

Metallo- β -lactamase 생성 *Pseudomonas aeruginosa*의 시험관내 항균제 병합요법에 대한 연구

분당제생병원 진단검사의학과

홍 승 복

In vitro Antimicrobial Combination Therapy in Metallo- β -lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*

Seung-Bok Hong

Department of Laboratory Medicine, Pundang Jesaeng General Hospital, Seongnam 463-774, Korea

Metallo- β -lactamase (MBL) can hydrolyze all β -lactams except monobactams and frequently coexists with various antibiotic resistance genes such as aminoglycoside resistance, sulfonamide resistance gene, etc. Therefore, the effective antibiotics against infections by these bacteria are markedly limited or can't even be found. We tried to search in-vitro antimicrobial combinations with synergistic effects for a VIM-2 type MBL producing *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical specimen.

On the selection of antibiotic combinations with synergistic effects, we performed a one disk synergy test, modified Pestel's method, in agar without aztreonam (AZT). The bacteriostatic synergistic effects of this tests were scored as S_1 (by susceptibility pattern in agar without antibiotics), S_2 (by the change of susceptibility in agar with or without antibiotics) and S_3 ($S_1 + S_2$) and was classified into weak (1 point), moderate (2 points) and strong (3 points) by S_3 score. Subsequently, we carried out the time-killing curve for the antibiotic combinations with the strong synergistic bacteriostatic effect.

One VIM-2 type MBL producing *P. aeruginosa* confirmed by the PCR showed all resistance against all β -lactams except AZT, aminoglycoside and ciprofloxacin. In the one disk synergy test, this isolate showed a strong bacteriostatic synergistic effect for the antibiotic combination of AZT and piperacillin-tazobactam (PIP-TZP) or AZT and amikacin (AN). On the time-killing curve after six hours of incubation, the colony forming units (CFUs/mL) of this bacteria in the medium broth with both combination antibiotics were decreased to 1/18.7, 1/17.1 of the least CFUs of each single antibiotics. The triple antibiotic combination therapy including AZT, PIP-TZP and AN was shown to be significantly synergistic after 8 hrs of exposure.

In a VIM-2 MBL producing *P. aeruginosa* with susceptibility for AZT, the triple antibiotic combination therapy including AZT, PIP-TZP and AN may be considered as an alternative antibiotics modality against the infection by some MBL type. But the antimicrobial combination therapy for many more MBL producing isolates is essential to know as soon as possible for the selection of effective treatment against the infection by this bacteria.

Key words : Metallo- β -lactamase(MBL), Antimicrobial combination therapy, One disk synergy test, Time-killing curve

I. 서 론

Metallo- β -lactamase(MBL)는 그람음성 세균이 생성하는 β -lactamase 중 활성 범위가 가장 넓어서 carbapenem을 포함하여 대부분의 β -lactam 항균제를 가수분해하므로 MBL 유전자의 획득은 이들 균에 의한 감염의 치료에 커다란 문제를 야기할 것으로 보고 되었다(Nordmann와 Poirel, 2002). 최근에 *Pseudomonas aeruginosa*(Watanabe 등, 1991)와 *Acinetobacter*(Yum 등, 2002)와 같은 포도당 비발효 그람음성 세균과 *Serratia marcescens*(Osano 등, 1994), *Enterobacter cloacae*(Jeong 등, 2003) 등의 장내세균에서 MBL의 검출이 증가되고 있다. 현재까지 전 세계적으로 5종류의 MBL 유전형이 분리되고 있는데(Riccio 등, 2000; Lauretti 등, 1999; Toleman 등, 2002; Castanheira 등, 2004; Lee 등, 2005) 국내에서는 VIM-2형과 IMP-1형이 *Pseudomonas species* 및 *Acinetobacter species*에서 주로 분리되고 있으며(Lee 등, 2003), 2005년 세계에서 최초로 국내에서 SIM-1형(Lee 등, 2005)이 새로이 보고되었다.

현재 MBL 생성 균에 의한 감염의 치료제 개발에 대한 연구가 진행되고 있으나(Watanabe 등, 1995; Matsumura 등, 1997; Nagano 등, 1999) 임상적으로 사용되기 위해서는 오랜 시간이 소요될 것이다(Gilpin 등, 1995; Payne, 1993; Walter 등, 1996). 따라서 현재 사용 중인 항균제 중에서 선택해야 하며 대안으로 항균제 병합요법이 포함될 수 있으나 아직까지 MBL 생성 균에서 항균제 상승효과에 대한 연구는 매우 드물다. 항균제의 병합은 i) 내성균주의 발생 억제 ii) 약물농도의 감소에 의한 독성 발생의 감소 iii) 여러 종류의 균에 의한 감염 iv) 항균제 상승효과에 대한 기대 등의 이유로 이용된다. 항균제 상승효과에 대한 시험은 checkerboard 및 time-killing curve에 의한 방법이 잘 알려져 있는데, checkerboard 시험은 다양한 항균제 조합에 대한 시험이 가능하나 재현성이 부족하며, 정균(bacteriostatic) 효과만 볼 수 있는 단점이 있다(Eliopoulos 등, 1996). Time-killing curve는 항균제 병합에 의한 살균(bactericidal) 효과를 반영하며 in vivo의 결과와 가장 잘 일치되나 지루한 방법 등으로 인한 시간 및 노력이 많이 소요되며 병합할 수 있는 항균제의 조합도 제한될 수밖에 없다(Eliopoulos 등, 1996).

이 연구의 목적은 MBL 생성 *P. aeruginosa*에서 상승효과를 보이는 항균제 조합을 one disk synergy 검사로 선별하고 선별된 항균제 조합을 time-killing curve를 통하여

확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 균주

PCR에 의해 VIM-2형 MBL로 확인된 *P. aeruginosa* CBU 01/11/569(Fig. 1)를 대상으로 상승효과를 보이는 항균제조합을 선별하였고 선별된 항균제 조합에 대한 상승효과를 time-killing curve로 확인하였다.

2. 항균제 감수성 검사

(1) 최소억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

Imipenem(IMP, Merk/Sharp&Dohme, Rahway, N.J USA), meropenem(MEP, Yuhanyanghang Pharmaceutical, Seoul, Korea), aztreonam(AZT, BMS, Co, Princeton, N.J. USA), cefepime(FEP, Bayer Korea, Seoul, Korea), ceftazidime(CAZ, Jeiljedang Pharmaceutical, Seoul, Korea), piperacillin(PIP, Yuhanyanghang Pharmaceutical, Seoul, Korea), piperacillin-tazobactam(PIP-TZP, Yuhanyanghang Pharmaceutical, Seoul, Korea), amikacin(AN, Boryeng

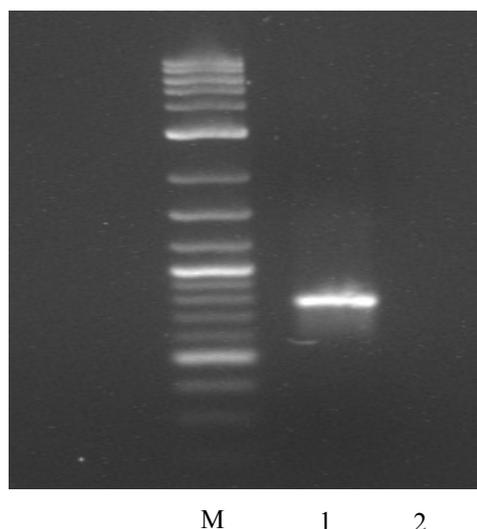


Fig. 1. Detection of amplified product of *bla*VIM-2 gene in 2% agarose gel electrophoresis. Lane M, DNA size marker (100 bp ladder); lane 1, VIM-2 producing *P. aeruginosa* (801 bp); lane 2, negative control.

Pharmaceutical, Seoul, Korea), ciprofloxacin(CIP, Bayer Korea, Seoul, Korea) 등의 최소억제 농도(MIC)를 측정하였는데, MIC은 NCCLS 지침(NCCLS, 2000)에 따라 미량 액체배지희석법으로 다음과 같이 시행하였다. 혈액 한천에서 하룻밤 동안 배양한 집락을 McFarland 0.5 관(10^8 CFU/mL)에 맞춘 후 다시 10배 희석하여(1×10^7 CFU/mL) 미리 준비한 항균제 plate(각각 100 μ L)에 5 μ L씩을 접종하여 최종농도가 well 당 5×10^5 CFU가 되게 하였다. 이것을 배양기에서 16~18시간 배양하였다. 매 실험마다 정도관리를 위하여 *P. aeruginosa* ATCC 27853를 정도관리 균주로 사용하였다. 최소억제농도는 균의 성장이 육안으로 관찰되지 않은 최소농도로 판정하였다.

3. 상승효과를 보이는 항균제의 선별 및 time-killing 시험

(1) 상승효과를 보이는 항균제의 선별검사

우선 MBL 생성 *P. aeruginosa*에 대한 최소억제 농도가 가장 낮은 AZT(MIC; 8 μ g/mL)과 여러 가지 β -lactam제 그리고 aminoglycoside, CIP, vancomycin(VA), tetracycline(TE), trimethoprim-sulfamethoxazole(SXT)의 병합효과를 디스크 확산법으로 선별하였다(one disk synergy test). 상승효과에 대한 선별검사를 위해 AZT의 sub-MIC(1/2 MIC, 4 μ g/mL) 배지를 제조하였다. AZT 4 μ g 배지에 위에서 McFarland 0.5 관의 탁도에 맞춘 균을 접종한 후 위에서 열거한 항균제 디스크를 올려놓고 37 $^{\circ}$ C에서 16~18시간 배양하였다. 이때 동시에 항균제를 첨가하지 않은 MH 배지에 상기 항균제 디스크를 올려놓고 AZT 4 μ g 배지의 억제대와 비교하였다. 상승효과의 판정은 Pestel 등(1995)의 방법에 따라 상승효과를 정량화 하였다. 우선 항균제를 넣지 않은 배지(S₁)에서 감수성(S), 중간내성(I), 저항성(R)에 따라 각각 2, 1, 0 점을 부여하였다. 항균제를 넣은 배지에서 억제대의 직경이 항균제를 넣지 않은 배지의 억제대 직경과 비교하여 감수성 양상이 변할 경우(S₂) 점수를 차등화 하여 부여하였다. 즉 R \rightarrow I, I \rightarrow S의 경우 2점, R \rightarrow S의 경우 3점, S \rightarrow S이나 억제대 직경이 증가한 경우는 1점, 그 이외에는 0점을 부여하였다. 상승효과의 최종 판정은 S₁과 S₂의 합(S₃)으로 판정하였는데, 1점의 경우 weak, 2점, moderate, 3점, strong으로 판정하였다.

(2) Time-killing curve

One disk synergy 검사에서 상승효과가 가장 큰 항균제 조합을 선택하여 time-killing curve를 작성하였다. 우선 AZT과 PIP-TZP의 병합에 의한 상승효과가 가장 컸기 때문에 선택하였고, AZT과 AN의 병합은 synergy score는 weak 이었지만 증가된 억제대가 PIP-TZP 다음으로 증가되었기 때문에 선택하였다.

Time-killing curve를 작성하기 위하여 AZT의 경우 1/2 MIC(최종농도 4 μ g/mL)을 선택하였고 PIP-TZP도 1/2 MIC(32 μ g/mL)을 선택하였다. 그러나 AN의 경우 MIC가 >256 μ g/mL로 1/2 MIC(128 μ g/mL)는 혈중 범위에 도달할 수 없는 농도(독성 혈중 농도)였으므로 치료적 혈중 농도를 기준으로 16 μ g/mL(치료범위; 10~25 μ g/mL, 독성범위: ≥ 35 μ g/mL, (Moyer와 Pippenger, 1994)를 선택하였다.

균 접종 농도는 MH 액체배지 7.6 mL에 McFarland 0.5 관(1×10^8 CFU/mL)의 균액 0.4 mL를 넣어 최종 균 농도가 5×10^6 CFU/mL가 되게 하였다. 이어서 0시간, 3시간, 6시간 24시간 후에 균의 수를 세었다. 균의 수는 Eliopoulos 방법(Eliopoulos 등, 1996)대로 시행하였는데, 각 시간마다 0.5 mL를 취하여 0.45% 생리식염수 4.5 mL에 섞어 10^1 부터 10^8 까지 계단 희석하여 이 중 25 μ L를 취하여 BAP에 접종하였다. 균수의 계산은 희석배수(10^n) $\times 40 \times$ 균수로 계산하였다.

III. 결 과

1. 상승효과를 보이는 항균제의 선별검사

MBL 생성 *P. aeruginosa*에 대해 상승효과를 보이는 항균제를 선별을 위해 one disk synergy test를 시행하였는데, *P. aeruginosa* CBU/01/11/569는 시험한 모든 β -lactam 항균제(AZT(MIC; 8 μ g/mL) 제외), aminoglycoside 그리고 CIP에 내성을 보여(Table 1) AZT 함유 배지를 이용하여 상승효과를 보이는 항균제를 찾고자 하였다. AZT 4 μ g 함유배지에서 PIP-TZP는 강한 상승효과(strong)를 보였다. AN, CAZ 및 FEP은 각각 weak 및 moderate 상승효과를 보였다(Table 2). Carbapenem (IMP, MEM), aminoglycoside 항균제(gentamicin, tobramycin), cephalosporin(cefazolin, cefuroxime, cefuroxime, cefotaxime),

Table 1. The minimal inhibitory concentration (MIC) of VIM-2 MBL producing *P. aeruginosa*

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Imipenem	256
Meropenem	64
Aztreonam	8
Cefepime	32
Ceftazidime	32
Piperacillin	128
Piperacillin-tazobactam	64/8
Amikacin	>256
Ciprofloxacin	128

penicillin(penicillin G, ampicillin, oxacillin), SXT, VA, TE, clindamycin, erythromycin, chloramphenicol 등의 항균제는 모두 상승효과가 관찰되지 않았다. 위의 결과를 바탕으로 두 가지 항균제 조합을 선택하여 time-killing curve로 상승효과를 확인하고자 하였다. 우선 강한 상승효과를 보인 AZT과 PIP-TZP의 조합을 선택하였고, 두 번째로 미약한 상승효과(weak)를 보였지만 의미 있는 억제대의 증가(6 \rightarrow 13.5 mm)를 보인 AZT과 AN 조합을 선택하였다.

2. Time-killing 실험

AZT와 PIP-TZP의 병합은 항균제 노출 6시간 후에 AZT(1.5×10^6 CFU/mL) 또는 PIP-TZP(1.2×10^6 CFU/mL)의 단독 항균제 투여보다 균수가 1/18.7로 감소하였다

(6.4×10^4 CFU/mL). 그리고 AZT와 AN의 병합에서도 항균제 노출 6시간 후에 AZT 또는 AN (1.1×10^7 CFU/mL)의 단독 항균제에 투여보다 균수가 1/17.1로 감소하였다 (6.4×10^4 CFU/mL). 결국 위 두 조합은 의미 있는 상승효과가 나타나지 않아 위 세 항균제의 병합을 시험하였다. 위 세 항균제를 병합하였을 때 항균제 노출 8시간에 AZT(1.2×10^7 CFU/mL), PIP-TZP (1.1×10^7 CFU/mL) 및 AN (2.4×10^8 CFU/mL)의 단독 투여에 비하여 균수가 1/183.3로 감소하여(6×10^4 CFU/mL) 의미 있는 상승효과를 보였다(Figs. 2, 3, 4).

IV. 고 찰

MBL을 생성하는 균에 의한 감염을 치료하기 위한 항균제의 선택은 매우 어렵다(Payne, 1993). 현재 MBL에 의해 가수분해 되지 않은 항균제의 개발 및 임상시험이 진행 중에 있지만(Matsumura 등, 1997; Nagano 등, 1999) 이 항균제를 사용하려면 오랜 시간이 필요할 것이다. 따라서 기존에 사용되고 있는 항균제 중에서 선택하여야 하며 항균제의 병합요법이 하나의 대안이 될 수 있을 것이다. 호중구 감소증 환자나 면역이 결핍된 환자에서 다제 내성인 *P. aeruginosa*에 의한 감염에 병합요법이 종종 이용되고 있는데(Dejongh 등, 1986), 이 중 β -lactam 항균제와 aminoglycoside의 병합에 의한 상승효과가 잘 알려져 있다(Dejongh 등, 1986; Miller 등, 1986). 그러나 아직까지 MBL를 생성하는 *P. aeruginosa*에서 병합요법의 효과에 대한 보고는 극히 드물다. 본 연구에서는 MBL을 생

Table 2. Screening for the antibiotics with the synergistic bacteriostatic effect in combination in aztreonam in VIM-2 MBL producing *P. aeruginosa*

Agar with 0.5 MIC of aztreonam	Antibiotic disc			
	PIP-TZP	CAZ	FEP	AN
Inhibition zone	19.0 mm	16.0 mm	15.5 mm	13.5 mm
Increased inhibition zone*	8.5 mm	5.5 mm	5.0 mm	7.5 mm
Change of Susceptibility	R \rightarrow S	R \rightarrow I	R \rightarrow I	R \rightarrow R
Synergic score [†] , S ₁	0	0	0	0
S ₂	3	2	2	1
S ₃ (S ₁ +S ₂)	3	2	2	1

* Increased inhibition zone (mm) in agar with 0.5 MIC of aztreonam than control (without antibiotics)

[†] Synergic score were defined as Pestel's method (Pestel et al. 1995) (see text for material and methods)

Abbreviation; PIP-TZP, piperacillin-tazobactams; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; AN, amikacin.

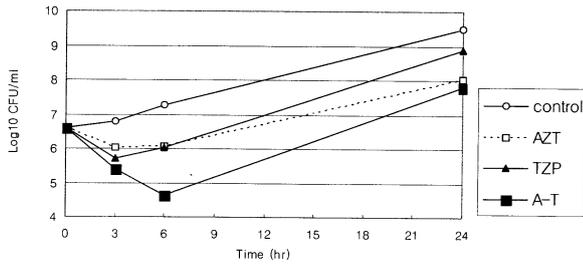


Fig. 2. Time-killing curves of a VIM-2 MBL producing *P. aeruginosa* after the exposure of AZT (4 µg/mL), TZP (32/4 µg/mL), or the combination of both. MIC: AZT; 8 µg/mL, TZP; 64/8 µg/mL. Abbreviation: A+T, aztreonam plus piperacillin-tazobactam.

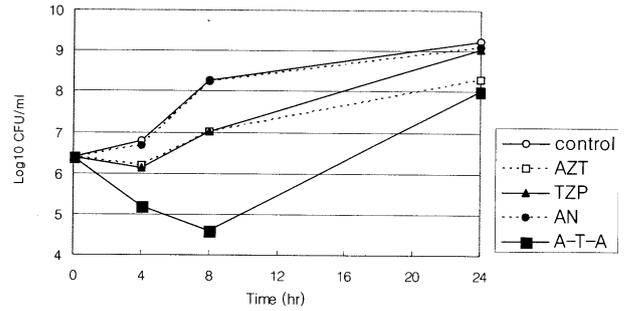


Fig. 4. Time-killing curves of a VIM-2 MBL producing *P. aeruginosa* after the exposure of AZT (4 µg/mL), TZP (32/4 µg/mL), AN (16 µg/mL), or the combination of the three. Abbreviation: A+T+A, aztreonam plus piperacillin-tazobactam plus amikacin.

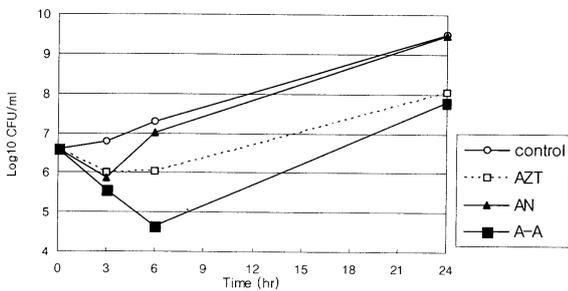


Fig. 3. Time-Killing curves of a VIM-2 MBL producing *P. aeruginosa* after the exposure of AZT (4 µg/mL), AN (16 µg/mL), or the combination of both. MIC : AZT; 8 µg/mL, AN; >256 µg/mL. Abbreviation: A+A; aztreonam plus amikacin.

성하는 *P. aeruginosa*에서 one disk synergy 검사를 이용하여 상승효과를 보이는 항균제를 찾아보았다. One disk synergy test는 Pestel 등(Pestel 등, 1995)의 방법을 변형하여 사용하였는데, 항균제를 섞은 배지와 섞지 않은 배지에서 억제대 직경의 차이로 상승효과를 정량적으로 측정할 수 있는 방법으로 상승효과를 보이는 항균제를 찾는 데 유용한 방법이다. 본 연구에서는 *P. aeruginosa* CBU 01/11/569가 AZT에 감수성을 보여 이 항균제와 병합에 의해 상승효과를 보이는 항균제 조합을 찾았다. AZT와 PIP-TZP의 병합에서 억제대의 증가가 가장 컸으며 이어서 AZT과 AN의 병합에서도 의미 있는 억제대 증가가 관찰되어(Table 2) 이들 항균제 조합으로 time-killing curve를 작성하였다.

그람 음성 간균에서 time-killing 시험의 기준은 아직까지 정해져 있지 않는데, 균의 응집 및 biofilm의 형성에

의해 균 집락 내부에 도달되는 항균제농도가 낮게 되며 24시간 후에 흔히 재 증식을 보일 수 있다(Cappelletty와 Rybak 등, 1996). 따라서 항균제 노출 후 6~8시간 내에 상승효과 유무를 판독하자는 보고가 있으며(Glew와 Pavuk, 1984), 실제로 β -lactam 항균제 및 대부분의 항균제는 8시간 이내에 재 투여가 되므로 위 제안이 의미 있을 것으로 생각된다. Time-killing 시험에서 항균제 농도는 MIC와 혈중농도를 고려해야 하는데, 일반적으로 1/4 MIC 또는 1/2 MIC 그리고 혈중 도달 농도를 고려하여 정한다(Elliopoulos 등, 1996). 본 실험에서는 기본적으로 1/2 MIC를 선택하였으며 AN은 1/4 MIC(>64 µg/mL)이 독성범위(toxic level>35 µg/mL, Zaske, 1980)이었으므로 독성범위 이하의 치료 농도(therapeutic range; 10~25 µg/mL)를 선택하여 항균제 노출 6시간 또는 8시간에 판독하였다. 실험 결과 AZT와 PIP-TZP의 병합에 의해서 각각의 항균제보다 억제효과는 컸지만 의미 있는 상승효과(100배 이상의 균 수 감소)는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 그러나 일부 균에서 aminoglycoside에 고도 내성일지라도 β -lactam제와의 병합은 의미 있는 상승효과를 나타낼 수 있다고 알려져 있어 자주 병합요법에 이용되고 있다(Miller 등, 1986). *P. aeruginosa* CBU 01/11/569는 AN에 대한 MIC가 256 µg/mL 이상을 보였으나 AZT와 one disk synergy 검사에서 억제대가 의미 있게 증가되었다. 그리고 time-killing curve에서는 AN과 AZT(β -lactams)의 병합은 AZT과 PIP-TZP의 병합 효과와 유사하였다(Fig. 3). 따라서 이 세 항균제를 병합하여 시험하게 되었는데, 이 시험에서는 각각의 항균제 조합보다 항균제 노출 후 8시간에 의미 있는 상승효과(1/183로 감소)를 보여(Fig. 4) 어떤 MBL 생성 균주에서 aminoglycoside를 포함하는 삼

중요법은 유용할 것으로 사료되었다.

결론적으로 MBL 생성 균은 종종 MBL 유전자와 동시에 aminoglycoside 내성 유전자를 포함하고 있기 때문에 aminoglycoside에 고도 내성을 보이지만 MBL 생성 균에서 병합요법에 aminoglycoside(특히, AN)를 포함하는 것은 효과적일 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 통상적으로 MBL 생성 균은 AZT를 가수분해하지 못하여 감수성일 수 있으므로 AN과 AZT의 이중 병합은 유용할 것이다. 그러나 이들 균에서 변이에 의한 AmpC β -lactamase를 갖고 있으면 AZT에 내성을 보일 수 있으므로(Korfmann 등, 1991; Stapleton 등, 1995) AZT의 효과는 감소할 수 있으며, 이런 경우 AZT, PIP-TZP, 그리고 AN의 삼중병합도 고려 해볼 수 있을 것이다. 앞으로 보다 많은 수 및 다양한 유전형의 MBL 생성 균을 대상으로 병합요법에 대한 시험이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schimdt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4654-4661, 2004.
2. Cappelletty DM and Rybak MJ. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combination against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:677-683. 1996.
3. Dejongh CA, Joshi JH and Thompson BW. A double β -lactam combination versus an aminoglycoside-containing regimen as empiric antibiotic therapy for febrile granulocytopenic cancer patients. *Am J Med Supp* 5C:101-111, 1986.
4. Eliopoulos GM, Moellering Jr RC. Antimicrobial combination. In Lorian V(eds). *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. p338-342. Williams & Willkins, Baltimore, 1996.
5. Gilpin ML, Fulston M, Payne D, Cramp R and Hood I. Isolation and structure determination of two novel phenazines from a *Streptomyces* with inhibitory activity against metallo-enzymes, including metallo- β -lactamases. *J Antibiot (Tokyo)* 48:1081-1085, 1995.
6. Glew RH and Pavuk RA. Early synergistic interaction between amikacin and six β -lactam antibiotics against multiply resistant members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 26:378-381, 1984.
7. Jeong SH, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, Kim YM, Park KH, Han BH, Lee SW and Jeong TS. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassettes, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 51:397-400, 2003.
8. Korfmann G, Sanders CC and Moland ES. Altered phenotypes associated with ampD mutation in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:358-364, 1991.
9. Lauretti L, Ricco MI, Mazzriol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R and Rossolini M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene form a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1584-1590, 1999.
10. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J and Chong Y. VIM-and IMP-type metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. *Emerg Infect Dis* 9:868-871, 2003.
11. Lee K, Yum JH, Young D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, bla (SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4485-4491, 2005.
12. Matsumura N, Minami S and Mitsuhashi S. Antibacterial activity of T-5575, a novel 2-carboxypenam, and its stability to β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 39:31-34, 1997.
13. Miller MH, El-Sokkary MA, Feinstin SA and Lowy FD. Penicillin-induced effects on streptomycin uptake and early bactericidal activity differ in viridans group and enterococcal streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 30:763-768, 1986.
14. Moyer TP and Pippenger CE. Therapeutic drug

- monitoring: In Burtis CA and Ashwood ER(eds). Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed, p1132-1134, WB Saunders, Co., Philadelphia, 1994.
15. Nagano R, Adachi Y, Imamura H, Yamada K, Hashizume T and Morishima H. Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various β -lactamases, including class B metallo- β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2497-2503, 1999.
 16. National Committee for Clinical laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-5th editions: approved standard. Wayne, NCCLS M7-A5, 2000.
 17. Nordmann P and Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect Dis* 8:321-331, 2002.
 18. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohtan M, Horii T, Ito H, Yoshimura F and Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38:71-78, 1994.
 19. Payne DJ. Metallo- β -lactamase- a new therapeutic challenge. *J Med Microbiol* 99:93-99, 1993.
 20. Pestel M, Martin E, Aucouturier C, Lemeland JF and Caron F. In vitro interaction between different β -lactam antibiotics and fosfomycin against bloodstream isolates of Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2341-2344, 1995.
 21. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G and Rossolini GM. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1229-1235, 2000.
 22. Stapleton P, Shannon K and Phillips I. DNA sequence differences of ampD mutants of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2494-2498, 1995.
 23. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN and Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial program. *J Antimicrob Chemother* 50:673-679, 2002.
 24. Walter MW, Felici A, Galleni M, Scoto RP, Adlington RM, Baldwin JE, Frere JM, Gololobov M and Schofield CJ. Trifluoromethyl alcohol and ketone inhibitors of metallo- β -lactamases. *Bioorg Med Chem* 6:2455-2458, 1996.
 25. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:147-151, 1991.
 26. Watanabe Y, Minami S, Hayashi T, Araki H, Kitayama R and Ochiai H. In vitro antibacterial properties of T-5575 and T-5578, novel parenteral 2-carboxypenam. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2787-2791, 1995.
 27. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM and Chong Y. Molecular characterization of metallo- β -lactamase producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomospecies* 3 from Korea: identification of two new integron carrying the bla_{VIM-2} gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 49:837-840, 2002.
 28. Zaske DE. Aminoglycosides: Counterpoint discussion. In Evans WE, Schentag JJ and Jusko WJ(eds.). Applied Pharmacokinetics. p210-239, Applied Therapeutics, San Francisco, 1980.