

Artículo Original

Detección de carbapenemasas NDM en *Klebsiella pneumoniae* utilizando el método modificado de inactivación del carbapenémico

Detection of NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* using the modified method of carbapenemic inactivation

Margarita Lovera-García ¹, Mirtha Roque-Alcarraz ²

Recibido: 01/09/2020 Aceptado: 27/12/2021 Publicado: 31/12/2021

Resumen

Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo Nueva Delhi Metalobetalactamasa (NDM) genera un grave problema en la salud pública debido a su mecanismo de resistencia antibiótica y rápida diseminación, causando altas tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados al agotarse las opciones de terapia antibiótica. El objetivo del estudio fue la detección de carbapenemasas NDM en *Klebsiella pneumoniae* utilizando el método modificado de inactivación del carbapenémico (mCIM). Se realizó un estudio de corte transversal utilizando aislados clínicos de un hospital nivel IV de Lima (Perú) en los meses de marzo a mayo de 2018. Se trabajó con 40 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, positivos para el gen NDM y 15 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* sensibles a carbapenémicos, negativos para el gen NDM. La identificación del gen se realizó por PCR convencional. El mCIM en *Klebsiella pneumoniae* tipo NDM demostró una sensibilidad y especificidad del 100% y kappa de 1 comparado con el método PCR. Se recomienda en los laboratorios la implementación del mCIM para detección de carbapenemasas tipo NDM en *Klebsiella pneumoniae* como método rápido, fácil, de bajo costo y oportuno para control de diseminación hospitalaria de este tipo de bacterias.

Palabras clave: carbapenemasas; carbapenémico; PCR; *Klebsiella pneumoniae* NDM; metalobetalactamasas; mCIM.

Abstract

New Delhi-type carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* Metallo-beta-lactamase (NDM) generates a serious public health problem due to its mechanism of antibiotic resistance and rapid dissemination, causing high rates of morbidity and mortality in hospitalized patients when antibiotic therapy options are drained. The objective of the study was to observe the detection capacity of NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* using the modified carbapenem inactivation method (mCIM). A cross-sectional study was carried out using clinical isolates from a level IV hospital in Lima (Perú) in the months of March to May 2018. It was worked with 40 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems, positive for the NDM gene and 15 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* sensitive to carbapenems, negative for the NDM gene. The identification of the gene was carried out by conventional PCR. The mCIM in *Klebsiella pneumoniae* type NDM demonstrated a sensitivity and specificity of 100% and kappa of 1, compared to the PCR. The implementation of the mCIM for the detection of NDM-type carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* is recommended in laboratories as a fast, easy, low-cost, and timely method for controlling the hospital spread of this type of bacteria.

Keywords: carbapenemases; carbapenem; PCR; *Klebsiella pneumoniae* NDM; metallobeta-lactamases; mCIM.

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.
Autor para correspondencia: marvilov@hotmail.com - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0483-5756>
² Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.
E-mail: mroquea@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9154-5767>

Citar como:

Lovera-García, M. y Roque-Alcarraz, M. (2021). Detección de carbapenemasas NDM en *klebsiella pneumoniae* utilizando el método modificado de inactivación del carbapenémico. *Ciencia e Investigación* 2021 24(1):3-7. doi: <https://doi.org/10.15381/ci.v24i1.22225>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

INTRODUCCIÓN

El incremento de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) es un grave problema y uno de los mayores desafíos a nivel mundial; aún más, cuando se trata de organismos productores de carbapenemasas (PC-ERC), a diferencia de los no productores de carbapenemasas (No PC-ERC), los genes de carbapenemasas de los PC-ERC contenidos en elementos genéticos móviles son responsables de su rápida propagación, limitando las opciones de tratamiento, siendo los causantes del alto impacto que se ve reflejado en la alta morbilidad y mortalidad de los pacientes, el costo que acarrea la estancia hospitalaria y el tratamiento con antibióticos de amplio espectro ¹⁻⁵.

En la actualidad, se utilizan dos esquemas de clasificación de las betalactamasas: la de Ambler y Bush. El esquema de Ambler se basa en la secuencia de aminoácidos de las enzimas, agrupándolas en cuatro clases A, B, C y D. Las clases A, C y D son betalactamasas con serina en su sitio activo; mientras que, las betalactamasas clase B son metaloenzimas (metalobetalactamasas) dependientes de zinc y son inhibidas por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El otro esquema es una clasificación funcional propuesta por Bush y colaboradores en 1985, designa las carbapenemasas con numerales grupo 1, 2, 3, y 4, basándose en los perfiles hidrolíticos e inhibitorios de las enzimas por compuestos como el ácido clavulánico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), aztreonam y oxacilina.

La carbapenemasa NDM (New Delhi Metalobetalactamasa) pertenece al grupo B de la clasificación de Ambler y al grupo 3 de la clasificación de Bush, neutraliza todos los betalactámicos, excepto el aztreonam y son inhibidas por EDTA⁶⁻¹².

Klebsiella pneumoniae, entre los enteropatógenos productores de carbapenemasas, es el que ha generado mayor impacto epidemiológico, clínico y responsable de brotes endémicos a nivel mundial^{14, 15}.

En el año 2008 se reportó el primer caso en el mundo (India) de una carbapenemasa del tipo NDM producida por una cepa de *Klebsiella pneumoniae*, expandiéndose desde aquel año en todos los continentes y diseminándose rápidamente en el ambiente hospitalario. En el año 2011 se reportó el primer caso en Latinoamérica, en el país de Guatemala^{12, 16}; después de dos años se reportó en Colombia. En Perú el primer reporte de *Klebsiella pneumoniae* NDM fue en el año 2016¹⁶.

Es sumamente importante desarrollar en los laboratorios hospitalarios métodos rápidos, sencillos, de bajo costo y accesibles para detección de carbapenemasas, con la finalidad de implementar estrategias de control de brotes, prevención de diseminación e información al clínico en breve tiempo.

Los métodos fenotípicos más utilizados para la detección de carbapenemasas incluyen: Test de Hodge modificado, Carba NP, mCIM y ensayos moleculares ¹³ (ver Tabla 1).

El objetivo principal de este artículo fue la detección de carbapenemasas NDM en *Klebsiella pneumoniae* utilizando el método modificado de inactivación del carbapenémico (mCIM) frente a la técnica de reacción en cadena a la polimerasa (PCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio realizado fue de tipo transversal, se estudiaron un total de 55 aislados clínicos (cepas) de *Klebsiella pneumoniae* de un hospital nivel IV, Lima, Perú.

Cepas: Se tomaron 40 cepas de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de hisopados rectales de vigilancia, positivas para el test de sinergia con el inhibidor etilendiaminotetraacético (EDTA), positivas para el gen bla_{NDM} y CMI (Concentración mínima inhibitoria) ≥4 µg/mL para imipenem (IMP) y meropenem (MEM). 15 cepas de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de urocultivos, negativas para el gen bla_{NDM} y CMI ≤1 µg/mL para imipenem (IMI) y meropenem (MEM). La identifica-

Tabla 1. Comparación del Test de Hodge Modificado, el Carba NP y el mCIM

	TEST DE HODGE MODIFICADO	CARBA NP	mCIM mCIM
REACTIVOS	Usa reactivos ya disponibles en el laboratorio	Requiere reactivos especiales no usados de rutina en el laboratorio	Usa reactivos ya disponibles en el laboratorio
COSTO DE MATERIALES	<\$1	\$2-10 por prueba	<\$1 por prueba
Tiempo de respuesta	24 h Requiere incubación de toda la noche	2 horas	24 h Requiere incubación de toda la noche
INTERPRETACIÓN	Interpretación subjetiva	Interpretación subjetiva	Interpretación subjetiva pero menos problemática
FORTALEZAS	Fácil de montar	Resultados rápidos Detecta carbapenemasas en <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter</i>	Buena sensibilidad para la detección de carbapenemasas de las clases A, B y D de Ambler en <i>Enterobacteriaceae</i>
LIMITACIONES	Falsos positivos con algunos <i>Enterobacter spp</i> que poseen AmpC y alteraciones en las porinas. Falsos negativos con carbapenemasas NDM-1	Pobre sensibilidad para la detección de carbapenemasas OXA-48	Pobre sensibilidad y especificidad para carbapenemasas en <i>Acinetobacter</i>

Fuente: CLSI Subcomité de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST). CLSI Boletín de noticias. junio de 2017;2:17. Disponible en: https://clsi.org/media/1869/ast_newsletter_sp3.pdf

ción y la susceptibilidad antimicrobiana (CMI) de las 55 cepas fue mediante el sistema automatizado MicroScan WalkAway Plus (Siemens®).

Pruebas moleculares: Se utilizó la técnica de PCR convencional en las 55 cepas, realizando las etapas de extracción de ADN, amplificación del gen bla_{NDM} y la electroforesis en gel de agarosa.

Método modificado de inactivación del carbapenémico (mCIM)¹³: Con un asa microbiológica estéril y descartable de 1µL, se cogió la bacteria a estudiar de un cultivo fresco en agar Mueller Hinton (MHA), la asada se transfirió a un tubo con 2 mL de caldo tripticasa soya (TSB) mezclando la suspensión en Vórtex. Se adicionó un disco de meropenem de 10µg a esta suspensión. La suspensión de TSB conteniendo el disco, se incubó por 4 horas de 37°C en ambiente de aire con la finalidad de que en caso la bacteria en estudio sea una productora de carbapenemasas, el carbapenem en el disco sea hidrolizado. A continuación antes de cumplir las 4 horas de incubación, se preparó una suspensión de 0.5 McFarland de *Escherichia coli* ATCC® 25922, la cual se inoculó en una placa de agar Mueller Hinton (MHA)

siguiendo el procedimiento para disco difusión como se describe en el CLSI M02. Una vez concluidas las 4 horas, se procedió a remover el disco del TSB usando un asa de 10 µL eliminando el exceso de líquido del mismo. El disco de meropenem, se colocó inmediatamente en la placa del MHA que fue inoculada con *Escherichia coli* ATCC®25922. Seguidamente se incubó la placa a 37°C en ambiente de aire. Después de 24 horas de incubación, se midió el halo de inhibición alrededor del disco de meropenem.

RESULTADOS

El mCIM en *Klebsiella pneumoniae* tipo NDM demostró una sensibilidad y especificidad del 100% y kappa de 1 comparado con la técnica de PCR considerada como la prueba “Gold Standard”. Las lecturas se interpretaron como carbapenemasa positiva cuando el disco presentó un halo de 6 mm (Fig. 1), esto se observó en todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae* tipo NDM. Por otro lado, se interpretaron como carbapenemasa negativa cuando el disco presentó un halo igual o mayor a 19 mm (Fig. 2) (Tablas 2-4).



Figura 1. Halo 6 mm = mCIM Positivo



Figura 2. Halo 20 mm = mCIM Negativo

Tabla 2. Tabla de contingencia del Método mCIM para detección de carbapenemasas tipo NDM en *Klebsiella pneumoniae*

Parámetro	Cálculo	95% de intervalo de confianza	
		Inferior	Superior
Kappa	1,000	1,000	1,000
N de casos válidos	55	55	55

Tabla 3. Determinación del nivel de concordancia (Índice Kappa) del Método mCIM para detección de carbapenemasas tipo NDM en *Klebsiella pneumoniae* con respecto a la prueba PCR “Gold Standard”

		PCR-NDM		Total
		Negativo	Positivo	
mCIM	Negativo	15	0	15
	Positivo	0	40	40
	Total	15	40	55

Tabla 4. Valoración del coeficiente kappa

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
0,00	Pobre (Poor)
0,01 – 0,20	Leve (Slight)
0,21 – 0,40	Aceptable (Fair)
0,41 – 0,60	Moderada (Moderate)
0,61 – 0,80	Considerable (Substantial)
0,81 – 1,00	Casi perfecta (Almost perfect)

Fuente: Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa (Cerdeja y Villarreal, 2008)

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el mCIM demostró la detección de carbapenemasas NDM en *Klebsiella pneumoniae*, presentando una sensibilidad y especificidad del 100%, demostrando alta concordancia con el método PCR, que es el método “Gold Standard”. El mCIM demostró ser un método sencillo, confiable, reproducible, económico y fácil de realizar e interpretar.

Meier M. y Hamprecht A.¹⁷, en el 2019, reportaron un estudio en el que compararon sistemáticamente cuatro métodos (Carba NP test, β Carba test, NeoRapid Carb, mCIM) para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas a partir de frascos de cultivos de sangre, siguiendo un protocolo de hemólisis. Los cuatro métodos demostraron buena detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas. El mCIM con algunas variaciones ajustadas al estudio, no reportó falsos positivos y se obtuvo para este método una sensibilidad y especificidad del 100%, resultado que concuerda con los resultados del presente estudio.

Yu B. et.al.¹⁸, en el 2018 publicaron un estudio donde evaluaron el mCIM para corroborar la sospecha de carbapenemasas en Enterobacterias de aislamientos clínicos. Se recolectaron 145 cepas de cuatro hospitales en China, identificadas por sistema automatizado y presencia de genes de carbapenemasas confirmado por el método PCR. El estudio indicó que el mCIM es un método simple y efectivo para identificar a Enterobacterias productoras de carbapenemasas; características que se comprobaron en el presente estudio.

En un estudio realizado en el 2017, Pragasam A. et.al.¹⁹ reportaron que con Rapidec Carba NP se detectó el 90% de bacterias productoras de carbapenemasas; mientras que, con mCIM se detectó el 99% de los aislamientos analizados. Rapidec Carba NP es una prueba rápida, detecta carbapenemasas en menos de 2 horas siendo una de sus fortalezas, pero la sensibilidad se reduce para la detección de carbapenemasas blaOxa-48; mientras que, el método mCIM es altamente sensible para la detección de esta enzima. La fortaleza del mCIM fue su alta sensibilidad y especificidad (>99% y 99%) y su limitación fue el tiempo transcurrido (24 horas) para la detección de carbapenemasas; ratificamos este resultado en nuestro estudio, en cuanto a alta sensibilidad y especificidad.

Sin embargo, el tiempo empleado en el desempeño del método no deja de ser oportuno en comparación con otras metodologías.

Concordamos con Kotb y Mowafy²⁰ que, el mCIM para la identificación de enterobacterias productoras de carbapenemasas es relativamente simple y económico; adicionalmente a lo indicado, Meier M y Hamprecht A.¹⁷. y Gauthier L. et.al.²¹ mencionaron que es un método preciso y reproducible donde los sistemas automatizados no están disponibles¹⁶.

CONCLUSIONES

Se recomienda a los laboratorios hospitalarios, la implementación del método modificado de inactivación del carbapenémico o mCIM para detección de producción de carbapenemasas tipo NDM en *Klebsiella pneumoniae* como método rápido, fácil, de bajo costo y de detección oportuna para control y prevención de diseminación hospitalaria de estas bacterias y la información en breve tiempo, para que el clínico elija, entre las pocas opciones, la mejor terapia antibiótica para pacientes infectados, con la finalidad de disminuir la tasa de morbilidad y mortalidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yamada K, Sasaki M, Imai W, Murakami H, Morita T, Aoki K, et al. Evaluation of inhibitor-combination mCIM for detecting MBL-producing Enterobacteriales using three MBL inhibitors. J Med Microbiol [Internet]. 1 de noviembre de 2019 [citado 24 de junio de 2020];68(11):1604-6. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001073>
2. Viegas D, Soares V. Prevalence of carbapenemase in Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems isolated in a tertiary referral hospital. J Bras Patol E Med Lab [Internet]. 2018 [citado 24 de junio de 2020];54(2). Disponible en: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1676-2444.20180017>
3. Reyes-Chacón J, Villacís-Acuña J, Chicaiza-Alomoto S, Satán-Salazar C, Salas-Iglesias S, Ushiña-Cueva L, et al. Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae. Infectio [Internet]. 3 de junio de 2017 [citado 24 de junio de 2020];21(4). Disponible en: <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/688>

4. Pancotto L, Nodari C, Rozales F, Soldi T, Siqueira C, Freitas A, et al. Performance of rapid tests for carbapenemase detection among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Microbiol* [Internet]. octubre de 2018 [citado 24 de junio de 2020];49(4):914-8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838217303349>
5. Tamma P, Simner P. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. Kraft CS, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. Noviembre de 2018 [citado 24 de junio de 2020];56(11). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01140-18>
6. Moreno K. Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*. [Internet]. 2013;70(608):599-608. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=47783>
7. Medina C, Muñoz J, Ortega R. Prevalencia del gen blaNDM en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aislados de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en el periodo de Junio a Octubre–2017 [Internet] [Tesis]. [Managua, Nicaragua]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN; 2017. Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/12271>
8. Pena I. Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas [Internet] [Tesis Doctoral]. [Madrid, España]: Universidad Complutense de Madrid; 2016. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>
9. Márquez K, Rojas A, Camacho G. *Klebsiella* productora de carbapenemasa en pediatría: revisión de la literatura. *Rev Latin Infect Pediatr*. [Internet]. 2017;30(3):107-15. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=75091>
10. Lopez A. Resistencia a carbapenémicos en bacilos Gram negativos, mediada por carbapenemasas [Internet] [Grado en Medicina]. [Santander, España]: Universidad de Cantabria; 2018. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10902/14601>
11. Salgado P. Factores de riesgo de colonización intestinal por enterobacterias productoras de carbapenemasas al ingreso en una unidad de cuidados críticos [Internet] [Tesis Doctoral]. [Madrid, España]: Universidad Autónoma de Madrid UAM; 2017. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/681484>
12. Arbizú-Medina O, García-Rosales K, Cerda-Aragón H, Martínez-García W, Pérez-Martínez A, Lanzas-Baca Y. Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en especies de Enterobacteriaceae aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua. 2018;60:4.
13. CLSI Subcomité de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST). CLSI Boletín de noticias. junio de 2017;2:17. Disponible en: https://clsi.org/media/1869/ast_newsletter_sp3.pdf
14. Rodríguez E, Saavedra S, Leal A, Álvarez C, Olarte N, Valde-rama A, et al. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomedica*. 20 de enero de 2014;34(1):224. Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1696>
15. Rojo V, Vázquez P, Reyes S, Puente Fuertes L, Cervero M. Factores de riesgo y evolución clínica de las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en un hospital universitario de España. Estudio de casos y controles. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2018 [citado 9 de julio de 2020];31, 5:427-34. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6194862/>
16. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo J, Chiappe-Gonzalez A, Vargas-Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori D, et al. *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* [Internet]. 30 de junio de 2017 [citado 27 de junio de 2020];34(2):261. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gov.pe/index.php/rpmesp/article/view/2615>
17. Meier M, Hamprecht A. Systematic Comparison of Four Methods for Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriales Directly from Blood Cultures. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 14 de agosto de 2019 [citado 27 de junio de 2020];57(11):e00709-19, /jcm/57/11/JCM.00709-19.atom. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/57/11/e00709-19>
18. Yu B, Dong D, Wang M, Guo Y, Yin D, Hu F. Evaluation of modified carbapenem inactivation method for suspected carbapenemase among Enterobacteriaceae clinical isolates. *Oncotarget* [Internet]. 26 de junio de 2018 [citado 27 de junio de 2020];9(49):29233-7. Disponible en: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.25603>
19. Pragasam A, Veeraraghavan B, Bakthavatchalam Y, Gopi R, Aslam R. Strengths and limitations of various screening methods for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae including new method recommended by clinical and laboratory standards institute, 2017: A tertiary care experience. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 28 de julio de 2020];35(1):116. Disponible en: <http://www.ijmm.org/text.asp?2017/35/1/116/202349>
20. Kotb M, Mowafy H. Detection of Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae using the Modified Carbapenem Inactivation Method. *Egypt J Med Microbiol*. 2019;28(4):7.
21. Gauthier L, Bonnin R, Dortet L, Naas T. Retrospective, and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Butaye P, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 3 de febrero de 2017 [citado 27 de junio de 2020];12(2):e0170769. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0170769>

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Autofinanciado.