

FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA PELAGEM DE COELHOS E PORQUINHOS-DA-ÍNDIA CLINICAMENTE SAUDÁVEIS NA CIDADE DE SALVADOR / BAHIA, BRASIL

(Filamentous fungi isolated from the coat of clinically healthy rabbits and guinea pigs in the city of Salvador, Bahia, Brazil)

Guilherme Teixeira Souza RIBEIRO*; Larissa de Carvalho RAHIM; Fernanda Fonseca da SILVA; Laura Helena Coutinho Araújo SANTANA; Janis Cumming HOHLENWERGER; Simone Campos Martins FREITAS

Universidade de Salvador (UNIFACS). Campus Prof. Barros, Torre Sul. Av. Luís Viana Filho, 3100, Paralela, Salvador/BA. CEP: 41.720-200.*E-mail: itsguilhermeribeiro@gmail.com

RESUMO

Fungos zoonóticos associados aos tecidos dos animais domésticos são potenciais riscos à saúde pública. O objetivo deste trabalho é identificar os principais fungos filamentosos associados ao pelo de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) clinicamente saudáveis da cidade de Salvador, Bahia, Brasil. As amostras de pelo foram coletadas de 18 porquinhos-da-índia e 6 coelhos domiciliados, de juvenis à adultos e oriundos de diferentes residências. As coletas foram decorrentes da região dorsal, ventral e caudal a pina da orelha, por meio da técnica de arrancamento do pelo manualmente. O cultivo foi realizado em meio Dermatobac[®] de acordo com a rotina laboratorial. Os fungos isolados nos porquinhos-da-índia foram o *Tricophyton mentagrophytes* (66,6%), o *Aspergillus* spp. (44,4%), o *Penicillium* spp. (5,5%), o *Mucor* spp. (5,5%) e o *Litcheimia* (5,5%); e em coelhos *Tricophyton mentagrophytes* (50%), *Curvularia* spp. (50%), *Penicillium* spp. (11,1%) e *Aspergillus* spp. (11,1%). Todos os fungos observados possuem potencial zoonótico, o que deve ser considerado como critério de avaliação à saúde pública e para criação por contactantes imunocomprometidos.

Palavras-chaves: dermatomicoses, saúde pública, zoonose.

ABSTRACT

Zoonotic fungi associated with tissues of domestic animals are potential risks to public health. The objective of this work was to identify the main filamentous fungi associated with the hair of clinically healthy rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*) in the city of Salvador, Bahia, Brazil. The hair samples were collected from 18 guinea pigs and 6 domiciled rabbits, from juveniles to adults and from different homes. Samples were collected from the dorsal, ventral and caudal of the ear tip, using the technique of manual plucking. Cultivation was performed in Dermatobac[®] medium according to the laboratory routine. The fungi isolated from guinea pigs were *Tricophyton mentagrophytes* (66.6%), *Aspergillus* spp. (44.4%), *Penicillium* spp. (5.5%), *Mucor* spp. (5.5%) and *Litcheimia* (5.5%); and in rabbits *Tricophyton mentagrophytes* (50%), *Curvularia* spp. (50%), *Penicillium* spp. (11.1%) and *Aspergillus* spp. (11.1%). All fungi isolated have zoonotic potential, which should be considered as a criterion for assessing public health and for breeding by immunocompromised contacts.

Key words: dermatomycoses, public health, zoonosis.

INTRODUÇÃO

Os cães e gatos são os principais animais que integram as famílias multiespécies (IRVINE e CILIA, 2017). A partir desta hipótese, Song e colaboradores (2013) buscaram avaliar o impacto da microbiota dessas espécies sobre contactantes humanos e encontraram indivíduos que compartilhavam um mesmo microbioma da pele e intestino com seus animais. Novas espécies têm sido integradas às famílias multiespécies, dentre elas coelhos e porquinhos-da-índia, isto denota a importância de assegurar a sua criação como animais de companhia.

Em mamíferos sadios, foram isoladas diversas espécies de fungos, como *Malassezia spp.*, *Alternaria spp.*, *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* (HOFFMAN, 2017; CABAÑES *et al.*, 2011), que são relatadas como agentes de morbidades dermatológicas, respiratórias e neurológicas em pacientes imunossuprimidos (MOHAMMED *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2011), o que ressalta esses microrganismos como promotores de moléstias à saúde pública.

A microbiota fúngica dos animais domésticos pode albergar agentes potencialmente zoonóticos (CAMPBELL *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2005). Os microrganismos presentes na epiderme desses animais estão em interface com o ambiente e contactantes, e, mesmo em indivíduos saudáveis, a sua avaliação é importante para prevenção de doenças (MORIELLO *et al.*, 2017; IVASKIENE *et al.*, 2009).

Chermrapai *et al.* (2019) sugerem que diferentes fatores influenciam a composição fúngica da pele e do pelo, como o ambiente, o estado de saúde do animal e contactantes. Não obstante desses resultados, outro estudo identificou uma divergência de espécies fúngicas isoladas da epiderme de animais e humanos em diferentes residências, o que fomenta a ideia de que microambientes, dentro de uma mesma região, interferem na composição dos microbiomas da pele e anexos (SONG *et al.*, 2013).

No Brasil, existe uma escassez de trabalhos que busquem descrever os fungos filamentosos associados à densa pelagem de coelhos e porquinhos-da-índia, animais que têm sido frequentemente domiciliados, o que revela uma importante lacuna de informação no que tange a transmissão e infecção de fungos zoonóticos a partir dessas espécies. Visto essa carência de informações, o objetivo deste trabalho foi descrever os principais fungos filamentosos associados à pelagem de coelhos e porquinhos-da-índia clinicamente saudáveis da cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais e condições ambientais

Os tutores responsáveis pelos animais assinaram um termo de livre consentimento e estavam cientes das etapas da pesquisa, bem como concordaram com a utilização dos seus animais. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com protocolo nº 35/2019.

As amostras de pelo foram decorrentes de 6 coelhos e 18 porquinhos-da-índia clinicamente saudáveis, domiciliados e de diferentes residências. Todos os animais domiciliam na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. Dos porquinhos-da-índia, 10 eram fêmeas e 8 machos, sendo 2 indivíduos juvenis e o restante adultos. Dos coelhos, 3 eram fêmeas e 3 machos, todos adultos. Esses animais viviam em contato com outros da mesma espécie e com cães, além dos seus tutores. As condições ambientais desses animais eram de chão coberto com papelão, como forma de substrato.

Avaliação clínica dos animais

Os indivíduos foram submetidos à anamnese, ao exame clínico geral e ao teste de fluorescência, com utilização da lâmpada de *wood*, foram excluídos aqueles que apresentaram

alterações nessas avaliações, para avaliar o potencial zoonótico dos animais clinicamente saudáveis.

Coleta das amostras

As amostras decorreram da técnica de arrancamento do pelo da região dorsal, ventral e caudal a pina da orelha, e foram armazenadas em pote coletor estéril e conduzidas ao laboratório da Universidade Salvador (UNIFACS) para cultivo em meio Dermatobac[®] (Probac, São Paulo), onde permaneceram na estufa para crescimento fúngico à temperatura de 25 a 27 °C, por 21 dias, com avaliações realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Descrição do meio de cultivo

O meio de cultivo Dermatobac[®] consiste em um tubo formado pelos meios Agar D.T.M. na face larga da lâmina, Agar Sabouraud Glicose Seletivo (meio amarelo claro) e Agar BIGGY na face dividida da lâmina (meio branco). Esse cultivo é seletivo, portanto, impede o crescimento de bactérias e dificulta a proliferação de fungos saprofíticos. O Agar DTM favorece o crescimento de dermatófitos, que por sua vez alcalinizam o meio, modificando a coloração de amarelo para vermelho, dentro de 72 horas, isso acontece em decorrência da presença de medidores de pH. O Agar Sabouraud Glicose Seletivo permite o crescimento de dermatófitos e algumas leveduras e o meio BIGGY apresenta uma maior seletividade para o crescimento de leveduras.

Análise de crescimento fúngico e identificação por microscopia

No período de 21 dias, com intervalos semanais, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram monitoradas, a fim de avaliar o crescimento fúngico. A fase de identificação foi realizada por meio das características macroscópicas das colônias e visualização em microscopia óptica em objetiva de 400x e 1000x, coradas com azul de lactofenol (D'OVIEDO *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2008).

Análise Estatística

Foi realizada uma tabela de dados pelo software Excel[®], onde foi feita a análise de frequência dos fungos identificados nas amostras de pelo dos coelhos e porquinhos-da-índia, de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dermatoses fúngicas em humanos são comumente relatadas, como consequência do contato com animais portadores de microrganismos zoonóticos, como o *Sporotrichx schenckii* (BOVE-SEVILLA *et al.*, 2008), o *Malassezia pachydermatis* (HOFFMAN, 2017; CABAÑES *et al.*, 2011) e o *Microsporum canis* (PASQUETI *et al.*, 2017). Estudos mostraram que pacientes com infecções no sistema respiratório e neurológico, causadas por agentes fúngicos, apresentavam maiores índices de mortalidade (MOHAMMED *et al.*, 2015). Essa relação interespecies pode ser um risco à vida de contactantes imunossuprimidos (NORITOMI *et al.*, 2005).

A partir do isolamento dos fungos, foi possível montar uma tabela com os agentes micóticos mais frequentes nas amostras dos coelhos e porquinhos da índia (Tab. 01).

Tabela 01: Ocorrência dos fungos filamentosos cultivados de acordo com o percentual de isolamento.

	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Curvularia spp.</i>	<i>Penicilium spp.</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>Litcheimia spp.</i>
Coelhos	3 (50%)	2 (33,3%)	3 (50%)	2 (33,3%)	0	0
Porcos da índia	12 (66,6%)	8 (44,4%)	0	1 (5,5%)	1 (5,5%)	1 (5,5%)

Referente aos fungos dermatomicóticos, o *Tricophyton mentagrophytes* foi a única espécie de dermatófito isolada nos coelhos e porquinhos-da-índia. Estudo realizado por Kraemer *et al.* (2012) apontou o *T. mentagrophytes* como principal causador de dermatofitose nessas espécies. Esses autores identificaram que os animais jovens eram mais susceptíveis ao isolamento e à infecção por esse fungo. Por outro lado, neste trabalho, tanto os indivíduos juvenis quanto os adultos foram positivos ao dermatófito e, mesmo com seu maior potencial virulento, não foram observadas alterações clínicas nos animais.

Estudos apontam a prevalência das dermatofitoses em coelhos e porquinhos-da-índia, mas não são capazes de elucidar o motivo para essa casuística (KRAEMER *et al.*, 2012; DONNELLY *et al.*, 2000). Sabe-se que esses fungos possuem tropismo por regiões queratinizadas, como o pelo e as unhas, onde utilizam a queratina disponível como fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento (IORIO *et al.*, 2007; TAPLIN *et al.*, 1969). Esse mesmo metabolismo pode ser explicado pela seletividade desses fungos pelo Ágar DTM, presente no Dermatobac[®], que potencializou o crescimento do *T. mentagrophytes* por conta do seu meio rico em peptonas. Essas proteínas são degradadas pelas enzimas produzidas pelo dermatófito, fornecendo-o nitrogênio e carbono (WAWRZKIEWICZ *et al.*, 1991). Portanto, sugere-se que pela maior densidade pilosa dessas espécies e estado hígido dos indivíduos, o estabelecimento de uma interação simbiótica foi desenvolvida.

Outros autores foram capazes de identificar diferentes espécies de dermatófitos em coelhos e porquinhos-da-índia com algum grau de lesão dermatológica (COELHO *et al.*, 2008) e clinicamente saudáveis (D’OVIDIO *et al.*, 2014). Esses estudos foram realizados em diferentes países, como Itália e Portugal, visto isso, sugere-se que os fatores ambientais influenciam quais fungos podem estar associados aos tecidos e anexos dos animais.

O *Aspergillus spp.* foi o segundo fungo filamentoso prevalente nas amostras dos porquinhos-da-índia, em 8 (44,4%), mas também foi isolado entre os coelhos, em 2 (11,1%), corroborando com outros trabalhos (COELHO *et al.*, 2008; D’OVIDIO *et al.*, 2014). Mesmo sendo classificado como saprofítico, não se descarta a sua importância clínica, visto que esse microrganismo pode ser o agente causador de doenças respiratórias (QIU *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2011) e neurológicas (NORITOMI *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2001), com alta prevalência em contactantes imunocomprometidos, sejam eles humanos ou animais (XAVIER *et al.*, 2008).

De acordo com Rocha *et al.* (2010), a *Curvularia* spp pode ser isolada em rações comerciais para coelhos. Os resultados do presente estudo, corroboram com o desses autores, visto que os indivíduos eram submetidos à alimentação à base de ração comercial para a espécie e as suas amostras deram positivas ao microrganismo, em 3 (50%).

Os demais fungos saprofiticos foram identificados nas amostras testadas, *Litcheimia* spp., *Mucor* spp e *Penicillium* spp., mas com menor prevalência que o *Aspergillus* spp. e o *Curvularia* spp., assim como referidos em literatura (D'OVIDIO *et al.*, 2014). Estes agentes possuem potencial zoonótico e oportunista (QIU *et al.*, 2014). Poucos relatos são apresentados acerca de infecções decorrentes desses microrganismos, mas é esclarecido que a ocorrência está relacionada a pacientes imunocomprometidos, tanto humanos quanto animais, com o desenvolvimento de enfermidades cutâneas, pulmonares e gastrintestinais (ALVES *et al.*, 2020; REYNALDI *et al.*, 2017; VAN CUTSEM *et al.*, 1989). Contudo, os animais estudados estavam clinicamente saudáveis e o isolamento desses fungos filamentosos pode ser relacionado à disseminação ambiental ou pelo contato direto com outros indivíduos, sejam eles da mesma espécie estudada ou não.

Durante o cultivo das amostras, as unidades formadoras de colônia (UFC) variaram de 2-4, por meio de cultivo. Segundo Moriello *et al.* (2017), o escore patogênico entre 1-4 UFC, por placa, é comum em animais tratados para infecções fúngicas ou aqueles que tiveram contato com fômites. Os coelhos e porquinhos-da-índia testados não apresentavam histórico de doenças sistêmicas ou uso de medicações que interferissem na homeostase do organismo. Os fungos isolados podem ter origem da própria microbiota dos animais, transmitidos por outros indivíduos que alberguem algum desses microrganismos em sua microbiota ou por meio do contato direto ou indireto.

CONCLUSÕES

Os fungos filamentosos isolados possuem potencial zoonótico, este fator deve ser considerado por humanos imunocomprometidos ao escolherem essas espécies como animais de companhia ou até como contactantes de outros animais que possam apresentar deficiência do sistema imunológico, barreira cutânea ou estejam submetidos à terapia imunossupressora. Ainda assim, novas pesquisas devem ser realizadas para avaliar se esses fungos filamentosos integram a microbiota tegumentar dos coelhos e porquinhos-da-índia, e se esses indivíduos compartilham os agentes fúngicos de seus tecidos com humanos, assim como é relatado com cães e gatos pertencentes às famílias multiespécies.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R.C.; FERREIRA, J.S.; ALVES, A.S.; MAIA, L.A.; DUTRA, V.; SOUZA, A.P.; GALIZA, G.J.N.; DANTAS A.F.M. Systemic and Gastrohepatic Mucormycosis in Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, v.175, n.1, p.90-94, 2020.
- BOVE-SEVILLA, P.M.; MAYORGA-RODRÍGUEZ, J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O. Sporotrichosis transmitted by a domestic cat: Case report. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, v.36, n.1, p.33-35, 2008

CABAÑES, F.J.; VEJA, S.; CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Medical Mycology* January, v.49, n.1, p.40–48, 2011.

CAMPBELL, J.J.; COYNER, K.S.; RANKIN, S.C.; THOMAS, P.L.; SCHICK, A.E.; SHUMAKER, A.K. Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. *Veterinary Dermatology*, v.21, n.6, p.619-625, 2010.

CHERMPRAPAI, S.; EDERVEEN, T.H.A.; BROERE, F.; BROENS, E.M.; SCHLOTTER, Y.M.; SCHALKWIJK, S.V.; BOEKHORST, J.; HIJUM, S.V.H.; RUTTEN, V. The bacterial and fungal microbiome of the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis and the impact of topical antimicrobial therapy, an exploratory study. *Veterinary Microbiology*, v.229, n.2, p.90–99, 2019.

COELHO, A.C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.4, p.1017-1020, 2008.

D’OVIDIO, D.; GRABLE, S.L.; FERRARA, M.; SANTORO, D. Prevalence of dermatophytes and other superficial fungal organisms in asymptomatic guinea pigs in Southern Italy. *Journal of Small Animal Practice*, v.55, n.7, p.355-358, 2014.

DONNELLY, T.M.; RUSH, E.M.; LACKNEG, P.A. Ringworm in small exotic pets. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v.9, n.2, p.82-93, 2000.

FERNANDES, Y.B.; RAMINA, R.; BORGES, G.; QUEIROZ, L.S.; MALDAUN, M.V.C.; MACIEL, JR.J.A. Orbital apex syndrome due to aspergillosis: case report. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v.59, n.3, p.806-808, 2001.

FERREIRA, R.R.; FERREIRO, L.; SPANAMBERG, A.; DRIEMEIER, D.; MACHADO, M.L.S.; BIANCHI, S.P.; SCHMIDT, D.; GUILLOT, J. Canine Sinonasal Aspergillosis, *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, n.4, p.1-6, 2011.

HOFFMANN, A.R. The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. *Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology*, v.28, n.1, p.60-70, 2017.

IORIO, R.; CAFARCHIA, C.; CAPELLI, G.; FASCIOCCO, D.; OTRANTO, D.; GIANGASPERO, A. Dermatophytoses in cats and humans in central Italy: epidemiological aspects. *Mycoses*, v.50, n.6, p.491–495, 2007.

IRVINE, L.; CILIA, L. More-than-human families: Pets, people, and practices in multispecies households. *Wiley*, v.11, n.2, p.1-13, 2017.

IVASKIENE, M.; SIUGZDAITE, J.; ALGIMANTAS, M.; AIDAS, G.; GINTARAS, Z.; SPAKAUSKAS, V. Isolation of fungal flora from the hair coats of clinically healthy dogs and cats. *Veterinarija ir Zootechnika*, v.45, n.67, p.13-19, 2009.

KAUFMAN, G.; HORWITZ, B.A.; DUEK, L.; ULLMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Medical Mycology*, v.45, n.2, p.149-155, 2007.

KRAEMER, A.; MUELLER, R.S.; WERCKENTHIN, C.; STRAUBINGER, R.K.; HEIN, J. Dermatophytes in pet Guinea pigs and rabbits. *Veterinary Microbiology*, v.157, n.1, p.208-213, 2012.

MOHAMMED, A.P.; DHUNPUTH, P.; CHILUKA, R.; UMAKANTH, S. An unusual case of invasive aspergillosis in an immunocompetent individual. *BMJ case reports*, n.1, p.1-5, 2015.

MORIELLO, K.A.; COYNER, K.; PATERSON, S.; MIGNON, B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. *Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology*, v.28, n.3, p.266-268, 2017.

NORITOMI, D.T.; BUB, G.L.; BEER, I.; SILVA, A.S.F.; CLEVA, R.; RODRIGUES, J.J.G. Multiple brain abscesses due to *Penicillium* spp infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.47, n.3, p.167-170, 2005.

PASQUETTI, M.; MIN, A.; SCACCHETTI, S.; DOGLIERO, A.; PEANO, A. Infection by *Microsporum canis* in Paediatric Patients: A Veterinary Perspective. *Veterinary Sciences*, v.4, n.3, p.46, 2017.

PATEL, A.; LLOYD, D.H.; LAMPORT, A.I. Survey of dermatophytes on clinically normal cats in the southeast of England. *Journal of Small Animal Practice*, v.46, n.1, p.436–439, 2005.

QIU, Y.; ZHANG, J.; LIU, G.; ZHONG, X.; DENG, J.; HE, Z.; JING, B. A case of penicillium marneffeii infection involving the main tracheal structure. *BMC Infectious Diseases*, v.14, n.1, p.242-247, 2014.

REYNALDI, F.J.; GIACOBONI, G.; CÓRDOBA, S.B.; ROMERO, J.; REINOSO, E.H.; ABRANTES, R. Mucormycosis due to *Saksenaia vasiformis* in a dog. *Medical Mycology Case Reports*, v.16, n.4, p.4-7, 2017.

ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.C.O.; GUEDES, M.I.F. Fungos Isolados a Partir de Rações Para Roedores Comercializadas na Cidade de Fortaleza – Ceará. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.4, n.1, p.23–29, 2010.

SONG, S.J.; LAUBER, C.; COSTELLO, E.K.; LOZUPONE, C.A.; HUMPHREY, G.; LYONS, D.B.; CAPORASO, J.G.; KNIGHTS, D.; CLEMENTE, J.C.; NAKIELNY, S.; GORDON, J.I.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Microbiology and infectious disease*, v.2, n.1, p.1-22, 2013.

TAPLIN, D.; ZAIAS, N.; REBELL, G.; BLANK, H. Isolation and Recognition of Dermatophytes on a New Medium (DTM), *Archives of Dermatological*, v.99, n.2, p.203-209, 1969.

VAN CUTSEM, J.; VAN GERVEN, F.; FRANSEN, J.; JANSSEN, P.A. Treatment of experimental mucormycosis in guinea pigs with azoles and with amphotericin B. *Chemotherapy*, v.35, p.267–72, 1989.

VANGEEL, I.; PASMANS, F.; VANROBAEYS, M.; DE HERDT, P.; HAESEBROUCK, F. Prevalence of dermatophytes in asymptomatic guinea pigs and rabbits. *Veterinary Record*, v.146, n.4, p.440-441, 2000.

WAWRZKIEWICZ, K.; WOLSKI, T.; LOBARZEWSKI, J. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia*, v.114, n.1, p.1-8, 1991.

XAVIER, M.O.; SALES, M.P.U.; CAMARGO, J.J.P.; PASQUALOTTO, A.C.; SEVERO, L.C.; *Aspergillus niger* causing tracheobronchitis and invasive pulmonary aspergillosis in a lung transplant recipient: case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.41, n.2, p.200-201, 2008.