

3 세대 세파계 항생제에 내성인 임상균주의 분포와 PCR 법을 이용한 TEM type β -lactamase 생산균주의 동정

김무용 · 오정인 · 송혜경 · 백경숙 · 광진환[‡]

LG 화학 기술연구원, 바이오텍연구소

(Received March 29, 1995)

Prevalence of Strains Resistant to the Third Generation Cephalosporins among Clinical Isolates and Identification of TEM Type β -lactamase from Resistant Strains by PCR Method

Mu Yong Kim, Jeong In Oh, Hye Kyong Song, Kyoung Sook Paek and Jin Hwan Kwak[‡]

Biotech Research Institute, LG Chemical Ltd, Taejon 305-380, Korea

Abstract Compared to the first-and second-generation cephalosporins, the third-generation cephalosporins are remarkably stable against hydrolysis by the β -lactamases produced by aerobic gram-negative bacilli, such as *Enterobacteriaceae*. Among these bacteria, the most prevalent plasmid-encoded β -lactamase is TEM-1 β -lactamase belonging to class A or group 2b. This enzyme is produced constitutively and is principally active against penicillins and old cephalosporins rather than third-generation cephalosporins, carbapenems and monobactams. However, new TEM type β -lactamases including TEM-9 and TEM-12 evolved through point mutations in a gene encoding β -lactamase have been discovered from patients during chemotherapy. These β -lactamases are known to be capable of hydrolyzing most of the third-generation cephalosporins. To study the prevalence of β -lactamases from clinical isolates collected in Korea, the minimal inhibitory concentrations(MICs) of several third-generation cephalosporins against 628 clinical isolates were determined by agar dilution methods, and β -lactamase-producing bacteria were isolated by use of cefinase disc. By polymerase chain reaction (PCR) method, clinical isolates harboring a gene for TEM type β -lactamase were identified among the β -lactamase producing strains. Twenty three percent of the clinical isolates was resistant to the third-generation cephalosporins, and more than 90% of resistant cells produced various β -lactamases. TEM type β -lactamases were dominant in gram-negative bacilli, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* species. These results suggest the necessity of the development of new cephalosporins which are stable against β -lactamases like TEM.

Keywords □ Cephalosporins, β -Lactamase, TEM, Minimal Inhibitory Concentration(MIC), Polymerase Chain Reaction(PCR)

Cephalosporin계 항생제는 감염질환의 치료에 사용되는 전체 항생제의 약 50% 정도를 차지하고 있으며, 인류가 지금까지 개발한 항생제 중 가장 약효가 우수하고 안전한 항생제로 평가되고 있다.¹⁾ 그러나 최근 잇단 내성균의 발현으로 기존의 항생제 뿐만 아니라 800 억

원 이상의 연구비를 투자하여 개발한 새로운 항생제들에 대해서도 세균이 간단히 돌연변이를 일으킴으로써 내성을 쉽게 획득하여 이들 항생제를 무력하게 만들고 있다.²⁾ 세파계 항생제에 대해 세균이 내성을 획득하게 되는 기전은 세균이 β -lactamase를 생산하여 세파계 항생제의 기본 골격 구조인 β -lactam ring을 가수분해시켜 활성을 없애거나, 또는 세균의 세포막 성분의 변

[‡] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

화로 인해 항생제가 세포내로 침투를 못하는 경우, 또는 세균이 항생제가 작용하는 작용점(target site)인 Penicillin Binding Protein(PBP)을 변화시킴으로써 내성을 획득하는 방법 등이 보고되어 있다.^{3,8)}

*Escherichia coli*와 같은 장내 gram negative bacilli 에서 주로 발견되는 내성은 위의 내성 기전 중 β -lactamase 의 생산에 의한 것이며, 이 중 plasmid에 기인 하는 TEM-1이 가장 널리 알려진 β -lactamase이다.⁹⁾ TEM-1은 ampicillin과 같은 penicillin류는 분해할 수 있으나 3 세대 세파계 항생제와 monobactam, carbapenem 등은 분해하지 못하였다. 그러나 최근 ceftazidime 등과 같은 3 세대 세파계 항생제도 분해할 수 있는 새로운 TEM type β -lactamase 들이 *Enterobacteriaceae* 속 균주 중에서 보고되고 있다. 즉 TEM-1의 Arg-164가 point mutation에 의해 serine 으로 변화되면서 ceftazidime 이나 aztreonam 등을 분해할 수 있는 TEM-12 와 같이 강력하고 새로운 TEM type β -lactamase mutant가 지금까지 30 여 종류나 발견되어지고 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 본 연구실에서도 지금까지 보고된 어떤 TEM β -lactamase 보다도 효소 활성이 강력한 새로운 TEM β -lactamase를 국내에서 분리된 임상균주로부터 분리하였다(data not shown). 새로운 extended spectrum β -lactamase(TEM 3, TEM 5, TEM 8-18, SHV 3-5 등)는 *Enterobacteriaceae* 속 균주 중 주로 *Klebsiella pneumoniae*에서 최초로 발견되는 경우가 많으며, 또 *K. pneumoniae* 에서 생산되는 extended spectrum β -lactamase는 *E. coli* 나 다른 gram-negative bacteria 에서 생산되는 enzyme보다 그 활성이 높은 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ Extended-spectrum β -lactamase 유전자를 가진 plasmid는 그 size가, 큰 편이며, 여러가지 항생제에 대하여 동시에 내성을 지닌 다제내성인 것이 많다. 이러한 plasmid는 개체간의 전달은 물론 종 간의 전달도 쉽게 이루어져 TEM을 대표로 하는 extended spectrum β -lactamase는 *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Citrobacter freundii* 이외에 *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Salmonella* spp, *Serratia marcescens* 등에서도 발견되기 때문에 감염질환의 치료에 있어서 큰 위협이 되고 있다.^{10, 15, 16)}

본 연구에서는 국내에서 분리되는 임상균주들에 대해 3 세대 세파계 항생제에 대한 내성 동향을 파악하고, 내성의 주 원인인 β -lactamase를 생산하는 균주의 분

리 빈도 및 특히 3 세대 세파계 항생제를 분해할 수 있는 TEM type의 β -lactamase의 생산균주를 PCR 법으로 쉽게 분리 동정할 수 있는 방법을 개발하여, 국내 임상 분리 균주로부터 TEM을 생성하는 내성균주의 분포를 확인하고자 하였다.

실험방법

시험 균주 - 표준 균주로서 *E. coli* 1193E(TEM1), *E. coli* 3455E(TEM3), *E. coli* 3739E(TEM5), *E. coli* 3457E(TEM7), *E. coli* 2639E(TEM9) 등을 사용하였고, 임상 분리 균주는 1990년 부터 1994년까지 여의도 성모병원과 강남성심병원에서 환자로부터 직접 분리 동정한 628 종의 균주를 사용하였다.

시약 및 기기 - Mueller-Hinton agar와 broth는 Difco 사에서 구입하였으며, ceftriaxone과 cefepime는 Sigma 사에서, ceftazidime, cefinase disc, *Taq* polymerase는 각각 Glaxo 및 BBL, Promega 사에서 구입하여 사용하였다. MIC 측정용 기기로는 MIC-2000 plus(Dynatech Co.)를 사용하였고, PCR 반응은 Power-Block system(Ericomp Co.)을 이용하였다. 균 배양용으로는 shaking incubator(Lab-line Co.), incubator(Napco Co.), clean bench(Baker Co.) 등을 사용하였다.

균액의 조제 - 시험균주는 Mueller-Hinton broth에서 35°C, 18시간 동안 진탕배양한 후 동일한 broth로 10⁸ CFU/ml이 되게 희석한 후 사용하였다.

항균력 시험 - 항생물질의 임상균주에 대한 MIC는 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards) 의 방법에 준하여 agar dilution method로 측정하였다.¹⁷⁾ Streptococci와 *Yersinia* spp. 는 defibrinated sheep blood를 5%로 첨가한 Mueller-Hinton medium(MHM)을, *Haemophilus influenzae*는 Fildes enrichment를 5%로 첨가한 MHM을 각각 사용하였으며, 나머지 균주에 대해서는 MHM을 그대로 사용하였다. 2 배수로 계단 희석된 항생물질이 들어 있는 MHM plate에 MIC-2000 plus를 이용하여 spot 당 10⁵ CFU가 되게 균을 접종하여, 35°C 에서 18 시간 배양한 후 MIC를 결정하였다.

Cefinase test - Nitrocefins는 Glaxo에서 개발된 세파계 항생제로서, β -lactamase에 의해 β -lactam 환이

분해되면 노란색에서 붉은색으로 변하는 성질을 갖고 있기 때문에 β -lactamase의 검출에 임상적으로 많이 이용되고 있다. MIC 측정 결과 내성균주로 판명된 임상균주들을 배양하여, Nitrocefin이 함유된 cefi nase disc(BBL)에 세균의 배양액을 20 μ l 정도 가한 뒤, disc의 색을 노란색에서 붉게 변화시키는 균을 β -lactamase 생성균주로 하였다.¹⁸⁾

Polymerase chain reaction(PCR) - PCR에 사용한 DNA template는 균주로부터 DNA를 분리하는 조작 없이, 직접 세균을 증류수 200 μ l에 현탁시키고 5분간 끓인 후 상정액을 5 μ l 취하여 PCR을 위한 주형액으로 사용하였다.¹⁹⁾ 사용한 primer는 TEM 유전자의 5' 말

단 염기서열과 3' 말단 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖고 있는 두 종류의 primer를 고안하여 사용하였으며, PCR 반응조건은 다음과 같이 하였다. DNA 주형액 5 μ l, 각각의 primer(800 μ g/ml) 1 μ l, 10 \times buffer(100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin) 10 μ l, 10 mM dNTP mixture(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 8 μ l, Taq polymerase(5 U/ μ l) 0.5 μ l를 포함하고 있는 반응액에 적당량의 증류수를 가하여 최종 반응액을 100 μ l로 하였다. 이 반응액을 94°C에서 1분, 57°C에서 30초, 72°C에서 2분간의 순환을 25회 반복하고 마지막으로 72°C에서 10분간 추가 반응시켰다.

Table I—MICs of the third-generation cephalosporins against 628 clinical isolates collected in Korea and prevalence of resistant strains

Strains	No. of strains	No.(%)of resistant strains	Antimicrobial Agents	MIC(μ g/ml)	
				Range	MIC ₉₀
<i>E. coli</i>	250	11(4)	Ceftazidime	0.063 - 128	0.5
			Ceftriaxone	0.016 - 64	0.13
			Cefoperazone	0.63 - > 128	16
<i>K. pneumoniae</i>	155	28(18)	Ceftazidime	0.063 - > 128	32
			Ceftriaxone	0.031 - > 128	16
			Cefoperazone	0.13 - > 128	128
<i>E. aerogenes</i>	36	12(33)	Ceftazidime	0.13 - 128	16
			Ceftriaxone	0.063 - 128	32
			Cefoperazone	0.5 - > 128	128
<i>E. cloacae</i>	48	26(54)	Ceftazidime	0.063 - > 128	64
			Ceftriaxone	0.016 - > 128	>128
			Cefoperazone	0.25 - > 128	>128
<i>C. freundii</i>	25	21(84)	Ceftazidime	0.063 - > 128	>128
			Ceftriaxone	0.016 - > 128	>128
			Cefoperazone	0.016 - > 128	>128
<i>M. morgani</i>	18	6(33)	Ceftazidime	0.2566 - 64	64
			Ceftriaxone	0.031 - 128	64
			Cefoperazone	4 - > 128	>128
<i>H. influenzae</i>	25	5(20)	Ceftazidime	0.13 - 16	16
			Ceftriaxone	0.063 - 8	4
			Cefoperazone	1 - 128	8
<i>P. mirabilis</i>	19	1(5)	Ceftazidime	0.031 - 8	0.063
			Ceftriaxone	\leq 0.008 - 4	0.016
			Cefoperazone	1 - 8	8
<i>P. vulgaris</i>	14	1(7)	Ceftazidime	0.016 - 64	0.13
			Ceftriaxone	\leq 0.008 - 8	0.063
			Cefoperazone	1 - 64	8
<i>Yersinia spp.</i>	8	1(13)	Ceftazidime	0.031 - 128	128
			Ceftriaxone	\leq 0.008 - 64	64
			Cefoperazone	0.063 - 128	128
<i>P. aeruginosa</i>	30	28(93)	Ceftazidime	1 - > 128	64
			Ceftriaxone	16 - > 128	>128
			Cefoperazone	8 - > 128	>128

결 과

임상균주에 대한 3세대 세파계 항생제의 시험관 내

MIC 측정과 내성균주의 분포 - 국내 임상 분리균주 628 종에 대해 3 세대 세파계 항생제인 ceftazidime, ceftriaxone, cefoperazone 등의 MIC를 측정된 결과, 이 중 ceftriaxone이 다른 항생제에 비해 임상균에 대하여 대체로 우수한 항균력을 지니고 있는 것으로 관찰되었으며, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*를 제외한 모든 종에서 시험균의 90%를 억제할 수 있는 농도(MIC₉₀) 가 대부분 8 µg/ml을 넘는 것으로 관찰되었다. 이들 임상균주 중 3세대 세파계 항생제에 대해 MIC 값이 대체로 8 µg/ml 이상인 균주를 내성균으로 정의하였다. 특히 *Pseudomonas aeruginosa*, *C. freundii*, *Enterobacter cloacae* 균주에서는 이들 3 세대 세파계 항생제에 대해 내성을 보인 균주의 비율이 각각 93%, 84%, 54%로 높은 비율을 보였으며, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *M. organii*, *H. influenzae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Yersinia spp.*에서는 내성균주의 비율이 각각 4%, 18%, 33%, 33%, 20%, 5%, 7%, 13%로 비교적 낮은 비율을 나타내었다(Table I). 한편, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Xanthomonas maltophilia*, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA), Methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*(MRSE) 등에서는 거의 모든 균주가 이들 3 세대 세파계 항생제에 대하여 내성을 나타내었다(data not shown).

내성균주 중 β-lactamase 생산 균주의 분포 - 3 세대 세파계 항생제에 대한 임상균주의 내성이 어떤 원인에 기인되는지 알아보기 위하여, 이들 내성균주들에 대해 β-lactamase 생산 여부를 cefinase disc를 이용하여 확인한 결과, 전체 내성균주 140 개 중에서 91%에 해당하는 127 개의 균주가 β-lactamase 를 생산하는 것으로 확인되었다(Table II). 따라서 3 세대 세파계 항생제에 대해 국내 임상 세균이 내성을 획득하는 주 원인은 이들 항생제를 분해할 수 있는 β-lactamase 생성에 의한 것임을 알 수 있었다.

PCR 법을 이용한 TEM 생산균주의 동정 - 3 세대 세파계 항생제를 무력화 시킬 수 있는 β-lactamase 중 가장 강력한 효소인 TEM을 생산하는 내성균주를 임상 분리 세균으로부터 쉽게 확인 동정할 수 있는 방법을 고안하기 위해 PCR 법을 사용하였다. TEM 유전자의

Table II—Distribution of TEM β-lactamase in resistant strains to the third generation cephalosporins

Stains	No. of resistant strains	β-lactamase(+)		β-lactamase(-)
		TEM	not TEM	
<i>E. coli</i>	11	9	-	2
<i>K. pneumoniae</i>	28	19	4	5
<i>E. aerogenes</i>	12	4	8	-
<i>E. cloacae</i>	26	7	19	-
<i>C. freundii</i>	21	5	15	1
<i>M. organii</i>	6	1	4	1
<i>H. influenzae</i>	5	-	1	4
<i>P. mirabilis</i>	1	-	1	-
<i>P. vulgaris</i>	1	1	-	-
<i>Yersinia spp.</i>	1	-	1	-
<i>P. aeruginosa</i>	28	-	28	-
Total	140	46	81	13

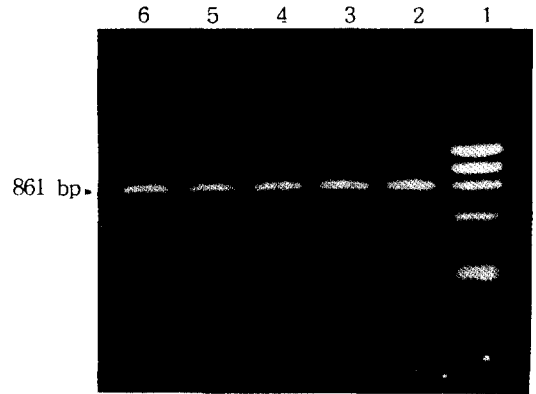


Fig. 1—1% Agarose gel electrophoresis of PCR products(861 bp). Phage X174 DNA/HaeIII markers(lane 1), *E. coli* 1193E(lane 2), *E. coli* 3455E(lane 3), *E. coli* 3739E(lane 4), *E. coli* 3457E(lane 5) and *E. coli* 2639E(lane 6).

upstream과 downstream에 존재하며 염기서열이 비교적 잘 보존되는 부위로 알려진 부분의 염기서열을 이용하여²¹⁾, 5' 말단 염기서열을 갖고 있는 primer 1(5'-ATGAGTATTCAACATTTCGGT-3')과 3' 말단의 염기서열에 상보적인 primer 2(5'-TTACCAATGCTT-AATCAGTGA-3')를 각각 고안 하였다. 이들 primer가 TEM 유전자를 가지고 있는 균주의 검출에 적당한지 확인하기 위하여, TEM β-lactamase를 생산하는 것으로 알려진 *E. coli* 1193E(TEM1), *E. coli* 3455E(TEM3), *E. coli* 3739E(TEM5), *E. coli* 3457E(TEM7), *E. coli* 2639E(TEM9)를 200 µl의 증류수에 현탁하여 100°C에서 5 분 간 끓인 후 상징액 5 µl를 취하여 이를 DNA 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응물

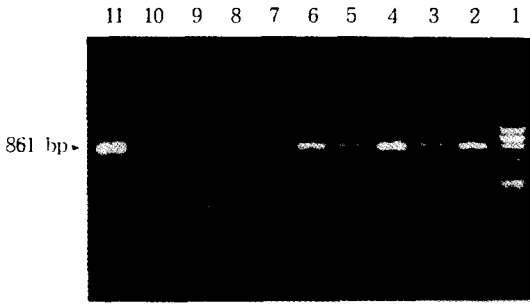


Fig. 2 — 1% Agarose gel electrophoresis of PCR products(861 bp). Phage X174 DNA/HaeIII markers(lane 1), resistant strains with TEM gene(lane 2, 3, 4, 5, 6, 11), and resistant strains without TEM gene(lane 7, 8, 9, 10).

들을 전기영동으로 확인한 결과, 이들 5 개의 균주 모두에서 TEM 유전자로 부터 유래된 861 bp 크기의 PCR product가 생성되어, 고안한 primer가 TEM β -lactamase 생산 균주의 확인 동정에 적당함을 확인하였다(Fig. 1).

국내 임상 균주 중에서 TEM β -lactamase 생산균주의 분포 - 임상균주 중에서 3 세대 세파계 항생제에 내성을 보이고(MIC가 8 μ g/ml 이상), cefinase disc 반응에 의해 β -lactamase를 갖는 것으로 확인된 임상균주에 대해, 위에서와 동일한 방법으로 PCR 을 진행하여 TEM 유전자를 가진 임상균주를 확인하였다(Fig. 2). PCR을 실시한 전체 127 개의 β -lactamase 생성 균주 중에서 46 개 균주가 TEM type β -lactamase를 생산하였으며, 특히 *E. coli*, *K. pneumoniae* 균주에서 TEM β -lactamase 생산 균주가 높은 빈도로 분리되었다(Table II).

고 찰

β -lactam계 항생제는 gram negative 와 gram positive bacteria에 존재하는 cell wall의 peptidoglycan 합성을 억제하는 작용 기전을 갖고 있으며, 이로 인해 우수한 항균 작용과 인체에 낮은 독성을 갖고 있기 때문에 현재 임상에서 가장 광범위하게 사용되고 있는 항생제이다. 그러나 이들 항생제의 남용으로 인해 세균의 내성 문제가 점차 임상에서 큰 문제가 되고 있으며, 이들 내성균에 대해 효과가 있는 새로운 세파계 항생제의 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다. 따

라서 실제로 임상에서 많이 사용되고 있는 약제에 대한 내성균의 동향을 파악하고 또 이들의 내성 기전을 연구하는 것은 임상에서 항생제의 합리적인 사용과 새로운 항생제의 개발에 많은 도움을 줄 수 있다. 세파계 항생제에 대한 세균의 내성 기전 중에서 β -lactamase 생산에 의한 내성 획득은 그 발생 빈도나 내성의 강도면에서 가장 중요한 원인이 되는데, 이는 세균이 간단히 돌연변이를 일으켜 새로운 항생제에 대해서도 내성을 손쉽게 획득할 뿐만 아니라 이들 내성 유전자가 다른 세균으로 쉽게 전이가 일어남으로써 빠른 시간 내에 내성이 확산되기 때문이다. 임상적으로 중요한 β -lactamase 생성 gram positive bacteria 로는 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, *E. faecalis* 등이 있으며, gram-negative bacteria에서는 거의 모든 세균에서 다양한 β -lactamase를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이 중 3 세대 세파계 항생제의 내성과 관련하여 가장 중요한 β -lactamase는 TEM 또는 SHV과 같이, 세균의 plasmid로 부터 기인하는 것으로 Bush의 분류법에 의해 group 2b 또는 2b'에 속하는 것들이다.²⁰⁾ TEM-type enzyme은 거의 모든 gram-negative bacteria에 존재하며, 새로이 발견되고 있는 TEM은 대부분의 3세대 세파계 항생제를 무력화시키기 때문에 임상균주로부터 TEM을 확인 동정하는 것은, 내성균의 동향을 파악하고 감염질환의 치료를 위한 항생제의 선택에 도움을 주어 임상에서 치료의 성공률을 높일 수 있게 된다.

국내에서 1990 년부터 1994 년 까지 분리된 임상균주 628 개 중에서 제 3세대 세파계 항생제에 내성을 보인 균주는 약 22% 였으며, 이중 *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *P. aeruginosa* 등에서 그 내성균주의 비율이 높게 나타났다. 이러한 내성 균주 중 β -lactamase를 생산하는 균주는 전체 내성균주의 91%인 127 종이었는데, 이와같은 현상은 이미 발표된 다른 나라의 결과와 유사하다. 또한 전체 β -lactamase 생성 내성균주 중에서 특히 TEM β -lactamase를 생산하는 균주의 비율은 33%이었다. 특히 *E. coli*, *P. vulgaris* 속 균주에서는 β -lactamase 생성 내성 균주 모두가 TEM을 갖고 있는 것으로 나타났고, *K. pneumoniae* 등에서도 TEM β -lactamase 생성 내성균주의 비율이 높게 나타났다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 우리나라에 분포되어 있는 임상균주 중에서는 기존에 사용되어지고 있는 3세대

세파계 항생제에 내성을 나타내는 균이 이미 많이 분포하고 있으며, 이러한 내성균주 대부분이 β -lactamase를 생산하는 것임을 알 수 있었다. 또한 β -lactamase를 생산하는 많은 균이 3 세대 세파계 항생제를 분해할 수 있는 효소 활성이 높은 TEM을 가지고 있어서, 이들 내성균에 의한 감염시 치료에 많은 어려움이 예상되어진다. 따라서 이들 TEM β -lactamase를 생산하는 내성균에 의한 감염질환을 효과적으로 치료하기 위해서는 적절한 항생제의 사용으로 내성균의 발생과 확산을 최대한 억제해야 할 뿐만 아니라, 이들 내성균에 대해 치료 효과가 높은 새로운 세파계 항생제의 개발이 절실히 요구되고 있다.^{22, 23)}

문 헌

- 1) Neu, H. C.: Third generation cephalosporins. Safety profiles after 10 years of clinical use. *J. Clin. Pharmacol.* **30**, 396 (1990).
- 2) Davies, J.: Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance gene. *Science* **264**, 375 (1994).
- 3) Vu, H. and Nikaido, H.: Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase constitutive *Enterobacter cloacae* strains to extended spectrum β -lactams. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **27** 393 (1985).
- 4) Nikaido, H. : Role of permeability barriers in resistance to β -lactam antibiotics. *Pharmacol. Ther.* **27**, 197 (1985).
- 5) Bush, K., Tanaka, S. K., Bonner, D. P. and Sykes, R. B.: Resistance caused by decreased penetration of β -lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **27**, 555 (1985).
- 6) Coleman, K., Athalye, M., Davison, M., Payne, D. J., Perry, C. R. and Chopra, I.: Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**, 1091 (1994).
- 7) Nikaido, H.: Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382 (1994).
- 8) Spratt, B. G.: Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264**, 388 (1994).
- 9) Sanders, C. C. and W. E. Sanders, Jr.: β -Lactam resistance in gram negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 824 (1992).
- 10) Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A.: More extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1697 (1991).
- 11) Hibbert-Rogers, L. C. F., Heritage, J. and Hawkey, P. M.: Convergent evolution of TEM-26, a β -lactamase with extended-spectrum activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**, 707 (1994).
- 12) Morosini, M. I., Canton, R., Negri, M. C., Baquero, F. and Blazquez, J.: New extended TEM-type β -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 458 (1995).
- 13) Huovinen, P., Hurovinen, S. and Jacoby, G. A.: Sequence of PSE-2 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 134 (1988).
- 14) Imtiaz, U., Manavathu, E. K. and Lerner, S. A.: Lerner Reversal of clavulanate resistance conferred by Ser-244 mutant of TEM-1 β -lactamase as a result of second mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1134 (1994).
- 15) Richmond, M. H. : The genetic basis of the spread of β -lactamase synthesis among plasmid carrying bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. London B* **289**, 349 (1980).
- 16) Jacoby, G. A.: Properties of plasmids responsible for extended-spectrum β -lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 164 (1991).
- 17) National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS). Document M7-A2: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. *Villanova, Pa.*, (1993).
- 18) Montgomery, K. and Raymundo, Jr.: Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta β -lactamase in clinically significant bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **9**, 205 (1979).
- 19) Gussow, D. and Clackson, T.: Direct clone characterization from plaque and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids. Res.* **17**, 4000 (1989).
- 20) Bush, K.: Characterization of β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 259 (1989).
- 21) Chanal, C., Poupard, M. C., Sirot, D., Labia, R.,

- Sirot, J., and Cluzel, R.: Nucleotide Sequences of CAZ-2, CAZ-6, and CAZ-7 β -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1817 (1992).
- 22) Smith, P. W., Chamiec, A. J., Chung, G., Cobley, K. N., and Wood, M. R.: Synthesis and biological activity of novel cephalosporins containing a(Z)-vinyl dimethylphosphonate group. *J. Antibiotics.* **48**, 73 (1995).
- 23) Song, H. K., Oh, J. I., Kim, M. Y., Kim, Y. Z., Kim, I. C., and Kwak, J. H.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of LB10517, a novel catechol-substituted cephalosporin with broad antibacterial spectrum. *J. Antimicrob. Chemother.* (submitted).