

Artículo Original/ Original Article

<http://dx.doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.03.06>

Rendimiento del Kit de Chagas V2.0 IICS-UNA para el tamizaje de la enfermedad

***María Eugenia Acosta-de Hetter**¹ , **Laura Aria**¹ , **Ivalena de Guillén**¹ ,
Alejandra Rojas¹ , **Belén Infanzón**¹ , **César Cantero**¹ , **Cynthia Bernal**¹ , **Kaspar Peter**² 

¹Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Producción. San Lorenzo, Paraguay

²Magellan bioConsult. Weilheim, Alemania

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Acosta de Hetter ME, Aria L, de Guillén I, Rojas A, Infanzón B, Cantero C, et al. Rendimiento del Kit de Chagas V2.0 IICS-UNA para el tamizaje de la enfermedad. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2022; 20(3): 06-12.

RESUMEN

En Paraguay la enfermedad de Chagas es endémica, siendo el número de personas infectadas de aproximadamente 165.000 y la población expuesta del 30% según registros del 2012. El objetivo del trabajo fue evaluar el ELISA Chagas test IICS V2.0 para tamizaje de la enfermedad en muestras de donantes de sangre. Se realizó un estudio transversal de pruebas diagnósticas, para lo que se incluyeron 775 muestras de suero provenientes de dos bancos de sangre, a partir de cuyos resultados se calculó la sensibilidad, valores predictivos positivo, negativo y la curva ROC. También se determinó la concordancia y correlación entre el ELISA Chagas test IICS V2.0 y un ELISA comercial. De las 775 muestras de bancos de sangre analizadas se obtuvo una sensibilidad del 99%, especificidad de 96%, VPP 96%, VPN 99% y un índice kappa igual a 0,95 (0,93-0,97) Error Estándar (EE) 0.01 y $p > 0,0001$ y el área ROC igual a 0,9835. Con respecto a la concordancia con el test comercial, el índice kappa fue de 0,926 IC95% (0,888-0,976), $p = 0,00001$ y el coeficiente de correlación $r = 0,971$ IC95% (0,962-0,978) $p = 0,0001$. Las concordancias obtenidas fueron muy buenas con respecto a la serología de las muestras de banco de sangre como la comparada con el test comercial, pudiendo utilizarse el kit de Chagas IICS V2 para el tamizaje de la enfermedad.

Palabras clave: enfermedad de Chagas, tamizaje, banco de sangre, sensibilidad, especificidad.

Performance of the IICS-UNA Chagas V2.0 Kit for screening of the disease

ABSTRACT

In Paraguay, Chagas disease is endemic, with approximately 165,000 infected people and 30% of the exposed population according to 2012 records. The objective of this study was to evaluate the ELISA Chagas test IICS V2.0 for screening of the disease in blood donor samples. We carried out a cross-sectional study of diagnostic tests, including 775 serum samples from two blood banks, and then calculating sensitivity, positive and negative values and the ROC curve. We also determined the concordance and correlation between the ELISA Chagas test IICS V2.0 and commercial ELISA. In the 775 blood bank samples analyzed, the Chagas ELISA test IICS V2.0 obtained a sensitivity of 99%, specificity of 96%, PPV 96%, NPV 99% and a kappa index equal to 0.95 (0.93-0.97) Standard Error (SE)

Fecha de recepción: agosto 2022. Fecha de aceptación: noviembre 2022

***Autor correspondiente: María Eugenia Acosta de Hetter.** Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Departamento de Producción. San Lorenzo, Paraguay.

Email: mea@iics.una.py/maruhetter@yahoo.com.mx.



0.01 and $p > 0.0001$ and the ROC area equal to 0.9835. Regarding the concordance with the commercial test, the kappa index was 0.926 CI95% (0.888-0.976), $p = 0.00001$ and the correlation coefficient $r = 0.971$ CI95%(0.962-0.978) $p = 0.0001$. The concordances obtained were very good with respect to the serology of the blood bank samples as compared to the commercial test, allowing the use of the Chagas IICS V2 kit for the disease screening.

Keywords: chagas disease, screening, blood bank, sensitivity, specificity, specificity.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas (ECh), causada por el hematozoario *Trypanosoma cruzi*, es una zoonosis que existe en 21 países de América⁽¹⁾. En Paraguay la enfermedad es endémica, siendo el número de personas infectadas de aproximadamente 165.000, y la población expuesta de 30 % en el 2012⁽²⁾. Los números de casos y tasas de incidencia de las Enfermedades de Notificación Obligatoria (ENO), comparativo en el mismo periodo de la semana epidemiológica (SE) 1 a la 30 de los años 2017, 2018 y 2019 se han informado como 393, 395 y 339 casos respectivamente⁽³⁾.

La enfermedad puede transmitirse mediante transfusión sanguínea (5-20%), en países como Argentina, Brasil y Chile se observan de 1,4 – 18% de casos y en Bolivia alcanza un 48%⁽⁴⁾. En bancos de sangre de Paraguay la prevalencia de esta enfermedad en los años 2001 – 2005 fue del 2,8 – 4,5%, y el 14% en la región de Boquerón -Chaco en el 2012^(4,5).

Como cita en la guía para el diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas en el 2018 por la OMS y OPS a los pacientes con sospecha diagnóstica de infección crónica por *T. cruzi* se sugiere utilizar el "estándar de diagnóstico", es decir, la combinación de dos pruebas serológicas con diferentes antígenos, convencionales con antígenos crudos o extractos solubles y no convencionales que utilicen combinaciones de proteínas recombinantes que detecten anticuerpos contra *T. cruzi* como el Ensayo inmunoenzimático (ELISA), Hemoaglutinación indirecta (HAI) o Inmunofluorescencia indirecta (IFI), y una tercera si los resultados de dichas pruebas son discordantes^(6,7).

Entre las pruebas de diagnóstico serológico, el ELISA cuenta con muchas ventajas operativas de automatización, registro e interpretación de los resultados, además de ofrecer una alta sensibilidad y especificidad^(8,9).

Evaluaciones realizadas con pruebas de ELISA comerciales, así como técnicas ELISA "in house", demostraron una sensibilidad del 100%. En cuanto a la especificidad, las técnicas convencionales que utilizan antígeno crudo son 100% específicas, no así las pruebas con antígenos recombinantes que pueden dar lugar a resultados falsos positivos⁽⁸⁾.

Asimismo, la mencionada guía menciona que el método de ELISA no solo es sensible sino también en la aplicación representa un menor costo frente a otros métodos por lo que existe una recomendación fuerte en utilizar el ELISA o el test inmunocromatográfico (ICT) para estudios poblacionales de prevalencia de la enfermedad de Chagas dando calidad de evidencia sobre la precisión diagnóstica de alta/moderada^(6,7).

Por lo mencionado anteriormente, también es recomendada la utilización del ELISA altamente sensibles o inmunoensayo quimioluminiscencia de micropartículas (CMIA) para el tamizaje de la enfermedad de Chagas en los servicios de Hemoterapia dando calidad de evidencia alta/moderada^(6,7).

Cabe mencionar que no todos los test comerciales emplean cepas de *T. cruzi* locales, por lo que es importante el desarrollo de pruebas de ELISA que utilicen estas cepas para mejorar la sensibilidad y especificidad. Por esta razón, el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud ha desarrollado un ELISA indirecto convencional que detecta IgG anti *T. cruzi* con el Chagas ELISA IICS v.1.0 que es utilizado en el sector privado y por el Programa Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas del Paraguay (SENEPA-MSPyBS) desde sus inicios pensado para trabajos de campo por la ventaja que ofrece la lectura a la vista⁽¹⁰⁾.

Por las exigencias tecnológicas se ha desarrollado el ELISA indirecto Chagas ELISA IICS V.2.0 en el marco del proyecto 14-INV-Conacyt con alta sensibilidad y especificidad para cumplir con los estándares de calidad exigidos y ser adaptado a los autoanalizadores para mayor eficiencia del proceso e interpretación por medio de índice. Por ello, se ha evaluado el kit de Chagas test IICS V2.0 para tamizaje de la enfermedad de Chagas, en muestras de banco de sangre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de pruebas diagnósticas de tipo transversal. Fueron incluidas 775 muestras de suero, con serología positiva (n=352) y serología negativa (n=423) para la enfermedad de Chagas provenientes de donantes de sangre que acudieron al Banco de Sangre del Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas, UNA y al Centro Nacional de Servicio de Sangre (CENSSA). La selección de las muestras de estos bancos de sangre se basó en los resultados positivos y negativos para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* por métodos automatizados. Todas ellas fueron colectadas entre los años 2014-2015 y almacenadas a -20°C hasta su utilización para este estudio. De las 775 muestras, fueron seleccionadas 224 para determinar la concordancia y correlación respecto a un test similar de ELISA.

ELISA

La prueba convencional Chagas ELISA IICS V.2.0 es un ensayo semicuantitativo para detectar anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* que utiliza antígeno crudo de epimastigotes de *T. cruzi* (ciclo completo Y) preparado en el Departamento de Medicina Tropical del IICS-UNA.

Las muestras y los controles fueron diluidos 50 veces, se agregaron 50 uL a los pocillos sensibilizados para luego incubar a 37° C durante 30 minutos. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados con un tampón de lavado. A continuación, se incubó con un segundo anticuerpo anti-IgG humano de cabra conjugado con enzima peroxidasa (IICS-UNA) a 37° C durante 30 minutos. Luego de tres lavados se agregó el sustrato ABTS (2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio) en tampón citrato y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para leer la densidad óptica (DO) a 405 nm. Todos los pasos son identificados por colores diferentes.

Para interpretar los resultados se calculó el índice, dividiendo la DO obtenida por el cut off ($I = \frac{DO}{Cutoff}$). El cut off se consideró como el promedio de dos o más controles negativos sumado 0,200.

Se consideró como negativo un índice menor o igual a 1; indeterminado entre 1 y 1,3 positivo mayor o igual a 1,3.

Para determinar la concordancia con una prueba no convencional, se utilizó la prueba Chagatest v.4.0 (Wiener, Rosario, Argentina), que utiliza antígenos recombinantes específicos de los estadios epimastigote y tripomastigote (SAPA, 1, 2, 13, 30 y 36) para la detección cualitativa de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico: Toda la información fue colectada y recopilada en hojas de cálculo de Microsoft Excel. Para los cálculos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), la curva ROC (Característica Operativa del Receptor) concordancia por índice kappa y el coeficiente de correlación de Pearson se utilizó el programa Epidat versiones 3.1 y 4.2. Se consideró para la significancia estadística una $p < 0,05$ para todos los análisis y un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Respecto a las 775 muestras de bancos de sangre, se obtuvo para el ELISA Chagas test IICS V2.0 una sensibilidad del 99%, especificidad de 96%, VPP 96%, VPN 99% y un índice kappa igual a 0,95 (0,93-0,97) Error Estándar (EE) 0,01 y

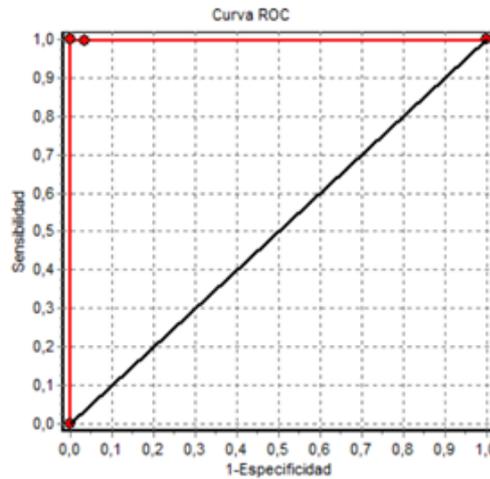
$p > 0,0001$, el cual es considerado casi perfecto. En la Tabla 1 se observa la distribución de los sueros analizados.

Tabla 1: Evaluación del kit Chagas test IICS V2.0 vs Banco de Sangre.

| ELISA IgG Chagas V2 | Sueros de banco de Sangre | | |
|---------------------|---------------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | Total |
| Positivo | 348 | 14 | 362 |
| Negativo | 4 | 409 | 413 |
| Total | 352 | 423 | 775 |

Sensibilidad del 99% (97-100%), Especificidad de 96% (95-99%), VPP 96% (94-98%), VPN 99% (97- 100%).

Se determinó la curva ROC para evaluar el desempeño del ELISA IgG Chagas V2.0 con respecto a los resultados de los bancos de sangre, en base a la sensibilidad y especificidad obtenidas. Se observa una excelente capacidad discriminativa de la prueba ya que está muy próximo a 1, dando el área bajo la curva igual a 0,9835. Figura 1



| Área ROC | EE | IC (95%) | | |
|----------|--------|----------|--------|-----------------|
| 0,9835 | 0,0044 | 0,9748 | 0,9921 | DeLong |
| | 0,0049 | 0,9739 | 0,9930 | Hanley & McNeil |

Figura 1: Curva ROC del ELISA IgG Chagas IICS V2.0 con respecto a los resultados de dos Bancos de Sangre Nacionales.

De 224 muestras positivas y negativas seleccionadas para determinar la concordancia con un test comercial (Wiener 4.0) para la enfermedad de Chagas, se obtuvo un índice kappa de 0,926 (0,888-0,976; error estándar de 0,0257) con una $p = 0,00001$ y un coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,971$ (0,962-0,978) con una $p = 0,0001$. En la Figura 2 se observa la correlación positiva entre ambos métodos de acuerdo con las densidades ópticas obtenidas.

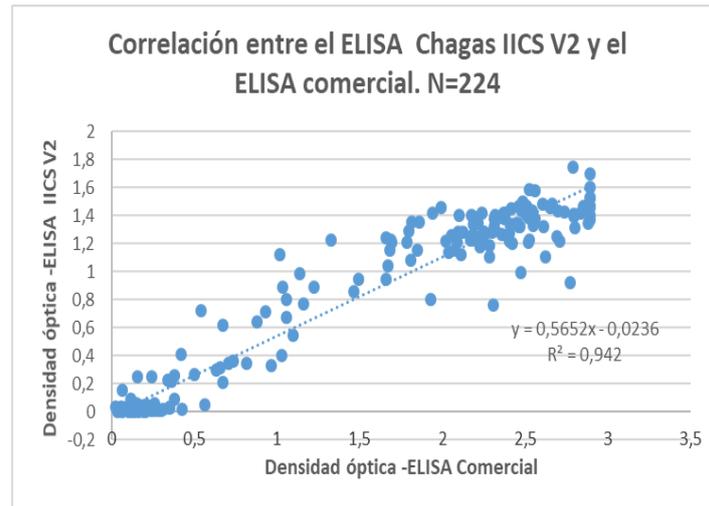


Figura 2: Correlación entre los ELISA IgG Chagas IICS V2.0 y el ELISA de Chagas comercial.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, la sensibilidad del Chagas test IICS V2.0 es de 99%, al comparar los resultados con los de los bancos de sangre (FCM, UNA y CENSSA).

En estudios realizados sobre enfermedades más prevalentes en Banco de sangre en Paraguay, mencionan a la enfermedad de Chagas, al virus de la Hepatitis B y el *Treponema pallidum*⁽¹¹⁻¹³⁾. Por esta razón se utilizan plataformas como ELISA o CLIA para las pruebas serológicas en bancos de sangre ya que deben ser de alta sensibilidad para descartar la mínima sospecha de reactividad^(6,13).

En nuestro estudio hemos comparado con las muestras procesadas en banco de sangre obteniendo una sensibilidad con respecto a los resultados del tamizaje igual al 99% indicando una alta sensibilidad capaz de identificar como positivo a los enfermos, tal como indican las recomendaciones para tamizaje en bancos de sangre⁽¹⁴⁾, así mismo también es recomendado para la enfermedad de Chagas la utilización de dos pruebas sensibles y su confirmación posterior con otra prueba de fundamento diferente altamente específico⁽¹⁵⁾.

En cuanto la capacidad del ELISA IgG Chagas test IICS V2.0 de predecir la ausencia o la presencia de enfermedad, los valores predictivos representan la probabilidad de que el paciente tenga la enfermedad una vez que se conozca el resultado de la prueba. En nuestro estudio el VPP fue de 96% (94-98%) lo que significa alta probabilidad de que un individuo con prueba positiva tenga la enfermedad y el VPN 99% (97-100%) alta probabilidad de que un individuo con prueba negativa no tenga la enfermedad⁽¹⁶⁾.

Los valores predictivos cambian con la prevalencia de la enfermedad en la población. En el caso de la enfermedad de Chagas la prevalencia en la población expuesta se encuentra dentro del 2 al 14%^(4,5) por lo que se necesitan pruebas muy sensibles y de VPP elevado ya que es el parámetro de mayor relevancia para los programas de tamizaje, debido a que un valor bajo significa una prevalencia baja o que la prueba es poco específica o ambas cosas⁽¹⁶⁾.

El ELISA Chagas test IICS V2.0 cumple con los criterios de validez y seguridad, ya que se observaron altos valores de sensibilidad y especificidad, como también en los valores predictivos, siendo una prueba ideal para ser utilizado en el tamizaje de la enfermedad⁽¹⁷⁾.

En cuanto al desempeño del ELISA mediante la curva ROC se observó alta capacidad discriminativa, ya que los valores se aproximan a 1, esta capacidad es la que se considera óptima para una prueba a ser utilizada como método de tamizaje y podría ser aplicada en bancos de sangre⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

El ELISA Chagas test IICS V2.0 es una técnica muy sensible para el diagnóstico de la enfermedad en la etapa crónica, y puede ser utilizado en laboratorios de

análisis clínicos y bancos de sangre para el diagnóstico de la enfermedad en conjunto con otras pruebas de fundamento diferente⁽⁶⁻⁷⁾. En comparación con el ELISA comercial de antígenos recombinantes, hemos obtenido una concordancia con índice kappa de 0,926 (0,888-0,976) estadísticamente significativa, considerada una concordancia casi perfecta según la escala de Landis y Kosh⁽¹⁸⁾.

Las concordancias obtenidas fueron muy buenas con respecto a la serología de las muestras de banco de sangre como la comparada con el test comercial, pudiendo utilizarse el kit de Chagas IICS V2.0 para el tamizaje de la enfermedad.

Agradecimientos: Dra. Elsi Vargas, Centro Nacional de Servicio de Sangre. CENSSA. Dra. Liliana Sosa, Biólogo Rodrigo Alcaraz.

Financiamiento: Este trabajo fue realizado dentro del Proyecto 14-INV-162-2013 financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores: María Eugenia Acosta de Hetter autor principal: elaboración del protocolo, recolección y análisis de los datos, presentación de resultados y redacción del manuscrito.

Laura Aria: elaboración del protocolo, recolección y análisis de los datos y presentación de resultados.

Ivalena de Guillén: redacción del protocolo, asesoría, revisión crítica del manuscrito.

Alejandra Rojas: recolección y análisis de los datos y presentación de resultados, informe final

Belen Infanzón y César Cantero: recolección y análisis de los datos y presentación de resultados.

Cynthia Bernal: redacción del manuscrito.

Peter Kaspar: asesoría.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Punukollu G, Gowda RM, Khan IA. Early twentieth century descriptions of the Chagas heart disease. *Int J Cardiol.* 2004 Jun; 95(2-3): 347-9.
2. Acosta N, López E, González N, Fernández MJ, Rojas de Arias A. Perfiles isoenzimáticos de poblaciones de *Triatoma infestans* de la Región Oriental y Occidental del Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud,* 2001/02 1(1).
3. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Tabla 8. Número de casos confirmados, por Regiones Sanitarias. Datos acumulado SE30, Dirección General de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. *Boletín Epidemiológico Semanal. Semana Epidemiológica* 30. 2019;(30):1-28.
4. Organización Panamericana de la Salud. Perfil de los sistemas de salud Paraguay: Monitoreo y análisis de los procesos de cambio y reforma. 3ra. Ed. Washington, DC: OPS; 2008
5. Paraguay. Ministerios de Salud Pública y Bienestar Social. SENEPA. Chagas. (fecha de acceso setiembre de 2022) Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/senepa/chagas.html>
6. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, D.C.: OPS; 2018.
7. Organización Panamericana de la Salud. Síntesis de evidencia: Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Panam Salud Pública.* 2020;44:e28. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.28>
8. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2010; 28 (5): 284-93.
9. Ferrer E, Lares M, Viettri M, Medina M. Comparison between immunological and molecular techniques for the diagnosis of

- Chagas disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(5): 277-82.
10. Aria L, Acosta ME, Guillen Y, Rojas A, Meza T, Infanzón B. Desempeño del Kit ELISA Chagas IICS V.1 para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2016; 14(3): 7-13
 11. Cerda Jaime, Cifuentes Lorena. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2012 Abr [citado 2017 Ago 21]; 29(2): 138-41.
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200003&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
 12. Rodríguez-Leiva RR, Ríos-González CM. Seroprevalencia de marcadores para infecciones transmisibles por transfusión en donantes de un hospital de referencia nacional de Paraguay, 2016. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* [Internet]. 2020 Apr [cited 2022 Apr 22]; 18(1): 61-8.
http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282020000100061&lng=en
<https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2020.018.01.61-068>.
 13. Escobar Amarilla MN, Montiel CR, Galeano I. Serologías reactivas en donantes del Banco de Sangre del Hospital de Clínicas, Paraguay. *Rev. virtual Soc. Párrafo Medicina.* En t. [Internet]. marzo de 2021 [citado el 22 de abril de 2022]; 8(1): 85-93.
<https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2021.08.01.85>
 14. Márquez Roa NA, Lemir de Zelada MO, Molas AC. Frecuencia serológica de infección por Trypanosoma cruzi en donantes de sangre en el Paraguay entre los años 2006 y 2011. *Mem. Inst. investig. Cienc. Salud* [Internet]. diciembre de 2013 [citado el 19 de abril de 2022]; 11(2): 26-31.
http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282013000200004&lng=en.
 15. Sáez-Alquezar A. Consideraciones sobre el tamizaje serológico en donantes de sangre. *Boletín electrónico del grupo cooperativo iberoamericano de medicina transfusional (GCIAMT)*, septiembre de 2010. gciamtboletin.blogspot.com.
 16. Jercic Lara MI, Alan Oyarce Fierro A. Recomendaciones técnicas para la selección de método de tamizaje. Santiago (Chile): Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud;2019. Resolución Exenta N°535 del 22.02.2019
 17. Gómez González C, Pérez Castán JF. Curso de introducción a la investigación clínica. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. *Concordancia. SEMERGEN-Medicina de Familia* 2007. 33(10): 509-19. Doi:
[http://dx.doi.org/10.1016/S1138-3593\(07\)73955-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1138-3593(07)73955-2)
 18. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977. 33: 159-74.
 19. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2012 Abr [citado 2022 Abr 28]; 29(2): 138-41. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200003&lng=es.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
 20. Farfán-García AE, Castellanos-Domínguez YZ, Luna-Marín KP, Angulo-Silva VM. Concordancia de dos pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev. salud pública* [Internet]. marzo de 2013 [citado el 28 de abril de 2022]; 15(2): 192-202.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642013000200003&lng=en