

## Ectoparasitos em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) cativos no semiárido do Rio Grande do Norte<sup>1</sup>

Josivania S. Pereira<sup>2\*</sup>, Leonardo C.A. Carvalho<sup>2</sup>, Benito Soto-Blanco<sup>2</sup>, Moacir F. Oliveira<sup>2</sup> e Sílvia M.M. Ahid<sup>2</sup>

**ABSTRACT-** Pereira J.S., Carvalho L.C.A., Soto-Blanco B., Oliveira M.F. & Ahid S.M.M. 2012. [Ectoparasites in guinea pigs (*Galea spixii* Wagler, 1831) in captivity in the semiarid region of Rio Grande do Norte, Brazil.] Ectoparasitos em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) cativos no semiárido do Rio Grande do Norte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(8):789-793. Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Avenida Francisco Mota 572, Bairro Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: [josigej@ufersa.edu.br](mailto:josigej@ufersa.edu.br)

Wild rodents in captivity can be attacked by ectoparasites which affect their health. This study aimed to identify the natural ectofauna of the guinea pig *Galea spixii* Wagler, 1831 in captivity in the semiarid region of Rio Grande do Norte and to study the behavioral dynamics of the most prevalent ectoparasitism. Specimens (n=40) of *G. spixii* in captivity in the Center for Wild Animal Multiplication (*Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido*) were anesthetized from March to October 2010 and examined searching for ectoparasites. The guinea pigs presented *Amblyomma* sp. (Koch, 1844), *Demodex* sp. (Owen, 1843) and *Gliricola quadrisetosa* (Ewing, 1924). The frequency of data of *G. quadrisetosa*, the most prevalent species in the study, showed that the mean of lice collected in the different body parts was higher in females (p=0,0498). The climatic period did not influence the frequency of *G. quadrisetosa* collected from the animals (p>0.05). *Demodex* sp. was the first record of ectofauna identified in *G. spixii* in semiarid conditions in Brazil. The data indicate that the body surface area and the climatic period did not influence the infra-population of *Gliricola quadrisetosa* found in *Galea spixii*.

INDEX TERMS: *Galea spixii*, *Amblyomma* sp., *Demodex* sp., *Gliricola quadrisetosa*.

**RESUMO.-** Os roedores silvestres quando criados em cativeiro podem ser acometidos por ectoparasitos que afetam a sua sanidade. Este trabalho objetivou identificar a ectofauna natural do preá *Galea spixii* criado nas condições de cativeiro no semiárido do Rio Grande do Norte e estudar o comportamento da dinâmica comportamental do ectoparasitismo mais prevalente. Utilizou-se 40 espécimes de *G. spixii* cativos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Os exemplares foram anestesiados e examinados para busca de ectoparasitos, durante os meses de março a outubro de 2010. Os preás estudados apresentaram *Amblyomma* sp.,

*Demodex* sp. e *Gliricola quadrisetosa*. Os dados de frequência de *G. quadrisetosa*, espécie de maior prevalência, revelaram que a média de piolhos recuperados nas distintas áreas corporais, foi maior para exemplares fêmeas (p=0,0498). O período climático não influenciou na frequência de *G. quadrisetosa* recuperada dos animais (p>0,05). Da ectofauna identificada em *G. spixii*, notifica-se *Demodex* sp. como primeiro registro neste roedor nas condições semiáridas do Brasil. Os dados sugerem que a área corporal e o período não interferiram na infra população de *Gliricola quadrisetosa* encontrada em *Galea spixii*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Galea spixii*, *Amblyomma* sp., *Demodex* sp., *Gliricola quadrisetosa*.

<sup>1</sup> Recebido em 20 de agosto de 2011.

Aceito para publicação em 4 de maio de 2012.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Avenida Francisco Mota 572, Bairro Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [josigej@ufersa.edu.br](mailto:josigej@ufersa.edu.br)

### INTRODUÇÃO

Os pequenos mamíferos constituem um grupo ecológico economicamente importante, tanto do ponto de vista da abundância e diversidade de espécies, quanto por serem

encontrados como componentes fundamentais em quase todos os ecossistemas terrestres. Nos últimos anos, tem-se notado um aumento na criação desses animais considerados fonte de proteína natural, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do nosso planeta (Reis et al. 2008).

Muitos desses animais, principalmente mamíferos roedores, são criados em cativeiros não apenas com o objetivo de fornecer alimento, mas para manter a espécie em seus habitats naturais, procurando uma alternativa para sua conservação e assim proporcionar o desenvolvimento de pesquisas voltadas ao conhecimento mais aprofundado destes organismos (Lacerda et al. 2006).

O preá, *Galea spixii* Wagler, 1831, é um pequeno roedor encontrado em todos os estados da região Nordeste do Brasil, e também em Minas Gerais e Mato Grosso (Moojen 1952). Pertence à subordem Hystricognathi, família Caviidae e subfamília Caviinae. É um animal silvestre cujas características são: ausência de cauda, superfície dorsal acinzentada e ventral branca, com manchas infraoculares e pós-auriculares brancas e morfologicamente semelhantes às demais espécies da subfamília Caviinae (Lacher 1981).

Quando em cativeiro, os preás são acometidos por doenças de natureza infecciosa ou parasitária. Os mesmos atuam como fontes de infecção para insetos vetores de endoparasitos (Barbosa 2005, Barbosa et al. 2008). A espécie *G. spixii* pode sofrer ação de ectoparasitos, dentre eles, pulgas, carrapatos, ácaros e piolhos. Estes interferem na saúde e bem-estar deste cavídeo por ocasionar prurido intenso, alopecia e crostas cutâneas na pele, predispondo a infecção bacteriana secundária (Ahid et al. 2009).

Considerando os ectoparasitos como um dos principais problemas que afetam a sanidade de roedores, unido a escassez de dados na literatura relacionados à biologia e ectoparasitismo dos mesmos, teve-se como objetivo a identificação da ectofauna natural de *G. spixii* mantido em regime de cativeiro, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil e o estudo da dinâmica comportamental do ectoparasitismo mais prevalente.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados machos adultos de *Galea spixii* (N=40) (Fig.1A), cativos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizada em Mossoró, Rio Grande do Norte (05°11'15"S e 37°20'39"W), sob autorização nº 1478912 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Estes hospedeiros foram identificados através da morfologia e com base em bibliografia específica consultada para roedores.

Os cavídeos, individualmente, foram submetidos a procedimentos de coleta, cuja metodologia utilizada, seguiu as normas de ética com o uso de animais e foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animais em pesquisa da UFERSA sob parecer nº 23091.000335/2011-12.

Os ectoparasitos foram coletados dos animais em dois períodos distintos: de chuva, representado pelos meses de março a abril de 2010, com respectiva temperatura média do ar em torno de 27,94°C; e precipitação pluviométrica 168,05mm; e de seca, onde considerou-se os meses de setembro a outubro de 2010, os quais apresentaram temperatura média do ar de 28,14°C; e precipitação pluviométrica de 7,9mm, respectivamente.

Para remoção dos ectoparasitos, os espécimes de *G. spixii* foram contidos quimicamente (Xilazina 10% e Cetamina 5%, nas doses respectivas de 3mg/kg e 15mg/kg). Individualmente, toda a superfície corporal foi inspecionada. Quando detectado carrapatos, estes eram coletados por giro sobre o seu eixo para evitar a perda de estruturas do gnatossoma.

Realizou-se raspados cutâneos da área posterior dorsal e inferior da mandíbula dos preás, bem como obtenção de cerúmen dos dois pavilhões auriculares com auxílio de swabs. O material resultante destes procedimentos foi transferido para lâmina, clareado em solução de hidróxido de potássio a 10%, por tempo médio de 3 horas e analisado através de microscopia óptica (aumento de 10x, 40x e 100x).

Para o penteamento com pente fino das áreas corporais dorsal e lateral utilizou-se as delimitações segundo Bittencourt et al. (2002). O material obtido da escovação era colocado em placas de Petri contendo álcool a 70% e levado ao estereomicroscópio para análise.

Posteriormente cada cavídeo foi banhado em água adicionada de detergente neutro (10%), por tempo médio de um minuto. Em seguida, a solução do banho contendo sujidades provenientes do corpo do animal foi tamisada para coleta dos ectoparasitos. Estes últimos foram processados no Laboratório de Parasitologia Animal da UFERSA.

Os espécimes recuperados foram identificados através de chaves dicotômicas segundo Werneck (1936, 1942), Aragão & Fonseca (1961) e Barros-Battesti et al. (2006), com auxílio da microscopia óptica e estereomicroscopia.

Os dados obtidos foram apresentados na forma de média simples e erro-padrão. A comparação estatística foi realizada por meio do Teste t, para os dados paramétricos, e Teste de Mann-Whitney, para os dados não paramétricos. O nível de significância foi estabelecido como  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com auxílio do programa BioEstat 5.0.

## RESULTADOS

Todos os ectoparasitos recuperados dos animais experimentais foram identificados como *Amblyomma* sp. (Koch 1844), *Demodex* sp. e *Gliricola quadrisetosa* (Ewing 1924).

Da inspeção realizada nos preás, observou-se que nove (22,5%) apresentaram parasitismo por larvas de *Amblyomma* sp. na região do pavilhão auricular e periocular, identificadas segundo as características morfológicas: sulco anal posterior ao ânus, olhos presentes e de palpos mais longos do que largos, com o segundo artículo mais do que duas vezes o comprimento do terceiro.

Dos espécimes submetidos ao raspado cutâneo da área dorsal, um (2,5%) apresentou positividade para ácaros do gênero *Demodex* sp. Para os raspados cutâneos da área inferior da mandíbula e swabs dos pavilhões auriculares, verificou-se positividade para este Demodecidae em 14 (35%) e um (2,5%) dos cavídeos analisados, respectivamente.

Os ácaros *Demodex* sp. foram observados em diferentes estádios evolutivos e identificados pelo corpo vermiforme, abdome alongado, estriado transversalmente e adultos com quatro pares de patas rudimentares. Nas fêmeas o orifício genital é ventral, em fenda longitudinal e situado ao nível da coxa IV (Fig.1B).

No procedimento de penteamento das áreas dorsal e lateral dos roedores, observou-se que todos apresentaram infestação por Phthiraptera, especificamente, *Glirico-*

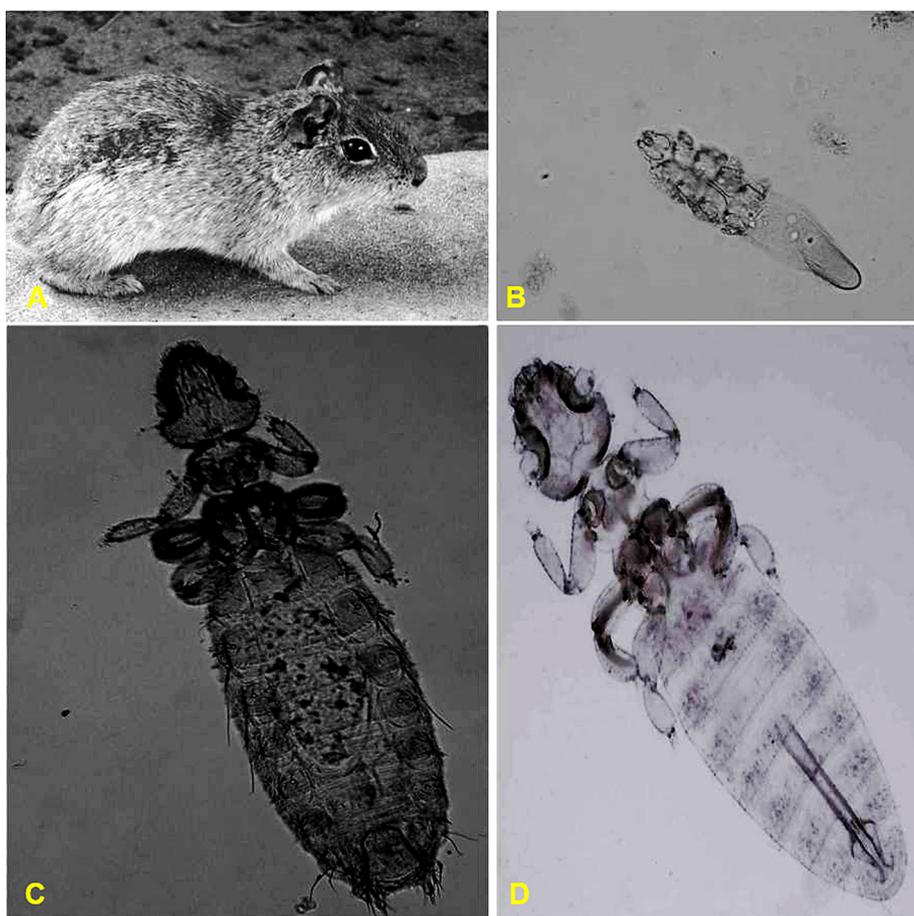


Fig.1. (A) Exemplar de *Galea spixii* nas condições de estudo. (B) *Demodex* sp., vista ventral da fêmea, 40x. *Gliricola quadrisetosa* em vista ventral: (C) fêmea, 10x, (D) macho, 10x.

*la quadrisetosa*. As amostras resultantes do banho estavam igualmente positivas para esta espécie. Deste último, recuperou-se 8.153 exemplares de *G. quadrisetosa*.

Este Amblycera recuperado de *G. spixii* foi identificado segundo as seguintes características taxonômicas: protórax arredondado; meso e metatórax reunidos, formando um só segmento, o pterotórax; abdome com margens posteriores dotadas de fileiras regulares de cerdas pequenas, além destas cerdas curtas, acha-se outras longas, em menor número, dispostas irregularmente e abdome com cinco pares de estigmas respiratórios (Fig.1C).

A confirmação dos espécimes fêmeas de *G. quadrisetosa* foi dada pela presença de um par de longas cerdas no 2º e 3º pleuritos abdominais, característica marcante e única desta espécie, e genitália formada de gonopodos grandes e salientes na extremidade posterior do abdômen (Fig.1C). Os machos, pela ausência das longas cerdas nos pleuritos mencionados e por possuir genitália composta de placa basal longa, cuja extremidade posterior apresenta dois grandes ramos terminais (externo e interno) fortemente encurvados para fora (Fig.1D).

Através do penteamento das áreas dorsal e lateral dos 40 animais experimentais obteve-se 13.629 piolhos da espécie *G. quadrisetosa*. Ao correlacionar a frequência deste Amblycera em relação à área corporal, observou-se que não existe diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre à média do número de piolhos adultos relacionada com a

média de ninfas obtidas do dorso dos mesmos. Dados similares foram registrados ao comparar à média do número de piolhos adultos com a média de ninfas na área corporal lateral dos preás (Quadro 1).

Não houve diferença estatística significativa ao relacionar a média de piolhos do sexo fêmea em relação a macho, coletados do dorso e lateral dos cavêdeos (Quadro 1). Diferença estatística significativa ( $p = 0,0498$ ) foi registrada quando comparado a média de exemplares fêmeas em relação aos machos, nas mesmas regiões corporais (dorso + lateral) (Fig.2)

**Quadro 1. Médias e erros padrão de *Gliricola quadrisetosa*, em relação à área corporal de *Galea spixii* (n=40)**

Área corpórea	Fase de vida	n	Média ± EP	CV	Valor p
Dorso	Ninfa	4.057	101,42 ± 14,63	91,15	0,2092
	Adultos	2.938	73,45 ± 8,70	74,95	
	Macho	1.250	31,25 ± 3,71	75,15	
	Fêmea	1.688	42,20 ± 5,16	77,36	
	Total	6.995	174,87 ± 22,64	81,85	
Lateral	Ninfa	4.203	105,07 ± 17,15	103,1	0,1764
	Adultos	2.431	60,77 ± 6,80	70,75	
	Macho	1.079	26,97 ± 3,32	77,92	
	Fêmea	1.352	33,80 ± 3,67	68,71	
	Total	6.634	165,85 ± 22,59	86,09	

EP = Erro padrão, CV = Coeficiente de variação. \* Significa diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

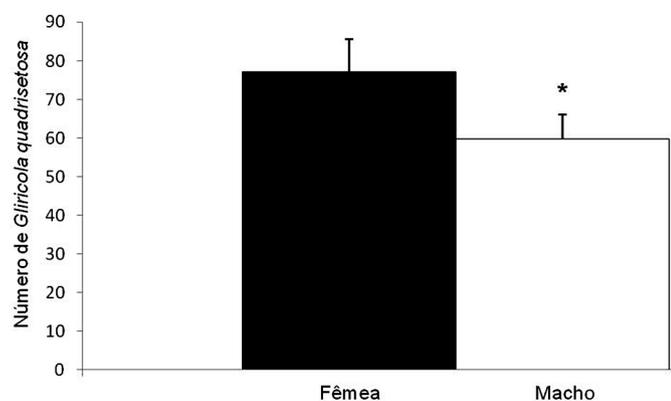


Fig.2. *Gliricola quadrisetosa* fêmea e macho recuperados das áreas corporais dorsal e lateral de *Galea spixii* (N=40). O asterisco significa a diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Quando se correlacionou a frequência de *G. quadrisetosa* em relação ao período climático, observou-se não haver diferença estatística entre a média de piolhos coletados nas distintas áreas corporais e nos períodos estudados (Quadro 2).

Ao relacionar a média de piolhos coletados na área corporal dorsal dos animais nos dois períodos climáticos, observou-se que esses dados não apresentaram diferença estatística significativa. O mesmo foi considerado para a região lateral (Quadro 2).

Ao correlacionar a média de piolhos adultos recuperados no dorso e lateral dos animais e no período de chuva, em relação a média obtida no período de seca, não foi observado diferença estatística significativa entre as mesmas. Dados similares foi registrado ao considerar a fase de ninfa destes ectoparasitos (Quadro 2).

**Quadro 2. Médias e erros padrão de *Gliricola quadrisetosa*, segundo área corporal de *Galea spixii* (n=20), submetidos a diferentes condições climáticas**

Área corporal	Fase de vida	Período climático				Valor p
		Chuva		Seca		
		Média + EP	CV	Média ± EP	CV	
Dorso	Ninfa	81,90±11,58	63,21	120,95±26,52	98,04	0,5792
	Adulto	69,55 ± 1,57	74,36	77,35 ± 13,69	79,10	0,4516
	Total	151,45±22,37	66,05	198,30±39,63	89,36	0,6750
Lateral	Ninfa	81,50 ± 16,92	92,81	128,65±29,36	102,0	0,3040
	Adulto	59,55 ± 11,08	83,22	62,00 ± 8,34	60,15	0,5609
	Total	141,05±27,31	86,58	190,65±36,71	86,08	0,2850

EP = Erro padrão, CV = Coeficiente de variação. \* Significa diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Da ectofauna identificada no cavídeos estudados notificou-se *Demodex* sp. como primeiro registro de um Demodecidae acometendo regiões corporais (pavilhão auricular; dorso e parte inferior da mandíbula) da espécie *Galea spixii* criado em condições de cativeiro, no Brasil.

O parasitismo por *Demodex* sp. em roedores não ocorre apenas nas áreas corporais estudadas no presente trabalho, mas em outras regiões, dentre elas: superfícies da genitália, focinho, dorso da cabeça (Nutting 1961), glândulas prepucial, clitoral (Bukva 1985) e membros posteriores (Schönfelder et al. 2010).

Os dados do presente estudo referente ao parasitismo no pavilhão auricular para *Demodex* sp. reforçam os achados de Bukva (1995), que observou este mesmo ácaro em roedores da espécie *Rattus norvegicus*, no sul da Bohemia, República Checa, e Bukva (1994) que confirmou este Demodecidae em *Apodemus agrarius*, na Slovakia.

Na região dorso-sacral de roedores foi igualmente notificada a presença de *Demodex* sp. por Hasegawa (1995) no Japão em *Mesocricetus auratus* e por Bukva (1995) na República Checa, em *R. Norvegicus*.

A cerca do parasitismo por larvas de *Amblyomma* sp. em *G. spixii*, os dados do presente trabalho corrobora com o observado por Carvalho et al. (2010) e reforçam os achados de Nava et al. (2008), Nava et al. (2006) que observaram em roedores infestação por este Ixodidae na fase larvar.

Infestação por *Gliricola quadrisetosa* em *Galea spixii* foi anteriormente descrita por Werneck (1942) e recentemente por Ahid et al. (2009). Apesar de a presente pesquisa mostrar o parasitismo apenas para este Amblycera, Werneck (1942) relata outro Phthiraptera, mas especificamente *Heterogyropus heteronychus*, como piolho mastigador específico deste cavídeo.

Werneck (1942) relatou que *G. quadrisetosa* é um Amblycera que parasita especificamente o roedor *G. spixii*, o que diverge do observado por Werneck (1936) que verificou a ocorrência desta espécie em outros cavídeos, dentre eles: *Cavia porcellus* e *Cavia aperea*.

Os dados do presente estudo revelaram que no roedor estudado não existe preferência por superfície corporal para a ectofauna de Phthiraptera identificada, divergindo de Bittencourt & Rocha (2002), cuja ectofauna encontrada em roedores, especificamente *Proechimys iheringi* Thomas, 1911 (Echymyidae), no Brasil, em especial o gênero *Gliricola* apresentou preferência por algumas áreas específica do corpo do hospedeiro, dentre elas o dorso e pescoço.

## CONCLUSÕES

Os ectoparasitos naturais identificados em *Galea spixii* criado em condições de cativeiro em Mossoró, Rio Grande do Norte, foram: *Amblyomma* sp., *Demodex* sp. e *Gliricola quadrisetosa*.

*Gliricola quadrisetosa*, ectoparasito de maior prevalência, parasitou *G. spixii* submetidos às condições do presente trabalho, independentemente da área corporal.

O período climático não influenciou na infra população de *Gliricola quadrisetosa* recuperada em *G. spixii*.

## REFERÊNCIAS

- Ahid S.M.M., Moura G.H.F., Filgueira K.D. & Oliveira M.F. 2009. Parasitismo por Phthiraptera em preás (*Galea spixii spixii*) cativos no semiárido do nordeste brasileiro. 2º Encontro Internacional da Conservação, Recife, PE. (Resumo)
- Aragão H. & Fonseca F. 1961. Notas de Ixodologia. VIII. Chave para famílias e para gêneros e espécies do Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2:121-129.
- Barbosa P.B.B.M. 2005. Efeito sobre a participação de roedores na cadeia de transmissão de *Leishmania infantum* (Protozoa: Trypanosomatidae) no Rio Grande do Norte. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 85p.
- Barbosa P.B.B.M., Queiroz P.V.S., Jerônimo S.M.B. & Ximenes M.F.F.M. 2008.

- Experimental infection parameters in *Galea spixii* (Rodentia: Caviidae) with *Leishmania infantum chagasi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103:545-548.
- Barros-Battesti D.M., Arzua M. & Bechara G.H. 2006. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Instituto Butantan, São Paulo. 223p.
- Bittencourt E.B. & Rocha C.F.D. 2002. Spatial use of rodents (Rodentia: Mammalia) host bodysurface by ectoparasites. Braz. J. Biol. 62:419-425.
- Bukva V. 1985. *Demodex flagellurus* sp. n. (Acari: Demodicidae) from the preputial and clitoral glands of the house mouse, *Mus musculus* L. Folia Parasitol., Praha, 32:73-81.
- Bukva V. 1994. *Demodex agrarii* sp. n. (Acari: Demodecidae) from cerumen and the sebaceous glands in the ears of the striped field mouse, *Apodemus agrarius* (Rodentia). Folia Parasitol., Praha, 41:305-311.
- Bukva V. 1995. *Demodex* species (Acari: Demodecidae) parasitizing the brown rat, *Rattus norvegicus* (Rodentia): redescription of *Demodex ratti* and description of *D. norvegicus* sp.n. and *D. ratticola* sp.n. Folia Parasitol., Praha, 42:149-160.
- Carvalho L.C.A., Pereira J.S., Sousa M.L.R., Oliveira M.F. & Ahid S.M.M. 2010. Ocorrência de Ixodidae e Argasidae em *Galea spixii spixii* (Wagler, 1831), em Mossoró, Rio Grande do Norte. 6<sup>o</sup> Congresso Nordestino de Produção Animal, Mossoró, RN. (Resumo)
- Hasegawa T. 1995. A case report of the management of demodicosis in the golden hamster. J. Vet. Med. Sci. 57:337-338.
- Lacerda P.M.O., Moura C.E.B., Miglino M.A., Oliveira M.F. & Albuquerque J.F.G. 2006. Origem do plexo lombossacral de mocó (*Kerodon rupestris*). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 43:620-628.
- Lacher Jr T.E. 1981. The comparative social behavior of *Kerodon rupestris* and *Galea spixii* and the evolution of behavior in the Caviidae. Bull. Carnegie Museum Nat. Hist. 17:1-71.
- Moojen J. 1952. Os Roedores do Brasil. Série A II. Biblioteca Científica Brasileira, Instituto Nacional do Livro, Ministério de Educação e da Saúde, Rio de Janeiro.
- Nava S., Mangold A.J. & Guglielmone A.A. 2006. The natural hosts of larvae and nymphs of *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 140:124-132.
- Nava S., Mangold A.J. & Guglielmone A.A. 2008. Aspects of the life cycle of *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae) under natural conditions. Vet. Parasitol. 156:270-276.
- Nutting W.B. 1961. *Demodex aurati* sp. nov. and *D. criceti*, ectoparasites of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Parasitol. 51:515-522.
- Reis F.S., Barros M.C., Fraga E.C., Penha T.A., Teixeira W.C., Santos A.C.G. & Guerra R.M.S.N.N. 2008. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, Estado do Maranhão, Brasil. Revta Bras. Parasitol. Vet. 17:69-74.
- Schönfelder J., Henneveld K., Schönfelder A., Hein J. & Müller R. 2010. Concurrent infestation of *Demodex caviae* and *Chirodiscoides caviae* in a guinea pig. Tierärztl. Praxis, Kleintiere, 38:28-30.
- Werneck F.L. 1936. Contribuição ao conhecimento dos Mallophagos encontrados nos mamíferos sul-americanos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 31:391-589.
- Werneck F.L. 1942. Sobre algumas espécies do gênero *Gliricola* (Mallophaga). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 37:297-319.