



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

das Chagas Bernardo, Cíntia; Rauta de Avelar, Barbara; Drummond Costa Ignacchiti, Mariana;  
Vilhena Freire Martins, Isabella; Salim Pereira, Maria Julia  
Kit comercial de ELISA® para a detecção de coproantígenos e exame coproparasitológico em bovinos  
com fígados condenados por fasciolose  
Ciência Rural, vol. 42, núm. 11, noviembre, 2012  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33124571008>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

## Kit comercial de ELISA® para a detecção de coproantígenos e exame coproparasitológico em bovinos com fígados condenados por fasciolose

Commercial ELISA® kit for detection of coproantigen and coproparasitological method in bovine livers with fascioliasis convicted

Cíntia das Chagas Bernardo<sup>I</sup> Barbara Rauta de Avelar<sup>I</sup> Mariana Drummond Costa Ignacchiti<sup>II</sup>  
Isabella Vilhena Freire Martins<sup>II\*</sup> Maria Julia Salim Pereira<sup>III</sup>

### RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo comparar um kit comercial de ELISA para a detecção de coproantígenos e um exame coproparasitológico de sedimentação utilizando-se como padrão ouro o diagnóstico da inspeção de fígados bovinos ao abate. Além disso, avaliou-se a correlação entre a intensidade parasitária mensurada pela contagem de ovos nas fezes e a de parasitos ao abate. Foram coletadas as fezes e avaliados macroscopicamente os fígados de 81 bovinos, dos quais 45 tiveram os fígados condenados por fasciolose hepática ao abate, nos quais se realizou a contagem dos parasitos. Duas frações de cada amostra de fezes coletadas foram separadas e uma delas foi armazenada em congelador para posterior realização do ELISA e a outra processada segundo uma técnica de sedimentação fecal para diagnóstico de ovos de *Fasciola hepatica*. O coeficiente de correlação de Spearman e o qui-quadrado de McNemar foram utilizados, adotando-se o nível de significância de 5%. Em oito fígados bovinos condenados por apresentarem lesões características de fasciolose, não foram encontrados exemplares do parasita. O exame coproparasitológico e o ELISA para detecção de coproantígenos, respectivamente, apresentaram sensibilidade de 51,11% e 75,55%, especificidade de 100% e 91,66%, valor preditivo positivo de 100% e 91,89%, valor preditivo negativo de 62% e 75% e kappa de 0,48 e 0,65. Os resultados obtidos pelo kit ELISA comercial não diferiram ( $P=0,06$ ) dos obtidos ao abate, mas o exame coproparasitológico diferiu ( $P<0,0001$ ) do abate na detecção de animais positivos. A correlação entre o número de parasitos no fígado e o número de ovos nas fezes é moderada ( $rs=0,5757$ ,  $P<0,0001$ ). O kit ELISA comercial foi mais sensível do que o exame coproparasitológico, embora este não deva ser descartado devido a sua eficiência.

**Palavras-chave:** *Fasciola hepatica*, bovino, imunodiagnóstico.

### ABSTRACT

The aim of this study was to compare a commercial ELISA kit for detection on coproantigen examination and fecal sedimentation using as gold standard inspection diagnosis of bovine livers at slaughter. In addition, we evaluated the correlation between the measured intensity of infection by counting eggs in the feces and the parasites in bovine livers. Feces were collected and evaluated macroscopically of 81 cattle livers, 45 of which had livers condemned by liver flukes and in these livers parasites were counted. Two fractions of stool samples collected were separated and one stored in freezer for further ELISA and other one processed according to sedimentation technique for diagnosis *Fasciola hepatica*. The Spearman correlation and McNemar chi-square were used, adopting the significance of 5%. In eight bovine livers condemned by the characteristic lesions of fascioliasis parasite were not found. The stool examinations and ELISA testing for detection coproantigen, respectively, had sensitivity of 51,11% and 75,55%, specificity of 100% and 91,66%, predictive positive value was 100% and 91,89%, predictive negative value 62% and 75% and kappa 0,48 and 0,65. The results obtained by commercial® ELISA kit did not differ ( $P=0,06$ ) obtained at slaughterhouse, but the stool examinations differed ( $P<0,0001$ ) in the detection of the positive animals. The correlation between the number of parasites in the liver and the number of eggs in the feces was moderate ( $rs=0,5757$ ,  $P<0,0001$ ). The commercial ELISA kit® was more sensitive than the fecal test, although this one shoud not be discarded because of their efficiency.

**Key words:** *Fasciola hepatica*, bovine, immunodiagnosis.

### INTRODUÇÃO

Exames coproparasitológicos são os testes de rotina no diagnóstico da fasciolose em locais em

\*Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.

<sup>II</sup>Departamento de Medicina Veterinária, UFES, 29500-000, Alegre, ES, Brasil. E-mail: ivfmartins@gmail.com. \*Autor para correspondência.

<sup>III</sup>Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Seropédica, RJ, Brasil.

que não se tem acesso à tecnologia avançada (MATTOS et al., 2009). No entanto, técnicas que detectam抗ígenos nas fezes de hospedeiros infectados vêm sendo aprimoradas para um diagnóstico mais precoce e acurado da fasciolose (ESTUNINGSIH et al., 2009; FLANAGAN et al., 2011). FLANAGAN et al. (2011) citam que os testes para detecção de coproantígenos diagnosticam a doença mais precocemente do que os exames coproparasitológicos.

Embora novos métodos de detecção de抗ígenos venham sendo empregados para o diagnóstico da fasciolose, principalmente em seu estágio inicial, esses não geram informações epidemiológicas importantes para o conhecimento da dinâmica da transmissão da *F. hepatica*, não substituindo, assim, o diagnóstico por exame de fezes (KLEIMAN et al., 2005).

Por outro lado, ainda que a doença clínica possa ocorrer três semanas pós-infecção, a confirmação do diagnóstico de fasciolose por meio do exame de fezes somente poderá ocorrer aproximadamente dez semanas após ingestão de metacercárias (LECLIPTEUX et al., 1998). Já, o teste ELISA para detecção de coproantígenos poderá detectar a doença a partir da quarta semana pós-infecção (ALMAZÁN et al., 2001).

No entanto, nem sempre a sensibilidade e especificidade de testes para detecção de parasitos do gênero *Fasciola* estão disponíveis, impossibilitando o conhecimento de seus valores preditivos (ANDERSON et al., 1999), que, juntos, compõem os indicadores de validade do teste (PEREIRA, 2008). Mais recentemente, devido à ausência de conhecimento sobre sua validade, a técnica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005) foi avaliada por MARTINS et al. (2008), encontrando sensibilidade de 59,8%.

O desconhecimento da sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e dos valores preditivos dificulta a escolha do melhor teste para cada contexto epidemiológico. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a validade e a reprodutibilidade de um kit comercial® de ELISA para detecção de coproantígenos e da técnica coproparasitológica de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005), utilizando como padrão ouro diagnóstico da inspeção de fígados bovinos ao abate. Além disso, avaliou-se a correlação entre as contagens de ovos do parasita nas fezes e a de parasitos no figado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Avaliaram-se macroscopicamente 81 fígados bovinos, abatidos no matadouro frigorífico do município de Atílio Vivácqua, Estado do Espírito Santo,

onde foram coletadas amostras de fezes de todos esses animais. Os fígados de 55,5% (45/81) dos bovinos foram condenados por fasciolose, sendo esses órgãos avaliados quanto ao número de parasitos presentes, e 44,5% (36/81) dos bovinos não obtiveram seus fígados condenados para nenhuma enfermidade.

As amostras de fezes coletadas foram encaminhadas ao laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em caixas isotérmicas e devidamente identificadas quanto ao animal de origem. No laboratório, foram separadas duas frações, sendo uma destinada ao exame coproparasitológico para ovos de *F. hepatica* (FOREYT, 2005) e a outra armazenada em congelador para posterior processamento pela técnica de ELISA indireto para detecção de coproantígenos.

### Processamento das amostras

O exame coproparasitológico de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* foi realizado segundo a técnica descrita por FOREYT, (2005) e validada por Martins et al. (2008).

O processamento do imunodiagnóstico foi realizado segundo instruções do fabricante do kit ELISA comercial BIO K 201 (Empresa Bio x – Bélgica) para detecção de coproantígenos, nas amostras de fezes.

### Análise estatística

Os indicadores de validade (sensibilidade, especificidade, valores preditivos) e indicador *kappa* das técnicas de sedimentação fecal e ELISA indireto para coproantígenos foram calculados considerando-se como padrão ouro o diagnóstico da inspeção de fígados bovinos ao abate.

O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para avaliar a correlação entre o número de ovos contados ao exame de fezes e o número de parasitos no fígado. O teste de qui-quadrado de McNemar foi empregado para avaliar a associação da frequência de fasciolose ao exame coproparasitológico e ao kit ELISA® comercial em relação à condenação de fígados bovinos ao abate. O programa estatístico Bioestat 5.0 foi empregado para os cálculos estatísticos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, são apresentados os resultados do exame coproparasitológico e da condenação de fígados por fasciolose ao abate. Dos 45 fígados condenados, 37 apresentavam um ou mais parasitos no fígado. Em oito (21,3%) fígados bovinos com lesões características causadas pela presença de *F. hepatica*,

Tabela 1 - Avaliação da validade e da reprodutibilidade do exame de sedimentação fecal para ovos de *Fasciola hepatica* (FOREYT, 2005) frente à condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate.

Exame coproparasitológico	Condenação de fígados ao abate		Total
	Sim	Não	
Positivo	23 (28,39%)	0 (0%)	23 (28,4%)
Negativo	22 (27,16%)	36 (44,44%)	58 (71,6%)
Total	45 (55,56%)	36 (44,44%)	81 (100%)

$\chi^2$  de McNemar= 20,04 (P<0,0001);  $kappa= 0,48$

não se encontrou, ao exame macroscópico, nenhum exemplar do parasito, fato que sugere um tratamento químico bem sucedido, porém tardio.

A sensibilidade e especificidade do exame coproparasitológico foi de 51,11% e 100% respectivamente. Esses resultados concordam com os achados de MARTINS et al. (2008), que, utilizando a mesma técnica de sedimentação, encontraram sensibilidade de 59,8% e especificidade de 100%. ANDERSON et al. (1999) utilizaram uma técnica modificada de sedimentação para recuperação de larvas de nematoides no diagnóstico da fasciolose e encontraram 66,7% e 100% de sensibilidade e especificidade, usando como padrão ouro a presença de parasitos no fígado. A sensibilidade baixa dos exames de fezes está relacionada com o longo período de pré-patência, já que somente após a decorrência deste é que os ovos do parasito podem ser detectados nas fezes (LECLIPTEUX et al., 1998).

O valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) do exame de sedimentação fecal para ovos de *F. hepatica* foram respectivamente de 100% e 62%. O valor preditivo negativo reflete a baixa sensibilidade do teste, assim como o positivo reflete a boa especificidade do exame de sedimentação fecal, além do contexto epidemiológico, pois a prevalência da enfermidade influencia nesses indicadores (PEREIRA, 2008). ANDERSON et al. (1999) encontraram VPP de 100% e VPN de 46% e atribuíram essa diferença à dificuldade dos testes coproparasitológicos em estimarem o número de ovos de *F. hepatica* no grande volume de fezes de grandes ruminantes. A concordância entre o exame coproparasitológico e a condenação de fígados ao abate ( $kappa= 0,48$ ) é considerada regular (PEREIRA, 2008).

O teste de qui-quadrado de McNemar ( $\chi^2=20,04$ ) mostra evidências estatísticas de associação altamente significativa (P<0,0001) entre as frequências de fasciolose obtidas pela condenação de fígados ao abate (56%) e ao exame coproparasitológico (28%) de

sedimentação fecal, o que já era esperado, devido à baixa sensibilidade do exame coproparasitológico.

A correlação moderada ( $rs=0,5757$ , P<0,001), observada neste estudo, corrobora os achados de ANDERSON et al. (1999) e FLANAGAN et al. (2011), que relataram não haver uma relação entre o número de parasitos e o número de ovos encontrados no exame de sedimentação fecal por sua liberação ser irregular.

No presente estudo, animais com maior número de parasitos no fígado apresentaram também maior número de ovos nas fezes, corroborando ANDERSON et al. (1999), tornando mais fácil o diagnóstico da enfermidade.

Na tabela 2, são apresentados os resultados do teste ELISA comercial para detecção de coproantígenos e os resultados da condenação de fígados. O fato de três (8,1%) dos 36 animais negativos na linha de inspeção para fasciolose hepática reagirem ao ELISA sugere falha na inspeção ou uma possível reação cruzada com outras parasitoses. Alguns autores encontraram semelhanças antigênicas entre antígenos de *Schistosoma mansoni* e *F. hepatica* (ARONSTEIN et al., 2009; DEALMEIDA et al., 2007), mas nenhum deles utilizou o ELISA como forma de diagnóstico. Porém, HASSAN et al. (1989) encontraram reação cruzada entre *Schistosoma*, *Fasciola* e *Heterophyes*, quando utilizaram o ELISA para detecção de coproantígenos.

Em estudo realizado para avaliação do sucesso do tratamento da fasciolose com o triclabendazole, FLANAGAN et al. (2011) observaram que apenas após a 14 semana pós-tratamento é que o número de ovos cai 95% e os níveis de coproantígenos não podem mais ser detectados nas fezes do hospedeiro, o que pode justificar o diagnóstico positivo das amostras provenientes dos animais cujos fígados foram condenados, sem que se tenha encontrado exemplar de *F. hepatica*.

No presente estudo, a sensibilidade do kit comercial foi de 75,55% e a especificidade de 91,66%.

Tabela 2 - Avaliação da validade e da reprodutibilidade do teste ELISA comercial® em relação à condenação de fígados por fasciolose bovina ao abate.

Teste ELISA	Condenação de fígados ao abate		Total
	Sim	Não	
Positivo	34 (41,97%)	3 (3,7%)	37 (45,68%)
Negativo	11 (13,58%)	33 (40,74%)	44 (54,32%)
Total	45 (55,56%)	36 (44,44%)	81 (100%)

\* $\chi^2$  de McNemar= ns; kappa=0,65.

CHARLIER et al. (2008), utilizando kit ELISA comercial® (Instituto Pourquier – França), encontraram sensibilidade de 94% e a especificidade de 93% para o teste ELISA para detecção de coproantígenos em amostras bovinas. SPINO & FINLAY (1994), em estudo realizado em humanos, observaram correlação entre os níveis de coproantígenos e o grau de parasitismo do hospedeiro, tal fato pode justificar a menor sensibilidade encontrada no presente estudo, já que 39 (86,7%) dos 45 animais positivos ao abate possuíam 10 ou menos parasitos no fígado.

ALMAZÁN et al. (2001) encontraram sensibilidade de 93,3% quando utilizaram amostras fecais de ovinos, e reafirmaram que níveis de抗ígenos de excreção e secreção de *F. hepatica* podem ser detectados a partir da quarta semana pós-infecção.

Os valores preditivos positivos e negativos do kit Elisa comercial® BIO K 201 foram de 91,89% e de 75%, respectivamente. Estes resultados são em função da sensibilidade e especificidade do teste, mas também da alta prevalência da enfermidade. A sensibilidade e a especificidade são características inerentes ao teste, mas os valores preditivos do teste podem ser alterados conforme o contexto epidemiológico. Em baixas prevalências, o valor preditivo positivo é baixo, necessitando de um teste mais específico para diminuir o número de falsos positivos, enquanto que o valor preditivo negativo quase não se altera (PEREIRA, 2008).

No presente trabalho, as prevalências estimadas para fasciolose hepática foram de 45,68% (37/81) utilizando-se o kit ELISA® comercial e 28,39% (23/81) o exame coproparasitológico, enquanto que a prevalência mensurada a partir do padrão ouro foi de 55,55% (Tabelas 1 e 2). ANDERSON et al. (1999) estimaram a prevalência da fasciolose bovina pelos métodos coproparasitológico e ELISA, utilizando fígados como padrão ouro, e sugeriram que em estudos transversais em grupos com prevalência ao padrão ouro acima de 50 % seria recomendado o uso do exame de fezes por ser menos oneroso.

Neste estudo, não há evidências estatísticas de associação ( $p=0,06$ ) entre as frequências de fasciolose obtidas pela condenação de fígados ao abate e pelo kit ELISA comercial®, indicando que produzem resultados similares. O indicador kappa (0,65) também mostra que a concordância é boa (PEREIRA, 2008) entre essas formas de diagnóstico.

REICHEL (2002) relata a importância das técnicas que detectam ovos nas fezes não só por selecionar animais positivos, mas também por determinar um padrão de infecção, servindo como ponto de partida para outras análises. FARIA et al. (2008) deixam claro que, na escolha da técnica de diagnóstico para fasciolose hepática, deve-se levar em consideração não apenas a eficácia do teste, mas a operacionalização, com o objetivo de reduzir tempo e custo, portanto o custo benefício, ou seja, a eficiência do teste deve ser avaliada.

## CONCLUSÃO

Embora o kit ELISA comercial tenha apresentado sensibilidade maior do que o exame coproparasitológico, os testes são semelhantes para os demais indicadores de validade, apresentando reprodutibilidade boa e regular, respectivamente. Assim, não se exclui o uso do exame de fezes, pois se deve levar em consideração a eficiência do exame traduzida pelo baixo custo e fácil execução.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), projeto procad 093/2007 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), órgãos financiadores das bolsas e dos recursos financeiros.

## REFERÊNCIAS

ALMAZÁN, C. et al. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally

- infected sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, n. 2, p.101-112, 2001.
- ANDERSON, N. et al. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.83, n.1, p.15-24, 1999.
- ARONSTEIN, W.S. et al. Molecular identity of a major antigen of *Schistosoma mansoni* which cross-reacts with *Trichinella spiralis* and *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, Cambridge, v.92, n.1, p.133-151, 2009.
- CHARLIER, J. et al. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.153, n.1-2, p.44-51, 2008. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/5522057\\_Qualitative\\_and\\_quantitative\\_evaluation\\_of\\_coprological\\_and\\_serological\\_techniques\\_for\\_the\\_diagnosis\\_of\\_fasciolosis\\_in\\_cattle](http://www.researchgate.net/publication/5522057_Qualitative_and_quantitative_evaluation_of_coprological_and_serological_techniques_for_the_diagnosis_of_fasciolosis_in_cattle)>. Acesso em: 23 jan 2012, doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.035.
- DE ALMEIDA, M.A. et al. Preliminary antigenic characterisation of an adult worm vomit preparation of *Fasciola hepatica* by infected human sera. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.49, n.1, p.31-35, 2007.
- ESTUNINGSIH, E. et al. Development and application of a fecal antigen diagnostic sandwich ELISA for estimating prevalence of *Fasciola gigantica* in cattles in central Java, Indonesia. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.95, n.2, p.450-455, 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1672.1>>. Acesso em: 12 set 2011, doi: 10.1645/GE-1672.1.
- FARIA, R.N. et al. Concordância entre duas técnicas coproparasitológicas para o diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.4, p.1023-1025, 2008.
- FLANAGAN, A. et al. Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.176, n.2-3, p.170-176, 2011. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/49640005\\_Comparison\\_of\\_two\\_assays\\_a\\_faecal\\_egg\\_count\\_reduction\\_test\\_\(FECRT\)\\_and\\_a\\_coproantigen\\_reduction\\_test\\_\(CRT\)\\_for\\_the\\_diagnosis\\_of\\_resistance\\_to\\_triclabendazole\\_in\\_Fasciola\\_hepatica\\_in\\_sheep](http://www.researchgate.net/publication/49640005_Comparison_of_two_assays_a_faecal_egg_count_reduction_test_(FECRT)_and_a_coproantigen_reduction_test_(CRT)_for_the_diagnosis_of_resistance_to_triclabendazole_in_Fasciola_hepatica_in_sheep)>. Acesso em: 13 out 2011, doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.057.
- FOREYT, W.J. **Parasitologia Veterinária**: manual de referência. 5.ed. São Paulo: Roca, 2005. 240p.
- HASSAN, M.M. et al. Cross-reactions in immunodiagnosis of patients infected with Schistosoma, Fasciola and Heterophyes using ELISA. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, Cairo, v.19, n.2, p.845-851, 1989.
- KLEIMAN, F. et al. Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis os fasciolosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.2, p.181-185, 2005.
- LECLIPTEUX, Th. et al. Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.77, n. 2-3, p.103-114, 1998.
- MARTINS, I.V.F. et al. Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (FOREYT, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal , v.17, supl.1, p.110-112, 2008.
- MATTOS, M.J.T. et al. Comparação de duas técnicas parasitológicas na identificação de ovos de *Fasciola hepatica*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.16, n.1, p.105-112, 2009.
- PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 596p.
- REICHEL, M.P. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.1107, n.1-2, p.65-72, 2002.
- SPINO, A.M.; FINLAY, C.M. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.1, p.190-193, 1994.