

FECHA DE RECEPCIÓN: 19 de abril de 2022  
FECHA DE ACEPTACIÓN: 19 de mayo de 2022  
FECHA DE PUBLICACIÓN: 5 de septiembre de 2022

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: Instituto  
Misionero de Biodiversidad.

\*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:  
kuhlmann.pa@gmail.com

REGISTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
EN SALUD N°: IS003575

## IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2 PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE SARS-COV-2 EN PUERTO IGUAZÚ, MISIONES

### *Implementation of a biosafety level 2 laboratory for molecular diagnosis of SARS-CoV-2 in Puerto Iguazú, Misiones*

\* Pamela Angelique Kuhlmann<sup>1</sup>. Licenciada en Genética.  
Lucía Acuña<sup>1</sup>. Doctora en Farmacología.  
Katherina Vizcaychipi<sup>1</sup>. Magister en Gerencia y Administración de Sistemas y Servicios en Salud.  
Candelaria Sánchez Fernández<sup>1</sup>. Doctora en Farmacia y Bioquímica.  
Anibal Depasquino<sup>1</sup>. Licenciado en Genética.  
Santiago Lattar<sup>1</sup>. Doctor en Microbiología Médica y Bacteriología.  
Tania Alarcón<sup>1</sup>. Bioquímica Clínica.  
Karina Salvatierra<sup>1</sup>. Doctora en Biotecnología.  
Emanuel Grassi<sup>1</sup>. Doctor en Ciencias Biológicas.  
Erik Ruuth<sup>1</sup>. Doctor en Biología Celular y Molecular.

<sup>1</sup> Instituto Misionero de Biodiversidad (IMiBio), Puerto Iguazú, Misiones, Argentina.

**RESUMEN.** INTRODUCCIÓN: La pandemia de COVID-19 ha creado desafíos sin precedentes para los laboratorios de todo el mundo. Los gobiernos nacionales y subnacionales se vieron en la necesidad imperiosa de adaptar instituciones para la detección de SARS-CoV-2 en respuesta a la emergencia sanitaria declarada en 2020. Con el objetivo de aumentar la capacidad de diagnóstico en la provincia de Misiones, se implementó un laboratorio de diagnóstico de excelencia dentro del Instituto Misionero de Biodiversidad. Este artículo comparte los pasos realizados y los desafíos enfrentados, con el fin de que sirva de guía a otras instituciones. MÉTODOS: Las etapas para establecer el laboratorio fueron: adquisición de equipamientos/reactivos, adaptación/renovación del laboratorio, incorporación y capacitación del recurso humano, establecimiento de buenas prácticas y bioseguridad, selección de la metodología de extracción y detección, implementación de controles de calidad y habilitación. RESULTADOS: Desde su habilitación el Laboratorio de Análisis Integral procesó 1186 muestras biológicas de casos sospechosos de COVID-19 y se convirtió así en el segundo laboratorio de referencia provincial. DISCUSIÓN: La eficiente articulación entre el Instituto Misionero de Biodiversidad y el Ministerio de Salud de Misiones logró la rápida implementación de este laboratorio de alta complejidad en una región de importancia epidemiológica.

**PALABRAS CLAVE:** Técnicas de Diagnóstico Molecular; Contención de Riesgos Biológicos; SARS-CoV-2

**ABSTRACT.** INTRODUCTION: The COVID-19 pandemic has created unprecedented challenges for laboratories around the world. National and subnational governments faced the urgent need to adapt institutions for the detection of SARS-CoV-2 in response to the health emergency declared in 2020. With the aim of increasing diagnostic capacity in the province of Misiones, a diagnostic laboratory of excellence was established within the "Instituto Misionero de Biodiversidad". This article shares the steps taken and the challenges faced, in order to serve as a guide to other institutions. METHODS: The stages to establish the laboratory were: acquisition of equipment/reagents, adaptation/renovation of the laboratory, incorporation and training of human resources, establishment of good practices and biosafety, selection of the extraction and detection methodology, implementation of quality controls and authorization. RESULTS: Since its authorization, the "Laboratorio de Análisis Integral" has processed 1186 biological samples from suspected cases of COVID-19, becoming the second reference laboratory in Misiones. DISCUSSION: The efficient articulation between the "Instituto Misionero de Biodiversidad" and the provincial Ministry of Health achieved the rapid implementation of this high complexity laboratory in a region of epidemiological importance.

**KEY WORDS:** Molecular Diagnostic Techniques; Containment of Biohazards; SARS-CoV-2

## INTRODUCCIÓN

El coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2) se ha clasificado dentro del género *Betacoronavirus*. Se trata de un virus encapsulado con ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla<sup>1</sup>. Su genoma codifica proteínas no estructurales, cuatro proteínas estructurales (espícula [S], envoltura [E], membrana [M] y nucleocápside [N]) y proteínas presuntamente accesorias<sup>2</sup>. La metodología estándar (*gold standard*) diagnóstica para la confirmación de la infección aguda por el SARS-CoV-2 en muestras respiratorias se basa en la detección directa del genoma viral mediante la amplificación específica de sus regiones conservadas, con una técnica de biología molecular que utiliza la retrotranscripción seguida por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés)<sup>3</sup>.

La manifestación clínica de la infección por SARS-CoV-2, conocida como enfermedad por coronavirus COVID-19, puede variar desde una infección asintomática hasta una enfermedad de carácter grave<sup>4,5</sup>. El diagnóstico temprano en el laboratorio es una herramienta útil para la gestión clínica y el control de brotes<sup>6</sup>.

La ciudad de Puerto Iguazú tiene 82 849 habitantes<sup>7</sup> y se sitúa a 300 kilómetros de la capital de Misiones. Está en una región de triple frontera, próxima a la ciudad de Foz do Iguazú (Brasil) y Ciudad del Este (Paraguay). Reconocida como un destino turístico, con constante movimiento poblacional y comercial, Puerto Iguazú posee una ubicación de riesgo epidemiológico<sup>8</sup>.

La red sanitaria de la provincia se estructura sobre la base de un esquema de zonificación que considera accesibilidad y cobertura en función de las necesidades de salud. La Zona Norte Paraná (ZNP) cuenta con dos centros de nivel III (hospitales SAMIC [Servicios de Atención Médica Integral para la Comunidad] en El Dorado y Puerto Iguazú). Frente a la declaración de la emergencia sanitaria y epidemiológica, a la que se sumaron la ubicación geográfica y la falta de un laboratorio diagnóstico de alta complejidad en ZNP, se planteó la necesidad de contar con un respaldo en esta zona, lo que condujo a implementar un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 dentro del Instituto Misionero de Biodiversidad (IMiBio) y realizar allí el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2.

## MÉTODOS

### ADQUISICIÓN DE EQUIPAMIENTOS Y REACTIVOS

En primera instancia se identificaron los equipamientos, consultorías y servicios necesarios para la puesta a punto y realización del protocolo de diagnóstico molecular.

Se recibió asesoramiento de la empresa *Thermo Fisher Scientific* para la adquisición de reactivos específicos de extracción de ácidos nucleicos y detección de SARS-CoV-2 mediante el empleo de la técnica de PCR en tiempo real con el equipo QuantStudio 5. En colaboración con expertos en virología y biología molecular, se desarrolló una lista de consumibles y reactivos necesarios para la extracción

de ARN viral, detección de SARS-CoV-2, accesorios para la PCR en tiempo real, descartables, equipos de protección personal (EPP) y elementos de bioseguridad (ver Tabla 1).

### ADAPTACIÓN Y RENOVACIÓN DEL LABORATORIO

La técnica de RT-PCR tiene sus requisitos de infraestructura edilicia y correcta planificación de los espacios físicos, y obliga a contar con al menos cuatro áreas: área de extracción con una cabina de seguridad biológica clase 2 o equivalente, área de amplificación, área de carga del templado y área de detección. Para cumplir con ello se seleccionó un laboratorio de 44 m<sup>2</sup>, el cual fue dividido en dos salas. Se utilizó mobiliario existente y se realizaron tareas de mantenimiento y mejoras eléctricas. Se conformó un espacio destinado a la recepción de muestras y extracción de ARN (sala sucia) y otro para amplificación y detección (sala limpia) (Foto 1, a y b).

Para definir el flujo de trabajo se consultaron diversos documentos técnicos<sup>9,10</sup>, a partir de los cuales se organizó un flujo unidireccional de la muestra de forma tal que su manipulación en la sala sucia no contaminara la sala limpia. Para ello se establecieron armarios separados y se colocaron flechas de indicación en el suelo. En la sala limpia se identificaron áreas específicas de trabajo. Para evitar la contaminación se recurrió a sets independientes de equipos e insumos para el uso exclusivo de cada sala y áreas correspondientes (estrictamente no intercambiables), tales como agua ultrapura, microcentrifugas, agitadores, refrigeradores/congeladores, micropipetas, racks con puntas, descartadores de residuos, objetos adicionales como lapiceras, temporizadores, tijeras, pinzas y elementos de protección personal.

En la sala sucia, destinada a la extracción de ARN, se dispusieron los equipos específicos para este procedimiento: centrifuga multipropósito refrigerada; cabina de seguridad biológica clase 2 A; y heladera de uso exclusivo para almacenamiento de las muestras. Para la instalación de la cabina de seguridad biológica, se requirió el traslado y montaje en el laboratorio (Foto 1, c), y luego certificación bajo forma NSF 49/EN 12469 para asegurar los parámetros de funcionamiento correctos del equipo.

La sala limpia se dividió en tres áreas: preparación de reactivos, carga de muestras y controles, y amplificación y detección. En el área de preparación de reactivos se ubicó una cabina de PCR. Para el área de carga de muestras y controles se utilizó una campana de extracción de gases, en la cual se instaló una lámpara ultravioleta (UV) para descontaminación de aire y superficies internas<sup>11</sup> y se verificó su correcta instalación e integridad. En el área de amplificación y detección se posicionó el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (*Thermo Fisher Scientific*), junto a todos los instrumentos e insumos necesarios para su funcionamiento.

### RECURSOS HUMANOS Y CAPACITACIONES

El equipo de trabajo se conformó con genetistas y bioquímicos, con especializaciones tales como ciencias biológicas,

TABLA 1. Equipos, consumibles y reactivos adquiridos para el montaje del laboratorio de nivel de bioseguridad 2.

Categoría		Ítem		
Extracción de ARN viral	Equipos	Cabina de seguridad biológica clase II, tipo A2		
		Centrífuga multipropósito refrigerada		
		Micropipetas multicanales y estándares de volúmenes variables		
	Consumibles y reactivos	Kit de extracción de ARN viral		
		Solución PBS (buffer fosfato salino)		
		Alcohol absoluto		
		Placa de 96 pocillos para extracción		
		Film adhesivo para placas		
		Rack magnético 96		
		Microtubo de 1,5 mL		
		Pipeta Pasteur de 1 mL, plástica		
		Pipeta serológica de 10 y 50 mL		
		Tubo tipo Falcon de 10 mL y 50 mL		
		Detección de SARS-CoV-2	Equipos	PCR en tiempo real
Agitador con soporte para placas				
Minicentrífuga con rotor para tiras de PCR				
Consumibles y reactivos	Kit de control positivo de SARS-CoV-2			
	Módulo de conectividad Wi-Fi			
	Tiras de 8 tubos ópticos de 0,2 mL			
Accesorios de la PCR en tiempo real	Consumibles y reactivos	Tiras de 8 tapas ópticas		
		Placa óptica de 96 pocillos		
		Film óptico adhesivo		
		Agua ultrapura		
		Aplicador de films		
		Herramienta para aplicación de tapas		
		Base de placas de 96 pocillos		
		Herramienta de remoción de placas		
		Descartables y equipos de protección personal	Consumibles y reactivos	Punta con filtro de 10 µL, 200 µL y 1000 µL
				Guantes de nitrilo
Barbijo N95				
Máscara protectora facial				
Camisolín descartable con puño elástico				
Cubrecazado descartable				
Cofia descartable				
Bioseguridad	Consumibles y reactivos			Carro transportador para transporte de muestras
		Cesto de basura de plástico rojo		
		Descartador de cortopunzantes y agujas		
		Bolsas rojas para residuos patológicos		
		Triple envase para transporte de muestras		

microbiología, virología, bioquímica clínica, biología molecular y administración de sistemas y servicios de salud, entre otras.

El personal se capacitó en la metodología y equipamientos necesarios para diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 con representantes de la empresa Thermo Fisher Scientific. Además de los contenidos teóricos impartidos sobre las aplicaciones de PCR en tiempo real, se desarrollaron corridas experimentales con el posterior análisis de resultados.

#### BUENAS PRÁCTICAS Y BIOSEGURIDAD

Se establecieron Procedimientos Operativos Estandarizados (POE) para todo el flujo de trabajo unidireccional, así como para la limpieza y desinfección del laboratorio. Asimismo, se

elaboró un protocolo de gestión de residuos institucional, se solicitó el alta municipal como generador de residuos patológicos y se estableció un espacio destinado al acopio transitorio en un área próxima al laboratorio. Para el tratamiento final de los residuos generados se contrató a una empresa especializada y certificada.

El laboratorio fue debidamente señalizado, y se restringió toda circulación interna conforme a los requisitos de un laboratorio de bioseguridad nivel 2 (Foto 1, d).

Se redactaron guías de buen uso, planillas de registro y mantenimiento de los equipamientos, y se organizaron jornadas de capacitación interna para garantizar el uso apropiado del equipamiento y la bioseguridad del recurso humano.

**FOTO 1.** Adaptación y renovación del laboratorio. a) Sala sucia. b) Sala limpia. c) Traslado, montaje, izaje y posicionamiento de la cabina de seguridad biológica clase II. d) Señalización del laboratorio.



### METODOLOGÍA DE INACTIVACIÓN/EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO VIRAL

Inicialmente, para la metodología de inactivación y extracción del material genético viral, se optó por un kit basado en perlas magnéticas. Sin embargo, este método resultó no ser el adecuado, ya que el tiempo empleado en el protocolo era extenso y únicamente permitía la extracción en placas de 96 muestras, lo que dificultaba el procesamiento económico de un número variable de muestras. Finalmente, se optó por realizar la extracción mediante columnas de centrifugación con membrana de sílica, lo que permitió trabajar con bajo flujo de muestras diarias y obtener un buen rendimiento en la recuperación del ARN viral siguiendo un protocolo rápido y sencillo.

### KITS DE DETECCIÓN *SINGLEPLEX*/*MULTIPLIX*

En primera instancia se utilizó un kit de detección en *singleplex* con tres dianas moleculares virales: gen S (espícula), gen N (nucleocápside) y gen ORF3b (implicado en la replicación) para evitar una posible reacción cruzada con otros coronavirus endémicos. Luego, con el incremento en el número de muestras, se escogió un kit de ensayo en *multiplex*, que representaba varias ventajas operativas: reducción de la cantidad de muestra necesaria para la reacción de RT-PCR, menor costo y mejora en la precisión al minimizar los errores de pipeteo.

### IMPLEMENTACIÓN DE CONTROLES

Se utilizaron controles para asegurar la calidad de todos

los protocolos, un control de extracción y tres controles de amplificación: control positivo, negativo e interno.

Los controles positivo y negativo, provistos por el kit de amplificación, permiten determinar la funcionalidad de la prueba diagnóstica y verificar la ausencia de contaminación en los reactivos, los consumibles y el medio ambiente. El control interno amplifica una región de un gen humano (ribonucleasa P), permite identificar la viabilidad de la muestra y evaluar la eficiencia del proceso de extracción de ARN. Finalmente, el control de extracción verifica que no exista contaminación cruzada entre muestras y se basa en la utilización de agua ultrapura tratada como una muestra; su resultado en la etapa de amplificación debe ser equivalente a un control negativo.

Para comprobar la reproducibilidad y precisión del ensayo de detección, se implementó semanalmente el análisis de duplicado de una muestra al azar y la comparación de concordancia de los resultados.

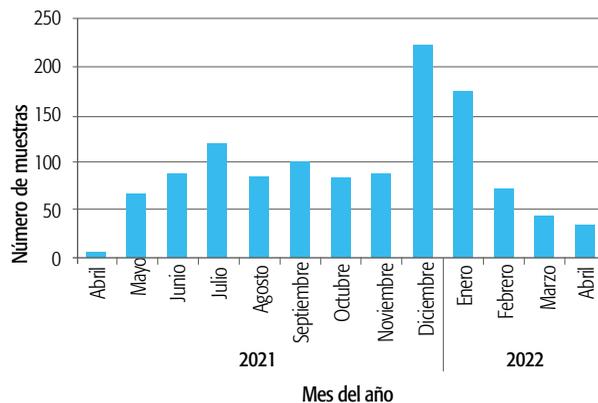
### HABILITACIÓN

El 14 de abril de 2021 se logró la implementación del Laboratorio de Análisis Integral (LAI) y su habilitación por el Colegio de Bioquímicos, tras la presentación de la documentación requerida para cumplir las exigencias necesarias de un laboratorio de análisis clínico con respecto a lo instrumental, el ambiente físico óptimo, el correcto proceso operativo y las buenas prácticas. Así mismo, se solicitó la autorización de la Red Provincial de Laboratorios de Salud de Misiones para incorporar el LAI a la Red de Influenza y Virus Respiratorios, como laboratorio de referencia para el diagnóstico molecular de COVID-19 en la zona norte de la provincia.

### RESULTADOS

Desde su habilitación el LAI recibió y procesó 1186 muestras biológicas de pacientes sospechosos de COVID-19, derivadas del Hospital SAMIC de Puerto Iguazú. Las muestras correspondían a pacientes internados y ambulatorios atendidos por el servicio de guardia de dicho nosocomio. En el Gráfico 1 se presentan los casos estudiados para SARS-CoV-2 entre abril de 2021 y abril de 2022. Todos los casos con resultado concluyente detectable fueron informados al Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública de Misiones para su publicación en los reportes de situación.

**GRÁFICO 1.** Muestras procesadas para el diagnóstico referencial de SARS-CoV-2 según mes del año, Zona Norte Paraná, Misiones, Argentina, abril de 2021 a abril de 2022, N=1186.



### DISCUSIÓN

La rápida implementación de este laboratorio de bioseguridad 2 para la detección molecular del SARS-CoV-2 demostró la importancia de una eficiente articulación entre el IMiBio y el Ministerio de Salud de la Provincia de Misiones. Esto fue posible gracias a cuatro parámetros principales: trabajo colaborativo a nivel regional; planificación rápida en respuesta a la emergencia sanitaria; gestión eficiente para la adquisición de equipamiento, insumos y reactivos necesarios; y sinergia entre los integrantes del equipo interdisciplinario.

Con el avance de los meses el LAI ha proporcionado y ejecutado nuevas herramientas para el fortalecimiento del diagnóstico diferencial al sistema de salud de la provincia de Misiones. Entre ellas se destacan la incorporación de un kit para la detección de mutaciones de SARS-CoV-2 asociadas a variantes y la puesta a punto de pruebas diagnósticas para patologías de carácter zoonótico, tanto en muestras humanas como en muestras de fauna silvestre.

De esta forma se logró conformar y establecer un laboratorio con enfoque *One Health* (Una Salud) en una región de importancia epidemiológica, que busca promover la salud de los seres humanos, los animales y el medio ambiente.

**AGRADECIMIENTOS:** Al Ministerio de Salud de la Provincia de Misiones por el apoyo institucional para la incorporación a la Red Provincial de Laboratorios de Salud de Misiones; a la presidenta Mag. Viviana Rovira, la Dirección General de Administración Financiera y la Dirección General de Asuntos Legales del IMiBio por su acompañamiento en la implementación de este laboratorio de alta complejidad en Puerto Iguazú.

**DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES:** No hubo conflicto de intereses durante la realización del estudio.

**CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES:** Todos los autores han efectuado una contribución sustancial a la concepción o el diseño del estudio o a la recolección, análisis o interpretación de los datos; han participado en la redacción del artículo o en la revisión crítica de su contenido intelectual; han aprobado la versión final del manuscrito; y son capaces de responder respecto de todos los aspectos del manuscrito de cara a asegurar que las cuestiones relacionadas con la veracidad o integridad de todos sus contenidos han sido adecuadamente investigadas y resueltas.

**Cómo citar este artículo:** Kuhlmann PA, Acuña L, Vizcaychipi K, Sánchez Fernández C, Depasquino A, Lattar S, et al. Implementación de un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 para diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 en Puerto Iguazú, Misiones. *Rev Argent Salud Pública*. 2022;14 Supl COVID-19:e54. Publicación electrónica 5 de Sept de de 2022.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<sup>1</sup> Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020 [citado 3 Jun 2022];5(4):536-544. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

<sup>2</sup> Yoshimoto FK. The proteins of severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the cause of COVID-19. *Protein J* [Internet]. 2020 [citado 3 Jun 2022];39(3):198-216. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-020-09901-4>

<sup>3</sup> Organización Mundial de la Salud. Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2: orientaciones provisionales, 11 de septiembre de 2020 [Internet]. Ginebra: OMS; 2020 [citado 3 Jun 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/335830>

<sup>4</sup> Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention. *JAMA* [Internet]. 2020 [citado 3 Jun 2022];323(13):1239-1242. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.2648>

<sup>5</sup> Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *JAMA* [Internet]. 2020 [citado 3 Jun 2022];323(20):2052-2059. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.6775>

<sup>6</sup> Wylie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2.

*N Engl J Med* [Internet]. 2020 [citado 3 Jun 2022];383(13):1283-1286. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc2016359>

<sup>7</sup> Instituto Nacional de Estadística y Censos. Censo 2010 [Internet]. Buenos Aires: INDEC; c2022 [citado 17 May 2022]. Disponible en: <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-2-41-135>

<sup>8</sup> Cabot D. Misiones. La ficción de pretender cerrar la frontera cuando se cambia de país con solo cruzar la calle [Internet]. *La Nación*. 13 Jul 2021 [citado 19 Abr 2022]. Disponible en: <https://www.lanacion.com.ar/sociedad/misiones-la-ficcion-de-pretender-cerrar-la-frontera-cuando-se-cambia-de-pais-con-solo-cruzar-la-nid12072021/>

<sup>9</sup> Organización Panamericana de la Salud. Documentos técnicos de la OPS - Enfermedad por el Coronavirus (COVID-19) [Internet]. Washington DC: OPS; 2020 [citado 19 Abr 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos-tecnicos-ops-enfermedad-por-coronavirus-covid-19>

<sup>10</sup> Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Recomendaciones para el manejo de materiales de pacientes en los laboratorios clínicos en tiempos de SARS-CoV-2 [Internet]. Buenos Aires: INEI; 2020 [citado 3 Jun 2022]. Disponible en: <http://sgcanlis.gob.ar/handle/123456789/1629>

<sup>11</sup> Das PK, Ganguly SB, Mandal B. Mitigating polymerase chain reaction/amplification contamination in a high-risk high-burden mycobacterial reference laboratory in a resource-limited setting. *Int J Mycobacteriol* [Internet]. 2018 [citado 3 Jun 2022];7(4):332-337. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_97\\_18](http://dx.doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_97_18)



Esta obra está bajo una licencia de *Creative Commons* Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Reconocimiento – Permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra. A cambio se debe reconocer y citar al autor original. No comercial – esta obra no puede ser utilizada con finalidades comerciales, a menos que se obtenga el permiso.