouro possui algumas desvantagens: o crescimento do fungo é bastante lento, necessita de profissionais altamente capacitados e laboratórios com nível de biossegurança 3 para crescimento da fase miceliana devido à alta infectividade de seus propágulos (Azar e Hage, 2017) (Figura 14).

2.6.3 Diagnóstico Histopatológico

Outro diagnóstico considerado conclusivo para a histoplasmose é a histopatologia/visualização direta, através da microscopia ótica, de leveduras, sendo observáveis células ovaladas de 2-4µm de diâmetro, com gemulação única, características de quando coradas com *Gomori methamine silver* (GMS) ou *periodic acid-Schiff* (PAS) (Azar e Hage, 2017; María e Clara, 2020) (Figura 14).

2.6.4 Diagnóstico Citopatológico

Similar ao diagnóstico histopatológico, o exame citopatológico busca visualizar leveduras em aspirados de tecidos e fluidos, como o LBA, quando corados com GMS ou PAS. Este método é considerado invasivo, sua sensibilidade depende da fase clínica da histoplasmose, atingindo apenas 50% de sensibilidade na fase aguda, necessitando o auxílio de outro método de detecção para um diagnóstico mais robusto. Além disso, as leveduras podem ser confundidas com forma amastigotas de *Leishmania* sp. (Azar e Hage, 2017) (Figura 14).

2.6.5 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico é um outro meio complementar para o diagnóstico da histoplasmose e inclui a detecção de antígenos de *Histoplasma* spp. em amostras de soro e urina, podendo ser extrapolada para líquido e LBA, através de métodos como o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

Existem testes de detecção de antígeno disponíveis no mercado pelas empresas MiraVista *Diagnostics* e IMMY, apresentando sensibilidade/especificidade que oscilam, respectivamente, de 64% a 73% e 99% em indivíduos imunocompetentes. Para pessoas com HIV/AIDS (PVHA) e na presença da forma disseminada da doença, as taxas variam de 90% a 100% para sensibilidade e de 32% a 99% para especificidade (Linder e Kauffman, 2019) (Villareal *et al.*, 2023). Apesar dos bons resultados, estes testes apresentam reatividade cruzada em indivíduos acometidos por outras infecções fúngicas, portanto devem ser cautelosamente avaliados para evitar falsos-positivo.

Ainda na sorologia, a detecção de anticorpos, através do método de imunodifusão, é bastante usada em sinergia com outros métodos de diagnóstico pois possui taxas de sensibilidade/especificidade consideráveis para pacientes com a histoplasmose pulmonar aguda/subaguda, entretanto, gera resultados negativos/inconclusivos em pacientes imunocomprometidos devido à baixa resposta de células da imunidade adaptativa (Falci *et al.*, 2019) (Figura 14).

2.6.6 Diagnósticos Moleculares

A detecção por métodos moleculares ganha cada vez mais destaque por sua rapidez e sensibilidade superiores a outros diagnósticos, principalmente a técnica de PCR e suas variações (Lopez *et al.*, 2017). O teste convencional pode ser realizado a partir de uma grande variedade de amostras especificadas nas outras formas de diagnóstico (Azar and Hage, 2017). A técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR), por exemplo, é um método recém desenvolvido, mas que já foi validado para a identificação do fungo *Histoplasma* em amostras animais e no ambiente a partir da utilização de um par de *primers* específico para este fungo, o *hc100* (Lopez *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2022).

Desta maneira, a padronização deste método para amostras clínicas será de extrema importância para o diagnóstico mais rápido e eficiente. Em contrapartida, alguns centros de referência, como no caso do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), dispõem do aparelho de espectrometria de massa denominado como Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF), apresenta um banco de dados extenso referente às proteínas de diversos microrganismos para um diagnóstico rápido. Entretanto este método depende do isolamento do patógeno em cultivo. Vale ressaltar que os métodos moleculares ainda não possuem validação para diagnósticos clínicos em escala laboratorial (Figura 14).

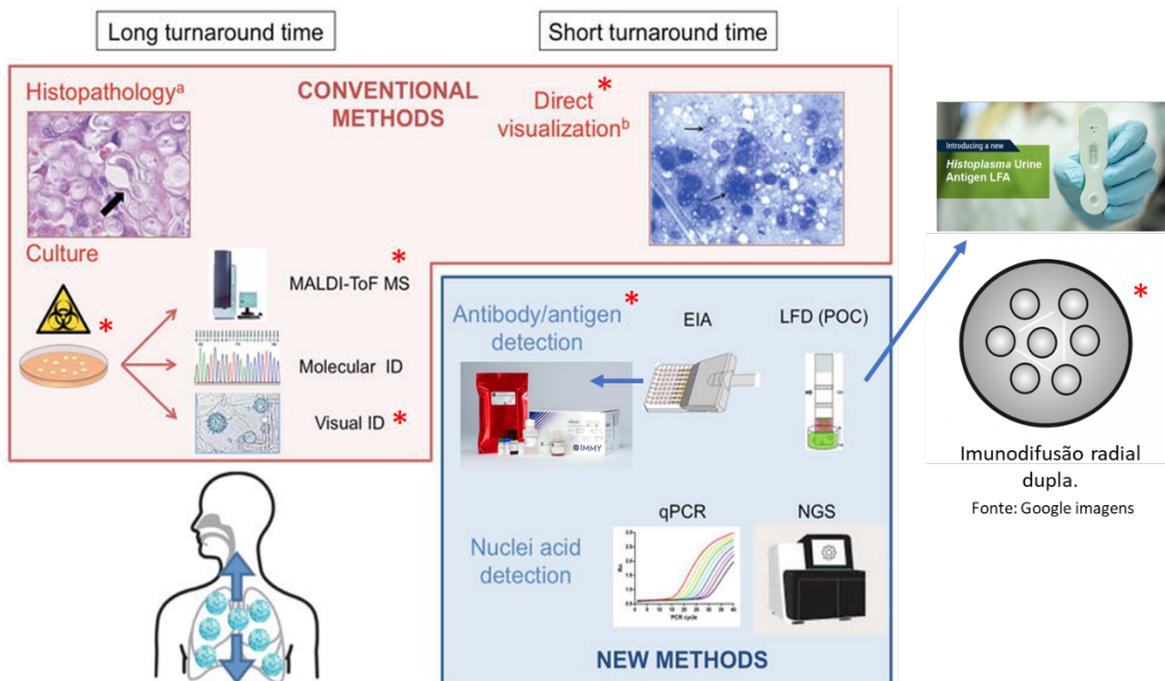


Figura 14. Métodos disponíveis para o diagnóstico da histoplasmose. (a) Preparação histopatológica mostrando uma levedura de *Histoplasma* sp. em brotamento [62]. (b) Visualização direta da citologia de aspiração por agulha fina mostrando leveduras intra e extracelulares de *Histoplasma* sp. MALDI-ToF MS: espectrometria de massa por desvio de tempo assistido por matriz a laser/ionização; ID: identificação (identification); EIA: ensaio imunoenzimático; LFD: dispositivo de fluxo lateral; POC: ponto de cuidado; qPCR: PCR quantitativo; NGS: sequenciamento de nova geração. *Diagnósticos implementados no Distrito Federal.

Fonte: adaptado de Buitrago e Valero, (2020).

2.7 Tratamento

Existem disponíveis no mercado, três principais classes de antifúngicos para o tratamento de micoses sistêmicas: polienos, azóis e equinocandinas (Souza and Amaral, 2017). O itraconazol é o antifúngico utilizado para casos de histoplasmose pulmonar aguda ou moderada, com aplicação oral de 200mg/dia num período de 6 a 12 semanas.

A anfotericina B é usada em casos de histoplasmose pulmonar grave e disseminada numa concentração de 0,7 a 1 mg/kg/dia, com a ressalva de ser a mais tóxica dentre os antifúngicos quando na forma de desoxicolato, necessitando a formulação lipossomal para reduzir os danos aos rins, que também é usada quando disponível, embora tenha uma custo elevado (Kauffman, 2007; Linder e Kauffman,

2019; Wheat *et al.*, 2007). Alternativamente, o posaconazol e o voriconazol podem substituir a anfotericina B em casos graves.

3. Justificativa

A histoplasmose é uma micose endêmica no Brasil, contando com surtos e casos autóctones em todas as regiões do país. A alta incidência de casos no Centro-Oeste brasileiro indica que o Distrito Federal é uma área potencialmente endêmica para o fungo *Histoplasma*, mas não há vigilância epidemiológica da doença e nem são conhecidas as espécies circulantes nesta área. Logo, investigar a epidemiologia molecular da histoplasmose no DF é essencial para avaliação mais precisa dos riscos para a saúde pública na região, facilitando a implementação de estratégias de controle e prevenção, proporcionando, por exemplo a possibilidade de uma resposta rápida a potenciais surtos.

Por outro lado, algo similar ocorre nos Estados Unidos, que possui um sistema de vigilância e diagnósticos mais robustos, mas também apresenta falhas na notificação devido a casos ocorridos fora da zona endêmica proposta. Ainda, a distribuição geográfica das espécies circulantes em seu território não é clara, assim como as condições ambientais que proporcionam a ocorrência das mesmas. A investigação epidemiológica e molecular pode revelar padrões de dispersão fora das zonas endêmicas conhecidas, contribuindo para uma atualização da zona de vigilância e políticas de saúde pública.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Explorar os aspectos epidemiológico e molecular da histoplasmose no DF e entorno e nos EUA, investigando a distribuição das espécies e as características do nicho ecológico deste fungo no território norte-americano.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar surtos e microepidemias de histoplasmose no Brasil através de uma revisão narrativa, visando quantidade de surtos ocorridos por estado, quando estes ocorreram e quais as fontes de exposição mais relatada

- Identificar as características clínicas e epidemiológicas no DF e entorno e mapear as possíveis áreas de risco desta região.

- Identificar as espécies de *Histoplasma* circulantes no DF e entorno via sequenciamento genômico, e estudo de filogenética a partir dos isolados clínicos do HUB.

- Compreender a epidemiologia genômica e a distribuição geográfica das espécies de *Histoplasma* em território norte-americano.

- Realizar a análise de modelamento de distribuição de espécies para os fungos *Histoplasma ohiense* e *Histoplasma mississippiense* e identificar potenciais áreas de sobreposição.

- Compreender quais as diferenças do diagnóstico da histoplasmose na região endêmica dos EUA com o que é implementado atualmente no Brasil, buscando formas de desenvolver uma vigilância epidemiológica desta micose no DF e entorno.

5. Materiais e Métodos

5.1 Estudo retrospectivo de surtos de histoplasmose no Brasil

Para esta etapa, foi realizada uma revisão de narrativa. As publicações relacionadas à histoplasmose no Brasil foram obtidas por combinações de palavras-chave e termos como '*Histoplasma*', 'histoplasmose', 'histoplasmose e surtos', 'surto de histoplasmose no Brasil', 'microepidemias/epidemias e histoplasmose' em bancos

de dados públicos como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Pubmed, Google, Google Scholar, Scielo, Web of Science.

A busca foi ampliada para incluir dissertações de mestrado e teses de doutorado disponíveis nos repositórios de universidades brasileiras, bem como anais de congressos. Foram utilizados termos relacionados à doença, como "histoplasmose", combinados com nomes de cidades, municípios e estados afetados em todo o Brasil. Além disso, os campos de busca incluíram o nome dos autores e o ano de publicação, a fim de garantir uma ampla cobertura de fontes acadêmicas que abordem a ocorrência de surtos no país.

As referências citando outros surtos no Brasil também foram consideradas. Além disso, foram incluídos estudos em qualquer idioma relatando um surto ou uma microepidemia de histoplasmose no Brasil, envolvendo, num mesmo evento de exposição, duas ou mais pessoas, ou uma pessoa e um mamífero não-humano, cujo diagnóstico tenha sido confirmado para a doença. Casos isolados foram excluídos do estudo.

As informações relevantes extraídas dos estudos foram: a data do surto (mês e ano), localização (estado e cidade), coordenadas geográficas, número de envolvidos, diagnóstico por cultivo ou sorológico, exame radiológico, disseminação e desfecho da doença (óbito).

5.2 Georreferenciamento e Cartografia dos surtos de histoplasmose no Brasil

As coordenadas dos surtos e microepidemias de histoplasmose foram obtidas por meio do georreferenciamento das cidades de relato, através do centróide dos estados brasileiros e dos municípios, no caso do RJ, com o intuito de ilustrar a distribuição de surtos da doença em todo o país de maneira simplificada. Os mapas foram gerados através do software QGIS versão 3.6.2.

5.3 Coleta dos dados clínicos e sociodemográficos de pacientes com histoplasmose – estudo retrospectivo no Distrito Federal

Esta etapa é caracterizada como um estudo retrospectivo pois baseia-se na coleta de dados secundários provenientes de prontuários, realizada nas dependências do HUB e LACEN-DF. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do HUB e da Faculdade de Medicina, UnB (processo CAAE 68687323.1.0000.5558).

O estudo retrospectivo foi conduzido no Laboratório de Micologia do Hospital Universitário de Brasília e nas instalações do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). Ambos os laboratórios atuam como centros de referência médica em micologia para o diagnóstico de histoplasmose em todo o sistema público de saúde do DF.

Os casos confirmados foram diagnosticados com base no cultivo microbiológico do fungo em ágar MYC ou SAB. Os casos denominados prováveis, foram identificados por imunodifusão dupla ou exame direto (Linder e Kauffman, 2019). Recolhemos dados clínicos, epidemiológicos e sociodemográficos de prontuários médicos físicos e eletrônicos (através do Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL, e TrakCare) de casos de histoplasmose no DF e arredores, abrangendo o período de 1994 a 2022.

Os dados demográficos e epidemiológicos de interesse incluíram o ano do diagnóstico, idade, sexo biológico, etnia, endereço residencial, profissão, local e métodos de diagnóstico, histórico de uso de drogas, sorologia para HIV, contagem de linfócitos CD4+, apresentação clínica da doença, coinfeções, comorbidades, detalhes do tratamento (incluindo dose e duração), e registro de óbito (Apêndice 2). Os locais de residência foram posteriormente utilizados como dados de entrada para a geração de mapas coropléticos da histoplasmose no DF e em GO, utilizando o software ArcGIS versão 3.40.

5.4 Recuperação dos isolados clínicos de *Histoplasma* sp. da micoteca do Hospital Universitário de Brasília e dos Estados Unidos

Esta etapa foi realizada em um laboratório de Nível de Biossegurança 3 (BSL3) no LACEN-DF devido à alta infectividade da fase micelial do fungo *Histoplasma*. Os

isolados clínicos (n = 18) da coleção micológica estavam armazenados em temperatura ambiente no laboratório de micologia do HUB. Para recuperar esses isolados, utilizamos alças de inoculação estéreis para transferir uma porção das colônias para dois meios de cultura recém-preparados: ágar SAB (Kasvi) e caldo BHI (Kasvi). Os repiques foram mantidos em temperatura ambiente no laboratório de micologia do LACEN-DF por 28 dias.

Para cada colônia sugestiva de *Histoplasma* sp. (branca e cotonosa ou marrom e cotonosa), uma lâmina com azul de lactofenol foi preparada para visualizar as estruturas fúngicas e garantir que a colônia isolada não fosse um contaminante. As colônias foram repicadas até o isolamento de uma colônia com biomassa suficiente de *Histoplasma* sp. para uma extração eficaz de DNA. Subculturas contaminadas ou aquelas sem crescimento observável foram autoclavadas e descartadas de acordo com os padrões de biossegurança (Figura 15).

Os 62 isolados de *Histoplasma* sp. dos EUA incluídos neste estudo estavam armazenados em *ultrafreezer* a -70°C na coleção micológica do CDC, na Geórgia, EUA. Dentre eles, os isolados de origem veterinária (n = 16) foram obtidos de animais domésticos atendidos por demanda espontânea no serviço veterinário do Departamento de Ciências Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Oklahoma, em Stillwater, OK. Os isolados clínicos (n = 29), ambientais (n = 12) e de animais silvestres (n = 2) foram obtidos em estudos anteriores (Tenório *et al.*, 2024), muitos dos quais com dados incompletos sobre os locais de coleta. Três amostras têm origem desconhecida. Todos os isolados foram cultivados em meio BHI a 25°C por 10 dias para a extração do DNA fúngico, sequenciamento, identificação de SNPs e análises de filogenética e genética de populações (Figura 16).

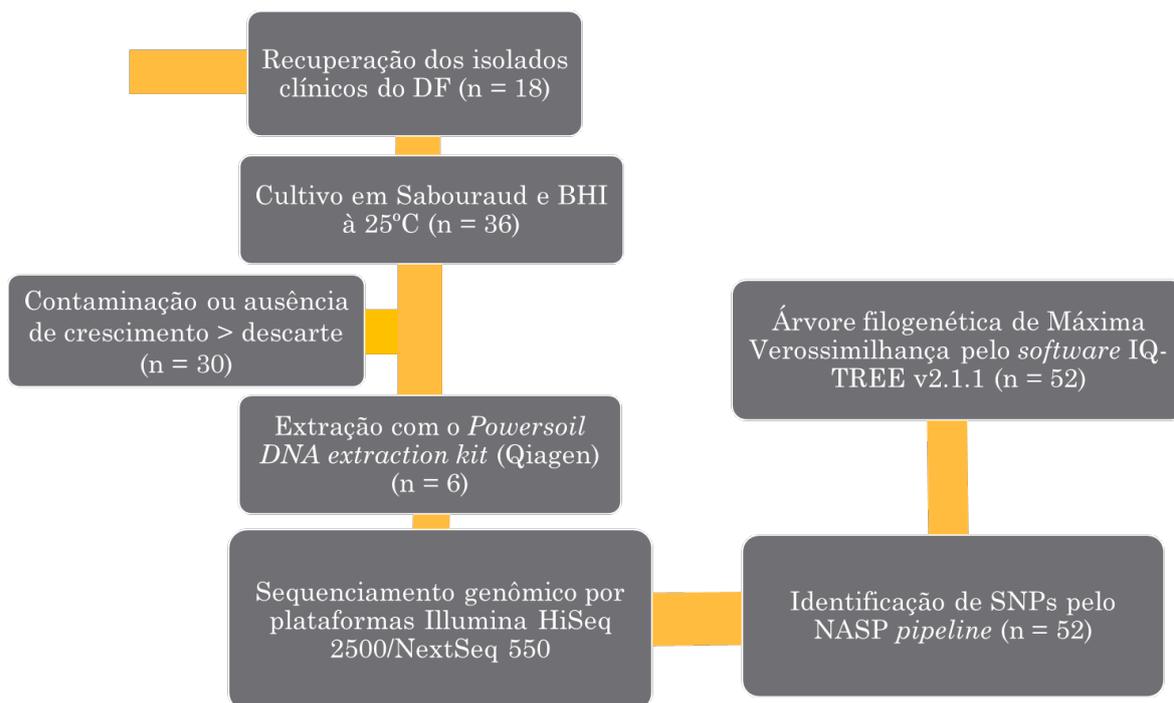


Figura 15. Fluxograma do processo de recuperação, extração e análises filogenéticas dos 18 isolados de *Histoplasma* sp. da micoteca do Hospital Universitário de Brasília, Brasília-DF. A recuperação dos isolados foi realizada nos meios Sabouraud e BHI, totalizando 36 amostras. Foram recuperadas apenas seis amostras viáveis para a extração e, após o sequenciamento destas, os genomas dos isolados do HUB foram comparados a outros 46 genomas de *Histoplasma* sp. da literatura para identificação de SNPs e inferência da filogenia.

Fonte: autoria própria.

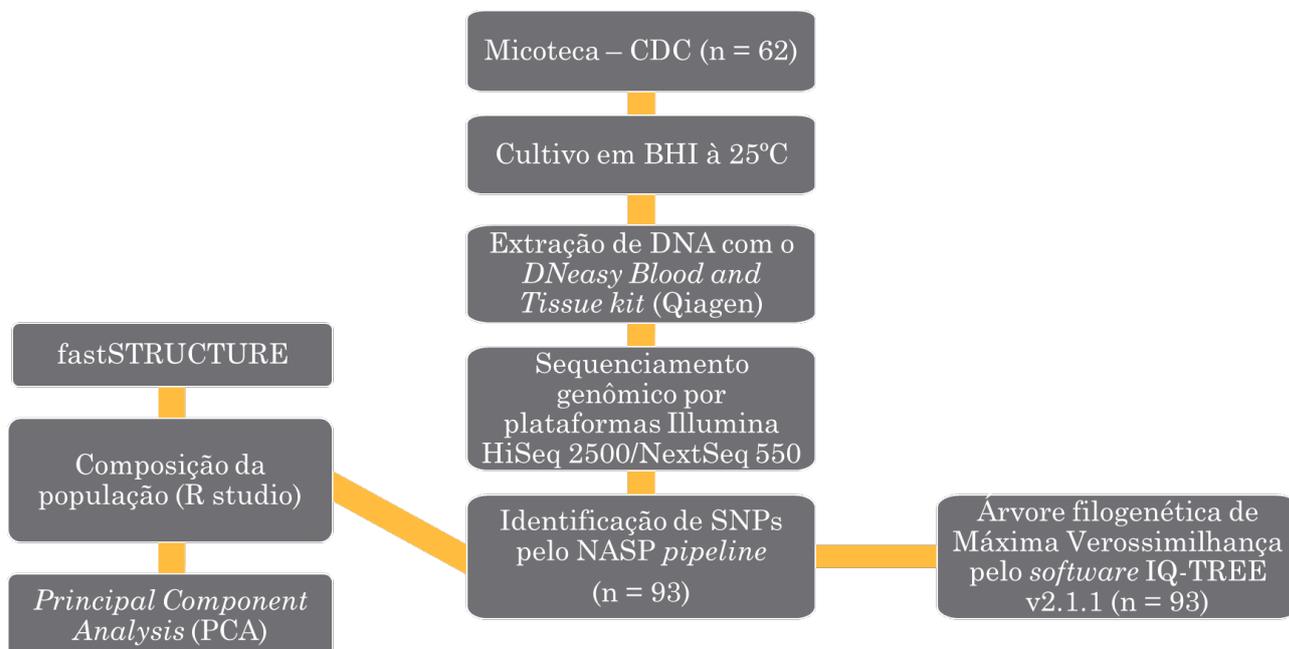


Figura 16. Fluxograma do processo de recuperação, extração e análises filogenéticas e de genética de populações dos isolados de *Histoplasma* sp. da micoteca do Center for Control and Diseases

Prevention. Para as análises de bioinformática, os genomas dos 62 isolados de *Histoplasma* sp. do CDC foram comparados a outros 31 genomas publicados em outros estudos.

Fonte: autoria própria.

5.5 Extração de DNA dos isolados clínicos de *Histoplasma* do Distrito Federal e dos Estados Unidos

Em uma cabine de segurança biológica classe II, 500µg de colônia fúngica foram transferidos para um tubo de centrifuga utilizando alças de inoculação estéreis. Estes tubos continham um tampão de lise do kit para extração de DNA PowerSoil (Qiagen) e esferas de vidro para auxiliar na quebra da parede fúngica. A extração de DNA de *Histoplasma* foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, porém com modificações na etapa de lise, envolvendo uma etapa de 10 ciclos de 1 minuto a 5.500 rpm no aparelho Precellys 24 *touch* (Bertin technologies). Ao final do processo, 50µL de DNA puro de cada isolado foram devidamente rotulados e estocados a -20°C. Para os isolados dos EUA, o DNA genômico foi extraído através do kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Gaithersburg, MD).

5.6 Sequenciamento genômico e genotipagem dos isolados clínicos de *Histoplasma* do Distrito Federal e dos Estados Unidos

A integridade dos DNAs extraídos foi verificada por eletroforese em gel de 0,8% de agarose. A estimativa de quantidade e pureza foi realizada por espectrofotometria no NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher). As bibliotecas de sequenciamento do tipo *paired-end* foram preparadas utilizando o kit Kapa Biosystems (Kapa Biosystems, Woburn, MA), utilizando aproximadamente 1 µg de DNA. O sequenciamento do DNA foi realizado nos equipamentos Illumina HiSeq 2500 (100 pb, *high output*, kits v3 ou v4) e Illumina NextSeq 550 (150pb, *high output mode* kit v2).

As *reads* foram polidas utilizando o Trimmomatic V0.32 (Bolger *et al.*, 2014) com os seguintes parâmetros: SLIDINGWINDOW:10:30, LEADING:28, TRAILING:28 e MINLEN:80. Essas leituras foram alinhadas à cepa de referência *H. mississippiense* *NAm1* (AAJI00000000.1) utilizando o pipeline Burrows-Wheeler Aligner (BWA - v 0.7.17 - (Li e Durbin, 2009)).

A cobertura genômica foi avaliada usando o script tinycov (<https://github.com/cmdoret/tinycov>). As *reads* processadas de cada cepa foram remapeadas para seu arquivo .bam correspondente para identificar INDELS e eliminar segmentos de DNA não mapeados, utilizando os programas RealignerTargetCreator e IndelRealigner (GATK toolkit v3.3-0 (McKenna *et al.*, 2010)).

O UnifiedGenotyper foi utilizado para identificar os SNPs, e filtros rigorosos foram aplicados aos arquivos .vcf com os seguintes parâmetros: QD=2.0, FS_filter=60.0, MQ_filter=30.0, MQ_Rank_Sum_filter=-12.5, Read_Pos_Rank_Sum_filter=-8. Os SNPs com baixa cobertura (<10X) ou com variantes alélicas inferiores a 90%, ou que estavam dentro de regiões duplicadas (detectadas pela ferramenta NUCmer (Kurtz *et al.*, 2004) na referência foram excluídos do conjunto de dados final.

A matriz de SNPs, composta por 93 isolados no grupo de dados dos EUA e 52 no grupo de dados do DF, foi utilizada para análise evolutiva. As árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML) foram construídas usando o IQ-TREE v2.1.1 (Minh *et al.*, 2020). O suporte do ramo das árvores foi determinado por meio de bootstrap e testes de razão de verossimilhança aproximada SH-like (Anisimova e Gsacuel, 2006; Minh *et al.*, 2013).

No caso das cepas norte-americanas, a composição populacional foi calculada por meio de duas abordagens: (i) o fastSTRUCTURE (Raj *et al.*, 2014) foi utilizado para investigar o número de populações crípticas dentro de *H. mississippiense* + *H. ohiense* ou em *H. mississippiense* e *H. ohiense* separadamente; o melhor cenário (k) de número de populações foi inferido pela maximização dos escores de log-verossimilhança simulados usando a função choosek.py. (ii) A Análise de Coordenação Principal (PCA), implementada no pacote R Adegenet v1.3 (Jombart e Ahmed, 2011), foi utilizada para avaliar a distribuição populacional dos mesmos conjuntos de dados com base na variação genética distribuída em duas coordenadas, PC1 e PC2.

Por fim, estudamos a quantidade de diversidade genética em *H. mississippiense* e *H. ohiense* calculando a diversidade média de nucleotídeos (π)

dentro das espécies, utilizando o script em Python `popgenWindows.py` disponível em https://github.com/simonhmartin/genomics_general. O idiomorfo sexual de cada isolado foi determinado alinhando os loci MAT1-1 (EF433757) ou MAT1-2 (EF433756) a cada genoma correspondente do fungo *Histoplasma*. O teste Qui-Quadrado foi empregado para avaliar se houve desvio da distribuição esperada de tipo de acasalamento 50:50.

5.7 Modelamento da distribuição de espécies *H. mississippiense* e *H. ohioense* nos Estados Unidos

As coordenadas geográficas das cidades/estados das amostras clínicas, veterinárias e ambientais, disponíveis em registros no CDC-EUA e Sepúlveda *et al.*, 2017, foram obtidas pelo *site* `latlong.net` (disponível em <https://www.latlong.net>). Para aumentar a robustez do modelo de nicho, incluímos amostras genotipadas utilizando um ou múltiplos loci, conforme publicado anteriormente (Balajee *et al.*, 2013; Kasuga *et al.*, 1999; Kasuga *et al.*, 2003; Sepúlveda *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2013), totalizando 152 entradas.

Amostras com metadados a nível exato de localização do hospital, clínica veterinária e/ou amostra ambiental (n=29) foram incluídas como localização de alta confiança através de uma coordenada geográfica exata no *raster* do perímetro urbano. *Raster* é um formato de dados geoespaciais utilizado para representar informações geográficas em uma estrutura de grade, onde o espaço é dividido em células ou pixels. Cada célula contém um valor que representa uma característica do terreno, como elevação, temperatura, ou outro dado ambiental. Amostras contendo informações a nível estadual (n=123) foram aleatorizadas para qualquer ponto dentro desse estado específico usando o Google Earth Engine (Gorelick *et al.*, 2017) por meio da função `randomPoints`.

Amostras sem informações geográficas foram excluídas da análise de modelamento de distribuição de espécies. As informações de presença geográfica foram obtidas no centro médico/veterinário onde cada isolado foi coletado, portanto, isso pode distorcer o modelo por introduzir o viés de ausência do local provável de

infecção. As variáveis climáticas usadas para prever a distribuição das duas espécies de *Histoplasma* foram obtidas do banco de dados WorldClim 2 (Fick and Hijmans, 2017). Esses dados representam médias de 1970 a 2000 de variáveis climáticas derivadas de medições meteorológicas terrestres. Essas variáveis englobam temperatura, precipitação e outras condições ambientais ecologicamente significativas para a ocupação do nicho geográfico como precipitação do trimestre mais seco, temperatura média do trimestre mais quente, precipitação anual e temperatura mínima do mês mais frio, temperatura média do trimestre mais frio, precipitação do trimestre mais frio.

Para prever a distribuição das duas espécies de *Histoplasma*, foram calculados modelos de distribuição de espécies (SDM) separados com base no algoritmo de Máxima Entropia (MaxEnt) (Phillips *et al.*, 2006). Os modelos de MaxEnt são baseados em dados geográficos de presença, apenas. Para que o modelo contabilizasse ausências e áreas onde as presenças não foram consideradas, mas podem ser possíveis, adicionamos uma amostragem aleatória de 1.000 pontos de fundo a ambos os modelos. Os cálculos e modelos foram realizados e avaliados utilizando o pacote R *dismo* através dos pacotes 'sf' (Pebesma, 2018), 'spatstat' (Baddeley e Turner, 2005), 'stars' (Pebesma e Bivand, 2023) e 'MASS' (Venables e Ripley, 2002).

Modelos de MaxEnt separados foram executados para a distribuição de *H. ohiense* e *H. mississippiense*. Em ambos os modelos, variáveis climáticas foram avaliadas quanto à colinearidade utilizando o teste de correlação de Spearman para pares, com um limite de 0,7, seguido de um teste *leave-one-out* Jackknife entre todas as variáveis correlacionadas. O desempenho do modelo foi avaliado utilizando a área sob a curva (AUC) da característica de operação do receptor (ROC). Para detectar áreas de sobreposição de nicho entre as duas espécies de *Histoplasma*, as distribuições previstas foram sobrepostas em um mapa. Foi estabelecido um limite de probabilidade prevista de 0,75 para examinar as áreas com maior probabilidade de sobreposição de alta confiança.

6. Resultados

6.1 Revisão dos surtos de histoplasmose no Brasil

Este estudo já foi publicado em artigo e está disponível no Apêndice 1.

6.2 Estudo retrospectivo da histoplasmose no Distrito Federal e entorno

O estudo retrospectivo identificou 26 casos confirmados e 8 casos prováveis de histoplasmose no DF e arredores, entre 1994 e 2022. Os relatórios médicos mostraram que os casos de histoplasmose foram predominantemente diagnosticados no Hospital Universitário de Brasília (HUB), Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) e Hospital Regional da Asa Norte (HRAN). Os dados sumarizados do estudo retrospectivo encontram-se na Tabela 1. A Tabela completa encontra-se no Apêndice 2.

Tabela 1. Dados sumarizados do estudo retrospectivo da histoplasmose no DF e entorno.

Ano do diagnóstico	Nº de pacientes	Sexo Biológico	Idade (anos)	Diagnóstico	Sorologia para HIV	Formas clínicas da histoplasmose	Coinfecções	Óbito
1994-2004	4	3M 1F	23-37	Cultivo/ Exame Direto	2 positivos	3 disseminadas, 1 crônica	tuberculose, <i>M. avium</i>	1
2005-2015	12	9M 3F	18-79	Cultivo/ Exame Direto	6 positivos 3 negativos	6 disseminadas, 5 agudas, 1 crônica	tuberculose, <i>M. avium</i> , leishmaniose, candidíase	3
2016-2022	16	12M 4F	23-90	Cultivo/ Exame Direto/ Sorologia	14 positivos	10 disseminadas	tuberculose, leishmaniose, candidíase, neurotoxoplasmose, COVID-19, citomegalovírus	7
NA	2	2M	55-70	Cultivo/ Sorologia	1 positivos	1 disseminada	-	1

M = Masculino, F = Feminino.

Fonte: prontuários médicos do HUB e LACEN-DF.

Todos os pacientes tinham o sexo biológico registrado, sendo 26 do sexo masculino e oito do sexo feminino, resultando em uma proporção de 3,25 homens para cada mulher. A idade média foi de 54 anos (variando de 18 a 90 anos) no momento do diagnóstico de histoplasmose e o valor de p foi significativo para esta

variável ($p=0.012$). Embora limitados, foram coletados históricos de uso de drogas, com sete fumantes ou ex-fumantes (7/34), cinco usuários de álcool (5/34) e um caso de uso de substâncias ilícitas, como maconha e cocaína (1/34). Todas essas informações podem ser visualizadas na Tabela 2 e Apêndice 2.

A ocupação de 53% dos pacientes estava disponível (18/34), incluindo agricultores ou ex-trabalhadores rurais (3), carpinteiro/pedreiro (2), ferreiro/pintor (1), manicure (1), motorista de caminhão (1), cozinheiro (1), estudante (1), entre outros (Tabela 2). Os pacientes eram provenientes de 11 municípios do Distrito Federal. Casos de histoplasmosose também foram diagnosticados em pacientes residentes em oito cidades de GO, nas proximidades do DF (Figura 17). Os locais de residência de quatro pacientes não foram especificados. Além disso, a origem, quando disponível, foi registrada e incluía cidades dos estados do Maranhão, MG, GO, Espírito Santo, Paraíba, Piauí, BA, Pernambuco e um caso estrangeiro da Venezuela (Apêndice 2).

Tabela 2. Dados sociodemográficos dos pacientes com histoplasmosse no Distrito Federal e em Goiás de 1994 a 2022.

Variável	HIV-Positivo N = 23 ¹	HIV-Negativo N = 3 ¹	Nd N = 8 ¹	p-value ²
Sexo Biológico				0.3
Masculino	19 (83%)	2 (67%)	5 (63%)	
Feminino	4 (17%)	1 (33%)	3 (38%)	
Raça				>0.9
Branca	4 (17%)	0 (0%)	2 (25%)	
Pardo	6 (26%)	1 (33%)	1 (13%)	
Nd	13 (57%)	2 (67%)	5 (63%)	
Idade				0.012
0-20 anos	1 (4.3%)	0 (0%)	1 (13%)	
21-40 anos	12 (52%)	1 (33%)	2 (25%)	
41-60 anos	10 (43%)	1 (33%)	1 (13%)	
61-80 anos	0 (0%)	1 (33%)	3 (38%)	
Mais que 80 anos	0 (0%)	0 (0%)	1 (13%)	
Tabagista				0.2
Sim	4 (17%)	0 (0%)	2 (25%)	
Não	8 (35%)	2 (67%)	0 (0%)	
Ex-tabagista	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Nd	10 (43%)	1 (33%)	6 (75%)	
Etilista				0.10
Sim	5 (22%)	0 (0%)	0 (0%)	
Não	7 (30%)	1 (33%)	0 (0%)	
Nd	11 (48%)	2 (67%)	8 (100%)	
Entorpecentes				0.5
Sim	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Não	4 (17%)	1 (33%)	0 (0%)	
Nd	18 (78%)	2 (67%)	8 (100%)	
Profissão				>0.9
Administrador	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Agricultor	1 (4.3%)	0 (0%)	1 (13%)	
Aposentado	2 (8.7%)	0 (0%)	1 (13%)	
Caminhoneiro	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Construtor Civil	1 (4.3%)	1 (33%)	0 (0%)	
Cozinheiro	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Desempregado	1 (4.3%)	0 (0%)	1 (13%)	
Estudante	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Funcionário Público	0 (0%)	0 (0%)	1 (13%)	
Manicure	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Técnico em eletrônica	1 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Vendedor	2 (8.7%)	0 (0%)	0 (0%)	
Nd	10 (43%)	2 (67%)	4 (50%)	
Óbito				0.4
Sim	10 (43%)	0 (0%)	2 (25%)	
Não	8 (35%)	3 (100%)	4 (50%)	
Nd	5 (22%)	0 (0%)	2 (25%)	

¹n (%) ²Fisher's exact test

Fonte: autoria própria

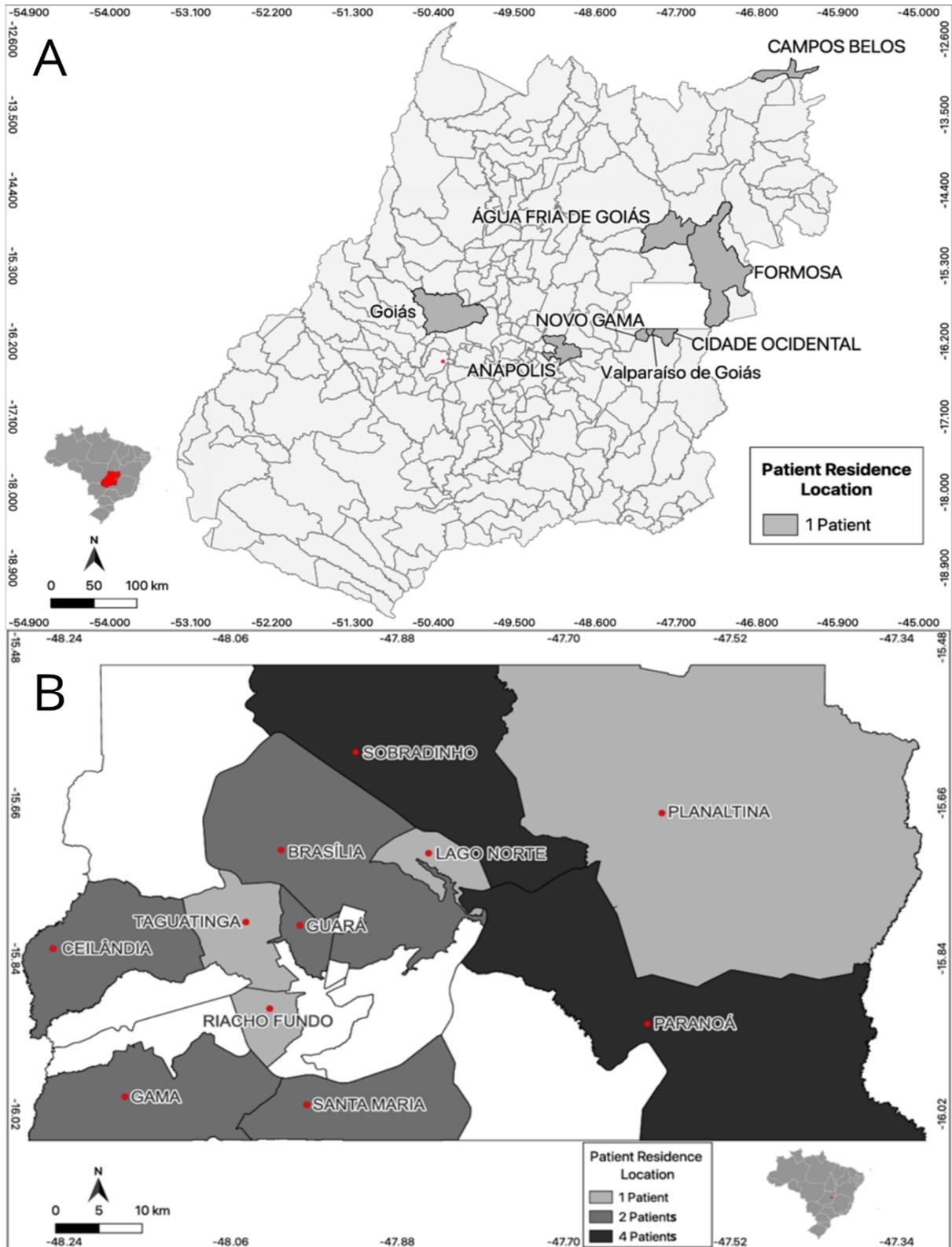


Figura 17. Distribuição geográfica da residência de pacientes com histoplasmose nos municípios do estado de Goiás (A) e no Distrito Federal (B). Mapa produzido no QGIS v. 3.40.0 com base no mapa do IBGE. Apenas regiões com 1 ou mais casos estão representadas.

Fonte: autoria própria.

Os diagnósticos foram realizados a partir de amostras de líquido cefalorraquidiano ou líquido (3/34), sangue (3/34), medula óssea (7/34), lavado broncoalveolar (4/34), escarro (2/34), biópsia (10/34) (quatro de pele, uma intestinal, duas hepáticas, uma de pulmão/epiglote, e duas biópsias não especificadas), e soro (5/34) (Figura 18). Esses achados demonstram que a maioria dos casos de histoplasmose neste estudo encontravam-se na forma disseminada, extrapulmonar.

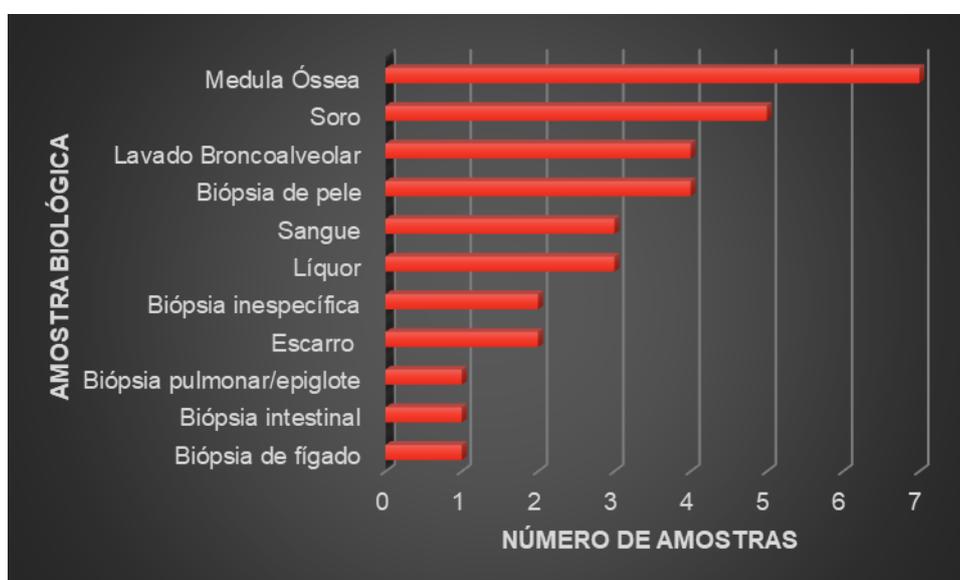


Figura 18. Amostras biológicas que possibilitaram o diagnóstico da histoplasmose.

Fonte: autoria própria.

O cultivo foi o método principal para confirmação dos casos de histoplasmose (22/34), seguido da combinação entre cultivo/exame direto (4/34). Os casos prováveis foram inferidos a partir da sorologia por imunodifusão radial dupla (5/34) e exame direto (3/34) (Figura 19)

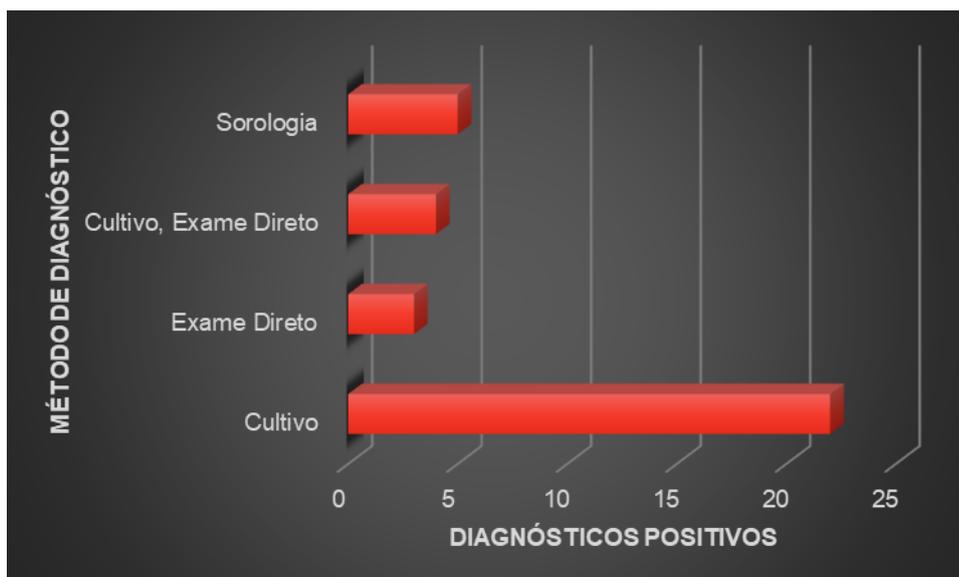


Figura 19. Métodos de diagnóstico descritos para identificação dos casos de histoplasmose no HUB e no LACEN-DF.

Fonte: autoria própria.

Em relação à apresentação clínica da histoplasmose, cinco casos apresentaram infecção pulmonar aguda, dois casos tinham a forma pulmonar crônica, 19 casos mostraram disseminação, e não foi possível estabelecer uma forma clínica para sete pacientes. Dois pacientes possuíam histórico de histoplasmose recorrente. Dez pacientes apresentavam exames radiológicos compatíveis com infecções pulmonares (Apêndice 2 – observações).

O diagnóstico positivo para HIV ocorreu em 67% dos indivíduos infectados (23/34). Entre os 23 casos de HIV positivos identificados neste estudo, 43% evoluíram para óbito (10/23). A contagem de linfócitos CD4+ estava disponível para 65% dos casos de HIV positivos (15/23), com 53% dos pacientes apresentando contagem celular <200 células/mm³ (9/15) (valor de referência em adulto CD4 = 900 a 2900 cél/mm³) (Apêndice 2).

Em relação às coinfeções, a tuberculose foi relatada em quatro casos, seguida de quatro casos de candidíase esofágica, dois de leishmaniose visceral, dois por *Mycobacterium avium*, um de COVID-19, um de neurotoxoplasmose e um de infecção por citomegalovírus (Figura 20). Vale ressaltar que todos os casos de coinfeção

foram diagnosticados em pacientes HIV positivos, exceto por uma coinfeção em um paciente sem sorologia para HIV.

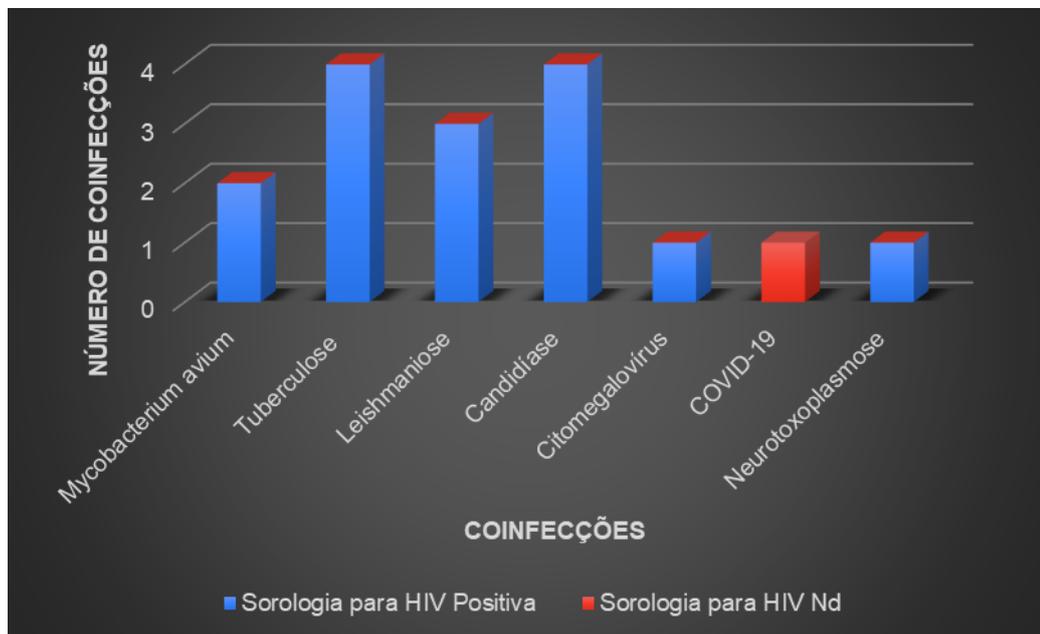


Figura 20. Distribuição de coinfeções por resultado da sorologia para HIV. Nota-se que alguns pacientes estavam coinfectados por mais de um patógeno: um paciente com leishmaniose e candidíase esofágica, um paciente com neurotoxoplasmose e candidíase esofágica, um paciente com tuberculose + citomegalovírus (esofagite) + *Candida albicans*, e um paciente com candidíase não especificada e COVID-19. Nd = Não descrito.

Os medicamentos utilizados para o tratamento da histoplasmosse foram itraconazol, fluconazol, anfotericina B, anfotericina B lipossomal e voriconazol, em associação ou não com a terapia antirretroviral (TARV) nos casos de pacientes com sorologia positiva para HIV e também com antibióticos para tratamento de coinfeções, como tuberculose. As doses e tempo de tratamento, embora limitados, variavam de 100 a 200mg/dia para itraconazol, com apenas um caso de terapia antifúngica por três anos; 52,9% dos casos não descreveram nenhum tipo de tratamento antifúngico (18/34). Para os pacientes com HIV/AIDS, a TARV foi frequentemente relatada, embora na maioria das vezes tenha sido descontinuada ou atrasada. Dois pacientes falecidos não possuíam nenhuma informação sobre infecção por HIV (Apêndice 2).

6.3 Recuperação de isolados clínicos, sequenciamento genômico e análises de filogenética

Dos 18 isolados iniciais, apenas seis foram recuperados com sucesso em meio SAB. A extração de DNA foi bem-sucedida para todos os seis, mas os padrões de sequenciamento foram alcançados apenas para três isolados. A nomenclatura dos isolados foi aleatorizada para HCHUB01, HCHUB02 e HCHUB03. Ainda, é importante ressaltar que não foram localizadas as informações sociodemográficas sobre os pacientes referentes aos 3 isolados clínicos de *Histoplasma*. Na árvore filogenética de Máxima Verossimilhança, os isolados deste estudo estão destacados em letras vermelhas e revelou-se que os isolados HCHUB01, HCHUB02 agrupavam-se com os isolados de *H. suramericanum*, clado Nordeste, enquanto que o HCHUB03 agrupa-se com isolados do clado *Histoplasma* sp. LamB (Figura 21).

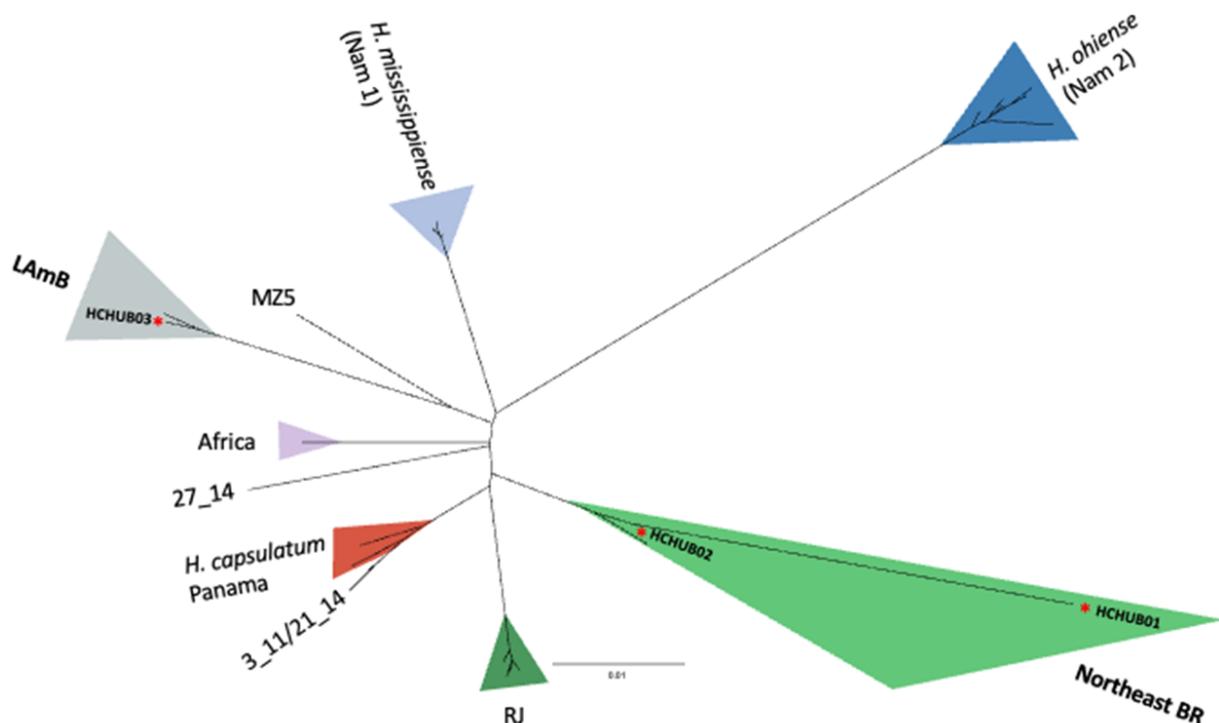


Figura 21. Árvore filogenética de isolados de *Histoplasma* sequenciados na América Latina. Os isolados deste estudo estão destacados com um asterisco vermelho. Os isolados HCHUB01, HCHUB02 agrupam-se com isolados do Nordeste, enquanto o HCHUB03 está mais próximo dos isolados LAmB1. A árvore filogenética foi construída usando o Método da Máxima Verossimilhança (ML) com o software IQ-TREE versão 2.1.1. O suporte dos ramos foi determinado utilizando testes de bootstrap e testes de razão de verossimilhança aproximada do tipo SH.

Fonte: autoria própria.

7. Discussão

7.1 Histoplasmose no Distrito Federal e entorno

O artigo referente a este tema está em preparo e encontra-se no Apêndice 1.

A histoplasmose é uma micose sistêmica distribuída globalmente e de alta endemicidade nas Américas (Ashraf *et al.*, 2020). No Brasil, parte dos casos relatados concentram-se na região Centro-Oeste, que detém mais de 400 reportados e inclui o único estado com notificação compulsória para a doença nesta região, GO (Almeida *et al.*, 2019). O DF é uma unidade federativa inserida na demarcação territorial do estado de GO e junto ao seu entorno, espera-se uma incidência elevada da histoplasmose considerando a quantidade de casos relatados nesse estado.

O estudo retrospectivo revelou, entre casos confirmados e prováveis, 34 casos de histoplasmose no DF e entorno em um período de 29 anos (1994-2022). Somados aos dois surtos envolvendo 28 bombeiros infectados durante o treinamento na caverna em Brazlândia e aos 14 casos relatados em uma zona rural em 1971, registra-se, ao todo, 76 casos de histoplasmose no DF e entorno (Alves *et al.*, 2021; Schmidt *et al.*, 1973). Logo, é possível concluir que o DF e seu entorno são áreas potencialmente endêmicas de histoplasmose, porém com poucos focos identificados. Adicionalmente, também é possível que o DF, devido à sua rede de saúde robusta, seja um local de busca de atendimento médico de qualidade, refletindo em casos importados de outros estados.

Deste modo, pode-se afirmar que, apesar de o DF e seu entorno serem áreas potencialmente endêmicas para a histoplasmose, a região enfrenta desafios relacionados à ausência de notificação e poucos relatos na literatura científica. Entretanto, este estudo representa um marco significativo, contribuindo com cerca de 50% dos casos relatados da doença até o momento, ampliando de forma expressiva o conhecimento epidemiológico na região e ressaltando a importância de uma vigilância epidemiológica e diagnósticos rápidos mais acessíveis.

Além disso, o mapa temático evidencia, de maneira geral, que os casos de histoplasmose estão distribuídos em todo o DF (Figura 15) e em algumas cidades de

GO próximas ao DF. Entretanto, para a histoplasmose e outras micoses endêmicas no geral, o maior problema para ausência de casos deve-se à ausência de vigilância epidemiológica, como mencionado anteriormente (Queiroz-Telles *et al.*, 2017).

Ainda, em consulta ao Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), através da ferramenta Tabnet Win32 3.3 (disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>), foram encontrados registros de casos de histoplasmose de 1996 à 2023. O foco, nesta ocasião, foi na região Centro-Oeste. Estes dados foram obtidos através das variáveis “Unidade da Federação” na opção “Linha”; “Ano do Óbito” em “Coluna”; e “Óbitos p/ Residência” em “Conteúdo” e escolha de “B39 Histoplasmose” em “Categoria CID-10” (Tabela 3). Estes dados mostram que no DF há apenas quatro instâncias em que a histoplasmose foi definida como a causa de morte. Em contrapartida, o GO demonstra uma quantidade superior de casos em todos os períodos, embora a notificação compulsória só tenha sido estabelecida em 2013.

Tabela 3. Óbitos de histoplasmose no Centro-Oeste obtidos via SIM.

Unidade da Federação	1996-2006	2007-2017	2018-2023	Total
Mato Grosso do Sul	5	6	3	14
Mato Grosso	5	6	1	12
Goiás	18	12	4	34
Distrito Federal	3	0	1	4
Total	31	24	9	64

Fonte: MS/SVS/CGIAE - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM

O número de óbitos por histoplasmose no DF observado via SIM é discrepante quando comparado ao obtido através do estudo retrospectivo. Isso pode ser explicado porque, na maioria das vezes, a histoplasmose não é indicada como a causa da morte. Isto é um fato, especialmente para PVHA, onde a causa da morte é comumente notificada e associada à condição de imunossupressão. Neste aspecto, a literatura traz a histoplasmose como uma doença mais relacionada com a morbidade (Denning, 2024).

Em contrapartida, Adenis e colaboradores compararam as taxas de mortalidade da histoplasmose e da tuberculose em PVHA na América Latina. Os autores demonstraram que as taxas de mortalidade da micose em questão, inclusive

no Brasil, superam as da tuberculose em PVHA (Adenis *et al.*, 2018). Este é um dado preocupante considerando que a mortalidade em PVHA com histoplasmose não tratada é próxima de 100%, ao passo que essa porcentagem cai para 30% em pacientes que recebem terapia antifúngica adequada (Denning, 2024).

Notavelmente, independente da micose sistêmica que acometa um indivíduo, a terapia antifúngica abordada baseia-se nas mesmas classes de antifúngicos, azóis e polienos, com variação de fármacos para determinada fase clínica da doença, doses e período de tratamento. Entretanto, o sucesso da terapia antifúngica está diretamente relacionado com o diagnóstico precoce da doença. Considerando que pacientes com sintomas de infecções agudas pulmonares são inicialmente tratados com antibióticos e empiricamente tratados com antifúngicos apenas quando não há melhora do quadro clínico, o número de fatalidades evitáveis aumenta.

Neste estudo não foi possível avaliar o início dos sintomas relacionados à histoplasmose pois estes dados não constavam de forma clara nos prontuários médicos, e podiam ser atribuídos à outras condições e doenças prévias do paciente no momento do diagnóstico da histoplasmose.

Apesar da lacuna de informações referente ao tratamento, a terapia antifúngica abordada nos casos aqui descritos é condizente com a literatura, ou seja, para casos mais graves, o antifúngico de preferência foi a anfotericina B. O itraconazol também foi utilizado para os casos de doença disseminada, mas provavelmente durante a fase de manutenção por ser menos tóxica ao paciente, que ocorre após a fase de ataque com a anfotericina B.

Outro dado importante é que houve três amostras de líquido cefalorraquidiano positivas para o fungo *Histoplasma* em cultivo. Isso indica que este patógeno é capaz de causar infecção no sistema nervoso central e é mais comum em indivíduos imunocomprometidos, onde geralmente é fatal se não tratada precoce e agressivamente (Wheat *et al.*, 2018). Neste estudo, dois desses pacientes eram soropositivos para HIV, um deles com uma contagem de linfócitos TCD4 de 11 células/mm³, e todos possuíam a forma disseminada da histoplasmose.

Deste modo, é imprescindível para a melhora do diagnóstico e por conseguinte, da vigilância epidemiológica, a implementação do teste rápido *point of care*, um teste de fluxo lateral similar ao teste de gravidez e teste rápido para COVID-19 e que já está disponível no mercado e é aplicado nas regiões endêmicas dos EUA (Abdallah *et al.*, 2021).

Por outro lado, o conteúdo informativo disponibilizado pelo Ministério da Saúde do Brasil sobre a histoplasmose e outras micoses endêmicas ainda é limitado, especialmente no que se diz respeito a expedição de boletins médicos de forma rotineira (Ministério da Saúde, 2023, disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/histoplasmose>).

Em contraste, nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) apresenta, de forma acessível e detalhada em seu site oficial, informações abrangentes sobre a doença, abordando desde o quadro clínico geral até sintomas, etiologia, tratamento, formas de prevenção e relatos de casos de pacientes acometidos pela enfermidade (disponível em <https://www.cdc.gov/histoplasmosis/index.html>).

Neste contexto, o Sistema Nacional de Vigilância para Notificação de Doenças dos EUA, aprovado pelo Conselho de Epidemiologistas Estaduais e Territoriais, define os critérios para a classificação de casos de histoplasmose no contexto de uma vigilância padronizada, porém não nacional. Esses critérios são uniformes e utilizados para estabelecer a definição de um caso para fins de vigilância em saúde pública nos estados considerados endêmicos para a histoplasmose. O documento, publicado em 2017, especifica os critérios clínicos, laboratoriais, ligação epidemiológica e a classificação dos casos como prováveis ou confirmados (CDC, 2017).

A implementação de um modelo similar no Brasil, especialmente em regiões endêmicas ou de busca por atendimento médico de qualidade, poderia melhorar significativamente a vigilância epidemiológica da histoplasmose. Tal modelo proporcionaria uma padronização na identificação e notificação de casos, o que facilitaria a obtenção de dados epidemiológicos mais robustos e permitiria uma resposta de saúde pública mais eficiente.

Além disso, seria fundamental adaptar os critérios clínicos e laboratoriais às especificidades regionais e à capacidade técnica dos laboratórios locais, bem como fortalecer a capacitação de profissionais de saúde para o diagnóstico precoce e manejo adequado da doença. A adoção de sistemas integrados de notificação, como o uso de plataformas digitais e bancos de dados nacionais, também seria crucial para o monitoramento contínuo da doença e a implementação de medidas de controle e prevenção.

Do ponto de vista clínico, o protocolo adotado nos EUA é similar ao do Brasil, com exceção da anamnese e diagnóstico epidemiológico e laboratorial (Figura 22). O diferencial encontra-se no histórico do paciente, que influencia diretamente no período entre o diagnóstico da doença e início da terapia antifúngica adequada. As atividades de risco, histórico de viagens e exames médicos podem levantar precocemente a suspeita de um caso de histoplasmosose e evitar decisões precipitadas. Adicionalmente, o diagnóstico laboratorial baseia-se em testes sorológicos, métodos mais rápidos que o isolamento do fungo em cultivo, e não teriam a desvantagem da reação cruzada com antígenos de *Blastomyces*, já que esta micose é geograficamente limitada aos EUA.

Neste âmbito, o Ministério da Saúde publicou no ano de 2023, o guia de Vigilância em Saúde, que aborda as doenças decorrentes do quadro de HIV/AIDS e inclui as micoses endêmicas (Guia de Vigilância em Saúde, 2023). Neste documento, há uma abordagem mais completa sobre a histoplasmosose e apresenta-se um algoritmo para o rastreamento de histoplasmosose em indivíduos com HIV (Figura 23). Este é o primeiro documento oficial que destaca a importância das micoses na saúde pública e discorre sobre a vigilância epidemiológica das mesmas de maneira geral, mas que

indica

um

caminho

tangível.

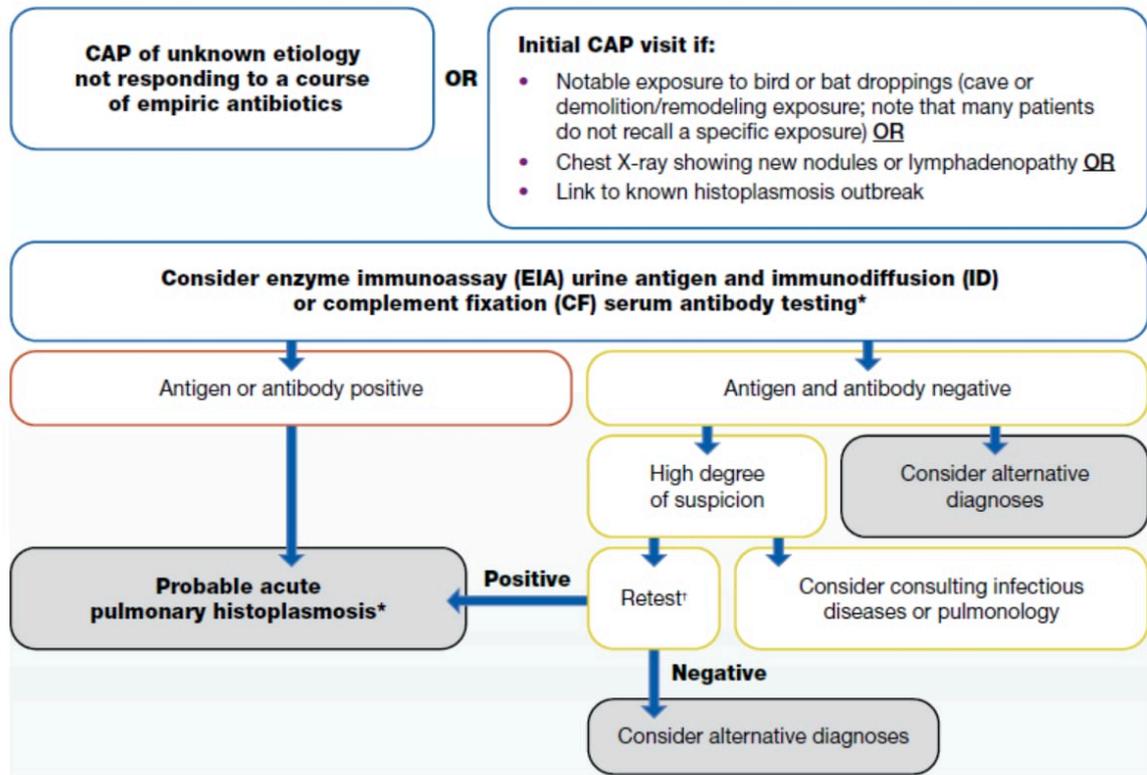
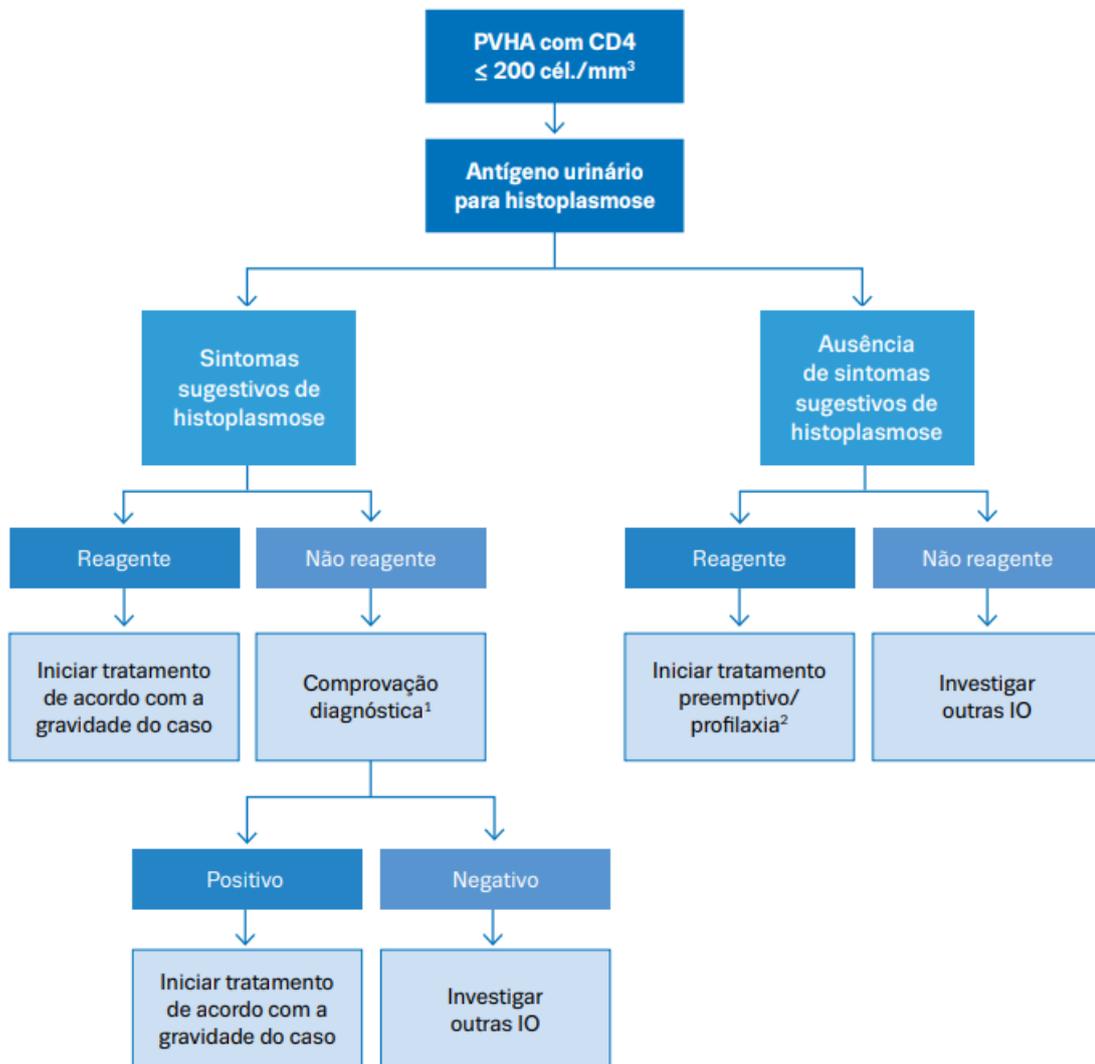


Figura 22. Fluxograma do diagnóstico da histoplasmosse adotado nos EUA (CDC). CAP = Pneumonia Adquirida na Comunidade.

Fonte: adaptado de Smith *et al.* (2023).



Fonte: Dathi/SVSA/MS.

¹ Cultivo micológico, exame histopatológico e/ou exame sorológico.

² Tratamento preemptivo com itraconazol até recuperação do CD4.

Nota: PVHA – pessoa vivendo com HIV/aids; IO – infecções oportunistas.

Figura 23. Fluxograma para rastreio de histoplasmosse em pessoa vivendo com HIV/Aids (PVHA).

Fonte: adaptado de Guia de Vigilância em Saúde (2023).

Outro exemplo que poderia ser futuramente adotado em regiões endêmicas do Brasil, é descrito em Benedict *et al.*, (2020). Neste estudo, avaliou-se a epidemiologia da histoplasmosse entre 2018 e 2019 nos EUA. Seguindo as diretrizes do Sistema Nacional de Vigilância para Notificação de Doenças, o objetivo do estudo era realizar uma vigilância de rotina em 9 estados considerados endêmicos, através de entrevistas com pacientes sobre os seus aspectos clínicos e exposições. Sumariamente,

observou-se que, dos 301 entrevistados, mais da metade havia sido tratada com antibacterianos e apenas 15% conhecia a histoplasmose antes do diagnóstico, indicando que o tratamento empírico foi empregado em mais de 150 indivíduos e poucos tinham sequer noção sobre a enfermidade que os afetara. Apesar das limitações de viés indicadas pelos autores, principalmente relacionada à confiabilidade da recordação dos entrevistados acerca do início dos sintomas e busca por atendimento, este estudo demonstrou que essa iniciativa de vigilância ajuda a elucidar fatores de influência na severidade, exposição e conhecimento geral sobre a histoplasmose na área geográfica proposta.

Este estudo permite, inclusive, que os inquéritos epidemiológicos sejam ajustados de acordo com a vivência hospitalar e o contato com os próprios pacientes, que podem agregar ao estudo através de sugestões e críticas. No DF e redondezas, estudos similares poderiam ser adotados para aprofundar o conhecimento sobre a epidemiologia da doença. Com a iniciativa do MS, o esforço poderia ser distribuído através de uma rede de vigilância sentinela, contemplando colaborações com instituições públicas como os hospitais regionais e universidades federais e instituições privadas, como clínicas e faculdades particulares.

Para este modelo de vigilância epidemiológica, os hospitais regionais de referência para histoplasmose incluídos neste estudo — HUB, HRAN e HBDF, além do LACEN-DF — seriam responsáveis pela identificação de casos prováveis e confirmados a partir de amostras provenientes de pacientes atendidos, prioritariamente, pelo SUS.

As universidades e instituições privadas, por sua vez, desempenhariam um papel estratégico ao fornecer suporte técnico e científico a esses hospitais, por meio de especialistas e tecnologias avançadas, como qPCR e sequenciamento genômico, que ainda não estão amplamente validados ou disponíveis para diagnóstico clínico em larga escala.

Essa integração entre hospitais, universidades e instituições privadas não apenas fortaleceria a capacidade diagnóstica, especialmente para casos duvidosos ou de difícil interpretação, como também promoveria a padronização de protocolos e

a ampliação do conhecimento sobre a doença. Além disso, a parceria possibilitaria um fluxo mais eficiente de informações e amostras, otimizando o diagnóstico diferencial em meio a doenças com apresentações clínicas similares.

A colaboração entre essas entidades também facilitaria a implementação de novas metodologias e equipamentos, contribuindo para a modernização e a agilidade da rede de vigilância, ampliando assim a capacidade de resposta à histoplasmose e outras micoses negligenciadas.

Ainda nessa questão, o Ministério da Saúde já promoveu treinamentos a profissionais de diversos LACENs para o diagnóstico laboratorial de micoses endêmicas (disponível em <https://bit.ly/3V80SF1>). Este fato incorre na possibilidade de expandir esses treinamentos à outras instituições de saúde públicas e privadas e garantir a capacitação periódica de outros profissionais, expandindo a rede de pesquisa.

Especificamente, as universidades poderiam liderar projetos de pesquisa que investiguem *hotspots* de incidência de *Histoplasma*, mapeando áreas geográficas de maior exposição e correlacionando-as com dados clínicos e genômicos dos casos detectados. Este tipo de estudo poderia identificar locais com alta probabilidade de ocorrência do fungo, além de explorar os fatores ambientais, como temperatura, umidade e tipo de solo, que favorecem seu crescimento e dispersão.

Ao cruzar dados ambientais com genômicos e clínicos, esses projetos podem revelar padrões de dispersão do fungo e identificar fatores de risco específicos para diferentes regiões. A inclusão de mais dados genômicos de isolados clínicos também permitiria avaliar a diversidade genética das cepas circulantes no DF, o que pode ser fundamental para entender variações na virulência e na resposta ao tratamento.

O benefício seria observado a longo prazo, reconhecendo aos poucos as regiões potencialmente endêmicas no DF, implementando políticas públicas de saúde de vigilância sentinela e reforçando a inclusão de micoses sistêmicas no protocolo de diagnóstico para PACs.

Fora do ambiente hospitalar e acadêmico, a imprensa e as mídias sociais desempenham um papel crucial na disseminação do conhecimento, especialmente para o público geral. Por meio de entrevistas com coordenadores de projetos de pesquisa, médicos e até relatos de pacientes, é possível ampliar a compreensão sobre a histoplasmoze. Essa abordagem, além de sensibilizar a sociedade, pode fortalecer a criação de políticas públicas de saúde, contando com o apoio popular, e alcançar profissionais de saúde, preparando-os para lidar com possíveis casos da doença.

Recentemente, uma reunião em Brasília no dia 04 de outubro de 2024, o MS em conjunto com gestores, técnicos e servidores dos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul, determinaram o plano piloto para a vigilância de micoses endêmicas no Brasil. Através de uma ferramenta denominada “Micosis”, já em uso nos estados mencionados, será possível notificar, solicitar e dispensar antifúngicos fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O uso dessa ferramenta permitirá, dentre outras vantagens, o monitoramento do perfil epidemiológico das micoses sistêmicas, incluindo a histoplasmoze. O esforço busca ainda elaborar guias e protocolos de vigilância e manejo clínico, além de programas de treinamento para que a vigilância das micoses seja implementada em todas as unidades federativas até 2027 (Ministério da Saúde, 2024, disponível em: <https://bit.ly/3CP23Dg>).

Em 2013 foi implementada em Brasília a Rede de Criptococose Brasil no Distrito Federal (RCB-DF). A criptococose também é uma micose sistêmica, com alta morbidade e letalidade em pacientes imunocomprometidos no DF. Este projeto foi um esforço entre pesquisadores da Universidade de Brasília e Fundação Fiocruz Brasília que se iniciou através de seminários científicos e discussões locais com o objetivo de difundir conhecimentos de epidemiologia, biologia do fungo, diagnóstico e tratamento, além da importância da própria rede no cenário brasileiro atual e futuro.

A ampla divulgação gerou participação de profissionais da saúde, pesquisadores e estudantes de universidades locais, laboratórios de saúde pública e funcionários públicos do RIDE-DF. Esta proposta inicial gerou frutos em pouco tempo, como a agregação de pesquisadores capacitados, captação de recursos, aprovação de projetos de pesquisa, melhoria nos serviços de saúde através do compartilhamento

mais rápido e eficiente dos dados sobre a doença, melhorando a condição, diagnóstico e tratamento dos pacientes com criptococose no DF. Este é um claro exemplo a ser seguido para estabelecer, de maneira similar, uma rede para a histoplasmose no DF (Júnior *et al.*, 2017).

Por outro lado, a paracoccidioidomicose (PCM), micose endêmica e de alta incidência no Brasil, possui vigilância epidemiológica nos estados de MT (2015), GO (2012), MG (2012) e Rondônia (1999) e Paraná (2000) (Millington *et al.*, 2018). De tempos em tempos, o Ministério da Saúde retoma as pautas relacionadas às micoses endêmicas. Em 2017, foi estabelecida uma nova versão do Consenso em PCM que traz, dentre as recomendações, a implementação da notificação compulsória nacional da doença e de uma rede de informações/banco de dados que contenham informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais (Millington *et al.*, 2018).

Inspirada em todos os exemplos mencionados anteriormente, a implementação de uma vigilância epidemiológica para a histoplasmose no DF e seu entorno é de extrema importância para a saúde da população local. Este esforço poderia ser potencializado pela associação de abordagens de epidemiologia molecular. Através do monitoramento de diferentes cepas circulantes do patógeno, é possível identificar variações genéticas associadas à maior virulência ou à resistência a tratamentos, facilitando o ajuste de estratégias terapêuticas e preventivas. A abordagem também pode melhorar o rastreamento da cadeia de transmissão em surtos, possibilitando a identificação de fontes de infecção e rotas de disseminação, o que é crucial para implementar medidas de controle mais eficientes.

Estudos como o de Benedict *et al.* (2020) nos Estados Unidos demonstram que a coleta de dados clínicos e epidemiológicos por meio de entrevistas com pacientes pode elucidar fatores de exposição e conhecimento da doença, fundamentais para traçar um perfil epidemiológico robusto e possivelmente delimitar áreas de exposição.

No contexto do DF, tal abordagem poderia ser associada a técnicas de epidemiologia molecular, que identificariam as cepas circulantes do fungo *Histoplasma* e suas variações genéticas, permitindo um monitoramento preciso das fontes de infecção e padrões de transmissão. Projetos locais, como a Rede de

Criptococose Brasil (RCB-DF), já mostraram que a colaboração entre universidades e serviços de saúde pode resultar em melhorias significativas no diagnóstico e tratamento de micoses sistêmicas. Assim, uma rede para a histoplasmose no DF, aliada ao uso da ferramenta "Micosis" e a colaboração com instituições acadêmicas, poderia fortalecer a vigilância epidemiológica de rotina e identificar fatores moleculares e ambientais que influenciam a dinâmica da doença na região.

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde tem dado maior destaque às micoses endêmicas, refletido em investimentos significativos para a aquisição e disponibilização de novos antifúngicos no sistema público de saúde (disponível em <https://bit.ly/4fLLIO5>). Essas medidas reforçam a necessidade de implementar uma rede de vigilância epidemiológica para a histoplasmose, com o objetivo de otimizar os recursos decorrentes dessas iniciativas.

A implantação do sistema Micosis no DF desempenhará um papel fundamental nesse contexto. Por meio da vigilância sentinela, será possível agilizar a identificação de casos de histoplasmose utilizando um fluxograma de triagem específico (Figura 19). Isso permitirá o início imediato do tratamento, evitando gastos desnecessários com antibióticos e assegurando o acompanhamento médico adequado de cada paciente. Assim, será possível alcançar o objetivo principal: melhorar a qualidade de vida dos pacientes, prevenindo a progressão da doença para quadros mais graves, principalmente em PVHA, e promovendo o uso eficiente dos recursos disponíveis.

Notavelmente, um dos dados mais impactantes do nosso estudo é o fato de que dentre os 23 casos de HIV positivos identificados neste estudo, 10 evoluíram para óbito, revelando uma taxa de letalidade de aproximadamente 43%. Esta porcentagem é alarmante numa região como o DF e entorno considerando os mais de 7.000 infectados por HIV de acordo com o último boletim epidemiológico disponível (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2023).

Além disso, os casos de coinfeção com outros patógenos são diversos, sendo que 10 deles ocorreram em indivíduos soropositivos para HIV. Destes, quatro apresentaram contagem de células TCD4 abaixo de 200cél/mm³ e seis óbitos ocorreram em pacientes coinfectados com *Mycobacterium avium* (dois pacientes),

leishmaniose (dois pacientes), tuberculose (um paciente), e tuberculose + citomegalovírus + *Candida albicans* (um paciente). Isso demonstra a frequência das infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos e a letalidade das mesmas, incluindo a histoplasmose (Figura 20).

Nesse contexto, é imprescindível que todos os pacientes soropositivos para HIV com contagem de linfócitos TCD4 abaixo de 200 cél/mm³ sejam testados para infecções oportunistas, inclusive as fúngicas. Portanto, estudos de epidemiologia como o aqui descrito, munidos de ferramentas de diagnóstico rápido como o *point-of-care*, sejam desenvolvidos para melhorar a compreensão acerca dos fatores ambientais envolvidos no desenvolvimento do fungo, bem como estabelecer as áreas de possível infecção, de modo a facilitar e acelerar o diagnóstico correto. Apesar da alta letalidade em PVHA e alta endemicidade no estado de Goiás, a histoplasmose ainda apresenta incidência abaixo do esperado no DF (Silva *et al.*, 2017).

Dentre os vários fatores que podem estar relacionados com essa baixa incidência no DF, podemos destacar: i) baixa conscientização dos profissionais de saúde e da população sobre a doença; ii) diagnóstico equivocado, dado o quadro clínico inespecífico com sintomas comuns a outras PACs e outras doenças definidoras de AIDS; iii) ausência de vigilância epidemiológica para a histoplasmose e outras micoses endêmicas; iv) ausência de um protocolo para testagem de infecções fúngicas em PVHA com CD4 abaixo de 200 células/mm³.

Vale a pena ressaltar que em PVHA com grave quadro de imunodepressão, quando se tem suspeita de infecção fúngica, o tratamento com compostos azólicos ou polienos é implementado de forma empírica devido à gravidade da doença e elevado risco de morte. Isso porque o diagnóstico micológico pode levar até 6 semanas (Linder e Kauffman, 2019). Para tanto, além do isolamento do fungo por cultivo microbiológico e exame direto, seria ideal a implementação de testes rápidos de diagnóstico sorológico e de urina na rede pública de saúde, assim como os aplicados nos EUA, IMMY e MiraVista.

Quanto às limitações deste estudo, os prontuários físicos mais antigos são de difícil acesso e vários não puderam ser localizados pelo registro providenciado nos

livros de micologia diferir do anotado no sistema. Ainda, grande parte das informações dos pacientes, como a anamnese e resultados de exames eram escritos a mão, com caligrafia de difícil compreensão ou a tinta encontrava-se apagada pelas condições de armazenamento dos prontuários, dificultando a identificação e extração das informações de interesse.

Com relação aos prontuários eletrônicos, vários pacientes não possuíam histórico completo, omitindo dados sociodemográficos, epidemiológicos e dos exames laboratoriais. Em relação ao mapa epidemiológico, seria ideal o georreferenciamento do local mais provável de infecção, entretanto, nos prontuários só consta o local de residência do paciente, induzindo um viés à pesquisa. Além disso, o mapa temático (Figura 17) não representa a distribuição geográfica real dos casos, sendo mais apropriado o desenvolvimento de um mapa de pontos utilizando, por exemplo, o centróide destes casos. Apesar disso, a epidemiologia da histoplasmose nunca foi realizada no DF e entorno, logo, este estudo é o primeiro passo para demonstrar, de maneira simples, os casos da doença nesta área.

Referente ao método de diagnóstico dos casos encontrados no estudo retrospectivo, mais especificamente a sorologia e o exame direto, ambos possuem baixa sensibilidade e a ausência da visualização histopatológica, que na época não havia sido implementada no HUB, impediu que mais casos pudessem ser confirmados.

Quanto às análises genômicas dos isolados de *Histoplasma* do DF, o sequenciamento não apresentou qualidade satisfatória na metade dos casos, gerando uma baixa cobertura genômica e, portanto, impedindo uma análise mais robusta dos dados. Entretanto, foi possível inferir as linhagens monofiléticas para os três isolados clínicos e definir as espécies de *Histoplasma* circulantes no DF.

A partir dessas análises, foi possível observar que dois dos isolados, HCHUB01 e HCHUB02, pertencem à espécie *H. suramericanum*, agrupados no clado Nordeste, que, como o nome sugere, é endêmico na região Nordeste do Brasil. Neste caso, duas hipóteses são plausíveis: i) Esta linhagem genética pode ser endêmica do Centro-Oeste do Brasil ou ii) Esse caso é importado do Nordeste e a doença manifestou-se

aqui no DF. Esta última hipótese é apoiada pelo fato de que sete pacientes do nosso estudo nasceram ou vieram de estados do Nordeste em busca de melhores cuidados médicos. Quanto ao caso identificado como LamB (HCHUB03): casos de histoplasrose causados por este genótipo são amplamente distribuídos na América Latina e já foram identificados em MT e GO (Teixeira *et al.*, 2016). Infelizmente, não localizamos os registros médicos destas amostras, impossibilitando a confirmação de alguma das hipóteses.

O estudo de genotipagem de *Histoplasma* no contexto de saúde pública no DF é crucial para uma compreensão abrangente da epidemiologia e impacto da histoplasrose na região. Ao analisar os diferentes genótipos do fungo, podemos identificar padrões de distribuição geográfica e variações genéticas que podem influenciar a incidência e a virulência da doença. Isso não apenas permite uma melhor avaliação do risco de infecção, e aliado aos estudos de epidemiologia, auxilia na implementação de estratégias de prevenção e controle mais eficazes.

Além disso, a epidemiologia molecular pode fornecer informações valiosas sobre a fonte de infecção, os padrões sazonais e fatores ambientais que contribuem para a propagação do fungo *Histoplasma*. Esses dados são fundamentais para orientar políticas de saúde pública, melhorar o diagnóstico precoce e garantir intervenções adequadas para proteger a população do DF contra os riscos associados à histoplasrose. Apesar da importância deste estudo, algumas limitações devem ser consideradas.

O número reduzido de pacientes e isolados analisados dificulta a realização de inferências robustas sobre a relação entre os genótipos de *Histoplasma* e os quadros clínicos ou epidemiológicos observados. Com um n amostral limitado, é desafiador estabelecer padrões consistentes de distribuição genotípica e correlacioná-los com a gravidade da doença ou fatores ambientais. No entanto, a vigilância genômica contínua pode preencher essas lacunas, ajudando a elucidar como as variações genéticas do patógeno podem influenciar as manifestações clínicas e o desfecho da histoplasrose. Isso reforça a necessidade de ampliar os estudos de genotipagem para uma compreensão mais aprofundada da epidemiologia da doença na região.

7.2 Histoplasmose nos Estados Unidos (Apêndice 4)

A histoplasmose é endêmica no centro-leste dos EUA e lidera os casos de infecções fúngicas sistêmicas no país (Mazi *et al.*, 2023). Ainda, os casos autóctones relatados fora da zona endêmica tornam incompleta a compreensão da epidemiologia e distribuição ambiental do fungo *Histoplasma* (Deepe, 2018; Maiga *et al.*, 2018). Contudo, amostras de solo indicam uma abrangência geográfica além da estabelecida por testes intradérmicos de reação à histoplasmina há várias décadas (McKinsey and Pappas, 2020).

Similar ao Brasil, a histoplasmose pode ser considerada uma doença negligenciada nos EUA. Autores apontam que essa negligência ocorre pelo próprio desconhecimento da doença por parte de profissionais de saúde e da população. O mapa epidemiológico da doença ainda era baseado em estudos da década de 1950. (Benedict *et al.*, 2021). Gradativamente, a doença vem ganhando mais destaque, evidenciado pelo aumento no número de estados em que a doença é notificada compulsoriamente, atualmente, em 15 estados (CDC).

As mudanças climáticas são um importante fator a ser considerado no âmbito de micoses endêmicas, considerando a capacidade de adaptação do fungo a ambientes mais quentes. Este fato também é considerado no caso da histoplasmose (Benedict *et al.*, 2021). As mudanças climáticas afetam não só o próprio fungo, mas também os seus hospedeiros, que são forçados a se deslocar para novas regiões e podem carregar os esporos, como no caso dos morcegos (Taylor *et al.*, 2022). Estas alterações ambientais podem levar a um aumento da virulência do fungo devido à adaptação a condições adversas, como temperatura elevada e exposição a luz (Rhijn e Bromley, 2021).

Nossos isolados ambientais sugerem que há ambientes propícios para ambas espécies, *H. ohiense* e *H. mississippiense*, em regiões dos EUA consideradas não endêmicas, incluindo variações de temperatura entre -18°C a 37°C (Moreira *et al.*, 2022). Nossos dados indicam a incidência das espécies *H. ohiense* e o *H. mississippiense* no leste e oeste, respectivamente, ambos governados por condições ecológicas bastante distintas.

Explorando características climáticas históricas dos EUA, identificamos que a precipitação do trimestre mais seco e a temperatura média do trimestre mais frio são as variáveis mais importantes para *H. ohiense* e *H. mississippiense*, respectivamente. Estes resultados corroboram os achados em Sepulveda *et al.* (2024) demonstrando melhor crescimento do *H. ohiense* frente ao *H. mississippiense* a 37°C.

Adicionalmente, a identificação de uma distribuição equitativa de idiomorfos MAT1-1/MAT1-2 está em conformidade com as expectativas para espécies que se reproduzem sexualmente, fortalecendo conclusões anteriores em relação ao fungo *Histoplasma* nos EUA (Kwon-Chung *et al.*, 1984).

A espécie *H. mississippiense* é representada por 2 genótipos distintos, Clado I e Clado II, ambos segregados pelas análises filogenômicas e PCA. Estes genótipos são representados, majoritariamente, por isolados veterinários de Oklahoma (Clado I) e isolados clínicos do Missouri (Clado II). Desta maneira, indaga-se a possibilidade de obtenção de traços termotolerantes únicos nos representantes do clado I, considerando a temperatura corporal elevada de cães e gatos (38-39°C). Ainda, considerando que a transição para a fase leveduriforme é um traço essencial para virulência, novos estudos de termotolerância intra e interespecíficos são fundamentais para esclarecer a aquisição de traços de adaptação por este clado (Valdez *et al.*, 2022).

Referente ao modelamento de distribuição de espécies de *Histoplasma* sp., é importante ressaltar a probabilidade da região de sobreposição entre *H. ohiense* e *H. mississippiense* no centro-oeste, inclusive pelo fato de intercâmbio gênico recente (Maxwell *et al.*, 2018). Isso infere numa possível zona de tensão e hibridização, atuando como uma fonte de variação genômica entre as 2 espécies. Entretanto, poucas zonas de hibridização foram identificadas e apenas coletas ambientais sistemáticas podem determinar se a hibridização de *Histoplasma* sp. demonstra uma estrutura geográfica (Gabaldon, 2020; Samarasinghe *et al.*, 2020).

Além das duas espécies predominantes, também encontramos 2 isolados de *H. suramericanum* nos EUA. Este fato pode ser explicado de duas maneiras: (i) *H. suramericanum* é endêmico nos EUA, embasado pelo isolamento ambiental no Texas;

(ii) casos importados de áreas endêmicas desta espécie. Um dos isolados, B10265, vem de um paciente da Califórnia sem histórico de viagens, impossibilitando a acurácia do evento de infecção, ou seja, onde realmente este indivíduo contraiu a doença. Em contrapartida, esta espécie foi identificada autóctone em Alberta e Montreal, Canadá (Dingle *et al.*, 2021), sugerindo um alcance maior do que o previsto. Embora as áreas de sobreposição entre diferentes espécies de *Histoplasma* pareça extensa e haja oportunidades constantes de hibridização, a introgressão é limitada.

Outro fator limitante da dispersão geográfica de *Histoplasma* sp. é através dos hospedeiros (Teixeira *et al.*, 2016). Este fungo já foi identificado em mais de 6 espécies de quirópteros em diferentes continentes, demonstrando a recorrente associação da dispersão do fungo com aves, carregando os esporos nas penas e por morcegos, através da infecção direta (Hoff e Bigler, 1981; Teixeira *et al.*, 2016) (Gonzales-Gonzales *et al.*, 2012; Gugnani e Denning, 2023; Gugnani *et al.*, 1994; McMurray e Russel, 1982; Mulec *et al.*, 2020; Taylor *et al.*, 2000; Vite-Garin *et al.*, 2021). Considerando que os morcegos são um grupo amplamente distribuído e diverso e hospedeiros naturais do fungo *Histoplasma*, levanta-se a questão sobre a coevolução entre hospedeiro e fungo (Teeling *et al.*, 2018).

Neste contexto, nossa pesquisa estabeleceu a distribuição geográfica das espécies de *Histoplasma* com base em características ambientais abióticas. A partir desses resultados, torna-se possível revisitar e aprimorar estudos que investigam a co-ocorrência de diferentes espécies de *Histoplasma* com seus hospedeiros potenciais, incluindo possíveis competidores, como outras espécies de fungos dimórficos. Essa abordagem permite a avaliação da influência de fatores bióticos na ampla distribuição geográfica do fungo *Histoplasma*.

Dito isto, modelar o nicho ecológico dos morcegos pode ajudar a entender como suas populações influenciam a distribuição geográfica do patógeno. Esse tipo de análise é relevante porque muitos morcegos habitam cavernas e outros locais escuros e úmidos, locais que também são favoráveis ao crescimento de *Histoplasma*. Além disso, fezes de morcego (guano) são ricas em nutrientes que podem facilitar o crescimento do fungo.

Ao sobrepor os mapas de probabilidade de ocorrência dos morcegos com aqueles das espécies *H. ohioense* e *H. mississippiense*, seria possível identificar *hotspots* de risco para a transmissão do fungo. Áreas de alta probabilidade de ocorrência tanto do fungo quanto dos morcegos podem indicar locais prioritários para monitoramento epidemiológico e estudos de saúde pública, elaborando-se projetos de educação ambiental e de conscientização para comunidades que vivem próximas a áreas de ocorrência, contribuindo para a prevenção de surtos e para um monitoramento contínuo em regiões endêmicas.

. Além disso, esses *hotspots* podem variar em função de fatores climáticos e sazonais, fornecendo dados valiosos sobre como mudanças ambientais podem afetar a ecologia do patógeno e dos morcegos. Essa abordagem integrada pode ainda abrir possibilidades para explorar interações ecológicas mais complexas entre *Histoplasma*, os morcegos e outras espécies que coabitam esses ambientes, assim como o impacto da atividade humana (ex.: agricultura, urbanização) sobre essas relações.

Algumas limitações deste estudo envolvem: (i) a ausência de coleta sistemática de isolados em cada estado, implicando numa representação incompleta da incidência geográfica do fungo; (ii) a maioria das amostras clínicas não descrevia os eventos de infecção ou histórico de viagens, resultando em lacunas nos dados; (iii) a baixa representatividade, baseada apenas em 93 isolados genotipados de *Histoplasma* frente a incidência anual de histoplasmose nos EUA, que inclusive, estende-se ao ENM. Apesar das limitações de amostragem, nossa pesquisa confirmou a presença, dentro e fora da área endêmica, dos dois principais genótipos, NAm1 e NAm2, como os principais agentes causadores da histoplasmose nos EUA.

Além disso, *H. mississippiense* apresentou uma diversidade nucleotídica genômica mais alta ($\pi = 0,57\%$) do que *H. ohioense* ($\pi = 0,14\%$), corroborados também pelo PCA. Embora a análise de PCA para *H. mississippiense* tenha revelado uma variação mínima, ela apoiou a análise de fastSTRUCTURE, indicando duas populações distintas dentro dessa espécie: *H. mississippiense* clados I e II. Por outro lado, *H. ohioense* não exibiu uma estrutura populacional semelhante no gráfico de PCA,

sugerindo a necessidade de mais isolados para investigar a possibilidade de novos genótipos dentro desse clado.

A escolha de utilizar 1000 pontos aleatórios para randomizar as amostras no modelo de MaxEnt foi baseada em boas práticas amplamente adotadas no modelamento de distribuição de espécies. Este método permite uma amostragem representativa do *background*, sem sobrecarregar o modelo com todas as células disponíveis, o que poderia introduzir redundâncias ou vieses de amostragem em áreas muito grandes ou com características ambientais que não são relevantes para o fenômeno estudado.

Além disso, a randomização de pontos oferece flexibilidade ao capturar a variabilidade ambiental em regiões onde não há presença confirmada de *Histoplasma*, sem assumir que o território contíguo ou toda a área de *background* seja necessariamente homogêneo. A escolha de 1000 pontos balanceia a precisão computacional e a robustez estatística, evitando o risco de ajuste excessivo que pode ocorrer ao usar todas as células disponíveis como *background*. Portanto, a utilização dos pontos aleatórios contribui para a generalização do modelo e permite que ele seja mais eficiente ao prever potenciais áreas de ocorrência, especialmente quando se trabalha com grandes regiões geográficas como os EUA.

Por fim, este estudo demonstra com sucesso a integração de uma abordagem multifacetada, combinando o sequenciamento completo do genoma, a filogenética e modelos de distribuição de espécies para compreender a distribuição de espécies de *Histoplasma* prevalentes nos EUA e possibilitando a atualização dos mapas epidemiológicos de forma mais robusta, indicando áreas emergentes de histoplasrose mais precisas que as já descritas (Hepler *et al.*, 2022; Maiga *et al.*, 2018; McKinsey e Pappas, 2020). Da mesma forma, uma pesquisa recente sobre a modelamento da distribuição de *Coccidioides* spp. obteve êxito ao estabelecer um padrão de distribuição com variáveis específicas que se associavam a áreas de elevada incidência de coccidioidomicose nos Estados Unidos (Ocampo-Chavira *et al.*, 2020). Ao utilizar a epidemiologia molecular e genotipagem completa do genoma, uma

compreensão mais completa do cenário epidemiológico atual e da diversidade de espécies causadoras de histoplasmose nos EUA está ao alcance.

8. Conclusões

Neste trabalho, realizamos importantes contribuições e descobertas no campo da epidemiologia molecular da histoplasmose, tanto no DF e seu entorno quanto nos EUA. No contexto brasileiro, entre casos confirmados e prováveis, identificamos 34 casos de histoplasmose a partir de prontuários médicos em dois centros de referência, e geramos um mapa coroplético que permitiu visualizar a distribuição geográfica desses casos.

A análise revelou uma alta taxa de letalidade em pacientes HIV positivos (10 óbitos em 23 casos), reforçando a importância do diagnóstico precoce e do tratamento adequado para populações imunossuprimidas. Também identificamos espécies circulantes de *Histoplasma* no DF, incluindo *H. suramericanum* clado Nordeste e LAmB, o que foi essencial para entender a diversidade genética e a distribuição local dessas espécies.

Além disso, mapeamos as subregiões de residência dos pacientes, indicando áreas potencialmente favoráveis para a ocorrência de novas infecções por *Histoplasma*. Simultaneamente, realizamos uma revisão narrativa sobre surtos de histoplasmose no Brasil, destacando que as cavernas representam o principal local de infecção, com mais de 50% dos surtos ocorrendo nesses ambientes, que favorecem o crescimento do fungo e a dispersão de esporos.

Nos EUA, nossa análise focou na epidemiologia molecular das espécies de *Histoplasma* circulantes no país, a partir de isolados clínicos, veterinários e ambientais. Sequenciamos o DNA de 62 novos isolados e construímos uma árvore filogenética. A partir desta, foram identificadas três espécies de *Histoplasma*: *H. ohioense*, *H. mississippiense* (endêmicas dos EUA) e *H. suramericanum*, cuja presença sugere isolados importados ou autóctones em regiões próximas ao México.

O ENM revelou áreas de sobreposição com mais de 75% de probabilidade de ocorrência das espécies de *Histoplasma* endêmicas na região, inclusive em estados fora da zona endêmica proposta, apontando a necessidade de atualizar o mapa epidemiológico da histoplasmose no país. Essa sobreposição indica zonas de contato entre espécies, com possível hibridização, o que pode levar à troca de material genético e, potencialmente, aumentar a resistência e a virulência do fungo. Esses achados, tanto no Brasil quanto nos EUA, destacam a importância de vigilância epidemiológica e diagnóstico preciso, especialmente no Brasil, onde a ausência de testes *point-of-care* e de notificação de casos devido à falta de um programa de vigilância impactam negativamente o controle da doença. Nosso trabalho fornece uma base valiosa para o aprimoramento do diagnóstico, manejo clínico e monitoramento da histoplasmose em diferentes regiões.

9. Referências

- Abdallah, W., et al., 2021. Diagnosis of Histoplasmosis Using the MVista *Histoplasma* Galactomannan Antigen Qualitative Lateral Flow-Based Immunoassay: A Multicenter Study. *Open Forum Infect Dis.* Aug 31;8(9):ofab454.
- Adenis, A. A., et al., 2018. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases.* 18, 1150-1159.
- Ajello, L., Zeidberg, L. D., 1951. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria Boydii* from soil. *Science.* 113, 662-3.
- Almeida, F., Lacaz, C. S., 1939. Cogumelo do gênero *Histoplasma* isolado de lesões de cromomicose. Associação de fungos nas lesões. *Folia Clin et Biol.* 11, 5.
- Almeida, M. A., et al., 2019. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases.* 86, 147-156.
- Almeida-Silva, F., et al. (2021). Genomic Diversity Analysis Reveals a Strong Population Structure in *Histoplasma capsulatum* LAmA (*Histoplasma suramericanum*). *Journal of Fungi*, 7(10).

- Alves, A. J. S., et al., 2021. Investigation of acute histoplasmosis outbreak among firefighters, Distrito Federal, 2017. *J. Health Biol Sci.* 9, 7.
- Alves, A. J. S., et al., Investigação de surto de histoplasmoze no Distrito Federal-Brasil, 2017. 54o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Olinda-PE, Brasil, 2018.
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol.* 55, 539-52.
- Antinori, S., et al., Histoplasmosis Diagnosed in Europe and Israel: A Case Report and Systematic Review of the Literature from 2005 to 2020. *Journal of Fungi*, Vol. 7, 2021.
- Araujo, F. G., 1970. Primeiro isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo em Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 12, 7.
- Armstrong, P., et al. (2018). Multistate Epidemiology of Histoplasmosis, United States, 2011–2014. *Emerging Infectious Disease Journal*, 24(3), 425.
- Ashbee, H. R., et al., 2008. Histoplasmosis in Europe: Report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Medical Mycology.* 46, 57-65.
- Ashraf, N., et al., 2020. Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. *Mycopathologia.* 185, 843-865.
- Azar, M. M., Hage, C. A., 2017. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 55, 1612-1620.
- Azar, M. M., et al., 2020. Endemic Fungi Presenting as Community-Acquired Pneumonia: A Review. *Semin Respir Crit Care Med.* 41, 522-537.
- Baddeley, A., Turner, R., 2005. spatstat: An R Package for Analyzing Spatial Point Patterns. *Journal of Statistical Software.* 12, 1 - 42.
- Baker, J., et al., 2020. Chronic Pulmonary Histoplasmosis-A Scoping Literature Review. *Open Forum Infect Dis.* 7, ofaa119.

- Balajee, S., et al., 2013. Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade. *Med Mycol.* 51, 345-51.
- Barros, N., et al., Pulmonary Histoplasmosis: A Clinical Update. *Journal of Fungi*, Vol. 9, 2023.
- Benedict K, et al., 2021. Revising Conventional Wisdom About Histoplasmosis in the United States. *Open Forum Infect Dis.* Jun 10;8(7):ofab306.
- Benedict, K., Mody, R. K., 2016. Epidemiology of Histoplasmosis Outbreaks, United States, 1938-2013. *Emerg Infect Dis.* 22, 370-8.
- Benedict, K., Park, B. J., 2014. Invasive fungal infections after natural disasters. *Emerg Infect Dis.* 20, 349-55.
- Benedict, K., Toda, M., & Jackson, B. R. (2021). Revising Conventional Wisdom About Histoplasmosis in the United States. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(7), ofab306. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab306>
- Benedict, K., et al., 2015. Mycotic Infections Acquired outside Areas of Known Endemicity, United States. *Emerg Infect Dis.* 21, 1935-41.
- Benedict, K., et al., 2020 Enhanced Surveillance for Histoplasmosis-9 States, 2018-2019. *Open Forum Infect Dis.* Aug 17;7(9):ofaa343.
- Boigues, B. C. S., et al. (2018). Clinical outcomes and risk factors for death from disseminated histoplasmosis in patients with AIDS who visited a high-complexity hospital in Campo Grande, MS, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51.
- Bolger, A. M., et al., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30, 2114-20.
- Borman, A. M., Johnson, E. M., 2023. Changes in fungal taxonomy: mycological rationale and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 36, e0009922.

- Boyce, K. J., Andrianopoulos, A., 2015. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiology Reviews*. 39, 15.
- Brechtling, P. J., Rappleye, C. A., 2019. *Histoplasma* Responses to Nutritional Immunity Imposed by Macrophage Activation. *J Fungi (Basel)*. 5.
- Bullen, J. J., 1949. The yeast-like form of *Cryptococcus farciminosus* (Rivolta): (*Histoplasma farciminosum*). *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 61, 117-120.
- Caceres, D. H., & Valdes, A. (2019). Histoplasmosis and Tuberculosis Co-Occurrence in People with Advanced HIV. *Journal of Fungi*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/jof5030073>
- Cachera, L., et al., 2021. Invasive Fungal Infections in Persons Living with HIV in an Amazonian Context: French Guiana, 2009-2019. *J Fungi (Basel)*. 7.
- Cano-Torres, J. O., et al., 2019. Progressive disseminated histoplasmosis in Latin America and the Caribbean in people receiving highly active antiretroviral therapy for HIV infection: A systematic review. *Med Mycol*. 57, 791-799.
- Carlucci, J. G., et al., 2016. Vertical Transmission of Histoplasmosis Associated With Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 5, e9-e12.
- Casadevall, A., 2017. Don't Forget the Fungi When Considering Global Catastrophic Biorisks. *Health Secur*. 15, 341-342.
- Castellanos Reynosa, M. E., et al. (2024). Clinical characteristics, diagnosis, treatment and outcomes of patients living with HIV and co-infected with tuberculosis and histoplasmosis: A 5-y retrospective case series. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 118(6), 391–398.
- Centers for Disease, C., Prevention, 2013. Histoplasmosis in a state where it is not known to be endemic--Montana, 2012-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 62, 834-7.

- Chang, M. R., et al. (2007). Study of 30 cases of histoplasmosis observed in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49.
- Choi, J., Kim, S. H., 2017. A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114, 9391-9396.
- Colombo, A. L., et al., 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 49, 785-98.
- Corbu, V. M., et al., 2023. Current Insights in Fungal Importance-A Comprehensive Review. *Microorganisms*. 11.
- Costa, F. d. F., et al., 2022. New Insights on Environmental Occurrence of Pathogenic Fungi Based on Metagenomic Data from Brazilian Cerrado Biome. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 65.
- Cottle, L. E., et al., 2013. A Multinational Outbreak of Histoplasmosis Following a Biology Field Trip in the Ugandan Rainforest. *Journal of Travel Medicine*. 20, 83-87.
- Da Rocha-Lima, H., 1912. Histoplasmosis ana epizootic lymphangitis. *Arch. Schiffs. Tropenhyg*. 16, 7.
- da Paz, G. S., et al., 2018. Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides brasiliensis* in bats collected in urban areas. *Transboundary and Emerging Diseases*. 65, 1797-1805.
- Damasceno, L. S., et al., 2016. The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 35, 19-27.
- Damasceno, L. S., et al., 2019. Novel clinical and dual infection by *Histoplasma capsulatum* genotypes in HIV patients from Northeastern, Brazil. *Scientific Reports*. 9, 11789.
- Darling, S. T., 1906. A PROTOZOÖN GENERAL INFECTION PRODUCING PSEUDOTUBERCLES IN THE LUNGS AND FOCAL NECROSES IN THE LIVER,

SPLEEN AND LYMPHNODES. Journal of the American Medical Association. XLVI, 1283-1285.

Darling, S. T., 1908. HISTOPLASMOSIS: A FATAL INFECTIOUS DISEASE RESEMBLING KALA-AZAR FOUND AMONG NATIVES OF TROPICAL AMERICA. Archives of Internal Medicine. II, 107-123.

Darling, S. T., 1909. The Morphology of the Parasite (*Histoplasma Capsulatum*) and the Lesions of Histoplasmosis, a Fatal Disease of Tropical America. J Exp Med. 11, 515-31.

De Pauw, B., et al. (2008). Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases*, 46(12), 1813–1821.

de Monbreun, W. A., 1939. The Dog as a Natural Host for *Histoplasma Capsulatum*: Report of a Case of Histoplasmosis in This Animal. The American Journal of Tropical Medicine. s1-19, 565-587.

de Perio, M. A., et al., Occupational Histoplasmosis: Epidemiology and Prevention Measures. Journal of Fungi, Vol. 7, 2021.

Deepe, G. S., Jr., 2018. Outbreaks of histoplasmosis: The spores set sail. PLoS Pathog. 14, e1007213.

DeMonbreun, W. A., 1934. The Cultivation and Cultural Characteristics of Darling's *Histoplasma Capsulatum*. The American Journal of Tropical Medicine. s1-14, 93-125.

Denning, D. W., 2024. Global incidence and mortality of severe fungal disease. Lancet Infect Dis.

Dingle, T. C., et al., 2021. Histoplasmosis acquired in Alberta, Canada: an epidemiological and genomic study. Lancet Microbe. 2, e191-e197.

- Dodd, K., Tompkins, E. H., 1934. A Case of Histoplasmosis of Darling in an Infant. *Am. J. Trop. Med.* 14, 11.
- Domer, J. E., 1971. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol.* 107, 870-7.
- Eissenberg, L. G., et al., 1993. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J Exp Med.* 177, 1605-11.
- Emmons, C. W., 1949. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Rep.* 64, 892-6.
- Emmons, C. W., 1950. Histoplasmosis: Animal Reservoirs and Other Sources in Nature of Pathogenic Fungus, *Histoplasma*. *Am J Public Health Nations Health.* 40, 436-40.
- Emmons, C. W., 1961. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Soil in Washington, D.C. *Public Health Reports (1896-1970).* 76, 591-595.
- Eulálio, K. D., et al. (2024). Epidemiological, clinical, and genomic landscape of coccidioidomycosis in northeastern Brazil. *Nature Communications*, 15(1), 3190.
- Falci, D. R., et al., 2019. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and *Histoplasma* Urine Antigen Detection. *Open Forum Infect Dis.* 6, ofz073.
- Falci, D.R., et al., 2021. The era of histoplasmosis in Brazilian endemic mycoses. *Lancet Reg Health Am.* Aug 12;3:100037.
- Fava Netto, C., et al., 1967. Histoplasmosse epidêmica. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 9, 11.
- Fava, S. d. C., Netto, C. F., 1998. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 40, 155-64.

- Ferreira, M. S., Borges, A. S., 2009. Histoplasmosis. Rev Soc Bras Med Trop. 42, 192-8.
- Fick, S. E., Hijmans, R. J., 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. International Journal of Climatology. 37, 4302-4315.
- Filho, A., et al., 2009. Histoplasmosis in the northeast of Brazil. Report of three cases. Rev Port Pneumol. 15, 109-14.
- Gabalton, T., 2020. Hybridization and the origin of new yeast lineages. FEMS Yeast Res. 20.
- Gomez, L. F., et al., 2019. Molecular epidemiology of Colombian *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from human and chicken manure samples. Heliyon. 5, e02084.
- Gonzales Zamora, J. A., & Espinoza, L. A. (2017). *Histoplasma* and Cytomegalovirus Coinfection of the Gastrointestinal Tract in a Patient with AIDS: A Case Report and Review of the Literature. Diseases, 5(4).
- Gonzalez-Gonzalez, A. E., et al., 2012. An Hcp100 gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. Epidemiol Infect. 140, 1955-63.
- Gorelick, N., et al., 2017. Google Earth Engine: Planetary-scale geospatial analysis for everyone. Remote Sensing of Environment. 202, 18-27.
- Goswami, R. P., et al., 1999. Histoplasmosis in eastern India: the tip of the iceberg? Trans R Soc Trop Med Hyg. 93, 540-2.
- Govindarajan, A., et al., 2023. A Case of Disseminated Histoplasmosis From California, in the Setting of Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Diagnostic Challenge. J Investig Med High Impact Case Rep. 11, 23247096231156007.
- Guerra, B. T., et al., 2019. Histoplasmosis Outbreaks in Brazil: Lessons to Learn About Preventing Exposure. Mycopathologia.

- Gugnani, H. C., Denning, D. W., 2023. Infection of bats with *Histoplasma* species. *Med Mycol.* 61.
- Gugnani, H. C., et al., 1994. A natural focus of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* is a bat cave. *Mycopathologia.* 127, 151-7.
- Guillot, J., et al., Histoplasmosis in Animals. In: S. Seyedmousavi, Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals. Springer International Publishing, Cham, 2018, pp. 115-128.
- Guimaraes, A. J., et al., 2011. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. *Front Microbiol.* 2, 225.
- Gómez, B. L., 2011. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America. *Current Fungal Infection Reports.* 5, 199-205.
- Gómez, L.F., et al., 2022. Comparison between Two Molecular Techniques: Nested and Real-Time Polymerase Chain Reaction Targeting 100-kDa Hc Protein for Detection of *Histoplasma capsulatum* in Environmental Samples. *Am J Trop Med Hyg.* Mar 14;106(5):1329–32.
- Hepler, S. A., et al., 2022. Integrating Public Health Surveillance and Environmental Data to Model Presence of *Histoplasma* in the United States. *Epidemiology.* 33.
- Heung, L. J., 2020. Monocytes and the Host Response to Fungal Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 10, 34.
- Hoff, G. L., Bigler, W. J., 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J Wildl Dis.* 17, 191-6.
- Holbrook, E. D., et al., 2013. Redundant catalases detoxify phagocyte reactive oxygen and facilitate *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. *Infect Immun.* 81, 2334-46.
- Horwath, M. C., et al., 2015. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. *Future Microbiol.* 10, 967-75.

Houlihan, C. F., Whitworth, J. A., 2019. Outbreak science: recent progress in the detection and response to outbreaks of infectious diseases. *Clin Med (Lond)*. 19, 140-144.

Jackson, K. M., et al. (2021). *Blastomyces dermatitidis* Environmental Prevalence in Minnesota: Analysis and Modeling Using Soil Collected at Basal and Outbreak Sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5), e01922-20.

Janbon, G., et al., 2019. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. *Microbes Infect*. 21, 237-245.

Jombart, T., Ahmed, I., 2011. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*. 27, 3070-1.

Júnior, J.L., et al., 2017. Implantação da Rede de Criptococose Brasil no Distrito Federal - RCB-DF. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília, Brasília*, v. 6, n. 2, p. 151-153.

Kandemir, H., et al., 2022. Phylogenetic and ecological reevaluation of the order Onygenales. *Fungal Diversity*.

Karimi, K., et al. (2002). Differences in Histoplasmosis in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome in the United States and Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(11), 1655–1660.

Kasso, M., Balakrishnan, M., 2013. Ecological and Economic Importance of Bats (Order *Chiroptera*). *ISRN Biodiversity*. 2013, 187415.

Kasuga, T., et al., 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol*. 37, 653-63.

Kasuga, T., et al., 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*. 12, 3383-401.

- Kauffman, C. A., 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev.* 20, 115-32.
- Kim, J. H., et al., 2022. Advances in Antifungal Development: Discovery of New Drugs and Drug Repurposing. *Pharmaceuticals (Basel)*. 15.
- Kirkland, T. N., Fierer, J., 2020. Innate Immune Receptors and Defense Against Primary Pathogenic Fungi. *Vaccines (Basel)*. 8.
- Kohler, J. R., et al., 2014. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5, a019273.
- Kohler, J. R., et al., 2017. Fungi that Infect Humans. *Microbiol Spectr.* 5.
- Kurtz, S., et al., 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 5, R12.
- Kwon-Chung, K. J., et al., 1984. Distribution of the two mating types among *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from an urban histoplasmosis outbreak. *Sabouraudia.* 22, 155-7.
- Lai, C. H., et al., 2007. Indigenous case of disseminated histoplasmosis, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 13, 127-9.
- Lehan, P. H., Furcolow, M. L., 1957. Epidemic histoplasmosis. *J Chronic Dis.* 5, 489-503.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 25, 1754-60.
- Limaye, A. P., et al., 2000. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. *N Engl J Med.* 343, 1163-6.
- Linder, K. A., Kauffman, C. A., 2019. Histoplasmosis: Epidemiology, Diagnosis, and Clinical Manifestations. *Current Fungal Infection Reports.* 13, 120-128.
- Londero, A. T., Ramos, C. D., 1978. The status of histoplasmosis in Brazil. *Mycopathologia.* 64, 153-6.

- Lopez, L. F., et al., 2017. Standardization and validation of real time PCR assays for the diagnosis of histoplasmosis using three molecular targets in an animal model. *PLoS One*. 12, e0190311.
- Lortholary, O., et al., 2013. Fungal infections in immunocompromised travelers. *Clin Infect Dis*. 56, 861-9.
- Lucey, O., et al., 2018. Reactivation of latent *Histoplasma* and disseminated cytomegalovirus in a returning traveller with ulcerative colitis. *JMM Case Rep*. 5, e005170.
- Maiga, A. W., et al., 2018. Mapping *Histoplasma capsulatum* Exposure, United States. *Emerg Infect Dis*. 24, 1835-1839.
- Manos, N. E., et al., 1956. Geographic variation in the prevalence of histoplasmin sensitivity. *Dis Chest*. 29, 649-68.
- María, J. B., Clara, V., Laboratory Diagnosis of Histoplasmosis: An Update. In: B. Felix, (Ed.), *Histoplasma* and Histoplasmosis. IntechOpen, Rijeka, 2020, pp. Ch. 4.
- Maxwell, C. S., et al., 2018. Recent admixture between species of the fungal pathogen *Histoplasma*. *Evolution Letters*. 2, 210-220.
- Mazi P.B., et al., 2022. Management of Histoplasmosis by Infectious Disease Physicians. *Open Forum Infect Dis*. Jun 24;9(7):ofac313.
- Mazi, P. B., et al., 2023. The Geographic Distribution of Dimorphic Mycoses in the United States for the Modern Era. *Clin Infect Dis*. 76, 1295-1301.
- McDermott, A. J., Klein, B. S., 2018. Helper T-cell responses and pulmonary fungal infections. *Immunology*. 155, 155-163.
- McKenna, A., et al., 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 20, 1297-303.
- McKinsey, D. S., Pappas, P. G., 2020. Histoplasmosis: Time to Redraw the Map and Up Our Game. *Clin Infect Dis*. 70, 1011-1013.

- McLeod, D. S. A., et al., 2011. Histoplasmosis in Australia: report of 16 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 90, 61-68.
- McMurray, D. N., Russel, L. H., 1982. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. *Am J Trop Med Hyg.* 31, 527-31.
- Menges, R. W., et al., 1967. Epidemiologic studies on histoplasmosis in wildlife. *Environmental Research.* 1, 129-144.
- Merow, C., Smith, M. J., & Silander Jr, J. A. (2013). A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: What it does, and why inputs and settings matter. *Ecography*, 36(10), 1058–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2013.07872.x>
- Millington, M.A., et al., 2018. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. *Epidemiologia E Serviços De Saúde*, 27(spe), e0500002.
- Minh, B. Q., et al., 2013. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol.* 30, 1188-95.
- Minh, B. Q., et al., 2020. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol.* 37, 1530-1534.
- Ministério da Saúde, 2023. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2023/hiv-aids/boletim-epidemiologico-hiv-e-aids-2023.pdf/view>
- Ministério da Saúde, 2023. Guia de Vigilância em Saúde. v. 6. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_6ed_v3.pdf
- Moraes, D., 2022. Nomenclature of the pathogenic fungus *Histoplasma*. *Research, Society and Development.* 11, e12111729424.
- Moraes, M. A. P., Almeida, M. M. R., 1976. Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo de Humboldt (Estado de Mato Grosso, Brasil). *Acta Amazonica.* 6.
- Moreira, L. M., et al., 2022. Molecular Detection of *Histoplasma capsulatum* in Antarctica. *Emerg Infect Dis.* 28, 2100-2104.

- Mulec, J., et al., 2020. Survey of *Histoplasma capsulatum* in bat guano and status of histoplasmosis in Slovenia, Central Europe. *International Journal of Speleology*. 49, 10.
- Myint, T., et al., 2020. HIV-Associated Histoplasmosis: Current Perspectives. *HIV AIDS (Auckl)*. 12, 113-125.
- Naranjo-Ortiz, M. A., Gabaldón, T., 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*. 94, 2101-2137.
- Nascimento, A.M., GOMES, J.G. 2019. Perfil de pacientes com micoses sistêmicas notificados de 2013 a 2018 em hospital de referência do estado de Goiás. *Boletim Epidemiológico SES-GO*. 1-9.
- Niego, A. G. T., et al., 2023. The contribution of fungi to the global economy. *Fungal Diversity*. 121, 95-137.
- Nnadi, N. E., Carter, D. A., 2021. Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathog*. 17, e1009503.
- Ocampo-Chavira, P., et al., 2020. Of Mice and Fungi: *Coccidioides* spp. Distribution Models. *J Fungi (Basel)*. 6.
- Ohno, H., et al., 2010. An Outbreak of Histoplasmosis among Healthy Young Japanese Women after Traveling to Southeast Asia. *Internal Medicine*. 49, 491-495.
- Oladele, R. O., et al., 2018. Histoplasmosis in Africa: An emerging or a neglected disease? *PLoS Negl Trop Dis*. 12, e0006046.
- Pará, M., 1946. Histoplasmosis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 26, 273-92.
- Pebesma, E., 2018. Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data. *The R Journal*. 10, 8.
- Pebesma, E., Bivand, R., 2023. *Spatial Data Science: With Applications in R*. Chapman and Hall/CRC.
- Phillips, S. J., et al., 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190, 231-259.

- Porta, A., Maresca, B., 2000. Host response and *Histoplasma capsulatum*/macrophage molecular interactions. *Med Mycol.* 38, 399-406.
- Queiroz-Telles, F., et al., 2017. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis.* 17, e367-e377.
- Raina, R. K., et al., 2016. Primary Cutaneous Histoplasmosis in an Immunocompetent Host from a Nonendemic Area. *Indian J Dermatol.* 61, 467.
- Raj, A., et al., 2014. fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics.* 197, 573-89.
- Ralph, A., et al., 2006. Histoplasmosis in two aboriginal patients from Australia's tropical Northern Territory. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100, 888-90.
- Ramos, I. C., et al. (2018). Predictive factors for disseminated histoplasmosis in AIDS patients with fever admitted to a reference hospital in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51.
- Rautemaa-Richardson, R., Richardson, M. D., 2017. Systemic fungal infections. *Medicine.* 45, 757-762.
- Ray, S. C., Rappleye, C. A., 2019. Flying under the radar: *Histoplasma capsulatum* avoidance of innate immune recognition. *Semin Cell Dev Biol.* 89, 91-98.
- Rayens, E., et al. (2022). Demographic and Socioeconomic Factors Associated with Fungal Infection Risk, United States, 2019. *Emerging Infectious Disease Journal*, 28(10), 1955.
- Reed, K. D., et al. (2008). Ecologic Niche Modeling of *Blastomyces dermatitidis* in Wisconsin. *PLOS ONE*, 3(4), e2034.
- Rodrigues, A. M., et al., 2020. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. *Stud Mycol.* 97, 100095.
- Sahaza, J. H., et al., 2019. Analyses of the genetic diversity and population structures of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Mexico, Guatemala, Colombia and

- Argentina, using a randomly amplified polymorphic DNA-PCR assay. *Epidemiol Infect.* 147, e204.
- Samarasinghe, H., et al., 2020. Hybridization Facilitates Adaptive Evolution in Two Major Fungal Pathogens. *Genes (Basel)*. 11.
- Schmidt, S., et al., 1973. Microepidemia de histoplasmosse na zona rural de Brasília - DF - 1967: II - Estudos Epidemiológico e Parasitológico da Fonte de Infecção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 7, 107-115.
- Schwarz, J., Baum, G. L., 1957. The History of Histoplasmosis, 1906 to 1956. *New England Journal of Medicine*. 256, 253-258.
- Sepulveda, E.S., et al., 2024. Phenotypic characterization of cryptic species in the fungal pathogen *Histoplasma*. *mSphere*. 2024.01.08.574719.
- Sepulveda, V. E., et al., 2017. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. *MBio*. 8.
- Severo, L. C., et al., 1986. Acute pulmonary histoplasmosis and first isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 28.
- Seyedmousavi, S., et al., 2018. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Med Mycol*. 56, 165-187.
- Sil, A., 2019. Molecular regulation of *Histoplasma* dimorphism. *Curr Opin Microbiol*. 52, 151-157.
- Sil, A., Andrianopoulos, A., 2014. Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens-- Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 5, a019794.
- Silva, M. E., 1956. Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo de zona endêmica de calazar na Bahia. *Boi. Fund. Gonçalo Muniz* 10, 16.
- Smith, D. F. Q., Casadevall, A., 2022. Disaster Microbiology-a New Field of Study. *mBio*. 13, e0168022.

Smith, D. J., et al., 2022. Surveillance for Coccidioidomycosis, Histoplasmosis, and Blastomycosis - United States, 2019. *MMWR Surveill Summ.* 71, 1-14.

Smith, D., et al. (2024). Associations between Minority Health Social Vulnerability Index Scores, Rurality, and Histoplasmosis Incidence, 8 US States. *Emerging Infectious Disease Journal*, 30(10), 2016.

Smith, D.J., et al., 2024. Clinical Testing Guidance for Coccidioidomycosis, Histoplasmosis, and Blastomycosis in Patients With Community-Acquired Pneumonia for Primary and Urgent Care Providers. *Clin Infect Dis.* Jun 14;78(6):1559-1563.

Sorley, D. L., et al., 1979. Bat-associated histoplasmosis in Maryland bridge workers. *The American Journal of Medicine.* 67, 623-626.

Souza, A. C., Amaral, A. C., 2017. Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity. *Front Microbiol.* 8, 336.

Stengel, A., et al., 2022. Improving Taxonomic Delimitation of Fungal Species in the Age of Genomics and Phenomics. *Front Microbiol.* 13, 847067.

Strassert, J. F. H., Monaghan, M. T., 2022. Phylogenomic insights into the early diversification of fungi. *Curr Biol.* 32, 3628-3635 e3.

Strassert, J. F. H., et al., 2021. A molecular timescale for eukaryote evolution with implications for the origin of red algal-derived plastids. *Nat Commun.* 12, 1879.

Taylor, M. L., et al. (2022). Considerations about the Geographic Distribution of *Histoplasma* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(7), e02010-21.

Taylor, M. L., et al., 2000. Molecular Typing of *Histoplasma capsulatum* Isolated from Infected Bats, Captured in Mexico. *Fungal Genetics and Biology.* 30, 207-212.

Taylor, M. L., et al., 2022. Considerations about the Geographic Distribution of *Histoplasma* Species. *Appl Environ Microbiol.* 88, e0201021.

- Teeling, E. C., et al., 2018. Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. *Annu Rev Anim Biosci.* 6, 23-46.
- Teixeira Mde, M., et al., 2016. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis.* 10, e0004732.
- Tenório, B.G., et al., 2024. Tracing histoplasmosis genomic epidemiology and species occurrence across the USA. *Emerg Microbes Infect.* Dec;13(1):2315960.
- Theodoro, R. C., et al., 2013. PRP8 intein in cryptic species of *Histoplasma capsulatum*: evolution and phylogeny. *Infect Genet Evol.* 18, 174-82.
- Thuiller, W. (2024). Ecological niche modelling. *Current Biology*, 34(6), R225–R229. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2024.02.018>
- Torres-Vélez C., et al., 2022. Visceral Leishmaniasis In A Patient With Multiple Myeloma: Casualty or Causality?. *J Med Case Rep Case Series* 3(08)
- Unis, G., Oliveira, F. de M., & Severo, L. C. (2004). Histoplasmosse disseminada no Rio Grande do Sul. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37.
- Valdez, A. F., et al., 2022. Pathogenicity & virulence of *Histoplasma capsulatum* - A multifaceted organism adapted to intracellular environments. *Virulence.* 13, 1900-1919.
- Van Dyke, M. C. C., et al., 2019. Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology.* 52, 55-63.
- van Rhijn, N., Bromley, M., 2021. The Consequences of Our Changing Environment on Life Threatening and Debilitating Fungal Diseases in Humans. *J Fungi (Basel).* 7.
- Vanbreuseghem, R., 1957. Tinea capitis and African histoplasmosis in the Belgian Congo. *Trans N Y Acad Sci.* 19, 622-34.
- Venables, B., Ripley, B., *Modern Applied Statistics With S.* 2002.

- Villareal, K., et al., 2023. The Current and Future States of Diagnostic Tests for Histoplasmosis with a Focus on People with HIV and Disseminated Histoplasmosis. *J Fungi (Basel)*. Jul 28;9(8):793.
- Vite-Garin, T., et al., 2014. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev Iberoam Micol*. 31, 11-5.
- Vite-Garin, T., et al., 2021. *Histoplasma capsulatum* Isolated from Tadarida brasiliensis Bats Captured in Mexico Form a Sister Group to North American Class 2 Clade. *J Fungi (Basel)*. 7.
- Wang, J., et al., 2019. Identification of *Histoplasma* causing an unexplained disease cluster in Matthews Ridge, Guyana. *Biosafety and Health*. 1, 150-154.
- Wang, R. J., et al., 2017. Approach to Fungal Infections in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals: Pneumocystis and Beyond. *Clin Chest Med*. 38, 465-477.
- Weaver, E., et al. (2020). Environmental factors affecting ecological niche of *Coccidioides* species and spatial dynamics of valley fever in the United States. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, 32, 100317.
- Wheat, J., et al. (2018). Central nervous system histoplasmosis: Multicenter retrospective study on clinical features, diagnostic approach and outcome of treatment. *Medicine*, 97(13).
- Wheat, J., et al., 2000. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 30, 688-95.
- Wheat, L. J., et al., 1981. A large urban outbreak of histoplasmosis: clinical features. *Ann Intern Med*. 94, 331-7.
- Wheat, L. J., et al., 2007. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 45, 807-25.
- Wheat, L. J., et al., 2016. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 30, 207-27.

Wu, B., et al., 2019. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*. 10, 127-140.

Xavier, M. O., et al., 2009. Chapter 1: laboratory diagnosis of pulmonary mycoses. *J Bras Pneumol*. 35, 907-19.

Zancope-Oliveira, R. M., Wanke, B., 1987. [Distribution of sources of infection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Rio da Prata, a municipality of Rio de Janeiro (RJ)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 29, 243-50.

Zeidberg, L. D., et al., 1952. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Am J Public Health Nations Health*. 42, 930-5.

10. Apêndices

Apêndice 1 – Surtos de histoplasmose no Brasil: lições para aprender sobre como prevenir exposição

Mycopathologia
https://doi.org/10.1007/s11046-019-00389-w



ORIGINAL PAPER

Histoplasmosis Outbreaks in Brazil: Lessons to Learn About Preventing Exposure

Bernardo Tenório Guerra · Fernando Almeida-Silva · Rodrigo Almeida-Paes ·
Rossana Patrícia Basso · João Paulo Romualdo Alarcão Bernardes ·
Marcos Abreu Almeida · Lisandra Serra Damasceno · Melissa Orzechowski Xavier ·
Bodo Wanke · Rosely M. Zancopé-Oliveira · Marcus de Melo Teixeira

Received: 30 May 2019 / Accepted: 23 September 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract Histoplasmosis is considered the most common invasive opportunistic fungal disease in the Americas, with outbreaks and micro-epidemics reported for over 80 years. In Brazil, this disease has been described since 1946, reaching a remarkable incidence in the population, especially during the HIV–AIDS pandemic. In this study, published and unpublished outbreaks and micro-epidemics of histoplasmosis in Brazil were revisited by accessing different database sources and evaluating epidemiological and clinical features. We have found reports spanning 1946–2017, across 10 Brazilian states and with involvement of 370 humans and 2 dogs, and 13 disseminated cases and 3 deaths were reported. Rio de

Janeiro had the largest number of outbreaks ($n = 20/40$; 50%) reported in this study. The majority of outbreaks and micro-epidemics was reported in caves ($n = 21/40$; 52.5%), followed by reports in abandoned/deactivated sites ($n = 6/40$; 15%), mines ($n = 5/40$; 12.5%), chicken coops ($n = 4/40$; 10%). Histoplasmosis is a serious health issue in Brazil considering the attractive and growing market of ecotourism throughout more than 7000 caves, and all levels of poultry farming activity are important to raise awareness about how dangerous this neglected disease can be and establish ways to decrease exposure to contaminated environmental sources through adequate preventive measures.

Handling editor: Sybren deHoog.

B. T. Guerra · J. P. R. A. Bernardes ·
M. de Melo Teixeira
Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina,
Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy
Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF CEP 70910-900, Brazil
e-mail: marcus.teixeira@gmail.com

F. Almeida-Silva · R. Almeida-Paes ·
M. A. Almeida · B. Wanke · R. M. Zancopé-Oliveira
Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

R. P. Basso · M. O. Xavier
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio
Grande (Famed-FURG), Rio Grande, RS, Brazil

J. P. R. A. Bernardes · M. de Melo Teixeira
Graduate Program in Genomic Sciences and
Biotechnology, Catholic University of Brasília, Brasília,
DF, Brazil

L. S. Damasceno
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, CE, Brazil

M. de Melo Teixeira
The Pathogen and Microbiome Institute, Northern
Arizona University, Flagstaff, AZ, USA

Published online: 16 December 2019

Springer

Keywords Histoplasmosis · Outbreaks · Micro-epidemics · Brazil · Histoplasma

Introduction

Histoplasmosis is a worldwide-distributed systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* sensu lato. This mycosis has been reported for over a century on all continents with the exception of Antarctica. The American and African continents are the most affected, especially in underdeveloped countries [1–3]. Bahr et al. [2] describe histoplasmosis worldwide through evaluation of histoplasmin skin tests (reaching reactivity up to 89% in some areas), showing the highest prevalence in the Americas and increasing rate of infections in Asian and African countries.

Histoplasmosis has first been described by Samuel Darling in 1906 in a case with the disseminated form from Panama [4]. A series of important studies were followed by characterizing the pathogen *antemortem* [5] as well as the identification of dimorphism and the first case of this infection in a dog [6]. The notorious severity of this neglected disease came with the HIV pandemic due to the high mortality ratio involving HIV–*H. capsulatum* co-infection [7–9]. *Histoplasma* sp. are mainly found in its filamentous form within enclosed areas enriched with bat and/or bird droppings (rich sources of nitrogen and phosphate compounds), low luminosity, and moderate temperature (~ 25 °C). Caves, basements, old buildings, and chicken coops are natural environmental sources of this fungus [10]. The fungal ecology has been studied for a long time and has been elucidated by pioneer studies of Dr. Chester Wilson Emmons and Dr. Libero Ajello, among other researchers, which have showed the influence, especially of bats and birds in the growth and dispersion of *Histoplasma* spp., but also demonstrated the isolation of the pathogen from guano-enriched soils [11–14]. Many mammals, like humans, dogs, and cats are potential hosts [11, 15].

During the saprobic phase, *Histoplasma* spp. produce infectious structures known as macro- and microconidia, the latter being the main infective spores due to their reduced size. After microconidia aerial dispersion and their inhalation by mammalian hosts, those spores reach lungs' alveoli, switch their

morphology to the yeast phase, and develop the infection [16, 17]. In addition, conidia can be easily dispersed by wind, reservoir hosts such as bats, and through soil disturbance, generating the possibility of new infection foci in unprecedented regions [10]. The onset of the infection depends on the fungal–host interaction, which is modulated by three key factors: immunological status of the host, the virulence of a given fungal strain, and the amount of fungal spores inhaled [16, 17]. Usually, histoplasmosis is asymptomatic in immunocompetent hosts, with minor cases displaying low fever, dry cough and fatigue, which can lead to misdiagnosis due to its similarity with other community-acquired pneumonia such as the flu or tuberculosis [3, 9, 18]. Immunocompromised patients such as people living with HIV/AIDS, individuals under chemotherapy and transplant patients are the primary concern because their immune system may not be able to withstand the infection [1]. Among these patients, there is a notorious ability for the fungus to disseminate to other organs through the bloodstream, along with high mortality rates, especially if they are not treated in the early stages of the infection [19]. The most common drugs used for treatment are liposomal amphotericin B and itraconazole [1].

With the advances of molecular systematics, new species diagnostics and identification methods have been developed, allowing to better understand the *Histoplasma* spp. evolution and taxonomy. The genotypic distribution of *Histoplasma* spp. from different countries around the globe was accessed via Multi-Locus Sequencing Typing (MLST), revealing at least eight species-level clades as follows: North America clade 1 (NA_m 1), North America clade 2 (NA_m 2), Latin America clade A (LA_m A), Latin America clade B (LA_m B), Panama, Australia, Netherlands, Eurasia, and Africa [20]. By expanding this work, Teixeira et al., 2016 provided substantial shreds of evidence that the genus *Histoplasma* is composed by at least 17 different monophyletic lineages; the LA_m A and LA_m B clades were split into LA_m A1, LA_m A2, LA_m B1, LA_m B2, RJ, and BR1-4, along with the description of the new phylogenetic species BAC1 [21]. Recently, four monophyletic lineages of *Histoplasma* were reclassified by using whole-genome phylogenetic concordance as follows: *Histoplasma capsulatum* sensu stricto Darling (Panama), *Histoplasma mississippiense* (NA_m 1), *Histoplasma ohiense* (NA_m 2), and *Histoplasma suramericanum* (LA_m A) [22]. The

Table 1 Summary of data collected in histoplasmosis outbreak reports in Brazil over 71 years

Study Reference	Date	City	State	Number involved	Diagnostic	Pulmonary involvement	Dissemination	Deaths	Occupation
1 [49]	September, 1943	Eldorado	SP	1 human and 1 dog	Yes	NA	Yes	Yes	Was born in a straw hut
2 [50]	October, 1958	Parafba do Sul	RJ	13 humans and 1 dog	Yes	Yes	Yes	No	Bats-inhabited cave
3 [51]	1959	Rio de Janeiro	RJ	8	NA	Yes	NA	No	Swimming in abandoned site
4 [52]	April, 1966	North Cost of SP (Between Caraguatatuba and Ubatuba)	SP	8	Yes	Yes	No	No	Bats-inhabited house
5 [53]	July, 1967	Brasília	DF	14	Yes	Yes	No	No	Bats-inhabited cave
6 [51]	1972	Vassouras	RJ	5	NA	Yes	Yes	Yes	Bats-inhabited cave
7 [54]	1975	Rio de Janeiro	RJ	5	Yes	Yes	NA	No	Bats-inhabited cave
8 [51]	1978	Near Angra dos Reis	RJ	7	NA	Yes	NA	No	Caving
9 [55]	October, 1978	Canoas	RS	2	Yes	Yes	No	No	Bats-inhabited tree
10 [56]	1980	Angra dos Reis	RJ	8	Yes	Yes	NA	NA	Caving
11 [51]	September, 1981	Niterói	RJ	10	Yes	Yes	Yes	No	Caving
12 [51]	May, 1981	São Gonçalo	RJ	14	Yes	Yes	NA	No	Caving
13 [51]	October, 1981	Petrópolis	RJ	10	Yes	Yes	NA	No	Caving
14 [57]	May, 1981	São Gonçalo	RJ	10	Yes	Yes	Yes	No	Abandoned mine
15 [57]	July, 1981	São Gonçalo	RJ	4	Yes	Yes	NA	No	Abandoned mine
16 [57]	October, 1981	Petrópolis	RJ	10	Yes	Yes	NA	No	Abandoned mine
17 [51]	February, 1982	Petrópolis	RJ	5	Yes	Yes	NA	No	Caving
18 [58]	August, 1982	São Gonçalo	RJ	6	Yes	Yes	Yes	No	Bats-inhabited cave
19 [57]	February, 1982	Petrópolis	RJ	5	Yes	Yes	NA	No	Abandoned mine
20 [57]	July, 1982	Niterói	RJ	6	Yes	Yes	Yes	No	Abandoned mine
21 [51]	July, 1984	Duque de Caxias	RJ	12	NA	Yes	NA	No	Chicken coop

Table 1 continued

Study	Reference	Date	City	State	Number involved	Diagnostic involvement	Pulmonary involvement	Dissemination	Deaths	Occupation
22	[51]	1984	Niterói	RJ	17	Yes	Yes	NA	No	Abandoned site—bats-inhabited
23	[59]	July, 1986	Borborema	PB	6	Yes	Yes	No	No	Chimney cleaning—bat droppings
24	[60]	1990	Rio de Janeiro	RJ	8	Yes	Yes	No	No	Cleaning a chicken coop
25	[61]	March, 1993	Manaus	AM	8	Yes	Yes	No	No	Caving
26	[62]	1993	Taquari	RS	2	Yes	Yes	Yes	No	Chicken coop cleaning
27	[63]	May, 1997	Pedro Leopoldo	MG	4	Yes	Yes	No	No	Caving
28	[64]	2000	Jequié	BA	4	Yes	Yes	No	Yes	Basement cleaning—bat droppings
29	[65]	2006	Blumenau	SC	2	Yes	Yes	No	No	Dust cleaning—bats
30	[66]	September, 2007	Arapeí	SP	35	Yes	Yes	No	No	Caving
31	[67]	September, 2007	Areias	SP	35	Yes	NA	NA	NA	Bats-inhabited cave
32	[68]	August, 2007	Cáceres	MT	34	Yes	Yes	No	No	Caving
33	[69]	2013	Unaí	MG	8	Yes	Yes	No	No	Bats-inhabited cave
34	[70]	May, 2017	Brazlândia	DF	18	No	Yes	No	No	Caving
35	[71]	1971–1973	North Cost of SP (Sumunga beach)	SP	10	Yes	NA	NA	NA	Caving
36	[72]	NA	São Gabriel	RS	3	Yes	Yes	Yes	No	Chicken droppings
37	[72]	NA	Porto Alegre	RS	2	Yes	Yes	Yes	No	NA
38	[72]	NA	Porto Alegre	RS	2	Yes	Yes	Yes	No	NA
39	[73]	NA	Niterói	RJ	5	Yes	Yes	Yes	No	Bats-inhabited cave
40	[74]	NA	Vale do Paraíba	SP	4	Yes	Yes	Yes	No	Bats-inhabited cave

NA non-available

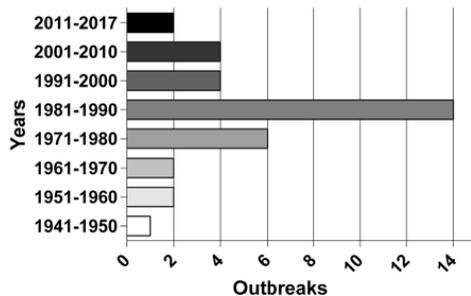


Fig. 3 Reported histoplasmosis outbreaks from 1946 to 2017 in Brazil

as well as by discussing how preventive actions might protect people from a high burden of *Histoplasma* exposure [26]. Thus, we reviewed at least 40 published and unpublished outbreak cases and micro-epidemics over 71 (1946–2017) years. We herein characterize general clinical features, geographic location, and the most likely recurrent sites of infection of two or more individuals. Finally, a set of recommendations are suggested to avoid exposure to areas with a high likelihood of *Histoplasma* contamination.

Materials and Methods

The methodology was based on the concept of a descriptive study, whereas the main objective is to determine the distribution of a particular disease or health situation. To analyze this parameter, we used databank sources with secondary data, such as published papers, epidemiological bulletins, M.Sc. and PhD. reports and unpublished cases found on the internet.

Searching Criteria and Data Filtering for Referential Articles

Starting on February 21, 2019, international and national databases such as NCBI Pubmed, Google, Google Scholar, Scielo, Web of Science were searched for combinations of keywords “histoplasma,” “histoplasmosis,” “histoplasmosis and surtos,” “histoplasmosis outbreaks in Brazil,” “micro-epidemics/epidemics and histoplasmosis,” also including Brazilian Universities, cities, states, authors,

and year of publishing. All relevant references of the articles were checked to gather as much information as possible. Inclusion criteria were based on studies in any languages that necessarily reported an outbreak or a micro-epidemic of histoplasmosis where two or more people or one person and a non-human mammalian presented symptoms compatible with the disease and got infected from the same exposure event. Only reports within Brazil were considered and isolated cases were excluded from the study. Epidemiological and clinical features like sex, occupation, and others were taken into consideration. Relevant information extracted from the studies consisted of the reported date of the outbreak (month and year), location (state and city), geographic coordinates, number of people involved, amount of positive cultures, X-ray photography data, immunodiagnostic results, dissemination, and disease outcome.

Cartography

Histoplasmosis outbreaks and micro-epidemics were mapped, state by state, through a search of coordinates of locations described in the reports to illustrate disease’s distribution across the country. The software used to produce the maps with the data that was found in the research was QGIS 3.6.2 ‘Noosa’, released on april 19, 2019. This software can make a match between the specific location and the cleaned data, favoring the understanding between the outbreaks and their location. Graphpad Prism v6.0 was used for graphs through analysis of data present in Table 1.

Results

From 1946 to 2017, we found 40 episodes of multiple *Histoplasma* infections that were characterized as an outbreak or micro-epidemic affecting 370 people and 2 dogs in total (Table 1). Complete epidemiological and clinical information was not available in all reports (shown in Table 1 as non-available “NA”). From those human patients, 193 were male and 81 were female according to the reported data. Most outbreaks were observed in Rio de Janeiro (RJ) (Fig. 1b), which accounts for ($n = 20/40$; 50%) of all outbreaks, followed by São Paulo (SP) ($n = 6/40$; 15%), Rio Grande do Sul (RS) ($n = 5/40$; 12.5%), Minas Gerais (MG) and the Distrito Federal (DF)

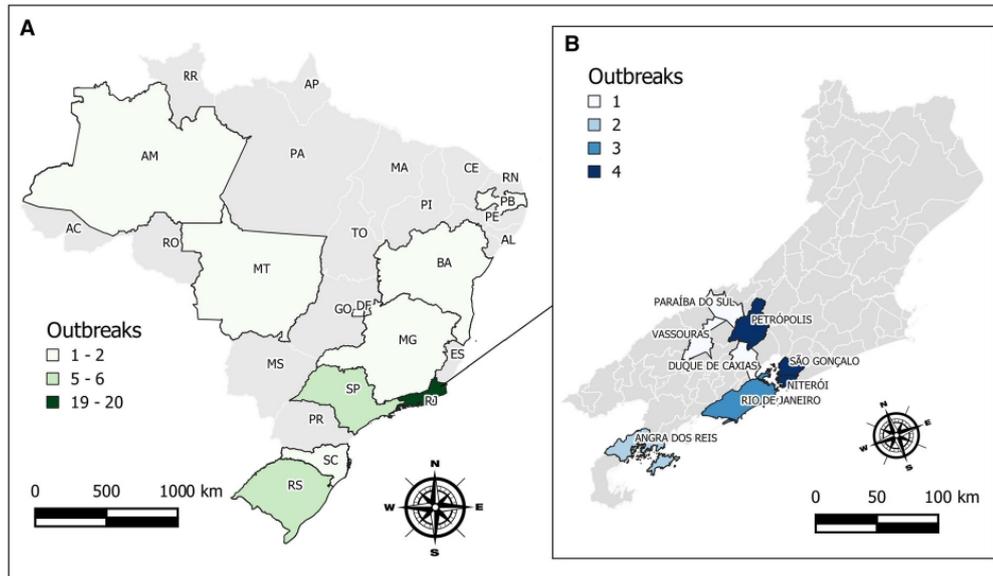


Fig. 1 Histoplasmosis outbreaks in Brazil. **a** Outbreaks and micro-epidemics reported in Brazil from 1946 to 2017. Outlined states in white (AM, MT, BA, MG, PB, SC, DF), gray (SP, RS), and black (RJ) had 1–2; 5–6 and 19–20 reports, respectively. **b** Outbreaks and micro-epidemics in the state of Rio de Janeiro

(RJ). Cities were pinpointed according to their respective geographic coordinates. Outlined cities in white (Vassouras, Paraíba do Sul, Duque de Caxias), gray (Angra dos Reis), darker gray (Rio de Janeiro) and black (Petrópolis, São Gonçalo, Niterói) had 1, 2, 3 and 4 outbreaks reported, respectively

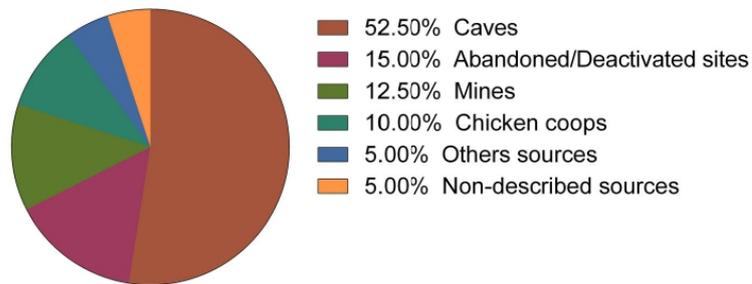


Fig. 2 Exposure sources of *Histoplasma* spp. outbreaks reported in Brazil

Africa clade was not ranked as a new species due to low taxa sampling. So far, only a few genomes of *Histoplasma* strains from South and Central America were sequenced by next-generation sequencing, and further taxonomical refinement in Latin America is needed, where the mycosis broadly occurs.

Currently, histoplasmosis outbreaks or micro-epidemics are defined as a sudden pulmonary infection

affecting more than one individual in a defined community and period [23]. Hundreds of outbreaks have been reported throughout the endemic areas of histoplasmosis around the globe, especially in the Americas, followed by Africa and Asia [24, 25]. In this study, we aimed to critically review the histoplasmosis outbreaks/micro-epidemics in Brazil by accessing the clinical features and the potential causative sources

focused on the active search of histoplasmosis cases, which led to the description of ($n = 37/40$; 92.5%) of the Brazilian outbreaks on this decade. Also, the observed increase in histoplasmosis cases in the 80s in RJ might be due the economic growth of Southeast Brazil. This finding suggests that active surveillance programs can improve early histoplasmosis diagnosis and detection and managements of outbreaks [35].

We observed a considerable distribution of the disease across the country based on outbreak investigations and this could be explained by the fact that conditions for this fungus' growth are similar in several regions, but also that *Histoplasma* sp. can adapt itself through necessary genetic regulations to survive in different environments and interactions with suitable hosts [21, 22, 36]. It is worth mentioning that the numbers herein reported are not representative of the country-wide real situation, they are just an estimative of cases that have been reported with symptomatic patients, not counting the asymptomatic ones. Also, we observed that despite Rio de Janeiro having a low number of caves compared to other states, it had the most number of reported cases ($n = 20/40$; 50%). One of the reasons for the most reports being in this state could be that specific training of doctors in medical mycology along with adequate laboratory support by health and research Institutions in this state might contribute to identify those micro-epidemics related to *Histoplasma*. Thus, specific diagnostics are more efficient and available to the population or this increased number of outbreaks in Rio de Janeiro might be correlated with the high population density of southeastern Brazil. Certainly, there are many micro-epidemics that are not notified and may mask the real numbers of this disease [24].

It is worth noting that regions where an outbreak had already been reported may be a potential source for future re-exposition and consequently new outbreaks. Reports show that people who returned to the same place of a previous outbreak were infected or reinfected (reports 12 and 21—Table 1). An important aspect is that infection dynamics also includes domestic animals, described in studies 1 and 2 (Table 1), which showed dogs susceptible to infection by *Histoplasma* spp. probably due to the inhalation of a large number of infective spores [11, 37]. Also, dogs follow their owners in outdoors activities with increased dust exposure, different than cats for example. So far, it has been described that

histoplasmosis cannot be transmitted from animals to humans and the only form of infection is through inhalation of spores from the environment [11, 37, 38].

An intriguing result is that out of 23 studies in which the month of the outbreak was reported, 14 occurred within the period of July–October, but a statistical correlation could not be applied since the majority of the reports did not provide the number of involved individuals not infected or asymptomatic. As of today, histoplasmosis is mostly associated with dry seasons in countries with similar climate as Brazil such as the Guianas [39], but other related factors remain unclear. Long drought seasons may contribute for spore production and dispersion under specific conditions in other dimorphs [40, 41]. However, this information has been studied in other mycosis such as coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis with similar ecological characteristics such as growth, development, and infection, and these might help understanding the role of the environment in the dispersion and growth of *Histoplasma* spp. The conditions of each season, for example increased dust exposure, high precipitations, and drought periods are thought to be deeply related to increased incidence of coccidioidomycosis [41]. On the other hand, absolute air humidity, soil-related jobs, mostly farming due to aerosolization of dust, and climate variation phenomena such as El niño showed positive correlations with increased incidence of paracoccidioidomycosis [42].

In comparison to a similar work performed in the USA, where histoplasmosis is also endemic in several states in the middle and eastern areas of the country, Brazil has less than a half of scientifically reported USA outbreaks (40 and 105, respectively—[25]). These discrepancies do not necessarily mean that there are more outbreaks in the USA, but could be a reflection of different investment in healthcare, including more advanced and available diagnostics, surveillance programs, and alerts to the population about the risks of histoplasmosis provided by the USA health agencies in known hotspots of the disease. Also, histoplasmosis infections are mostly related to chicken coops as well as construction and demolition in the USA while cave visitation was the main source of exposure in Brazil; however in both countries, the majority, if not all cases, occurred in locations harboring high load of guano/bird droppings which increases the likelihood of infection by this fungus [25]. These observations provide strong arguments

($n = 2/40$; 5%) each, Bahia (BA), Mato Grosso (MT), Paraíba (PB), Amazonas (AM), and Santa Catarina (SC) ($n = 1/40$; 2.5%) each (Fig. 1a). Cave visitation/training exposures accounted for 52.5% of infections ($n = 21/40$) while 15% were reported in abandoned/deactivated sites ($n = 6/40$), 12.5% in mines ($n = 5/40$), 10% in chicken coops cleaning/management ($n = 4/40$), 5% from other sources ($n = 2/40$) and 5% of unknown/non-described sources ($n = 2/40$ —Fig. 2). Diagnostics by either fungal culture, X-ray photography, histoplasmin intradermic reaction, or antibody detection were described in 87.5% ($n = 35/40$) of the cases (Table 1). In all but three studies, deep pulmonary involvement was confirmed, dissemination was observed and described in 13 reports and, three deaths occurred in individuals without known immunodeficiency status (Table 1).

Most outbreaks ($n = 29/40$; 72.5%) were reported in the last century, with the majority being reported during 1980s decade ($n = 14/40$; 35%). There was an increased number of reported outbreaks in the 1970s and 1980s ($n = 17/40$; 42.5%) in total (Fig. 3). Most of the outbreaks were published from July to October (Table 1).

Discussion

Histoplasmosis is caused by a dimorphic fungus mostly found in areas with high concentrations of bat guano and/or bird droppings coupled with enclosed warm environments and low luminosity, especially in caves and chicken coops [24]. In Brazil, there are several published studies concerning HIV/AIDS patients [9, 27–29]; however, a considerable number of outbreaks have also been reported all over the country with alarming statistics. Brazil is a hotspot for histoplasmosis outbreaks, especially because of its growing speleology activity throughout the vast number of caves all over the country coupled with the adequate conditions for fungal growth and dispersion found in those environments. Specific diagnostic tests for histoplasmosis are not always available in all country's regions and most clinical data generated ends up filed and stored, resulting in almost no notification whatsoever and thus avoiding any ways of effective countermeasures to decrease the number of cases. In addition, many studies are not published, and M.Sc. projects and PhD. thesis are often locally

archived masking the true numbers of this disease. Despite the high rates of infection in immunocompetent patients and the high mortality among people living with HIV/AIDS, unfortunately histoplasmosis is not a notifiable disease in the Brazilian territory, except for the Goiás state. The example of Goiás state must be followed by other state-level and country-level health agencies, especially in other states with intense mining and agricultural activities.

We found through our research that caves are the most common sites of infection ($n = 21/40$; 52.5%). According to the Sociedade Brasileira de Espeleologia (SBE), there are 7862 catalogued caves in Brazil, which brings an alert to potential exposure to *Histoplasma* sp. for thousands of ecotourists all over the country (<http://www.cavernas.org.br/cnc/>). Due to the defective knowledge about the disease and the lack of notification by Brazilian health agencies, histoplasmosis awareness is scant and people at risk are not conscious on how to avoid potential infection through the use of simple measures, mostly, personal protective equipment (PPE) such as appropriate clothing, N95 masks, or other types of protective respirators [30].

In immunocompetent people, the disease is usually asymptomatic and most of the symptomatic patients display minor, self-limited symptoms and rapidly respond to appropriate treatments [31–33]. Nevertheless, there were some cases of severe pulmonary manifestations, dissemination, and even deaths in apparently immunocompetent people. Therefore, we can speculate that this disease is a major concern in immunocompromised patients and even in immunocompetent individuals.

It is important to notice a possible connection between HIV pandemics that happened in the early 1980s [19, 34] with increased outbreak reports in the same period (Fig. 3). Data from the US Center for Disease Control and Prevention (CDC) show that the mortality rate in co-infected *Histoplasma* spp.-HIV/AIDS patients ranges from 20 to 40%, showing that histoplasmosis should be carefully approached when dealing with immunocompromised patients such as HIV/AIDS, diabetes, transplanted, under chemotherapy or corticosteroids treatment [9]. However, the lack of deaths on the outbreaks that occurred in the 1980s weakens this hypothesis. Another plausible explanation for the excess of cases in the 1980s is that during that decade a medical mycology group from RJ was

that *Histoplasma* spp. can develop in any region of North and South America under appropriate growth conditions [10, 11, 14].

Healthcare-associated infections (HAI) due to *Histoplasma* sp. should also be considered since residues generated by these facilities (i.e., any organic matter contained in trash) are not always properly discarded. The accumulation of such materials can attract pigeons and other birds and their droppings are a great source of nutrients for *Histoplasma* spp. growth, endangering local environment and, especially in hospitals, immunocompromised patients [16, 43]. Moreover, this fungus is a risk-group 3 pathogen, especially when dealing with its filamentous form due to high spore (microconidia) production, and should be manipulated specifically at biosecurity level 3 laboratories. Laboratory-acquired histoplasmosis has been reported in the past [44, 45] and since the 1960s no laboratory-acquired infections have been reported due improved biosecurity protocols that must be strictly followed to avoid potential infections.

Taking altogether, some precautions must be considered to decrease overall exposure to histoplasmosis in Brazil and other countries of Latin America: immunocompromised people with underlying diseases (e.g., AIDS and diabetes) or patients under immunosuppressive treatments (e.g. transplanted, chemotherapy, corticosteroid treatment) must avoid visitation to caves, chicken coops and mines, or contact with bird/bat droppings [9, 46–48]; long-term visitations in caves should be avoided by all personnel; avoid generation of aerosol by disturbance of soils with high concentration of bat guano/bird droppings; follow protocols of waste disposal; use of appropriate PPE during training in caves or any speleological practices in which a high concentration of bat guano/bird droppings are present; avoid places and periods of high bat activity; make awareness of areas in which histoplasmosis has been identified using warning signs; demand better notification of health-related departments and the government itself through every mean of communication, especially social medias. For a better understanding of the histoplasmosis situation in Brazil, investment in health programs, notification, and research development is necessary and further studies are vital to build a more concrete basis around environmental factors, spore dispersion, host–pathogen interaction, and diagnostics.

Acknowledgements R.M.Z.O. was partially supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq—Grant 302796/2017-7) and Foundation Carlos Chagas Filho Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ—Grant E-26/203.076/2016). M.M.T. research was funded by the CNPq Grant No. 434640/2018-2.

Author Contributions Conceived of or designed study—R.A.P., L.S.D., M.O.X., B.W., R.M.Z.O., M.M.T.; Performed research—B.T.G., F.A.S., R.P.B., J.P.R.A.B., M.A.A.; Analyzed data—B.T.G., F.A.S., R.A.P., R.P.B., J.P.R.A.B., M.A.A., M.M.T.; Contributed new methods or models—B.T.G., F.A.S., J.P.R.A.B., B.W., R.M.Z.O., M.M.T.; Wrote the paper—B.T.G., F.A.S., J.P.R.A.B., M.M.T.;

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest These authors have no conflict of interests or any potential influence or impart bias on the submitted work.

References

1. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):207–27. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.009>.
2. Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, Sarosi GA. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. *Curr Trop Med Rep*. 2015;2(2):70–80. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0044-0>.
3. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):115–32. <https://doi.org/10.1128/CMR.0027-06>.
4. Darling ST. A protozoön general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymphnodes. *J Am Med Assoc*. 1906;XLVI(17):1283–5. <https://doi.org/10.1001/jama.1906.62510440037003>.
5. Dodd K, Tompkins EH. A case of histoplasmosis of darling in an infant. *Am J Trop Med*. 1934;14:11.
6. Collins RD. Dr William DeMonbreun: description of his contributions to our understanding of histoplasmosis and analysis of the significance of his work. *Hum Pathol*. 2005;36(5):453–64. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.01.025>.
7. Adenis A, Nacher M, Hanf M, Vantilcke V, Boukhari R, Blachet D, et al. HIV-associated histoplasmosis early mortality and incidence trends: from neglect to priority. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3100. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003100>.
8. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002319>.
9. Adenis AA, Valdes A, Cropet C, McCotter OZ, Derado G, Couppie P, et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis

- sustained period of diminished precipitation. Mycopathologia. 2002;153(3):113–20.
41. Comrie AC. Climate factors influencing coccidioidomycosis seasonality and outbreaks. Environ Health Perspect. 2005;113(6):688–92.
 42. Barrozo LV, Benard G, Silva ME, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(3):e643. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000643>.
 43. Furcolow ML, Guntheroth WG, Willis MJ. The frequency of laboratory infections with *Histoplasma capsulatum*: their clinical and X-ray characteristics. J Lab Clin Med. 1952;40(2):182–7.
 44. Murray JF, Howard D. Laboratory-acquired histoplasmosis. Am Rev Respir Dis. 1964;89:631–40. <https://doi.org/10.1164/arrd.1964.89.5.631>.
 45. Spicknall CG, Ryan RW, Cain A. Laboratory-acquired histoplasmosis. N Engl J Med. 1956;254(5):210–4. <https://doi.org/10.1056/NEJM195602022540504>.
 46. Kauffman CA, Freifeld AG, Andes DR, Baddley JW, Herwaldt L, Walker RC, et al. Endemic fungal infections in solid organ and hematopoietic cell transplant recipients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). Transpl Infect Dis. 2014;16(2):213–24. <https://doi.org/10.1111/tid.12186>.
 47. Tulloch BR, Jariwalla A. Disseminated histoplasmosis in diabetes. Br Med J. 1977;2(6092):959.
 48. Smith JA, Kauffman CA. Endemic fungal infections in patients receiving tumour necrosis factor-alpha inhibitor therapy. Drugs. 2009;69(11):1403–15. <https://doi.org/10.2165/00003495-200969110-00001>.
 49. Madureira P. Histoplasmosis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1946;26:273–92.
 50. Paula A. Microepidemia de histoplasrose. Rev Serv Nac Tuberc. 1959;3:10.
 51. Paula A, Aidé MA. As microepidemias de histoplasrose do Estado do Rio de Janeiro. JBM. 1985;49:11.
 52. Fava Netto C, Silva UA, Chammas F, Lacaz CS. Histoplasrose epidêmica. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1967;9(4):11.
 53. Schmidt S, Machado OP, Galvão AB. Microepidemia de histoplasrose na zona rural de Brasília—DF—1967: II—Estudos Epidemiológico e Parasitológico da Fonte de Infecção. Rev Soc Bras Med Trop. 1973;7:107–15.
 54. Rêgo AP, Bethlem N, Magarão S, Miranda JL, Bethlem E. Microepidemia de histoplasrose. JBM. 1976;31:9.
 55. Severo LC, Picon PD, Londero AT, Rubião HFOJ. Histoplasrose aguda. Relato de dois casos. Rev AMRIGS. 1981;37:4.
 56. Melo JBF, Millington FR, Gonçalves ALC, editors. Histoplasrose: microepidemia no litoral sul do Estado do Rio de Janeiro. XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 1980; Natal-RN, Brazil.
 57. Wanke B. Histoplasrose: Estudo Epidemiológico, Clínico e Experimental. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1985.
 58. Verbicário LPS, Andrade E, Alvim MAM, Andrade CRM, Gabetto JM, Pinho RR. Histoplasrose aguda: reavaliação de seis casos 10 anos após a microepidemia. Arq Bras Med. 1993;67:4.
 59. Fernandes FO, Costa W, Wanke B, Oliveira RZ. Microepidemia de histoplasrose capsulata: clínica e epidemiológica do primeiro surto ocorrido no Estado da Paraíba. CCS. 1989;11:11.
 60. Kritski AL, Lemle A, de Souza GR, de Souza RV, Nogueira SA, Pereira NG, et al. Pulmonary function changes in the acute stage of histoplasmosis, with follow-up. An analysis of eight cases. Chest. 1990;97(5):1244–5. <https://doi.org/10.1378/chest.97.5.1244>.
 61. Suzaki A, Kimura M, Kimura S, Shimada K, Miyaji M, Kaufman L. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. Kansenshogaku Zasshi. 1995;69(4):444–9.
 62. Severo LC, Rizzon CFC, Roesch EW, Porto NS. Histoplasrose pulmonar aguda: episódio em casa de adultos. Rev Assoc Méd Rio Grande do Sul. 1993;37:3.
 63. Cury GC, Diniz Filho A, Cruz AGdCe, Hobaika ABdS. Surto de histoplasrose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34:483–6.
 64. Pecanha Martins AC, Costa Neves ML, Lopes AA, Querino Santos NN, Araujo NN, Matos Pereira K. Histoplasmosis presenting as acute respiratory distress syndrome after exposure to bat feces in a home basement. Braz J Infect Dis. 2000;4(2):103–6.
 65. Oliveira FdM, Unis G, Severo LC. Microepidemia de histoplasrose em Blumenau, Santa Catarina. J Bras Pneumol. 2006;32:375–8.
 66. Vicentini AP, Kohara VS, Passos AN, Feliciano RS, Barreto LC, Freitas RS, et al. Microepidemia de histoplasrose no município de Arapeí, São Paulo. BEPA. 2008;5(58):4.
 67. 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. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400028>.
 68. Lima HCAV, Barrado JCS, Rocha S, Muniz MV, Braga FF, Millington A et al. Investigação de surto de histoplasrose após curso de captura de morcegos hematófagos, Cáceres-Mato Grosso, 2007. Mostra Nacional de Experiências Bem-Sucedidas em Epidemiologia, Prevenção e Controle de Doenças; Brasília-DF, Brazil 2008.
 69. 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. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2013.12.002>.
 70. Alves AJS, Figueiredo JA, Millington MA, Segatto C, Cardoso AV, Freitas FS et al. Investigação de surto de histoplasrose no Distrito Federal—Brasil, 2017. 54o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Olinda-PE, Brasil 2018.
 71. Fava Netto C, Almeida Neto JM, Guerra MAG, Costa EO. Histoplasrose epidêmica. Novos surtos ocorridos no litoral norte do Estado de São Paulo. Inquérito epidemiológico com histoplasmina e paracoccidioidina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1976;18:5.
 72. Unis G, Roesch EW, Severo LC. Histoplasrose pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. J Bras Pneumol. 2005;31:52–9.

- compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(10):1150–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30354-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30354-2).
10. Howard DH. The epidemiology and ecology of blastomycosis, coccidioidomycosis and histoplasmosis. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1984;257(2):219–27.
 11. Emmons CW. Histoplasmosis: animal reservoirs and other sources in nature of pathogenic fungus, histoplasma. *Am J Public Health Nations Health*. 1950;40(4):436–40.
 12. Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Rep*. 1949;64(28):892–6.
 13. Zeidberg LD, Ajello L, Dillon A, Runyon LC. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Am J Public Health Nations Health*. 1952;42(8):930–5.
 14. Ajello L, Zeidberg LD. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria Boydii* from soil. *Science*. 1951;113(2945):662–3.
 15. Hasenclever HF. Histoplasmosis in bats. *Health Lab Sci*. 1972;9(2):125–32.
 16. Carreto-Binaghi LE, Damasceno LS, Pitangui Nde S, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ, Zancoppe-Oliveira RM, et al. Could *Histoplasma capsulatum* be related to healthcare-associated infections? *Biomed Res Int*. 2015;2015:982429. <https://doi.org/10.1155/2015/982429>.
 17. Leimann BC, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, et al. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22(3):141–6.
 18. Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Zancoppe-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. *Braz J Microbiol*. 2006;37(1):1–13. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100001>.
 19. Nacher M, Adenis A, Aznar C, Blanchet D, Vantilcke V, Demar M, et al. How many have died from undiagnosed human immunodeficiency virus-associated histoplasmosis, a treatable disease? Time to act. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(2):193–4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0226>.
 20. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castaneda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*. 2003;12(12):3383–401.
 21. Teixeira Mde M, Patane JS, Taylor ML, Gomez BL, Theodoro RC, de Hoog S, et al. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):e0004732. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004732>.
 22. Sepulveda VE, Marquez R, Turissini DA, Goldman WE, Matute DR. Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. *MBio*. 2017. <https://doi.org/10.1128/mbio.01339-17>.
 23. Módulos de Princípios de Epidemiologia para o Controle de Enfermidades. Módulo 5: pesquisa epidemiológica de campo – aplicação ao estudo de surtos. 2010.
 24. Deepe GS Jr. Outbreaks of histoplasmosis: the spores set sail. *PLoS Pathog*. 2018;14(9):e1007213. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007213>.
 25. Benedict K, Mody RK. Epidemiology of histoplasmosis outbreaks, United States, 1938–2013. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(3):370–8. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151117>.
 26. Campbell CC. Histoplasmosis outbreaks: recommendation for mandatory treatment of known microfoci of *H. capsulatum* in soils. *Chest*. 1980;77(1):6–7.
 27. Falci DR, Monteiro AA, Braz Caurio CF, Magalhaes TCO, Xavier MO, Basso RP, et al. Histoplasmosis, an underdiagnosed disease affecting people living with HIV/AIDS in Brazil: results of a multicenter prospective cohort study using both classical mycology tests and histoplasma urine antigen detection. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(4):ofz073. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz073>.
 28. Damasceno LS, Ramos AN Jr, Alencar CH, Goncalves MV, de Mesquita JR, Soares AT, et al. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a north-eastern area of Brazil. *Mycoses*. 2014;57(7):406–13. <https://doi.org/10.1111/myc.12175>.
 29. da Silva Ferreira B, de Araujo Filho JA, Matos Pereira N, de Miranda Godoy L, Borges Lamounier B, Dias Nunes E, et al. Disseminated histoplasmosis in AIDS patients: an urban disease. Experience in a metropolis in the middle east of Brasil. *Infez Med*. 2017;25(3):258–62.
 30. Diaz JH. Environmental and wilderness-related risk factors for histoplasmosis: more than bats in caves. *Wilderness Environ Med*. 2018;29(4):531–40. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2018.06.008>.
 31. Kauffman CA. Histoplasmosis. *Clin Chest Med*. 2009;30(2):217–25. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.002>.
 32. Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(2):192–8.
 33. 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. <https://doi.org/10.1086/521259>.
 34. Barre-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(12):877–83. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3132>.
 35. Ferreira-da-Cruz MF, Wanke B, Galvao-Castro B. Prevalence of paracoccidioidomycosis in hospitalized adults in Rio de Janeiro (RJ) Brazil. *Mycopathologia*. 1987;97(1):61–4.
 36. Shen Q, Rappleye CA. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. *Curr Opin Microbiol*. 2017;40:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.003>.
 37. Bromel C, Sykes JE. Histoplasmosis in dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2005;20(4):227–32. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2005.07.003>.
 38. Silva-Ribeiro VL, Ferreira-da-Cruz MF, Wanke B, Galvao-Castro B. Canine histoplasmosis in Rio de Janeiro: natural and experimental infections. *J Med Vet Mycol*. 1987;25(5):319–22.
 39. Hanf M, Adenis A, Carme B, Couppie P, Nacher M. Disseminated histoplasmosis seasonal incidence variations: a supplementary argument for recent infection? *J AIDS Clin Res*. 2012;3(8):3.
 40. Proctor ME, Klein BS, Jones JM, Davis JP. Cluster of pulmonary blastomycosis in a rural community: evidence for multiple high-risk environmental foci following a

73. 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.
74. Zöllner MSAdC, Rezende KMPeC, Birman S, Elias CPF, Arisawa EÂL, Santos MABDV. Clinical and evolutionary characteristics of four patients with pulmonary

histoplasmosis reported in the Paraíba Paulista Valley region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:599–601.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Apêndice 2 – Características sociodemográficas e clínicas dos pacientes com histoplasose no Distrito Federal e entorno.

Ano	ID do Paciente	Sexo Biológico	Idade (anos)	Raça	Profissão
1994	HCHUB01	M	23	Nd	Agricultor
1998-1999	HCHUB02	M	27	Nd	Funcionário público
2003	HCHUB03	F	32	Branca	Aposentado
2003	HCHUB04	M	37	Pardo	Caminhoneiro
2005	HCHUB05	F	79	Parda	Nd
2007	HCHUB06	M	49	Nd	Nd
2007	HCHUB07	M	18	Nd	Estudante
2007	HCHUB08	M	32	Pardo	Cozinheiro
2008	HCHUB09	M	43	Nd	Nd
2008	HCHUB10	M	32	Nd	Nd
2008	HCHUB11	M	65	Nd	Construtor civil
2013	HCHUB12	M	63	Nd	Nd
2014	HCHUB13	M	23	Pardo	Nd
2014	HCHUB14	M	29	Nd	Nd
2014	HCHUB15	F	41	Nd	Nd
2015	HCHUB16	F	19	Nd	Nd
2016	HCHUB17	M	23	Nd	Administrador
2017	HCHUB18	F	27	Nd	Nd
2018	HCHUB19	M	44	Nd	Nd
2018	HCHUB20	F	26	Nd	Manicure
2019	HCHUB21	M	28	Nd	Nd
2020	HCHUB22	F	41	Branca	Nd
2020	HCHUB23	M	30	Nd	Agricultor
2020	HCHUB24	M	43	Pardo	Nd
2020	HCHUB25	M	90	Nd	Nd
2020	HCHUB26	F	58	Branca	Aposentada
2020	HCHUB27	M	33	Pardo	Nd
2020	HCHUB28	M	44	Branco	Vendedor
2020	HCHUB29	M	50	Pardo	Vendedor
2021	HCHUB30	M	47	Nd	Desempregado
2022	HCHUB31	M	46	Branco	Nd
2022	HCHUB32	M	40	Pardo	Construtor civil
Nd	HCHUB33	M	70	Branco	Agricultor
Nd	HCHUB34	M	55	Nd	Técnico em eletrônica

Nd = Não descrito
M = Masculino, F = Feminino
HUB = Hospital Universitário de Brasília,
HBDF = Hospital de Base de Brasília,
HRAN = Hospital Regional da Asa Norte,
HRP = Hospital Regional do Paranoá,
HRG = Hospital Regional do Gama
TARV = Terapia antiretroviral
DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Centro de Diagnóstico da Histoplasnose	Residência	Natural de/Procedência	Tabagista
HUB	Taguatinga-DF	Nd	Sim
HUB	Nd	Nd	Nd
HUB	Valparaíso-GO	MG	Sim
HUB	Sobradinho-DF	São João do Sobrado-ES/Imperatriz-MA	Não
HUB	Lago Norte-DF	Romão-MG/Riachinho-MG	Sim
HUB	Água Fria de Goiás-GO	Nd	Sim
Nd	Planaltina-DF	Planaltina-GO	Sim
Nd	Santa Maria-DF	Santa Tereza-GO	Nd
HRAN	Anápolis-GO	Nd	Nd
HUB	Formosa-GO	Nd	Nd
Nd	Gama-DF	Januária-MG/Valparaíso-GO	Nd
Nd	Nd	Nd	Nd
Nd	Sobradinho-DF	Abadia-GO	Não
Nd	Sobradinho-DF	Nd	Não
Nd	Campos Belos-GO	Nd	Não
HBDF	Sobradinho-DF	Brasília-DF	Nd
Nd	Paranoá-DF	Não	Não
HBDF	Formosa-GO	Nd	Nd
HBDF	Gama-DF	Nd	Nd
HRG	Gama-GO	Nd	Não
Nd	Nd	Nd	Nd
HBDF	Nd	Brasília-DF	Nd
HRAN	Ceilândia-DF	Brasília-DF	Não
HUB	Paranoá-DF	Desterro-PA	Não
HUB	Brasília-DF	Nd	Nd
HRP	Paranoá-DF	Inhuma-PI	Sim
HBDF	Ceilândia-DF	Feira da Mata-BA	Não
HBDF	Cidade Ocidental-GO	Nd	Nd
HBDF	Guará-DF	Imperatriz-MA	Nd
Nd	Paranoá-DF	Nd	Nd
HBDF	Santa Maria-DF	Recife-PE	Não
HUB	Riacho Fundo I-DF	Caracas-Venezuela	Sim
HRAN	Asa Norte-DF	Santa Rita de Cássia-BA	Nd
Nd	Guará-DF	Nd	Nd

Nd = Não descrito

M = Masculino, F = Feminino

HUB = Hospital Universitário de Brasília,

HBDF = Hospital de Base de Brasília,

HRAN = Hospital Regional da Asa Norte,

HRP = Hospital Regional do Paranoá,

HRG = Hospital Regional do Gama

TARV = Terapia antiretroviral

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Etilista	Drogas ilícitas	Amostra	Diagnóstico da histoplasmose	Sorologia HIV
Nd	Nd	Biópsia fígado	Exame Direto	Nd
Nd	Nd	Escarro	Cultivo, exame direto	Nd
Não	Não	Medula óssea	Cultivo, exame direto	Positivo
Sim	Não	Biópsia Intestinal	Exame direto	Positivo
Nd	Nd	Lavado Broncoalveolar	Cultivo	Nd
Sim	Nd	Medula Óssea	Cultivo	Positivo
Sim	Maconha, cocaína	Líquor	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Medula óssea	Exame direto	Positivo
Nd	Nd	Biópsia de pele	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Medula óssea	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Escarro	Cultivo	Negativo
Nd	Nd	Biópsia de fígado	Cultivo	Nd
Não	Não	Biópsia Pulmão/epiglote	Cultivo	Negativo
Não	Nd	Lavado Broncoalveolar	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Lavado Broncoalveolar	Cultivo	Negativo
Nd	Nd	Lavado Broncoalveolar	Cultivo	Nd
Não	Nd	Medula óssea	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Sangue	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Medula óssea	Cultivo	Positivo
Não	Nd	Líquor	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Sangue	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Líquor	Cultivo	Nd
Não	Nd	Biópsia de pele	Cultivo, exame direto	Positivo
Sim	Nd	Medula óssea	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Biópsia	Cultivo	Nd
Nd	Nd	Biópsia	Cultivo	Positivo
Não	Não	Soro	Sorologia	Positivo
Não	Não	Soro	Sorologia	Positivo
Nd	Nd	Soro	Sorologia	Positivo
Nd	Nd	Biópsia de pele	Cultivo	Positivo
Nd	Nd	Soro	Sorologia	Positivo
Sim	Nd	Sangue	Cultivo, exame direto	Positivo
Nd	Nd	Biópsia de pele	Cultivo	Nd
Nd	Nd	Soro	Sorologia	Positivo

Nd = Não descrito

M = Masculino, F = Feminino

HUB = Hospital Universitário de Brasília,

HBDF = Hospital de Base de Brasília,

HRAN = Hospital Regional da Asa Norte,

HRP = Hospital Regional do Paranoá,

HRG = Hospital Regional do Gama

TARV = Terapia antiretroviral

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Contagem CD4 cél/mm3	Forma clínica da histoplasmose	Co-infecção	Outras condições
-	Disseminada	Não	Nd
-	Crônica	Não	Nd
Nd	Disseminada	<i>Mycobacterium avium</i>	Nd
Nd	Disseminada crônica	Tuberculose	Nd
-	Aguda	Nd	Nd
49	Disseminada	Nd	Nd
11	Disseminada	<i>Mycobacterium avium</i>	Nd
10	Disseminada aguda	Tuberculose	Nd
5	Disseminada	Nd	Nd
Nd	Disseminada	Leishmaniose	Nd
-	Aguda	Não	Câncer renal (metástásico nos pulmões)
-	Disseminada	Nd	Nd
-	Crônica	Nd	Nd
Nd	Aguda	Leishmaniose e candidíase (esofágica)	Nd
-	Aguda	Nd	Nd
-	Aguda	Nd	Nd
320	Disseminada	Neurotoxoplasmose e Candidíase esofágica	Nd
72	Disseminada	Nd	Nd
147	Disseminada	Tuberculose e Citomegalovírus (esofagite), <i>Candida albicans</i> (LBA)	Nd
Nd	Disseminada	Tuberculose	Não
Nd	Disseminada	Nd	Nd
-	Disseminada	Nd	Nd
Nd	Disseminada	Leishmaniose	Nd
14	Disseminada	Nd	Nd
-	Nd	Candidíase e COVID-19	Nd
240	Nd	Nd	Nd
263	Nd	Nd	Nd
69	Nd	Nd	Nd
691	Nd	Nd	Não
507	Disseminada	Nd	Nd
341	Nd	Nd	Nd
193	Disseminada	Não	Nd
Nd	Disseminada	Nd	Linfoma não Hodgkin e Síndrome hemofagocítica
Nd	Nd	Nd	Nd

Nd = Não descrito

M = Masculino, F = Feminino

HUB = Hospital Universitário de Brasília,

HBDF = Hospital de Base de Brasília,

HRAN = Hospital Regional da Asa Norte,

HRP = Hospital Regional do Paranoá,

HRG = Hospital Regional do Gama

TARV = Terapia antiretroviral

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Tratamento	Dose e tempo	Óbito	Observações
Itraconazol	3 anos	Nd	-
Nd	Nd	Não	-
Nd	Nd	Sim	-
Itraconazol e Anfotericina B	100mg/dia (Itraconazol)	Não	-
Nd	Nd	Não	-
Anfotericina B	Nd	Nd	-
TARV, Bactrim, Fluconazol, Anfotericina B	Nd	Sim	Meningite
TARV, Anfotericina B	Nd	Não	Insuficiência cardíaca
Nd	Nd	Nd	-
Anfotericina B	Nd	Sim	Infiltrado em base pulmonar, insuficiência respiratória aguda
Nd	Nd	Não	-
Nd	Nd	Não	-
Nd	Nd	Não	Histoplasmose aos 7 e aos 26 anos pulmonar e laringea (estenose), comprometimento pulmonar de até 15%
Anfotericina B lipossomal, TARV	200mg (Anfotericina B)	Não	-
Nd	Nd	Não	-
Voriconazol	Nd	Sim	Linfoma células B, consolidação nodular sugestiva de infecção fúngica
Itraconazol, Fluconazol e Anfotericina B	Nd	Nd	-
Fluconazol	Nd	Sim	-
Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B, Rifampicina	Nd	Sim	Pancitopenia, insuficiência respiratória, opacidades esparsas pelos pulmões com lesões em vidro fosco
TARV	Nd	Sim	Pequenos nódulos com distribuição randômica no parênquima pulmonar
Nd	Nd	Sim	-
Nd	Nd	Nd	-
Anfotericina B	Nd	Sim	Presença de pápulas amarronzadas disseminadas na face, tórax, região femoral, mucosa oral
TARV (2019), Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B lipossomal	150mg/dia (Fluconazol)	Não	Lesões ulceradas nos lábios e nariz
Nd	Nd	Não	DPOC por fogão a lenha
Nd	Nd	Nd	DPOC exacerbado, neoplasia retal
Nd	Nd	Não	-
TARV, Anfotericina B	250mg/dia	Sim	-
TARV	Nd	Não	(TARV há 3 anos)
TARV	Nd	Não	-
TARV	Nd	Sim	Tuberculose (há 8 anos), Tomografia Computadorizada revelou vidro fosco
Itraconazol	200mg (Itraconazol)	Não	Recidiva (2020 e 2022), ruptura intestinal por histoplasmose. Reside em Brasília há 4 anos
Anfotericina B	10 dias	Sim	Numerosos micronódulos nos pulmões e opacidades em vidro fosco
Nd	Nd	Nd	-

Nd = Não descrito
M = Masculino, F = Feminino
HUB = Hospital Universitário de Brasília,
HBDF = Hospital de Base de Brasília,
HRAN = Hospital Regional da Asa Norte,
HRP = Hospital Regional do Paranoá,
HRG = Hospital Regional do Gama
TARV = Terapia antiretroviral
DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Fonte: autoria própria.

Apêndice 3 – Artigo em produção - Epidemiologia molecular de histoplasmosse no Distrito Federal, Brasil

Running Title: Epidemiology of histoplasmosis in the Federal District, Brazil

Title: The epidemiology of histoplasmosis in midwestern Brazil

Authors: Bernardo Guerra Tenório^a, Ana Carolina Franco Santana^b, João Eudes Filho^c, Carmélia Matos Santiago Reis^b, Joana D’Arc Gonçalves da Silva^d, André Bon Fernandes da Costa^b, André Afonso Machado Coelho^b, Amabel Fernandes Correa^e, João Paulo Romualdo Alarcão Bernardes^a, Maria Sueli Soares Felipe^f, Bridget Marie Barker^g, André Moraes Nicola^a, Luciana Oliveira de Medeiros Marques^b, Marcus de Melo Teixeira^{a,g,@}

Affiliations:

^a Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, ZIP 70910-900, Brasília, DF, Brazil.

^b Hospital Universitário de Brasília, ZIP 70840-901, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^c Secretaria de Estado de Saúde, ZIP 70719-040, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^d Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), ZIP 70710-907, Brasília, DF, Brazil.

^e Laboratório Central de Saúde Pública - DF (LACEN-DF), ZIP 70830-010, Brasília, DF, Brazil.

^f Universidade Católica de Brasília (UCB) – Brasília, ZIP 71966-900, Brasília, DF, Brazil

^g The Pathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, ZIP 86011, Flagstaff, Arizona, USA.

@ **Marcus de Melo Teixeira** - Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil, ZIP 70910-900, marcus.teixeira@gmail.com.

Abstract

Histoplasmosis is an endemic mycosis in Brazil with a high prevalence among people living with HIV/AIDS. Despite its high mortality among immunocompromised patients, the disease is underrecognized by health authorities and is only notifiable in the state of Goiás. Additionally, the epidemiology of histoplasmosis is unknown in Distrito Federal. Since the 1970's, two outbreaks have been reported in this area. Along with autochthonous cases, this suggests that *Histoplasma* sp., is endemic to this region. Moreover, as no genotyping has been completed on isolates circulating in Distrito Federal, it is unknown which species of *Histoplasma* exist in this region. To bridge this molecular epidemiology gap of histoplasmosis, we performed a retrospective study and identified 34 cases of the disease in Distrito Federal and surrounding areas. The lethality rate was 43% among people living with HIV/AIDS. Demographic data were used to map histoplasmosis cases through the ArcGIS software. We also genotyped three local clinical isolates and, through phylogenetic approaches, we identified that two isolates nested with the *H. suramericanum* Northeast clade, while the third clustered within the LAmB1 clade. This work represents the first contribution towards understanding the epidemiology of histoplasmosis in Distrito Federal.

Key-words: *Histoplasma*, histoplasmosis, Distrito Federal, epidemiology, molecular epidemiology, HIV.

Sponsorships: We would like to express our gratitude to the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [concession number 88887.343296/2019-00], and the Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grants [140427/2022-8], and 316965/2023-5.

Introduction

Histoplasmosis, a fungal disease caused by *Histoplasma* sp., is a public health concern with a global impact on human populations and has high endemicity in the Americas, Africa and southeast Asia ^(1,2,3). At least 17 genetic lineages of *Histoplasma* have been characterized using genealogical concordance methods, some showing prominent phenotypical traits and geographical isolation. The disease manifests primarily after visiting locations where the fungus thrives, usually areas with high deposition of bat guano or bird droppings, such as caves, demolition sites and chicken coops ⁽⁴⁾. Disturbance of soil contaminated with *Histoplasma* generates airborne micro- and macroconidia which may be inhaled by mammals and transition into pathogenic yeasts inside the lungs ⁽⁵⁾. Most immunocompetent individuals infected with *Histoplasma* exhibit the subclinical/asymptomatic form of the disease (90% of cases), as their immune system alone usually is sufficient to control and resolve the infection ⁽⁶⁾. Occasionally, apparently healthy individuals may develop acute pulmonary histoplasmosis with a nonspecific pneumopathological presentation, often misdiagnosed as other community-acquired pneumonias such as influenza and tuberculosis ⁽⁷⁾. The most commonly described symptoms include fever, cough, weight loss, fatigue, body aches, headache, and chills ⁽⁶⁾. Depending on the fungal burden and integrity of the immune system, the yeasts of *Histoplasma* can persist in a latent state within granulomas inside the lungs and relapse, representing the chronic pulmonary form of the disease ⁽⁸⁾. Moreover, the immunocompromised are at higher risk when facing histoplasmosis due to the compromised adaptative response, especially people living with HIV/AIDS (PLWHA), under immunosuppressive therapy, or those with autoimmune conditions ⁽⁹⁾. If the host is unable to effectively control the infection, the yeasts may enter the lymphatic system and cause disseminated disease, which is often fatal. For instance, in Latin America, histoplasmosis accounts for up to 30% of deaths in the HIV/AIDS populations, a higher mortality rate than that of

tuberculosis ⁽¹⁰⁾. Despite being a major public health concern, histoplasmosis continues to be neglected. There is a pressing need for a comprehensive understanding of its epidemiology, clinical manifestations, and molecular/cellular biology to improve management, treatment, and prevention efforts. This is especially critical in areas where the disease is endemic and accurate diagnostic tools are not widely accessible ⁽¹¹⁾.

Histoplasmosis is endemic in the midwestern region of Brazil, particularly in the state of Goiás, where thousands of cases have been reported state ^(11, 12). A study conducted at the Dr. Anuar Auad Tropical Disease Hospital in Goiânia, the capital of Goiás state, revealed an alarming mortality rate of 53.0% ⁽¹³⁾, one of the highest in Brazil ⁽¹¹⁾. The midwestern region is composed by the states of Mato-Grosso, Mato-Grosso do Sul, Goiás and the Distrito Federal (DF), and only in Goiás is histoplasmosis a disease of compulsory notification ⁽¹⁴⁾. DF is a political-administrative region located within the territory of the Goiás state; thus, a high prevalence of histoplasmosis in this area is expected, considering they share similar biome and climatic features. However, only two case-series have been published so far. Thus, epidemiological data is scarce to assess the burden of this mycosis, its potential sources, and the risk factors associated with its transmission within the local population in the Brazilian capital ^(15, 16, 17).

To bridge this epidemiological gap, we retrospectively investigated medical records of histoplasmosis cases diagnosed in the Hospital Universitário de Brasília (HUB) and Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), within DF and surroundings from 1994 to 2022. We then recovered clinical isolates and performed whole-genome sequencing coupled with phylogenetic analyses to understand which genotype is most likely to cause infections in DF. By undertaking such a thorough approach, we aim to enhance our understanding of the burden of histoplasmosis in this area, supporting effective public health interventions. This work stands as a significant contribution towards filling knowledge voids and paving the way for informed strategies to manage and mitigate the regional histoplasmosis impact.

Material and Methods

Ethics

This work was approved by the ethics and research committee of the Faculty of Medicine, Universidade de Brasília (UnB) (CAAE 68687323.1.0000.5558).

Retrospective study in the Distrito Federal and surroundings

The retrospective study was conducted at HUB and LACEN-DF. Both of these laboratories function as key medical mycology reference centers for histoplasmosis in the entire public healthcare system in DF and surrounding areas. Cases were diagnosed based on the microbiological cultivation of the fungus on Mycosel or Sabouraud agar and confirmed by double immunodiffusion, direct exam and radiological data. We gathered clinical, epidemiological and sociodemographic data from paper and electronic medical records of histoplasmosis cases that occurred in DF and surroundings, spanning from 1994 to 2022. Data collected included the year of diagnosis, age, biological gender, ethnicity, residential address, profession, place and methods of diagnosis, history of drug use, HIV serology, CD4+ lymphocyte count, if the patient was under immunosuppression from other causes, clinical presentation of the disease, coinfections, comorbidities, treatment details (including dose and duration), and death record (Supplementary Table 1). Patients' residences were obtained from the medical records. These locations were subsequently utilized as input data for generating histoplasmosis maps of using the ArcGIS software.

Clinical isolates recovery from the HUB/LACEN-DF mycological collection

This step was performed in a biosafety level 3 laboratory at LACEN-DF due to the high *Histoplasma* infectivity. The clinical isolates (n = 18) of the mycological collection had been stored at room temperature in the mycology laboratory of HUB. To recover those isolates, we used sterile inoculation loops to transfer a portion of the

colonies to two freshly prepared media, Sabouraud agar (Kasvi) and Brain Heart Infusion broth (Kasvi). The subcultures were maintained at room temperature at the LACEN-DF mycology laboratory for 28 days. For each colony suggestive of *Histoplasma* sp. (white and cottony or brown and cottony), a slide with lactophenol cotton blue was prepared to visualize fungal structures and ensure that the isolated colony was not a contaminant. The colonies were subcultured until isolation of a sufficiently sized colony with viable cells of *Histoplasma* cells for DNA extraction. Contaminated subcultures or those with no observable growth were autoclaved and discarded following biosafety standards.

Genomic sequencing and genotyping of clinical isolates of *Histoplasma*

In a Class II biological safety cabinet, 500 µg of fungal colony was transferred to a 2 mL centrifuge tube using sterile inoculation loops. These recipients contained a lysis buffer from the PowerSoil DNA extraction kit (Qiagen) and glass beads to aid in breaking down the fungal cell wall. Fungal DNA extraction was carried out following the manufacturer's protocol, with modifications in the lysis step involving 10 cycles of 1 minute at 5.500 rpm in a Precellys 24 touch instrument (Bertin technologies). The integrity of the extracted DNAs was verified through electrophoresis on a 0.8% agarose gel. Quantity and purity estimations were performed by spectrophotometry using the NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher). Paired-end sequencing libraries were prepared using the Kapa Biosystems kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA), utilizing approximately 1 µg of DNA. DNA sequencing was conducted on Illumina HiSeq 2500 (100 bp, high output, kits v3 or v4) and Illumina NextSeq 550 (150 bp, high output mode kit v2) instruments. The reads were polished using Trimmomatic V0.32⁽¹⁸⁾ with the following parameters: SLIDINGWINDOW:10:30, LEADING:28, TRAILING:28, and MINLEN:80. These reads were aligned to the reference strain *H. mississippiense* NAm1 (AAJI00000000.1) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA - v 0.7.17) pipeline⁽¹⁹⁾. Genomic coverage was assessed using the tinycov script (<https://github.com/cmdoret/tinycov>). Processed reads from each strain were remapped to their corresponding .bam file to identify INDELS and eliminate unmapped

DNA segments, using the programs RealignerTargetCreator and IndelRealigner (GATK toolkit v3.3-0) ⁽²⁰⁾. The UnifiedGenotyper was used to identify SNPs, and strict filters were applied to the .vcf files with the following parameters: QD=2.0, FS_filter=60.0, MQ_filter=30.0, MQ_Rank_Sum_filter=-12.5, Read_Pos_Rank_Sum_filter=-8. SNPs with low coverage (<10X) or with allelic variants less than 90%, or within duplicated regions (detected by the NUCmer tool ⁽²¹⁾) in the reference, were excluded from the final dataset. The SNP matrix, comprising 52 isolates, was used for evolutionary analysis. A Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree was constructed using IQ-TREE v2.1.1 ⁽²²⁾. Branch support was determined through bootstrap and SH-like approximate likelihood ratio tests ^(23, 24).

Results

Retrospective study on histoplasmosis

The retrospective study identified 34 cases of histoplasmosis in DF and its surroundings, diagnosed by culture and confirmed by serology, direct microscopy or radiological findings between 1994 and 2022. Medical reports showed that the cases were predominantly diagnosed at the Hospital Universitário de Brasília (HUB), Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), and Hospital Regional da Asa Norte (HRAN). All patients had a recorded gender, 26 males and 8 females, resulting in a male-to-female ratio of 3.25:1. The average age was 54 years (18 to 90 years) at the time of histoplasmosis diagnosis, with a median of 40.5 years (Figure 2). Although limited, the history of smoking, alcohol consumption, and illicit drug use was collected, with seven smokers or ex-smokers, five alcohol users, and one case of illicit substance use such as marijuana and cocaine recorded. The occupation of 53% of the patients was available (18/34) and included farmers or former rural workers (3), carpenter/mason (1), blacksmith/painter (1), manicurist (1), truck driver (1), cook (1), and student (1), among others. Patients were referred from 11 municipalities of DF. Cases of histoplasmosis were also diagnosed in patients living in eight cities in Goiás, bordering DF, see Figure 1. The places of residence for 4 patients were unspecified. Additionally, the birthplace or the region patients were referred from, when available, was recorded

and included cities from the states of Maranhão, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo, Paraíba, Piauí, Bahia, Pernambuco, and one foreign case from Venezuela. Diagnoses were made from samples of cerebrospinal fluid (3/34), blood (3/34), bone marrow (7/34), bronchoalveolar lavage (4/34), sputum (2/34), biopsy (10/34) (four, skin, one intestinal, two liver, 1 lung/epiglottis, two unspecified biopsies), and serum (5/34). Regarding the clinical presentation of histoplasmosis, five cases presented acute pulmonary infection, two cases had the chronic pulmonary form, 19 cases showed dissemination, and it was not possible to establish a clinical form for seven patients. Two patients had a history of recurrent histoplasmosis. Positive HIV diagnosis was confirmed in 67% of infected individuals (23/34). The CD4+ lymphocyte count was available for 65% of HIV+ cases (15/23), with 53% of patients presenting a cell count <200 cells/mm³ (9/15). Tuberculosis was reported as co-infection in six cases, as well as four cases of esophageal candidiasis, two of visceral leishmaniasis, one of COVID-19, one of neurotoxoplasmosis, and 1 of cytomegalovirus infection. It is worth noting all but one of the coinfections were diagnosed in PLWHA. The commonly used antifungals were itraconazole, fluconazole, amphotericin B, and voriconazole for periods that varied between 10 days and 3 years; 38% of the medical records did not describe any type of antifungal treatment (13/34). For PLWHA, antiretroviral therapy was frequently reported, although mostly were discontinued or delayed. Among the 23 cases in PLWHA, 43% died (10/23). The records for other two deceased people had no information on HIV infection. Furthermore, from the initial 18 isolates, only six were successfully recovered. DNA extraction was successful for all, but the sequencing standards were only met for three isolates, named HCHUB01, HCHUB02 and HCHUB03. Evolutionary analyses revealed that two isolates (HCHUB01 and HCHUB02) clustered within *H. suramericanum* Northeast clade and the last (HCHUB03) was nested with the LAmB1 clade.

Discussion

Histoplasmosis, sporotrichosis, paracoccidioidomycosis and coccidioidomycosis, are neglected endemic mycoses in Brazil with elevated case-mortality rates among the immunocompromised ⁽²⁵⁾. DF is a federal unit wholly contained within the state of Goiás. In conjunction with its surrounding areas, a high incidence of histoplasmosis is expected, in line with environmental models, given the number of cases reported in Goiás ⁽¹⁴⁾. Our retrospective study revealed 34 cases of histoplasmosis in DF over a period of 29 years (1994-2022). In addition to the two outbreaks involving 28 firefighters infected during training in a cave in Brazlândia-DF and the 14 cases reported in a rural area in 1971, for a total of 76 cases of histoplasmosis recorded in this area ^(16, 15). In addition, the epidemiological map shows a broad distribution of patients with histoplasmosis throughout the DF and surrounding cities located in the state of Goiás (Figure 1). Therefore, it can be concluded that the DF and its surroundings are endemic areas for histoplasmosis, in spite of the fact that there are few identified hotspots. As for the state of Goiás, this mycosis is already recognized as endemic and is a notifiable disease, so increased detection of histoplasmosis is expected.

Furthermore, among the 23 histoplasmosis cases in PLWHA identified in this study, 10 (43%) resulted in death. This rate is particularly alarming given the lethality of disseminated histoplasmosis in this population, which accounts for over 23,000 people infected in DF and Goiás together, according to the most recent epidemiological data ⁽²⁶⁾. Additionally, among the PLWHA, we observed a higher male to female ratio of 4.5:1, instead of the 3.25:1 from the whole study, which is consistent with the literature ⁽²⁷⁾. In this context, the expansion of epidemiological studies in the Brazilian midwestern is imperative to understand the environmental factors involved in fungal growth, map the geographical distribution, and predict areas of potential infection, thus facilitating and improving rapid diagnosis within vulnerable populations. Furthermore, despite the DF being an endemic area for histoplasmosis, cases might be underestimated because of: i) misdiagnosis, given the unspecific clinical presentation of histoplasmosis common to other pulmonary infections; ii) absence of clinical

laboratory infrastructure for the diagnosis of histoplasmosis that depends on biosafety level 3 for the culture of the mycelial phase; iii) lack of public awareness about the disease risk; and iv) lack of access to rapid diagnostics for histoplasmosis in the public healthcare services ^(11, 4). Importantly, patients with AIDS (CD4 cell count <200 cells/mm³), with a suspected fungal infection, receive empirical treatment with azole or polyene compounds due to high morbidity and mortality. This is because mycological diagnosis can take up to 6 weeks, in other words, delaying treatment could be fatal ⁽¹¹⁾.

Notably, limitations of this study include the challenges associated with accessing physical records dated before the year 2000. Many records were challenging to locate, as the information provided in medical mycology laboratory records often differed from that annotated in the electronic medical system. Moreover, most patient data, including medical history and test results, was handwritten. The legibility of the handwriting, exacerbated by ink fading due to storage conditions, hindered the identification and extraction of pertinent information, noted as missing data in Supplementary Table 1. Electronic medical records, on the other hand, presented challenges with several patients lacking a comprehensive history and anamnesis, leading to omissions in sociodemographic, epidemiological, and laboratory test data. In light of these challenges, it is unsurprising that histoplasmosis epidemiology has not been previously investigated in DF or in Goiás. Consequently, this study serves as the inaugural step towards understanding the prevalence of histoplasmosis in this region. Another hindrance is that our *Histoplasma* isolates were most likely compromised since they were stored in tubes containing the same culture medium for years after their initial isolation, without the subculturing. Consequently, several fungal colonies were likely dead due to a long-term lack of nutrients.

We successfully inferred the phylogenomic background of three DF clinical *Histoplasma* isolates (Figure 3). Two strains, HCHUB01 and HCHUB02, were genotyped as *H. suramericanum* Northeast BR and one strain, HCHUB03, as LAmB. However, we could not entirely resolve the *H. suramericanum* clade due to low genomic coverage of two strains as reported previously. It is possible to observe the two monophyletic lineages for the isolates belonging to the Northeast clade, which is

endemic in Northeast Brazil ⁽¹⁴⁾. Thus, two plausible hypotheses emerge: i) the cases could have been originally infected in the Northeast region, with the disease being diagnosed in DF, or ii) the genetic lineage may be endemic to the Brazilian midwestern. Unfortunately, the medical records from these patients were not found, so we couldn't confirm either hypothesis. On the other hand, we have identified seven patients born or referred from Northeastern Brazil, which might corroborate the first hypothesis. However, the second hypothesis is also plausible and can be confirmed when additional isolates autochthonous from DF are genotyped. Regarding the case identified as LAmB, histoplasmosis instances caused by this genotype are extensively distributed in Latin America and have been previously documented in Mato Grosso and Goiás ⁽¹⁾. Therefore, we suggest that LAmB is endemic in Midwestern Brazil, including in DF. Genotyping studies of *Histoplasma* within the DF public healthcare system are pivotal for achieving a comprehensive understanding of the epidemiology and impact of histoplasmosis in the region, contributing to better management and outcomes.

DF exhibits a robust infrastructure, abundant resources, and a well-trained healthcare workforce, providing an optimal environment for the implementation of enhanced diagnostic methodologies for endemic mycosis. Presently, histoplasmosis diagnosis relies on culture isolation of the pathogen, supplemented by inferences drawn from radiological observations and direct examination. However, this approach presents notable drawbacks due to specialized technical knowledge and time to diagnosis. Local healthcare authorities have also incorporated serologic identification using radial immunodiffusion, yet it suffers from low sensitivity. Considering these limitations, it is imperative to explore more advanced and commercially available diagnostic techniques. Notable alternatives include the MiraVista and IMMY assays, along with molecular methods such as RT-qPCR ⁽⁶⁾, which are being implemented in the public healthcare system. These advanced methods offer superior sensitivity and faster results.

The integration of advanced diagnostics and fungal genotype analysis helps identify geographic and genetic patterns that influence the prevalence and severity of histoplasmosis. These insights improve risk assessments and support more effective

prevention strategies. Molecular epidemiology also sheds light on infection origins and environmental factors. This knowledge is essential for guiding public health policies and targeted interventions. By applying these findings, we can better protect DF's population, especially in PLWHA, and improve overall health outcomes.

Acknowledgements

We extend our gratitude to Dr. Jason Stajich for providing the bioinformatics framework for our analyses.

Apêndice 4 – Rastreando a epidemiologia molecular da histoplasmose e a ocorrência de espécies nos EUA

Tracing histoplasmosis genomic epidemiology and species occurrence across the USA

Bernardo Guerra Tenório^a, Daniel R. Kollath^b, Lalitha Gade^c, Anastasia P. Litvintseva^c, Tom Chiller^c, Jeff S. Jenness^d, Jason E. Stajich^e, Daniel R. Matute^f, Andrew S. Hanzlicek^{g,h}, Bridget M. Barker^b and Marcus de Melo Teixeira^{a,b}

^aFaculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil; ^bPathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA; ^cMycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA; ^dSchool of Forestry, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA; ^eDepartment of Microbiology & Plant Pathology and Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside, CA, USA; ^fBiology Department, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA; ^gMiraVista Diagnostics, Indianapolis, IN, USA; ^hDepartment of Veterinary Clinical Sciences, Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA

ABSTRACT

Histoplasmosis is an endemic mycosis in North America frequently reported along the Ohio and Mississippi River Valleys, although autochthonous cases occur in non-endemic areas. In the United States, the disease is provoked by two genetically distinct clades of *Histoplasma capsulatum sensu lato*, *Histoplasma mississippiense* (Nam1) and *H. ohiense* (Nam2). To bridge the molecular epidemiological gap, we genotyped 93 *Histoplasma* isolates (62 novel genomes) including clinical, environmental, and veterinarian samples from a broader geographical range by whole-genome sequencing, followed by evolutionary and species niche modelling analyses. We show that histoplasmosis is caused by two major lineages, *H. ohiense* and *H. mississippiense*; with sporadic cases caused by *H. suramericanum* in California and Texas. While *H. ohiense* is prevalent in eastern states, *H. mississippiense* was found to be prevalent in the central and western portions of the United States, but also geographically overlapping in some areas suggesting that these species might co-occur. Species Niche Modelling revealed that *H. ohiense* thrives in places with warmer and drier conditions, while *H. mississippiense* is endemic to areas with cooler temperatures and more precipitation. In addition, we predicted multiple areas of secondary contact zones where the two species co-occur, potentially facilitating gene exchange and hybridization. This study provides the most comprehensive understanding of the genomic epidemiology of histoplasmosis in the USA and lays a blueprint for the study of invasive fungal diseases.

ARTICLE HISTORY Received 8 November 2023; Revised 31 January 2024; Accepted 4 February 2024

KEYWORDS Histoplasmosis; molecular epidemiology; *Histoplasma ohiense*; *Histoplasma mississippiense*; genomics; species distribution modelling

Introduction

Histoplasmosis is an endemic mycosis that is distributed in specific tropical and subtropical areas of the globe with high prevalence in the eastern portion of the United States, particularly in the Mississippi and Ohio River Valleys. The disease is caused by the dimorphic fungus *Histoplasma* sp. and is reported in all continents including its recent discovery in Antarctica [1,2]. The filamentous form of the fungus is frequently associated with soils enriched with bat guano or bird droppings, with average temperatures of 25°C, low luminosity, and high humidity [3–5]. During this phase, micro- and macroconidia are produced, and the infection is triggered when susceptible hosts inhale these aerosolized particles upon soil disturbance reaching the lungs' alveoli. The fungus transitions to yeast form at 37°C and

specific metabolic conditions imposed by the host [6]. Cases and outbreaks have been linked to construction sites, abandoned buildings, caves, and chicken coops [7]. Histoplasmosis is usually asymptomatic or develops clinical symptoms similar to other acute pulmonary infections such as fever, cough, and fatigue [2]. Progressive and disseminated histoplasmosis is commonly observed in immunocompromised patients and is often fatal, especially in HIV + patients [8].

Histoplasmosis is highly endemic in the United States and up to 80,000 documented cases were reported between 2006 and 2017. In 2019, there were 1124 confirmed cases, and it is estimated that approximately 500,000 natural *Histoplasma* infections occur annually within the United States and about 1% are symptomatic [9–11]. Large-scale histoplasmin skin test surveys revealed a high prevalence of

CONTACT Marcus de Melo Teixeira  marcus.teixeira@gmail.com  Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil, ZIP 70910-900

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2315960>.

© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

Histoplasma infection around the Ohio and Mississippi Valleys, suggesting that 60% to 90% of those residents have been exposed to the fungus [12,13]. At least 105 histoplasmosis outbreaks were documented between 1938 and 2013 in the USA, affecting 2850 individuals [7]. The epidemiological scenario has been changing since autochthonous cases have been reported outside the proposed endemic zone in the US. The disease has been observed in the western portion of the United States, extending to Canada, and reported at a lower incidence in southern and central regions of the United States [12, 13]. However, the case rates may be significantly underestimated due to a lack of surveillance. The disease has a mandatory notifiable status in thirteen of the fifty USA states [11, 14]. In the USA and Canada, histoplasmosis is caused by *H. mississippiense* (NAM1) and *H. ohioense* (NAM2), while in Latin America, the disease is caused by *H. suramericanum* (LAMa), *H. capsulatum sensu stricto* (Panama) and other cryptic genotypes [15–17]. In recent studies, Teixeira *et al.*, 2016 also observed that cat-and-bat-associated genetic clusters are observed in both Latin and North American *Histoplasma* species, suggesting that alternate hosts may play an important role in species diversification [15]. The phylogenetic species concept [18] strongly advocates for the recognition of multiple species boundaries within *Histoplasma* [15,16,19,20,21]. According to electrophoresis karyotype and genome sequencing analysis, the *Histoplasma* spp. genomes have 5–7 chromosomes spanning 30.4 Mb up to 39.4Mb and such variation is dictated by different genotypes and geographic origin [22,23].

Molecular epidemiological studies of histoplasmosis have been scarce in the USA, even though the disease is prevalent and emergent. To date, all the molecular-based epidemiological studies conducted in the USA (*i*) have used only a few genetic markers, or (*ii*) were obtained only from patients in Missouri and Louisiana, which represents only a portion of the potential range of *Histoplasma* [15,16,19]. In this study, we bridge these gaps by studying 93 *Histoplasma* genomes obtained from a broader geographic range. These isolates were obtained from clinical, veterinary, and environmental sources, which were collected in 19 US states to classify the aetiological agents of American histoplasmosis and species distribution in a broader context. By using data from whole-genome sequence typing as a tool for molecular epidemiology, we argue it is possible to obtain a better understanding of *Histoplasma*'s geographic range and pinpoint which *Histoplasma* genotypes are more likely to be found in each region of the country. Furthermore, this framework allows seeking for clinically-relevant phenotypes between species causing histoplasmosis in the American continent.

Material and methods

Fungal strains, DNA extraction and genome sequencing

Sixty-two environmental, clinical, and veterinary isolates from this study, were received in the Mycotic Diseases Branch Laboratory at the Centers for Disease Control and Prevention for routine fungal identification or as part of ongoing fungal disease surveillance. Upon arrival, isolates were identified by sequencing of the ITS2 region of the rDNA and were stored in 20% glycerol at -70°C . Isolates were grown on brain heart infusion (BHI) agar at 25°C not more than 10 days. Genomic DNA was extracted by using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's recommendations and verified using 0.8% gel electrophoresis. The quantification estimate and purity was measured on a NanoDrop™ 2000c spectrophotometer. All procedures were conducted in a BSL3 laboratory due to the high fungal infectivity of *Histoplasma*'s mycelial phase. All paired-end sequencing libraries were prepped using the Kapa Biosystems kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA) and approximately 1 μg of DNA was used as input material. DNA sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 (100 bp, high output v3 or v4 chemistries) or in an Illumina NextSeq 550 equipment (150bp, high output v2).

SNP calling, phylogeny and population structure

Paired-end reads were trimmed using Trimmomatic V0.32 [24] using the following parameters: SLIDING-WINDOW:10:30, LEADING:28, TRAILING:28 and MINLEN:80 and aligned to the *H. mississippiense* NAM1 reference strain (AAJ100000000.1) using the Burrows–Wheeler Aligner (BWA - v 0.7.17 - [25]). Genomic coverage was assessed using the tinycov script (<https://github.com/cmdoret/tinycov>). Read files from each strain were remapped to its correspondent bam file to identify INDELS and purge unmapped DNA segments utilizing the RealignerTargetCreator and IndelRealigner programs (GATK toolkit v3.3-0 [26]). UnifiedGenotyper was used to identify the SNPs and hard filters were applied for the .vcf files using the following parameters: QD = 2.0, FS_filter = 60.0, MQ_filter = 30.0, MQ_Rank_Sum_filter = -12.5, Read_Pos_Rank_Sum_filter = -8. SNP's with n low coverage (<10X) or low variant allele calls (<90%) or falling within duplicated regions (detected by NUCmer tool [27]) in the reference genome were purged from the final dataset. The whole-genome SNP matrix composed of 93 isolates was used for evolutionary analysis. Maximum Likelihood

(ML) phylogenetic trees were built using IQ-TREE v2.1.1 [28]. Branch support was determined using bootstrap and SH-like approximate-likelihood ratio tests [29, 30]. Population composition was calculated using two approaches: (i) fastSTRUCTURE [31] was used to investigate the number of cryptic populations within *H. mississippiense* + *H. ohiense* or in *H. mississippiense* and *H. ohiense* separately. The best scenario (k) of number of populations was inferred by the maximization of log-likelihood scores simulated using the choosek.py function. (ii) Principal Coordinate Analysis (PCA) implemented in the R package Adegenet v1.3 [32] was used to evaluate the population distribution of the same datasets based on the genetic variation distributed in two coordinates, namely PC1 and PC2. Finally, we studied the amount of genetic diversity in *H. mississippiense* and *H. ohiense* by calculating the average nucleotide diversity (π) within species using the Python script *popgen-Windows.py* available at https://github.com/simonhmartin/genomics_general. The mating-type idiomorph of each isolate was determined by aligning either the *MAT1-1* (EF433757) or *MAT1-2* (EF433756) loci to each corresponding *Histoplasma* genome. The Chi-squared test was employed to assess whether there was a deviation from the expected 50:50 mating-type distribution.

Species distribution modelling

Geographic coordinates from clinical, veterinary and environmental samples from the sequenced genomes were retrieved from records available at the US-CDC and from Sepulveda et al., [16]. To improve the robustness of the niche modelling, we included samples that were genotyped using single or multiple loci as published elsewhere [19,33,34], totalizing 152 entries. Samples with city-level metadata ($n=29$) were included as high confidence geographical locations. Samples containing state-level information ($n=123$) were randomized within that given state using Google Earth Engine [35] through the random-Points function. Samples without any geographical information were excluded for niche modelling analysis. Climate variables used to predict the distribution of the two *Histoplasma* species were obtained from the WorldClim 2 database [36]. These data represent 1970–2000 averages of climatic variables derived from ground-based meteorological measurements. These variables encompass temperature, precipitation, and other ecologically significant environmental conditions for geographic niche occupation.

To predict the distribution of the two *Histoplasma* species, separate species distribution models (SDM) were calculated based on the Maximum Entropy (MaxEnt) algorithm [37]. The MaxEnt models are based on presence-only geographic data. To account

for absences and areas where presences are not accounted for but may be possible, we added a random sampling of 1000 background points to both models. The models were constructed and evaluated using the dismo R package version 1.3–14 [38]. Separate MaxEnt models were run for the distribution of *H. ohiense* and *H. mississippiense*. In both models, climate variables were assessed for collinearity with a pairwise Spearman's correlation test with a threshold of 0.7, followed by leave-one-out Jackknife test among all correlated variables. Model performance was assessed using the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC). To detect areas of niche overlap between the two species of *Histoplasma*, the predicted distributions were overlaid onto a map. A threshold of predicted probability of 0.75 was set to examine areas that have highest probability of high-confidence overlap.

Results

Phylogenetic background of *Histoplasma* strains from the US

We sequenced and deposited 62 *Histoplasma* isolates, with coverages ranging from 15.82X to 102.7X, from 19 U.S. states in the Sequence Read Archive (SRA) under accession numbers (SRR25580010-SRR25580071). A total of 1,360,150 SNPs, covering 903,017 informative sites, were analyzed across 93 genomes, which included the 62 novel isolates, 30 from a previous study [16], and the reference genome NAM1. Notably, Missouri and Georgia had the highest numbers of human isolates ($n=17$ and $n=11$, respectively), Indiana had the most environmental isolates ($n=8$), and Oklahoma recorded a substantial number of pet-derived isolates ($n=15$); see Supplementary Table 1.

Our study revealed that the majority of U.S. isolates belonged to two *Histoplasma* species: *H. mississippiense* (NAM1) and *H. ohiense* (NAM2). Soil-derived strains from both species were identified in Indiana, suggesting the potential for soil-borne infections by these genotypes in the state. Within *H. ohiense*, human-derived strains constituted 65% of the isolates, followed by 21% of environmental isolates, 6% from wild mammals, and 4% from veterinary sources, with 4% having no specified source records. These isolates were distributed across 17 states. In contrast, within *H. mississippiense*, we observed two monophyletic clades, named Clade I and Clade II. Clade I primarily consisted of cat (47.4%) and dog-derived (26.3%) strains, all from Oklahoma, with human-derived (21%) strains in California, Colorado, and Kansas. Environmental strains (5.3%) were confined to Indiana within *H. mississippiense*. Clade II comprised solely of human-derived strains distributed across Arkansas,

Indiana, and Missouri. Additionally, two strains nested within *H. suramericanum* were identified, one from Texas and another from Richmond, California, indicating potential endemicity in the Southern and Western USA. Both cases had unknown travel history.

We next measured the amount of genetic variation within each *Histoplasma* species present in the US. We have found that *H. mississippiense* has a larger nucleotide diversity (π) ($\pi = 0.57\%$) than *H. ohiense* ($\pi = 0.14\%$, Figure 2(A)). We further investigated the population structure of both species using the Structure followed by PCA approaches, aiming to identify potentially cryptic populations. Both Structure (upper panel) and PCA (lower panel) that incorporate the two species show, as expected, two distinct and well-defined clusters: *H. mississippiense* and *H. ohiense* (Figure 2(B), Supplementary Figure 1). Most of the observed genetic variation is explained by PC1 (90.93%) which corresponds to the differentiation between *H. mississippiense* and *H. ohiense*. PC2 explain 0.44% of the total variance. Next, we studied the extent of populations within each species. Structure analyses haven't detected any cryptic population as indicated by Figure 2(C) upper panel and Supplementary Figure 1. Nevertheless, the PCA analysis in Figure 2(C) (lower panel) did identify three subtle clusters. It is important to note that PC1 accounts for only 6.15% of the variance, and PC2 for 4.41%. In contrast, structure analysis did find two discrete populations within *H. mississippiense*, which corresponds to *H. mississippiense* clades I and II (Figure 2(D) upper panel, Supplementary Figure 1), in agreement with phylogenomic analysis (Figure 1). The PCA plots do also discriminate these two populations along the PC1 axis, which explains 17.15% of the total variation within this species (Figure 2(D), lower panel); PC2 explain 9.41% of the total variance. With respect to the mating-type distributions within *H. mississippiense* and *H. ohiense*, different populations and locations do not differ from the expected 50:50 mating-type distribution in sexual recombining species ($p > 0.05$).

Geographic distribution and species modelling of *H. mississippiense* and *H. ohiense*

Histoplasma ohiense isolates are collected broadly in the USA (17 states) while *H. mississippiense* seems to have a smaller distribution (11 states). While *H. ohiense* is prevalent in eastern portion of the country, *H. mississippiense* was found to be predominant in the central and western portions of the USA (Figure 3). The range of the species does overlap. We found both species in Indiana, Missouri, Oklahoma, and California suggesting that these species might co-occur, which could facilitate gene exchange between species. Notably, both species,

H. mississippiense and *H. ohiense*, were collected as environmental samples in Indiana (Figure 3). We used species niche modelling to determine if any environmental factors favoured the occurrence of one or both species. The best performing model for *H. ohiense* had precipitation of driest quarter (36% contribution), mean temperature of warmest quarter (15% contribution), annual precipitation (12% contribution), and minimum temperature of coldest month (10% contribution) as the top climate variables that contributed to model performance (AUC = 0.975). The best-performing model for *H. mississippiense* had mean temperature of coldest quarter (51% contribution), precipitation of coldest quarter (15% contribution), and mean temperature of the warmest quarter (12% contribution) as the top climate variables that contributed to model performance (AUC = 0.883). Environmental modelling also suggested that niche overlap between the two species of *Histoplasma* in North America might be larger than our collections suggest as they might co-occur in Missouri, Arkansas, Louisiana, Mississippi, Alabama, Georgia, Tennessee, Kentucky, North Carolina, South Carolina, Illinois, Indiana, Virginia and Ohio. Figure 4 shows a scenario inferred with 75% probability.

Discussion

Histoplasmosis, an endemic fungal disease in the US, is primarily reported in midwestern, eastern, and central states. However, the comprehensive understanding of its epidemiology in the US remains incomplete due to limited notifiable cases, inadequate diagnostics and awareness in non-endemic regions, and a poorly described ecological niche [12, 39]. Nonetheless, there are indications that the range of *Histoplasma* in North America is larger than currently thought. *Histoplasma* has been collected outside of the commonly recognized endemic areas, usually from soil and guano, suggesting the fungus might occur in its saprotrophic phase across a larger geographic area [40]. Indeed, our environmental mapping suggests that the environmental conditions propitious for the occurrence of both species *Histoplasma* are broader. These results are not surprising as *Histoplasma* can survive in soil temperatures ranging from -18°C to 37°C [1], but they do suggest that a systematic environmental survey is sorely needed to determine what is the disease's prevalence, identify high-risk areas, and better understand the environmental factors influencing its occurrence.

Our results show that *H. ohiense* is more prevalent in the eastern USA while *H. mississippiense* is commonly found in the western region of the USA (Figure 3). Notably, the predicted geographic ranges for the two species in North America are mostly governed by different environmental conditions. Precipitation

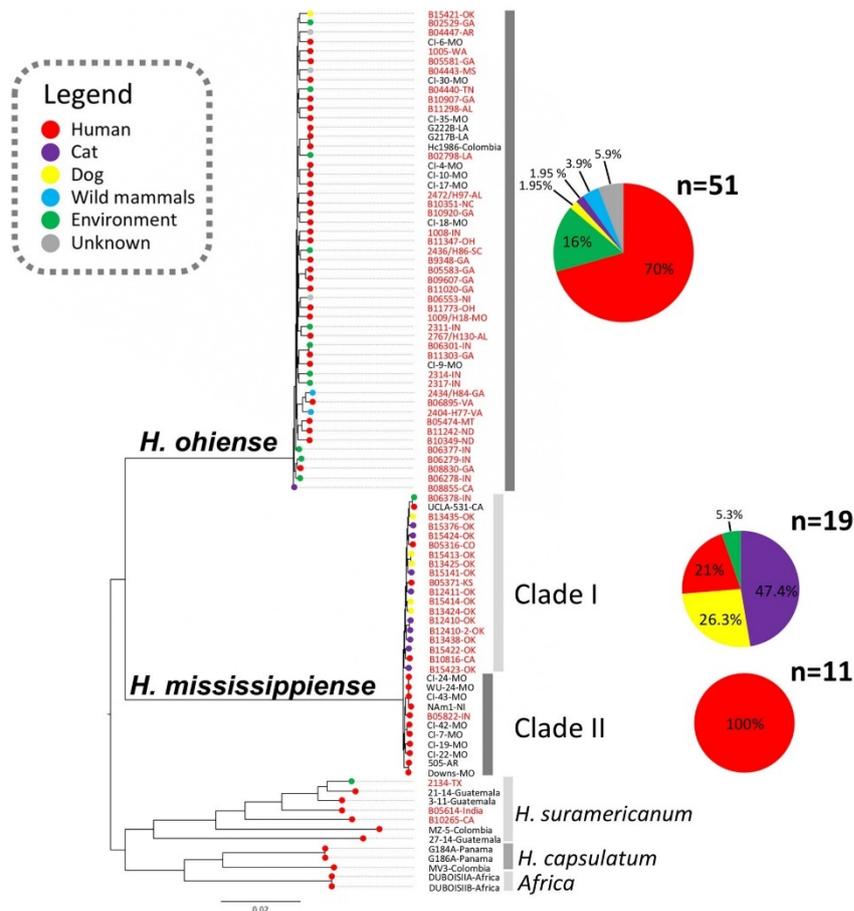


Figure 1. Whole-genome phylogenetic tree of *Histoplasma* isolates collected in the United States. The branches are proportional to the number of mutations and 1000 ultrafast bootstraps and SH-aLRT were used supporting the major branches of the tree. The nodes in the tree represent common ancestors, and the branching points indicate the divergence of lineages. The tips represent each *Histoplasma* isolate and are colour-coded according to its source; the percentage of each source of isolation was plotted in a pie chart. The state or country of isolation were added next to each taxa; two isolates had no information regarding the place of isolation (NI).

of driest quarter and mean temperature of coldest quarter are the most important variables for *H. ohiense* and *H. mississippiense*, respectively. This is in agreement with yeast growth curves performed at 37°C; *H. ohiense* has optimal density growth higher than *H. mississippiense* [21].

Both the phylogenetic and PCA analysis reveal two distinct genotypes within *H. mississippiense*: Clade I and Clade II. Clade I predominantly comprises veterinarian samples recovered mostly in Oklahoma, while clade II consists exclusively of clinical samples recovered mostly in Missouri. Notably, both cats and dogs exhibit higher average body temperatures than humans (38°C–39°C). Consequently, representatives of *H. mississippiense* Clade I may have acquired

unique thermotolerance traits facilitating their survival in pets. However, comprehensive thermotolerance assays, including different genotypes within and between species, are imperative to ascertain whether this clade exhibits genotype-specific thermo-adaptation traits. The clustering of a significant proportion of Clade I strains from dogs and cats prompts an intriguing consideration: Could this clade possess an enhanced adaptation to higher body temperatures typically observed in these animals, which are 1–1.5°C higher than humans? Since the ability to transition to yeast is a key trait in virulence (reviewed in [41]), the influence of temperature on the distribution of these two pathogens deserves a more systematic treatment.

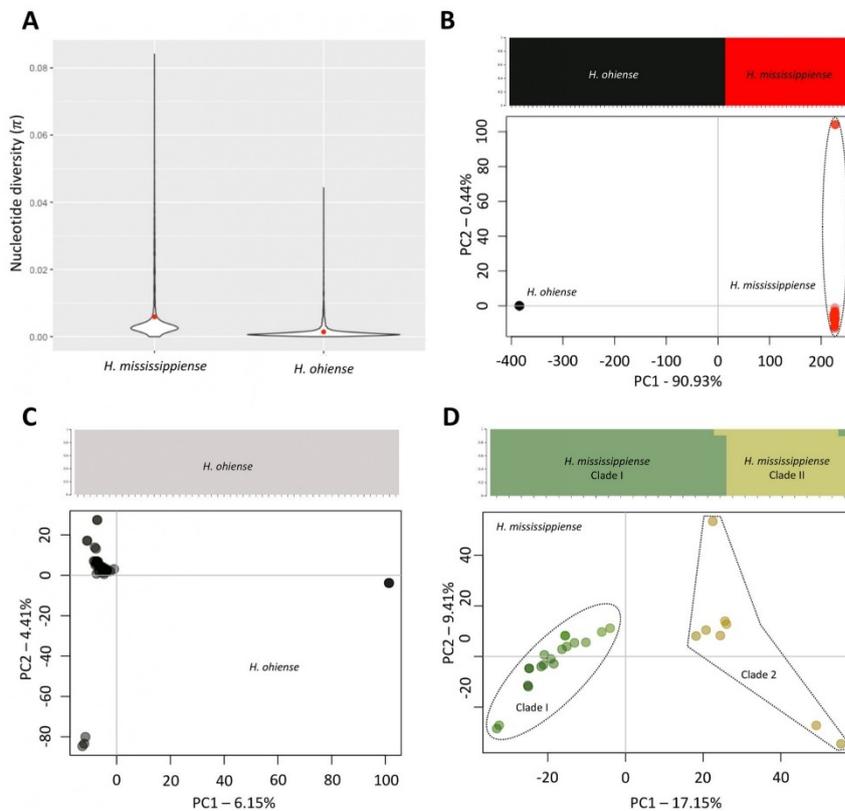


Figure 2. Diversity analysis and population genetic analysis of *Histoplasma* sp. in the USA. (A) Violin plot explaining the genome-wide dispersion of nucleotide diversity in *Histoplasma ohioense* and *H. mississippiense* (π). Red dots represent the average π values within each species. Structure plots and Principal Coordinate Analysis (PCA) suggests different patterns of population structure in *Histoplasma ohioense* and *H. mississippiense* together (B) or *H. ohioense* (C) and *H. mississippiense* (D) separately. Structure analysis revealed the presence or absence of cryptic populations which was inferred by the maximization of log-likelihood scores simulated in the fastSTRUCTURE software and is displayed in the upper panel of each comparisons. Each row represents an individual and the heights and colours of percentage of each population represent the probability of belonging to a given cluster. PCA plots are displayed in the lower panels and depicts the genetic variation distributed in two coordinates, PC1 and PC2, based on polymorphisms and similarities in the genomes of *Histoplasma ohioense* and *H. mississippiense* analyzed together or separately.

A second result from the ENM is that the geographic range of the two species overlaps across the Midwest (Figure 4). This geographic overlap is of importance because the two species have been reported to have exchanged alleles recently [42]. Additionally, our discovery of a balanced distribution of *MAT1-1/MAT1-2* idiomorphs aligns with expectations for sexually recombining species, corroborating earlier findings in *Histoplasma* within the US [43]. This poses the question to whether there is a tension zone in which the two species not only overlap but also hybridize, which in turn might act as a source of variation for each of the two species. Hybridization in fungi seems to be prevalent and has been proposed to be an important evolutionary mechanism that can generate new trait combinations in admixed

individuals. Genomic studies have revealed that indeed introgression is common across fungal species boundaries [20,44,45]. Despite the potential importance of hybridization in fungi, few hybrid zones have been identified [46,47]. A more systematic environmental sampling across the US in *Histoplasma* is needed to determine whether hybridization shows a geographic structure.

An additional finding from our sampling was the two isolates of *H. suramericanum* found in North America. Two potential non-mutually exclusive explanations can illuminate this observation. First, *H. suramericanum* might be endemic in the US. The isolation of a clinical sample from this species in Texas suggests that this species might be endemic to Southern USA but it does not provide evidence for

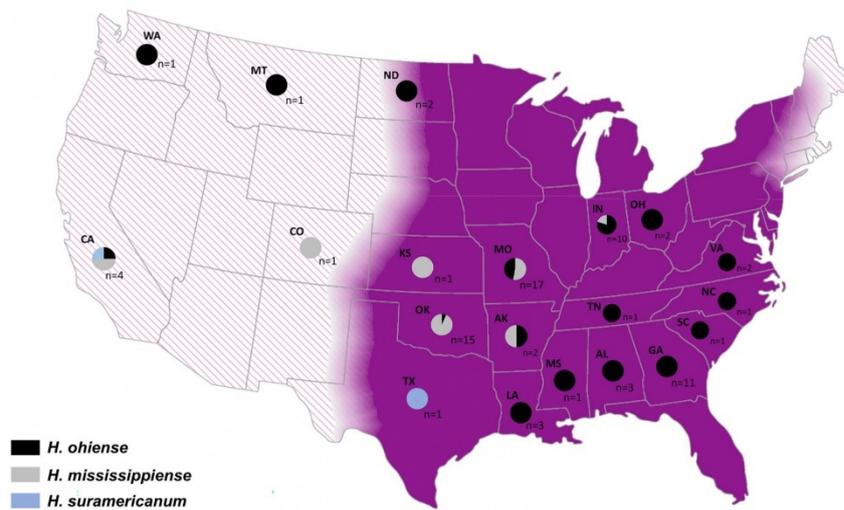


Figure 3. Geographic distribution of *Histoplasma ohioense*, *H. mississippiense* and *H. suramericanum* in the US territory. Eighty two isolates were genotyped using whole genome phylogenetic typing and were plotted as pie charts to each respective state of origin. *Histoplasma ohioense* is represented by black while *H. mississippiense* and *H. suramericanum* are represented by grey and blue colours respectively. Two isolates had no information regarding the location of isolation. The background map is coloured in purple representing the known endemic area of histoplasmosis in the mid-eastern of US; hachure area represents potential endemic areas.

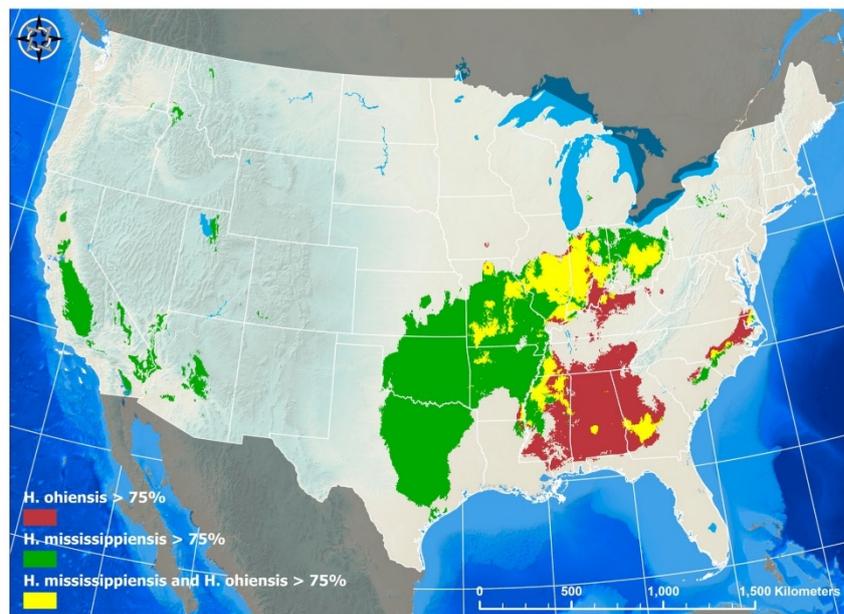


Figure 4. Species Niche Modelling of *Histoplasma ohioense* and *H. mississippiense*. The location of 152 *Histoplasma* typed by whole-genome or other methods were used as presence-only geographic data to generate species distribution models (SDM) based on the Maximum Entropy (MaxEnt) algorithm (25). Separate MaxEnt models were ran for the distribution of *H. ohioense* (red area) and *H. mississippiense* (green area) and performance was assessed using the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC). In order to detect areas of niche overlap between the two species of *Histoplasma*, the predicted distributions were overlaid onto a map (yellow area). A threshold of predicted probability of 0.75 was set to examine areas of that have highest probability of species-specific areas as well as the overlapping areas.

or against the idea that *H. suramericanum* may contribute to autochthonous cases of histoplasmosis in the country. The second possibility is that patients from other locations in the species' range might have migrated to the USA. The isolate B10265 was recovered from a patient from Richmond, California, with unknown travel history, and we can't infer the precise location of infection. It's worth mentioning that the metadata associated with those isolates is old and future work is needed to infer the distribution of *H. suramericanum* in North America. In addition, this species has also been found to be autochthonous in Alberta and Montreal, Canada [17], which in turn suggests it might have a much larger range than previously thought. The areas of overlap of different species of *Histoplasma* seem to be extensive, and even though they might have the opportunity for regular gene exchange, introgression is limited.

One factor that might affect species distribution of the different *Histoplasma* species is the geographic range of their potential hosts [15]. Bats, and birds to a certain extent, are considered to be key for the dispersion of *Histoplasma* [5,15,48,49]. Isolation of *Histoplasma* from over six different species of bats (guano or internal organs), belonging to different genera, suggests that bats are a natural host of the fungus across the Americas [50,51,52], Europe [53], Africa [54] and Asia [55]. Bats are a widely distributed and diverse group [56], posing the question of whether there has been host-fungus coevolution and subsequent specialization. Most of the bat surveys predate genomic and metagenomic surveys. Our study focuses on the importance of abiotic factors to determine the potential niche of two different species of *Histoplasma*. Now that a more complete picture exists of the geographic range of *Histoplasma*, studies assessing the co-occurrence of different species of *Histoplasma* and potential hosts, and even potential competitors (e.g. other species of dimorphic fungi), will make it possible to determine the importance of biotic factors in the geographic range of *Histoplasma*.

Nevertheless, it is imperative to recognize some limitations in our study. The uneven distribution of isolates among states may result in an incomplete representation of the fungus's geographic prevalence. Additionally, a significant proportion of clinical samples lacked documented infection events or travel history due to the antiquity of the samples, leading to data gaps. Moreover, the absence of standardized medical records and reports hampers a comprehensive analysis of differences of histoplasmosis clinical manifestations among the examined clinical strains from both species. The study is based on the analysis of 93 *Histoplasma* isolates, including 62 novel genomes, which may not fully represent the thousands of infections occurring annually in the United States. This limitation also applies to the ecological niche

modelling (ENM) analysis, which relied on a limited number of genotyped isolates. Therefore, comprehensive collections through epidemiological survey studies are essential to address these gaps. Despite the sampling limitations, our study confirmed the presence of the two major genotypes, NAm1 and NAm2, as the primary causative agents of histoplasmosis. We also observed their prevalence in both suggested endemic areas and non-endemic states. Furthermore, *H. mississippiense* exhibited higher genome-wide nucleotide diversity ($\pi = 0.57\%$) than *H. ohiense* ($\pi = 0.14\%$), and the respective PCA plots corroborated this pattern. While the PCA analysis for *H. mississippiense* revealed minor variance, it supported the Structure analysis, indicating two distinct populations within that species: *H. mississippiense* clades I and II. Conversely, *H. ohiense* did not display a similar population structure in the PCA plot, suggesting the need for more isolates to investigate the possibility of new genotypes within this clade.

In this study, we combined whole-genome sequencing, phylogenetics, and species distribution models (SDM) to understand the species distribution of fungal pathogens. Most epidemiological maps are based on pre-1970s data [13]. This study successfully demonstrates the integration of a multifaceted approach, along with epidemiological data, to deduce the distribution of fungal pathogens. For example, a recent study on *Coccidioides* spp. distribution modelling successfully achieved a distribution pattern with defined inputs that correlated with areas of high coccidioidomycosis incidence in the USA [57]. Similarly, emerging areas of histoplasmosis were predicted using a modelling approach [12,58]. By using molecular epidemiology and whole-genome sequence typing, a fuller understanding of the current epidemiological scenario and species diversity causing histoplasmosis in the US is within reach.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by Arizona Department of Health Services [grant number ADHS14-082975]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [grant number 434640/2018-2]; UC Multicampus Research Programs and Initiatives and National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) [grant number 5U19AI166058].

References

- [1] Moreira LM, Meyer W, Chame M, et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in Antarctica.

- Emerg Infect Dis. 2022 Oct;28(10):2100–2104. doi:10.3201/eid2810.220046
- [2] Linder KA, Kauffman CA. Histoplasmosis: epidemiology, diagnosis, and clinical manifestations. *Curr Fungal Infect Rep.* 2019/09/01;13(3):120–128. doi:10.1007/s12281-019-00341-x
 - [3] Emmons CW. Association of bats with histoplasmosis. *Public Health Rep (1896).* 1958 Jul;73(7):590–595. doi:10.2307/4590196
 - [4] Ajello L. Relationship of *Histoplasma Capsulatum* to Avian habitats. *Public Health Rep (1896).* 1964 Mar;79(3):266–270. doi:10.2307/4592099
 - [5] Hoff GL, Bigler WJ. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J Wildl Dis.* 1981 Apr;17(2):191–196. doi:10.7589/0090-3558-17.2.191
 - [6] Sil A. Molecular regulation of *Histoplasma* dimorphism. *Curr Opin Microbiol.* 2019 Dec;52:151–157. doi:10.1016/j.mib.2019.10.011
 - [7] Benedict K, Mody RK. Epidemiology of *Histoplasmosis* outbreaks, United States, 1938–2013. *Emerg Infect Dis.* 2016 Mar;22(3):370–378. doi:10.3201/eid2203.151117
 - [8] Myint T, Leedy N, Villacorta Cari E, et al. HIV-associated *Histoplasmosis*: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl).* 2020;12:113–125. doi:10.2147/HIV.S185631
 - [9] Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, et al. *Histoplasmosis*. *Infect Dis Clin North Am.* 2016 Mar;30(1):207–227. doi:10.1016/j.idc.2015.10.009
 - [10] Mazi PB, Sahrman JM, Olsen MA, et al. The geographic distribution of Dimorphic Mycoses in the United States for the modern era. *Clin Infect Dis.* 2023 Apr 3;76(7):1295–1301. doi:10.1093/cid/ciac882
 - [11] Smith DJ, Williams SL. Endemic Mycoses State Partners G, et al. Surveillance for Coccidioidomycosis, *Histoplasmosis*, and Blastomycosis - United States, 2019. *MMWR Surveill Summ.* 2022 Aug 19;71(7):1–14. doi:10.15585/mmwr.ss7107a1
 - [12] Maiga AW, Deppen S, Scaffidi BK, et al. Mapping *Histoplasma capsulatum* exposure, United States. *Emerg Infect Dis.* 2018 Oct;24(10):1835–1839. doi:10.3201/eid2410.180032
 - [13] McKinsey DS, Pappas PG. *Histoplasmosis*: time to redraw the map and up our game. *Clin Infect Dis.* 2020 Mar 3;70(6):1011–1013. doi:10.1093/cid/ciz327
 - [14] Armstrong PA, Jackson BR, Haselow D, et al. Multistate epidemiology of *Histoplasmosis*, United States, 2011–2014. *Emerg Infect Dis.* 2018 Mar;24(3):425–431. doi:10.3201/eid2403.171258
 - [15] Teixeira Mde M, Patane JS, Taylor ML, et al. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jun;10(6):e0004732. doi:10.1371/journal.pntd.0004732
 - [16] Sepulveda VE, Marquez R, Turissini DA, et al. Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. *MBio.* 2017 Dec 5;8(6):1–23. doi:10.1128/mBio.01339-17
 - [17] Dingle TC, Croxen MA, Fathima S, et al. *Histoplasmosis* acquired in Alberta, Canada: an epidemiological and genomic study. *Lancet Microbe.* 2021 May;2(5):e191–e197. doi:10.1016/S2666-5247(20)30229-9
 - [18] Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2000 Oct;31(1):21–32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
 - [19] Kasuga T, White TJ, Koenig G, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol.* 2003 Dec;12(12):3383–3401. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x
 - [20] Matute DR, Sepulveda VE. Fungal species boundaries in the genomics era. *Fungal Genet Biol.* 2019 Jul 4;131:103249. doi:10.1016/j.fgb.2019.103249
 - [21] Victoria ES, Jonathan R, Jingbaoyi L, et al. Phenotypic characterization of cryptic species in the fungal pathogen *Histoplasma*. *bioRxiv.* 2024:1–37. 2024.01.08.574719. doi:10.1101/2024.01.08.574719
 - [22] Canteros CE, Zuiani MF, Ritacco V, et al. Electrophoresis karyotype and chromosome-length polymorphism of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Latin America. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 Sep 1;45(3):423–428. doi:10.1016/j.femsim.2005.05.015
 - [23] Voorhies M, Cohen S, Shea TP, et al. Chromosome-level genome assembly of a human fungal pathogen reveals synteny among geographically distinct species. *mBio.* 2022 Feb 22;13(1):e0257421. doi:10.1128/mbio.02574-21
 - [24] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014 Aug 1;30(15):2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
 - [25] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
 - [26] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010 Sep;20(9):1297–1303. doi:10.1101/gr.107524.110
 - [27] Delcher AL, Phillippy A, Carlton J, et al. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 1;30(11):2478–2483. doi:10.1093/nar/30.11.2478
 - [28] Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol.* 2020 May 1;37(5):1530–1534. doi:10.1093/molbev/msaa015
 - [29] Minh BQ, Nguyen MA, von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol.* 2013 May;30(5):1188–1195. doi:10.1093/molbev/mst024
 - [30] Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010 May;59(3):307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010
 - [31] Raj A, Stephens M, Pritchard JK. fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics.* 2014 Jun;197(2):573–589. doi:10.1534/genetics.114.164350
 - [32] Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics.* 2011 Nov 1;27(21):3070–3071. doi:10.1093/bioinformatics/btr521
 - [33] Arunmozhi Balajee S, Hurst SF, Chang LS, et al. Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade. *Med Mycol.* 2013 May;51(4):345–351. doi:10.3109/13693786.2012.733430
 - [34] Theodoro RC, Scheel CM, Brandt ME, et al. PRP8 intein in cryptic species of *Histoplasma capsulatum*: evolution and phylogeny. *Infect Genet Evol.* 2013 Aug;18:174–182. doi:10.1016/j.meegid.2013.05.001

- [35] Gorelick N, Hancher M, Dixon M, et al. Google Earth Engine: planetary-scale geospatial analysis for everyone. *Remote Sens Environ.* 2017;12/01;202:18–27. doi:10.1016/j.rse.2017.06.031.
- [36] Fick SE, Hijmans RJ. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol.* 2017/10/01;37(12):4302–4315. doi:10.1002/joc.5086.
- [37] Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Modell.* 2006/01/25;190(3):231–259. doi:10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026.
- [38] Hijmans RJ, Phillips S, Leathwick J, et al. Package ‘dismo’ version 1.3-14 2017. Available from: <https://rdr.io/cran/dismo/>.
- [39] Deepe Jr GS. Outbreaks of histoplasmosis: the spores set sail. *PLoS Pathog.* 2018 Sep;14(9):e1007213. doi:10.1371/journal.ppat.1007213
- [40] Canakis A, Kolachana S, Holden VK, et al. Opportunistic knocks: a gardener with ulcerative colitis and new pulmonary nodules. *Dig Dis Sci.* 2023 Feb;68(2):380–384. doi:10.1007/s10620-022-07785-1
- [41] Valdez AF, Miranda DZ, Guimaraes AJ, et al. Pathogenicity & virulence of *Histoplasma capsulatum* - a multifaceted organism adapted to intracellular environments. *Virulence.* 2022 Dec;13(1):1900–1919. doi:10.1080/21505594.2022.2137987
- [42] Maxwell CS, Sepulveda VE, Turissini DA, et al. Recent admixture between species of the fungal pathogen *Histoplasma*. *Evolution Letters.* 2018/06/01;2(3):210–220. doi:10.1002/evl3.59
- [43] Kwon-Chung KJ, Bartlett MS, Wheat LJ. Distribution of the two mating types among *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from an urban histoplasmosis outbreak. *Sabouraudia.* 1984;22(2):155–157. doi:10.1080/00362178485380231
- [44] Stukenbrock EH. The role of hybridization in the evolution and emergence of new fungal plant pathogens. *Phytopathology.* 2016 Feb;106(2):104–112. doi:10.1094/PHYTO-08-15-0184-RVW
- [45] Steensels J, Gallone B, Verstrepen KJ. Interspecific hybridization as a driver of fungal evolution and adaptation. *Nat Rev Microbiol.* 2021/08/01;19(8):485–500. doi:10.1038/s41579-021-00537-4
- [46] Samarasinghe H, You M, Jenkinson TS, et al. hybridization facilitates adaptive evolution in two major fungal pathogens. *Genes (Basel).* 2020 Jan 16;11(1):1–21. doi:10.3390/genes11010101
- [47] Gabaldon T. Hybridization and the origin of new yeast lineages. *FEMS Yeast Res.* 2020 Aug 1;20(5):1–8. doi:10.1093/femsyr/foaa040
- [48] Gonzalez-Gonzalez AE, Aliouat-Denis CM, Carreto-Binaghi LE, et al. An Hcp100 gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. *Epidemiol Infect.* 2012 Nov;140(11):1955–1963. doi:10.1017/S0950268811002585
- [49] Taylor ML, Reyes-Montes MDR, Estrada-Barcenas DA, et al. Considerations about the geographic distribution of *Histoplasma* species. *Appl Environ Microbiol.* 2022 Apr 12;88(7):e0201021. doi:10.1128/aem.02010-21
- [50] Taylor ML, Chávez-Tapia CB, MR R-M. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet Biol.* 2000/08/01;30(3):207–212. doi:10.1006/fgbi.2000.1219.
- [51] Vite-Garin T, Estrada-Barcenas DA, Gernandt DS, et al. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Tadarida brasiliensis* bats captured in Mexico form a sister group to North American Class 2 Clade. *J Fungi (Basel).* 2021 Jun 30;7(7):1–17. doi:10.3390/jof7070529
- [52] McMurray DN, Russel LH. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. *Am J Trop Med Hyg.* 1982 May;31(3 Pt 1):527–531. doi:10.4269/ajtmh.1982.31.527
- [53] Mulec J, Simčič S, Kotar T, et al. Survey of *Histoplasma capsulatum* in bat guano and status of histoplasmosis in Slovenia, Central Europe. *Int J Speleol.* 2020;49:10. doi:10.5038/1827-806X.49.1.2297
- [54] Gugnani HC, Muotoe-Okafor FA, Kaufman L, et al. A natural focus of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* is a bat cave. *Mycopathologia.* 1994 Sep;127(3):151–157. doi:10.1007/BF01102915
- [55] Gugnani HC, Denning DW. Infection of bats with *Histoplasma* species. *Med Mycol.* 2023 Aug 2;61(8):1–8. doi:10.1093/mmy/myad080
- [56] Teeling EC, Vernes SC, Davalos LM, et al. Bat biology, genomes, and the Bat1 K Project: to generate chromosome-level genomes for all living bat species. *Annu Rev Anim Biosci.* 2018 Feb 15;6:23–46. doi:10.1146/annurev-animal-022516-022811
- [57] Ocampo-Chavira P, Eaton-Gonzalez R, Riquelme M. Of mice and fungi: *Coccidioides* spp. distribution models. *J Fungi (Basel).* 2020 Nov 27;6(4):1–14. doi:10.3390/jof6040320
- [58] Hepler SA, Kaufeld KA, Benedict K, et al. Integrating public health surveillance and environmental data to model presence of *Histoplasma* in the United States. *Epidemiology.* 2022;33(5):654–659. doi:10.1097/EDE.0000000000001499