

Implementación de un método molecular para la identificación de *Mycoplasma pneumoniae* resistente a macrólidos

Implementation of a molecular method for the detection of macrolide-resistant
Mycoplasma pneumoniae

Ruxana Sardiñas Morales^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-1110-5460>

Brian Arturo Mondeja Rodríguez² <https://orcid.org/0000-0001-6196-3570>

Yenys Ramírez Cintra¹ <https://orcid.org/0000-0002-3907-8468>

Nadia María Rodríguez Preval¹ <https://orcid.org/0000-0002-1921-2527>

¹Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

²Centro de Estudios Avanzados de Cuba. La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: ruxana@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: *Mycoplasma pneumoniae* es causa frecuente de infecciones respiratorias en niños y jóvenes. Los macrólidos son la primera línea de tratamiento. La rápida emergencia de resistencia a estos antimicrobianos ha motivado el desarrollo de métodos moleculares para su detección en muestras clínicas positivas a este patógeno.

Objetivo: Implementar un método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de resistencia a macrólidos a partir de muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*.

Métodos: Se implementó una RT-PCR para la detección de las mutaciones A2058G y A2059G en el ARNr 23S de *M. pneumoniae*. Se analizaron 24 muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*, que provenían de pacientes con síntomas respiratorios. Se evaluó la sensibilidad, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad de la RT-PCR.

Resultados: La RT-PCR mostró un 100 % de especificidad para *M. pneumoniae* y un 92 % de sensibilidad, con un límite de detección de 2 copias/ μ L, que equivale a

10 copias/reacción. Además, se demostró la reproducibilidad y repetibilidad de estos resultados. Se obtuvo una correcta identificación de los genotipos salvaje y mutante, correspondientes a cada control. De las muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*, el 77,3 % (17/22) se identificó como sensible a macrólidos y el 22,7 % (5/22) como resistente.

Conclusiones: La alta sensibilidad y especificidad del método de RT-PCR implementado permite que el Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí cuente con un método eficaz para el diagnóstico de *M. pneumoniae* resistente a macrólidos.

Palabras clave: *Mycoplasma pneumoniae*; RT-PCR; ARNr 23S; resistencia a macrólidos.

ABSTRACT

Introduction: *Mycoplasma pneumoniae* is a common cause of respiratory track infections in children and young adults. Macrolides are the first-line treatment. The rapid emergence of resistance to these antimicrobials has motivated the development of molecular methods for their detection in clinical samples positive for this pathogen.

Objective: To implement a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method for the detection of macrolide resistance in *M. pneumoniae* positive clinical samples.

Methods: An RT-PCR was implemented to detect mutations A2058G and A2059G in 23S rRNA of *M. pneumoniae*. *M. pneumoniae* positive clinical samples from 24 patients with respiratory symptoms were analyzed. Sensitivity, specificity, repeatability and reproducibility of the RT-PCR assays were evaluated.

Results: The RT-PCR assays showed 100% specificity to *M. pneumoniae*, and 92% sensitivity with a detection limit of 2 copies/ μ L, equivalent to 10 copies/reaction. Moreover, the repeatability and reproducibility of these results were demonstrated. Wild and mutant genotypes associated to each control were properly identified. Of the clinical samples positive for *M. pneumoniae*, 77.3% (17/22) were macrolide-sensitive and 22.7% (5/22) were macrolide-resistant.

Conclusions: The high sensitivity and specificity of the RT-PCR method implemented provides the National Reference Laboratory of Mycoplasmas of the Institute of Tropical Medicine Pedro Kourí with an effective method for the diagnosis of macrolide-resistant *M. pneumoniae*.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*; RT-PCR; 23S rRNA; macrolide resistance.

Recibido: 07/02/2022

Aceptado: 08/03/2022

Introducción

Mycoplasma pneumoniae es causa frecuente de infecciones del tracto respiratorio alto y bajo en humanos, especialmente entre niños en edad escolar y adultos jóvenes. Debido a la falta de sensibilidad y al tiempo prolongado necesario para la detección de *M. pneumoniae* mediante el cultivo bacteriológico, actualmente se utilizan técnicas moleculares para el diagnóstico de estas infecciones.⁽¹⁾

Las tetraciclinas, fluoroquinolonas y macrólidos son los antimicrobianos eficaces para su tratamiento, y estos últimos son los más empleados, principalmente en niños debido a los efectos adversos que producen las fluoroquinolonas y tetraciclinas.⁽²⁾ Sin embargo, su uso extensivo condujo a la rápida emergencia a nivel mundial de aislados clínicos de *M. pneumoniae* resistente a macrólidos.⁽³⁾ El principal mecanismo molecular asociado a esta resistencia es la presencia de mutaciones puntuales dadas por la sustitución nucleotídica en las posiciones 2063/2064 (2058/2059, numeración de *Escherichia coli*) en la región de la peptidiltransferasa (dominio V) del gen 23S del ARNr.⁽⁴⁾

El método fenotípico comúnmente utilizado para determinar la susceptibilidad a los macrólidos es la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).⁽⁵⁾ Los métodos moleculares, de amplio uso en la actualidad para la detección de estas mutaciones, se basan fundamentalmente en la secuenciación del dominio V; ambos procedimientos son fiables, pero laboriosos. Además, varios estudios reportan ensayos basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés) para la detección de resistencia a macrólidos directamente a partir de muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*, que han mostrado una excelente correlación con el método de secuenciación.⁽⁶⁾

En el año 2019 se reporta por primera vez la detección y caracterización de aislados y muestras positivas a *M. pneumoniae* resistente a macrólidos en Cuba, empleando la técnica de CIM y la secuenciación.⁽⁷⁾ Sin embargo, la implementación de un algoritmo basado en un método de RT-PCR para determinar la frecuencia de infecciones causadas por *M. pneumoniae* resistente a macrólidos directamente a partir de muestras clínicas es una tarea de suma relevancia en el contexto epidemiológico actual para el correcto manejo de las infecciones respiratorias en Cuba. Este es un método mucho más rápido que proporciona ventajas sobre los procedimientos de detección de resistencia existentes.

El presente trabajo tiene como objetivo implementar un método de RT-PCR para la detección de mutaciones puntuales en muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*, diagnosticadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (LNR-M/IPK).

Métodos

Cepas de referencias

Se utilizaron cepas de referencia de micoplasmas de origen humano de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), pertenecientes a la colección de cepas del LNR-M/IPK: *Mycoplasma amphoriforme* A39^T (ATCC BAA-992), *Mycoplasma buccale* CH 20247^T (ATCC 23636), *Mycoplasma faucium* DC 333^T (ATCC 25293), *Mycoplasma fermentans* PG 18^T (ATCC 19989), *Mycoplasma hominis* PG 21^T (ATCC 23114), *Mycoplasma orale* Patt (ATCC 15544), *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531) y M6696. Además, se emplearon los aislados autóctonos de *M. pneumoniae* Mp1 y Mp5. Estas cepas y aislados estaban conservados a -80 °C hasta su utilización.

Muestras clínicas

Se estudiaron 24 muestras clínicas previamente demostradas como positivas a *M. pneumoniae* en el LNR-M/IPK, que estaban conservadas a -80 °C. Las muestras consistían en exudado faríngeo, esputo, líquido pleural y secreción bronquial, que provenían de pacientes con síntomas respiratorios.

Preparación de los patrones de ADN de *Mycoplasma pneumoniae*

La cepa referencia de *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531) se cultivó en 50 mL de medio de cultivo SP4 durante 21 días a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 15 000 g, durante 30 min a 4 °C y a partir del sedimento celular obtenido se procedió a la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de ADN de los extractos obtenidos mediante espectrofotometría y se prepararon diluciones decimales seriadas desde 10⁵ hasta 10⁻¹ copias de genoma por microlitros (copias/μL) de ADN.

RT-PCR para la detección de las mutaciones A2058G y A2059G en *Mycoplasma pneumoniae*

Se realizó una RT-PCR para la detección de las mutaciones A2058G y A2059G en el gen que codifica para el ARNr 23S de *M. pneumoniae*, a partir de muestras clínicas positivas, según la metodología descrita por *Kristiansen* y otros desarrollada para *Mycoplasma genitalium* en 2016.⁽⁸⁾ Se realizaron dos modificaciones a la metodología original. La primera consistió en el uso de los cebadores MH 23S-11: 5'-TAA CTA TAA CGG TCC TAA GG-'3 y MP 23S-22: 5'-ACA CTT AGA TGC TTT CAG CG-'3 descritos por *Pereyre* y otros en el 2004 para la amplificación de un fragmento de 352 pb del gen 23S del ARNr de *M. pneumoniae*. La segunda modificación se basó en cambios en el programa de amplificación, específicamente en la cantidad de ciclos empleados, descrito más adelante.⁽⁹⁾ Se preparó una mezcla de reacción para un volumen final de 25 μL. Por cada reacción de PCR se adicionó 1X de Tampón de PCR (Qiagen, Alemania); 2,5 mM de MgCl₂ (Qiagen, Alemania); 200 nM de cada desoxirribonucleótido (Qiagen, Alemania); 500 nM de los cebadores; 200 nM de la sonda correspondiente al genotipo salvaje: Cy5-GGACGG AAAGACCCCGTG AAG CTTT-BHQ2; 100 nM de las sondas MRM-A2063G (FAM-GAC GGG AAG ACC CCG TGA AGC TTT-BHQ1) y MRM-A2064G (FAM-GAC GGA GAG ACC CCG TGA AGC TTT-BHQ1), y 1,5 U de Taq-polimerasa (Qiagen, Alemania). Como controles positivos se emplearon 5 μL de ADN de la cepa de referencia M6696 y el aislado autóctono Mp5 que contienen las mutaciones A2059G y A2058G, respectivamente, así como la cepa de referencia *M. pneumoniae* FH y el aislado autóctono Mp1 con genotipo

salvaje. Se emplearon también como controles positivos ADN de muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae* genotipificadas previamente que contenían las mutaciones A2058G y A2059G.⁽⁷⁾ Como control negativo se empleó agua ultrapura.

La amplificación se realizó en un equipo Rotor-Gene Q 5-plex Versión 2.1.0.9 (Qiagen, Alemania), utilizando un programa de un ciclo inicial de 95 °C durante 5 min, 10 ciclos de 95 °C durante 5 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 5 s y 40 ciclos de 95 °C durante 1 s, 61 °C durante 30 s y 72 °C durante 5 s.

Para la determinación de la presencia de las mutaciones se utilizó la prueba Scatter en combinación de lectura de los canales de emisión de fluorescencia verde y rojo. Las muestras positivas a *M. pneumoniae* con alguna de las mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos presentan una mayor fluorescencia en el canal de emisión verde; mientras que las muestras positivas a *M. pneumoniae* que no poseen dichas mutaciones lo hacen en el canal de emisión rojo.

Evaluación de la sensibilidad, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad de la RT-PCR

El límite de detección se determinó como la menor dilución de ADN que mostraba una amplificación en el 95 % de las réplicas. Para ello, se empleó como estándares 5 µL de cada una de las diluciones realizadas a los extractos de ADN cuantificado de la cepa de referencia *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531). La sensibilidad diagnóstica se determinó como la fracción del número total de muestras positivas que son correctamente asignadas con el método de RT-PCR utilizado: verdaderos positivos (VP) / VP + falsos negativos (FN). La especificidad se determinó como la fracción del número total de muestras negativas que son asignadas correctamente con el método de RT-PCR utilizado: verdaderos negativos (VN) / VN + falsos positivos (FP). Para ello se empleó como control positivo 5 µL del extracto de ADN de la cepa tipo de *M. pneumoniae* (dilución 10³), y como muestra 5 µL del resto de las cepas de referencia de las especies de micoplasmas de origen humano. Estos resultados se expresaron en porcentaje. Se evaluaron como valores de desempeño el cálculo de r^2 y la eficiencia del ensayo. Los ensayos se realizaron por triplicado en días alternos, en diferentes laboratorios y con diferentes equipos Rotor-Gene

para evaluar la reproducibilidad de los resultados. Se utilizaron tres réplicas por cada dilución de ADN para evaluar la repetibilidad.

Resultados

La RT-PCR mostró un 100 % de especificidad para *M. pneumoniae*. Se obtuvo una correcta identificación de los genotipos correspondientes a cada control. El genotipo salvaje, identificado por la RT-PCR como “Wild Type” amplificó en el canal de emisión de fluorescencia rojo (Fig., cuadrante superior derecho), y los genotipos mutantes, identificados como “Mutant”, amplificaron en el canal de emisión de fluorescencia verde (Fig., cuadrante superior izquierdo). No se produjo amplificación en las muestras correspondiente a las demás especies de micoplasmas analizadas, al igual que para el control negativo, las que fueron identificadas como “None” y ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo (Fig.). La sensibilidad fue de un 92 %, ya que dos de las muestras positivas a *M. pneumoniae* analizadas por el método resultaron falsas negativas. El límite de detección de la RT-PCR fue 2 copias/ μ L, lo que se traduce en 10 copias/reacción. Esta es la menor dilución de ADN en la que se alcanzó una amplificación en el 95 % de las réplicas. Este resultado se obtuvo por cada una de las réplicas, y las siguientes dos veces que se repitió el ensayo en diferentes laboratorios y bajo las condiciones de cada uno (Tabla).

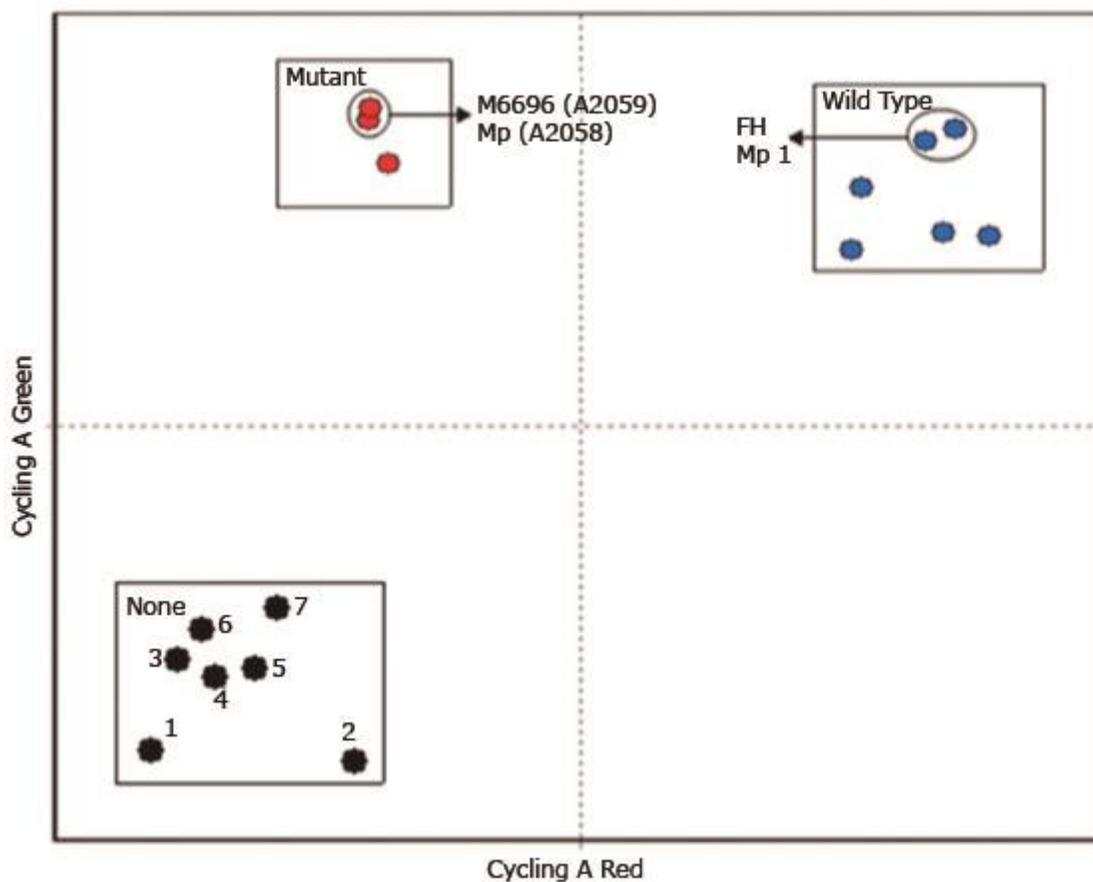


Fig. - Resultados de la RT-PCR para la detección de resistencia a macrólidos mediante el análisis Scatter en los canales de emisión de fluorescencia rojo (eje horizontal) y verde (eje vertical). 1: Control negativo; 2: *M. amphoriforme* A39^T; 3: *M. faucium* DC 333^T; 4: *M. fermentans* PG; 5: *M. hominis* PG 21^T; 6: *M. orale* Patt; 7: *M. buccale* CH 20247^T.

Tabla - Resultado de la evaluación por triplicado de los patrones de ADN de *M. pneumoniae* mediante la RT-PCR implementada

Ensayo por triplicado	Patrones de ADN de <i>M. pneumoniae</i> (copias/reacción)						
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
1	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/0
2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/0
3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/0

De las 24 muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*, se logró genotipificar el 91,7 % (22/24) de ellas mediante la RT-PCR para la detección de resistencia a macrólidos. El

77,3 % (17/22) de las muestras se identificó como sensibles a macrólidos (genotipo salvaje), y el 22,7 % (5/22) como resistente a macrólidos (genotipo mutante), al detectarse las mutaciones A2058G/A2059G. Esta técnica no discrimina entre una mutación u otra.

Discusión

Los macrólidos se consideran la primera línea de tratamiento para las infecciones causadas por *M. pneumoniae*. Sin embargo, los altos niveles de resistencia a estos antimicrobianos desarrollados por este patógeno representan una problemática a nivel mundial. Teniendo en cuenta el lento crecimiento de esta especie, lo que complejiza la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos, se ha impulsado el desarrollo y puesta en práctica de métodos moleculares rápidos y certeros para la detección de resistencia a macrólidos directamente a partir de muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*.

En 2016, *Kristians* y otros describen un método de RT-PCR basado en el uso de sondas de hidrólisis para la detección de polimorfismos de simple nucleótido en el gen 23S del ARNr de *M. genitalium*, mediante la detección de las mutaciones A2058G y A2059G asociados con la resistencia a macrólidos a partir de muestras clínicas.⁽⁸⁾ Teniendo en cuenta la cercanía filogenética que existe entre el gen 23S del ARNr de esta especie y el de *M. pneumoniae*, con una similitud del 96,7 %, ⁽¹⁰⁾ en la presente investigación se implementó esta técnica de RT-PCR con algunas modificaciones, para su empleo en la detección de resistencia a macrólidos, a partir de muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*.

Con la metodología implementada para el estudio de resistencia a macrólidos a partir de muestras positivas a *M. pneumoniae* se obtuvo una correcta identificación de los genotipos salvajes y mutantes en las cepas de referencia y muestras/aislados autóctonos empleados como controles positivos en el ensayo. Este método de RT-PCR no discrimina entre estas dos mutaciones, sino que las agrupa espacialmente separándolas de las muestras con genotipos salvaje que también se agrupan entre sí.⁽⁸⁾

En la literatura internacional se describe una variedad de ensayos moleculares basados en la técnica de RT-PCR para la detección, a partir de muestras clínicas, de mutaciones en el gen

del ARNr 23S de *M. pneumoniae* que confieren resistencia a macrólidos. Estos métodos permiten discriminar los genotipos mutantes entre sí y con el genotipo salvaje.

Los resultados de la presente investigación fueron similares a los reportados por *Liu* y otros en 2014, quienes diseñaron un método de PCR de ciclaje basado en la combinación de una sonda quimérica marcada y una ARNasa H, así como lo informado por *Guo* y otros en 2019, quienes desarrollan una técnica de PCR alelo específico. Esta última se acopla al análisis de curvas de disociación para detectar las mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos localizadas en la posición A2058G y A2059G del gen 23S del ARNr de *M. pneumoniae*. Los resultados de ambas PCR aplicadas en aislados clínicos revelan una concordancia del 100 % con los resultados de la secuenciación. El límite de detección que se obtiene en ambos estudios coincide y en ellos se informa una alta especificidad para *M. pneumoniae*, ya que las PCR resultan negativas para todas las demás especies de micoplasmas analizadas.^(11,6)

Además, el método implementado mostró una mayor sensibilidad y especificidad que las reportadas por *Li* y otros en 2009, al emplear una PCR múltiple que utiliza la tecnología de sonda de hibridación y la transferencia de energía fluorescente de resonancia (FRET) diseñada para la identificación, directamente en muestras clínicas positivas, de tres mutaciones (A2058G, A2059G y C2617A/G) en la región 23S del ARNr de *M. pneumoniae* asociadas con la resistencia a macrólidos. En ese estudio la PCR desarrollada resulta positiva para *M. genitalium* y *Mycoplasma pirum*, y muestra un límite de detección de 14 copias/reacción.⁽¹²⁾ Por su parte, *Peuchant* y otros en 2009, al emplear dos métodos de PCR-FRET para la detección de resistencia a macrólidos en muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae*, demostraron un 100 % de especificidad de estos. Sin embargo, informaron un límite de detección de 20 copias/reacción en ambos casos, aunque los ensayos fueron validados con aislados clínicos caracterizados genéticamente y mostraron una alta concordancia con el método de secuenciación.⁽⁶⁾

El método de RT-PCR implementado en la presente investigación identifica, directamente a partir de muestras clínicas, los genotipos mutantes A2058G o A2059G y los diferencia de los genotipos salvajes de forma correcta, con una elevada especificidad y sensibilidad, además. Estos resultados permiten recomendar su uso de manera rutinaria en el LNR-

M/IPK para el diagnóstico de infecciones causadas por *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos, lo que contribuiría al uso de opciones terapéuticas más eficaces.

Referencias bibliográficas

1. Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. Clin Microbiol Rev. 2017;30(3):747-809. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00114-16>
2. Loconsole D, De Robertis AL, Mallamaci R, Sallustio A, Morea A, Prato R, *et al.* First description of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia in Italy. Biomed Res Int. 2019;7168949. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7168949>
3. Copete AR, Aguilar YA, Rueda ZV, Velez LA. Genotyping and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Medellin, Colombia. Int J Infect Dis. 2018;66:113-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.019>
4. Wagner K, Imkamp F, Pires VP, Keller PM. Evaluation of Lightmix *Mycoplasma macrolide* assay for detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in pneumonia patients. Clin Microbiol Infect. 2019;25(3):383.e5-e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.10.006>
5. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guidelines. CLSI Document M43-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2011.
6. Guo D, Hu W, Xu B, Li J, Li D, Li S, *et al.* Allele-specific real-time PCR testing for minor macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. BMC Infect Dis. 2019;19:616. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4228-4>
7. Rodríguez N, Mondeja B, Sardiñas R, Vega D, Dumke R. First detection and characterization of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Cuba. Int J Infect Dis. 2019;80:115-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.12.018>
8. Kristiansen QG, Lisby GJ, Schonning K. A 5' Nuclease Genotyping Assay for Identification of Macrolide Resistant *Mycoplasma genitalium* Clinical Specimens. J Clinical Microbiol. 2016;54(6):1593-97. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00012-16>

9. Pereyre S, Guyot C, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(2):460-5. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.460-465.2004>
10. Dumke R, von Baum H, Luck PC, Jacobs E. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:613-6. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02968.x>
11. Liu Y, Ye X, Zhang H, Wu Z, Xu X. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* and its macrolide-resistance mutation by Cycleave PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78:333-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.002>
12. Li X, Atkinson TP, Hagood J, Makris C, Duffy LB, Waites KB. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28:693-6. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31819e3f7a>

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Ruxana Sardiñas Morales, Nadia María Rodríguez Preval.

Curación de datos: Ruxana Sardiñas Morales, Nadia María Rodríguez Preval, Brian Arturo Mondeja Rodríguez.

Análisis formal: Ruxana Sardiñas Morales, Nadia María Rodríguez Preval.

Investigación: Ruxana Sardiñas Morales, Yenys Ramírez Cintra, Nadia María Rodríguez Preval, Brian Arturo Mondeja Rodríguez.

Metodología: Ruxana Sardiñas Morales, Nadia María Rodríguez Preval.

Recursos: Nadia María Rodríguez Preval.

Supervisión: Nadia María Rodríguez Preval.

Redacción - borrador original: Ruxana Sardiñas Morales.

Redacción - revisión y edición: Ruxana Sardiñas Morales, Yenys Ramírez Cintra, Nadia María Rodríguez Preval, Brian Arturo Mondeja Rodríguez.