

Evaluación de la estabilidad del sistema de diagnóstico inmunoenzimático DAVIH VIH-2

Evaluation of the stability of the immunoenzymatic diagnostic system DAVIH VIH-2

MSc. Dayamí Martín Alfonso,^I MSc. Kenia Romero Martínez,^{II} MSc. María Teresa Pérez Guevara,^{III} Lic. Anitza Fragas Quintero,^{IV} DrC. Eladio Silva Cabrera^V

Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el estudio de la estabilidad de los componentes y el producto terminado constituye un importante requisito regulatorio en los diagnosticadores.

Objetivo: realizar un estudio de estabilidad en tiempo real durante doce meses del sistema inmunoenzimático (ELISA) DAVIH VIH-2.

Métodos: se realizó un estudio de estabilidad en tiempo real durante doce meses en tres lotes del diagnosticador DAVIH VIH-2, ELISA indirecto diseñado para la detección de anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 en suero o plasma humano. Se controlaron los requisitos de calidad de los componentes de acuerdo a sus especificaciones. Se estudió la normalidad de valores de densidad óptica/valor límite y la homogeneidad de las medias y varianzas mediante las dócimas de Grubbs y Cochran. Se estimó la precisión en los controles positivo y negativo del sistema y en seis muestras con diferente reactividad al virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 mediante el cálculo del coeficiente de variación y se confeccionaron las cartas de control de los valores de las medias de densidad óptica respecto al tiempo.

Resultados: los requisitos de calidad de cada componente se cumplieron durante 12 meses, excepto las características funcionales del conjugado a partir de los seis meses. Los valores en las dócimas de Grubbs y Cochran fueron menores que los valores críticos tabulados para α del 1 y 5 % por lo que existió homogeneidad en las medias y las varianzas en todo el periodo. El coeficiente de variación se mantuvo inferior al 10 % excepto en las muestras con reactividad media y baja, mientras que en las cartas de control, los valores de densidad óptica se mantuvieron en el límite de la media ± 2 desviaciones estándar hasta el noveno mes.

Conclusiones: con estos resultados se propuso un periodo de validez para el producto terminado de 4 meses con un 50 % de cobertura.

Palabras clave: diagnosticador, estudios de estabilidad, ELISA, virus de Inmunodeficiencia humana tipo 2, VIH-2.

ABSTRACT

Introduction: the study of the components stability and the finished product is an important regulatory requirement for diagnostic tests.

Objective: to carry out, for twelve months, a stability in real time study on the immunosorbent assay system (ELISA) DAVIH HIV-2.

Methods: a real-time stability study was carried out for twelve months to three lots of the ELISA indirect diagnostic test DAHIV HVI/2, designed to detect antibodies to the human immunodeficiency virus type 2 in human serum or plasma. The components' quality requirements by their specifications were monitored. The normality of optical density values/limit value and homogeneity of the means and variances were studied by using Grubbs and Cochran tests. Precision was estimated at the system's positive and negative controls and in six samples with different reactivity to the human immunodeficiency virus type 2, by calculating the variation coefficient and control records were elaborated of the mean values of optical density compared to time.

Results: the quality requirements of each component were met for 12 months, except the kit's functional characteristics from the sixth months on. The values in Grubbs and Cochran tests were lower than the α -tabulated critical values for 1 and 5%, so homogeneity manifested in the means and variances throughout the period. The variation coefficient remained under 10%, except in the samples with low and middle reactivity, while in control records, the optical density values remained within the mean limits: ± 2 standard deviation, up to the ninth month.

Conclusions: after these results, four month was proposed as a validity period for the finished product, with coverage of 50%.

Keywords: diagnostic means; stability studies; ELISA; human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2).

INTRODUCCIÓN

Los estudios de estabilidad de los sistemas de diagnóstico brindan las evidencias del desempeño de los mismos a través del tiempo y dan garantía de la precisión y confiabilidad para que mantengan la calidad requerida durante la permanencia en el mercado, por el tiempo de vencimiento y en las condiciones de envase y almacenamiento declarados para el producto.^{1,2}

Para realizar un estudio de estabilidad de anaquel o en tiempo real se recomienda estudiar la estabilidad durante el uso, así como en la etapa de post-comercialización y se dispone que en los intervalos de tiempo en los que se realiza el ensayo se debe mantener las propiedades funcionales de los componentes del diagnosticador y si procede, se puede continuar el estudio hasta que la degradación del producto sea significativa.^{2,3}

La estabilidad en los diagnosticadores puede afectarse por una serie de factores ambientales tales como la temperatura, la luz y la humedad por lo que resulta importante determinar su influencia en la integridad de los productos y las variaciones que experimentan con respecto al tiempo. Por estas razones, estos estudios se han

convertido en una necesidad de la industria farmacéutica y biotecnológica para garantizar la calidad de sus productos.

Para realizar la solicitud de una Autorización de Comercialización de Diagnosticadores (ACD) se establece como requisito la incorporación de los estudios de estabilidad al Expediente de Registro⁴ en el cual se declara el periodo de validez del producto, que puede ser modificado cuando se realizan cambios mayores en la formulación de algún componente o en las condiciones de envase del producto.⁵ El objetivo del presente trabajo es realizar un estudio de estabilidad en tiempo real durante doce meses del sistema inmunoenzimático (ELISA) DAVIH VIH-2.

MÉTODOS

Diagnosticador

Se empleó el sistema ELISA indirecto para la detección de anticuerpos al virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2) en suero o plasma humano (DAVIH VIH-2) producido en los Laboratorios DAVIH, Cuba; el cual contiene 9 reactivos, suficientes para 192 determinaciones ([tabla 1](#)).

Tabla 1. Componentes y especificaciones de calidad del estuche DAVIH VIH-2

Componente	Características físicas			Características químicas	
	Características organolépticas (inspección visual)			Requisito	Método de ensayo
	Presentación	Color	Transparencia		
R1: Microplaca de 96 pozos sensibilizados	Microplaca de 8 tiras de 12 pocillos	Incolora	Transparente	No procede	No procede
R2: Suero Control Negativo	Líquido	Ligeramente amarillo	Transparente	$DO \leq 0,250$	DAVIH VIH-2
R3: Suero Control Positivo	Líquido	Ligeramente amarillo	Transparente	$DO \geq 1,00$	DAVIH VIH-2
R4: Diluyente de Muestra	Líquido	Ligeramente amarillo	Transparente	No procede	No procede
R5: Solución de lavado 25X	Líquido	Ligeramente amarillo	Transparente	7,2 a 7,4	Medición del pH
R6: Conjugado antiIgG-H peroxidasa	Líquido	Ligeramente amarillo	Transparente	Concentrado 200 X según título	DAVIH VIH-2
R7: Diluyente de conjugado	Líquido	Ligeramente amarillo	Transparente	No procede	No procede
R8: Cromógeno OPD	Tabletas	Blanco	no	No procede	No procede
R9: Tampón sustrato	Líquido	Incoloro	Transparente	5,0 a 5,1	Medición del pH

Lotes

Se utilizaron tres lotes consecutivos de cuatro estuches cada uno (768 determinaciones por lote), aprobados por el Laboratorio de Control de Calidad (Subdirección de Gestión de la Calidad, CICDC), los cuales se almacenaron de 2 a 8 °C hasta el momento del ensayo.

Panel de muestras

Se ensayaron para cada lote, cuatro réplicas de 6 muestras, pertenecientes al panel "VIH-2" del Banco de Sueros del Laboratorio de Control de Calidad del CICDC, con la siguiente caracterización:

- Dos muestras de reactividad alta en el sistema DAVIH VIH-2 con $1,00 \geq DO \geq 2,00$ referidas como muestras A21 y A40 de este panel.
- Dos de reactividad media ($1,00 \geq DO \geq 2,00$) referidas como M33 y M39.
- Dos de reactividad baja ($1,0 \geq DO \geq 1,5$) en el sistema como B35 y B34, las cuales pertenecen a seis individuos cubanos seropositivos a VIH-2 y negativos a VIH-1.

Frecuencia de ensayo

Se estudió la estabilidad, durante 12 meses, con una frecuencia trimestral, de los componentes del producto intacto. El ensayo se realizó según las instrucciones de uso del fabricante.⁶

Características físico-químicas

Se evaluaron las características organolépticas y se midió el pH de cada componente (pHmetro HANNA 211). En las características organolépticas se inspeccionó el color, la transparencia y la presencia de partículas por el examen visual. Se realizó una verificación del volumen con el uso de pipetas automáticas y cilindros graduados según el componente en estudio.

Ensayos

Se chequearon en los ensayos, las características funcionales de los componentes: R2 y R3 (sueros controles positivo, negativo) y el R6 (conjugado) con el cumplimiento de los límites establecidos para cada uno de ellos en la lectura de la densidad óptica (DO) a 492 nm ([tabla 1](#)).

Parámetros de validación

Un ensayo se consideró válido cuando la densidad óptica (DO) de las réplicas del suero control positivo (CP) $\geq 1,0$; la DO de al menos dos réplicas del suero control negativo (CN) $\leq 0,250$ y la relación $DO\ CP/DO\ CN \geq 4$, los cuales se establecieron como límites de aceptación en el manual de instrucción del estuche.

No se estudió la calidad microbiológica por ser un indicador no controlado.

Estudio de precisión

Se evaluó la precisión con el uso del coeficiente de variación (CV)⁷ para lo cual se calcularon la media (X) y la desviación estándar (DE) de valores normalizados de lecturas de DO/valor límite (VL) de las muestras en cada ensayo y en los periodos trimestrales que se evaluaron (0, 3, 6, 9 y 12 meses).

Se estudió la normalidad de los valores obtenidos en cada muestra ensayada por cada periodo estudiado, la homogeneidad de las medias de los valores con el criterio de aceptación de la Dócima de Grubbs (G max y min: estadígrafos de Grubbs)⁸ así como la homogeneidad de las varianzas de los tres lotes en estudio, con el criterio de aceptación de la Dócima de Cochran (C: estadígrafo de Cochran).⁸

Se confeccionaron para cada muestra, las cartas de control o gráficos de *Levey-Jennings*,⁹ en los que se incluyeron los valores de las medias de DO correspondientes a los periodos 0, 3, 6, 9 y 12 meses. En este caso se estableció como límite de control la media(X)±2DE.

Comprobación de la estabilidad del producto

Cuando el producto terminado (sistema DAVIH VIH-2) no fue estable, se procedió a realizar un ensayo del sistema, se utilizó los productos intermedios y a granel (PIG) que dieron origen a los componentes R2, R3 y R6, que se mantuvieron antes en congelación a -20°C desde el momento del envase de los componentes del lote hasta este paso, así como el resto de los componentes de cada lote de estudio y a partir de estos resultados se definieron los reactivos limitantes de la estabilidad.

Determinación del periodo de estabilidad del sistema

El periodo de estabilidad del producto terminado se estableció con la toma de la información obtenida en la evaluación de las características físico-químicas y funcionales de cada componente restándole el 50 % del tiempo total como periodo de cobertura.

RESULTADOS

Características físico-químicas

En las condiciones de almacenamiento (temperatura de 2 a 8 °C) evaluadas durante doce meses, no se observaron cambios en las características organolépticas con relación al color, presencia de partículas o cambios apreciables en el volumen de ninguno de los componentes del estuche hasta el noveno mes.

La solución de lavado (R5) y el tampón sustrato (R9) mantuvieron el pH en el intervalo establecido en las especificaciones de calidad de ambos componentes durante 12 y 9 meses en orden.

El reactivo conjugado R6 mantuvo sus características físicas durante 9 meses.

La solución de lavado (R5) diluida 1X para el uso, fue estable por una semana en un rango de temperatura de 2 a 8 °C mientras que las tabletas del cromógeno (R8) se deben reconstituir y utilizar de inmediato.

Estudio de precisión

Los valores de los estadígrafos G y C se comportaron por debajo de los valores críticos tabulados para estimar la homogeneidad en las medias de los valores de DO estudiados y de sus varianzas en todo el periodo como se ha mostrado en la [tabla 2](#) mientras que, en la [tabla 3](#) se mostraron los valores de las medias, la DE y el CV obtenido en cada evaluación de la precisión del sistema en el tiempo. Las muestras de reactividad alta (A21 y A40) así como el control positivo mantuvieron los valores del coeficiente de variación por debajo del 5 % en todo el periodo evaluado. Sin embargo, las muestras con reactividad media y baja comenzaron a acercarse al 10 % a partir de los seis meses y superaron este valor en la evaluación de los doce meses. La muestra M39 fue el único caso donde se superó el 15 % en la última evaluación que se realizó.

Tabla 2. Estimación de los estadígrafos de las dójimas de Grubbs y Cochrans en el estudio de precisión del sistema

Muestra	3 meses				6 meses				9 meses				12 meses			
	C1%	C5%	G1	G2	C1%	C5%	G1	G2	C1%	C5%	G1	G2	C1%	C5%	G1	G2
CP	0,698	0,673	1,363	1,15	0,711	0,734	1,13	1,47	0,8	0,76	1,224	1,12	0,69	0,773	1,25	1,14
CN	0,598	0,553	1,3	1,24	0,722	0,711	1,45	1,16	0,78	0,756	1,514	1,43	0,723	0,778	1,13	1,35
A21	0,677	0,634	1,26	1,16	0,688	0,734	1,233	1,42	0,689	0,713	1,17	1,112	0,888	0,766	1,43	1,46
A40	0,598	0,623	1,13	0,999	0,788	0,724	1,123	1,22	0,686	0,745	1,24	1,27	0,563	0,673	1,36	1,115
M33	0,698	0,473	1,163	1,2	0,811	0,733	1,38	1,25	0,865	0,777	1,19	1,39	0,823	0,775	1,22	1,23
M39	0,778	0,513	1,22	1,34	0,81	0,716	1,23	1,13	0,857	0,766	1,18	1,12	0,669	0,714	1,16	1,36
B35	0,78	0,693	1,3	1,13	0,732	0,754	1,15	1,11	0,845	0,76	1,23	1,26	0,624	0,773	1,252	1,24
B34	0,744	0,773	1,23	1,22	0,751	0,765	1,31	1,39	0,839	0,77	1,145	1,164	0,756	0,783	1,233	1,27

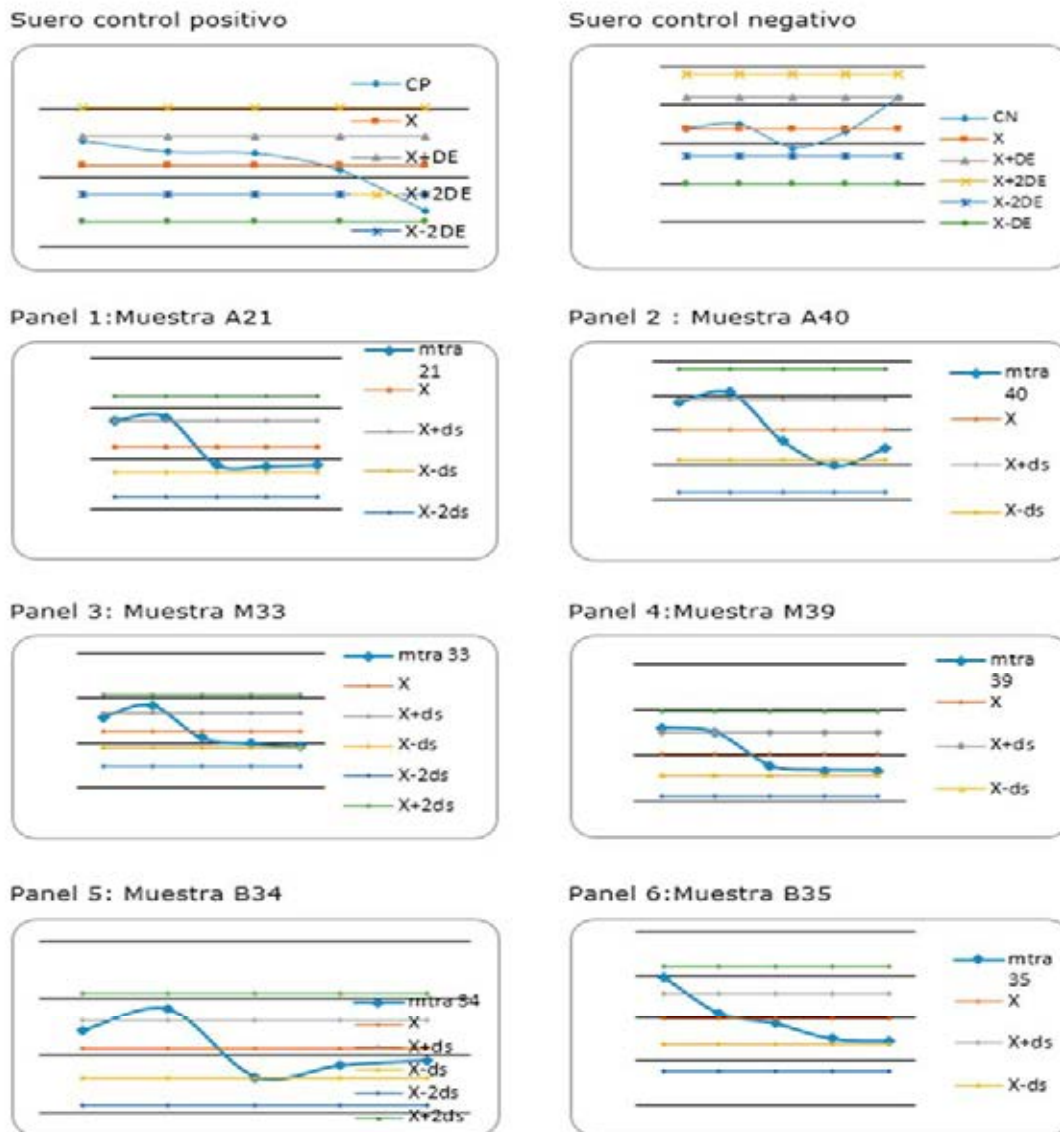
Valores críticos para número de réplicas (n) = 4 y lotes estudiados (p) = 3: C: estadígrafo de Cochrans para 1 y 5 %, G: estadígrafo de Grubbs (G1 y G2): C (á 1 %) = 0,883; C (á 5 %) = 0,798; G máxima (G1) = 1,496; G mínima (G2) = 1,481.

Tabla 3. Resultados de la precisión en muestras referencia y controles del sistema DAVIH VIH-2

Muestra	3 meses			6 meses			9 meses			12 meses		
	X/VL	DE	CV%	X /VL	DE	CV%	X/VL	DE	CV%	X/VL	DE	CV%
CP	5,69	0,016	0,28	5,8	0,026	0,44	4,57	0,02	0,43	4,52	0,107	2,36
CN	0,29	0,015	5,17	0,268	0,014	5,22	0,284	0,018	6,33	0,276	0,02	7,24
A21	5,72	0,019	0,33	5,32	0,216	4,06	5,11	0,232	4,54	4,98	0,253	5,08
A40	5,74	0,014	0,24	5,61	0,059	1,05	5,76	0,084	1,45	5,47	0,089	1,62
M33	4,63	0,125	2,69	4,10	0,292	7,12	3,74	0,338	9,03	3,47	0,395	11,38
M39	4,22	0,055	1,30	3,52	0,366	10,39	3,11	0,411	13,21	2,73	0,46	16,84
B35	3,49	0,211	6,04	3,17	0,234	7,38	2,89	0,266	9,2	2,72	0,303	11,14
B34	3,03	0,095	3,13	2,58	0,247	9,57	2,43	0,237	9,75	2,34	0,244	10,42

X: media de valores de DO/VL, DE: desviación estándar, CV %: coeficiente de variación en porcentaje

En la [figura](#) se mostraron las cartas o gráficos de control de cada suero control del sistema, así como del panel de referencia que se utilizó en el estudio. Se observó que no se obtuvieron valores dispersos por encima de la media(X) $\pm 2DE$ en ningún punto de la evaluación. Este intervalo se considera como idóneo, en el cual se deben distribuirse los valores en este tipo de estudio^{7,10,11} y los valores superiores a las dos desviaciones estándar son considerados como puntos erróneos e imprecisos para un ensayo de este tipo.



Evaluaciones (eje de las X) ;(1)-tiempo cero, (2):3 meses, (3): 6meses, (4): 9 meses (5): 12 meses.
 Eje de las Y: Panel: 1- 2-sueros de reactividad alta, 3-4- reactividad media, 5- 6.reactividad baja.

Fig. Cartas de control (Lewey-Jennings) para el sistema DAVIH VIH-2.

DISCUSIÓN

Características físico-químicas

Como parte de la evaluación de los índices físico-químicos susceptibles de cambiar durante el tiempo de almacenamiento que pueden influir en la calidad, seguridad y eficacia del producto se encuentran las características organolépticas y químicas.² Los componentes de este sistema cumplieron con sus especificaciones de calidad hasta el noveno mes, periodo en que la solución sustrato (R9) no cumplió con el índice de acidez (pH) establecido por lo que se convirtió en un reactivo limitante de la estabilidad del producto terminado.

Estudio de precisión

Los estadígrafos G y C en cada ensayo, representan los resultados de la homogeneidad de la muestra y la varianza, han indicado en la precisión intraensayos de los tres lotes en estudio; existió homogeneidad muestral. Sin embargo, el análisis del CV mostró el aumento de la dispersión de los valores de DO en las muestras con reactividad media y baja a VIH-2 (muestras M y B del panel de evaluación), a partir del segundo trimestre de evaluación ya que la desviación estándar de estas fue superior a las de alta reactividad. Resulta muy importante para el desarrollo de los protocolos de evaluación de la estabilidad de los diagnosticadores en general, la adecuada selección de las muestras que se utilizarán como patrones de precisión donde se incluya la diversidad de la reactividad así como el uso de diversas técnicas estadísticas que permitan concluir de manera conjunta, el momento real en que el producto comienza a ser susceptible y a perder su estabilidad.

Por otra parte, el aumento de la dispersión trajo consigo el incremento del coeficiente de variación a valores cercanos al 10 %, que es el límite permisible para este tipo de estudio en que se utilizan valores normalizados como en este caso, en el cual se utilizaron valores de la media sobre el valor límite del ensayo.⁷ La aplicación de esta metodología de normalización facilitó el procesamiento estadístico de los coeficientes de variación para las lecturas de DO inferiores a cero, tales como las lecturas obtenidas en los sueros débiles positivos y los sueros negativos.

El hecho de que en ninguno de los tres lotes evaluados durante los doce meses se obtuvieran valores dispersos, muestra que el sistema se comportó de forma precisa durante el periodo. Sin embargo, luego del noveno mes, en cada uno de los gráficos mostrados en la [figura](#) se observó una declinación inferior a la media en cada una de las seis muestras positivas del panel y el suero control positivo del sistema, así como un incremento de los valores de la media en los sueros negativos, lo cual solo se explicó por un evidente deterioro en las inmunoglobulinas del reactivo conjugado,¹² reforzándose el criterio de que este también constituye un reactivo limitante de la estabilidad del producto terminado.

Es importante también destacar la aplicación de estas útiles herramientas (gráficos de control) en este tipo de estudio, en la que se valora el tiempo en que un producto puede mantener su funcionalidad en la post-comercialización.¹³

Determinación del periodo de estabilidad del sistema

Cuando los lotes del producto presentan diferentes perfiles de estabilidad, la propuesta de periodo de validez debe basarse en los resultados del lote menos estable y la fecha de vencimiento a proponer estará dada por el tiempo en que todos los lotes estudiados cumplen con sus indicadores de calidad, estableciéndose un margen de seguridad o porcentaje de cobertura.^{14,15} En el caso, se observó la misma tendencia en todos los lotes, en los que ambos reactivos limitantes (R9 y R6) solo cumplieron con los indicadores de calidad empleados hasta el noveno mes. Es por eso que de acuerdo a los resultados de los ensayos químico-físicos, los de funcionalidad, así como el valor agregado de la cobertura de un 50 % del tiempo en que se mantuvo la estabilidad de los mismos, se propuso un periodo de validez de cuatro meses para el producto terminado.

Este corto periodo de estabilidad puede representar una debilidad para el producto terminado. Sin embargo, el hecho de que este sistema no fue diseñado para la comercialización a otros centros o al exterior, sino que juega un papel específico en el pesquisaje de anticuerpos al VIH-2 en el algoritmo de diagnóstico del VIH,¹⁶ etapa que se realiza en Laboratorio de Diagnóstico del CICDC y que no representa riesgos por la transportación, ni demoras para aplicarlo, sino que una vez que el lote es producido y liberado por el Laboratorio de Calidad de este Centro puede ser aplicado de inmediato.

Este estudio, unido a los estudios de validación del desempeño, permitió la obtención del Registro del diagnosticador ⁴ en la entidad regulatoria para los diagnosticadores de uso humano, el Centro de Control de Medicamentos (CECMED) en Cuba.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. CECMED. Regulación 20. Buenas Prácticas para la producción de los diagnosticadores, CECMED. 2004 [citado 12 de enero de 2015]. Disponible en <http://www.cecmmed.sld.cu>.
2. Norma Cubana NC-EN 13640. Estudios de estabilidad de diagnosticadores; 2004.
3. Urrutia E, Orta D, Pérez N, Barbería D, Vega M, Hernández L, et al. Estabilidad real de una formulación parenteral liofilizada de estreptoquinasa recombinante a temperatura ambiente. *Biotechnología Aplicada*. 2002; 19: 34-6.
4. CECMED. Requisitos generales para el registro de los diagnosticadores. Regulación. Ago 2014 [citado 12 de enero de 2015]. Disponible en <http://www.cecmmed.sld.cu>
5. CECMED. Regulación 34. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. CECMED. 2000 [citado 12 de enero de 2015]. Disponible en <http://www.cecmmed.sld.cu>.
6. Manual de uso del sistema DAVIH VIH-2. Edición; 2011.
7. Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev Sci Tech of Int Epiz*. 1998; 17(2): 507-26.

8. NC-TS-368: Guía para la Validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos, 1ra Edición, Anexo A, A 1-3. Dósimas de Grubbs y Cochcrans; 2004.
9. Norma NC ISO 8258. Gráficas de control de Shewart; 2002. CECMED. Regulación 47. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. CECMED. 2007 [citado 12 de enero de 2015]. Disponible en <http://www.cecmed.sld.cu> .
10. Paweska JT, Potts AD, Harris HJ, Smith SJ, Viljoen GJ, Dungu B. Validation of an indirect enzyme- linked immunosorbent assay for the detection of antibody against Brucella abortus in cattle sera using an automated ELISA workstation. Onderstepoort J. of Vet. Res. 2002;69:61-77.
11. Ochoa R. Validación de los inmunoensayos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. En: Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Ciudad de la Habana: Ediciones Finlay. 2008;57-75.
12. Trullols E. Validation of qualitative analytical methods. Tesis Doctoral Universidad Rovira Virgili. Departamento de Química orgánica y analítica. Tarragona, Francia; 2006.
13. Sierra R, Rodríguez E, Laguna A, González VL. Estudio de estabilidad de tabletas que contienen 20 mg de policoasanol como ingrediente activo. Rev. Ciencias Químicas. CENIC. 2006;37(3):143-7.
14. CECMED Regulación 25-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos biológicos y biotecnológicos. CECMED. 2000 [citado 12 de enero de 2015] Disponible en <http://www.cecmed.sld.cu>.
15. Díaz H, Pérez MT, Lubián AL, Nibot C, Cruz O, Silva E, et al. HIV Detection in Cuba: Role and Results of the National Laboratory Network. Medicc Review. 2011;13(2):9-13.

Recibido: 23 de diciembre de 2014.

Aceptado: 10 de junio de 2015.

Dayamí Martín Alfonso. Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. (CICDC). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correo electrónico: cicdc@infomed.sld.cu