

## Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia

Evaluation of the secondary bacterial infection's influence on the evolution of cutaneous leishmaniasis in Corte de Pedra, Bahia

Luis Angel Vera<sup>1</sup>, João Barberino Santos<sup>1</sup>, Vanize de Oliveira Macêdo<sup>1</sup>, Albino Verçosa de Magalhães<sup>2</sup>, Isolina Allen Ciuffo<sup>3</sup> e Conceição Guerra Santos<sup>3</sup>

**Resumo** Foram avaliados 84 pacientes leishmanióticos com o objetivo de verificar a prevalência de infecção bacteriana secundária das úlceras cutâneas e de estudar sua relação com a cicatrização das lesões. A infecção secundária foi diagnosticada mediante cultura bacteriana aeróbica de amostra de tecido da lesão. Todos os pacientes receberam tratamento antimonial durante 20 dias e fizeram lavagem da úlcera com água e sabão comum. A casuística foi composta principalmente de adolescentes e de adultos dedicados à lavoura, apresentando lesão única. Em 47,6%, as úlceras estudadas estavam localizadas nas pernas e nos pés. Verificou-se infecção secundária em 45/83 (54,2%), sendo mais freqüente nas lesões localizadas abaixo dos joelhos. O *Staphylococcus aureus* predominou (88,9%). A reepitelização completa das úlceras, avaliada em 79 pacientes um mês após o fim do tratamento, não foi influenciada pela infecção secundária.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose tegumentar. Infecção. Bactérias. *Staphylococcus aureus*.

**Abstract** In order to study the prevalence of secondary bacterial infection in ulcerated lesions and its relationship to the healing process, 84 leishmaniotic patients were evaluated. Diagnosis of the secondary infection was made by bacterial aerobic culture of peripheral tissue specimen of the ulcer. All patients received antimonial therapy during 20 days and washed their ulcers with common soap. Cases were composed mainly of adolescent and adult farmer patients with single lesions. The evaluated ulcers were encountered on legs and feet in 47.6%. Secondary bacterial infection was found in 45/83 (54.2%), and was more frequent in lesions located below the knee. *Staphylococcus aureus* predominated (89%). The ulcers' healing process, evaluated in 79 patients one month after finishing treatment, was not influenced by the secondary bacterial infection.

**Key-words:** Tegumentary leishmaniasis. Infection. Bacteria. *Staphylococcus aureus*.

Ainda é desconhecido o papel da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose tegumentar. A persistência de inflamação na leishmaniose experimental (medida pela produção de óxido nítrico e de seus derivados) facilitaria a infecção secundária ou, contrariamente, a infecção secundária participaria na geração da inflamação<sup>6</sup>. Por outro lado, há evidência de que o *S. aureus* e suas exotoxinas, em combinação com IFN-g, são capazes de ativar macrófagos e produzir óxido nítrico com efeito leishmanicida<sup>2</sup>.

Entretanto, não é fácil diferenciar entre colonização e infecção bacteriana de úlceras cutâneas, pois a infecção tem sido definida pela presença de bactérias invasoras de tecidos<sup>9</sup>. As culturas bacteriológicas de amostras obtidas mediante *swab* podem não refletir a infecção dos tecidos mais profundos. A cultura do

aspirado com agulha tem sensibilidade baixa, enquanto a de tecido biopsiado oferece melhores resultados<sup>19</sup>.

Existem poucos relatos sobre a prevalência de bactérias nas úlceras leishmanióticas. No Irã, 35,7% das lesões em 2.202 pacientes com suspeita clínica de leishmaniose cutânea mostraram a presença de bactérias patogênicas, sendo o *S. aureus* a mais isolada<sup>4</sup>. Da mesma forma, no Estado do Maranhão, Brasil, o estudo bacteriológico, feito mediante *swab* das úlceras em 53 pacientes leishmanióticos, evidenciou predomínio de estafilococos<sup>16</sup>.

Contudo, a importância desses achados não tem sido avaliada em profundidade. Este estudo teve como objetivo verificar a influência da infecção bacteriana secundária, diagnosticada mediante métodos confiáveis, na cicatrização das lesões cutâneas leishmanióticas.

1. Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição da Universidade de Brasília. 2. Laboratório de Patologia da Universidade de Brasília, Brasília, DF. 3. Laboratório Central (LACEN) de Salvador, Bahia, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. João Barberino Santos. Núcleo de Medicina Tropical/UNB, Campus Universitário - Asa Norte, Caixa Postal 4517, 70199-970 Brasília, DF

Tel: 55 61 273-5008, Fax: 55 61 273-2811

e-mail: tropical@unb.br

Recebido para publicação em 11/5/2000.

## PACIENTES E MÉTODOS

Estudo descritivo e analítico, de acompanhamento de coortes, realizado em Corte de Pedra, área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA)<sup>5</sup>. A amostra foi constituída de pacientes em demanda espontânea ao centro de saúde local, entre agosto e dezembro de 1998, com quadro clínico de leishmaniose cutânea ulcerada, intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva, após consentimento informado. Os critérios de exclusão foram: gravidez, antecedentes de leishmaniose e de alergia medicamentosa, uso de antimicrobianos sistêmicos nas 48 horas anteriores à admissão (ou de penicilina benzatina nas últimas três semanas), evidência clínica de leishmaniose mucosa ou de doença grave.

A infecção bacteriana secundária foi diagnosticada mediante isolamento de bactérias patogênicas na cultura de amostra de tecido biopsiado da úlcera, e foi considerada aparente diante da presença de sinais inflamatórios perilesionais ou de febre (temperatura axilar > 38°C).

Todos os pacientes receberam tratamento com antimoniatado de meglumina EV, 15-20mg/kg/dia de Sb<sup>v</sup>, durante 20 dias consecutivos, e fizeram lavagem da úlcera cutânea com água e sabão comum duas vezes ao dia, por 15 dias. Apenas os pacientes com infecção secundária aparente receberam trimetoprim/sulfametoxazol VO 160/800mg de 12/12 horas durante 7 dias.

**Acompanhamento.** As avaliações clínicas, incluindo a aferição da área da úlcera<sup>3</sup>, foram feitas nos dias D0, D10, D20 e D50 do início do tratamento antimonial. No caso de lesões múltiplas, somente foi avaliada a úlcera mais antiga, sendo o objetivo final verificar sua reepitelização completa.

Na admissão, de cada paciente, foram realizados:

- IDRM usando 0,1 ml de antígeno equivalente a 25mg de proteína de promastigotas de *L. (L) amazonensis*, cepa MHOM/BR/86/BA125.

- uma biópsia por *punch*, de 4mm de diâmetro, da borda da úlcera cutânea (sem atingir a base da lesão), mediante procedimentos assépticos e após antisepsia com álcool iodado. Metade longitudinal de amostra de tecido foi usada para estudo parasitológico; a outra metade foi usada para cultura de bactérias piogênicas aeróbias.

**Estudo parasitológico.** O esfregaço do tecido biopsiado para exame direto foi feito mediante aposição,

por seis vezes, em uma lâmina de vidro, e corado com Giemsa. Uma porção desta amostra tecidual foi homogenizada e inoculada nas patas posteriores de um hamster, a outra porção foi preservada em formol a 10% para exame histopatológico posterior, mediante coloração HE.

**Exames bacteriológicos.** O fragmento biopsiado foi colocado em tubo de ensaio contendo 5ml de soro fisiológico estéril, conservado e transportado a 4°C para cultivo bacteriológico. Também, após limpeza da úlcera com solução salina estéril, foram coletadas duas amostras da secreção da base da úlcera, mediante *swabs*, para cultivo de bactérias aeróbias: uma amostra foi colocada em tubo de ensaio com 5ml de soro fisiológico estéril, conservada e transportada a 4°C e, a outra amostra foi colocada em meio de Stuart, conservada e transportada à temperatura ambiente. Finalmente, foi coletada outra amostra da secreção, através de *swab*, para exame direto pelo Gram. Todas estas amostras para cultura, transportadas dentro das 24 horas seguintes para o Laboratório Central (LACEN) de Salvador, Bahia, foram inoculadas em meios de TSB, ágar sangue e ágar Mac Conkey, e incubadas a 35°C durante 24 horas. Para identificação dos estreptococos, verificou-se o tipo de hemólise, o sorogrupo de Lancefield, e foi feito o teste da optoquina; os estafilococos foram diferenciados pela produção de coagulase. A identificação final de bactérias Gram negativas foi realizada usando-se os testes bioquímicos convencionais.

Em D20, foi coletada uma amostra de secreção da base da úlcera, mediante *swab*, para cultura de bactérias aeróbias, e transportada dentro das 48 horas seguintes ao LACEN.

As análises estatísticas foram feitas através do Programa Epi Info 6 versão 6.04b (CDC, Estados Unidos/OMS, Suíça), utilizando-se para as variáveis categóricas o teste de Chi-quadrado (X<sup>2</sup>) com correção de Yates ou, o teste exato de Fisher. Para as numéricas contínuas, usou-se a Análise de Variância (ANOVA) ou o teste de Kruskal-Wallis (K-W). Foi fixado um nível de significância de 0,05 e um intervalo de confiança (IC) de 95%.

## RESULTADOS

Foram incluídos 84 pacientes, com intervalo de idade de 4-72 anos, média de 26,3 e preponderância da faixa etária de 10-19 anos. Predominou o sexo masculino (67,9%) sobre o feminino (32,1%). Os lavradores representaram 60,7%. Apenas 21,4% negaram qualquer manipulação prévia das úlceras, embora fossem usados emplastos de plantas, tais como a *Astronium lecointei* Ducke (aroeira), a *Anacardium occidentale* L. (cajeiro) e a *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz). Os pacientes apresentaram uma média de 1,69 lesões

(intervalo de 1-8), sendo que a maioria (69%) apresentou lesão única. A média do número de úlceras por paciente foi 1,61. A localização da úlcera mais antiga foi abaixo dos joelhos em 40 (47,6%), pacientes nos membros superiores em 16 (19%), na cabeça em 11 (13,1%), no tronco em 10 (11,9%), e nas coxas em 7 (8,3%). A área inicial da úlcera teve média de 3,41cm<sup>2</sup>, desvio padrão (DP) de 5,66 e intervalo de 0,06-45,26; o tempo de evolução foi, em média, de 6,86 semanas (DP de 3,30 e intervalo de 2-20). Na úlcera estudada,

foi encontrada secreção em 71 (84,5%), pacientes e evidenciou-se odor fétido em quatro (4,8%). Somente em três (3,6%) houve sinais inflamatórios perilesionais. A temperatura axilar teve média de 36,8°C e intervalo de 35,8-37,9°C. No decorrer das avaliações, foi encontrada linfadenomegalia regional satélite em 86,9%.

A IDRm foi positiva nos 84 pacientes. Somente uma biópsia não foi feita, pela dor local intensa referida pelo paciente. Observou-se a presença de amastigotas no exame histopatológico em 43/83 (51,8%) e, na pesquisa direta, em 16/83 (19,3%). Visualizou-se lesão no hamster em 9 (24%) de 38 animais inoculados. O total de pacientes com diagnóstico de leishmaniose confirmado foi 54 (64,3%).

**Exames bacteriológicos mediante swab nos 84 pacientes.** Os resultados do exame direto mostraram apenas cocos gram positivos em 57,1%, cocos gram positivos e bacilos gram negativos em 23,8%, e ausência de bactérias em 19%. As culturas à admissão do paciente mostraram bactérias gram positivas em 46,5%, gram negativas em 17,9%, flora mista em 19%, saprófitas em 7,2%, e resultado negativo em 9,6%. O *Staphylococcus aureus* foi a bactéria mais freqüentemente (59,5%) isolada. A concordância entre os resultados positivos e negativos do exame direto e da cultura foi 73,8%. As culturas de controle em D20, em 77 dos 84 pacientes, mostraram bactérias gram positivas em 53,3%, saprófitas em 16,9%, gram negativas em 11,7%, flora mista em 2,6% e resultado negativo em 15,6%. A concordância entre os resultados das culturas obtidas antes e ao fim do tratamento foi 28,6%.

**Exame bacteriológico mediante biópsia.** Houve, também, predomínio de bactérias gram positivas (Tabela 1). Comparando-se os resultados da cultura de tecido biopsiado com os da cultura do

material obtido mediante *swab* à admissão, observou-se concordância em 50%.

À admissão, segundo o teste de K-W, houve falta de associação entre a área da úlcera e o tempo de evolução ( $p=0,336$ ) ou a presença de infecção secundária ( $p=0,674$ ). No entanto, houve associação entre as úlceras de maior tamanho e o uso local de algum tipo de planta ( $p=0,003$ ) ou a localização da lesão abaixo dos joelhos ( $p=0,001$ ).

Para a análise final em D50, foram retirados os três pacientes com infecção secundária aparente (incluindo a paciente sem biópsia); outros dois foram excluídos: um por apresentar hipersensibilidade cutânea generalizada ao antimonial, o outro por solicitação expressa.

Então, em 79 pacientes foi feita a avaliação da relação entre a reepitelização completa das lesões e as variáveis que poderiam ter influência nesse processo de cicatrização (idade dos pacientes; uso de plantas prévio à admissão; número, tamanho, localização e duração das lesões; dose e irregularidade do tratamento antimonial), encontrando significância estatística somente para duas variáveis: as úlceras que não reepitelizaram tiveram maior tamanho [para área > 1,99cm<sup>2</sup> o Risco Relativo (RR) = 4,82; IC=1,78-13,06] ou estavam localizadas abaixo dos joelhos (RR=4,02; IC=1,63-9,90).

Os pacientes, divididos em infectados e não infectados, mostraram-se comparáveis em quase todas as variáveis avaliadas, existindo diferença apenas quanto à localização da lesão (Tabela 2). A análise estratificada de Mantel-Haenszel mostrou também que não houve associação entre a infecção secundária e a falha na reepitelização completa da úlcera, dependente da sua localização: RR global = 0,92 (IC=0,44-1,92); RR combinado = 0,65 (IC=0,34-1,26),  $p=0,350$ .

Tabela 1- Resultado da cultura bacteriológica de amostra de tecido biopsiado da úlcera em 83 pacientes.

Bactérias isoladas	Nº pacientes	% Grupal
Bactérias gram positivas	36	43,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	
<i>S. aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	1	
Flora mista	4	4,8
<i>S. aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	
<i>S. aureus</i> e <i>Proteus mirabilis</i>	1	
<i>S. aureus</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i>	1	
Bactérias Gram negativas	5	6,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	
<i>Citrobacter koseri</i>	1	
Saprófitas	7	8,4
<i>Micrococcus sp.</i>	1	
Estafilococos coagulase (-)	6	
Nenhuma	31	37,3

Tabela 2- Análise comparativa final entre os 43 pacientes infectados e os 36 não infectados.

Variáveis	Infectados	Não infectados	Teste	p valor
Idade dos pacientes em anos	25,1 (16,29)*	25,9 (13,94)*	K-W	0,647
Sexo masculino	72,1%	66,7%	X <sup>2</sup> (Yates)	0,782
Lesão única	65,1%	69,4%	X <sup>2</sup> (Yates)	0,867
Duração da lesão em semanas	7,4 (3,49)*	6,3 (3,07)*	K-W	0,104
Área inicial da úlcera em cm <sup>2</sup>	2,9 (3,55)*	3,7 (7,60)*	K-W	0,779
Lesão localizada abaixo dos joelhos	55,8%	30,6%	X <sup>2</sup> (Yates)	0,043(p<0,05)
Uso prévio de plantas	53,5%	33,3%	X <sup>2</sup> (Yates)	0,117
Dose do Antimonial (mg/Kg/d)	18,4 (2,67)*	19,4 (2,27)*	ANOVA	0,073
Irregularidade do tratamento EV	7,0%	16,7%	Fisher	0,287
Reepitelização completa da lesão	74,4%	72,2%	X <sup>2</sup> (Yates)	0,972

\*média (DP)

## DISCUSSÃO

As características epidemiológicas e clínicas dos pacientes avaliados são representativas da população atingida pela LTA na região do estudo<sup>8 10 18</sup>. A análise dos resultados corrobora que o tamanho da úlcera leishmaniótica não está influenciado pela infecção secundária<sup>14</sup>, nem pela duração da lesão<sup>18</sup>. São outras variáveis, como a virulência do parasito ou a localização da picada do vetor, que determinam essa característica e explicam porque as úlceras localizadas abaixo dos joelhos têm maior tendência a crescer, fenômeno já observado anteriormente<sup>7</sup>. A associação entre o uso local de plantas e tamanho aumentado da úlcera pode ser atribuído à atitude do paciente diante da percepção da severidade da doença.

O achado freqüente do complexo leishmaniótico cutâneo-ganglionar foi proporcionado pelas múltiplas avaliações clínicas do acompanhamento. Em Corte de Pedra, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido isolada dos gânglios linfáticos regionais satélites, com sensibilidade de até 58,6%<sup>17</sup>.

Quanto às culturas bacteriológicas feitas mediante swab, o freqüente isolamento de bactérias aeróbias (patógenas e saprófitas), teve concordância com estudos feitos no Equador (97,6%)<sup>1</sup> e no Maranhão (86,8%)<sup>16</sup>. Neste último, os estafilococos foram também as bactérias mais freqüentes (41%)<sup>16</sup>; no Irã, a porcentagem de isolamento do *S. aureus* nas lesões com confirmação parasitológica foi maior (87%)<sup>4</sup>. As culturas de controle feitas em D20 mostraram grande mudança nos resultados, correlacionando-se com os achados em outros tipos de úlceras cutâneas crônicas, conseqüente à natureza transitória dessas bactérias<sup>20</sup>.

No cultivo bacteriológico do material biopsiado, houve freqüente isolamento de bactérias patógenas, com claro predomínio do *S. aureus*, sendo concordante com os resultados das culturas obtidas mediante swab, em somente metade dos casos. Estudos semelhantes, realizados em pacientes com pé diabético mostraram, também, baixa concordância entre os resultados obtidos mediante swab e de amostras de tecidos profundos<sup>19</sup>. Os dados apresentados demonstram que existe invasão

tecidual local de bactérias em pelo menos metade dos pacientes estudados. Isto explica porque as medidas de assepsia e antissepsia, que procuram eliminar a contaminação das úlceras leishmanióticas, não conseguem diminuir as taxas de contaminação bacteriana das culturas parasitológicas<sup>13</sup>.

A presença ou não de reepitelização completa ao final da avaliação não esteve associada a variáveis como idade, número e duração das lesões ou tratamento local prévio à admissão. A idade do paciente e o número de lesões não parecem influenciar o processo de cicatrização das lesões<sup>12</sup>. A evidência mostrada de que a duração das lesões não constitui um fator influente na cicatrização, concorda com o encontrado previamente<sup>15</sup>. Por outro lado, as lesões menores reepitelizaram completamente com maior freqüência do que as maiores, fenômeno já demonstrado por outros pesquisadores<sup>10 12 15</sup>. Da mesma forma, a reepitelização completa se produziu com maior freqüência em lesões localizadas acima dos joelhos, independentemente do tamanho da úlcera. É reconhecida a cura demorada das lesões localizadas nas pernas<sup>11 12</sup>.

Confirmou-se que as lesões localizadas abaixo dos joelhos são as mais freqüentemente infectadas. A falta de associação entre a infecção bacteriana secundária e as variáveis como idade, sexo, tamanho inicial, duração e número total de lesões é análoga à ausência de correlação importante entre o isolamento de fungos e o tamanho ou a duração das lesões<sup>14</sup>.

Finalmente, não foi observada influência da infecção bacteriana secundária, restrita à úlcera, no processo de reepitelização completa das lesões leishmanióticas cutâneas, um mês após tratamento convencional, concordando com a hipótese de outro pesquisador<sup>12</sup>. Em outros tipos de úlceras, como as de origem venosa localizadas nas pernas, não foi observada relação entre a presença de bactérias (com predomínio do *S. aureus*) e o processo de cura<sup>20</sup>. Em úlceras de decúbito, não houve evidência de que o *S. aureus* retarde a cicatrização, ao contrário do que acontece com a *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Proteus*, as quais parecem influir negativamente nesse processo<sup>3</sup>.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Aída Goes, diretora do LACEN; ao Dr. Edgard Carvalho e ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, pelo fornecimento do antígeno para a IDRМ; ao Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa, pela revisão do trabalho; ao Sr. Ednaldo Lima do Lago e a todo o pessoal do Centro de Saúde de Corte de Pedra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coronel VV, Martini L, Alava JJ, Garcia NT, Gomez EA, Hashiguchi Y. Bacterial flora in suspected *Leishmania* ulcers of patients from an endemic focus on the Pacific coast of Ecuador. *In: Hashiguchi Y (ed) Studies on New World leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador. Research Report Series No. 3, Kyowa Printing & Co, Kochi, p. 125-126, 1992.*
2. Cunha FQ, Moss DW, Leal LMCC, Moncada S, Liew FY. Induction of macrophage parasitocidal activity by *Staphylococcus aureus* and exotoxins through the nitric oxide synthesis pathway. *Immunology 78: 563-567, 1993.*
3. Daltrey DC, Rhodes B, Chattwood JG. Investigation into the microbial flora of healing and non-healing decubitus ulcers. *Journal of Clinical Pathology 34: 701-705, 1981.*
4. Edrissian GH, Mohammadi M, Kanani A, Afshar A, Hafezi R, Ghorbani M, Gharagozloo AR. Bacterial infections in suspected cutaneous leishmaniasis lesions. *Bulletin of the World Health Organization 68: 473-477, 1990.*
5. França F, Lago EL, Tada S, Costa JML, Vale K, Oliveira J, Costa MA, Osaki M, Cheever L, Netto EM, Barreto AC, Johnson WD, Marsden PD. An outbreak of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 86: 169-174, 1991.*
6. Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Von Zuben FJ, Yamada A, Augusto O. *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infection and Immunity 66: 807-814, 1998.*
7. Herwaldt BL, Arana BA, Navin TR. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The Journal of Infectious Diseases 165: 518-527, 1992.*
8. Jones TC, Johnson Jr WD, Barreto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, França TF, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases 156: 73-83, 1987.*
9. Kanj LF, Wilking SVB, Phillips TJ. Pressure ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology 38: 517-536, 1998.*
10. Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Lago EL, Barreto AC, Cuba CC, Johnson WD. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil. An area of *Leishmania braziliensis* transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 17: 169-177, 1984.*
11. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 80: 859-876, 1986.*
12. Merchan-Hamann E. Ensaio terapêutico com quatro esquemas de antimonial no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília. Brasília, DF, 1989.
13. Navin TR, Arana FE, Mérida AM, Arana BA, Castillo AL, Silvers DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 42: 36-42, 1990.*
14. Nishimoto K, Almeida R, Coronel VV, Nonaka S, Hashiguchi Y. Fungi isolated from suspected *Leishmania* ulcers of patients from an endemic focus on the Pacific coast of Ecuador. *In: Hashiguchi Y (ed) Studies on New World leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador. Research Report Series No. 3, Kyowa Printing & Co, Kochi, p. 127-128, 1992.*
15. Oster CN, Chulay JD, Hendricks LD, Pamplin CL, Ballou WR, Berman JD, Takafuji ET, Tramont EC, Canfield CJ. American cutaneous leishmaniasis: a comparison of three sodium stibogluconate treatment schedules. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34: 856-860, 1985.*
16. Pereira ALN, Cella WP, Oliveira EG, Moreira IV, Filho SAR, Gonçalves EGR, Costa JML. Infecção secundária em leishmaniose tegumentar americana: perfil bacteriano e sensibilidade a antibióticos. *In: Resumos do XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Guarapari p. 223, 1999.*
17. Romero GAS, Sampaio RNR, Macêdo VO. Sensibilidade da cultura do aspirado de linfonodo na leishmaniose cutânea localizada (LCL) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis (L.V.b.)*. *In: Resumos do XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Guarapari p. 31, 1999.*
18. Sánchez-Salomé GL. Imunoterapia e quimioterapia da leishmaniose cutânea localizada: ensaio clínico controlado. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília. Brasília, DF, 1995.
19. Sapico FL, Canawati HN, Witte JL, Montgomerie JZ, Wagner JrFW, Bessman AN. Quantitative aerobic and anaerobic bacteriology of infected diabetic feet. *Journal of Clinical Microbiology 12: 413-420, 1980.*
20. Skene AI, Smith JM, Doré CJ, Charlett A, Lewis JD. Venous leg ulcers: a prognostic index to predict time to healing. *British Medical Journal 305: 1119-1121, 1992.*