

Hospital Pediátrico Docente "William Soler"

Evaluación cuantitativa de eficacia de un esterilizador químico que emplea formaldehído 2 % en fase de vapor a bajas temperaturas

Dra. Roxana Hidalgo Rodríguez, Téc Sonia Chiroles Despaigne y Téc. Odalys Villavicencio Betancourt

RESUMEN

Se desarrolló un método de análisis microbiológico, que permitió evaluar la eficacia del esterilizador modelo 130 LF marca Matachana, de fabricación española, cuyo principio de funcionamiento se basa en el uso de temperaturas bajas, empleando formaldehído 2 % en fase de vapor, como agente esterilizante. Las evaluaciones realizadas a esta tecnología, fueron comparadas con el método de referencia de esterilización química, que utiliza una mezcla de CO₂ con óxido de etileno. Para el análisis se emplearon fragmentos de catéteres compuestos químicamente por cloruro de polivinilo y fluoroetileno propileno o teflón, los que fueron inoculados previamente con cepas bacterianas de referencia, productoras de endosporas (*Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*) suspendidas en medios de cultivos con adición de materia orgánica e inorgánica, valorando el proceso en ambiente restringido de difusión del agente esterilizante. El resultado de las evaluaciones fue satisfactorio, obteniéndose 100 % de esterilidad para las condiciones planteadas, por cada ciclo.

Palabras clave: Eficacia, formaldehído 2 %, esterilización a bajas temperaturas.

La esterilización de dispositivos médicos termosensibles empleando esterilizantes químicos en fase de vapor a bajas temperaturas, ha sido aceptada de forma universal como un paso esencial en el control de infecciones nosocomiales en los centros de salud.

La metodología de referencia emplea el gas óxido de etileno (OxEt) como agente esterilizante químico, cumpliendo los límites de reducción en la carga microbiana normados para los procesos de esterilización.¹

El principio de funcionamiento de esta metodología requiere de la remoción de residuos generados durante el proceso, los cuales se adhieren a las superficies de los dispositivos reprocesados.

La eliminación total o disminución de residuos a límites permisibles normados requiere de un proceso de destoxificación que va desde 48 h hasta 10 d o más,² en dependencia del aumento del número de reesterilizaciones realizadas a un mismo dispositivo.³

La tecnología que emplea formaldehído 2 % como agente esterilizante en fase de vapor a bajas temperaturas es una alternativa reciente dentro de este tipo de metodología.

El formaldehído en su modo de acción a bajas concentraciones, lisa la pared celular de los microorganismos, alcaliniza grupos amino y sulfhidrilo de proteínas y los átomos de nitrógeno del anillo de las bases de purina.⁴ Como proceso alternativo ha mostrado actividad esporicida y bactericida bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad; estos efectos fueron demostrados primeramente para *Bacillus anthracis* en un proceso a 70 °C desarrollado por Esmarch en 1902.⁵

En estudios posteriores realizados por *Nordgren* en 1939,⁶ se demostró la importancia de la humedad relativa y la evacuación de la cámara, antes de la admisión de formaldehído-vapor, garantizando la penetración adecuada del agente esterilizante en el interior de la carga.

Este proceso comienza a usarse en la práctica hospitalaria en la década de los sesenta.

Estudios realizados por *Alder, Gingell y Mitchell*⁷ en el período comprendido entre 1971-1975, permitieron establecer un ciclo básico de uso de formaldehído (2 mL/ft³) a 73 °C durante 2 h, minimizando el daño a los equipos termosensibles, sin pérdida de la actividad esporicida.

Comprobaron además la disminución de niveles de residuos de formaldehído sobre dispositivos de goma y polietileno, alcanzando valores por debajo de 0,45 ppm (específicamente en tubos de PVC).

Establecieron controles para el proceso mediante el uso de indicadores físico- químicos y biológicos aún empleados en la actualidad.

En sus inicios, fue un proceso designado para el procesamiento de citoscopios y dispositivos similares, desde entonces se ha ido perfeccionando el equipamiento para garantizar el control necesario para la esterilización de una amplia variedad de dispositivos médicos.

En la actualidad el proceso consta de 2 ciclos de esterilización, cada uno con 5 etapas en la que primero se elimina el aire de la cámara esterilizadora, haciendo pulsos de vapor para obtener la humedad suficiente y el pre-acondicionamiento de la carga; después se realizan pulsos de formaldehído, concentrados a 2 %, alternando con pulsos de vapor.

Al terminar el tiempo de esterilización, los residuos de formaldehído son eliminados haciendo un ciclo de vacío y pulsando aire estéril al interior de la cámara. Se restablece la presión atmosférica y no requiere de tiempo de aireación, lo que representa una ventaja que al concluir el programa seleccionado, después de la apertura de la cámara, el material puede usarse de forma inmediata o almacenarse hasta el momento de su uso.

Teniendo en consideración la necesidad cada vez más vital de “reprocesar” artículos termosensibles, clasificados como críticos, que resultan de una creciente demanda actual y tomando como base el criterio de la compatibilidad entre los dispositivos y el agente esterilizante, el equipo de trabajo desarrolló un ensayo evaluativo basado en el método de “sobre muerte” a un equipo esterilizador que basa su principio de funcionamiento en

el uso del formaldehído 2 % en fase de vapor a bajas temperaturas comparado con la metodología de óxido de etileno, tecnología de referencia.

MÉTODOS

Se realizó un estudio comparativo para evaluar la eficacia, o el efecto microbicida del equipo esterilizador Matachana, modelo 130 LF, de fabricación española, el cual tiene acoplado un microprocesador, que permite el desarrollo de 2 programas de esterilización empleando bajas temperaturas. Como agente esterilizante, utiliza el formaldehído 2 % en fase de vapor.

Uno de los procesos se realiza a 50 °C, consta de 20 pulsos de formaldehído, un tiempo de esterilización de 120 min a una presión de 123 mbar y tiene una duración total de aproximadamente 5 h, incluida la aireación.

El otro ciclo se realiza a una temperatura de 60 °C, consta de 15 pulsos de formaldehído, un tiempo de esterilización de 60 min a una presión de 200 mbar y tiene una duración total de aproximadamente 3 h, incluida la aireación.

El método de referencia usado para establecer la comparación, fue el proceso de esterilización química, que emplea óxido de etileno como agente esterilizante y se desarrolla a bajas temperaturas.

Se utiliza una cámara esterilizadora de fabricación japonesa, modelo SAKURA adaptada para la realización de este proceso. Consta de un solo programa, en el cual se mezclan el óxido de etileno y el CO₂ en una proporción de 20/80 %, respectivamente.

La concentración de gases en el interior de la cámara es de 500-1 000 mg/L, una humedad relativa entre 60-90 % y una temperatura que oscila entre 55-60 °C, con un tiempo de esterilización, comprendido entre 4-6 h, la apertura de la cámara, se realiza 24 h después de concluido el proceso, teniendo lugar una destoxificación en horno a 60 °C, aproximadamente durante 8 h y un tiempo de aireación entre 7-10 d en un local ventilado.

Para la validación, se aplica un método microbiológico estándar establecido en la norma (ASTM. International standard Test Method to Determine Efficacy of Sterilization Processes for Reusable Medical Devices [simulated Use Test]: E 1837-96. ASTM, West Conshohocken, PA. 1996), que permite cuantificar el índice de reducción microbiana, es específico para procesos que emplean agentes esterilizantes químicos en estado gaseoso a bajas temperaturas, exponiendo el proceso de esterilización a 2 condiciones que representan “el caso más desfavorable”, bloqueando el paso del agente esterilizante.

En la neutralización del proceso se utiliza materia orgánica (proteínas) e inorgánica (sales).

Diseño experimental

Se emplearon fragmentos de catéteres de cloruro de polivinilo (PVC) con diámetro interno de 3 mm y 2 cm de largo, para confeccionar los indicadores de proceso, que funcionaron como soporte microbiano. Estos fueron primeramente esterilizados por

óxido de etileno y después inoculados asépticamente con una suspensión microbiana concentrada $1,0 \times 10^6$ ufc/10 μ L de medio líquido triptona soya (TSC) (OXOID), triptona soya más 0,5 % de fracción V de albúmina bovina (BDH) y triptona soya más 0,65 % de cloruro de sodio (MERCK).

El inóculo, se dejó secar durante 12 h a temperatura ambiente, dentro de placas de petri, en el interior de una cabina de seguridad biológica clase II A de fabricación cubana.

Estos controles de proceso fueron embalados en papel de uso médico, compuesto por una capa de papel kraft y otra de plástico bilaminado (polipropileno y poliéster) y sellados.

Se realizaron 5 ciclos de esterilización por cada programa, para ambos esterilizadores.

Los paquetes de prueba, cada uno con 3 fragmentos de catéteres, fueron colocados en la parte delantera, media y posterior en el interior de la cámara esterilizadora, a razón de 3 paquetes por ciclo, completando un total de 15 pruebas.

Cepas bacterianas utilizadas

Para la confección de los controles de proceso, se utilizaron bacterias productoras de endosporas, clasificados estos microorganismos altamente resistentes al proceso de esterilización química.

Para evaluar el proceso que emplea formaldehído en fase de vapor, se utilizó la cepa microbiana de referencia *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 lote: S-231P concentrada a $1,0 \times 10^5$ esporas/unidad (SGM BIOTECH, U.S.A.).

Para el control del proceso que emplea óxido de etileno se utilizó la cepa microbiana de referencia de *Bacillus subtilis var. niger* ATCC 9372 lote: G-91P concentrada a $1,0 \times 10^6$ esporas/unidad (SGM BIOTECH, U.S.A.).

Método microbiológico

Se conformaron 3 réplicas por cada condición planteada por ciclo de esterilización.

Cada paquete de pruebas fue asépticamente procesado, colocando cada fragmento de catéter en un tubo de ensayo que contenía medio de cultivo líquido para restituir el inóculo, el cual fue homogeneizado vigorosamente durante 5 min a temperatura ambiente.

Se realizaron diluciones seriadas. Cada dilución fue cuantificada por duplicado, sembrando en placas de Petri que contenían 10 mL de medio triptona soya agar. La extensión se realizó por espátula de Drigalski.

Los medios de cultivos (líquidos y sólidos) sembrados, fueron incubados a la temperatura correspondiente, para permitir el crecimiento de cada microorganismo. Posterior a los tiempos de incubación, se determinó presencia o no de turbidez en el tubo contenedor del catéter; de no observarse turbidez, se declara el fragmento de

catéter estéril; si se observa turbidez, se procede a un subcultivo del medio para especificar crecimiento del microorganismo.

Para evaluar los medios sólidos, se estableció como condición: de no existir crecimiento, se declara el fragmento de catéter estéril; de existir crecimiento, el límite de detección por placa es de 7 ufc/fragmento de catéter, teniendo en cuenta que este, fue restituido en 2 mL de medio, del cual se tomaron 100 µL para realizar la siembra, por lo que esta cantidad fue representada como $1 \log_{10}$

Los controles negativos estaban formados por fragmentos de catéteres estériles no inoculados, mantenidos asépticamente a temperatura ambiente hasta que se concluyeron los ciclos de esterilización. Fueron sometidos al mismo procedimiento de ensayo microbiológico.

Los controles positivos estaban formados por fragmentos de catéteres estériles inoculados, mantenidos asépticamente a temperatura ambiente hasta que se concluyeron los ciclos de esterilización. Fueron sometidos al mismo procedimiento de ensayo microbiológico.

RESULTADOS

El objetivo del estudio fue determinar la eficacia del proceso o efecto de letalidad sobre una población microbiana, formada por bacterias productoras de endosporas, realizado por el esterilizador químico que emplea formaldehído-vapor a bajas temperaturas, comparado con el método de referencia utilizado para este tipo de esterilización (óxido de etileno).

Para garantizar la efectividad del ensayo, cada uno de los esterilizadores fue probado con la cepa microbiana de referencia, recomendada por los estándares aplicados.

Los valores obtenidos, resultaron del promedio de 6 réplicas por cada condición, fueron expresados como el logaritmo sobre la base de 10 de la concentración microbiana recuperada en cada una de las diluciones.

El valor 0, representa la ausencia de crecimiento del microorganismo, para esa dilución.

En la tabla 1 se observan los valores correspondientes a los controles de biomasa microbiana recuperada por dilución en medio de cultivo triptona soya caldo, tanto en presencia de materia orgánica, representada por 0,5 % de albúmina bovina como en presencia de materia inorgánica, representada por 0,65 % de cloruro de sodio, partiendo de una concentración de 10^5 ufc/10 µL, como resultado de las diluciones realizadas se obtiene la disminución esperada correspondiente a cada suspensión.

Tabla 1. Eficacia del esterilizador FVBT en la eliminación de esporas bacterianas de *Bacillus stearothermophilus* en presencia de materia orgánica e inorgánica

Esterilizador	TSC	TSC + 0,65 %	TSC+ 0,5 %
FVBT	(Control de medio)	NaCl	Albúmina

Diluciones <i>Bacillus stearothermophilus</i> (ufc/10µL)	Control +	BR 50 °C	BR 60°C	Control +	BR 50 °C	BR 60 °C	Control +	BR 50 °C	BR 60 °C
1x10 ⁵	4,9640	0	0	4,9746	0	0	4,9507	0	0
1x10 ⁴	3,8781	0	0	3,8826	0	0	3,8092	0	0
1x10 ³	2,9956	0	0	2,9948	0	0	2,8965	0	0
1x10 ²	1,9685	0	0	1,9731	0	0	1,9542	0	0
1x10 ¹	0,9031	0	0	0,9542	0	0	0,8451	0	0
1x10 ⁰	No crecimiento	0	0	No crecimiento	0	0	No crecimiento	0	0
1x10 ⁻¹	No crecimiento	0	0	No crecimiento	0	0	No crecimiento	0	0

TSC: control de medio de cultivo utilizado como inóculo de los fragmentos de catéteres, TSC+ 0,5 % de albúmina: neutralizador orgánico del proceso, TSC+ 0,65 % de NaCl: neutralizador inorgánico del proceso, BR: biomasa microbiana recuperada/dilución posterior al proceso, Control (+): biomasa microbiana recuperada/dilución. Valor promedio de 6 réplicas.

Posterior al tratamiento con formaldehído en ambos ciclos (50-60 °C), no se recuperaron valores de biomasa, correspondiendo el valor 0 con la ausencia de crecimiento microbiano en ambos ciclos de esterilización por formaldehído, en presencia de ambas condiciones en las que fue suspendida la cepa microbiana *Bacillus stearothermophilus*.

En la tabla 2 se exponen los resultados del ensayo realizado al esterilizador químico que emplea óxido de etileno, el cual constituye el método de referencia, se observan los valores correspondientes a los controles de biomasa microbiana recuperada por dilución en medio de cultivo triptona soya caldo, tanto en presencia de materia orgánica, representada por 0,5 % de albúmina bovina como en presencia de materia inorgánica, representada por 0,65 % de cloruro de sodio, partiendo de una concentración de 10⁶ ufc/10 µL, como resultado de las diluciones realizadas se obtiene la disminución esperada correspondiente a cada suspensión.

Tabla 2. Eficacia de la esterilización por óxido de etileno en la eliminación de esporas bacterianas de *Bacillus subtilis var niger* en presencia de materia orgánica e inorgánica

Esterilizador óxido de etileno	TSC (Control de medio)	TSC+ 0,5 % albúmina	TSC+ 0,65 % NaCl
Diluciones <i>Bacillus subtilis var. niger</i> (ufc/10 µL)	Control +	BR 55 °C	Control + BR 55 °C

1x10 ⁶	5,9446	0	5,9616	0	5,9418	0
1x10 ⁵	4,9546	0	4,9673	0	4,9398	0
1x10 ⁴	3,8657	0	3,8704	0	3,7867	0
1x10 ³	2,9777	0	2,9946	0	2,8971	0
1x10 ²	1,9731	0	1,9868	0	1,9685	0
1x10 ¹	0,9031	0	0,8451	0	0,8451	0
1x10 ⁰	No crecimiento	0	No crecimiento	0	No crecimiento.	0
1x10 ⁻¹	No crecimiento	0	No crecimiento	0	No crecimiento	0

TSC: control de medio de cultivo utilizado como inóculo de los fragmentos de catéteres, TSC+ 0,5% de albúmina: neutralizador orgánico del proceso, TSC+ 0,65 % de NaCl: neutralizador inorgánico del proceso, BR: biomasa microbiana recuperada/dilución posterior al proceso, Control (+): biomasa microbiana recuperada/dilución. Valor promedio de 6 réplicas

Posterior al tratamiento con óxido de etileno a una temperatura de 55 °C, no se recuperaron valores de biomasa, correspondiéndose el valor 0 con la ausencia de crecimiento microbiano en presencia de ambas condiciones en las que fue suspendida la cepa microbiana *Bacillus subtilis*.

DISCUSIÓN

Como resultado del ensayo de eficacia, se alcanzó 100 % de esterilidad en cada fragmento de catéter por cada dilución sembrada y su réplica; en relación con las 2 condiciones planteadas y para cada uno de los ciclos del esterilizador evaluado, en comparación con la tecnología de referencia (óxido de etileno), según se observa en las tablas 1 y 2.

Se comprobó ausencia de crecimiento de las cepas microbianas de referencia (*Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*), utilizadas en las condiciones planteadas para la evaluación (albúmina 0,5 % y NaCl 0,65 %) posterior al tratamiento con el agente esterilizante, comparados con la biomasa recuperada en los fragmentos de catéter no procesados, tomados como controles positivos.

Los resultados son coincidentes con los obtenidos por *Manresa* en 1997 (*Manresa A. Validación del Sistema de Esterilización por Formaldehído a Bajas Temperaturas. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. España. 1997*), aplicando la metodología de ensayo establecida en la norma DIN 58948-14 y la cepa microbiana de referencia *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 para ambos procesos (50-60 °C), en los que obtuvo ausencia de crecimiento para las 9 pruebas que realizó, comparado con el crecimiento obtenido en la muestra control positivo.

El resultado de el actual estudio, difiere del resultado obtenido por *Alfa* en 1998,⁸ en el cual evalúa la eficacia del proceso que emplea ácido peracético como esterilizante líquido utilizado a 56 °C comparado con 100 % de óxido de etileno, para el que desarrolla el método de “el caso más desfavorable” establecido por la ASTM. En sus resultados, obtuvo 100 % de esterilidad para los fragmentos de catéter tratados por ácido peracético y 50 % de crecimiento microbiano representado por 3 log₁₀ de ufc/fto de catéter para la cepa de *Bacillus subtilis* en presencia de cloruro de sodio posterior al tratamiento con óxido de etileno.

Según los primeros estudios realizados a procesos de esterilización que emplean gas a bajas temperaturas (óxido de etileno y formaldehído) por *Abbott, Cockton y Jones* en 1956⁹ sobre el efecto de oclusión de esporas en presencia de materia orgánica e inorgánica, se observó específicamente, que el sustrato compuesto por cristales de sales era capaz de bloquear más la difusión del agente esterilizante.

Estudios realizados por *Doyle y Ernst* en 1967,¹⁰ demostraron que este fenómeno también ocurría en procesos de humedad y calor seco a altas temperaturas, por lo que no estaba limitado solamente a procesos realizados a bajas temperaturas.

Estudios recientes, realizados por *Alfa* en 1996,¹¹ en los que analizó la eficacia de peróxido de hidrógeno en fase de vapor comparado con 100 % de óxido de etileno a bajas temperaturas (50-60 °C), en presencia de materia inorgánica, obtiene resultados coincidentes con las primeras evaluaciones realizadas por *Abbott* en 1956.

Analizando la evaluación expuesta en las tablas 1 y 2I, se puede plantear, que los resultados obtenidos en relación con el proceso de formaldehído, se deben al modo de aplicación del agente esterilizante, el cual es inyectado a la cámara de forma fraccionada, o sea, intercalándose con pulsos de vapor saturado cada 15 min, lo cual ayuda a la disolución de los cristales tanto de sales como de proteínas, facilitando la penetración del agente esterilizante.

La admisión de formaldehído gaseoso a la cámara en sus inicios, se realizaba por un total de 4 pulsos, seguida de evacuaciones de aire seco, lo cual contribuía a la desecación de los cristales y no a su disolución (Alder VG. Sterilization by low temperture steam and formaldeyde under subatmospheric pressure at 80 °C. [ed. Sneath, PMA] COSPAR (Committee of Space Research) Technique Manual Series No. 4. Paris: COSPAR Secretariat; 1968. 141-55).

La modificación actual de la metodología, permite la obtención de mejores resultados en relación con la efectividad del agente esterilizante en su modo de acción, obteniéndose 100 % de efecto microbicida para este tipo de esterilización química y la total ausencia de crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* en presencia de materia orgánica e inorgánica.

En relación con los resultados obtenidos posterior al tratamiento por óxido de etileno expuestos en la tabla 2, se valoró el uso mixto en una proporción de 20 % del agente esterilizante con 80 % de CO₂, en presencia de altos niveles de humedad, lo que facilita la disolución de los cristales. *Alfa* en sus estudios utiliza 100 % del agente esterilizante, no existe mezcla de este con otros gases.

Se concluyó que se comprobó alta eficacia o 100 % de efecto microbicida para el proceso de esterilización química que emplea formaldehído a bajas temperaturas, en las muestras de catéteres inoculadas con 10^6 ufc/ mL de *Bacillus stearothermophilus*, obteniendo la total ausencia de crecimiento en presencia de materia orgánica e inorgánica.

Quantitative evaluation of the efficiency of a low temperature steam chemical sterilizer using formaldehyde 2 %

SUMMARY

A method of microbiological analysis was developed to evaluate the efficiency of Matachana sterilizer 130 LF made in Spain, whose functioning principle is based on the use of low temperatures, using formaldehyde 2 % at steam stage as a sterilizing agent. The evaluations performed to this technology were compared with the reference method of chemical sterilization that uses a mixture of CO₂ with ethylene oxide. Fragments of catheters chemically composed of polyvinyl chloride and fluoroethylene propylene or teflon, which were previously inoculated with reference bacterial strains producing endospores (*Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*) suspended in culture media with addition of organic and inorganic matter, were used to assess the diffusion process of the sterilizing agent in a restricted environment. The result of the evaluations was satisfactory. 100 % of sterility was attained at each cycle under the stated conditions.

Key words: Efficiency, formaldehyde 2 %, sterilization at low temperatures

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Greene VW. Desinfection and Sterilization of disposable devices/ equipment. In: Chemical Germicida in Health Care. Rutala WA ed. Washington USA:Association for professionals in Infection Control and Epidemiology;1995.
2. Environmental protection Agency. Notice of proposed rule making on protection of stratospheric ozone (40 CFR part 82). Fed Reg 1993;(58):28093-192.
3. Hidalgo R, Chiroles S, Villavicencio O. Dispositivos Médicos de uso único reprocessados por esterilización química empleando óxido de etileno. Rev Cubana Hig Epidemiol 2002(40):2.
4. Favero MS. Chemical disinfection of medical and surgical materials. En: Block SS, ed. Disinfection, sterilization and preservation. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger;1983. p. 469-92.
5. Esmarch E. Die wirking von Formalinwässer/ dämpfen in Disinfectios apparat Hygenische Rundschau 1902;12:961-70.
6. Nordgren C. Investigations on the sterilizations efficiency of gaseous formaldehyde. Acta Patol Microbiol. Escand 1939;11:1-165.
7. Mitchell JP, Alder VG. The disinfection of urological endoscopes. British J Urol 1975;47:571-6.

8. Alfa MJ, De Gagne P, Olson, Hizon R. Comparison of liquid chemical sterilization with peracetic acid and ethylene oxide sterilization for long narrow lumens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;26:469-77.
9. Abbott C F, Cockton J, Jones W. Science papers and discussions, resistance of crystalline substances to gas sterilization. *J Pharm Pharmacol* 1956(6):709-21.
10. Doyle JE, Ernest RR. Resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores occluded in water- insoluble crystals to three sterilization agents. *Appl Microbiol* 1967;15:726-30.
11. Alfa M J, De Gagne P, Olson N, Puchalski T. Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100 % ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:92-100.

Recibido: 17 de enero de 2005. Aprobado: 11 de noviembre de 2005.
Dra. *Roxana Hidalgo Rodríguez*. Calle 10 # 61 e/ C y D Lawton. CP 10700. Ciudad de La Habana, Cuba.