

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE MANUTENÇÃO DA FASE NÃO PARASITÁRIA SOBRE A FASE PARASITÁRIA DE *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE).

V. BELLATO¹ & E. DAEMON².

(1) Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UFES), Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, SC, CEP 88250-000;

(2) Dpto de Parasitologia Animal/IB/UFRRJ, km 47 antiga Rio-São Paulo, Seropédica, RJ, CEP 23851-970.

SUMÁRIO: Com objetivo de estudar o efeito de três temperaturas de manutenção da fase não parasitária sobre a duração do período parasitário e percentual de recuperação de ninfas, fêmeas e larvas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*, foi realizado o presente experimento no período de março de 1993 a setembro de 1994. Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, coletadas de cães naturalmente infestados, foram mantidas, para a postura e produção de larvas, em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. de $80 \pm 10\%$ e escotofase. As larvas obtidas foram alimentadas em coelhos e transferidas para as temperaturas de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $32 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. de $80 \pm 10\%$ e escotofase, fornecendo de cada temperatura, material para outras infestações e estudo da fase parasitária do ciclo biológico. Os resultados mostraram que os adultos pertencentes ao grupo mantido a 18°C tiveram uma fase parasitária significativamente ($p < 0,05$) mais longa ($13,54 \pm 0,23$ dias) do que aqueles dos grupos mantidos a 27°C ($9,69 \pm 0,43$ dias) ou 32°C ($9,57 \pm 0,49$ dias). O oposto ocorreu com as ninfas, que apresentaram a fase parasitária mais longa ($5,16 \pm 0,06$ dias) no grupo mantido a 32°C , enquanto $4,87 \pm 0,12$ dias e $4,30 \pm 0,09$ dias foram observados nos grupos mantidos a 27 e 18°C , respectivamente. Não houve diferenças significativas nos percentuais de recuperação de todos os estágios do ciclo. As diferenças de peso não diferiram estatisticamente para larvas e ninfas, porém foram significativas ($p < 0,05$) em adultos, que mostraram uma média de $171,05 \pm 9,67$ mg, $152,67 \pm 4,42$ mg e $91,87 \pm 1,47$ mg nos grupos mantidos a 27 , 32 e 18°C , respectivamente.

PALAVRAS - CHAVE: : *Rhipicephalus sanguineus*, temperatura, fase parasitária.

INTRODUÇÃO

A espécie *Rhipicephalus sanguineus*, segundo LINARDI & NAGEM (1973) está amplamente distribuída em todo o território nacional. Embora PEGRAM *et al.* (1987) tenham confirmado a presença de cinco espécies dentro do grupo *sanguineus* na região Afrotropical, RIBEIRO (1995) estudou variações morfológicas de *Rhipicephalus* coletados em cães de diferentes regiões geográficas do território nacional e classificou os espécimens como *R. sanguineus*, provavelmente, segundo o autor, a única espécie do gênero nas regiões estudadas. Apesar de sua importância principalmente como transmissor de agentes patogênicos, poucos estudos sobre

este ixodídeo trioxeno foram realizados no Brasil. Utilizando coelhos como hospedeiros, foram desenvolvidos trabalhos por CUNHA (1978), COELHO (1993) e SARTOR (1994). BECHARA *et al.* (1995) desenvolveu a fase parasitária em cão doméstico, cachorro-do-mato, cobaia e hamster.

A necessidade de conhecer o desempenho biológico sob diferentes condições de temperatura e obter, deste modo, subsídios importantes para estudos mais aprofundados sobre a dinâmica populacional e, como consequência, elaborar programas de controle mais eficazes, motivou a realização do presente trabalho. Os objetivos foram os de verificar o efeito de três temperaturas, na fase não parasitária, sobre a duração do período parasitário e percentual de recuperação de ninfas, fêmeas e larvas ingurgitadas de *R. sanguineus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. NEITZ (EPPWON) do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no período de março de 1993 a setembro de 1994. O estudo da fase parasitária foi realizado em condições ambientais, os instares durante a fase não parasitária foram mantidos em condições controladas no laboratório de Ixodologia da EPPWON.

Foram utilizados como hospedeiros exemplares da espécie *Oryctolagus cuniculus* (L., 1758), coelhos mestiços (Califórnia x Nova Zelândia) com idade entre 60 e 90 dias, de ambos os sexos, com peso inicial entre 1,5 e 2,1 kg, sem contato prévio com carrapatos e produtos acaricidas. Os animais foram mantidos durante o período experimental em gaiolas individuais, em condições ambientais, onde receberam ração comercial para coelhos e água.

Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram coletadas de cães (*Canis familiaris* L., 1758), naturalmente infestados e sem contato recente com carrapaticidas, no bairro Campo Grande, cidade do Rio de Janeiro. Após a coleta, as mesmas foram limpas com pincel de cerdas macias, identificadas (confirmação realizada por RIBEIRO, 1995), pesadas, acondicionadas individualmente em placas de Petri e transferidas para câmara climatizada regulada à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (U.R.) de $80 \pm 10\%$ e em escotofase. Os ovos de cada fêmea foram coletados a cada três dias após o início da postura, pesados, reunidos e, em grupos de 100 mg, acondicionados em seringas plásticas descartáveis, com capacidade de 10 ml, previamente preparadas, identificadas e mantidas nas mesmas condições controladas descritas para as fêmeas ingurgitadas. Após a eclosão, um grupo de cinco coelhos foi infestado através da técnica do saco de pano aderido à base das orelhas (NEITZ *et al.*, 1971), recebendo cada animal, aproximadamente 2.500 larvas com 15 a 25 dias de jejum. Diariamente, pela manhã, os sacos foram abertos e as larvas ingurgitadas desprendidas de cada coelho, coletadas, contadas e pesadas, sendo o material identificado por hospedeiro e data de coleta.

A partir das larvas coletadas, todo o desenvolvimento da fase não parasitária foi realizado separadamente em câmaras climatizadas, reguladas em três diferentes temperaturas (tratamentos), $18 \pm 1^\circ\text{C}$, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $32 \pm 1^\circ\text{C}$. As temperaturas extremas correspondem às médias das máximas e das mínimas da região onde foi realizado o estudo, enquanto a temperatura de 27°C é aquela comumente empregada no estudo da biologia de carrapatos de regiões tropicais. Para os três tratamentos a U.R. foi de $80 \pm 10\%$ e escotofase.

Seringas com 100 larvas ingurgitadas foram preparadas e distribuídas nas diferentes temperaturas. Após 15 a 25 dias da ecdise, para o estudo da fase parasitária de ninfas, foram utilizados exemplares procedentes de cada temperatura, realizando-se infestações, conforme técnica citada para larvas, em cinco coelhos por tratamento, na razão de 200 ninfas por coelho. Após o desprendimento natural das ninfas ingurgitadas os exemplares foram coletados, contados, pesados e acondicionados em seringas plásticas seguindo as temperaturas de procedência dos instares, na razão de 20 ninfas por seringa. Após 15 a 25 dias da ecdise, para o estudo da fase parasitária de fêmeas foram infestados cinco coelhos por tratamento, com 10 machos e 15 fêmeas por coelho e as fêmeas desprendidas naturalmente, coletadas dos sacos de pano, contadas, pesadas, acondicionadas em placas de Petri e distribuídas nas respectivas temperaturas para a realização das posturas. Seringas com 100mg de ovos foram preparadas para a produção de larvas as quais foram utilizadas nas infestações em cinco coelhos por temperatura de procedência dos instares, com 2.500 larvas por coelho, conforme metodologia anteriormente descrita.

As atividades relacionadas com o acompanhamento da fase experimental foram realizadas diariamente pela manhã.

A análise da fase parasitária de ninfas, adultos e larvas, instares procedentes de três diferentes temperaturas foi realizada levando-se em consideração:

- Período parasitário- compreendido desde a infestação até o desprendimento e coleta dos instares ingurgitados.

- Percentual de recuperação- total dos instares ingurgitados coletados em relação ao total de indivíduos utilizados nas infestações.

Para comparação estatística foi utilizada a Análise da Variância (ANOVA) e o teste Duncan.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Fase Parasitária de ninfas: Os parâmetros biológicos da fase parasitária de ninfas de *R. sanguineus*, alimentadas em coelhos, estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Período parasitário, percentagem de recuperação e peso de ninfas ingurgitadas (média \pm desvio padrão) de *R. sanguineus*, coletadas de coelhos infestados artificialmente com 200 ninfas cada, procedentes de 18, 27 e 32°C , U.R. de $80 \pm 10\%$ e escotofase

| Parâmetros | Temperatura | | |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | $18 \pm 1^\circ\text{C}$ | $27 \pm 1^\circ\text{C}$ | $32 \pm 1^\circ\text{C}$ |
| Per.Parasit. (dias) | 3 - 7 $4,30^a \pm 0,09$ | 4 - 8 $4,87^a \pm 0,12$ | 4 - 8 $5,16^a \pm 0,06$ |
| Recuperação (%) | 62,50 - 94,00 $82,40^a \pm 6,48$ | 83,00 - 96,50 $91,20^a \pm 2,48$ | 77,50 - 96,50 $88,30^a \pm 3,80$ |
| Peso (mg) | 3,53 | 3,94 | 3,73 |

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 0,05.

Foi observado um aumento no período parasitário dos instares procedentes da temperatura menor para a mais elevada e o maior percentual de recuperação, bem como o maior peso, foi obtido com instares procedentes da temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05 para o período parasitário nas três temperaturas, o mesmo não ocorrendo com o percentual de recuperação.

Pode-se afirmar que as diferenças encontradas em relação ao ciclo parasitário, no presente trabalho, estão relacionadas com as condições de temperatura de procedência dos instares. Este efeito, não comentado na literatura consultada, provavelmente decorre da ação das diferentes temperaturas sobre a fisiologia do carrapato. Embora SALEH *et al.* (1978) constatassem um período de ingurgitamento ninfal menor mantendo coelhos em temperaturas mais altas, NASSAR *et al.* (1971) e SARDEY & RAO (1973) afirmaram que a temperatura e a U. R. em que são mantidos os hospedeiros pouco ou nada interferem no período parasitário de ninfas.

Os resultados obtidos neste experimento, comparando-se as médias e/ou limites de variação com outros realizados em coelhos, sobre o período parasitário de ninfas, são semelhantes aos observados por FELDMAN-MUHSAM (1964) para instares procedentes da temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Resultados semelhantes aos observados para as ninfas procedentes da temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ da atual pesquisa, são encontrados nos trabalhos de CUNHA (1978) e KOSHY *et al.* (1983). SARTOR (1994) observou um período parasitário e peso semelhantes, todavia o percentual de recuperação foi menor.

2. Fase parasitária de fêmeas: Os parâmetros biológicos da fase parasitária de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas em coelhos estão expressos na Tabela 2.

Foi observado um aumento no período parasitário quando foram alimentados em coelhos, instares procedentes da temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$. O peso médio e a percentagem de recuperação também foram menores quando comparados com a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $32 \pm 1^\circ\text{C}$. A análise estatística

demonstrou diferença significativa ao nível de 0,05 entre as médias do período parasitário e do peso médio para os instares provenientes de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ comparado com os demais tratamentos, não havendo diferença entre os procedentes das temperaturas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Na literatura consultada, somente SARDEY & RAO (1973) consideraram que a diminuição da temperatura onde são mantidos os hospedeiros aumenta o período de ingurgitamento de fêmeas de *R. sanguineus*. Afirmaram ainda, que a idade e a espécie do hospedeiro interferem no ciclo parasitário de adultos, pois, segundo os autores, em cães jovens o período parasitário foi menor quando comparado com cães adultos, ficando em situação intermediária quando alimentados em coelhos. FAHMY *et al.* (1977) observaram um maior período de alimentação dos instares mantidos em condições ambientais durante o inverno em relação ao verão. Considerando as condições experimentais do presente trabalho, pode-se afirmar que o principal fator a interferir no aumento do período parasitário, no menor percentual de recuperação e no menor peso das fêmeas ingurgitadas foi a atuação da temperatura na fase não parasitária, que pode ter influenciado no ciclo do parasito desde a ecdise larval na temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, com pequeno reflexo sobre a fase parasitária de ninfas, porém, apresentando diferença bastante acentuada na fase parasitária de adultos.

Os resultados obtidos para os instares procedentes da temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $32 \pm 1^\circ\text{C}$, com relação ao período parasitário de fêmeas em coelhos, são semelhantes, considerando o limite de variação e/ou média, aos de MAHADEV (1977), CUNHA (1978) e SARTOR (1994). Esta última autora observou ainda, resultados semelhantes para o percentual de recuperação e peso médio das fêmeas ingurgitadas. PAUL *et al.* (1970) observaram um período parasitário maior, considerando a soma dos períodos de pré-alimentação e alimentação. O peso das fêmeas ingurgitadas ficou abaixo do encontrado para os instares procedentes das temperaturas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $32 \pm 1^\circ\text{C}$ deste estudo, porém, os autores não citaram se os coelhos foram utilizados em mais de uma infestação, o que poderia resultar em aquisição da imunidade (COELHO, 1993). NASSAR *et al.* (1971), também sem esclarecer se reinfestaram os animais, encontraram períodos de pré-alimentação e alimentação de fêmeas crescentes nas diversas gerações estudadas, variando em média de 8,6 dias na primeira geração a 13,3 dias na quarta geração. Períodos de ingurgitamento menores foram encontrados por SALEH *et al.* (1978) e KOSHY *et al.* (1983). As diferenças observadas pelos diversos autores podem estar relacionadas com a idade dos adultos quando das infestações, técnica de infestação, utilização de hospedeiros com ou sem infestações prévias, temperatura de procedência dos instares e com as cepas de carrapatos.

Tabela 2 - Período parasitário, percentagem de recuperação e peso de fêmeas ingurgitadas (média \pm desvio padrão) de *R. sanguineus*, coletadas de coelhos infestados artificialmente com 10 machos e 15 fêmeas cada, procedentes de 18, 27 e 32°C , U.R. de $80 \pm 10\%$ e escotofase

| Parâmetros | Temperatura | | |
|------------------------|---|--|--|
| | $18 \pm 1^\circ\text{C}$ | $27 \pm 1^\circ\text{C}$ | $32 \pm 1^\circ\text{C}$ |
| Per.Parasit. (dias) | 9 - 21 13,54 ^a \pm 0,23 | 7 - 18 9,69 ^b \pm 0,43 | 7 - 19 9,57 ^b \pm 0,49 |
| Recuperação (%) | 60,00 - 100,00 76,00 ^a \pm 6,87 | 66,70 - 93,30 82,67 ^a \pm 4,98 | 73,30 - 100,00 85,32 ^a \pm 4,43 |
| Peso (mg) | 50,00 - 132,70 91,87 ^a \pm 6,87 | 78,00 - 236,00 171,06 ^b \pm 9,67 | 50,50 - 219,10 152,65 ^b \pm 4,32 |

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 0,05.

3. Fase parasitária de larvas: Os parâmetros biológicos da fase parasitária de larvas de *R. sanguineus* alimentadas em coelhos estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Período parasitário, percentagem de recuperação e peso de larvas ingurgitadas (média \pm desvio padrão) de *R. sanguineus*, coletadas de coelhos infestados artificialmente com aproximadamente 2.500 larvas cada, procedentes de 27 e 32°C, U.R. de 80 \pm 10% e escotofase

| Parâmetros | Temperatura | |
|----------------------------|--|--|
| | 27 \pm 1°C | 32 \pm 1°C |
| Período parasitário (dias) | 3 - 8 4,17 ^a \pm 0,13 | 3 - 7 4,28 ^a \pm 0,14 |
| Recuperação (%) | 44,80 - 88,40 66,04 ^a \pm 7,50 | 31,70 - 57,50 48,22 ^a \pm 4,95 |
| Peso (mg) | 0,30 | 0,27 |

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 0,05.

O período parasitário foi semelhante nas duas temperaturas (na temperatura de 18 \pm 1°C não houve continuidade do ciclo). Tanto o período parasitário como o percentual de recuperação não apresentaram diferença estatística significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Os resultados obtidos sobre período parasitário, comparando-se as médias e/ou limites de variação, são similares aos observados por PAULI *et al.* (1970); FUJISAKI *et al.* (1976) e CUNHA (1978). Período menor, comparado com o do atual experimento, foi encontrado por SALEH *et al.* (1978) e KOSHY *et al.* (1983). Período maior foi encontrado por FELDMAN-MUHSAM (1964). Estas diferenças devem estar relacionadas com a metodologia, idade das larvas ou com a cepa de carrapatos. FUJISAKI *et al.* (1976) e SARTOR (1994) encontraram uma média do peso das larvas, semelhante ao deste estudo, todavia, a média do período parasitário observado pela autora e o percentual de recuperação foram menores.

Pode-se portanto considerar que as temperaturas de procedência dos instares (27 \pm 1°C e 32 \pm 1°C) não apresentaram efeito marcante na fase parasitária de larvas.

SUMMARY

The present experiment was carried out to study the effect of three temperatures in the non parasitic phase, on the parasitic period and recuperation percentage of engorged nymphs, females and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. The experiment was conducted from march 1993 to september 1994.

Engorged females of the tick, collected from naturally infested dogs, were kept at 27 \pm 1°C, 80 \pm 10% RH and escotophase for oviposition and larval production. The larvae obtained were fed on rabbits. These larvae were transferred to

the temperature of 18, 27 and 32°C, 80% RH and escotophase, furnishing of each temperature, material for others infestations and to study of the parasitic phases of the tick life-cycle. Results showed that adults from the group exposed to 18°C had a significantly ($p < 0,05$) longer parasitic phase (13,54 \pm 0,23 days) than those from groups kept at 27°C (9,69 \pm 0,43 days) or 32°C (9,57 \pm 0,49 days). The opposite happened with nymphs. They showed the longest parasitic period (5,16 \pm 0,06 days) in the group exposed to 32°C while 4,87 \pm 0,12 days and 4,30 \pm 0,09 days were observed in the groups exposed to 27 and 18°C, respectively. The three parasite stages showed no statistically significant differences of the percentage of tick recovery. Tick weight differences were not statistically different on larvae and nymphs, but were significant ($p < 0,05$) in adults, that showed an average of 171,06 \pm 9,67 mg, 152,67 \pm 4,42 mg and 91,87 \pm 1,47 mg in the groups exposed to 27, 32 and 18°C, respectively.

KEY WORDS: *Rhipicephalus sanguineus*, temperature, parasitic phase.

REFERÊNCIAS

- BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J.; FERREIRA, B.R. & GARCIA, M.V. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 4 (2): 61-66.
- COELHO, C.F. 1993. *Biologia da fase não parasitária de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) sob condições de laboratório: aspectos da oviposição*. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 52 p.
- CUNHA, D.W. 1978. *Estudos da toxicidade de alguns carrapatos comumente encontrados no Brasil (Acarina: Ixodidae)*. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 78 p.
- FAHMY, M.A.M., MANDOUR, A.M. & ARAFA, M.S. 1977. Certain biological and ecological observations on *Rhipicephalus s. sanguineus* (Latreille, 1806) in Assiut Area, Upper Egypt. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, 7(1): 25-34.
- FELDMAN-MUHSAM, B. 1964. Laboratory colonies of *Rhipicephalus*. *Bulletin of World Health Organization*, 31: 587-589.
- FUJISAKI, K., KITAOKA, S. & MORII, T. 1976. Comparative observations on some bionomics of japonese ixodid ticks under laboratory cultural conditions. *National Institute for Animal Health Quart.*, 16:122-128.

- KOSHY, T.J., RAJAVELU, G. & LALITHA, C.M. 1983. On the life cycle of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Cheiron*, 12(6):337-338.
- LINARDI, P.M. & NAGEM, R.L. 1973. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães em Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Revista Brasileira de Biologia*, 33(4):529-538.
- MAHADEV, P.V.M. 1977. Life cycle, feeding behavior and ovipositional ability of *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acarina: ixodidae). *Indian Journal of Acarology*, 2:12-20.
- NASSAR, M.S., HAMMAD, S.M. & EL KOUHARY, A.S. 1971. The biology of the brown dog tick *Rhipicephalus s. sanguineus*. *Bull. Soc. Ent. Egypte.*, 55:409-418.
- NEITZ, W.O.D., BOUGHTON, F. & WALTERS, H.S. 1971. Laboratory investigations on the life cycle of Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 38(3):215-224.
- PAUL, C.F., KAPOOR, D. & PERTI, S.L. 1970. Studies on the life-history and development of ticks. *Lahdev. J. Sci. Tech.*, 8(2):80-83.
- PEGRAM, R.G., KEIRANS, J.F., CLIFFORD, C.M. & WALKER, J.B. 1987. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Systematic Parasitology*, 10(1):27-44.
- RIBEIRO, A.L. 1995. *Estudo das variações morfológicas de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no Brasil*. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 38 p.
- SALEH, R.S., EL-GAYAR, F. & SHAZLI, A. 1978. Biological studies on *Rhipicephalus sanguineus sanguineus* Latr. Alex. *Journal of Agricultural Research*, 26(3):653-657.
- SARDEY, M.R. & RAO, S.R. 1973. Observations on the life-history and bionomics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) under different temperatures and humidities. *Indian Journal of Animal Science*, 43(9):867-869.
- SARTOR, A.A. 1994. *Aspectos da biologia de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 80 p.

(Received 1 November 1996, Accepted 26 February 1997)