

水环境中耐药菌的研究进展

Current Study of Antibiotic Resistance Bacteria in Aquatic Environment

常晓松¹/舒为群^{1,*}/曹佳²

(1. 第三军医大学军事预防医学院环境
卫生学教研室, 重庆 400038;

2. 第三军医大学军事预防医学院
卫生毒理学教研室, 重庆 400038)

CHANG Xiao-song¹, SHU Wei-qun^{1,*}, CAO Jia²

(1. Department of Environmental Hygiene, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; 2. Department of Hygienic Toxicology, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【摘要】临床和畜禽业抗生素的滥用导致微生物在选择性压力作用下获得并维持耐药性,并有可能通过质粒和整合子将耐药基因在相同或不同种属中广泛传播转移,最终导致多重耐药。耐药菌在多种水环境中均有检出,水环境作为耐药基因传播的媒介,其庞大的耐药基因库,将为进入环境中的致病菌及条件致病菌提供获得大量耐药基因的机会,一旦这些致病菌再次感染人体,引起爆发性流行,其治疗将非常困难。本文综述了目前国内外水环境中耐药菌的研究现状,耐药基因传播方式及其对人类的潜在危害。

【关键词】水环境;耐药菌;耐药基因传递

中图分类号: R123.1

标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)03-0206-03

【ABSTRACT】The abuses of antibiotics in medicine and livestock exposed to environmental bacteria lead to a large-scale dissemination of antibiotic-resistance bacteria in aquatic environment under selective pressure and the resistant organism could transfer resistance genes across the genus and species by plasmid and integron. Antibiotic resistance microbes are common in aquatic environment and the aquatic environment has become a major reservoir for antibiotic-resistant microbes. Infections caused by those resistant strains usually lead to a higher fatality rate than that observed with non-resistant one, especially among immunocompromised individual. This review describes recent research about current study of antibiotic resistant bacteria, the transfer of resistant gene and the hazardous to the human being.

【KEY WORDS】aquatic environment; antibiotic resistance bacteria; antibiotic resistance gene transfer

自1929年青霉素发现以来,抗生素的种类日益增多,并广泛应用于人类和畜禽微生物感染的预防和治疗,抗生素在发挥治病救人、促进动物植物生长等功能的同时,也被滥用和大剂量使用,其危害是使耐药菌群成为优势菌群,改变了自然微生态结构,水环境中耐药菌种类、数量、多重耐药率的不断增加可能对人类和动物的健康造成严重威胁^[1]。

发现制药厂污水中菌株的耐药率分别为:氨曲南 38.0%,头孢西丁 23.8%,氯霉素 18.6%,头孢噻肟 10.2%,四环素 8.4%,萘啶酸 6.8%。

水环境中微生物不仅对多类抗生素产生抗性,而且同一菌株对2种或2种以上抗生素抗性的比例也非常高。Messi^[8]在矿泉水中分离到的120株异养菌中,多重耐药率达到了55%,以假单胞菌属居多。Mudryk^[9]对波罗的海南岸水域分离到的异养菌的研究发现,大多数异养菌对3~8种抗生素都具有不同程度的抗性。Ash^[4]在美国河流中也检出具有对多种抗生素抗性的革兰阴性菌。Guardabassi等^[7]运用不动杆菌属作为环境耐药性的监测菌,对医院排放的污水和制药厂排放污水进行检测发现医院污水中单重耐药率为43.9%,多重耐药率为4.7%,Lin^[10]2001年2月至2002年1月期间在南非莫拉苏子河分离到的130株耐热大肠菌群中,94.7%对1类以上抗生素耐药,75.2%为多重耐药菌。

1 污染现状研究

通过前期的研究发现,耐药菌存在于各种各样的水体中,包括各种形式排放的污水、矿泉水、管网水、饮用水、海水^[2-5]。Mulamattathil等^[6]从密闭网组化水系分离的273株耐热大肠菌中,93%菌株对一种以上抗生素具有耐药性,对各受试抗生素的耐药率分别为:氨卡青霉素 83.5%,头孢菌素 75.5%,磺胺嘧啶 74.4%,链霉素 39.6%,四环素 33.8%。Guardabassi等^[7]通过研究

收稿日期: 2007-01-22; 修订日期: 2007-04-05

基金项目: 国家科技部西部引导项目(2003BA869C); 国家自然科学基金重点项目(30630056); 重庆市重大科技专项(CSTC2006AA7003)

作者简介: 常晓松(1978-)男,四川省乐山市人,硕士研究生,研究方向: 环境微生物学。

* Correspondence to: SHU Wei-qun, Tel: 023-68752294, E-mail: wqshu@mail.tmmu.com.cn

国内相关报道虽然较少,但情况同样非常严峻,刘小云^[2]对重庆市医院污水污染的地表水和农业流域地表水中分离得到 162 株耐热大肠菌,其中 98.1% 具多重耐药性,其耐药率分别为红霉素 99.4%,链霉素 85.2%,氧氟沙星 74.5%,环丙沙星 56.8%,诺氟沙星 56.2%,庆大霉素 47.5%,头孢他啶 42.0%,氨基青霉素 33.3%,丁胺卡那霉素 22.2%。与国外报道比较,国内水环境中耐药菌的单、多重耐药率均高于国外,应引起高度重视。

2 水环境中耐药基因传递机制

自然界中各种细菌广泛存在,相互联系;细菌具有多种在种内或种间进行自主转移或诱动转移的遗传因子如质粒、转座子、噬菌体等;质粒、转座子上还有募集和表达外源耐药基因的整合子;在水环境中,细菌的质粒、转座子、噬菌体等通过接合、转化及转导等方式,相互间交换所携带的一些基因^[11],可使菌群更好地适应环境。这是细菌在长期进化过程中所获得的生存本领。耐药基因最初可能起源于少数抗生素产生菌或细菌自身基因的随机突变。在抗生素广泛应用所形成的选择压力胁迫下,有机会通过菌间交换获得耐药基因的细菌生存、繁衍成为耐药亚群,在抗生素选择压力的持续胁迫下,交流、选择过程不断重复。

Akinbowale^[12]对澳大利亚各种水体中的耐药菌研究发现,在调查的 100 株革兰阴性菌中,74.4% 的多重耐药菌携带 1~10 个片段大小在 $(2 \sim 51) \times 10^3$ bp 的质粒。刘小云^[13]对重庆市多种水体所分离的耐药性耐热大肠菌进行质粒分析发现,质粒的携带率为 56.8%。质粒是发生接合作用传递耐药基因的基础,质粒在水环境中耐药菌尤其是多重耐药菌的高携带率为耐药基因的转移提供了物质基础。

Park^[14]认为持续的抗生素选择性压力对大肠杆菌整合子 I 耐药基因盒的保持起着重要作用,缺乏持续性选择性压力的水生环境常常造成大肠杆菌的整合子耐药基因盒的丢失及功能的丧失。Lin^[15]对密苏比河的调查发现,58% 的多重耐药菌拥有整合子 I,整合子包含的耐药基因中, β -内酰胺酶基因(pse)占 44%,氨基糖甙抗性基因 16%,同时包含磺胺抗性和季胺复合物抗性的基因占 24%。

3 水环境中的耐药菌主要来源

3.1 医院和制药厂污水排放 多种抗生素以原型排放入医院污水和制药厂污水,进入下水道,造成水环境中抗生素浓度的增加,在抗生素的持续选择性压力存在下,耐药菌在水环境中得以维持,该环境污水具备了细菌生长所需的营养物质,抗生素选择压力抑制敏感菌对营养物质竞争的同时,为耐药菌的生长提供了非常适宜的生长环境。前期有研究发现环丙沙星在医院污水排放环境中检出浓度在 $0.7 \sim 145.2 \mu\text{g}/\text{L}$ ^[16]。在德国的大型医院,医院污水排放环境中的氨基西林检出范围在 $20 \sim 80 \mu\text{g}/\text{L}$ ^[17]。医院污水中微生物 MICs(最低抑菌浓度)显著高于城市污水环境中微生物 MICs,提示医院污水中抗生素的浓度过高可能造成该环境中耐药菌的增多,抗生素敏感菌株数量的下降^[18]。

医院污水排放作为水环境中耐药菌的重要来源,另一个非常重要的原因就是临床耐药菌的直接排放,Lin^[10]通过比较临床分

离大肠杆菌株与医院污水排放环境分离株耐药谱发现两者具有良好的相关性($r = 0.97$),说明医院抗生素滥用造成的临床微生物耐药性对污水排放环境耐药性的分布可能有着直接的影响。刘小云等^[13]对受医院污水污染地表水样中分离出的 39 株菌进行耐药谱的研究发现,39 株菌对青霉素、链霉素和红霉素耐药率均为 100%,其中 26% (10 株) 对研究选用的 10 种抗生素都具有耐药性,该水体中分离的耐药菌株耐药率和多重耐药率显著高于其他调查水体。

3.2 城市下水道和污水处理厂 耐药菌在城市下水道以及污水处理过程中的曝气池和厌氧消化池都有检出^[5,13,19]。Reinthal^[20]对澳大利亚 3 家污水处理厂分离的大肠杆菌对 24 种抗生素抗性进行调查发现,该环境中的大肠杆菌对青霉素类、头孢类、喹诺酮类、四环素类抗生素均有不同程度的耐药,其中,四环素的耐药达到 57%。

通常认为医院污水排放是导致水环境中耐药菌增多的主要原因,但 Wiethan 等^[21]通过对城市污水处理厂和医院排放污水中耐药菌的对比研究发现,2 种水体中的耐药菌数量级大致相同,考虑到医院污水排放入水环境后平均有 100 倍的稀释作用^[17],医院污水排放不应该是造成城市管道排放水环境中耐药菌增加的主要原因。目前还需要对各种污水排放进行监测和评估,以期综合评价造成水环境中耐药菌增加的主要原因。

4 水环境中耐药菌危害研究

Guardabassi^[22]发现,医院、抗生素生产厂以及兽医畜牧业所产生的抗生素耐药菌排放到废水、土壤中,通过污水处理站后,仍有大量多重耐药菌存活,通过污水排放系统或土壤的滤过进入地表水以及地下水,在整个过程中,耐药菌通过垂直传播以及水平转移,将耐药基因传递到存在于土壤、水环境中的自然菌群,水环境及土壤在耐药菌的传播过程中起到了关键的作用。1950 年随着第 1 例耐青霉素大肠杆菌报道,多重耐药菌如绿脓杆菌、肠球菌,MRSA(耐甲氧西林金葡菌)相继出现,2003 年 6 月,美国疾病预防控制中心发布报告,一种对万古霉素产生抗性的金黄色葡萄球菌新菌种(VRSA)在密西根州一家医院被分离出来,虽然目前已开发出对 VRSA 有效的抗生素,但传播模式相似的部分或完全耐万古霉素的金黄色葡萄球菌的出现,仍然引起了感染控制和公共卫生领域的极大担忧,如果对新抗生素再产生耐药性,后果将极其严重。当前流行病学研究主要集中在临床分离的耐药菌株,而对于水环境中的耐药菌研究甚少^[23],耐药菌在土壤、污水、地表水、农村地下水、城市饮用水甚至水生鱼类的器官中的稳定检测^[24-29]已经引起了国外学者的密切关注。

Biyela 等^[30]通过对南非密哈拉苏子河中耐药性肠道菌的研究发现,耐药菌对早期应用的抗生素的抗性非常高,而且环境中分离的耐药菌株与腹泻病人分离得到的耐药菌株显著相关($r = 0.97$),他认为密哈拉苏子河对于耐药基因的传递来说不仅是一种媒介及储存作用,而且临床耐药菌通过水平转移把耐药基因传递给原生态细菌,从而造成耐药基因的扩散和转移。这一看法与 Ash 和 Park 一致^[4,31]。Hart^[32]通过在小鼠和鸡的动物实验证明了抗生素抗性在动物体内的转移,作者观察到四环素抗性在动物肠道内发生了转移,四环素敏感的大肠埃希菌获得了四环素抗



性,进一步的研究发现,动物的饮水中如果加入了四环素将增强四环素抗性的转移。Bourgeois-Nicolaos 等^[33]对已知肠道菌鼠体内体外实验发现, VanA 基因在动物肠道菌和人肠道菌间发生了转移,而且这种转移在种间肠道菌转移较种间转移更为普遍。

目前有关耐药菌在水环境中的生存、耐药细菌及其耐药基因在水环境中的传播转移规律以及可能对人群健康危害的研究都很少。Vanessa 等研究了来自土壤的 480 种不同芽胞微生物,发现其中的每一种都对至少 7 种现有的抗生素有耐药性,提示土壤已经成为一个巨大的耐药基因库,但该项研究并没有给出抗生素耐药性从土壤到致病细菌直接转移的证据^[34]。而水环境作为庞大的耐药基因库,耐药菌耐药基因向致病菌转移的行为规律的研究迄今为止也未见报道。

5 结 语

到目前为止,国外关于自然环境中耐药菌的产生、耐药菌株及耐药基因的传递以及耐药菌对于人和自然的危害研究非常有限,寻找控制水生环境耐药菌耐药性传播的有效方法也是学者共同的研究目标^[35],水生环境中耐药菌的出现在国内还没有引起足够重视^[2],自然水环境中庞大的耐药基因库为出现在水环境中的致病菌或条件致病菌提供了获得多重耐药的机会,一旦获得多重耐药的沙门氏菌、致病性大肠菌等水源性传播致病菌通过各种途径感染人体造成暴发流行,将对临床治疗药物的选择造成极大局限,对人类健康造成威胁。

参考文献:

[1] Mazel D, Davies J. Antibiotic resistance in microbes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 56(9-10): 742-754.

[2] 刘小云,舒为群,李阳. 地表水中耐热大肠菌群对 10 种常用抗生素的耐药性研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 2005, 23(3): 164-167.

[3] Mudryk Z J. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach[J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, 50(1): 80-86.

[4] Ash RJ, Mauck B, Morgan M. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States[J]. *Emerging Infect Dis*, 2002, 8(7): 713-716.

[5] Thomas Schwartz, Wolfgang Kohlen, Bernd Jansen, et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(3): 325-335.

[6] Mulamattathil SG, Esterhuysen HA, Pretorius PJ. Antibiotic-resistant Gram-negative bacteria in a virtually closed water reticulation system [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(6): 930-937.

[7] Guardabassi L, Dalsgaard A, Olsen JE. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(5): 659-667.

[8] Messi P, Guerrieri E, Bondi M. Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin[J]. *Science of the total environment*, 2005, 346(1-3): 213-219.

[9] Mudryk Z J. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach[J]. *Mar Pollut*

Bull, 2005, 50(1): 80-86.

[10] Lin J, Biyela PT, Puckree T. Antibiotic resistance profiles of environmental isolates from Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA) [J]. *Water SA*, 2004, 30(1): 23-28.

[11] John Davison I. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment [J]. *Plasmid*, 1999, (42): 73-91.

[12] Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia [J]. *J Appl Microbiol*, 2006, 100(5): 1103-1113.

[13] 刘小云,舒为群,邱志群,等. 水环境中耐热大肠菌群的抗生素耐药性与质谱研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(6): 118-121.

[14] Park JC, Lee JC, Oh JY, et al. Antibiotic selective pressure for the maintenance of antibiotic resistant genes in coliform bacteria isolated from the aquatic environment [J]. *Water Sci Technol*, 2003, 47(3): 249-253.

[15] Lin J, Biyela PT. Convergent acquisition of antibiotic resistance determinants amongst the Enterobacteriaceae isolates of the Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA) [J]. *Water SA*, 2005, 31(2): 257-260.

[16] Hartmann A, Alder AC, Koller T, et al. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital water [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, 17(3): 377-382.

[17] Kümmerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents [J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 9(12): 1203-1214.

[18] Heuer H, Krogerrecklenfort E, Wellington EMH, et al. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(2): 289-302.

[19] Guillaume G, Verbrugge D, Chassens-Libotte ML, et al. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A to E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32(1): 77-85.

[20] Reinthaler F F, Posch J, Feierl G, et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge [J]. *Water Research*, 2003, 37(8): 1685-1690.

[21] Wiethan J, Unger J, Brunswik-Titze A, et al. Occurrence and reduction of antibiotic resistant (pathogenic) bacteria in municipal sewage treatment plants: In Proc. International Water Association 2nd World Water Congress, Berlin, 15-19th October, 2001 [C]. Berlin: International Water Association, Abstract P0009: 227.

[22] Guardabassi L, Lo Fo Wong D M, Dalsgaard A. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria [J]. *Water Research*, 2001, 36(8): 1955-1964.

[23] Heuer E, Krogerrecklenfort E M H, Wellington. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(2): 289-302.

[24] Trevors JT. Survival of *E. coli* donor, recipient, and transconjugant cells in soil [J]. *Water, Air, Soil Pollut*, 1987, 34(4): 409-414.

[25] Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge [J]. *Water Research*, 2003, 37(8): 1685-1690.

(下转第 238 页)

本全部摄食。5种废电池浸泡液都明显影响涡虫的摄食率,与对照组比较差异显著($P < 0.01$)。综合不同稀释度和不同作用时间各组涡虫的摄食率,5种废电池浸泡液对涡虫摄食的影响强度依次为: $NF > JQ > BX^2 \approx BX^1 > SX$ 。在同种浸泡液中其影响强度随稀释倍数的增大而减少。

3 讨 论

本实验中我们所选用的5种废电池既有无汞电池(NF, JQ和SX),也有低汞电池(BX^2 , $Hg < 0.025\%$),还有含汞量较高的普通型电池(BX^1)。从实验结果来看,它们的浸泡液对涡虫生存与摄食均有影响,不同电池的影响程度相差较大。其中无汞电池,浸泡液的毒性最大,明显高于含汞量比它高的普通型电池 BX^1 ,说明各种电池浸泡液对涡虫毒性的大小不能仅看含汞量的多少。比较 BX^1 实验组与 BX^2 实验组的结果发现,普通型电池(BX^1)对涡虫的摄食与生存影响大于低汞型电池(BX^2)。

电池的成分复杂,除对涡虫有毒害的几种重金属外,还含有其他成分,如碱性物质等,这些物质都能影响涡虫生存和摄食。电池的品牌不同,甚至执行标准不同的同品牌电池中有害物质的种类和含量也会有差异,含汞量不同只是其中的一个方面。本文的研究只是一个开端,要进一步搞清影响涡虫生存或摄食的主要成分还需要结合化学分析,如果能模拟废电池成分来进行研究将更有意义。

参考文献:

- [1] 周 敏,陈 勇,胡秋峰. 用于测定废干电池中汞量的样品消解方法[J]. 上海师范大学学报:自然科学版, 2002, 31(4):52-55.
- [2] 赵怡冰,许武德,郭宇欣. 生物的指示作用与水环境[J]. 水源保护, 2002, 8(2):11-16.
- [3] 吴玉环,高 谦,程国栋,等. 苔藓植物对全球变化的响应及其生物指示意义[J]. 应用生态学报, 2002, 13(7):895-900.
- [4] 阮禄章,张迎梅,赵东芹,等. 白鹭作为无锡太湖地区环境污染指示生物的研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(2):263-268.
- [5] Chen JN, Yu HX, Liu Y, et al. Ecotoxicological evaluation of 4-aminobiphenyl using a test battery[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 58(1):104-109.
- [6] Calevro F, Campani S, Filippi C, et al. Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian *Pleurodeles waltl* and regeneration in the planarian *Dugesia etrusca*[J]. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 1999, 2(3):281-288.
- [7] 屈铭志,许 新. 废电池浸泡液对水螅的影响[J]. 生物学教学, 2001, 26(9):34-35.
- [8] 陈广义,陈晓红,刘德增. 中国涡虫纲分类学研究进展[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4):406-412.
- [9] 刘昌利,董 森,潘俊峰. 几种家用洗涤剂对涡虫的急性毒性实验[J]. 云南环境科学, 2002, 21(4):12-13.
- [10] 康思琦,周 斌,罗爱平. 镉镍废电池中金属镍镉浸出行为的研究[J]. 五邑大学学报:自然科学版, 2002, 16(1):21-24.

(上接第 208 页)

- [26] Wnorowski AU. Resistance to antibiotics of heavy-metal tolerant and heavy-metal sensitive bacterial strains[J]. *Environ Sci Health*, 1993, 28(1):203-215.
- [27] McKeon DM, Calabrese JP, Bissonette GK. Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies[J]. *Water Research*, 1995, 29(8):1902-1908.
- [28] Moffie BG, Mouton RP. Sensitivity and resistance of *Legionella pneumophila* to some antibiotics and combinations of antibiotics[J]. *Antimicrob Chemother*, 1988, 22(4):457-462.
- [29] Pathak DP, Gopal K. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish[J]. *Environ res*, 2005, 98(1):100-103.
- [30] Biyela PT, Lin J, Bezuidenhout C C. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes[J]. *Water Sci Technol*, 2004, 50(1):45-50.
- [31] Park JC, Lee JC, Oh JY, et al. Antibiotic selective pressure for the maintenance of antibiotic-resistant genes in coliform bacteria isolated from the aquatic environment[J]. *Water Sci. Technol*, 2003, 47(3):249-253.
- [32] Hart WS, Heusenroeder MW, Barton MD. A study of the transfer of tetracycline resistance genes between *Escherichia coli* in the intestinal tract of a mouse and a chicken model [J]. *JVet-Med-B-Infect-Dis-Vet-Public-Health*, 2006, 53(7):330-40.
- [33] Bourgeois-Nicolaos N, Moubareck C, Mangeney N, et al. Comparative study of vanA gene transfer from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis* and to *Enterococcus faecium* in the intestine of mice[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 254(1):27-33.
- [34] Vanessa M, D' Costa, Katherine M, et al. Sampling the Antibiotic Resistome[J]. *Science*, 2006, 311(5759):374-377.
- [35] Guardabassi L, Kruse H. Overlooked aspects concerning development and spread of antimicrobial resistance. Central European Symposium on Antimicrobial Resistance Brijuni[J], Croatia, *Expert Rev Anti-infect Ther*, 2003, 1(3):359-362.