

# Análise do desempenho de testes rápidos comerciais para detecção de troponina I sérica

## *Performance analysis of commercial rapid tests for serum troponin detection*

Raquel Ida Ferreira; Marcela R. Amaral; Maytê S. R. Brito; Matheus P. Pinto; Ana Carolina R. Maranhão; Lucas R. R. Costa; Rômulo C. Vaz de Melo

Faculdade de Medicina de Barbacena, Barbacena, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMO

**Introdução:** Atualmente, os testes rápidos representam importante ferramenta diagnóstica, fornecendo resultados em curto espaço de tempo e dispensando a utilização de grandes automações. **Objetivo:** Avaliar o desempenho de cinco *kits* de testes rápidos para pesquisa sérica de troponina I. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas 100 amostras de pacientes com suspeita de infarto agudo do miocárdio (IAM) de um hospital do município de Barbacena, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram testadas nos cinco *kits* comerciais de teste rápido de troponina I e o resultado foi comparado com o método considerado referência no estudo (imunoensaio quimioluminescente quantitativo). Em seguida, foram definidos níveis de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e coeficiente de correlação dos testes rápidos em relação ao método de referência. **Resultados:** Os *kits* Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup> apresentaram o mesmo desempenho, atingindo níveis iguais de sensibilidade (98,08%), especificidade (100%), VPP (100%), VPN (97,96%) e coeficiente de correlação (0,99). O *kit* Eco Diagnóstica<sup>®</sup> apresentou 82,69% de sensibilidade, 0,91 de coeficiente de correlação e 84,21% de VPN, não atingindo os níveis ideais, mesmo dentro do intervalo de confiança. **Discussão:** Os resultados obtidos com os *kits* Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup> confirmam dados preexistentes na literatura sobre a exatidão diagnóstica dos testes rápidos para detecção de troponina. Esses testes permitem a tomada de decisão imediata pelo médico e podem ser usados para reduzir tempo e custos de internações desnecessárias na suspeita de IAM. **Conclusão:** Os *kits* Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup> apresentaram excelente desempenho diagnóstico e constituem importante ferramenta diagnóstica em laboratórios menores, sem equipamentos automatizados.

**Unitermos:** infarto do miocárdio; troponina I; técnicas de diagnóstico cardiovascular.

### ABSTRACT

**Introduction:** Rapid tests represent an important diagnostic tool, providing results in a short period of time and eliminating the use of large automated equipment. **Objective:** To evaluate the performance of five rapid test kits for troponin I detection in serum. **Materials and methods:** Samples from 100 patients with suspected acute myocardial infarction (AMI) were selected from a hospital in Barbacena, MG, Brazil. They were tested in the five troponin I commercial rapid test kits and the results were compared with the study reference method (quantitative chemiluminescent immunoassay). Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and correlation coefficients of the rapid tests against the reference method were defined. **Results:** The kits from Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> and Wama<sup>®</sup> presented the same performance, reaching equal levels of sensitivity (98.08%), specificity (100%), PPV (100%), NPV (97.96%), and correlation coefficient (0.99). The Eco Diagnostica<sup>®</sup> kit presented lower sensitivity (82.69%), low correlation coefficient (0.91) and NPV (84.21%), not reaching ideal levels even though lying within the confidence interval. **Discussion:** The results obtained with the Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> and Wama<sup>®</sup> test kits corroborate pre-existing literature data on the diagnostic accuracy of rapid tests for troponin detection. These tests are allowed for immediate decision making by physicians and can be used to reduce unnecessary hospitalization time and costs associated with a suspected AMI. **Conclusion:** The kits from Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> and Wama<sup>®</sup> showed excellent diagnostic performance, what makes them an important diagnostic tool in smaller laboratories without automated equipment.

**Key words:** myocardial infarction; troponin I; diagnostic techniques, cardiovascular.

## RESUMEN

**Introducción:** Hoy en día, las pruebas rápidas representan importante herramienta diagnóstica, ofrecen resultados en corto espacio de tiempo y dispensan el uso de equipos automatizados. **Objetivo:** Evaluar el desempeño de cinco kits de pruebas rápidas para detectar troponina I en suero. **Material y métodos:** Se eligieron 100 especímenes de pacientes sospechosos de infarto agudo de miocardio (IAM) de un hospital en el municipio de Barbacena, Minas Gerais, Brasil. Los especímenes fueron testados en los cinco kits comerciales de prueba rápida de troponina I y el resultado se comparó con el método considerado referencia en el estudio (inmunoensayo quimioluminiscente cuantitativo). Luego, se establecieron los niveles de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y coeficiente de correlación de las pruebas rápidas con respecto al método de referencia. **Resultados:** Las marcas Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> y Wama<sup>®</sup> tuvieron el mismo desempeño, alcanzando niveles iguales de sensibilidad (98,08%), especificidad (100%), VPP (100%), VPN (97,96%) y coeficiente de correlación (0,99), mientras la marca Eco Diagnóstica<sup>®</sup> presentó 82,69% de sensibilidad, 0,91 de coeficiente de correlación y 84,21% de VPN, no alcanzando los niveles ideales, aunque dentro del intervalo de confianza. **Discusión:** Los resultados obtenidos con las marcas Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup> confirman datos preexistentes en la literatura sobre la precisión diagnóstica de las pruebas rápidas para detectar troponina. Esas pruebas permiten a los médicos adoptar decisiones de forma inmediata y pueden ser usados para reducir tiempo y costos de internaciones innecesarias cuando hay sospecha de IAM. **Conclusión:** Las marcas Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup> presentaron excelente desempeño diagnóstico y representan importante herramienta diagnóstica en laboratorios menores, sin equipos automatizados.

**Palabras clave:** infarto del miocardio; troponina I; técnicas de diagnóstico cardiovascular.

## INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade mundial. Em 2015, 31% das mortes no mundo foram decorrentes de DCV. Estima-se que as doenças cardíacas coronarianas sejam responsáveis por 7,4 milhões desses óbitos<sup>(1)</sup>.

O diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM) consiste na elevação ou na queda de biomarcadores cardíacos e, pelo menos, de um dos seguintes critérios: presença de sintomas isquêmicos, alterações no eletrocardiograma (ECG) indicativas de isquemia (elevação ou depressão do segmento ST ou novo bloqueio cardíaco de ramo esquerdo), desenvolvimento de ondas Q patológicas no ECG ou evidência de exames de imagem com perda de viabilidade miocárdica ou contratilidade segmentar anormal<sup>(2-4)</sup>. Contudo, muitos casos não apresentam sintomas típicos e o ECG é inespecífico em 50% dos pacientes com IAM<sup>(5)</sup>.

Nesse contexto, biomarcadores cardíacos são fundamentais para o diagnóstico de IAM e síndrome coronariana aguda (SCA). A troponina cardíaca é considerada o biomarcador com maior sensibilidade e especificidade para detecção de lesão miocárdica; as troponinas I e T podem ser utilizadas nesse diagnóstico, apresentando desempenho semelhante<sup>(2, 5, 6)</sup>.

Desde o início dos anos 90, existem ensaios quantitativos para a dosagem da troponina sérica, e os protocolos atuais para o diagnóstico do infarto os consideram como teste de escolha. Atualmente, recomenda-se uma dosagem de troponina na

admissão do paciente e ao menos mais uma dosagem deve ser realizada após 6-12 horas<sup>(5, 7)</sup>. É importante que o resultado seja liberado o mais rápido possível, pois a reperfusão coronariana precoce pode melhorar o prognóstico do paciente. Todavia, nem todos os laboratórios do país possuem equipamentos automatizados para realizar esse teste<sup>(8, 9)</sup>.

Testes rápidos podem resolver os problemas de falta do equipamento automatizado e tempo de realização do ensaio, uma vez que dispensam o uso de equipamentos, são de leitura visual e fornecem resultado em poucos minutos. Porém, embora os testes rápidos estejam amplamente disponíveis no mercado e seus fabricantes tenham de apresentar procedimentos de validação para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), esses procedimentos e seus resultados não são divulgados, portanto, não há o conhecimento necessário sobre a sensibilidade e a especificidade dos testes para o diagnóstico do IAM no meio médico. Dessa forma, é imprescindível realizar pesquisas para avaliar esse desempenho, corroborando ou não o uso desses testes em locais de pequena demanda, sem possibilidade de utilização de métodos automatizados.

## OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de cinco kits comerciais de teste rápido para a detecção de troponina I sérica em pacientes com suspeita de IAM atendidos em uma unidade de urgência.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

### Desenho experimental

Trata-se de um estudo de exatidão diagnóstica de cinco *kits* comerciais de testes rápidos para pesquisa de troponina I sérica, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Barbacena (protocolo 2.893.449, CAAE: 97475518.7.0000.8307).

### Coleta do material

Como referência para a metodologia, foram utilizadas as normas técnicas preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008<sup>(10)</sup>.

Cem amostras de sangue foram selecionadas e encaminhadas ao Laboratório São José de Barbacena, Minas Gerais – referência em análise de marcadores cardíacos na região –, pertencentes a pacientes do setor de urgência e emergência do Hospital Ibiapaba Cebams, Barbacena, Minas Gerais, com suspeita de IAM. A seleção foi realizada por conveniência, de acordo com a demanda do serviço laboratorial, incluindo amostras de pacientes que realizaram a dosagem de marcadores cardíacos creatinofosfoquinase ou troponina. Amostras sanguíneas insuficientes, hemolisadas, lipêmicas ou ictericas foram excluídas da pesquisa.

As amostras foram submetidas à dosagem de troponina I pelo método quantitativo quimioluminescente no equipamento Access<sup>®</sup> (Beckman, Coulter<sup>®</sup>), considerado, neste estudo, o método de referência. Foram consideradas positivas as amostras com troponina I  $\geq 0,5$  ng/ml e negativas com troponina I  $< 0,5$  ng/ml. Posteriormente, elas foram testadas em cinco *kits* de testes rápidos comerciais para detecção de troponina I sérica, seguindo as recomendações dos fabricantes. Nove *kits* de testes rápidos foram pré-selecionados para troponina I, pois eram as marcas mais utilizadas pelos laboratórios diagnósticos: Abon<sup>®</sup>, Bioclin<sup>®</sup>, Eco Diagnóstica<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Invitro<sup>®</sup>, Katal<sup>®</sup>, Laborimport<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup>, OrangeLife<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup>. Entre eles, cinco foram selecionados, priorizando aqueles com maior prazo de validade: Abon<sup>®</sup>, Eco Diagnóstica<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup>.

Os testes foram realizados pelos próprios pesquisadores no laboratório, sob supervisão de técnicos em patologia clínica e bioquímicos devidamente qualificados. Durante o experimento, os testes foram identificados com o nome e o número de registro de cada paciente. Para evitar erros, apenas cinco amostras foram avaliadas em cada momento. As recomendações de cada fabricante foram seguidas quanto ao tipo de amostra (soro ou sangue total), quantidade de reagente necessário e tempo para leitura dos testes, que variou entre 10 e 15 minutos. O procedimento para avaliação de cinco amostras, desde a identificação até a leitura e o processamento dos resultados, durou, em média, 30 minutos.

Objetivou-se uma concordância de 99% entre os resultados dos testes rápidos e do método de referência. Os autores declararam ausência de quaisquer conflitos de interesses financeiros, pessoais ou profissionais com os fornecedores de *kits* para dosagem de troponina I.

### Análise estatística

Os resultados obtidos foram transcritos para a base de dados e inseridos em uma planilha Excel. Os dados foram analisados pelo *software* estatístico Stata versão 9.2. A comparação entre o método de referência para dosagem de troponina I e os testes rápidos foi feita por meio dos testes de Pearson (qui-quadrado) e exato de Fischer. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e coeficiente de correlação foram obtidos entre os testes rápidos e o método de referência. Para este estudo, o método de referência foi considerado o padrão-ouro, com sensibilidade e especificidade de 100%. Os resultados foram calculados considerando o intervalo de confiança (IC) de 95%.

## RESULTADOS

---

A população do estudo foi composta por 100 pacientes, sendo 51 (51%) do sexo feminino e 49 (49%) do masculino. A média de idade foi de 65 anos, com desvio padrão de 12,35.

A dosagem de troponina I pelo método quantitativo (referência) mostrou 48 resultados negativos e 52 positivos. Os testes rápidos Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup> apresentaram resultado discordante em apenas uma das 100 amostras analisadas, com resultado de troponina I de 0,95 ng/ml, positivo no método de referência e negativo nos demais testes; para os testes rápidos, tal valor é considerado um resultado falso-negativo. A avaliação dos testes rápidos Eco diagnóstica<sup>®</sup> mostrou discordância em nove amostras, com resultados de troponina I de: 0,62; 0,9; 0,95; 0,97; 1,08; 2,22; 2,52; 3,5 e 34,1 ng/dl, todos positivos no método de referência e negativos no teste rápido em questão, considerados resultados falso-negativos. Resultados falso-positivos não foram encontrados em nenhum dos testes avaliados.

A **Tabela** apresenta os valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, acurácia e coeficiente de correlação (*r*) entre os testes rápidos comerciais e o método de referência. Observa-se que as marcas Abon<sup>®</sup>, Interteck<sup>®</sup>, Medtest<sup>®</sup> e Wama<sup>®</sup> apresentaram desempenho idêntico, atingindo excelentes níveis de exatidão diagnóstica e coeficiente de correlação em relação ao método de referência; todas as medidas atingiram níveis ideais (100%) dentro do IC.

TABELA – Especificações de exatidão diagnóstica e IC de testes rápidos para detecção de troponina I sérica em comparação com as do método quimioluminescente no equipamento Access® (Beckman-Coulter®), em amostras de sangue de pacientes com suspeita de IAM no Hospital Ibiapaba Cebams, Barbacena, Minas Gerais, Brasil

	S	E	VPP	VPN	r	Acurácia
Abon®	98,1 (95,4-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	97,9 (95,2-100)	0,99 (0,97-1)	99 (97-100)
Eco diagnóstica®	82,7 (75,3-90,1)	100 (100-100)	100 (100-100)	84,2 (77,1-91,4)	0,91 (0,85-0,96)	91 (85-96)
Interteck®	98,1 (95,4-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	97,9 (95,2-100)	0,99 (0,97-1)	99 (97-100)
Medtest®	98,1 (95,4-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	97,9 (95,2-100)	0,99 (0,97-1)	99 (97-100)
Wama®	98,1 (95,4-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	97,9 (95,2-100)	0,99 (0,97-1)	99 (97-100)

Todas as medidas apresentaram valor de  $p < 0,01$ .

IC: intervalos de confiança; IAM: infarto agudo do miocárdio; S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor produtivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; r: coeficiente de correlação.

O teste Eco diagnóstica® apresentou níveis mais baixos de sensibilidade (82,69%) e VPN (84,21%) e, mesmo dentro do IC, não atingiu o nível ideal (100%). Além disso, o coeficiente de correlação em relação ao método de referência também foi menor que os demais (0,91) – não atingiu o nível ideal dentro do IC.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce e o início rápido de medidas terapêuticas apresentam impacto direto na morbimortalidade de pacientes com SCA<sup>(11)</sup>. Diversos estudos como este afirmam que testes rápidos para detecção de troponina I são adequados para avaliar indivíduos com sintomas sugestivos de SCA em serviços de emergência, sendo uma alternativa para reduzir tempo e custos de internações desnecessárias, além de permitir a tomada de decisão imediata pelo médico assistente<sup>(8, 11, 12)</sup>.

### Implicações clínicas

Este estudo não avaliou a utilização direta de testes rápidos para detecção de troponina I no diagnóstico do IAM. No entanto, o potencial desses testes foi analisado de maneira indireta nesse diagnóstico, por meio de comparação com os resultados de um teste laboratorial reconhecido e amplamente utilizado. A implementação de testes rápidos em setores de emergência pode reduzir o tempo de diagnóstico, os custos com internação e o tempo de internação, conforme já evidenciado na literatura<sup>(13, 14)</sup>.

Os testes rápidos Abon®, Interteck®, Medtest® e Wama® para troponina I apresentaram excelente exatidão diagnóstica, com níveis ideais de especificidade e VPP. Os níveis de sensibilidade e VPN foram muito altos, além do coeficiente de correlação de 0,99, atingindo a perfeição dentro do IC. Dessa forma, os resultados do estudo corroboram dados preexistentes na literatura acerca da exatidão diagnóstica dos testes rápidos para detecção de troponina<sup>(7, 13, 15)</sup>.

É importante ressaltar que apenas uma amostra apresentou resultados discordantes entre os testes rápidos e o método de

referência. Não houve a possibilidade de confirmação do resultado do imunoensaio quantitativo, uma vez que o volume de amostra não era suficiente para testes adicionais. Portanto, embora o imunoensaio quantitativo tenha sido considerado o método de referência para este estudo, não podemos descartar a possibilidade de esse resultado ser um falso-positivo nesse teste e verdadeiro-negativo nos testes rápidos.

Os pesquisadores consideraram o desempenho do teste Eco diagnóstica® insuficiente para uso clínico, pois os valores de sensibilidade e VPN e o coeficiente de correlação em relação ao método de referência foram baixos, não atingindo níveis satisfatórios dentro do IC. Isso ocorreu principalmente porque esse teste apresentou resultados falso-negativos em amostras com diferentes níveis de concentração de troponina I, o que vai de encontro ao preconizado pela literatura, que, para o manejo do IAM, recomenda testes com elevados níveis de sensibilidade<sup>(15)</sup>.

### Limitações

Uma limitação do estudo foi a incapacidade de realizar a validação clínica dos resultados, com a verificação dos prontuários e a confirmação do quadro de IAM. No entanto, o número de amostras e os resultados demonstraram que essa validação talvez não traga maiores informações. Outra limitação está relacionada com o uso do imunoensaio quantitativo quimioluminescente como método de referência para validação; essa escolha foi feita porque o método era prático e de fácil acesso. Supondo que os resultados deste teste sejam o padrão para comparação, um erro pode ter ocorrido na análise. Porém, pela correlação quase perfeita entre os principais testes, acreditamos que, se esse erro ocorreu, não foi relevante para a análise final.

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os testes rápidos Abon®, Interteck®, Medtest® e Wama® para detecção de troponina I sérica

apresentaram excelente desempenho diagnóstico, sendo uma ferramenta diagnóstica importante em laboratórios de menor

porte, sem equipamentos automatizados, que realizam testes de pacientes com suspeita de IAM em unidades de emergência.

## REFERÊNCIAS

---

1. WHO. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
2. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Fourth universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2018; 138(20): e620-45.
3. Palamalai V, Murakami MM, Apple FS. Diagnostic performance of four point of care cardiac troponin I assays to rule in and rule out acute myocardial infarction. *Clin Biochem*. 2013; 46(16-17): 1631-5. PubMed PMID: 23850852.
4. Greiser A, Winter T, Mahfoud H, et al. The 99<sup>th</sup> percentile and imprecision of point-of-care cardiac troponin I in comparison to central laboratory tests in a large reference population. *Clin Biochem*. 2017; 50(18): 1198-1202. PubMed PMID: 28803961.
5. Heeschen C, Goldmann BU, Moeller RH, Hamm CW. Analytical performance and clinical application of a new rapid bedside assay for the detection of serum cardiac troponin I. *Clin Chem*. 1998; 44(9): 1925-30. PubMed PMID: 9732978.
6. Suzuki K, Komukai K, Nakata K, et al. The usefulness and limitations of point-of-care cardiac troponin measurement in the emergency department. *Intern Med*. 2018; 57(12): 1673-80. PubMed PMID: 29434124.
7. Christ M, Geier F, Blaschke S, et al. Clinical performance of a new point-of-care cardiac troponin I test. *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56(8): 1336-44. PubMed PMID: 29630502.
8. Juliano M, Wason C. Comparison of point-of-care versus laboratory troponin testing in an emergency department setting. *Mil Med*. 2017; 182(7): e1938-e40. PubMed PMID: 29630502.
9. Hirschl MH, Herkner H, Laggner AN, et al. Analytical and clinical performance of an improved qualitative troponin T rapid test in laboratories and critical care units. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124(4): 583-7. PubMed PMID: 10747317.
10. Garret PE, Lasky FD, Meier KL. User protocol for evolution of qualitative test performance; approved guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. 2008; 28(2).
11. Singer AJ, Williams J, Taylor M, Le Blanc D, Thode HC Jr. Comprehensive bedside point of care testing in critical ED patients: a before and after study. *Am J Emerg Med*. 2015; 33(6): 776-80. PubMed PMID: 25836947.
12. Suh D, Keller DI, Hof D, et al. Rule-out of non-ST elevation myocardial infarction by five point of care cardiac troponin assays according to the 0 h/3 h algorithm of the European Society of Cardiology. *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56(4): 649-57. PubMed PMID: 29257750.
13. Sardi AR, Lamoureux JA, Phillip-Samuel SG. Point-of-care testing of troponin levels compared with automated laboratory evaluation: a reliability study. *Crit Care Nurs Q*. 2016; 39(4): 345-51. PubMed PMID: 27575797.
14. Cramer GE, Kievit PC, Brouwer MA, Keijzer MH, Luijten HE, Verheugt FWA. Lack of concordance between a rapid bedside and conventional laboratory method of cardiac troponin testing: impact on risk stratification of patients suspected of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2007; 381(2): 164-66.
15. Ramparany L, Ramirez J, Nizou JY, Le Saux D, Richard V, Talarmin A. Evaluation of four rapid immunochromatographic tests for the detection of cardiac troponin I. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18(3): 414-17.

---

## AUTOR CORRESPONDENTE

Raquel Ida Ferreira  0000-0003-1533-8971  
e-mail: raquelidaferreira@yahoo.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.