

Nota



PRIMER REGISTRO DE PULGAS (INSECTA, SIPHONAPTERA) EN POBLACIONES DE *Lycalopex* (CARNIVORA, CANIDAE) DE LA PATAGONIA ARGENTINA

Juliana P. Sanchez¹, Alejandro Travaini², Alejandro Rodríguez³
y Marcela Lareschi^{4,5}

¹ Centro de Bioinvestigaciones, Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. CeBIO, CIT NOBA (CONICET-UNNOBA), Pergamino, Argentina. [Correspondencia: <julianasanchez@unnoba.edu.ar>]

² Centro de Investigaciones Puerto Deseado UNPA, CONICET.

³ Departamento de Biología de la Conservación, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Sevilla, España.

⁴ Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, CONICET CCT La Plata-UNLP), Argentina.

⁵ Cátedras Zoología General y Parasitología General, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, Argentina.

RESUMEN. Se registran por primera vez pulgas en *Lycalopex griseus* y *Lycalopex culpaeus* de la Patagonia argentina (Parque Nacional Bosques Petrificados de Jaramillo y Parque Nacional Monte León). Las pulgas colectadas ($n = 151$, Prevalencia [P] = 80.80%, Abundancia media [AM] = 5.80, Intensidad media [IM] = 7.19) fueron identificadas como *Pulex irritans* ($n = 144$, $P = 80.80\%$, $AM = 5.54$, $IM = 6.85$) y *Polygenis (Polygenis) platensis* ($n = 7$, $P = 19.20\%$, $AM = 0.27$, $IM = 1.40$). *Pulex irritans* es un reconocido vector de diversos patógenos; su presencia en *L. culpaeus* de Santa Cruz amplía su distribución geográfica hacia el sur, representando un potencial riesgo sanitario. Registramos por primera vez *P. (P.) platensis* en *Lycalopex*. Esta especie de pulga parasita principalmente roedores, por lo que su asociación con *Lycalopex* implicaría una relación depredador-presa, vía común de colonización en sifonápteros.

ABSTRACT. First record of fleas (Insecta, Siphonaptera) in populations of *Lycalopex* (Carnivora, Canidae) from Patagonia, Argentina. Fleas are recorded for the first time on *Lycalopex griseus* and *Lycalopex culpaeus* from Patagonia (Parque Nacional Bosques Petrificados de Jaramillo and Parque Nacional Monte León). The collected fleas ($n = 151$ Prevalence [P] = 80.80%, Mean abundance [MA] = 5.80, Mean intensity [MI] = 7.19) were identified as: *Pulex irritans* ($n=144$, $P=80.80\%$, $MA = 5.54$, $MI= 6.85$) and *Polygenis (Polygenis) platensis* ($n=7$, $P = 19.20\%$, $MA = 0.27$, $MI = 1.40$). *Pulex irritans* is a recognized vector of several pathogens; its presence in *L. culpaeus* of Santa Cruz extends its geographic distribution towards the south, representing a potential health risk. This is the first record of *P. (P.) platensis* in *Lycalopex*. Since *P. platensis* parasites mainly rodents, this association would imply a predator-prey relationship, a common route of colonization in fleas.

Palabras claves: *Lycalopex culpaeus*. *Lycalopex griseus*. Pulicidae. Rhopalopsyllidae. Santa Cruz.

Key words: *Lycalopex culpaeus*. *Lycalopex griseus*. Pulicidae. Rhopalopsyllidae. Santa Cruz.

Lycalopex (Carnivora, Canidae) es un género de zorros nativo de Sudamérica. En la Patagonia argentina se distribuyen poblaciones de las tres especies de zorros que habitan en el país: *Lycalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) (zorro pampeano), limitado al norte de la región; *Lycalopex culpaeus* (Molina, 1782) (zorro colorado) y *Lycalopex griseus* (Gray, 1837) (zorro gris), estos dos últimos con poblaciones en toda la Patagonia (Vaccaro et al. 1995; Díaz & Lucherini 2006). La nómina de pulgas de zorros para la Argentina incluye hasta el momento registros ocasionales para las tres especies que corresponden al centro y norte del país (Lareschi et al. 2016), desconociéndose aspectos ecológicos de la asociación parásito-hospedador, tales como abundancia y prevalencia de la infestación.

El objetivo de esta comunicación es dar a conocer los primeros registros de pulgas parásitas de zorros de la Patagonia argentina. Se aportan además los primeros datos sobre prevalencia, abundancia e intensidad media de la infestación de pulgas en *Lycalopex*, información que es relevante para estudios epidemiológicos posteriores.

Se estudiaron ejemplares de *L. griseus* y *L. culpaeus*, procedentes de dos localidades de la provincia de Santa Cruz: Parque Nacional Bosques Petrificados de Jaramillo (PNBPJ; 47° 39.887'S, 67° 59.729'W), y Parque Nacional Monte León (PNML; 50° 12.519'S, 68° 56.141'W). Estas localidades están comprendidas en la ecorregión de la estepa arbustiva Patagónica. El clima es árido y frío (González & Rial 2004), con temperaturas medias anuales en torno a los 7 °C y precipitaciones anuales inferiores a los 150 mm en PNBPJ y de 150-200 mm en PNML. La vegetación que predomina en el PNBPJ es la estepa de coirón (principalmente de los géneros *Stipa*, *Poa* y *Festuca*) y estepas arbustivas de duraznillo (*Colliguaja integerrima*), yaoyin (*Lycium chilense*), calafate (*Berberis buxifolia*) y mata negra (*Junellia tridens*); en el PNML domina una estepa arbustiva de mata negra que puede ocupar hasta el 70% de la superficie del suelo y forma mosaicos con pastizales de gramíneas (*Festuca pallescens*) sobre sedimentos aluviales aterrazados (Oliva et al. 2001).

Para la captura e inmovilización de los zorros, y la colecta de sus pulgas, en ambos parques nacionales se procedió del siguiente modo. Los zorros fueron capturados con cepos acolchados Oneida Victor® de los calibres Nro. 1 y 1.5. Estos se instalaron individualmente o en pares a lo largo de caminos internos de cada área protegida, espaciados al menos 500 metros entre sí. Según las condiciones particulares de cada sitio se utilizaron estímulos olfativos o cebos comestibles para atraer a los zorros (Travaini et al. 1996). Cada zorro capturado se colocó en una jaula, se le quitó la trampa y fue transportado al laboratorio. Allí se le administró una dosis aproximada de 10 mg por kilo de Zoletil, una combinación de clorhidrato de tiletamina y clorhidrato de zolazepam en una proporción de 1:1 (Travaini & Delibes 1994), manteniéndolo inmovilizado por un período de entre 30 y 40 minutos, mientras un observador revisó el pelo del animal desde la cabeza a la cola, en busca de pulgas.

Las pulgas colectadas fueron conservadas en tubos Eppendorf de 2 ml con etanol 96%, etiquetados y sellados con parafilm para su envío al laboratorio de parasitología. En el laboratorio algunas pulgas fueron preparadas siguiendo técnicas convencionales para su identificación al microscopio óptico (Sanchez 2013). Estas fueron aclaradas en potasa K (OH), deshidratadas en una serie creciente de alcohol, diafanizadas en Eugenol (un derivado del clavo de olor) y por último montadas en preparados permanentes con bálsamo de Canadá. Otras pulgas fueron identificadas bajo microscopio estereoscópico binocular sin preparación previa y preservadas en freezer para estudios posteriores. Las identificaciones se realizaron siguiendo las claves y descripciones originales (Hopkins & Rothschild 1953; Smit 1987; Linardi & Guimarães 2000). Especímenes de referencia de cada especie de pulga se depositaron en la División de Entomología del Museo de la Plata, Argentina. Para cada especie de pulga se calculó la prevalencia (P: porcentaje de hospedadores parasitados), abundancia media (AM: número promedio de pulgas por hospedador examinado) e intensidad media (IM: número promedio de pulgas por hospedador parasitado) (Bush et al. 1997). Los tres índices se calcularon

para el total de hospedadores (P, AM e IM total), para cada parque nacional y para cada especie hospedadora individualmente. Para la comparación de dichos índices entre áreas se utilizaron el test G para tablas de contingencia (comparación entre prevalencias) y el test t de Student (comparación entre abundancias e intensidades medias) (Zar 1999). Adicionalmente, para *L. griseus* se calculó la P, AM e IM de pulgas en cada parque nacional dado que dicha especie hospedadora se capturó en ambos parques. Además para cada especie de pulga, se agregó un comentario sobre su distribución geográfica y hospedatoria conocida.

Se capturaron 24 zorros grises (16 en PNBPJ y 8 en PNML) y 2 zorros colorados, ambos en PNML. En estos hospedadores se colectaron e identificaron en total 151 pulgas; los valores totales son: P = 80.80%, AM = 5.80, IM = 7.19. Los valores por especie hospedadora fueron *L. griseus*: n = 119, P = 79.20%, AM = 4.96, IM = 6.26 y *L. culpaeus*: n = 32, P = 100%, AM = 16, IM = 16, y los valores por áreas fueron PNBPJ: n = 107, P = 77.80%, AM = 5.94, IM = 7.64 y PNML: n = 44, P = 87.50%, AM = 5.50, IM = 6.29. La comparación de prevalencias de pulgas entre Parques Nacionales no mostró diferencias significativas ($G=0.36$, $p=0.55$). Tampoco se observaron diferencias significativas en las comparaciones de las abundancias e intensidades medias ($t=0.16$, $p=0.87$ y $t=0.47$, $p=0.64$, respectivamente).

Las pulgas fueron identificadas como:

Pulex irritans Linnaeus 1758
(Familia Pulicidae)

Especímenes estudiados.— 92 ♀ en 18 individuos de *L. griseus* y en 2 individuos de *L. culpaeus*; 52 ♂ en 14 individuos de *L. griseus* y 1 individuo de *L. culpaeus*.

Índices parasitológicos.—

Valores totales: n = 144, P = 80.80%, AM = 5.54, IM = 6.85; PNBPJ: n = 100, P = 77.8%, AM = 5.56, IM = 7.14; PNML: n = 44, P = 87.5 %, AM = 5.50, IM = 6.29. Las comparaciones de prevalencias, abundancias e intensidades medias de *P. irritans* entre parques nacionales no mostraron diferencias significativas ($G=0.36$, $p=0.55$; $t=0.02$, $p=0.98$ y $t=0.296$, $p=0.77$, respectivamente).

Lycalopex griseus: n = 113, P = 79.20%, AM = 4.71, IM = 5.95; *Lycalopex griseus* de PNBPJ: n = 69,

P = 75.0 %, AM = 4.31, IM = 5.75; *Lycalopex griseus* de PNML: n = 44, P = 87.50 %, AM = 5.50, IM = 6.29. Las comparaciones de prevalencias, abundancias e intensidades medias de *P. irritans* en *L. griseus* entre Parques Nacionales no mostraron diferencias significativas ($G=0.54$, $p=0.46$; $t=0.68$, $p=0.50$ y $t=0.31$, $p=0.76$, respectivamente).

Lycalopex culpaeus: n = 31, P = 100%, AM = 15.50, IM = 15.50

Comentarios.— Se trata de una especie de pulga cosmopolita. En Argentina se distribuye en localidades de todas las regiones geográficas. No obstante, no se menciona para la provincia de Santa Cruz, y su distribución más austral en el país es la localidad Epuyén de la provincia del Chubut (Lareschi et al. 2016). *Pulex irritans* se menciona en la Argentina parasitando un amplio rango de mamíferos domésticos y silvestres de los órdenes Artiodactyla, Didelphimorphia, Carnivora, Lagomorpha y Rodentia. Se la registró previamente parasitando a *L. griseus* y *L. gymnocercus* (Lareschi et al. 2016), y este es el primer registro de la especie asociada a *L. culpaeus*. El presente hallazgo constituye una ampliación de la distribución geográfica de *P. irritans* hacia el sur y del rango de hospedadores.

Polygenis (Polygenis) platensis (Jordan & Rothschild, 1908) (Familia Rhopalopsyllidae, Subfamilia Rhopalopsyllinae)

Especímenes examinados.— 6 ♀ en 3 individuos de *L. griseus* y en 1 ejemplar de *L. culpaeus*; 1 ♂ en 1 ejemplar de *L. griseus*.

Índices parasitológicos.—

Valores totales: n = 7, P = 19.20%, AM = 0.27, IM = 1.40; PNBPJ: n = 7, P = 27.80%, AM = 0.39, IM = 1.40

Lycalopex griseus: n = 6, P = 16.70%, AM = 0.25, IM = 1.50; *Lycalopex griseus* de PNBPJ: n = 6, P = 25.0%, AM = 0.38, IM = 1.50

Lycalopex culpaeus: n = 1, P = 50.0%, AM = 0.50, IM = 1

Comentarios.— Esta especie de pulga se distribuye en Bolivia, Brasil, Chile, Uruguay y Argentina. En este último país, se registra en varias localidades de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Chubut, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Río Negro, Salta, San Luis, Santa Cruz y Santiago del Estero (Lareschi et al. 2016). Si bien se la registró asociada a aves, parasita principalmente mamíferos de diversos órdenes, en su mayoría roedores (Lareschi et al. 2016); este registro es la primera mención de la asociación de *P. (P.) platensis* con *Lycalopex*.

Los registros de pulgas parásitas de zorros de la Argentina son hallazgos accidentales. Para *L. gymnocercus* de localidades del centro y norte del país, se mencionan dos especies de la familia Pulicidae (*Pulex irritans*, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835)) y dos de la familia Rhopalopsyllidae, subfamilia Parapsyllinae (*Delostichus talis* (Jordan, 1936) y *Ectinorus (Ectinorus) barrerai* Jordan, 1939) (Lareschi et al. 2016); mientras que para *L. culpaeus*, solamente se cita a *Malacopsylla grossiventris* (Weyenbergh, 1879) (Malacopsyllidae). En *L. griseus*, se conoce un mayor número de pulgas de diversas familias, que incluye junto a las especies anteriormente nombradas para *L. gymnocercus* y *L. culpaeus*, a *Phthiropsylla agenoris* (Rothschild, 1904) (Malacopsyllidae) y *Ectinorus (Ectinorus) ixanus* (Jordan, 1942) (Rhopalopsyllidae, Parapsyllinae). Los resultados obtenidos en el presente trabajo son novedosos ya que amplían la nómina de pulgas de zorros de la Argentina, y en particular de la Patagonia, dado que los registros más australes citados en la bibliografía para el país son de la provincia de Mendoza (Autino & Lareschi 1998).

Los estudios ecológicos sobre pulgas de zorros se han desarrollado principalmente en la Región Holártica (Aubert & Beaucournu 1976; Sréter et al. 2003; Dobler & Pfeffer 2011; Foley et al. 2017). En lo que respecta a Sudamérica, y en particular para el género *Lycalopex*, la bibliografía solo incluye un trabajo para *L. culpaeus* de Chile, donde se registra por primera vez para ese país a *P. irritans* parasitando a dicha especie de zorro, sin mencionar la prevalencia y abundancia de la infestación (Rubio et al. 2013). Dentro del continente americano se conocen además estudios para zorros de Brasil, exclusivamente del género *Cerdocyon* Smith, 1839. En dichos estudios las distintas especies de pulgas se registraron con diferencias en sus prevalencias y abundancias medias a lo largo de las localidades analizadas. Se observó que *Rhopalopsylus lutzi lutzi* (Baker, 1904) (Rhopalopsyllidae) fue la más abundante y prevalente en el estado de Bahía (Cerdeira et al. 2000), mientras que *P. irritans* junto a *C. felis felis* lo fueron para el estado de Pernambuco (Sá Santos et al. 2016) y para Minas Gerais (Curi et al.

2010). Dado que *C. felis felis* es una pulga típica de perros y gatos domésticos, su presencia y abundancia en los dos últimos estados indicó una mayor conexión del zorro con el ambiente doméstico (Sá Santos et al. 2016).

En el presente estudio se obtuvieron altos valores de prevalencia, abundancia e intensidad media de pulgas en *L. griseus* y *L. culpaeus* en ambos parques nacionales, sin observarse diferencias significativas de dichos índices entre áreas. De las especies de pulgas identificadas, *P. irritans* es un componente típico en los ensambles parasitarios de zorros, registrándose en asociación con varios géneros como *Vulpes* Frisch, 1775, *Urocyon* Baird, 1857, *Cerdocyon* y *Lycalopex*, a lo largo de todo el mundo (Aubert & Beaucournu 1976; Sréter et al. 2003; Dobler & Pfeffer 2011; Foley et al. 2017). En contraste, *P. (P.) platensis* se registra por primera vez parasitando a un género de zorros. *Pulex irritans* se halló en ambos parques nacionales y especies hospedadoras con altos valores de prevalencia ($\geq 75\%$), abundancia media (≥ 4.3) e intensidad media (≥ 5.7), demostrando que su asociación con *Lycalopex* no es accidental. Mientras que *P. (P.) platensis*, fue hallada en ambas especies de zorros, con bajos valores de dichos índices y solo se registró en las poblaciones del PNBJP. Dado que los roedores son los hospedadores principales de *P. (P.) platensis* y asimismo constituyen una de las presas habituales de los zorros (Zapata et al. 2005), la asociación entre esta especie de pulga y las especies de zorros estudiadas, implicaría una relación depredador-presa, vía común de colonización en sifonápteros (Marshall 1981).

En este contexto, la información obtenida en el presente estudio referida a ecología parasitaria es novedosa para pulgas asociadas a zorros, y en particular para *P. irritans* de la Argentina por su importancia sanitaria. Esta especie de pulga es conocida como vector de varios agentes patógenos que incluyen las bacterias causantes de la peste bubónica (*Yersinia pestis*) y el tifus murino (*Rickettsia typhi*) (Bitam et al. 2010). En este sentido, la ampliación de su distribución, junto con su elevada prevalencia y abundancia observada en zorros de la Patagonia pueden implicar un riesgo sanitario. Estos resultados son de importancia para estudios epidemiológicos.

lógicos posteriores, así como para establecer medidas de prevención y control de zoonosis en la región.

Agradecimientos. Agradecemos al personal del Parque Nacional de los Bosques Petrificados de Jaramillo y del Parque Nacional Monte León su ayuda y apoyo durante el trabajo de campo; a Diego E. Procopio, Mariana Martínez, Leo Martínez y José V. López-Bao por su colaboración en la obtención del material; a Estrella Montalibet y Susana Yranek por su colaboración en las tareas de laboratorio y a Javier Millán. Los muestreos fueron financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Gobierno de España; CGL2011-27469) y por fondos FEDER de la Unión Europea. Los trabajos de laboratorio fueron financiados por la Universidad Nacional de La Plata (N753 a ML).

LITERATURA CITADA

- AUBERT, M. F. A., & C. BEAUCOURNU. 1976. Contribution à l'étude du parasitisme du Renard (*Vulpes vulpes* L.) et de quelques autres carnivores sauvages par les Siphonaptères dans le Nord-Est de la France. Annals of Parasitology 51:143-146.
- AUTINO, A., & M. LARESCHI. 1998. Capítulo 27: Siphonaptera. Biodiversidad de artrópodos argentinos. Una perspectiva biotaxonómica (J. J. Morrone & S. Coscarón, eds.) Ediciones Sur, La Plata.
- BITAM, I., K. DITTMAR, P. PAROLA, M. F. WHITING, & D. RAOULT. 2010. Fleas and flea-borne diseases. International Journal of Infectious Diseases 14:667-676.
- BUSH, A. O., K. D. LAFFERTY, J. M. LOTZ, & A. W. SHOSTAK. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms. Margolis et al. revised. Journal of Parasitology 83:575-583.
- CERQUEIRA, E. J. L., E. M. SILVA, A. F. MONTE-ALEGRE, & I. A. SHERLOCK. 2000. Considerações sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa *Cerdocyon thous* (Canidae) da área endêmica de leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33:91-93.
- CURI, N. H. A. ET AL. 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. Biodiversity and Conservation 19(12):3513-3524.
- DÍAZ, M. M., & M. LUCHERINI. 2006. Familia Canidae. Mamíferos de Argentina. Sistemática y distribución (R. M. Báquez, M. M. Díaz & R. A. Ojeda, eds.) Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, Tucumán.
- DOBBLER G., & M. PFEFFER. 2011. Fleas as parasites of the family Canidae. Parasites and Vectors 4:2-12.
- FOLEY, P. ET AL. 2017. Diversity of flea (Siphonaptera) parasites on red foxes (*Vulpes vulpes*) in Romania. Journal of Medical Entomology 54:1243-1250.
- GONZÁLEZ, L., & P. RIAL. 2004. Guía geográfica interactiva de Santa Cruz. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ediciones, ErreGé y Asociados, Buenos Aires.
- HOPKINS G. H. E., & M. ROTHSCHILD. 1953. An illustrated catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History). Volume I. Tungidae and Pulicidae. The Trustees of the British Museum, London.
- LARESCHI M., J. P. SANCHEZ, & A. AUTINO. 2016. A review of the fleas (Insecta-Siphonaptera) from Argentina. Zootaxa 4103:239-258.
- LINARDI, P. M., & L. R. GUIMARÃES. 2000. Sifonápteros do Brasil. Museu de Zoologia-USP, FAPESP, São Paulo.
- MARSHALL, A. 1981. The ecology of ectoparasitic insects. Academic Press, London.
- OLIVA, G., L. GONZÁLEZ, P. RIAL, & E. LIVRAGHI. 2001. El ambiente en la Patagonia austral. Ganadería sustentable en la Patagonia austral (P. Borrelli & G. Oliva, eds.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Patagonia Sur, Trelew, Chubut, Argentina.
- RUBIO, A., F. FREDES, & C. BONACIC. 2013. Serological and parasitological survey of free-ranging culpeo foxes (*Lycalopex culpaeus*) in the Mediterranean biodiversity hotspot of Central Chile. Journal of Animal and Veterinary Advances 12:1445-1449.
- SÁ SANTOS, E. M. ET AL. 2016. Ticks and fleas in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) of Pernambuco state, Brazil. Brazilian journal Veterinary and Animal Science 53:295-299.
- SANCHEZ, J. P. 2013. Sifonápteros parásitos de los roedores sigmodontinos de la Patagonia norte de la Argentina: estudios sistemáticos y ecológicos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de la Plata, La Plata.
- SMIT, F. G. A. M. 1987. An illustrated catalogue of the Rothschild Collection of fleas Siphonaptera in the British Museum (Natural History). Vol. VII. Malacopsylloidea (Malacopsyllidae and Rhopalopsyllidae). Oxford University Press, Oxford & Londres.
- SRÉTER, T., Z. SZÉLLA, & I. VARGA. 2003. Ectoparasite infestations of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. Veterinary Parasitology 115:349-354.
- TRAVAINI, A., & M. DELIBES. 1994. Immobilization of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) with tiletamine hydrochloride and zolazepan hydrochloride. Journal of Wildlife Diseases 1:52-56.
- TRAVAINI, A., R. LAFFITTE, & M. DELIBES. 1996. Leg-hold trapping red foxes (*Vulpes vulpes*) In Doñana National Park: efficiency, selectivity, and injuries. Journal of Wildlife Research 90:589-591.
- VACCARO, G. E., O. B. CANEVARI, & A. L. GARDNER. 1995. Taxonomy of the genus *Lycalopex* (Carnivora: Canidae) in Argentina. Proceedings of the Biological Society of Washington 108:729-747.
- ZAPATA, S. C., A. TRAVAINI, M. DELIBES, & R. MARTÍNEZ-PECK. 2005. Food habits and resource partitioning between grey and culpeo foxes in southeastern Argentine Patagonia. Studies on Neotropical Fauna and Environment 40:97-103.
- ZAR, J. H. 1999. Biostatistical Analysis, 4th edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.