

# Resistencia a $\beta$ -lactámicos por $\beta$ -lactamasas en enterobacterias aisladas de infección urinaria

En mujeres de Caborca, Sonora, México

Rafael De La Rosa<sup>1</sup>, Yessica Enciso<sup>1</sup>, Mario Mazón<sup>1</sup>, Ramón Lugo<sup>1</sup>, Dora Valencia<sup>1</sup>,  
Margarita Arenas<sup>2</sup> y Manuel Ballesteros<sup>2</sup>

Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias<sup>1</sup>, Instituto de Ciencias<sup>2</sup>  
Universidad de Sonora<sup>1</sup>, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla<sup>2</sup>  
H. Caborca, Son.<sup>1</sup>; Puebla, Pue.<sup>2</sup>; México.

[rdlosa, yessica.enciso, rlugo]@caborca.uson.mx, [maguie10,gmanuel.b]@gmail.com

**Abstract**— The emergence of antimicrobial-resistant enterobacteria due to the production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) has increased in recent years and represents a serious health problem worldwide. The main objective of this work was to determine the susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics and ESBL production of enterobacteria isolated from urine samples of women in Caborca, Sonora, Mexico. 162 samples were collected during the period from November 2015 to December 2016, 82 strains were isolated, being *E. coli* the most frequent pathogen (84.38%). The antibiotic to which they were more resistant was aztreonam, ceftriaxone and ceftazidime, while the ESBL production was observed in 39.03% of the strains.

**Keyword**— *enterobacteriaceae, susceptibility, extended spectrum betalactamases, antibiotics.*

**Resumen**— El surgimiento de enterobacterias multirresistentes a los antimicrobianos debido a la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se ha incrementado en los últimos años e implican un serio problema en salud a nivel mundial, pues reduce considerablemente las opciones terapéuticas. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la susceptibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y la producción de BLEE en enterobacterias aisladas de orina de mujeres en Caborca, Sonora, México. Se recolectaron 162 muestras durante noviembre 2015 a diciembre 2016, se aislaron 82 cepas, siendo *E. coli* el patógeno más frecuente (84.38%). El antibiótico para el que presentaron mayor aztreonam (47.56%), ceftriaxone (42.69) and ceftazidime (42.69), mientras que la producción de BLEE se observó en 39.03% de las cepas.

**Palabras claves**— *enterobacterias, susceptibilidad, resistencia, betalactamasas de espectro extendido, antibióticos.*

## I. INTRODUCCIÓN

La elevada resistencia antibiótica representa en la actualidad un gran desafío terapéutico, y constituye un serio problema en salud pública a nivel mundial, pues a pesar de disponer de un gran número de antimicrobianos, el surgimiento de resistencia a los mismos se mantiene constante en los microorganismos patógenos, siendo una de las principales causas el inadecuado uso empírico de los antibióticos de amplio espectro [1].

Un grupo de antimicrobianos ampliamente utilizados son los  $\beta$ -lactámicos, estos son antibióticos bactericidas cuyo blanco de acción es la fase final de la síntesis del peptidoglicano. Los  $\beta$ -lactámicos actúan como sustratos competitivos de distintas enzimas que participan en la síntesis de la pared celular, principalmente de las transpeptidasas, también conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBP) que hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico llevando a la formación de un éster estable entre la estructura hidrolizada y un grupo oxidrilo de la serina localizada en el sitio activo de la enzima. Con ello se inhibe la transpeptidación, desestabilizando la pared celular y subsecuente lisis bacteriana mediada por autolisinas [2]–[4].

Sin embargo, actualmente en diversos países como Nigeria, Suecia, Uganda, Vietnam, Egipto y en México se reportan altos porcentajes de resistencia a estos antibióticos en cepas bacterianas aisladas de muestras de orina de mujeres con ITU, lo cual implica un grave problema, pues son de los fármacos más utilizados en estos eventos infecciosos [4]–[8].

Diferentes mecanismos están involucrados en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos está mediada por varios mecanismos entre los que se encuentran: alteración del sitio blanco, es decir mutaciones en las PBP, disminución de la permeabilidad, bombas de eflujo e inactivación enzimática por  $\beta$ -lactamasas, siendo estas últimas de gran importancia dado que con frecuencia son codificadas por genes localizados en elementos genéticos móviles tales como plásmidos y transposones, lo que permite su rápida distribución, inclusive entre distintas especies bacterianas [1], [9]

La producción de  $\beta$ -lactamasas es el mecanismo de resistencia antibiótica más frecuente e importante en microorganismos Gram negativos. Existe una amplia variedad de enzimas  $\beta$ -lactamasas, algunas son de espectro reducido como las penicilinasas y cefalosporinasas, otras poseen un espectro ampliado, y son capaces de inactivar a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos incluyendo a monobactámicos, pero no a cefamicinas ni carbapenémicos. Este último grupo de enzimas se conoce como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y derivaron de las  $\beta$ -lactamasas de espectro reducido a partir de una serie de mutaciones puntuales, que alteraron su centro activo permitiéndoles modificar su perfil de sustrato y mejorar su capacidad de hidrólisis frente a los  $\beta$ -lactámicos [9]–[14].

Actualmente las BLEE comprenden uno de los mecanismos de resistencia más frecuentemente encontrados en los microorganismos patógenos y son reportadas en elevado porcentaje en varios países como la India, Venezuela, Perú, Egipto y México [7], [8], [15]–[17]. La importancia que implica la presencia de este mecanismo en aislados clínicos de enterobacterias se debe principalmente a la dificultad que representa el tratamiento antibiótico, ya que además de resistir al efecto de los  $\beta$ -lactámicos estos microorganismos tienden a ser resistentes a otros antibióticos como aminoglucósidos o fluoroquinolonas llevando con frecuencia a fallas terapéuticas que pueden ser fatales.

Debido a la gravedad e importancia de las infecciones producidas por cepas productoras de BLEE el objetivo principal de este trabajo fue identificar la susceptibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y la determinación fenotípica de BLEE en cepas de enterobacterias aisladas de orinas de mujeres cursando infección de tracto urinario.

## II. TRABAJOS RELACIONADOS

### A. *Obtención de muestras*

Durante el período comprendido entre noviembre de 2015 a diciembre de 2016, se recolectaron bajo consentimiento informado, 162 muestras de orina provenientes de pacientes ambulatorios del sexo femenino que asistieron a hospitales y laboratorios clínicos de Caborca, Sonora, México.

Las muestras se recolectaron previo aseo genital, en un recipiente estéril y por micción media, acorde a los lineamientos establecidos por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) [18] Los urocultivos se realizaron, únicamente a las muestras de orina que presentaron de moderadas a abundantes bacterias y piuria en sedimento urinario, de acuerdo a los criterios de la guía de práctica clínica del diagnóstico y tratamiento de la infección aguda, no complicada del tracto urinario en la mujer [19].

### B. Identificación microbiológica

Para el análisis bacteriológico se sembraron las muestras seleccionadas en agar sangre de carnero al 5%, posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas, se tomó con asa estéril una pequeña porción de colonia bien diferenciada y se colocó en un portaobjetos para realizar la tinción de Gram y descartar los microorganismos Gram positivos.

Las bacterias Gram negativas fueron sembradas en los medios de cultivo sólidos: eosina azul de metileno (EMB), McConkey, Salmonella-Shigella (SS) y verde brillante para la identificación morfológica. Posteriormente se determinó la identidad de los microorganismos mediante pruebas de identificación bioquímica convencionales (indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato de Simmons, motilidad, hidrólisis de la urea, producción de ácido sulfhídrico y fermentación de glucosa, lactosa o sacarosa).

### C. Determinación de susceptibilidad antibiótica y detección de BLEE

Para la determinación de susceptibilidad a  $\beta$ -lactámicos y la detección fenotípica de BLEE se llevó a cabo el método de difusión en disco de Kirby Bauer. Se sembraron masivamente suspensiones bacterianas ajustadas al 0.5 en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml), la inoculación se realizó con hisopo estéril en placas de agar Mueller Hinton.

Los antibióticos probados fueron: cefotaxima (30  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), ceftriaxona (30  $\mu$ g) y cefoxitina (30  $\mu$ g), estos se colocaron alrededor de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20  $\mu$ g/10  $\mu$ g) considerando un espacio de separación aproximado de 15 mm entre cada uno. El procedimiento fue realizado por duplicado, la primera replica con el inhibidor (amoxicilina/ácido clavulánico) y la segunda en ausencia del mismo, esto acorde a los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para la detección fenotípica de BLEE [20].

Los cultivos se incubaron durante 16-18 horas a 37°C y se midieron los halos de inhibición para la interpretación de resultados de acuerdo a los criterios establecidos por CLSI (Tabla I). Un incremento  $\geq 5$  mm en el diámetro del halo para cefotaxima o ceftazidima cuando se prueban en combinación con ácido clavulánico, comparado con el diámetro del halo cuando se prueba sin ácido clavulánico, confirma la producción de BLEE. Como control de calidad se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, según lo establece el CLSI.

Tabla I. Interpretación del diámetro de los halos de inhibición (mm)

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Amoxicilina (30 $\mu$ g)	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$
Ceftazidima (30 $\mu$ g)	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$
Cefotaxima ((30 $\mu$ g)	$\leq 22$	23-25	$\geq 26$
Ceftriaxona (30 $\mu$ g)	$\leq 19$	20-22	$\geq 23$
Aztreonam (30 $\mu$ g )	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$
Cefoxitina (30 $\mu$ g)	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$

### III. RESULTADOS

#### A. Determinación de susceptibilidad antibiótica y detección de BLEE

Se obtuvieron 82 cepas de la familia *Enterobacteriaceae* que cumplieron con las recomendaciones de la Secretaría de Salud y las especificaciones para microorganismos entéricos. El 90.24% de las cepas aisladas fueron identificadas bioquímicamente como *Escherichia coli*, seguido de, *Klebsiella* spp (3.66%) y *Shigella* spp (3.66%) *Salmonella* spp (2.24%) (Tabla II).

Tabla II. Frecuencia de enterobacterias aisladas a partir de muestras de orina de mujeres.

Especie bacteriana	No. de cepas	Porcentaje de cepas
<i>Escherichia coli</i>	74	90.24
<i>Klebsiella</i> spp.	3	3.66
<i>Shigella</i> spp.	3	3.66
<i>Salmonella</i> spp.	2	2.24

#### B. Resultados de susceptibilidad antibiótica y fenotipos productores de BLEE

Las pruebas de susceptibilidad mostraron que las cepas presentaron mayor resistencia al monobactámico aztreonam (47.56%) seguido de las cefalosporinas de tercera generación ceftriaxona (42.69%) y ceftazidima (42.69%) (Tabla III).

Tabla III. Susceptibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Antibiótico	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Aztreonam	37.81	14.63	47.56
Ceftriaxona	41.46	15.85	42.69
Ceftazidima	41.46	15.85	42.69
Cefoxitina	1.22	63.41	35.37
Cefotaxima	43.90	35.37	20.73
Amoxicilina/ Ac. Clavulánico	28.05	56.10	15.85

El fenotipo productor de BLEE se observó en 32 (39.03%) cepas, de las cuales 27 (84.37%) fueron *E. coli*. (Tabla IV).

Tabla IV. Porcentaje de enterobacterias con fenotipo productor de BLEE.

Especie bacteriana	BLEE +	%	BLEE -	%
<i>Escherichia coli</i>	27	32.93	47	57.31
<i>Klebsiella</i> spp.	2	2.44	1	1.22
<i>Shigella</i> spp.	2	2.44	1	1.22
<i>Salmonella</i> spp.	1	1.22	1	1.22
Total	32	39.03	50	60.97

### IV. DISCUSIÓN

La producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido constituye uno de los principales mecanismos de resistencia antibiótica presentes en cepas de enterobacterias e implican un serio problema en salud

pública, dado el limitado número de antimicrobianos que tienen efecto sobre estos patógenos. En el presente trabajo se analizaron los perfiles de susceptibilidad antibiótica de enterobacterias aisladas de orina de mujeres con ITU en Caborca, Sonora observándose un elevado porcentaje de resistencia a  $\beta$ -lactámicos implementados en el tratamiento de infección urinaria, encontrándose en rangos de 15.85% a 47.56%. Estos resultados son menores a los reportados en otros trabajos llevados a cabo en el Suroeste de Nigeria por Abodium y cols., 2014 (29% a 95%), México por Miranda-Estrada y cols., 2016 (15.9% a 92.5%) y Egipto por Elsayed y cols., 2017 (93% a 95%) [6]–[8]. Sin embargo, debemos considerar en este trabajo el elevado porcentaje de resistencia intermedia a los antibióticos probados, que podrían indicar porcentajes de resistencia equiparables e incluso superiores a los reportados por esos autores. Se sabe que la resistencia intermedia indica que, durante el proceso de división celular bacteriano, algunas clonas hijas presentan características de resistencia que originalmente no poseían y esas clonas resistentes tienden a expandirse clonalmente sobre las sensibles, bajo la presión que ejerce el uso del antibiótico. En trabajos recientes este fenómeno se ha observado al evaluar fosfomicina, uno de los antibióticos implementados como primera elección en el tratamiento de infecciones urinarias [21]. Con todo esto se debe considerar mantener una estrecha vigilancia en el uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos e implementarlos únicamente después de la determinación de los perfiles de susceptibilidad antibiótica, evitando con esto el surgimiento de clonas resistentes por presión de selección. los microorganismos Gram positivos.

Al analizar nuestros resultados, observamos que 39.03% de los aislados presentaron el fenotipo productor de BLEE, estos resultados son similares a los obtenidos en Egipto (Elsayed y cols., 2017) con un 36% y menores a los reportados en trabajos previos analizando enterobacterias obtenidas de orina de adultos de ambos sexos y mujeres gestantes realizados en Colombia (Argüez de Paz y cols., 2015), la India (Mukherjee y cols., 2015) y donde se reportaron porcentajes de 78.1%, 69.2% respectivamente [8], [15], [22]. Por otra parte, nuestros resultados son mayores a los reportados en Perú (4%) y en Suecia, Uganda y Vietnam (10% en promedio) cuya población de estudio fueron adultos de ambos sexos y mujeres gestantes respectivamente (Díaz-Mongue y cols., 2014; Ramos y cols., 2012). Por otra parte, en reportes realizados en nuestro país, específicamente en Guerrero (Castro y cols., 2014), Sonora (Navarro-Navarro y cols., 2011) y en el Estado de México (Morones-Esquivel y cols., 2016) se reporta un 21%, 0-14.4% y 26-32% respectivamente de enterobacterias, productoras de BLEE [23]–[25], estos porcentajes difieren a los reportados en el presente trabajo excepto en el último. Estos resultados indican que tanto la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la producción de BLEE varía dependiendo del tipo de paciente y de las distintas áreas geográficas estudiadas.

Así mismo, la diferencia entre el porcentaje de resistencia a estos antibióticos con respecto al fenotipo BLEE que se observó en este trabajo, podría indicar que la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos mediada por BLEE es importante. Sin embargo, para las cepas que no presentaron el fenotipo productor de enzimas  $\beta$ -lactamasas, posiblemente están presentes otros mecanismos diferentes que pueden explicar la resistencia a esta familia de antibióticos [1], [9].

Con nuestros resultados se infiere que el uso de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en México debe mantenerse bajo vigilancia remarcando la urgente necesidad de búsqueda de opciones terapéuticas en el tratamiento de infección urinaria y de realizar más investigaciones enfocadas en la determinación de los perfiles de resistencia antibiótica que presentan los patógenos urinarios aislados en nuestro país, de tal forma que favorezca el uso de una terapia más eficaz y se reduzca el riesgo de generar resistencia antimicrobiana por presión de selección incluso a otros antibióticos.

## V. CONCLUSIONES

El 50.61% de las cepas aisladas de orina de mujeres con ITU pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. El microorganismo predominante es *Escherichia coli* (90.24%). Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos mostraron que las enterobacterias aisladas presentaron un mayor porcentaje de resistencia a aztreonam (47.56%), ceftriaxona (42.69%) y a ceftazidima (42.69%). Para todos los antibióticos evaluados se observó elevado porcentaje de resistencia intermedia y 39.03% de los aislados fueron BLEE positivos. Finalmente debe mantenerse bajo vigilancia el uso de  $\beta$ -lactámicos en el tratamiento de mujeres con ITU en Caborca, Sonora, México.

## REFERENCIAS

- [1] G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, "Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians," *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, vol. 33, no. 3, pp. 300, 2017.
- [2] S. Dzidic, J. Suskovic, and B. Kos, "Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 46, no. 1, pp. 11–21, 2008.
- [3] H. AR, *Antibiotic Basic for Clinicians.*, 2nd ed. New Delhi: Wolters Kluwer (India), 2015.
- [4] C. Suárez and F. Gudiol, "Antibióticos betalactámicos," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 27, no. 2, pp. 116–129, 2009.
- [5] N. L. Ramos *et al.*, "Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Pregnant Women in Different Countries," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 11, pp. 3569–3574, Nov. 2012.
- [6] A. O. Abiodun, O. A. Olufunke, F. C. Dunah, and F. Oladiran, "Phenotypic Identification and Phylogenetic Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* in Symptomatic Pregnant Women With Urinary Tract Infections in South-Western Nigeria," *Int. J. Biol.*, vol. 6, no. 4, Sep. 2014.
- [7] L. I. Miranda-Estrada, M. Ruíz-Rosas, J. Molina-López, I. Parra-Rojas, E. González-Villalobos, and N. Castro-Alarcón, "Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 35, no. 7, pp. 426–433, Aug. 2017.
- [8] A. H. Elsayed, Talat I; Ismail, Hala AF; Elgamal, Samir A and Gad, "The Occurrence of Multidrug Resistant *E. Coli* which Produce ESBL and Cause Urinary Tract Infections Abstract Identification of isolates," pp. 1–8, 2017.
- [9] R. Morales I, "Terapia de bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido," *Rev. Chil. infectología*, vol. 20, 2003.
- [10] D. M. Livermore, "Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase," vol. 14, pp. 3–10, 2008.
- [11] K. Bush and G. A. Jacoby, "Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 3, pp. 969–976, 2010.
- [12] S. Shaikh, J. Fatima, S. Shakil, S. M. D. Rizvi, and M. A. Kamal, "Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 90–101, 2015.
- [13] C. Alberto Fica, "Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos, cocáceas gram positivas y anaerobios. implicancias terapéuticas," *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 25, no. 3, pp. 432–444, 2014.
- [14] D. Tafur and V. Villegas, "Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas," *Infectio*, vol. 12, no. 3, pp. 217–226, 2008.
- [15] M. Mukherjee, S. Koley, S. K. Mukherjee, S. Basu, B. Ghosh, and S. Chakraborty, "Phylogenetic background of *e. Coli* isolated from asymptomatic pregnant women from Kolkata, India," *J. Infect. Dev.*

- [16] F. Galván, J. Agapito, N. Bravo, J. Lagos, and J. Tamariz, “Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú,” *Rev. Medica Hered.*, vol. 27, no. 1, p. 22, 2016.
- [17] V. R. y G.-G. L. Perozo Mena Armindo, Marín Milagros Castellano Maribel, Ling Toledo Eliana, Nuñez Daniela, Ginestre Messaria, Villasmil Jessica, Bermúdez-Gonzalez Jose, “Detección de Betalactamasas de espectro extendido en Enterobacteriaceae en un Centro de Salud de Maracaibo, Venezuela,” *Kasmera*, vol. 45, no. 2, pp. 88–99, 2017.
- [18] A. Andreu, J. Cacho, A. Coira, and J. A. Lepe, “Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 29, no. 1, pp. 52–57, 2011.
- [19] S. de Salud, “Diagnóstico y Tratamiento de la Infección Aguda, no Complicada del Tracto Urinario de la Mujer,” 2009.
- [20] CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. 2017.
- [21] A. E. Lucas *et al.*, “Frequency and Mechanisms of Spontaneous Fosfomycin Nonsusceptibility Observed upon Disk Diffusion Testing of *Escherichia coli*,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. e01368-17, Nov. 2017.
- [22] N. R. H. Anya Ruth Argüez de Paz, Anelys Rodríguez Chávez, “*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario,” *Rev Cub Med Int Emerg*, vol. 14, no. 4, 2015.
- [23] M. Castro, A., Salgado, J., Ocampo, R., Silva, S. y Rosas, “Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero,” *Rev Tlamati Sabiduría*, vol. 5, no. 1, pp. 14–23, 2014.
- [24] M. Navarro-Navarro, R. E. Robles-Zepeda, A. Garibay-Escobar, and E. Ruiz-Bustos, “*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de  $\beta$ -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora,” *Salud Publica Mex.*, vol. 53, no. 4, pp. 341–344, 2011.
- [25] I. Morones-Esquivel *et al.*, “Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido en hemocultivos y urocultivos,” *Med. Interna Mex.*, vol. 32, no. 4, pp. 381–387, 2016.