

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA HISTOPLASMOSIS EN EL ESTADO BOLIVAR, VENEZUELA. CASOS CLÍNICOS, ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA Y SEROLÓGICA DE UNA LOCALIDAD

Gregorio S. VOLCAN G. (1), Gerardo A. GODOY (1), Clemencia E. MEDRANO P. (1), Cesar DÍAZ S. (2) y Luis H. CALDERA (2)

RESUMEN

Se presentan dos casos de histoplasmosis, de los cuales uno pertenece a la forma pulmonar crónica cavitaria y otra, a la diseminada grave. El último caso fué hallazgo de una revisión de autopsia de un niño, efectuada 5 años atrás. Se llevó a cabo una encuesta epidemiológica en la localidad de La Paragua, Estado Bolívar, sitio de nacimiento del segundo, que comprendió tests cutáneos a la histoplasmina en 1.173 personas, estudios de contaminación de suelos, exámenes clínicos y complementarios en sospechosos y estudio serológico de los reactores positivos a la histoplasmina, mediante pruebas de doble inmuno-difusión en agar, utilizándose dos técnicas: Métodos de Ouchterlony y la micro-inmunodifusión en agar-gel. Se demostró por estos estudios, una prevalencia del 54,9% de reactores a la histoplasmina y se pudo detectar un caso de histoplasmosis primaria benigna.

INTRODUCCION

La identificación original de la histoplasmosis está asociada a una protozoosis, el *Kala-Azar*, enfermedad que se confunde con una de las formas clínicas más severas pero infrecuente de aquella, la diseminada grave¹². Entretanto, las dificultades de diagnóstico diferencial se plantean comunemente con la tuberculosis pulmonar, pues es esta localización visceral, el sitio frecuente de la infección micótica^{2,4,10,13,14}.

FURCOLOW en 1970¹⁵, se pronuncia por la superposición de la histoplasmosis y la paracoccidioidomicosis en las cuencas de los grandes ríos de Sur-América, áreas en las cuales se calcula habitan unas 40.000.000 de personas.

En Venezuela, fué señalado el primer caso de histoplasmosis por CAMPINS & SCHARYJ

en 1952⁹, fuera de la hoya hidrográfica principal del Orinoco.

El Estado Bolívar, cuya área abarca un tercio del territorio nacional, el límite norte lo recorre el Orinoco, al cual vierten sus aguas los principales ríos de la región: Caura, Caroní, Paragua y otros. En este Estado, se han efectuado pocos estudios sobre histoplasmosis de los cuales, el primero por PRÍNCIPE & col. en 1958²⁰, informa resultados variables de reactores a la histoplasmina, los cuales fluctuaban desde un 80,0% en El Callao, el más alto del País, hasta el 2,0% en Ciudad Bolívar.

Hasta ahora no tenemos referencias sobre casos autóctonos estudiados o publicados en esta área del territorio. En 1975, identificamos nuestro primer caso de histoplasmosis, forma cavitaria crónica y en el mismo año, en

Este trabajo se ha realizado en parte, con fondos para el Proyecto de Investigación CI-2-09-00022-74/75, subsidiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente.

(1) Departamento de Parasitología y Microbiología

(2) Departamento de Medicina, Escuela de Medicina, Núcleo Bolívar, Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar — Venezuela

una revisión de muertes por Kala-Azar en el Hospital Universitario, se demostró que el material proveniente de un niño de la población de La Paragua, muerto 5 años atrás, correspondía histopatológicamente a una histoplasmosis diseminada. En el primer caso no se pudo establecer el sitio de infección, por cambios de residencia durante el posible inicio de su enfermedad; en el segundo, el niño de 9 meses de edad, había permanecido de por vida en la localidad de su nacimiento, esto último nos alentó a efectuar un estudio en ese lugar que incluyese: muestreos de suelos, reacciones cutáneas a la histoplasmina, estudio serológico de los reactores y exámenes clínicos y complementarios en los sospechosos. Los casos mencionados de pacientes y los resultados de esa encuesta, son el motivo de la presente publicación.

MATERIAL Y METODOS

Casos humanos — a) Se efectuó revisión del material proveniente de la autopsia del paciente R.T., historia clínica N.º 08-25-31. Los fragmentos de órganos habían sido conservados en formol al 10% a temperatura ambiente durante 5 años. Parte del material fue incluido en parafina y sometido a diferentes procesos de coloración: PAS, HE y Grocott. Se obtuvo en los archivos de la sección de Hematología, un frotis de médula ósea tomado durante la hospitalización del paciente; b) P.M., historia clínica N.º 143440. Ingresó al Hospital del Tórax en abril de 1975. Se tomaron muestras de esputo, las cuales fueron procesadas según rutina para descartar hongos patógenos y tuberculosis, parte de ese material fue inoculado en testículos de cobayos.

Histoplasmina usada — Fue obtenida a partir de una cepa de *Histoplasma capsulatum* aislada el 4/10/74, de cultivos en Micobiotic Agar (Lab. Difco, U.S.A.), en los cuales se habían sembrado fragmentos de bazo de ratones blancos, que habían sido inoculados el 24/9/74, con tierra colectada del interior de la Cueva del Guácharo, situada en el Distrito Caripe del Estado Monagas, en las coordenadas geográficas: Long. 0.63° 33' 06", Lat. N. 10° 10' 27" ¹⁰. Las muestras, mantenidas en frío hasta su traslado al laboratorio, provenían de los sitios denominados Salón de Baile y Juan de la Rosa, donde se acumulan en gran canti-

dad, las excretas depositadas por los pájaros (*Steatornis caripensis*) que habitan en la gruta formando una gran colonia, sitios éstos de donde otros Autores ya habían aislado el hongo ¹.

Las muestras fueron suspendidas al 10% en solución fisiológica más 0,05 g de succinato de cloramfenicol (Lab. Parke-Davis, U.S.A.) por ml. Los ratones fueron inoculados por vía intra-peritoneal con 1 ml del sobrenadante y mantenidos en jaulas, donde el agua para beber, contenía 0,33 g por ml de cloramfenicol. El método de preparación de la histoplasmina consistió en: siembra de la cepa en medio de Smith, mantenimiento de los cultivos en la oscuridad a una temperatura de 25°C por 6 meses y filtración, siguiéndose procedimientos establecidos(*) y usándose como preservativo merthiolate al 1:5.000(**).

La padronización para pruebas cutáneas se controló con histoplasmina suministrada por el Prof. Fava Netto de São Paulo, Brasil, con una dilución final de 1:1.000 de la histoplasmina bruta, de manera que las pápulas obtenidas por ambas, se correlacionaran y siendo que una de 5 a más mm en los reactores, era considerada como positiva. El lote usado contenía 1,4 mg de proteína por ml, determinación hecha por el método de LOWY ¹⁹. La posibilidad de efectuar lecturas inespecíficas en los tests cutáneos, que no se debieran a los antígenos micóticos, fue descartada controlando a varios de los reactores positivos, con inoculaciones de medio de Smith y merthiolate en las mismas concentraciones usadas para la histoplasmina y determinando la negatividad de las mismas.

Pruebas cutáneas — Se usó la histoplasmina en la dilución determinada, llevándose a cabo la preparación del material en el momento de efectuar las pruebas. Se usaron jeringas descartables, inyectándose intradermicamente 0,1 ml de histoplasmina en la región anterior del antebrazo. Las lecturas se realizaron a las 48 horas.

(*) U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service. National Institutes of Health. Bethesda 14. Maryland. 1st. Revision, February 11, 1955.

(**) Según recomendaciones del Prof. C. Fava Netto. São Paulo, Brasil

Encuesta epidemiológica — Se llevó a cabo en la localidad de La Paragua, zona agrícola maderera, con una población aproximada de 2.000 habitantes y situada a 190 km al sur de Ciudad Bolívar, sobre la margen izquierda del río Paragua. La región corresponde al bosque seco (Holdridge) o bosque tropófito macrotérmico (Pittier) cuyas características son: pluviosidad media anual de 1.000 a 2.000 mm, temperatura media anual mayor de 24°C y altura entre 0 a 400 mts. ³.

Entre abril y mayo de 1975 se estudiaron 1.173 personas, cuyas edades estaban comprendidas entre los 3 meses y los 74 años. Aproximadamente el 65% de los encuestados tenían menos de 15 años. Se censaron 541 personas del sexo masculino y 632 del femenino.

Muestreo de tierras — Fueron visitadas 4 viviendas y sus alrededores, incluyendo la casa donde se había registrado el caso fatal de histoplasmosis, donde existían condiciones apropiadas para la existencia del hongo: jardines arbolados, tierras conteniendo hojas en descomposición, heces de pájaros, de murciélagos y otros mamíferos. Se tomaron 10 muestras en total, de manera que cada una de ellas fuese representativa de amplias áreas del interior de las casas, gallineros y jardines. Parte de las muestras fue procesada de la manera ya descrita e inoculadas por vía intra-peritoneal en ratones cepa 657/BL, 4 animales para cada muestra. También se inocularon cobayos por vía intratesticular, uno para cada muestra.

El sobrenadante de las muestras fue tratado con penicilina y estreptomocina en la proporción de 20 U y 0,25 mg por ml respectivamente. Volúmenes de 0,20 ml del sobrenadante, se sembraron en placas de agar-sangre, usándose tres placas por muestra.

Todos los animales inoculados el 7/10/75 fueron sacrificados entre las 4 a 6 semanas siguientes. Fragmentos de bazo y de testículos de los que sobrevivieron al periodo de un mes (33 en total), fueron sembrados en tubos con medio inclinado, dos por cada animal.

Encuesta serológica — Fueron obtenidos 159 sueros de personas que habían resultado positivas al test cutáneo de la histoplasmina, 64 de ellas del sexo masculino y 95 del femenino. Los sueros fueron protegidos con mer-

thiolate a una dilución de 1:5.000 y guardados en congelación a una temperatura de -20°C, hasta su uso. La colecta de los mismos se llevó a cabo entre mayo de 1975 y abril de 1976.

Métodos serológicos usados — Todos los sueros fueron sometidos a la prueba de la doble inmunodifusión en agar-gel, para la demostración de las bandas de precipitación M y H¹⁶. Las técnicas usadas fueron el método de Ouchterlony, usando como medio de difusión el modificado por NICHOLS ⁷; la otra técnica fue la Micro Inmunodifusión en Gel de Agar ¹⁷. Los sueros no sufrieron ninguna modificación antes de su uso. El antígeno fue la misma histoplasmina empleada anteriormente, pero en este caso, concentrada por evaporación unas 10 veces. El suero padrón usado como control, provenía del paciente P.M., el cual presentaba las dos bandas de precipitación. La identificación de las bandas se hizo con suero e histoplasmina controles, utilizados en el "Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A.", facilitados gentilmente por el Dr. L. Kaufman.

Exámenes clínicos y complementarios — En 3 pacientes sospechosos de presentar la enfermedad, se efectuaron exámenes clínicos, radiológicos, recuento de plaquetas, proteínograma y estudio de médula ósea.

Los estudios histopatológicos fueron procesados por personal del Departamento de Anatomía Patológica.

RESULTADOS

a) **Resumen de la historia clínica del paciente R.T.** — Admitido el 27/7/70, sexo masculino, edad 9 meses. A los 7 meses, presenta diarrea febril que cede al tratamiento médico. Dos semanas después, reaparece fiebre moderada que se mantiene por 5 días, desde entonces presenta tos húmeda espástica que ocasionalmente provoca vómitos. Al mes siguiente, la madre nota tumoración abdominal progresiva y fiebre acompañada de erupción cutánea.

Examen físico — poliadenopatías cervicales, axilares e inguinales. Hígado a 4 cm del reborde costal derecho y bazo 8 cm por debajo del reborde costal izquierdo. Sangre periférica:

glóbulos rojos 2.600.000; glóbulos blancos 1.850; plaquetas 90.000 por mm cúbico. Proteinograma: proteínas totales 4,90; albúmina 2,42; alfa₁ 0,22; alfa₂ 0,58; beta 0,46 y gammas 1,22 g%. **Informe radiológico:** extensas nodulaciones y moteado diseminado en ambos pulmones. **Diagnóstico:** neumonía focal. En los últimos días presentó deposiciones diarreicas fétidas de color marrón. Autopsia el 10/8/70.

Se observaron cortes histológicos de los siguientes órganos: cerebro, cerebelo, médula espinal, vértebra dorsal, pulmones, hígado, bazo, bazo acesorio, ganglios linfáticos mesentéricos. En dos láminas de médula ósea obtenidas en vida del paciente (Fig. 1) y en la mayoría de los órganos, se pudo demostrar la presencia de *H. capsulatum*, incluyendo las meninges que envuelven la médula espinal.

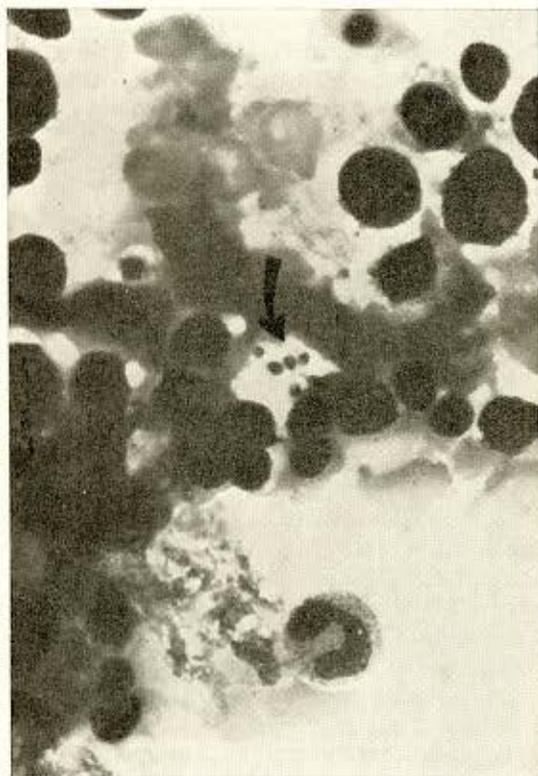


Fig. 1 — Frotis de médula ósea del paciente R.T., coloreado con Giemsa. La flecha señala un grupo de *H. capsulatum* extracelulares. 1.250 X

b) **Hallazgos en el paciente P.M.** — Sexo masculino, 54 años. Natural del Estado Cara-

bobo, sus últimos 25 años han sido de residencia en el Estado Bolívar. Buen estado general, fumador de 50 ó más cigarrillos por día. Disnea a los medianos esfuerzos. Borde inferior del hígado a 4 cm del reborde costal derecho. Sinusitis maxilar bilateral crónica. Las pruebas de sensibilidad cutánea fueron: P.P.D. 18 mm, coccidioidina 5 mm, histoplasmina 8 mm, paracoccidioidina 18 mm. **Hematología:** hemoglobina 9,20 g%; leucocitos 5.500, plaquetas 368.000 por mm cúbico. Proteinograma: albúmina 3,96; alfa, globulina 0,32; alfa₂ 0,91; beta 1,07 y gammas 2,14 g%.

Radiografías pulmonares a su ingreso y posterior a su egreso, se muestran en las Figs. 2 y 3. La doble inmunodifusión del suero con-

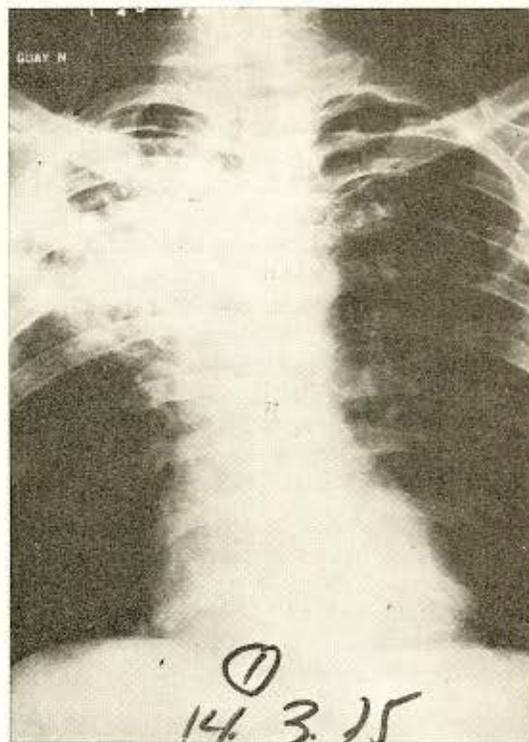


Fig. 2 — P.M. 14-3-75. Infiltrado no homogéneo con múltiples imágenes claras, localizado en 2/3 superiores del hemitórax derecho. Imágenes en «panel de abejas» en campo superior izquierdo.

tra histoplasmina, fué positiva hasta una dilución de 1:32, demostrándose las bandas de precipitación M y H. En cortes histológicos de testículos de cobayos, sacrificados 30 días después de ser inoculados con esputo del pacien-

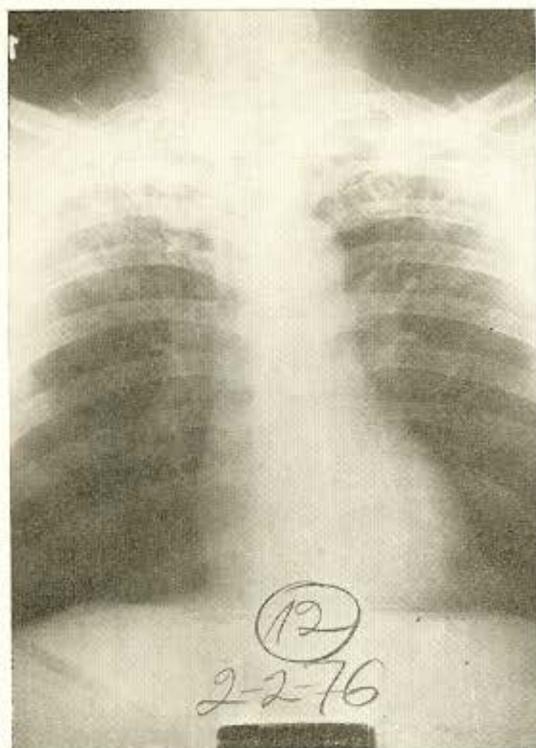


Fig. 3 — P.M. 2-2-76. Mejoría continua, el infiltrado tiende a ser indurativo en ambos vértices, con imágenes claras e imprecisas en los mismos.

te, se demostró la presencia de *H. capsulatum*, e igualmente se obtuvo el aislamiento del hongo, sembrando fragmentos de aquel material. El paciente fue sometido a tratamiento oral con una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim por un año, al cabo del cual se ha mantenido la cura clínica y las imágenes de regresión en los controles radiológicos.

c) **Muestreo de tierras** — No se obtuvo aislamiento de *H. capsulatum* de ninguna de las muestras estudiadas.

d) **Encuesta epidemiológica** — Pruebas cutáneas — De las 1.173 personas (un poco más del 50% de la población de La Paragua), sometidas a pruebas de sensibilidad a la histoplasmina, se obtuvieron 644 reactores positivos, 54,9% del total. En el Quadro I, se agrupan las personas censadas según grupos etarios y el sexo; el menor porcentaje de pruebas positivas se encontró en el grupo de 0-4 años y el mayor en el de 25-29 años, 30,0% y 77,5% respectivamente. En el mismo cuadro se puede ob-

servar que desde la edad de 5 años, el número de personas sensibles a la histoplasmina es elevado, siendo que hay una prevalencia mayor del sexo femenino en relación a los del masculino: de 632 del primero, 370 fueron positivas, lo cual representa un 58,5%; de 541 del sexo masculino, 274 el 50,5%, fueron positivas.

e) **Pruebas serológicas** — Se obtuvieron 159 sueros de personas, tanto del sexo masculino como del femenino, reactoras positivas a la histoplasmina. La mayoría de estos sueros fueron obtenidos posteriormente a los 4 días siguientes a la aplicación de la prueba cutánea; en algunos casos, este periodo se extendió hasta un lapso de 3 meses. Con excepción de 20, los demás sueros no formaron bandas de precipitación con ninguno de los métodos usados. Los sueros positivos (el 12,5% del total), dieron una sola banda de precipitación identificada como banda M.

f) **Pacientes sospechosos** — En un niño de 3 años de edad que presentaba estados catarrales a repetición, prueba cutánea negativa a la tuberculina y una histoplasmina de 12 mm, se le demostraron múltiples adenopatías cervicales y axilares. Un estudio radiológico posterior reveló pequeñas imágenes densas, parahiliares, bilaterales y con tendencia a la calcificación. El estudio serológico demostró la presencia de banda M. Seis meses después, la banda M se mantenía presente y las imágenes radiológicas habían disminuido en número y densidad. Los estudios de biopsia ganglionar mostraron presencia de granulomas en los cuales no se pudo demostrar el hongo. El cuadro presentado por este paciente fue catalogado como una histoplasmosis aguda benigna.

DISCUSION

Las contribuciones al estudio de las micosis profundas han sido muy escasas en esta región del País. BATTISTINI en 1958⁶, describe los primeros casos autóctonos de paracoccidioidomicosis. Encuestas epidemiológicas con paracoccidioidina e histoplasmina han sido indicativas de altos índices de reactores positivos^{5,20}, sin embargo, no hemos sabido de casos clínicos de histoplasmosis publicados. Entretanto, RODRIGUEZ²¹, señala que de 747

CUADRO I

Especificación de los reactores positivos en las personas censadas mediante las pruebas cutáneas a la histoplasmina, en la localidad de la Paragua, Estado Bolívar, según los grupos etarios y el sexo.

Grupos etarios	ambos sexos	Reactores positivos	%	♀	+	%	♂	+	%
0 - 4	270	81	30,00	124	32	25,80	146	49	33,56
5 - 9	305	155	50,81	163	91	55,82	142	64	45,07
10 - 14	188	132	70,21	97	72	74,22	91	60	65,93
15 - 19	98	76	77,55	64	52	81,25	34	24	70,58
20 - 24	59	36	61,01	44	28	63,63	15	8	53,33
25 - 29	58	45	77,58	41	31	75,60	17	14	82,35
30 - 34	37	27	72,97	23	17	73,91	14	10	71,42
35 - 39	30	16	53,33	18	6	33,33	12	10	83,33
40 y más	128	76	59,37	58	41	70,68	70	35	50,00
T o t a l e s	1.173	644	54,90	632	370	58,54	541	274	50,54

VOLCAN G., G. S.; GODOY, G. A.; MEDRANO P., C. E.; DIAZ S., C. & CALDERA, L. H. — Contribución al estudio de la histoplasmosis en el Estado Bolívar, Venezuela. Casos clínicos, encuesta epidemiológica y serológica de una localidad. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19:261-268, 1977.

pruebas cutáneas a la coccidioidina, aplicadas en el lapso de 1971-1974, a pacientes del servicio de neumonología, solo el 6,6% fueron positivas, esto afirma la hipótesis de que las dos micosis pulmonares más importantes de la región, son aquellas dos primeras.

En nuestro trabajo de campo se demuestra que una de cada dos personas de la localidad estudiada ha tenido contacto con *H. capsulatum*; esta relación tiene igual significación en personas del sexo masculino, como del femenino, lo que posiblemente tenga por explicación el hecho de que en estos núcleos rurales, los trabajos agrícolas son efectuados igualmente por personas de ambos sexos. En uno de cada siete habitantes, se tomó sangre para pruebas de inmunodifusión, las muestras fueron obtenidas posteriormente a las pruebas cutáneas con histoplasmina, encontrándose en 20 de ellas, anticuerpos precipitantes identificados como del tipo M. Este hallazgo se corresponde con lo referido en algunas publicaciones, en el sentido de que aproximadamente un 15% de las personas previamente sensibilizadas con antígenos de *Histoplasma*, desarrollan posteriormente anticuerpos precipitantes contra esos mismos antígenos, si estos son usados en pruebas cutáneas^{8,18}. Los resultados que estamos informando proporcionan nuevos datos sobre la histoplasmosis en la región.

S U M M A R Y

Contribution to the study of histoplasmosis in the State Bolívar, Venezuela. Presentation of clinical cases, epidemiologic survey, and serologic data from one locality

Two cases of histoplasmosis are presented. The first presents a chronic, cavitary, pulmonary form. The second, which occurred in a child, presents a disseminated form. This second case was found through a review of autopsy material taken 5 years earlier. An epidemiologic survey was subsequently carried out in the area of La Paragua, State Bolívar, Venezuela, which was the birthplace of the disseminated case. The survey consisted of histoplasmin skin tests in 1,173 persons, soil studies for fungal isolation, clinical examinations of suspected cases, and serologic studies of those persons having positive histoplasmin

skin tests utilizing two double immunodiffusion techniques: the method of Ouchterlony with Nichol's modified medium, and micro-immunodiffusion in agar gel. Of those skin tested 54.9% were found to react positively to histoplasmin, and one case of primary benign histoplasmosis was discovered.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Freddy Mejías, por el asesoramiento en la interpretación del material histopatológico. Al Dr. José Alvarez, Sra. Carmen de Moreno y Sra. Dolores de Martínez, cuya colaboración fue inestimable.

REFERENCIAS

1. AJELLO, L.; BRICENO-MAAZ, T.; CAMPINS, H. & MOORE, J. C. — Isolation of *Histoplasma capsulatum* from an oil Bird (*Steatornis caripensis*) Cave in Venezuela. *Mycopath. et Mycol. Appl.* 12: 199-206, 1960.
2. ANGULO O., A. & CAPECCHI, Y. — Lesiones numulares pulmonares de origen inflamatorio. *Histoplasmosas. Torax* (Caracas, Venezuela) 1:27-34, 1973.
3. ATLAS FORESTAL DE VENEZUELA — Ministerio de Agricultura y Cría. Dirección de Recursos Naturales Renovables. Senda Avila, S. A. Caracas, Venezuela, 1961.
4. BALDO, J. I.; CAMPINS, H. & AYALA P., C. — Histoplasmosis en Venezuela. *Mycopath. et Mycol. Appl.* 15:177-216, 1951.
5. BASTARDO DE ALBORNOZ, M. C. — Aplicación de la técnica de inmunofluorescencia en el diagnóstico de las micosis. Estudio de los anticuerpos precipitantes y de transferencia pasiva, por las pruebas de inmunodifusión, anafilaxia pasiva cutánea (P.C.A.) y otras técnicas. [Tesis doctoral]. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, 1974.
6. BATTISTINI, F. — Datos no publicados, 1976.
7. BRADLEY, G.; PINE, L.; REEVES, M. & MOSS, W. — Purification, Composition, and Serological Characterization of Histoplasmin-H and M Antigens. *Infect. Immun.* 9:870-880, 1974.
8. BUECHNER, H. A. et al. — The current Status of serologic, immunologic, and skin tests in the diagnosis of pulmonary mycoses. *Chest* 63:259-270, 1973.
9. CAMPINS, H. & SCHARYJ, M. — Comprobación de la histoplasmosis en Venezuela. *Gac. Med. Caracas* 61:67-75, 1953.

VOLCAN G., G. S.; GODOY, G. A.; MEDRANO P., C. E.; DÍAZ S., C. & CALDERA, L. H. — Contribución al estudio de la histoplasmosis en el Estado Bolívar, Venezuela. Casos clínicos, encuesta epidemiológica y serológica de una localidad. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19:261-268, 1977.

10. CATASTRO ESPELEOLÓGICO DE VENEZUELA. Sociedad Venezolana de Espeleología. Caracas, Venezuela, 1973, Tomo I, p. 92.
11. CHRISTIE, A. & PETERSON, J. C. — Pulmonary calcification in negative reactors to tuberculin. *Amer. J. Public Health* 35:1131-1147, 1945.
12. EMMONS, C. W.; BINFORD, C. H. & UTZ, J. P. — *Medical Mycology*. Second Edition. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974, Chapter 20, p. 276.
13. FAVA NETTO, C.; SILVA, U. de A. e; CHAMMAS, F. & LACAZ, C. da S. — Histoplasmosis epidémica, Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:222-232, 1967.
14. FURCOLOW, M. L. — Development of calcification in pulmonary lesions associated with sensitivity to Histoplasmin. *Publ. Hlth. Rept.* 64:1363-1393, 1949.
15. FURCOLOW, M. L. — Future Trends in the Mycoses in Latin America. *Proc. International Symposium on Mycoses. Pan-American Health Organization, Scientific Publication* n° 205, 265-268, 1970.
16. HEINER, D. C. — Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics* 22:616-627, 1958.
17. KAUFMAN, L. — Micro Agar-Gel Immunodiffusion Tests. *Manual of Standardized Serodiagnostic Procedures for Systemic Mycoses. Part I.* Department of Research Development and Coordination. Washington D. C., *Pan-American Health Organization*, July 25, 9-14, 1972.
18. KAUFMAN, L. — Serology: Its Value in the Diagnosis of Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, and Histoplasmosis. *Proc. International Symposium on Mycoses. Pan-American Health Organization, Scientific Publication* n° 205, 96-100, 1970.
19. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
20. PRINCIPE M., A.; CONVIT, J. & PIFANO C., F. — Resultados de las encuestas epidemiológicas sobre Histoplasmosis, Coccidioidomicosis y Tuberculosis, realizadas en algunas regiones de Venezuela. *Mycopath. et Mycol. Appl.* 15:11-52, 1951.
21. RODRIGUEZ, S. — Comunicación personal, 1975.

Recebido para publicação em 27/7/1976.