

Suscetibilidade *in vitro* a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* spp e *Micrococcus* spp isoladas a partir de mucosa oral de macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro

In vitro susceptibility to antibiotics in *Staphylococcus* spp e *Micrococcus* spp strains isolated from oral mucosae of captive capuchin monkeys (*Cebus apella*)

Daniel ASPIS¹;
Lúcia BALDASSI²;
Pedro Manuel Leal GERMANO³;
José Daniel Luzes FEDULLO⁴;
Estevão de Camargo PASSOS⁵;
Margareth de Andrade GONÇALVES⁶

1- Prefeitura Municipal de Barueri, Barueri - SP
2- Instituto Biológico, São Paulo - SP
3- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP
4- Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo - SP
5- Instituto Pasteur, São Paulo - SP
6- Secretaria da Educação do Governo do Estado de São Paulo, São Paulo - SP

Resumo

O estudo foi realizado com 29 macacos-pregos (*Cebus apella*). Foram colhidas 50 amostras de suabe da mucosa oral, junto à transição muco-gengival maxilar, com auxílio de zaragatoas esterilizadas, embebidas em caldo Brain Heart Infusion (BHI). Todos os animais foram submetidos a exame clínico para avaliação periodontal. As amostras obtidas foram cultivadas em meios apropriados: caldo simples, caldo BHI, e ágar sangue para o isolamento de cocos Gram-positivos aeróbios da família *Micrococcaceae*. Para sua classificação utilizou-se as provas de catalase, Staphy-test (teste rápido para caracterização de *Staphylococcus aureus*) e sensibilidade à bacitracina. Foram identificados 73,1% de *Staphylococcus* spp; 15,4% de *Staphylococcus aureus*; e 11,5% *Micrococcus* spp. As cepas isoladas foram testadas em relação à sua suscetibilidade a antibióticos pela técnica de difusão em ágar. Verificou-se para as cepas de *Staphylococcus* spp, 94,7% de sensibilidade a cefalotina e resistência de 89,5% à penicilina, 97,4% à oxacilina, 55,3% à tetraciclina, 57,9% à clindamicina e 63,2% à amoxicilina. Os dados obtidos demonstraram que a cefalotina foi o antibiótico para o qual as amostras de *Staphylococcus* spp estudadas apresentaram, *in vitro*, maior grau de sensibilidade.

Palavras-chave:

Suabe oral.
Staphylococcus spp.
Micrococcus spp.
Antibióticos.
Suscetibilidade *in vitro*.
Macacos-pregos (*Cebus apella*).

Correspondência para:
PEDRO MANUEL LEAL GERMANO
Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 715
01246-904 - São Paulo - SP
pmlgerma@usp.br

Recebido para publicação: 28/02/2003
Aprovado para publicação: 19/02/2004

Introdução

Em saúde pública, a preocupação com a criação de primatas não humanos não está ligada somente ao risco de transmissão de doenças contagiosas aos seres humanos, de

caráter zoonótico ou não, mas, sobretudo por lesões cutâneas traumáticas ou infecciosas causadas por mordeduras. Por se tratar de animais considerados inteligentes, de reflexos rápidos e providos de grande força física, são capazes de agredir com severidade seus

tratadores, infligindo-lhes ferimentos graves¹, os quais parecem ser mais sérios do que os provocados por outros animais exóticos.^{2,3}

As mordeduras provocam simultaneamente lesões por compressão dos tecidos, determinando escarificação da zona atingida; e, por perfuração, dando origem a necroses puntiformes, correspondentes à penetração profunda dos dentes caninos do animal.⁴

A cavidade bucal e os dentes dos macacos, de um modo geral, constituem meio hiperséptico, associando floras saprófitas e patogênicas extremamente polimorfas, além de enzimas e produtos de degradação biológica, muitas vezes tóxicos⁴. Estes microrganismos são consequência dos hábitos alimentares dos animais, que incluem desde frutas variadas até pequenos roedores e insetos ou ao costume de levar constantemente as mãos contaminadas à boca, mesmo com matéria fecal. Por outro lado, os microrganismos podem, também, fazer parte da própria flora microbiana dos animais, tal como relatado por Kloos et al.⁵, que isolaram a partir da superfície cutânea de primatas não humanos: *Staphylococcus* spp, *Staphylococcus aureus* de narinas e abdômen e *Staphylococcus sciuri* ocasionalmente das narinas. As espécies de *Micrococcus* spp foram encontradas nos macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*), sendo *Micrococcus varians* a mais isolada.

Dada a gravidade destes acidentes nos seres humanos e sua frequência cada vez maior nos centros urbanos, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de avaliar a flora microbiana de primatas não humanos. Assim, Rayan et al.⁶ isolaram um total de 82 cepas de bactérias da cavidade bucal de 17 macacos Rhesus (*Macaca mulata*), destacando-se entre outras *Streptococcus* spp a-hemolíticos (19,5%); *Streptococcus* spp g-hemolíticos (1,2%); *Staphylococcus aureus* (3,8 %) e *Staphylococcus* spp b-hemolíticos (1,2%); *Pseudomonas* spp (2,4%); e, *Escherichia coli* (1,2%).

Krygier et al.⁷ isolaram de placa bacteriana de superfícies dentárias limpas e

gingiva saudável de macaco *Macaca speciosa*, cocos e bastonetes Gram-positivos. Contudo, a medida que se evidenciava gengivite, provocada pela deposição de placas bacterianas, era possível isolar, também, fusobactérias, espiroquetas e espirilas.

Em pesquisa realizada com orangotangos, *Pongo pygmaeus*, Stoller et al.⁸ identificaram flora poli-microbiótica a partir de culturas bacterianas anaeróbias de placa sub-gengival, provenientes tanto de regiões comprometidas, quanto sem alterações.

Com base nos aspectos mencionados, o estudo da flora bacteriana dos primatas não humanos, em particular a da cavidade bucal, bem como a verificação de sua sensibilidade a antibióticos, é importante em saúde pública. Assim, o objetivo deste trabalho é verificar a sensibilidade, *in vitro*, a antibióticos, de cepas de *Staphylococcus* spp e *Micrococcus* spp, isoladas de mucosa oral de macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro.

Materiais e Métodos

Foi utilizado um grupo de 29 macacos-pregos (*Cebus apella*) adultos mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Os animais gozavam de boas condições de saúde e negativos ao teste tuberculínico intradérmico, não apresentando histórico recente de uso de antibióticos. Os animais estavam identificados através de números tatuados no lado interno da coxa, seus pesos variavam de 1,2-5,0 kg. Eram alimentados duas vezes ao dia com frutas, vegetais, ovos cozidos, pescoço de frango e ração para primatas formulada pelo zoológico e água *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos em três recintos fechados com área de 3,0 x 2,0 x 4,0 metros com barras de ferro, cerca de arame e chão cimentado durante os 12 meses do experimento.

Cada animal foi anestesiado com 4,4 mg/kg tiletamina e zolazepam (Zoletil 50, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda., São

Paulo, Brasil, 04696-000) por via intramuscular para facilitar o teste tuberculínico intradérmico, cuidados veterinários e colheita das amostras.

Foram colhidas, de cada um dos animais do experimento, amostras da mucosa oral, junto à transição muco-gengival maxilar, com o auxílio de zaragatoas esterilizadas, embebidas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) mantidas em tubos de tampa rosqueada. Foram realizadas sete colheitas com frequência bi-mensal.

O número de animais submetidos às colheitas foi: 8 na primeira, 8 na segunda, 8 na terceira, 8 na quarta, 7 na quinta, 5 na sexta e 6 na sétima, totalizando 50 amostras colhidas. A apresentação dos animais para colheita das amostras foi praticada de modo aleatório.

As amostras foram submetidas, de imediato, aos procedimentos técnicos para cultura e isolamento de cocos Gram-positivos aeróbios e foram semeadas em caldo simples, ágar contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro, e incubadas a 37°C por 24 horas. As diferentes colônias obtidas foram submetidas à coloração de Gram e tiveram suas morfologias e atividade hemolítica anotadas. Aquelas que se caracterizaram como cocos Gram-positivos foram isoladas e mantidas em caldo BHI, para identificação bioquímica.

As diferentes colônias foram caracterizadas quanto à produção e tipo de hemólise (não hemolíticas, a e b-hemolíticas).

As cepas de cocos Gram-positivos com reação positiva à prova de catalase e negativas à prova de bacitracina (ausência de halo de inibição) foram submetidas ao Staphy-Test (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, Brasil, 05509-005) teste em lâmina, para identificação de *Staphylococcus aureus*.

Após a identificação, as cepas de *Staphylococcus* spp, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus* spp foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos seguintes antibióticos: clindamicina 2 mg, penicilina 10 U, oxacilina 1 mg, tetraciclina 30 mg, amoxicilina 10 mg

e cefalotina 30 mg, conforme técnica proposta por Bauer et al.⁹, e modificações propostas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards.¹⁰

Resultados

Na tabela 1 observam-se o total de cepas isoladas e respectivas frequências, foram isoladas 52 cepas de cocos Gram-positivos aeróbios em 27/29 (93,1%) animais, *Staphylococcus* spp ocorreu em 23/29 (79,3%), *Staphylococcus aureus* em 7/29 (24,1%) e *Micrococcus* spp em 6/29 (20,7%). A frequência das cepas isoladas foi de 73,1% (38/52) para *Staphylococcus* spp, 15,4% (8/52) para *Staphylococcus aureus* e 11,5% (6/52) para *Micrococcus* spp.

Todas as cepas se mostraram positivas à prova da catalase, as quais foram submetidas ao Staphy-test e à prova da bacitracina. Na tabela 2 estão representados a frequência da atividade hemolítica das cepas de *Staphylococcus* spp isoladas, 68,4% (26/38) não hemolíticas, 23,7% (9/38) a-hemolíticas e 7,9% (3/38) b-hemolíticas.

Na tabela 3 estão registrados os microrganismos isolados dos macacos-pregos de número 21 a 29, submetidos a mais de uma colheita. Foram isoladas cepas de *Staphylococcus* spp nos animais n^{os} 21, 22, 24, 25, 26, 27 e 28; cepas de *Staphylococcus aureus* nos animais n^{os} 22, 23, 25, 26 e 27; e cepas de *Micrococcus* nos animais n^{os} 23, 25 e 29. Saliente-se que o isolamento bacteriano nos animais n^{os} 22, 28 e 29 ocorreu em uma única oportunidade, nos animais n^{os} 21, 23, 24, 25, 26 e 27 na maioria das ocasiões, sendo que apenas o n^o 25 apresentou isolamento para os três microrganismos.

A tabela 4 mostra a suscetibilidade *in vitro* aos antibióticos das cepas isoladas. Em relação à sensibilidade e resistência frente aos antibióticos testados, a cefalotina apresentou o maior poder de inibição do crescimento bacteriano das cepas isoladas, uma vez que foi observado sensibilidade em 94,7% (36/38) das cepas de *Staphylococcus* spp, 87,5% (7/8) das cepas de *Staphylococcus aureus* e 66,7%

coagulase positivas e patogênicas *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. schleiferi coagulans*. As coagulase-negativas são representadas por *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. cobnii*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi schleiferi*, *S. pasteurii*, *S. caprae*, *S. pulvereri*, *S. hominis*, *S. capitis* e *S. auricularis*¹¹, sendo algumas delas produtoras de toxinas e enzimas específicas.⁵

Segundo Parr et al.¹², alguns pesquisadores enfatizaram a função da higienização da pele por parte de macacos *Cebus apella*. Talvez o auxílio oral na limpeza cutânea e remoção de ectoparasitas interferisse com a composição da microflora da mucosa oral desta espécie de primatas não humanos.

O isolamento de alta porcentagem de *Staphylococcus* spp, da família *Micrococcaceae* no presente estudo, (73,1%), pressupõe risco de processo inflamatório infeccioso em caso de mordedura por estes animais.

Os dados sobre a ocorrência de mordeduras infligidas por animais são escassos^{13,14,15}, os relacionados a estudo bacteriológico das lesões também o são², e em relação aos acidentes provocados com primatas não humanos os registros também são escassos.^{3,16,17,18,19,20}

O estudo de sensibilidade e resistência frente a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* spp tem sido realizado por autores, principalmente no que se refere ao estudo da mastite bovina.²¹

Lloyd et al.²² realizaram um estudo com cepas de *Staphylococcus intermedius* e *S. aureus* isoladas a partir da pele, ouvidos, olhos, mucosas nasal e oral, traquéia, vagina e vulva de animais da espécie canina. Das cepas isoladas da mucosa oral, 100% mostraram-se resistentes à penicilina, 80% resistentes à oxitetraciclina, não havendo resistência aos antibióticos lincomicina, eritromicina, co-trimoxazole e cefalexina.

Biberstein et al.²³, realizaram experimento no qual procedeu-se à identificação de cepas de *Staphylococcus* spp coagulase-positivos isoladas a partir de casos clínicos variados, das espécies canina, felina,

equina, primatas não humanos, caprina e bovina. Realizaram testes de sensibilidade frente aos antibióticos penicilina, ampicilina, oxacilina, carbenicilina, cefalotina, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, amicacina, sulfametoxazole e trimetoprim. Cepas de *S. aureus* apresentaram 70% de resistência frente à penicilina, 23,3% à tetraciclina, 15,4% ao cloranfenicol e *S. intermedius* mostrou resistência à penicilina de 61,3% das cepas, 39,9% à tetraciclina, 9,8% ao cloranfenicol e 10,5% à eritromicina.

Para Saijonmaa-Koulumies e Lloyd²⁴, cepas de *S. intermedius*, isoladas da mucosa oral de cães, apresentaram resistência à penicilina e à amoxicilina, quando da realização de antibiograma com a técnica da difusão em ágar. Os antibióticos testados foram penicilina, amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, cefalexina, sulfametoxazole com trimetoprim, eritromicina, lincomicina, oxitetraciclina, metilicina, enrofloxacin e oxacilina.

São raros os dados de literatura sobre isolamento e sensibilidade de *Micrococcus* spp. EIFF et al.²⁵, testaram, *in vitro*, 188 cepas de *Micrococcus* spp e 63 de *Stomatococcus mucilaginosus* obtidas a partir de casos clínicos humanos, frente à penicilina, ampicilina, cefazolina, cefotiam, cefuroxime, cefotaxime, imipenem, gentamicina, amicacina, netilmicina, eritromicina, claritromicina, clindamicina, vancomicina, teicoplanina, rifampicina, fosfomicina e ácido fusídico. Os resultados mostraram que os antibióticos β -lactâmicos testados, penicilina e imipenem, eram mais ativos contra *Micrococcus* spp. A rifampicina mostrou ser o antibiótico mais ativo dentre os testados.

Goldstein e Citron²⁶ estudaram, *in vitro*, a atividade de dez antibióticos frente a 147 cepas de bactérias aeróbias. Foram testados penicilina, cefalexina, ampicilina, tetraciclina, ácido clavulânico e amoxicilina, cefadroxil, cefuroxime, ciprofloxacina, ofloxacina e enofloxacina. Todas as cepas empregadas mostraram sensibilidade frente ao cefuroxime, 60% de resistência à

cefalexina e 95% ao cefadroxil.

Rayan et al.⁶ verificaram para cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, entre outras bactérias isoladas a partir da cavidade oral de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), sensibilidade de 100% frente ao cefoperazone, 96% ao cloranfenicol e 89% à ampicilina.

Ainda que haja controvérsia sobre a atuação em casos de ferimento por mordedura, sobre intervenção cirúrgica além de tratamento profilático e terapêutico com antibióticos, alguns autores preconizam que a escolha de antibióticos deva ser empírica, selecionando-se aqueles com atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp, entre outros.^{27,28} Assim, o prévio e constante conhecimento da prevalência de espécies bacterianas na microbiota, bem como sua sensibilidade a antibióticos, é essencial para

que se esteja preparado para atuação em problemas emergenciais.

Conclusões

1. *Staphylococcus* spp foram isolados de 79,3% (23/29) dos macacos-prego (*Cebus apella*), *Staphylococcus aureus* de 24,1% (7/29) e *Micrococcus* spp de 20,7% (6/29).

2. Os dados obtidos demonstram que a cefalotina foi o antibiótico para o qual as cepas de *Staphylococcus* spp, isoladas a partir da mucosa oral de macacos-prego (*Cebus apella*) criados em cativeiro, apresentaram maior grau de sensibilidade.

3. Para *Staphylococcus* spp, a maior porcentagem de resistência foi observada em relação a penicilina (89,5%), oxacilina (97,4%), clindamicina (57,9%) e amoxicilina (63,2%).

Abstract

Twenty-nine capuchin monkeys (*Cebus apella*) were used in this study. Fifty samples of oral mucous membrane were collected in area next to their muco-gingival-maxilar transition using sterilized swabs soaked in Brain Heart Infusion (BHI). All animals were clinically examined for periodontal evaluation. The samples were cultivated in appropriate media, namely: simple broth, BHI broth and, blood agar in order to get aerobic Gram positive cocci, from the *Micrococcaceae* family, isolated. Catalase test, Staphy-test (a quick-test for *Staphylococcus aureus* characterization) and bacracin-sensitivity test were the tools employed for their classification. Data were follows: 73.1% of them were *Staphylococcus* spp; 15.4% *Staphylococcus aureus*; and, 11.5% *Micrococcus* spp. The isolated were strains tested for their *in vitro* susceptible to antibiotics by the agar diffusion technique. Concerning the *Staphylococcus* spp strains, 94.7% were susceptibility to cephalotin; however, 89.5% of them were resistant to penicillin; 97.4% to oxacilin; 55.3% to tetraciline; 57.9% to clindamicine; and 63.2% to amoxiciline. *Staphylococcus* spp strains studied presented the highest *in vitro* sensitivity degree to cephalotin..

Key-words:

Oral swabs.
Staphylococcus spp.
Micrococcus spp.
Antibiotics.
in vitro susceptibility.
Capuchin monkeys (*Cebus apella*).

Referências

1. SATTERFIELD, W. C.; VOSS, W. R. Nonhuman primates and the practitioner. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 17, p. 1185-1203, 1987.
2. GOLDSTEIN, E. J. C. Bite wounds and infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. 633-640, 1992.
3. ZAKARIA, M. B. et al. Accidental injuries associated with nonhuman primate exposure at two regional primate research centers (USA): 1988-1993. **Laboratory Animal Science**, v. 46, p. 298-304, 1996.
4. DORTU, J. Ulcère de jambe par morsure de singe. **Phlebologie**, v. 31, p. 113-117, 1978.
5. KLOOS, W. E.; ZIMMERMAN, R. J.; SMITH, R. F. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus*

- species on animal skin. **Applied Environmental Microbiology**, v. 31, p. 53-59, 1976.
6. RAYAN, G. M.; FLOURNOY, D. J.; CAHILL, S. L.. Aerobic mouth flora of the Rhesus Monkey. **Journal of Hand Surgery**, v. 12A, p. 299-301, 1987.
7. KRYGIER, G. et al. Experimental gingivitis in *Macaca speciosa* monkeys: clinical, bacteriologic and histologic similarities to human gingivitis. **Journal of Periodontology**, v. 44, p. 454-463, 1973.
8. STOLLER, N. H. et al. Periodontal disease in the orangutan (*Pongo pygmaeus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 20, p. 454-460, 1989.
9. BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
10. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests**. Villanova, (PA), 1990. (Approved standard M2-A3).
11. KONEMAN, E. W. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1997. 1458 p.
12. PARR, L. A. et al. Grooming down the hierarchy: allogrooming in captive brown capuchin monkeys, *Cebus apella*. **Animal Behaviour**, v. 54, p. 361-367, 1997.
13. FREUD, H. K. et al. Mordedura por animales. Estudio de 606 casos. **Revista Clínica Española**, v. 197, p. 560-563, 1997.
14. GOLDSTEIN, E. J. C. et al. Bacteriology of human and animal bites. **Journal Clinical Microbiology**, v. 8, p. 667-672, 1978.
15. HATZ, C. F. et al. Circumstances and management of 72 animal bites among long-term residents in the tropics. **Vaccine**, v. 13, p. 811-815, 1995.
16. CAMPBELL, A. C. Primate bites in Gibraltar - minor casualty quirk? **Scottish Medical Journal**, v. 34, p. 519-520, 1989.
17. GOLDSTEIN, E. J. C.; PRYOR III, E. P.; CITRON, D. M. Simian bites and bacterial infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 1551-1552, 1995.
18. JANDA, H. D. et al. Nonhuman primate bites. **Journal Orthopaedic Research**, v. 8, p. 146-150, 1990.
19. SOTIR, M. et al. Risk of occupational exposure to potentially infectious nonhuman primate materials and to simian immunodeficiency virus. **Journal of Medical Primatology**, v. 26, p. 233-240, 1997.
20. TRIBE, G. W.; NOREN, E. Incidence of bites from *Cynomolgus* monkey in attending animal staff -1975-80. **Laboratory Animal**, v. 17, p. 110, 1983.
21. MUHAMMAD, G. et al. Reproducibility of antibiogram of bovine mammary gland *Staphylococci* under conditions of repeated subculturing. **Journal of Veterinary Medicine, series b**, v. 45, p. 189-192, 1998.
22. LLOYD, D. H.; LAMPORT, A. I.; FEENEY, C. Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic *staphylococci* in the UK, 1980-96. **Veterinary Dermatology**, v. 7, p. 171-175, 1996.
23. BIBERSTEIN, E. L.; JANG, S. S.; HIRSH, D. C. Species distribution of coagulase-positive *Staphylococci* in animals. **Journal Clinical Microbiology**, v. 19, p. 610-615, 1984.
24. SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E.; LLOYD, D. H. Carriage of bacteria antagonistic towards *Staphylococcus intermedius* on canine skin and mucosal surfaces. **Veterinary Dermatology**, v. 6, p. 187-194, 1995.
25. EIFF, C. V.; HERRMANN, M.; PETERS, G. Antimicrobial susceptibilities of *Stomatococcus mucilaginosus* and of *Micrococcus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 268-270, 1995.
26. GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M. Comparative activities of cefuroxime, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin, enoxacin e ofloxacin against aerobic and anaerobic bacteria isolated from bite wounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 1143-1148, 1988.
27. KLEIN, J. D. Animal bite infections. **Delaware Medical Journal**, v. 61, p. 17-20, 1989.
28. KLEIN, M. Nondomestic mammalian bites. **American Family Physician**, v. 32, p. 137-141, 1985.