

BRIEF REPORT

Investigation of Contamination of Wild Rats (*Rattus rattus*) from Tehran City to Antibiotic Resistant Enterobacteriaceae in 2009

Shahin Najar Peerayeh¹, Neda Soleimani¹, Javid Sadrai², Safoura Derakhshan¹

¹ Department of Bacteriology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Parasitology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received May 11, 2010 ; Accepted October 24, 2010)

Abstract

Background and purpose: Wild rats are considered as an important spreading factor of contamination in urban areas. During recent years, the wild rats were extensively distributed in Tehran. Therefore, it is important to investigate the antibiotic resistance of enteric bacteria isolated from rats, because of the possibility of antibiotic resistance transmission to human. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance rate of Enterobacteriaceae among wild rats living in densely populated areas of Tehran city.

Materials and methods: Forty wild rats were trapped in the North, South, East, West and Central areas of Tehran and transferred to the laboratory alive. Cecum was obtained and its contents were cultured aseptically. Antibiotic susceptibility of isolated was determined by disk diffusion method.

Results: Escherichia coli (10 isolates), Salmonella typhimurium (7 isolates), Shigella sonnei (1 isolate), Proteus mirabilis (3 isolates), Citrobacter freundii (17 isolates), and Enterobacter (4 isolates) were isolated from rats. Antibiotic resistance was very high in all isolated species of Enterobacteriaceae.

Conclusion: The results showed that the rats from the study areas of Tehran city harbored antibiotic resistant pathogenic bacteria such as Salmonella and Shigella in their cecal contents. These organisms may be important reservoirs for transmission of drug-resistant bacteria to human. Therefore, it is very important to control the rat populations and to improve sewage management systems.

Key words: Drug resistance, enterobacteriaceae, rat

J Mazand Univ Med Sci 2010; 20(78): 70-75 (Persian)

بررسی میزان آلودگی رت های وحشی شهر تهران به باکتری های انتروباکتریاسه مقاوم به آنتی بیوپتیک در سال ۱۳۸۸

شهین نجار پیرایه^۱ صفورا درخشان^۱ جاوید صدرایی^۲ ندا سلیمانی^۱

چکیده

سابقه و هدف: رت های وحشی به عنوان یک عامل مهم انتشار آلودگی در نواحی شهری مورد توجه هستند. در سال های اخیر، رت های وحشی در تهران به طور وسیعی پراکنده شده اند. بنابراین، بررسی مقاومت آنتی بیوپتیکی باکتری های روده ای جدا شده از رت ها به علت احتمال انتقال مقاومت آنتی بیوپتیکی به انسان اهمیت دارد. هدف این تحقیق، بررسی میزان مقاومت آنتی بیوپتیکی باکتری های خانواده انتروباکتریاسه جدا شده از مدفعه رت های وحشی بود که در نقاط پر جمعیت شهر تهران زندگی می کنند.

مواد و روش ها: چهل رت وحشی (*Rattus rattus*) از مناطق شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز تهران به دام انداخته شده و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. سکوم حاوی مدفعه در شرایط استریل خارج و محتویات آن کشت شد. سپس حساسیت آنتی بیوپتیکی سویه های جدا شده با روش انتشار از دیسک تعیین شد.

یافته ها: اشریشیا کلی (۱۰ ایزوله)، سالمونلا تیفی موریوم (۷ ایزوله)، شیگلا سونثی (۱ ایزوله)، پروتئوس میرابیلیس (۳ ایزوله)، سیتروباکتر فروندي (۱۷ ایزوله) و انتروباکتر (۴ ایزوله) از رت ها جدا شدند. مقاومت آنتی بیوپتیکی در تمام گونه های جدا شده انتروباکتریاسه بسیار بالا بود.

استنتاج: نتایج نشان داد که رت های بدست آمده از نواحی مورد مطالعه شهر تهران، حامل باکتری های بیماری زای مقاوم به آنتی بیوپتیک نظیر سالمونلا و شیگلا در سکوم خود می باشند. این موجودات ممکن است مخازن مهمی برای انتقال باکتری های مقاوم به دارو به انسان باشند. بنابراین کنترل جمعیت رت ها و مدیریت بهتر سیستم های فاضلاب اهمیت زیادی دارد.

واژه های کلیدی: مقاومت دارویی، انتروباکتریاسه، رت

مقدمه

می شوند (۲). رفت و آمد این موجودات به محیط های حاوی مواد غذایی اینار شده باعث آلوده شدن غذا با میکروب های روی پوست آن ها شده یا میکروب هایی که از طریق ادرار کردن و تخلیه مدفعه به محیط های مرتبط با انسان وارد می کنند. بنابراین این محیط ها یک

جوندگان نزدیک به ۴۰ درصد تنوع پستانداران جهان را تشکیل داده و برخی از گونه های آن ها نزدیک به انسان ها زندگی می کنند (۱). رت ها، مخزن باکتری های مختلف بیماریزا در انسان و سایر گونه های حیوانی بوده و باعث آلودگی غذاهای ذخیره شده در انبارها

E-mail: najarp_s@modares.ac.ir

ک

مؤلف مسئول: شهین نجار پیرایه - تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی

۱. گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

۲. گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱ تاریخ تصویب: ۸۹/۸/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۹/۷/۱

زنده به ساختمان انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی
دانشگاه تربیت مدرس تهران منتقل شدند.

در آزمایشگاه، رت‌ها با اتر بیهوده شدند. سپس
ناحیه پوست شکمی آنها با الكل ۷۰ درجه ضد عفونی
شده و سکوم در شرایط استریل خارج و به پلیت‌های
استریل منتقل شد. از نمونه‌های سکوم حاوی مدفوع،
یک سواب نمونه گیری شده و به لوله حاوی محیط
غذی کننده سلنت F (ساخت شرکت Biolife از ایتالیا)
منتقل گردید. یک سواب نیز به طور مستقیم به
محیط‌های افتراقی مک کانکی آگار، سالمونلا-شیگلا
آگار و ائوزین-متیلن بلوا آگار (ساخت شرکت Biolife
از ایتالیا) منتقل و به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در دمای
۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس از محیط
سلنت F تلچیق شده، در محیط‌های مک کانکی آگار،
سالمونلا-شیگلا آگار و ائوزین-متیلن بلوا آگار کشت
ثانویه داده شد. محیط‌ها به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در
دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس
از گرمخانه گذاری، شکل کلنی‌ها و تفاوت کلنی‌ها در
ظاهر (رنگ و اندازه) بررسی شده و از نمونه‌های
مخلوط برای بدست آوردن کشت خالص، یک کشت
ثانویه دیگر داده شد.

شناسایی باکتری‌های عضو خانواده انتروباکتریا به
توسط تست‌های اکسیداز، تخمیر قند، احیای نیترات و
بررسی میکروسکوپی انجام گرفت. تمام ایزووله‌های
شناسایی شده به عنوان گرم منفی، اکسیداز منفی،
تخمیر کننده قند و احیا کننده نیترات به نیتریت به عنوان
اعضای خانواده انتروباکتریا به نظر گرفته شده (۱۲) و
با استفاده از تست‌های افتراقی تخمیر سیترات، حرکت،
اندول، تولید گاز، تخمیر لاکتوز، متیل رد، وژ-
پروسکوئر و تولید SH_2 گونه‌های انتروباکتریا به
شناسایی و ایزووله‌ها داخل گونه قرار گرفتند (۱۳).

حساسیت ایزووله‌های باکتریایی جدا شده به
هفت آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش انتشار دیسک
CLSI 2006 (Disk diffusion assay) بر طبق استاندارد

منبع عفونت بوده و ممکن است با تماس مستقیم یا
تماس با محصولات غذایی آلوده این عفونت‌ها به انسان
منتقل شود (۳). برخی باکتری‌های جدا شده از رت‌ها
مانند یرسینیا پستیس، استرپتوباسیلوس مونیلیفرمیس و
سالمونولا تیفی موریوم عامل طاعون، تب هاوهیل و
سالمونلوز می‌باشند (۴، ۵). سایر باکتری‌ها مانند
اشریشیا کلی و یرسینیا انتروکولی تیکانیز عامل
گاستروانتریت در انسان‌ها می‌باشند (۶-۸). خانواده
انتروباکتریا به مانند گونه‌های پروفتوس و کلبیلا در رت‌ها
و سویه‌هایی که بر اثر استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها
به عوامل ضد میکروبی مختلف بسیار مقاوم هستند نیز
می‌توانند تهدیدی برای سلامت انسان و حیوان باشند (۹).

در سال‌های اخیر، رت‌های وحشی به طور وسیعی
در شهر تهران پراکنده شده‌اند. با توجه به اینکه این
 موجودات می‌توانند مخزن سویه‌های بیماریزا و مقاوم
بوده و در جایه جایی سویه‌های مقاوم در محیط‌های
 مختلف بویژه در نواحی شهری نقش مهمی داشته
باشند (۱۰، ۱۱)، تهدید جدی برای سلامت عمومی هستند.
بنابراین بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا
شده از رت‌های به دام اندخته شده از نقاط پرجمعیت
تهران به دلیل احتمال انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به
انسان از اهمیت خاص خود برخوردار است. هدف این
تحقیق، بررسی میزان آلودگی رت‌های وحشی بدست آمده
از نقاط پرجمعیت شهر تهران به انتروباکتریا به
بیماریزا در انسان و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی
باکتری‌های جدا شده از آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی ۴۰ رت سیاه
(*Rattus rattus*) به روش تله گذاری در پنج منطقه
جغرافیایی شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز شهر
تهران جمع‌آوری شدند (این تعداد رت در فاصله زمانی
۴ ماه از این نقاط جمع‌آوری شدند). رتها به صورت

یک آناتی بیوتیک (شیگلا سونئی به اریترومایسین) و یا چند آناتی بیوتیک نشان دادند که سویه های سالمونلا تیفی موریوم مقاومتین (مقاومت به ۶ آناتی بیوتیک) و سپس سیتروباکتر فروندی (مقاومت به ۵ آناتی بیوتیک) و سرانجام اشريشیاکلی (مقاومت به ۴ آناتی بیوتیک) قرار داشتند. پنج سویه اشريشیاکلی به طور همزمان به جنتامیسین، نالیدیکسیک اسید، سفتازیدیم و تری متواپریم- سولفامتوکسازول مقاومت نشان دادند. همچنین، ۱۲ سویه از ۱۷ سویه سیتروباکتر فروندی به طور همزمان مقاوم به نالیدیکسیک اسید و سفتازیدیم بودند. حساس ترین آناتی بیوتیک به کار رفته در این بررسی اریترومایسین بود (فقط ۸ ایزووله از ۴۲ ایزووله مقاوم بودند) و مقاوم ترین آناتی بیوتیک، نالیدیکسیک اسید تعیین شد (۲۰ ایزووله از ۴۲ ایزووله مقاوم بودند). نتایج این بررسی پیشنهاد می کند که رت ها حامل باکتری هایی هستند که برای انسان ها بیماریزا و یا بالقوه بیماریزا هستند. جداسازی باکتری های بیماریزا مانند

جدول شماره ۱: باکتری های عضو خانواده انترووباکتریاسه جدا شده از سکوم رت های به دام افتاده در شهر تهران، ایران

تعداد	باکتری جدا شده
۱۰	اشريشیاکلی
۷	سالمونلا تیفی موریوم
۴	گونه های انتروباکتر
۱۷	سیتروباکتر فروندی
۱	شیگلا سونئی
۳	پروتوس میراپلیس
۴۲	جمع کل

جدول شماره ۲: تعداد رت های دارای باکتری به صورت مخلوط و نوع باکتری شناسایی شده آن ها

تعداد رت ها	گونه باکتری های جدا شده
۲	سالمونلا تیفی موریوم- گونه های انتروباکتر
۲	سالمونلا تیفی موریوم- سیتروباکتر فروندی
۴	سیتروباکتر فروندی- اشريشیاکلی
۱	گونه های انتروباکتر- سیتروباکتر فروندی- اشريشیاکلی
۳	سالمونلا تیفی موریوم- سیتروباکتر فروندی- اشريشیاکلی
۲	اشريشیاکلی- پروتوس میراپلیس

(Clinical and Laboratory Standard Institute) بررسی شد(۱۴). پلیت های حاوی محیط مولرهیتalon آگار (ساخت شرکت Merck از آلمان) با هر یک از ایزووله های باکتریایی مورد آزمایش تلقیح شده و هفت دیسک آناتی بیوتیکی بر روی سطح آگار قرار گرفتند. دیسک های آناتی بیوتیکی شامل: اریترومایسین (۱۵ میکرو گرم)، جنتامیسین (۱۰ میکرو گرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکرو گرم)، آزترونام (۱۵ میکرو گرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکرو گرم)، سفپیم (۳۰ میکرو گرم) و تری متواپریم- سولفامتوکسازول (۲۵ میکرو گرم) (ساخت شرکت Mast از انگلستان) بود. این آناتی بیوتیک ها به علت استفاده فراوان از آن ها در پژوهشی انتخاب شدند. یک پلیت جداگانه با اشريشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ تلقیح شده و برای کنترل رشد باکتریایی و پتنسی دیسک های آناتی بیوتیک استفاده شد. پلیت ها به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس هاله های مهاری آنها بر حسب میلی متر اندازه گیری و ثبت گردید.

یافته ها و بحث

به طور کلی ۴۲ ایزووله باکتریایی عضو خانواده انترووباکتریاسه از سکوم رت ها بدست آمد. سیتروباکتر فروندی بیشترین تعداد (۱۷ سویه) و پس از آن اشريشیاکلی (۱۰ سویه)، سالمونلا تیفی موریوم (۷ سویه) و انتروباکتر (۴ سویه) بیشترین تعداد را داشتند. میزان جداسازی سایر باکتری ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همچنین، از مجموع ۴۰ رت، ۱۴ رت به صورت مخلوط دارای باکتری های خانواده انترووباکتریاسه بودند (جدول شماره ۲). آزمایش انتشار از دیسک نشان داد که ایزووله های پروتوس میراپلیس و انتروباکتر مورد بررسی به تمام آناتی بیوتیک های آزمایش شده حساس بودند (جدول شماره ۳). سایر ایزووله های باکتریایی مقاومت هایی به

جدول شماره ۳: تعداد سویه‌های مقاوم انتروباکتریاسه جدا شده از رت‌ها به هر یک از آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده

آنتی بیوتیک	۱۰ (۱۰ ایزووله)	سالمونلا تیفی موریوم	انتروباکتر	پروتوس میرابیلیس	شیگلا سونئی	پروتوباکتر فرونودی	جمع کل
اربرومایسین	*	۷	-	-	۱	-	۸
جنتامیسین	** ۵	۷	-	-	-	-	۱۲
نالیدیکسیک اسید	(۲) ۵	۳	-	-	(۱) ۱۷	-	۲۰
آزترنونام	-	۳	-	-	۶	-	۹
سفنازیدین	(۲) ۵	۱	-	-	(۲) ۱۲	-	۱۸
سفپیم	-	۲	-	-	۷	-	۹
کوتربیماکسازول	(۲) ۵	-	-	-	۳	-	۸

* مقاومتی دیده نشد.

** مقاومت به صورت همزمان در هر گونه مورد بررسی دیده شد.

سویه‌هایی مانند کلبسیلا پنومونیه بسیار مقاوم که قبل استفاده از آنتی بیوتیک در رت‌ها موجود نبود، جای آنها را می‌گیرد (۱۸، ۵). این سویه‌های مقاوم انتروباکتریاسه ممکن است از طریق تماس با مدفوع یا آب یا غذای آلوده شده با مدفوع به انسان‌ها منتقل شود. مقاومت آنتی بیوتیکی به داروهایی مانند بتا-لакتام‌ها به صورت کروموزومی یا پلاسمیدی است (۲۰، ۱۹). فلور طبیعی، پلاسمیدهای مقاومت را از سویه‌های مقاوم خورده شده کسب می‌کند و ممکن است این پلاسمیدها به باکتری‌های بیماریزا منتقل شوند (۲۰).

نتایج بررسی حاضر می‌تواند رت‌ها را به عنوان یک منبع مهم باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک معرفی کند که ممکن است انسان‌ها و سایر حیوانات را عفونی کند. این مسئله تهدیدی برای سلامت عمومی است. با توجه به این که رت‌های مورد بررسی از نواحی پر جمعیت به دام انداخته شدن اهمیت این موضوع بیشتر می‌شود. بنابراین، نقش این جوندگان وحشی در شیوع باکتری‌های بسیار مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها باید به طور گسترده تحقیق شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسنده‌گان از شهرداری شهر تهران به علت همکاری در اجرای طرح تقدیر می‌نمایند.

اشریشاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و شیگلا سونئی از نظر بهداشت عمومی مهم است. اگرچه اشریشاکلی فلور طبیعی روده است ولی در ایجاد گاستروانتریت در کودکان و افراد دچار نقص اینمی نقش دارد (۱۵). سالمونلا تیفی موریوم عامل مهم سالمونلوز غیرتیفوئیدی بوده و از طریق آلودگی غذا و آب به انسان‌ها منتقل می‌شود (۵). شیگلا سونئی عامل مهم اسهال در کشورهای توسعه یافته می‌باشد (۱۶). گونه‌های انتروباکتر، سیتروباکتر فرونودی و پروتوس میرابیلیس بیماریزاهای فرصت طلب بوده و باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند (۱۷). رت‌ها می‌توانند با وارد شدن در سیستم فاضلاب بیمارستان‌ها، این بیماریزاهای فرصت طلب را کسب کرده و سپس با رفت و آمد در مناطق پر جمعیت شهری این سویه‌ها را به انسان‌ها منتقال دهند.

مسئله دیگر مقاومت آنتی بیوتیکی بالای باکتری‌های جدا شده به آنتی بیوتیک‌های مختلف مورد استفاده در انسان‌ها و در حیوانات می‌باشد. مقاومت به این عوامل ضد میکروبی می‌تواند ناشی از این حقیقت باشد که رت‌ها از طریق منابع مختلف در محیط مانند غذا، آب و سیستم فاضلاب با این عوامل ضد میکروبی در تماس بوده‌اند. محققان نشان داده‌اند که پس از تجویز مختصر مواد ضد میکروبی خوراکی به رت‌ها، فلور طبیعی انتروباکتریاسه از دستگاه گوارش آنها حذف شده و سپس باکتری‌هایی مانند گونه‌های مقاوم سالمونلا یا

References

1. Jittapalapong S, Herbreteau V, Hugot JP, Arreesrisom P, Karnchanabanthoeng A, Rerkamnuaychoke W, et al. Relationship of parasites and pathogens diversity to rodents in Thailand. *Kasetsart J (Nat Sci)* 2009; 43: 106-117.
2. Durham DP, Casman EA. Threshold conditions for bubonic plague persistence in urban rats. *Risk Anal* 2009; 29(12): 1655-1663.
3. Burriel AR, Kritis SK, Kontos V. Some microbiological aspects of rats captured alive at the port city of Piraeus, Greece. *Int J Environ Health Res* 2008; 18(2): 159-164.
4. Elliott SP. Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 13-22.
5. Swanson SJ, Snider C, Braden CR, Boxrud D, Wunschmann A, Rudroff JA, et al. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents. *N Engl J Med* 2007; 356(1): 21-28.
6. Sadycov R, Digel I, Artmann AT, Porst D, Linder P, Kayser P, et al. Oral lead exposure induces dysbacteriosis in rats. *J Occup Health* 2009; 51(1): 64-73.
7. Curfs JA, Meis JG, Van der Lee HL, Mulder J, Kraak WG, Hoogkamp-Korstanje JA. Persistent *Yersinia enterocolitica* infection in three rat strains. *Microb Pathog* 1995; 19(1): 57-63.
8. Le Moine V, Vannier P, Jestin A. Microbiological studies of wild rodents in farms as carriers of pig infectious agents. *Prev Vet Med* 1987; 4(5-6): 399-408.
9. Kolawole OM, Sunmonu TO. Effect of wastewater treated with methanolic bark extract of *Bridelia Ferruginea* benth on rat kidney and liver. *J Appl Sci Environ Sanit* 2010; 5 (1): 55-64.
10. Levy SB, Marshall B, Schluederberg S, Rowse D, Davis J. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32(12): 1801-1806.
11. Turkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health* 2009; 57(3): 197-203.
12. Farmer JJ, Farmer MK, Holmes B. The Enterobacteriaceae: general characteristics. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infections*. 10th ed, London: Hodder Arnold; 2005. PP 1317-1359.
13. Ardic M, Kav K, Guner A, Dogruer Y. Identification of Enterobacteriaceae in Urfa cheese. *Acta Aliment* 2007; 36(4): 483-488.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) publications. M2-A9 performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard, 9th ed. Stanford (CA): CLSI Publications, 2006.
15. Sooka A, du Plessis M, Keddy K. Enterovirulent *Escherichia coli*. *South Afr J Epidemiol Infect* 2004; 19(1): 23-33.
16. Barnoy S, Jeong KI, Helm RF, Suvarnapunya AE, Ranallo RT, Tzipori S, et al. Characterization of WRSs2 and WRSs3, new second-generation virG(icsA)-based *Shigella sonnei* vaccine candidates with the potential for reduced reactogenicity. *Vaccine* 2010; 28(6): 1642-1654.
17. Glupezynski Y, Huang TD, Berhin C, Claeys G, Delmee M, Ide L, et al. In vitro activity of

- temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(11): 777-783.
18. Hansen AK. Antibiotic treatment of nude rats and its impact on the aerobic bacterial flora. *Laborat Anim* 1995; 29: 37-44.
19. Miriagou V, Carattoli A, Fanning S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect* 2006; 8(7): 1923-1930.
20. Gakuya FM, Kyule MN, Gathura PB, Kariuki S. Antimicrobial susceptibility and plasmids from *Escherichia coli* isolated from rats. *East Afr Med J* 2001; 78(10): 518-522.

Archive of SID