

# REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Official Publication of the Brazilian Society of Anesthesiology  
www.sba.com.br



## ARTIGO CIENTÍFICO

# Efeitos antimicrobianos de cetamina em combinação com propofol: um estudo *in vitro*☆

Zekine Begec<sup>a</sup>, Aytac Yucel<sup>a</sup>, Yusuf Yakupogullari<sup>b</sup>, Mehmet Ali Erdogan<sup>a,\*</sup>, Yucel Duman<sup>b</sup>, Mahmut Durmus<sup>a</sup> e M. Ozcan Ersoy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Anestesiologia e Reanimação, Faculdade de Medicina, Inonu University, Malatya, Turquia

<sup>b</sup> Departamento de Microbiologia Clínica, Faculdade de Medicina, Inonu University, Malatya, Turquia

Recebido em 9 de agosto de 2012; aceito em 3 de setembro de 2012

### PALAVRAS-CHAVE

Atividade antimicrobiana;  
Cloreto de benzetônio;  
Cetamina;  
Cetofol;  
Propofol

### Resumo

**Experiência e objetivos:** Cetamina e propofol são os anestésicos gerais que também exibem efeitos antimicrobianos e promotores do crescimento microbiano, respectivamente. Embora esses agentes sejam frequentemente aplicados em combinação durante o uso clínico, não há dados sobre seu efeito total no crescimento microbiano na administração combinada. Nesse estudo, investigamos o crescimento de alguns microrganismos em uma mistura de cetamina e propofol.

**Método:** Nesse estudo, utilizamos cepas padronizadas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Realizamos uma análise de tempo-crescimento para avaliar as taxas de crescimento microbiano em propofol 1%. A atividade antimicrobiana de cetamina, isoladamente e em propofol, foi estudada pelo método de microdiluição.

**Resultados:** Em propofol, as cepas estudadas cresceram de concentrações de  $10^3$ - $10^4$  ufc/mL para  $\geq 10^5$  ufc/mL, dentro de 8-16 horas, dependendo do tipo de microrganismo. Foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) (para *Candida*, concentração fungicida mínima) de cetamina, como se segue (CIM, CBM): *E. coli* 312,5, 312,5  $\mu$ g/mL; *S. aureus* 19,5, 156  $\mu$ g/mL; *P. aeruginosa* 312,5, 625  $\mu$ g/mL; e *C. albicans* 156, 156  $\mu$ g/mL. Na mistura cetamina + propofol, cetamina exibiu atividade antimicrobiana para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* em CBMs a 1250, 625 e 625  $\mu$ g/mL, respectivamente. O crescimento de *S. aureus* não foi inibido nessa mistura (concentração de cetamina = 1250  $\mu$ g/mL).

**Conclusão:** Cetamina preservou sua atividade antimicrobiana de maneira dose-dependente contra alguns microrganismos em propofol, que é robusta solução promotora de crescimento microbiano. O uso combinado de cetamina e propofol na aplicação clínica de rotina pode diminuir o risco de infecção causada por contaminação acidental. Entretanto, deve-se ter em mente que cetamina não pode reduzir todas as ameaças patogênicas na mistura com propofol.

© 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

☆Estudo realizado na Faculdade de Medicina, Universidade Inonu, Malatya, Turquia.

\* Autor para correspondência.

E-mail: drmalierdogan@gmail.com (M.A. Erdogan).

## Introdução

Propofol é agente sedativo-hipnótico de amplo uso; é administrado na indução e manutenção da anestesia. Propofol é considerado como bom agente promotor do crescimento microbiano, devido a seu rico conteúdo nutricional, por exemplo, óleo de soja, glicerol e lecitina de ovo.<sup>1,2</sup> Em consequência, têm sido descritas infecções graves em pacientes após uso de propofol contaminado.<sup>3,4</sup>

Cetamina é um anestésico geral com efeito antagônico nos receptores de n-metil d-aspartato. Esse agente se caracteriza pelo rápido início das suas ações: analgesia, anestesia, elevação da pressão arterial e dilatação nas vias aéreas inferiores. Considerando seus efeitos favoráveis no sistema cardiovascular e pulmonar, cetamina pode ser particularmente importante para indução da anestesia em um paciente hipovolêmico.<sup>5,6</sup> Além disso, alguns estudos documentaram a atividade antimicrobiana de cetamina.<sup>7,8</sup>

Foi demonstrado que a combinação de cetamina e propofol (cetofol) é farmacologicamente compatível, quando aplicada na mesma seringa. Vários estudos informaram que cetofol tem atividade reguladora positiva nos parâmetros hemodinâmicos em voluntários humanos.<sup>9-11</sup> Com respeito ao grande efeito promotor do crescimento microbiano do propofol e da atividade antimicrobiana da cetamina, foi considerada como válida a investigação do efeito total de sua combinação no crescimento de algumas bactérias e fungos. Portanto, realizamos um estudo *in vitro* para determinar o efeito da mistura desses agentes (i.e., cetofol) em alguns microrganismos clinicamente importantes, que constituem os patógenos significativos das infecções hospitalares no mundo.

## Materiais e métodos

### Agentes farmacológicos e microrganismos

No presente estudo, usamos cetamina (Ketalar® 50 mg/mL, Pfizer), e propofol 1% (Propofol® 1%, Fresenius). As misturas dos agentes foram preparadas em condições assépticas.

Nesse estudo, utilizamos as seguintes cepas padronizadas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) (RSHM/Turquia), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) (Oxoid/Grã-Bretanha), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Oxoid/Grã-Bretanha) e *Candida albicans* (ATCC 14053) (Oxoid/Grã-Bretanha).

### Atividade promotora do crescimento microbiano de propofol

Estudamos as taxas de crescimento dos microrganismos testados em análises de tempo-crescimento. Resumidamente, selecionamos colônias bacterianas e fúngicas crescidas em placas de ágar nutriente e suspendidas em salina fisiológica 0,9% estéril na densidade 0,5 de McFarland. Essas suspensões foram ressuspendidas em propofol para ajuste da concentração final dos microrganismos para  $1-2 \times 10^4$  bactérias por mL e  $4-5 \times 10^3$  fungos por mL. Incubamos essas suspensões a 35°C durante 24 horas. Em períodos de 2 horas,

foram feitas subculturas para meios de ágar nutriente entre 0 e 24 horas. Fizemos a leitura visual do número de unidades formadoras de colônia (ufc/mL) crescidas nas placas, por apenas um investigador.

### Atividade antimicrobiana de cetamina

Investigamos o impacto da cetamina, isoladamente e na mistura com propofol, nas velocidades de crescimento microbiano de cada microrganismo com o método de microdiluição, em conformidade com as normas publicadas para testes de sensibilidade antimicrobiana pelo Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>12,13</sup> (CLSI) e de acordo com o estudo previamente publicado por Gocmen et al.<sup>7</sup> Adotamos a concentração de cetamina que estava associada com inibição de 100% do crescimento de fungos como o valor de CIM para *C. albicans*.

### Atividade antimicrobiana de cetamina nos testes de rotina

Resumidamente, diluímos seriadamente cetamina em placas de cultura estéreis de poliestireno com 96 poços. Em seguida, preparamos suspensões bacterianas e fúngicas em salina fisiológica 0,9% estéril na densidade 0,5 de McFarland. Ressuspendemos essas suspensões em seus caldos de rotina. Distribuímos um volume de 100 µL de inóculos em cada poço. As concentrações finais de cetamina variaram de 1250 até  $1,22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  nos poços contendo  $2,5-5 \times 10^4$  ufc·mL<sup>-1</sup> inóculos de bactérias, ou  $1-5 \times 10^3$  ufc·mL<sup>-1</sup> inóculos de *Candida*. Depois de incubar durante 24 h a 35°C, determinamos as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) por leitura visual. Para a cepa de *Candida*, adotamos a inibição de 100% como o valor para CIM com respeito ao controle dos inóculos isentos de fármaco. Determinamos as concentrações bactericidas mínimas (CBMs) (para *Candida*, concentração fungicida mínima); para tanto fizemos subculturas dos poços exibindo inibição de crescimento bacteriano ou fúngico visível para os meios de ágar nutriente apropriados. Adotamos como CBM a concentração dos agentes no poço que tivesse causado inibição de 99,9% da cepa testada. Preparamos culturas de controle para os microrganismos, caldo e solução dos agentes farmacológicos.

### Atividade antimicrobiana de cetamina em propofol

Fizemos diluição seriada de cetamina em solução de propofol em placas estéreis de poliestireno com 96 poços. As suspensões bacterianas e fúngicas preparadas em salina fisiológica 0,9% estéril na densidade 0,5 de McFarland foram ressuspendidas em propofol e distribuídas em cada poço em alíquotas iguais. As concentrações finais de cetamina variaram de 1250 até  $1,22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  nos poços contendo  $2,5-5 \times 10^4$  ufc·mL<sup>-1</sup> inóculos de bactérias, ou  $1-5 \times 10^3$  ufc·mL<sup>-1</sup> inóculos de *Candida*. Depois da incubação durante 24 h a 35°C, determinamos CBMs fazendo subculturas dos poços nos meios ágar apropriados, conforme foi descrito acima. Fizemos culturas de controle para microrganismos, propofol e solução dos agentes farmacológicos.

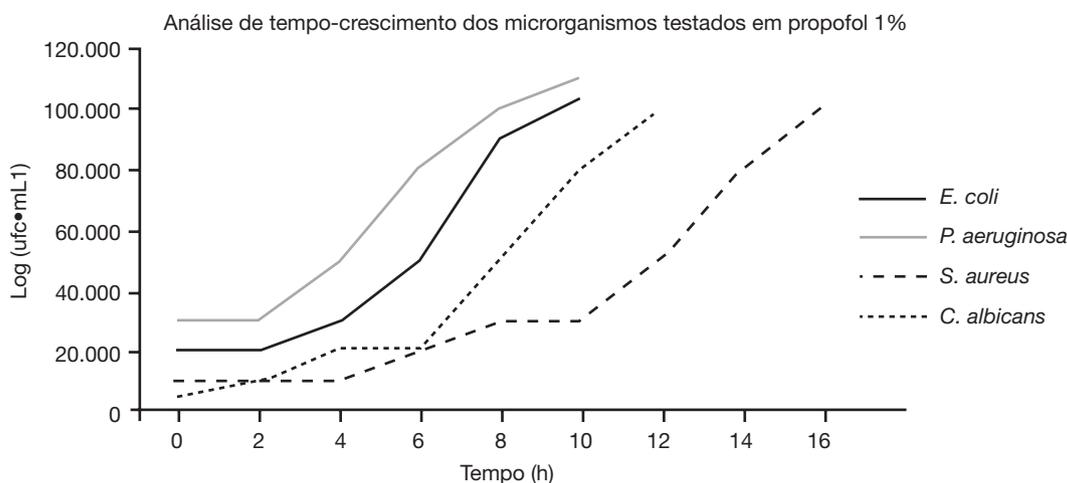


Figura 1 Taxas de crescimento dos microrganismos na solução de propofol 1% em períodos de 2 h.

Tabela 1 Valores para concentração inibitória mínima (CIMs) e concentração bactericida mínima (CBMs) de cetamina (isoladamente) e na mistura com propofol para os microrganismos estudados

Microrganismos	Cetamina		Cetamina + propofol
	CIMs ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	CBMs ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	CBMs ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<i>E. coli</i>	312,5	312,5	1.250
<i>S. aureus</i>	19,5	156	> 1.250
<i>P. aeruginosa</i>	312,5	625	625
<i>C. albicans</i>	156	156	625 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Concentração fungicida mínima

## Resultados

### Crescimento microbiano em propofol 1%

A figura 1 ilustra as velocidades de crescimento das cepas testadas em suspensão de propofol 1%. Nas primeiras 2 horas da incubação, não detectamos crescimento significativo de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, em comparação com o tempo zero. Mas a concentração de *C. albicans* duplicou (de  $5 \times 10^3$  ufc•mL<sup>-1</sup> para  $1 \times 10^4$  ufc•mL<sup>-1</sup>) no mesmo intervalo de tempo. *E. coli* e *P. aeruginosa* chegaram a uma concentração  $\geq 1 \times 10^5$  ufc•mL<sup>-1</sup> na 10<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> hora de incubação; *C. albicans* na 14<sup>a</sup> hora e *S. aureus* na 16<sup>a</sup> hora.

### Atividade antimicrobiana de cetamina nos testes de rotina e na mistura com propofol

Cetamina demonstrou efeito antimicrobiano *in vitro* contra todas as cepas testadas em testes de sensibilidade antimicrobiana de rotina. Determinamos a CIM mais baixa de cetamina para *S. aureus*:  $19,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; e medimos a CIM mais elevada para *E. coli* e *P. aeruginosa*:  $312,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Com relação às CBMs de cetamina, detectamos o valor mais baixo para *S. aureus* e *C. albicans*:  $156 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e determinamos o valor mais elevado para *P. aeruginosa*:  $625 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Na mistura com propofol, foram medidas as CBMs de cetamina para *P. aeruginosa* e *C. albicans*:  $625 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e para *E. coli*,  $1,250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Não nos foi possível determinar a CBM de *S. aureus* (CBM >  $1,250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), por não ter ocorrido inibição.

A tabela 1 ilustra os valores medidos das CIMs e CBMs de cetamina para cada microrganismo.

## Discussão

Nesse estudo, determinamos que propofol foi uma forte solução promotora de crescimento microbiano, não só para bactérias mas também para fungos. Considerando os tipos dos microrganismos, os gram-negativos *P. aeruginosa* e *E. coli* demonstraram o mais rápido índice de crescimento, chegando a uma concentração de  $1 \times 10^5$  ufc•mL<sup>-1</sup> dentro de 8 e 10 horas, respectivamente, enquanto que *C. albicans* alcançou essa concentração na 14<sup>a</sup> hora. Por outro lado, *S. aureus* teve a mais lenta velocidade relativa de crescimento entre todas as cepas testadas (fig. 1).

Cetamina é um agente principalmente utilizado para indução e manutenção de anestesia geral. É medicamento importantíssima, categorizada na Lista de Agentes Farmacológicos Essenciais” da Organização Mundial da

Saúde.<sup>14</sup> Cetamina exerce muitos efeitos em humanos, inclusive analgesia, anestesia, alucinações, elevação da pressão arterial e broncodilatação. Em 2008, Gocmen et al.<sup>7</sup> publicaram estudo *in vitro* informando que cetamina tinha atividade antimicrobiana contra alguns estreptococos, estafilococos, *E. coli* e *P. aeruginosa*, em concentrações entre 500-2.000 µg•mL<sup>-1</sup>. Diante do fato que o nível sanguíneo anestésico da cetamina era de aproximadamente 2 µg•mL<sup>-1</sup>, esses autores afirmaram não ter sido possível observar essa atividade antibacteriana em humanos durante a anestesia.

Observamos que cetamina tinha atividade antibacteriana e antifúngica potencial nas cepas testadas. Com relação aos tipos de microrganismos, constatamos que *P. aeruginosa* e *E. coli* são mais resistentes; e *S. aureus* foi o mais sensível à cetamina. Detectamos que, em comparação com os microrganismos gram-negativos, *S. aureus* tinha valores de CIM 5 logs mais baixos e valores de CBM 2 logs mais baixos. Por outro lado, em nosso experimento os valores de CIM e CBM de cetamina para *C. albicans* foram iguais.

No presente estudo, investigamos a atividade antimicrobiana de cetamina em mistura com propofol. Essa mistura tem sido utilizada com êxito em diferentes situações clínicas, como: cuidados anestésicos monitorados, terapia eletroconvulsiva, sedação para procedimento e analgesia em pacientes de emergência.<sup>9-11,15</sup> Nessa mistura (cetofol), observamos que cetamina conservou suas atividades antibacterianas e antifúngicas em CBMs mais altas. Em nosso estudo, não foi possível medir CIMs de cetamina em propofol, devido ao fato de ter-se formado uma solução turva nas microplacas em seguida à inclusão de propofol; isso não nos permitiu uma clara avaliação visual. Assim, detectamos apenas CBMs de cetamina em cetofol. Com relação às cepas testadas, observamos um aumento do dobro nos valores de CBM de cetofol para *E. coli* e *C. albicans*. Contudo, não foi determinada uma CBM exata de cetofol para *S. aureus*, devido ao fato que seu valor estava situado acima do limite de detecção do teste. Curiosamente, a CBM dessa mistura não mudou, em comparação com a avaliação da cetamina isolada, tendo permanecido estável para *P. aeruginosa* em 625 µg•mL<sup>-1</sup>.

Infecção é preocupação considerável durante o uso clínico de propofol. Particularmente por causa de sua base lipídica, esse agente proporciona um meio preferencial para muitas classes de microrganismos. Portanto, poderão ocorrer infecções pós-operatórias nosocomiais, que representam pesado ônus em termos de morbidade e mortalidade, com graves consequências econômicas por causa da contaminação do propofol.<sup>16</sup> Mueller et al.<sup>4</sup> relataram um surto de sepse causado por microrganismos gram-negativos, inclusive *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*, em sete pacientes, devido ao uso de propofol contaminado em pequenos procedimentos cirúrgicos. Já Henry et al.<sup>17</sup> descreveram bacteremia e infecções de feridas pós-operatórias causadas por *S. marcescens*, em seguida ao uso de propofol no Canadá. Ademais, Bennett et al.<sup>18</sup> descreveram infecções relacionadas ao uso de propofol, inclusive infecções na corrente sanguínea, infecção no local cirúrgico e episódios febris agudos em 62 casos, em seguida a procedimentos cirúrgicos em sete hospitais norte-americanos. Esses autores identificaram *S. aureus*, *C. albicans* e bac-

térias gram-negativas como *Moraxella*, *Enterobacter* e *Serratia* spp. como responsáveis por essas infecções. Em todos esses estudos, os autores enfatizaram que a contaminação extrínseca de propofol, como resultado de lapsos na preparação asséptica e na manipulação e armazenamento desse agente farmacológico, causou essas infecções com risco para a vida dos pacientes.

O Center of Disease Control and Prevention sugeriu práticas seguras para medicação, como evitar o uso de seringas em vários pacientes e também evitar frascos para medicação individual para vários pacientes; também sugeriu a rígida aderência às técnicas assépticas e às práticas de controle das infecções durante a aplicação de propofol.<sup>19</sup> Além disso, para que haja redução na incidência de infecções pós-operatórias relacionadas ao uso de propofol, têm sido fabricadas emulsões antimicrobianas contendo preservativos (i.e., EDTA ou metabissulfito de sódio) em conformidade com discussões mantidas com a Food and Drug Administration Agency (FDA). Atualmente, essas formulações são utilizadas nos Estados Unidos; não obstante, soluções de propofol sem preservativo ainda estão sendo comercializadas na Europa e em outras partes do mundo. Nos Estados Unidos, Jansson et al.<sup>16</sup> informaram uma redução na incidência de infecções relacionadas ao uso de propofol, de 39 para 9 infecções por ano, em seguida à implementação de propofol contendo EDTA em 1996. Contudo, visto que o problema com o uso de propofol ainda persiste, apesar da inclusão do preservativo, esses autores salientaram que a adição do EDTA é apenas uma precaução de segurança adicional. Assim, em qualquer situação o médico deve recorrer às boas práticas de assepsia durante a medicação com propofol. Em nosso estudo, testamos uma emulsão de propofol livre de preservativo, que também era usada em nosso hospital. Embora propofol com adição de antimicrobianos também esteja sendo comercializada em nosso país, as formas livres de preservativos são amplamente preferidas, possivelmente por razões econômicas.

Propofol e cetamina são misturados (como produto não licenciado) na proporção volumétrica de 1:1 antes da aplicação clínica; essa mistura contém 5 mg•mL<sup>-1</sup> de cetamina.

Em seu estudo, Gocmen et al.<sup>7</sup> informaram que os níveis sanguíneos de cetamina eram demasiadamente baixos para que exibissem qualquer efeito antimicrobiano no corpo; em vista disso, decidimos investigar se essa substância poderia impedir o crescimento microbiano em combinação com propofol. No presente estudo, observamos que as CBMs de cetamina na mistura de cetofol se situavam entre 625 e 1.250 µg•mL<sup>-1</sup> (> 1.250 µg•mL<sup>-1</sup> para *S. aureus*). Portanto, acreditamos que cetamina pode ter utilidade na redução do crescimento de alguns patógenos bacterianos e fúngicos no propofol antes da aplicação.

Nesse estudo, constatamos que, em particular, bactérias gram-negativas cresciam rapidamente numa solução de propofol. Esses resultados são curiosamente similares aos dados previamente publicados nos estudos de surtos infecciosos.<sup>3,4,17,18</sup> Acreditamos que esse fomento seletivo do propofol para os microrganismos gram-negativos poderia explicar porque essas bactérias podem ser os principais patógenos dos surtos nosocomiais relacionados ao uso de propofol.

Ainda em nosso estudo, demonstramos que a inclusão de cetamina em propofol pode reduzir o crescimento bacteriano e fúngico nessa solução e, em consequência, proporciona uma medicação anestésica segura para abordagens cirúrgicas. Contudo, a atividade de cetamina pode variar, dependendo do tipo de microrganismo. Assim, independentemente dessa proteção, enfatizamos que devem ser cumpridas medidas higiênicas rígidas em qualquer ocasião de uso do propofol, de acordo com as recomendações das autoridades.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. White PF, Romero G. Nonopioid intravenous anesthesia. In Clinical anesthesia. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p. 334-52.
2. Crowther J, Hrazdil J, Jolly DT, et al. Growth of microorganisms in propofol, thiopental, and a 1:1 mixture of propofol and thiopental. *Anesth Analg*. 1996;82:475-8.
3. Abdelmalak BB, Bashour CA, Yared JP. Skin infection and necrosis after subcutaneous infiltration of propofol in the intensive care unit. *Can J Anaesth*. 2008;55:471-3.
4. Muller AE, Huisman I, Roos PJ, et al. Outbreak of severe sepsis due to contaminated propofol: lessons to learn. *J Hosp Infect*. 2010;76:225-30.
5. Miller AC, Jamin CT, Elamin EM. Continuous intravenous infusion of ketamine for maintenance sedation. *Minerva Anesthesiol*. 2011;77:812-20.
6. Persson J. Wherefore ketamine? *Curr Opin Anaesthesiol*. 2010;23:455-60.
7. Gocmen S, Buyukkocak U, Caglayan O. In vitro investigation of the antibacterial effect of ketamine. *Upsala J Med Sci*. 2008;113:39-46.
8. Kruszewska H, Zareba T, Tyski S. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol Pharm*. 2002;59:436-9.
9. Andolfatto G, Willman E. A prospective case series of single-syringe ketamine-propofol (ketofol) for emergency department procedural sedation and analgesia in adults. *Acad Emerg Med*. 2011;18:237-45.
10. Rapeport DA, Martyr JW, Wang LP. The use of "ketofol" (ketamine-propofol admixture) infusion in conjunction with regional anaesthesia. *Anaesth Intensive Care*. 2009;37:121-3.
11. Weatherall A, Venclovas R. Experience with a propofol-ketamine mixture for sedation during pediatric orthopedic surgery. *Paediatr Anaesth*. 2010;20:1009-16.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: 2009.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 3rd ed. approved standard M27-A3. Wayne, PA: 2008.
14. World Health Organization. WHO Model List of Essential Medicines. 17th List. 2011. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf)
15. Erdogan Kayhan G, Yucel A, Colak YZ, et al. Ketofol (mixture of ketamine and propofol) administration in electroconvulsive therapy. *Anaesth Intensive Care*. 2012;40:305-10.
16. Jansson JR, Fukada T, Ozaki M. Propofol EDTA and reduced incidence of infection. *Anaesth Intensive Care*. 2006;34:362-8.
17. Henry B, Plante-Jenkins C, Ostrowska K. An outbreak of *Serratia marcescens* associated with the anesthetic agent propofol. *Am J Infect Control*. 2001;29:312-5.
18. Bennett SN, McNeil MM, Bland LA, et al. Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. *N Engl J Med*. 1995;20:147-54.
19. King CA, Ogg M. Safe injection practices for administration of propofol. *AORN J*. 2012;95:365-72.