

**Indicador de calentamiento global a partir de la fermentación ruminal de alimentos con diferentes niveles de energía y proteína<sup>▲</sup>****Global warming indicator from rumen fermentation of feedstuffs with different energy and protein levels<sup>▲</sup>**

Brayan Eduardo Martínez-Hernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1995-0973>, Omar Salvador-Flores<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5954-2216> y Luis Alberto Miranda-Romero<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0342-7897>

<sup>1</sup>Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México – Texcoco, Chapingo, Estado de México CP 56230. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México Campo Cuatro, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Col. San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli.

\*Correspondencia: braedma@gmail.com

**Resumen**

**Objetivo:** Evaluar la técnica de producción de gas *in vitro* como método para estimar *in vivo* un indicador de calentamiento global, en dietas con diferentes niveles de energía metabolizable y proteína bruta.

**Materiales y Métodos:** Se usó la técnica de producción de gas *in vitro* para obtener un indicador de calentamiento global a partir de la producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, la emisión potencial de gases de fermentación y la digestibilidad de cinco dietas: tres dietas balanceadas a niveles bajo (2,7:12,8); medio (2,7:15,3) y alto (3,0:17,6); y dos desbalanceadas en energía metabolizable y proteína bruta, con las cuales se alimentó a 30 corderos (26,5 ± 3,7 kg PV) en corraletas individuales. La engorda duró 60 días (tres periodos de 20 días). En cada periodo se tomaron muestras del alimento ofrecido, el rechazado y heces por animal, las cuales fueron fermentadas con la TPG durante 24 h. El diseño fue completamente al azar con arreglo factorial 5 x 3 (dieta x periodo).

**Resultados:** La digestibilidad *in vitro* de la materia seca y la fermentación ruminal *in vitro* fueron 6 y 13 % mayores para las dietas balanceadas en comparación con las desbalanceadas, respectivamente. En cuanto a la producción de CH<sub>4</sub> y el indicador potencial de calentamiento global, se observó una mayor producción en el tercer periodo de la engorda respecto a los primeros 40 días. Además, las raciones altas en energía metabolizable fueron las de mayor impacto ambiental en el calentamiento global ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** El indicador potencial de calentamiento global obtenido con la técnica de producción de gas es útil para estimar el impacto ambiental de las dietas para rumiantes; y las dietas balanceadas, independientemente del nivel de energía y proteína, tuvieron una mayor digestibilidad y fermentación.

**Palabras clave:** cordero, fermentación, impacto ambiental

**Abstract**

**Objective:** To evaluate the *in vitro* gas production technique as method to estimate *in vivo* a global warming indicator, in diets with different levels of metabolizable energy and crude protein.

**Materials and Methods:** The *in vitro* gas production technique was used to obtain a global warming indicator from CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production, the potential emission of fermentation gases and digestibility of five diets: three balanced diets at low (2,7:12,8); medium (2,7:15,3) and high levels (3,0:17,6) and two unbalanced diets in metabolizable energy and crude protein, with which 30 lambs (26,5 ± 3,7 kg LW) were fed in individual pens. Fattening lasted 60 days (three periods of 20 days). In each period samples of the offered and rejected feedstuff, and feces were taken per animal, which were fermented with the GPT during 24 h. The design was complete randomized with 5 x 3 factorial arrangement (diet x period).

**Results:** The *in vitro* dry matter digestibility and *in vitro* ruminal fermentation were 6 and 13 % higher for the balanced diets compared with the unbalanced ones, respectively. Regarding CH<sub>4</sub> production and the global warming potential indicator, higher production was observed in the third period of fattening with regards to the first 40 days. In addition, the diets high in metabolizable energy were the ones with higher environmental impact on global warming ( $p < 0,05$ ).

**Conclusions:** The global warming potential indicator obtained with the gas production technique is useful to estimate the environmental impact of the diets for ruminants; and the balanced diets, independently from the energy and protein level, they had higher digestibility and fermentation.

**Keywords:** lamb, fermentation, environmental impact

<sup>▲</sup> Trabajo presentado en la V Convención Internacional Agrodesarrollo 2019 celebrada del 22 al 26 de octubre del 2019. Centro de Convenciones Plaza América. Varadero, Cuba.

<sup>▲</sup> Paper presented in the 5th International Convention Agrodesarrollo 2019 celebrated on October 22-26, 2019. Plaza America Convention Center. Varadero, Cuba.

Recibido: 07 de agosto de 2019

Aceptado: 12 de septiembre de 2019

Como citar este artículo: Martínez-Hernández, B. E.; Salvador-Flores, O. & Miranda-Romero, L. A. Indicador de calentamiento global a partir de la fermentación ruminal de alimentos con diferentes niveles de energía y proteína. *Pastos y Forrajes*. 42 (4):285-289, 2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

## Introducción

Los rumiantes contribuyen al calentamiento global al generar productos de la fermentación anaeróbica de carbohidratos, tales como calor, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y metano (CH<sub>4</sub>), según señalan Castelán-Ortega *et al.* (2014). Este último representa una pérdida del 10 % de la energía contenida en el alimento (Carmona *et al.*, 2005), y es el segundo contribuyente más significativo al efecto invernadero, al atrapar veinte veces más calor que el dióxido de carbono (Yan *et al.*, 2010). Además, se calcula que aproximadamente una cuarta parte de todo el CH<sub>4</sub> antropogénico se produce por fermentación entérica de los rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2008; Ramin y Huhtanen, 2013).

La estimación de las emisiones de gases de efecto invernadero, principalmente CH<sub>4</sub>, por métodos *in vivo* es considerada más exacta, y entre estos destacan la cámara de respiración, el trazador SF<sub>6</sub> y las técnicas micrometeorológicas (Rodríguez *et al.*, 2019). Sin embargo, estas técnicas son costosas y laboriosas; y, en menor o mayor grado, afectan el comportamiento animal. Por su parte, las técnicas *in vitro* son de bajo costo (Danielsson *et al.*, 2017), prácticas, poco contaminantes, y se pueden usar para estimar los parámetros de la cinética de producción de gas y predecir la producción de metano (Ramin y Huhtanen, 2012).

La técnica de producción de gas *in vitro* (TPG) genera gas proveniente directa y principalmente, pero no exclusivamente, de la fermentación ruminal de los carbohidratos del alimento; por tanto, el gas puede ser un indicador del contenido de energía (Menke y Steingass, 1988; Posada y Noguera, 2005). Algunos trabajos de investigación han evidenciado la factibilidad de aplicar la TPG en estudios *in vivo*, con el fin de determinar el efecto de la dieta en la emisión potencial de gases (Miranda-Romero *et al.*, 2018). Debido a lo anterior, existe el interés de evaluar la producción potencial de metano en función del contenido de energía y proteína del alimento; por lo que el objetivo de la investigación fue evaluar la técnica de producción de gas *in vitro* como método para estimar *in vivo* un indicador de calentamiento global, en dietas con diferentes niveles de energía metabolizable y proteína cruda.

## Materiales y Métodos

*Localización del estudio.* El trabajo se llevó a cabo en dos fases: la primera consistió en la engorda

de 30 corderos durante 60 días y la toma de muestras del alimento ofrecido, y tuvo lugar en la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México –localizada en Cuautitlán Izcalli, Estado de México–. El área está situada a una latitud de 19,695826 norte y longitud de 99,190613 oeste; el clima es templado. La precipitación media anual es de 653 mm y la temperatura promedio es de 15,7 °C (INAFED). La segunda fase se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición de rumiantes del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el kilómetro 38,5 de la carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México; y consistió en la fermentación por duplicado de las 90 muestras de alimento ofrecido, mediante la técnica de producción de gas *in vitro* a 24 h de la incubación.

*Tratamiento y diseño experimental.* Con un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y seis repeticiones, se formularon cinco dietas con diferentes niveles de energía metabolizable (Mcal/kg) y proteína cruda (%). Para el grupo testigo (MM) se utilizaron los niveles de energía metabolizable (2,8 Mcal/kg) y proteína cruda (16 %) que recomienda el NRC (2007) para ovinos en crecimiento y finalización. Para los grupos experimentales se usaron dos niveles de energía metabolizable, uno superior (3,0 Mcal/kg) y otro inferior (2,7 Mcal/kg) con respecto a las recomendaciones del NRC (2007). De igual manera se utilizaron dos niveles de proteína bruta: superior (18 % PB) e inferior (14 % PB). Con las combinaciones se obtuvieron los siguientes tratamientos (Mcal/kg:% PB): AA (3:18), AB (3:14), BA (2,7:18) y BB (2,7:14). Las cuatro combinaciones se muestran en la figura 1.

*Animales y manejo.* Treinta corderos machos (26,5 ± 3,7 kg PV) instalados en corraletas individuales de 1 m<sup>2</sup> fueron alimentados con las dietas, las cuales fueron asignadas aleatoriamente. Los corderos tuvieron un periodo de adaptación de 10 días. La engorda duró 60 días y fue dividida en tres periodos de 20 días cada uno. En cada periodo se tomaron cada tercer día muestras del alimento ofrecido, con las que se conformaron muestras compuestas por animal y por periodo. Las 90 muestras fueron secadas, molidas y fermentadas por la técnica de producción de gas modificada (Getachew *et al.*, 1998), para medir la producción de gas total (mL g<sup>-1</sup>) y para estimar la producción de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> más gases

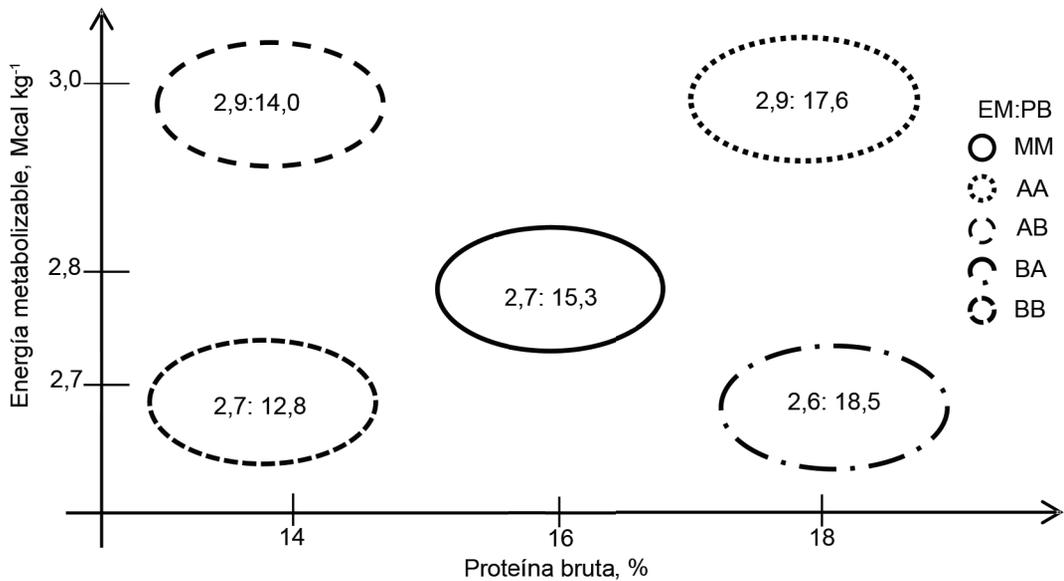


Figura 1. Energía metabolizable (EM) y proteína bruta (PB) en dietas con nivel alto (A), medio (M) o bajo (B). MM: dieta de referencia recomendada por la NRC (2007) para ovinos que ganan 250 g/días. Valores dentro de los óvalos corresponden al nivel de EM y PB para cada dieta.

menores (CH<sub>4</sub>+GM) y la digestibilidad *in vitro* (DIVMS) a las 24 h de la incubación.

La producción total de gas fue referida como índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGM, mL g<sup>-1</sup>). Los valores de CH<sub>4</sub>+GM fueron ajustados como metano teórico (CH<sub>4</sub>) multiplicando cada valor por 0,77 (Zhong *et al.*, 2016). Con los valores de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> se obtuvo el indicador potencial de calentamiento global (IPCG), considerando un valor equivalente por metano de 23 (Berra *et al.*, 2009) y la siguiente ecuación:

$$IPCG(\text{mL CO}_2 \text{ eq g}^{-1} \text{ MS}) = \text{CO}_2(\text{mL g}^{-1}) + \text{CH}_4(\text{mL g}^{-1}) \times 23$$

El análisis estadístico se realizó con el procedimiento GLM y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (SAS 9.4).

### Resultados y Discusión

De acuerdo con el IEPGF, la dieta desbalanceada AB se fermentó menos que las dietas balanceadas (AA, BB y MM) en los dos primeros periodos de la engorda, y tendió a ser de las menos fermentables en el tercer periodo junto con la dieta balanceada AA (tabla 1). Este resultado es congruente con la DIVMS, pues se observó que las dietas balanceadas a nivel bajo, medio o alto de EM y PC (BB, MM y AA) tuvieron una mayor digestibilidad ( $p < 0,05$ ) que las desbalanceadas (AB y BA). La digestibilidad promedio fue alta en los primeros dos periodos. Sin embargo, como se trataba de animales adultos no

hubo diferencia ( $p > 0,05$ ) en la digestibilidad, lo que coincide con lo descrito por Bastida-García *et al.* (2011).

La producción de metano promedio de los tres periodos fue inferior al 16 %, lo cual se corresponde con dietas altas en concentrado; a su vez, el valor fue menor que en dietas altas en forraje ( $> 20$  %), según señalan Dumortier *et al.* (2017).

Es notorio que la producción de metano fuera mayor para el último periodo de la engorda (41-60 días). Por otra parte, se observó que las dietas con baja energía (BB y BA) produjeron menos metano ( $p < 0,05$ ); mientras que la dieta con alta energía y proteína (AA) produjo una mayor cantidad ( $p < 0,05$ ) de metano (tabla 1).

Por su parte, la fermentación ruminal *in vitro* de las dietas demostró que, con un mayor contenido de EM (AA y AB), el IPCG tuvo un valor superior ( $p < 0,05$ ) y, por ende, estas fueron las de mayor impacto ambiental respecto al calentamiento global, principalmente en los dos primeros periodos de engorda. En el último periodo, la dieta con niveles medios de EM y PC (MM) también tuvo un IPCG alto ( $p < 0,05$ ). En contraste, el IPCG fue menor ( $p < 0,05$ ) con la fermentación de las dietas con nivel bajo de EM (tabla 1).

Estos resultados indican que, independientemente del nivel de EM y PB, la fermentación ruminal del alimento se optimiza cuando estos nu-

Tabla 1. Producción de gas de fermentación *in vitro* e indicador potencial de calentamiento global de dietas con diferentes niveles de energía y proteína.

Periodo, días	Tratamiento, EM:PB	CH <sub>4</sub> , %	IEPGF <sub>24h</sub> , mL g <sup>-1</sup>	IPCG, mL CO <sub>2</sub> eq g <sup>-1</sup> cordero <sup>-1</sup>	DIVMS, %
0-20	BB	0,1 <sup>b</sup>	206,9 <sup>a</sup>	219,9 <sup>c</sup>	71,6 <sup>ab</sup>
	MM	5,6 <sup>a</sup>	195,7 <sup>a</sup>	400,1 <sup>b</sup>	74,1 <sup>a</sup>
	AA	9,4 <sup>a</sup>	182,0 <sup>a</sup>	552,7 <sup>a</sup>	75,0 <sup>a</sup>
	BA	7,8 <sup>a</sup>	131,4 <sup>b</sup>	344,3 <sup>bc</sup>	62,1 <sup>b</sup>
	AB	9,9 <sup>a</sup>	195,0 <sup>a</sup>	610,0 <sup>a</sup>	68,4 <sup>ab</sup>
21-40	BB	4,2 <sup>ab</sup>	171,3 <sup>a</sup>	330,0 <sup>a</sup>	73,4 <sup>ab</sup>
	MM	1,7 <sup>b</sup>	172,1 <sup>a</sup>	239,5 <sup>ab</sup>	72,6 <sup>ab</sup>
	AA	4,7 <sup>a</sup>	193,9 <sup>a</sup>	390,4 <sup>a</sup>	80,3 <sup>a</sup>
	BA	2,3 <sup>ab</sup>	91,6 <sup>b</sup>	138,1 <sup>b</sup>	68,0 <sup>b</sup>
	AB	4,0 <sup>ab</sup>	198,0 <sup>a</sup>	369,2 <sup>a</sup>	77,5 <sup>ab</sup>
41-60	BB	5,4 <sup>c</sup>	194,2 <sup>ab</sup>	421,2 <sup>c</sup>	75,3
	MM	16,4 <sup>ab</sup>	206,5 <sup>a</sup>	941,9 <sup>a</sup>	77,1
	AA	16,6 <sup>a</sup>	183,0 <sup>b</sup>	842,1 <sup>ab</sup>	74,1
	BA	12,4 <sup>b</sup>	190,6 <sup>ab</sup>	695,1 <sup>b</sup>	75,3
	AB	15,6 <sup>ab</sup>	189,0 <sup>b</sup>	825,3 <sup>ab</sup>	73,8

EM: energía metabolizable (Mcal kg<sup>-1</sup>), PB: proteína bruta (% kg<sup>-1</sup>), CH<sub>4</sub>: metano, IEPGF<sub>24h</sub>: índice de emisión potencial de gases de fermentación, IPCG: índice potencial de calentamiento global, DIVMS: digestibilidad *in vitro*

a, b, c: letras desiguales dentro de columnas son diferentes para p < 0,05

trimentos están balanceados (BB, MM y AA); lo cual, por consecuencia, incrementaría la producción de AGV y la energía disponible para el rumiante (Popa *et al.*, 2016).

Por otro lado, cuando la dieta está desbalanceada en EM y PC, la fermentación ruminal del alimento es menor; y, por consiguiente, la producción de AGV también se reduce, particularmente cuando hay exceso de EM (AB). Los resultados también indicaron que el nivel de EM en la dieta es más determinante que el nivel de PC en el impacto ambiental; puesto que las dietas AA y AB mostraron mayores IPCG y, en promedio de los tres periodos, tuvieron 31 % más de IPCG que las dietas BB, MM y BA.

### Conclusión

El indicador potencial de calentamiento global obtenido por la técnica de producción de gas *in vitro* es útil para estimar el impacto ambiental por la fermentación de los alimentos para rumiantes. En esta investigación se demostró que el IPCG estuvo determinado por el nivel de EM en la dieta. Por otro lado, se confirmó que las dietas balanceadas, independientemente de su nivel de EM y PC, se fermentaron mejor que las desbalanceadas; y, por consiguiente, se espera una mayor disponibilidad

de energía proveniente de AGV para el rumiante. Ello tiene implicaciones para la producción de corderos, ya que los productores de bajos recursos deben considerar, antes de incluir ingredientes energéticos o proteicos, que es mejor balancear la dieta a niveles bajos de EM y PC para mejorar la fermentación ruminal y, probablemente, el comportamiento productivo de los corderos.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), la Universidad Autónoma Chapingo a través de la Dirección General de Investigación y Posgrado, y el Posgrado en Producción Animal.

### Contribución de los autores

- Brayan Eduardo Martínez-Hernández. Conceptualización, curación de datos, análisis formal, adquisición de financiamiento, investigación, administración del proyecto, visualización, redacción del borrador original, revisión y edición.
- Omar Salvador-Flores. Conceptualización, adquisición de financiamiento, metodología, recursos, administración del proyecto, redacción, revisión y edición.

- Luis Alberto Miranda-Romero. Conceptualización, curación de datos, análisis formal, adquisición de financiamiento, metodología, administración del proyecto, recursos, supervisión, visualización, redacción del borrador original, revisión y edición.

### Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

### Referencias bibliográficas

- Bastida-García, J. L.; González-Ronquillo, M.; Domínguez-Vara, I. A.; Romero-Bernal, J. & Castelán-Ortega, O. Effect of field pea (*Pisum sativum* L.) level on intake, digestion, ruminal fermentation and *in vitro* gas production in sheep fed maintenance diets. *Anim. Sci.* 82 (5):654-662, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00884.x>.
- Beauchemin, K. A.; Kreuzer, M.; O'Mara, F. & McAllister, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agr.* 48 (2):21-27, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1071/ea07199>.
- Berra, G.; Finster, L. & Valtorta, S. E. Una técnica sencilla para la medición de emisiones de metano entérico en vaca. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias.* 8 (1):49-56, 2009. DOI: <https://doi.org/10.14409/favecv.v8i1.1479>.
- Carmona, J. C.; Bolívar, Diana M. & Giraldo, L. A. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18 (1):49-63, 2005.
- Castelán-Ortega, O. A.; Ku-Vera, J. C. & Estrada-Flores, J. G. Modeling methane emissions and methane inventories for cattle production systems in Mexico. *Atmósfera.* 27 (2):185-191, 2014.
- Danielsson, R.; Ramin, M.; Bertilsson, J.; Lund, P. & Huhtanen, P. Evaluation of a gas *in vitro* system for predicting methane production *in vivo*. *J. Dairy Sci.* 100 (11):8881-8894, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12675>.
- Dumortier, P.; Aubinet, M.; Beckers, Y.; Chopin, H.; Debacq, A.; Gourlez-de-la-Motte, L. *et al.* Methane balance of an intensively grazed pasture and estimation of the enteric methane emissions from cattle. *Agric. For. Meteorol.* 232:527-535, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agrfor-met.2016.09.010>.
- Getachew, G.; Blümmel, M.; Makkar, H. P. S. & Becker, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72 (3-4):261-281, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2).
- Menke, K. H. & Steingass, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:7-55, 1988.
- Miranda-Romero, L. A.; Vazquez-Mendoza, Paulina; Burgueño-Ferreira, J. A. & Aranda-Osorio, G. Nutritive value of cactus pear silages for finishing lambs. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 20:196-215, 2018.
- Popa, D.; Popa, R.; Vidu, L. & Nicolae, C. Emission of methane from enteric fermentation of cattle and buffaloes in Romania between 1989-2014. *Agric. Agric. Sci. Procedia.* 10:289-298, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.066>.
- Posada, S. L. & Noguera, R. R. Técnica *in vitro* de producción de gases : una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *LRRD.* 17 (4). <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posal7036.htm>, 2005.
- Ramin, M. & Huhtanen, P. Development of an *in vitro* method for determination of methane production kinetics using a fully automated *in vitro* gas system-A modelling approach. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174 (3-4):190-200, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.008>.
- Ramin, M. & Huhtanen, P. Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. *J. Dairy Sci.* 96 (4):2476-2493, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6095>.
- Rodríguez, J. C.; Pellat, F.; Watts, C.; Lizárraga-Celaya, C.; Yépez-González, G.; Jiménez-Ferrer, G. *et al.* Mediciones de metano y bióxido de carbono usando la técnica de covarianza de vórtices en ganado lechero semiestabulado en Sonora, México. *Terra Latinoamericana.* 37:69-80, 2019. DOI: <https://doi.org/10.28940/tl.v37i1.412>.
- Yan, T.; Mayne, C. S.; Gordon, F. G.; Porter, M. G.; Agnew, R. E.; Patterson, D. C. *et al.* Mitigación de las emisiones entéricas de metano a través de la mejora de la eficiencia de la utilización de la energía y la productividad en vacas lecheras lactantes. *J. Dairy Sci.* 93 (6):2630-2638, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2929>.
- Zhong, R. Z.; Fang, Y.; Sun, H. X.; Wang, M. & Zhou, D. W. Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. *J. Integr. Agr.* 15 (2):414-423, 2016. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61036-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61036-X).