

Nghiên cứu đặc điểm di truyền tế bào của bọ xít hút máu *Triatoma rubrofasciata* ở miền Trung Việt Nam

Hồ Viết Hiếu^{1,2*}, Lê Thành Đô², Tạ Phương Mai², Phan Quốc Toàn^{1,2}, Phạm Anh Tuấn²,
Ngô Giang Liên³, Phạm Thị Khoa²

¹Bộ môn Vi sinh - ký sinh trùng, Khoa Y, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

²Trung tâm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và phát triển công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

³Bộ môn Mô phôi và tế bào, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 13/4/2017; ngày chuyển phản biện 17/4/2017; ngày nhận phản biện 22/5/2017; ngày chấp nhận đăng 1/6/2017

Tóm tắt:

Triatoma rubrofasciata là một loài bọ xít hút máu (BXHM) thuộc phân họ Triatominae phân bố rộng trên thế giới. Phân họ Triatominae gồm hơn 150 loài, bao gồm vector chính truyền bệnh Chagas. Ở Việt Nam, các nhà khoa học đã thu thập được loài *T. rubrofasciata* ở 21 tỉnh/thành phố. Đặc biệt, loài bọ xít này xuất hiện trong khu dân cư ở các thành phố và các tỉnh miền Trung: Đà Nẵng, Quảng Nam, Quy Nhơn, Nha Trang... Nghiên cứu những đặc tính sinh học của loài BXHM *T. rubrofasciata* là cần thiết để góp phần đề xuất các biện pháp phòng chống loài côn trùng hút máu nguy hiểm này. Nghiên cứu di truyền tế bào, cấu trúc bộ nhiễm sắc thể góp phần tìm hiểu nguồn gốc, định danh loài và so sánh với các công bố trước. Trong nghiên cứu này, cấu trúc, số lượng bộ nhiễm sắc thể của loài BXHM *T. rubrofasciata* ở miền Trung Việt Nam đã được nghiên cứu bằng kỹ thuật nhuộm băng C. Nghiên cứu đã xác định bộ nhiễm sắc thể của *T. rubrofasciata* ở miền Trung là $2n = 25$ với 22 nhiễm sắc thể thường và 3 nhiễm sắc thể giới tính ($2n = 22A + X1X2Y$).

Từ khóa: Bọ xít hút máu *Triatoma rubrofasciata*, miền Trung, nhiễm sắc thể, nhuộm băng C, Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Bệnh Chagas được phát hiện vào năm 1909 trên người do ký sinh trùng *Trypanosoma cruzi* gây ảnh hưởng đến đời sống của trên 7 triệu người, trong đó có đến 12.000 ca tử vong mỗi năm [1-3]. Các véc tơ truyền bệnh Chagas thuộc phân họ BXHM Triatominae. Trong số hơn 150 loài đã được xác định của phân họ Triatominae, *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) là loài phân bố toàn cầu với sự hiện diện ở 45 quốc gia [4]. Sự di cư của loài này theo các con đường giao lưu hàng hóa và du lịch [1, 5-7]. *T. rubrofasciata* được phát hiện có mang ký sinh trùng *Trypanosoma cruzi* và *T. conorhini* [8] và là một trong số véc tơ chính truyền bệnh Chagas ở Nam Mỹ từ những năm 1970 [9-11].

Ở Việt Nam, năm 2010, ghi nhận sự xuất hiện và tấn công của BXHM ở 21 tỉnh/thành phố [12, 13]. Số ca ghi nhận sự tấn công của BXHM *T. rubrofasciata* tăng lên trong những năm gần đây, đặc biệt ở các thành phố lớn [14], gây tâm lý lo ngại trong nhân dân [12, 15].

Hình thái học của loài BXHM *T. rubrofasciata* đã được nghiên cứu và mô tả chi tiết năm 1979 [16]. Các phương pháp mới như nghiên cứu di truyền tế bào và di truyền phân tử đã được áp dụng vào phân loại trong những thập niên gần đây. Các nghiên cứu về di truyền tế bào đã xác định được bộ nhiễm

sắc thể của hơn 90 loài thuộc phân họ BXHM Triatominae [17]. Trong đó kỹ thuật nhuộm băng C (C-banding), đánh giá các vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin) nằm cạnh tâm động [6, 9, 12] là một công cụ hiệu quả. Đây là kỹ thuật thiết yếu trong việc xác định nhiễm sắc thể giới tính cũng như xác định sự hiện diện của nhiễm sắc thể có tâm động lan tỏa (nhiễm sắc thể holocentric) của các loài *Triatoma*. Sử dụng kỹ thuật nhuộm băng C, các nhà khoa học đã phát hiện sự đa dạng cao của dị nhiễm sắc, bao gồm sự thay đổi về hình dạng, số lượng, kích thước, cấu trúc và vị trí trên nhiễm sắc thể ở các loài côn trùng khác nhau. Tính đa hình của dị nhiễm sắc ở loài *T. infestans*, véc tơ chính truyền bệnh Chagas, là một ví dụ điển hình. Nghiên cứu trên loài *T. infestans* đã cung cấp những thông tin quan trọng về nguồn gốc và sự phân tán của loài này [17]. Đến nay, đã có nhiều nghiên cứu về bộ nhiễm sắc thể của các loài BXHM trên thế giới và của *T. rubrofasciata* ở Nam Mỹ. Với chu kỳ vòng đời ngắn và cách ly khỏi quần thể gốc, ở Nam Mỹ, các đặc điểm di truyền của BXHM tại khu vực miền Trung Việt Nam cần được nghiên cứu. Ngoài ra, do Việt Nam có địa hình trải dài nên việc phân tích về đặc điểm di truyền của BXHM ở khu vực miền Trung là hết sức cần thiết. Mặt khác, trong xu thế hội nhập, giao lưu văn hóa và du lịch, sự lan truyền của hệ ký sinh trùng rất khó kiểm soát. Hơn nữa, sự bùng phát số ca tấn công người của BXHM đặt ra yêu cầu cấp thiết về

*Tác giả liên hệ: Email: hieuhoviet@gmail.com

A study on the cytogenetics of blood kissing bugs *Triatoma rubrofasciata* in the Central Vietnam

Viet Hieu Ho^{1,2*}, Thanh Do Le², Phuong Mai Ta²,
Quoc Toan Phan^{1,2}, Anh Tuan Pham², Giang Lien Ngo³,
Thi Khoa Pham²

¹Department of Biology and Microbiology, Faculty of Medicine, Duy Tan University, Danang

²Center for Molecular Biology, Institute of Research and Development, Duy Tan University, Danang

³Department of Cell Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 13 April 2017; accepted 1 June 2017

Abstract:

The large kissing bugs *Triatoma rubrofasciata* (belong to the subfamily Triatominae), well known as a main vector of Chagas disease, have been recorded worldwide. In Vietnam, this species also has been recorded in about 21 provinces. Therefore, studying biological characteristics of *T. rubrofasciata* is necessary to propose solutions to the prevention activities of this dangerous insect. In this study, for the first time we have determined the structure and number of chromosomes of *T. rubrofasciata* from the Central Vietnam by using C-banding technique. As the result, the chromosomes of *T. rubrofasciata* is $2n = 25$ with 22 normal ones and three sex chromosomes ($2n = 22A+X1X2Y$).

Keywords: C-banding, Central Vietnam, chromosomes, kissing bugs, *Triatoma rubrofasciata*.

Classification number: 3.5

việc nghiên cứu đặc điểm sinh học và hệ ký sinh trùng của *T. rubrofasciata* ở Việt Nam. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích cấu trúc bộ nhiễm sắc thể của loài BXHM *T. rubrofasciata* ở miền Trung Việt Nam bằng kỹ thuật nhuộm băng C. Nghiên cứu này cung cấp những dữ liệu về di truyền tế bào, có ý nghĩa về khoa học và thực tiễn, làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về đặc điểm sinh học của BXHM ở Việt Nam và hỗ trợ cho công tác phòng chống loài côn trùng nguy hiểm này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Loài BXHM *T. rubrofasciata* thu thập được tại các tỉnh miền Trung, Việt Nam.

Phương pháp thu và xử lý mẫu

Các nghiên cứu điều tra và thu thập mẫu được tiến hành ở Nghệ An, Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quy Nhơn, Khánh Hòa, dựa trên các đặc điểm hình thái theo bảng định loại của Lent và Wygodzinsky (1979) [16] và Trương Xuân Lam (2004) [18]. Mẫu sống được giữ trong các lọ kín ánh sáng và được tiếp tục nuôi trong phòng thí nghiệm. Quá trình nuôi giữ và xử lý mẫu vật tuân thủ các yêu cầu an toàn sinh học.

Kỹ thuật sinh học phân tử

Các mẫu thu thập dựa trên hình thái tiếp tục được định loại bằng phản ứng chuỗi tổng hợp ADN và giải trình tự gen. ADN tổng số từ các bộ phận khác nhau của bộ xít được tách chiết sử dụng bộ kit Anapure Tissue DNA mini KIT (Trường Đại học khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội). Sau khi tách ADN tổng số, đoạn gen CoII được nhân lên với cặp mồi đặc hiệu cho BXHM: COII F 5'-ATG ATT TTA AGC TTC ATT TAT AAA GAT-3' và COII R 5'-GTC TGA ATA TCA TAT CTT CAA TAT CA-3'. Chu trình nhiệt của phản ứng gồm: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ lặp lại 95°C - 1 phút, 55°C - 30 giây, 72°C - 45 giây; và 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được giải trình tự (Công ty Phù Sa) và so sánh với ngân hàng dữ liệu quốc tế về gen ở côn trùng.

Phương pháp nhuộm băng C

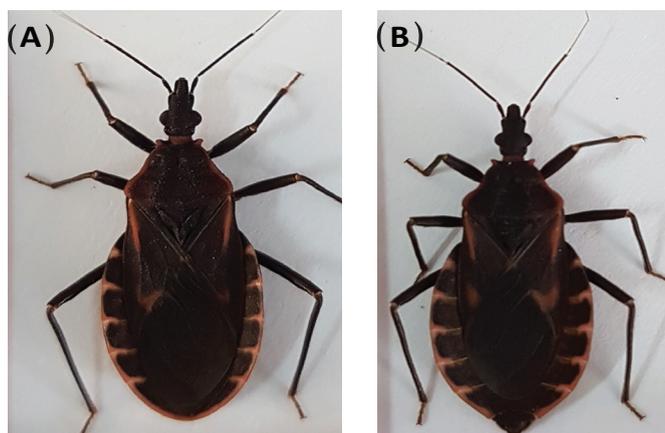
Phương pháp nhuộm băng C được thực hiện theo quy trình của Sumner (1972) [19] và Panzera (2010) [10]. Tinh hoàn bộ xít đực được thu thập và cố định qua đêm trong dung dịch cồn etylic - axit acetic khô với tỷ lệ 3:1 ở -20°C. Mẫu sau khi cố định được rửa sạch bằng nước cất và đưa lên lam kính tạo tiêu bản. Tiêu bản mẫu sau đó được nhuộm bằng dung dịch orcein - acetic 45% trong 5 phút. Cấu trúc mô trên tiêu bản tiếp tục được thủy phân bằng dung dịch HCl 1N ở 60°C trong 5 phút. Tiêu bản sau khi thủy phân được rửa qua bằng nước cất và xử lý 5 phút trong Ba(OH)₂ ở 50°C. Sau khi xử lý, tiêu bản được rửa lại bằng nước cất và ủ trong dung dịch đệm SSC 2X (Saline-sodium citrate buffer pH 7.0) ở nhiệt độ 60°C trong 15 phút. Tiêu bản được để khô ở nhiệt độ phòng và quan sát trên hệ kính hiển vi Olympus CKX41 kết nối camera Infinity. Các tế bào ở các kỳ khác nhau của quá trình phân bào được ghi hình với độ phóng đại 1000x.

Kết quả nghiên cứu

Hình thái BXHM thu thập ở miền Trung Việt Nam

Hình thái của BXHM thu thập được ở miền Trung Việt Nam giống với các mô tả trước đây. Con trưởng thành có màu cam đỏ ở xung quanh rìa mép bên ngoài của bụng. Đốt

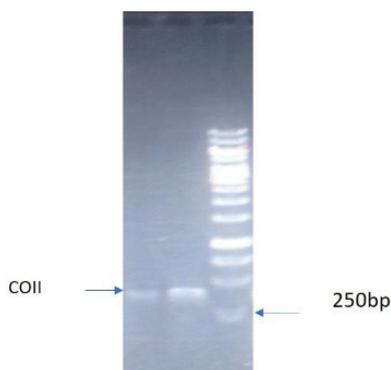
ăng ten thứ nhất vượt qua đỉnh đầu. Lông ở gần phần miệng ngắn và dần dần dài hơn ở đỉnh vòi. Vây hình khiên rộng, hình tam giác nhọn. Có màu cam đỏ ở phần ngực trước.



Hình 1. Hình thái BXHM: (A) Con đực; (B) Con cái.

Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

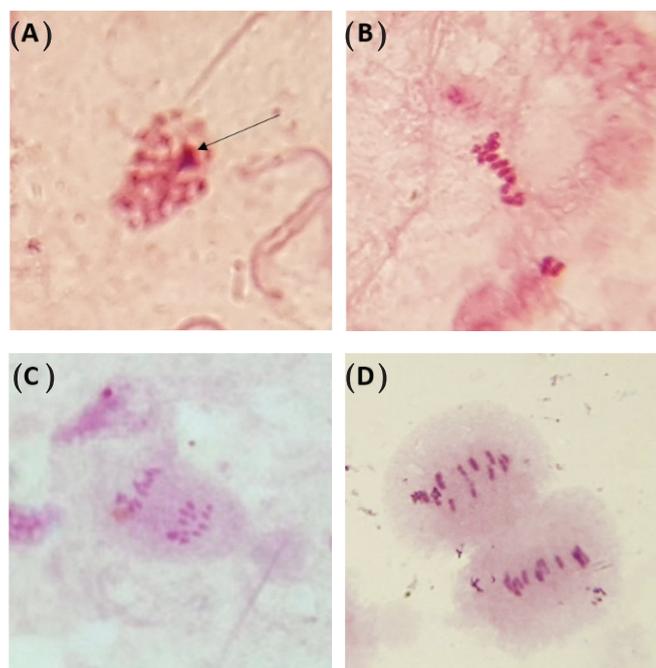
Kết quả PCR đặc hiệu cho đoạn gen CoII được trình bày ở hình 2. Sản phẩm PCR cho một băng đặc hiệu duy nhất với kích thước xấp xỉ 606 cặp bazơ ni tơ trên gel Agarose. Kết quả giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu quốc tế khẳng định các mẫu thu thập được thuộc loài *T. rubrofasciata*.



Hình 2. Sản phẩm phản ứng PCR.

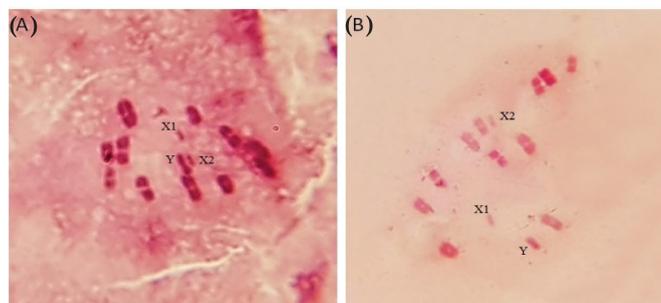
Bộ nhiễm sắc thể của loài *Triatoma rubrofasciata* ở Việt Nam

Bộ nhiễm sắc thể trong quá trình phân chia trên 100 tiêu bản đã được sử dụng để phân tích. Hình thái nhân tế bào và nhiễm sắc thể ở các kỳ khác nhau được trình bày ở hình 3. Ở kỳ đầu (3A), vùng dị sắc rất rõ có hình tròn (mũi tên trong hình). Kỳ giữa, các nhiễm sắc thể có hình dạng đặc trưng và tập trung ở mặt phẳng xích đạo (3B). Ở kỳ sau tế bào, các nhiễm sắc thể phân ly về 2 cực của tế bào (3C). Kỳ cuối (3D) tế bào phân tách thành hai tế bào con. Đặc trưng ở loài này là chúng không hình thành thoi vô sắc.



Hình 3. Hình thái nhân tế bào ở các giai đoạn khác nhau: (A) Kỳ đầu; (B) Kỳ giữa; (C) Kỳ sau; (D) Kỳ cuối.

Ở kỳ giữa I, II nhiễm sắc thể xếp thành 2 hàng với các cặp nhiễm sắc thể thường phân biệt với nhau rõ nét bởi kích thước và hình dạng (hình 4). Kích thước của nhiễm sắc thể thường và của nhiễm sắc thể giới tính có sự chênh lệch khá lớn, tạo nên sự khác nhau rõ rệt. Kích thước của các nhiễm sắc thể thường lớn hơn so với nhiễm sắc thể giới tính do chúng là nhiễm sắc thể đa tâm, một dạng đặc trưng của phân họ BXHM Triatominae. Các nhiễm sắc thể giới tính khác biệt về kích thước và đặc điểm vùng dị sắc. Phân tích cho thấy *T. rubrofasciata* phân bố ở Việt Nam có ba nhiễm sắc thể giới tính với hai nhiễm sắc thể X (X1X2) và một nhiễm sắc thể Y. Nhiễm sắc thể giới tính Y dài hơn nhiễm sắc thể X, đồng thời có vùng dị nhiễm sắc bất màu đậm hơn. Bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội của BXHM trong nghiên cứu này là $2n = 25 (22A + X1X2Y)$. Số lượng này ổn định ở tất cả các cá thể trong nghiên cứu.



Hình 4. Bộ nhiễm sắc thể của BXHM *T. rubrofasciata*: (A) Kỳ giữa giảm phân I; (B) Kỳ giữa giảm phân II.

Bàn luận

Mặc dù có sự đồng nhất về số lượng nhiễm sắc thể, sự ứng dụng các kỹ thuật nhuộm băng nhiễm sắc thể cho thấy rằng phân họ BXHM có sự đa dạng cả về nhiễm sắc thể và kiểu nhân. Kỹ thuật C-banding đã được chứng minh là hữu ích cho việc mô tả những đặc điểm và phân biệt những loài gần gũi với nhau cũng như biểu thị tính đa hình trong cùng loài.

Việc áp dụng các chỉ thị di truyền tế bào khác nhau góp phần đáng kể trong phân loại các loài trong phân họ BXHM Triatominae [20-22]. Nghiên cứu của Panzera về di truyền tế bào của các loài trong phân họ BXHM đã cho thấy tính đa dạng trong phân họ. Số lượng nhiễm sắc thể giới tính có sự khác nhau rất nhiều, trong đó 3 hệ nhiễm sắc thể giới tính được phát hiện ở các con đực là XY, X1X2Y và X1X2X3Y. Số lượng nhiễm sắc thể lưỡng bội (2n) của 90 loài trong họ Triatominae được mô tả từ 21 đến 25 nhiễm sắc thể gồm: 2 loài có 21 nhiễm sắc thể (18A+X1X2Y); 49 loài có 22 nhiễm sắc thể (20A+XY); 34 loài có 23 nhiễm sắc thể (20A+X1X2Y); 4 loài có 24 nhiễm sắc thể (20A+X1X2X3Y) và 1 loài có 25 nhiễm sắc thể (22A+X1X2Y). Hầu hết chúng xuất hiện với 20 nhiễm sắc thể thường (Autosomes-A) [17]. Trong nghiên cứu của Alevi (2016) khi phân tích và so sánh loài *T. rubrofasciata* với các loài trong giống *Triatoma* thì loài này được phát hiện có sự khác nhau so với 30 loài khác về cấu trúc bộ nhiễm sắc thể. Các quần thể loài *T. dimidiata*, *T. protracta* và *T. tibiamaculata* có đặc điểm giống nhau về kiểu nhân với loài *T. rubrofasciata*, tuy nhiên chúng không có mối liên hệ tiến hóa với nhau [23, 24]. Tại Việt Nam, Jean-Pierre Dujardin, Trương Xuân Lam, Phạm Thị Khoa đã xác định bộ nhiễm sắc thể của BXHM tại Hà Nội [25].

Kết luận

Bộ nhiễm sắc thể của loài BXHM *T. rubrofasciata* ở khu vực miền Trung Việt Nam là $2n = 25 (22 + X1X2Y)$. Đây là kết quả nghiên cứu đầu tiên được công bố về kiểu nhân của BXHM *T. rubrofasciata* ở khu vực miền Trung Việt Nam. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây trên thế giới. Loài BXHM ở khu vực miền Trung Việt Nam chưa có sự thay đổi về di truyền tế bào so với các quần thể *T. rubrofasciata* khác trên thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C. Galvão (2014), *Vetores da doença de chagas no Brasil*, 289p, Sociedade Brasileira de Zoologia, Curitiba, Brasil.

[2] WHO (2000), *Control of chagas disease*, Technical Report series 905, Second report of the WHO Expert Committee.

[3] https://en.wikipedia.org/wiki/Chagas_disease.

[4] C.J. Schofield & C. Galvão (2009), "Classification, evolution, and species groups within the Triatominae", *Acta Tropica*, **110**, pp.88-100 (special issue doi:10.1016/j.actatropica.2009.01.010).

[5] C. Galvão, R.U. Carcavallo, D.S. Rocha, J. Jurberg (2003), "A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes", *Zootaxa*, **202**, pp.1-36.

[6] J.S. Patterson, C.J. Schofield, J.P. Dujardin, M.A. Miles (2001), "Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with Old World species of *Triatoma*: evidence

of New World ancestry", *Medical and Veterinary Entomology*, **15**, pp.443-451.

[7] A.C. Silveira & D.F. Rezende (1994), "Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil", *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **27**, pp.11-22.

[8] R.E. Ryckman & E.F. Archbold (1981), "The Triatominae and Triatominae born trypanosomes of Asia, Africa, Australia and the East Indies", *Bull. Soc. Vector Ecologists*, **6**, pp.143-166.

[9] S.A. Justi, C.A.M. Russo, J.R.S. Mallet, M.T. Obara, C. Galvão (2014), "Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)", *Parasites & Vectors*, **7**, p.149.

[10] F. Panzera, R. Pérez, Y. Panzera, I. Ferrandis, M.J. Ferreira, L. Calleros (2010), "Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)", *Cytogenet Genome Res.*, **128**, pp.77-87.

[11] I.A. Sherlock & E.M. Serafim (1974), "Fauna Triatominae do Estado da Bahia, Brasil. VI. Prevalência geográfica da infecção dos triatomíneos por *T. cruzi*", *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **8**, pp.129-142.

[12] Phạm Thị Khoa, Trần Thanh Duong, Dujardin Jean Pierre (2013), "Kissing bugs in Vietnam: rearing and insecticide test", *ESKIV Symposium*, pp.48-56, Science and Technics Publishing House.

[13] J.P. Dujardin, T.X. Lam, P.T. Khoa, C.J. Schofield (2015), "The rising importance of *Triatoma rubrofasciata*", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **110**, pp.319-323.

[14] Nguyễn Văn Châu, Vũ Đức Chính (2013), *Distribution, Ecological habits and results in in jury of blood sucking bugs *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) in some areas of Vietnam*, pp.35-40, Science and Technics Publishing House.

[15] Triệu Nguyễn Trung (2010), *Kết quả điều tra bước đầu BXHM người tại miền Trung và những cảnh báo cần thiết về loài bọ xít này*, <http://www.impeq.vn/impe-n/vn/portal/InfoDetail.jsp?area=58&cat=936&ID=3873>.

[16] H. Lent & P. Wygodzinsky (1979), "Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease", *Bull. American Mus. Nat. Hist.*, **163** (Art.3), pp.125-520.

[17] F. Panzera, Yanina Pazera, et al. (2013), "Contributions and recent advances in cytogenetics of subfamil Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), Vectors of Chagas disease", *Proceeding of ESKIV workshop*, pp.61-69, Science and Technics Publishing House.

[18] Trương Xuân Lam (2004), "Hai loài BXHM thuộc giống *Triatoma* Laporte, 1832 (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) được ghi nhận ở Vườn Quốc gia Tam Đảo", *Tạp chí Sinh học*, **26(3A)**, tr.73-76, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

[19] A.T. Sumner (1972), "A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin", *Exp. Cell Res.*, **75**, pp.304-306.

[20] F. Panzera, et al. (1996), "Chromosome Numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro*, **91(4)**, pp.515-518.

[21] F. Panzera, S. Hornos, J. Pereira, R. Cestau, D. Canale, L. Diotaiuti, J.P. Dujardin, R. Pérez, (1997), "Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae)", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57**, pp.732-739.

[22] F. Panzera, J.P. Dujardin, P. Nicolini, M.N. Caraccio, V. Rose, T. Te Ilez, H. Bermu dez, M.D. Bargues, S. Mas-Coma, J.E. O'Connor, R. Pe rez (2004), "Genomic changes of Chagas disease vector", *South America. Emerg. Infect. Dis.*, **10**, pp.438-446.

[23] Alevi, et al. (2016), "Cytogenetic Characterisation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer) (Hemiptera, Triatominae) Spermatocytes and Its Cytotaxonomic Application", *African Entomology*, **24(1)**, pp.257-260.

[24] K.C.C. Alevi, K.C. Borsatto, F.F.F. Moreira, J. Jurberg, M.T.V. Azeredo-Oliveira (2015), "Karyosystematic of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)", *Zootaxa*, **3494**, pp.433-438.

[25] Jean-Pierre Dujardin, Khoa Phạm Thị, Lam Trương Xuan, et al. (2015), "Epidemiological status of kissing-bugs in South East Asia: A preliminary assessment", *Acta tropica*, doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.022.