

# Integron과 이동성 내성 유전자 Cassettes

이경원, 정윤섭

연세대학교 의과대학 임상병리과학교실, 세균내성연구소

## Integron and Mobile Gene Cassettes

Kyungwon Lee, M.D. and Yunsop Chong, Ph.D.

Department of Clinical Pathology and Research Institute of Bacterial Resistance,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

### 서 론

감염 질환을 흔히 일으키는 세균 중에 항균제 내성이 혼란은 이미 잘 알려져 있다. 특히 근래에는 임상에서 널리 사용되는 항균제에 대한 다제 내성 세균이 대단히 흔해졌으며, *Pseudomonas* 감염 치료를 위해서는 유효한 약제의 선택이 어려울 정도로 내성균이 많아졌다(1). 그람음성 간균의 내성 유전자는 plasmid, 염색체 혹은 transposon에 들어있는 것이 많은데, 이들 중에는 여러 가지 내성 유전자를 가진 것이 있어서 다제 내성을 나타내고, 내성 유전자가 integron이라고 하는 구조 중에 들어 있는 경우가 있다. 즉, 세균의 염색체나 plasmid 중에는 transposon이 있으며, plasmid나 transposon 구조 중에는 integron이 있고, integron 중에는 cassette가 있으며, cassette 중에는 내성 유전자가 들어있는 경우가 있다(2).

Integron은 현재 4 종류가 알려져 있으며, 그 중 class 1, 2 및 3 integron에는 항균제 내성 유전자를 가진 gene cassette도 있으며, 일부 내성 gene cassette는 integron 사이를 자유로이 이동할 수 있다(3). Class 4 integron은 *Vibrio cholerae*에서만 보고되었다. Integron에는 공통적으로 integrase 유전자, cassette가 삽입되는 재조합부위 (*attI site*) 및 promoter가 있으며, 그 class는 integrase 유전자 (*intI*)의 염기서열에 의해서 구별된다(3).

### Integron의 구조

대부분의 integron은 class 1에 속하는데 그 구조는

접수번호 : CM 3-2-8

교신저자 : 이경원

(120-752) 서울 서대문구 신촌동 134번지  
연세대학교 의과대학 임상병리과학교실  
Tel : 02) 361-5866 Fax : 02) 313-0908

다음과 같다. 즉, integron에는 두 개의 보존 서열 (conserved segment, CS)이 있고, 이 사이에는 내성 유전자나 기능이 밝혀지지 않은 gene cassette가 삽입된다(4). 5' CS의 상류역에는 삽입된 내성 유전자의 발현을 위한 promoter가 있고, 그 하류에는 integrase 유전자 (*int*)가 있다. 3' CS에는 ethidium bromide와 제4급 암모늄 화합물의 내성 유전자인 *qacEΔI*, sulfonamide의 내성 유전자인 *sulI* 및 open reading frame (ORF)인 *orf5*가 있다(Fig. 1).

Gene cassette는 gene coding region과 59 base element (be)로 불리는 재조합 부위로 이루어져 있다. 59 be는 integron의 integrase가 인지하는 재조합부위이며, integrase 유전자 (*int*)에 인접한 *attI*에 cassette가 삽입된다. Cassette에는 스스로를 이동시키는 유전자는 없지만, integrase 작용으로 이동성을 갖게 된다. Integrase는 gene cassette를 잘라내어서 환상체를 만들고 이를 삽입시키는 작용을 한다(5) (Fig. 2). 일단 삽입된 cassette는 integron의 일부가 된다. Integron에 삽입되는 gene cassette의 수는 일정하지 않아서, cassette가 들어 있지 않은 integron (In0)도 있으며(6), 어떤 integron에는 5개의 cassette가 있는 경우도 있다(7, 8). 또한 integron 중의 cassette 위치는 cassette가 잘려나가거나, 새로 배열되거나, 새 cassette가 삽입됨으로서 달라지게 되므로(9), 그 순서는 일정하지 않다(4).

Gene cassette는 1999년까지 최소한 59가지가 알려져 있는데(10), 대부분은 항균제 내성에 관여한다(Table 1). 그 외에 소독제로 흔히 사용되는 제4급 암모늄 화합물에 대한 내성 유전자도 있고, 아직 기능이 밝혀지지 않은 ORFs도 있다. Gene cassette에 들어있는 내성 유전자에는  $\beta$ -lactamase, aminoglycoside 수식 효소, trimethoprim 내성, chloramphenicol 내성 등의 유전자가 있다. Integron 중의 대부분의 내성 유전자는 오래동안 사용되어 온 항균제에 대한 것이지만, 최근에는 새로

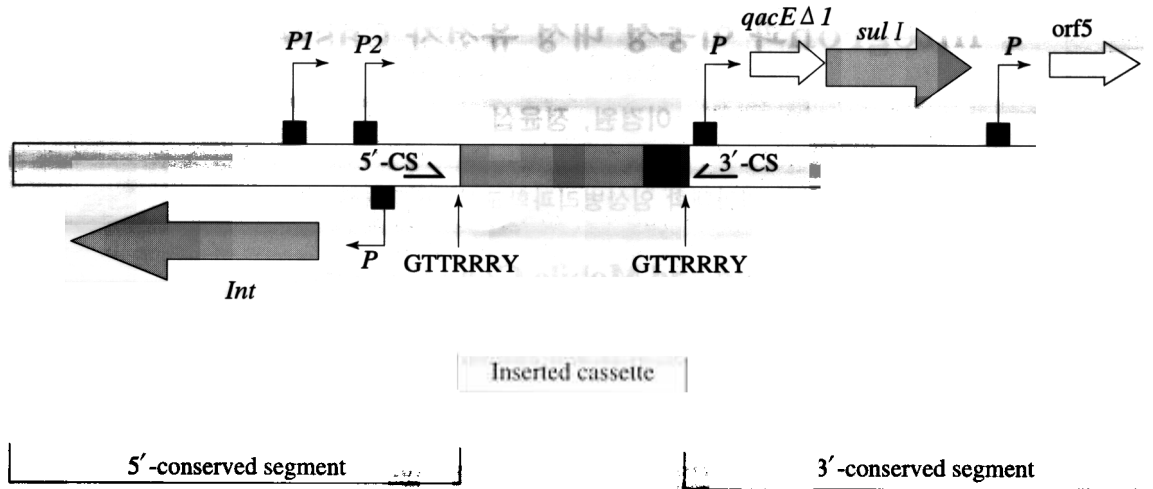


Fig. 1. General structure of integron. The arrows show the direction of transcription. *int*, integrase; *qacE*  $\Delta$  1, a truncated quaternary ammonium compound resistance; *sul I*, sulfonamide resistance dihydropteroate synthase, type 1; *orf5*, open reading frame.

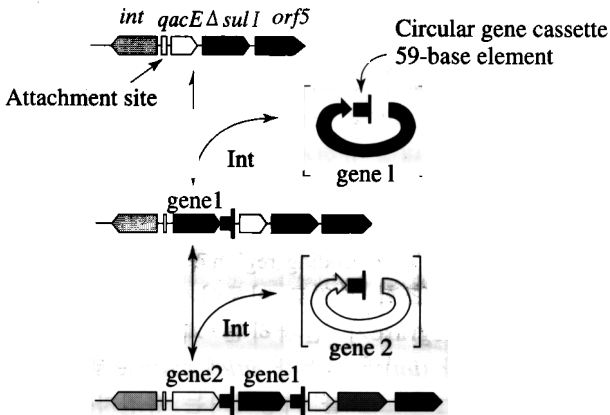


Fig. 2. Site-specific insertion and excision of integrons.

운 항균제에 대한 것들, 즉 VEB-1, GES-1, VIM-1, VIM-2 등의 유전자들이 있음이 보고되었다[11-14].

Integrase 외에 *attI*와 59 be도 gene cassette의 이동성에 관여한다[10]. 59 be는 cassette에 따라 염기서열이 다를 수 있고, 그 길이도 다양하다. 59 be에는 7 bp core region을 가진 불완전한 inverted repeat 두 개가 있는데, 왼쪽 끝은 RYYAAC이고, 오른쪽 끝은 GTTRRRY이다. 재조합은 59 be의 한쪽 끝인 GTTRRRY의 G와 T 잔기 사이에서 일어난다. Cassette는 환상체 구조이므로 다른 한쪽 끝은 coding sequence의 5' 쪽에 붙게 된다. 즉, integration은 gene cassette의 사이나 59 be와 *attII* 사이에서 일어나는데, 보통은 후자의 경우가 많다. *attII*은 5' CS의 3' 쪽 말단에 위치하며, 59 be보다 덜 복잡하고, 7 bp core region이 있다.

Gene cassette는 integron의 5' CS에 있는 promoter에 의해 발현된다. Cassette는 쉽게 자리를 옮길 수 있어서

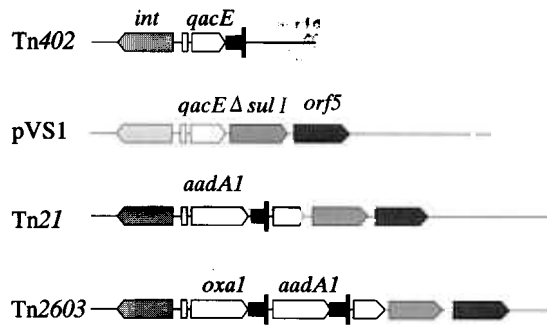


Fig. 3. Some representative integrons.

어느 항균제가 선택 압력으로 작용하면, 그 항균제에 대한 내성을 발현하게 하는 내성 유전자가 promoter의 바로 아래 자리에 이동하여, 가장 강한 발현을 가능하게 한다. Promotor의 강도와 cassette의 위치가 항균제 내성의 발현 정도를 다르게 하는 것은 임상적으로 중요하다. 즉, promoter가 약하거나 내성 유전자 cassette의 위치가 다른 cassette 보다 하류에 있어서 내성 발현이 약한 경우에는 항균제의 선택 압력이 생길 때, cassette의 위치가 상류로 이동될 것이고, 항균제 내성을 강하게 발현하여 치료 효과가 없게 될 것이다[2].

Class 2 integron은 Tn7 계열에서 관찰되며, 5' CS에는 pseudo-integrase 유전자 (*intI2*)가 있는데, *intI1* 유전자의 염기서열과 46.5%만이 동일하다. Gene cassette는 소수만이 들어있으며, trimethoprim (*dhfrI*), streptothricin (*sat*) 및 streptomycin (*ant(3'')-Ia*) 내성 유전자가 이에 속한다[3, 15].

Arakawa 등[16]은 metallo- $\beta$ -lactamase 유전자인 *bla<sub>IMP</sub>*가 다른 2개의 gene cassette와 함께 integron에 있고, 5'

Table 1. Class 1 integron gene cassettes

Antimicrobial agents	Gene cassettes
$\beta$ -lactams	<i>blaP1, blaP2, blaP3, blaIMP, blaESP, blaVEB-1, oxa1, oxa2a, oxa2b, oxa3, oxa5, oxa7, oxa9, oxa10, oxa15, oxa19, oxa20, oxa21</i>
Aminoglycosides	<i>aadA1a, aadA1b, aadA2, aadB, aac(6')-Ia, aac(6')-Ib, aac(6')-Id, aac(6')-Il, aac(6')-Iq, aacA7, aac(6')-IIa, aac(6')-IIb, aac(3)-Ia, aac(3)-Ib, aac(3)-VIa</i>
Trimethoprim	<i>dfrA5, dfrA7, dfrA12, dfrA14, dfrB1, dfrB2, dfrB3</i>
Chloramphenicol	<i>catB2, catB3, catB5, catB6, cmlA, cmlA2, cmlB</i>
Quarternary compounds	<i>qacE, qacF, qacG</i>
Rifampin	<i>arr-2</i>
Erythromycin	<i>ereA</i>
Unidentified ORFs	<i>orfA, orfC, orfD, orfE, orfF, orfN</i>

CS에 있는 *intI* 유전자는 *intI1*의 염기서열과 59.6%가 동일하여(3), 이를 class 3 integron이라고 하였다.

### Integron의 기원

Integron이 발견은 몇가지 내성 유전자의 DNA 염기서열 분석 시에 상류역에서 동일한 서열이 관찰됨으로서 1980년대 중반에 이루어졌다(17). 그러나 integron이 출현한 것은 항균제 내성 유전자가 생기기 전인 것으로 추정되며(5). 초기의 integron은 G + C 비율이 높은 세균에서 유래되었다고 생각된다. 유전자가 들어 있지 않은 'empty' integron이 plasmid pVS1에서 관찰되었는데, 이 plasmid에는 59 be가 없으므로, 59 be는 gene cassette와 관계된 것임을 알 수 있다(Fig. 3). 그러나 내성유전자가 어떻게 59 be와 관계되고, 어떻게 integron 속으로 들어 갔는 지는 알 수 없다. Gene cassette의 기원에 대해서도 확실히 알려져 있지 않으나(10), 가장 먼저 integron에 들어간 cassette는 소독제에 대한 내성 유전자인 *qacE*로 추정된다. 대부분의 integron에는 sulfonamide 내성 유전자의 삽입으로 인해 절단 (truncate)된 *qacE* 유전자가 있다. 즉, 대부분의 integron은 defective transposon의 형태를 취하고 있다. *qacE* cassette는 1920년대 acridine orange가 치료제로 사용되었을 때 생겼고, sulfonamide 내성 유전자는 1930년대에 삽입되었을 것으로 추정된다. 반대로 integrase 유전자와 transposition 유전자는 아주 오래 동안에 걸쳐서 진화된 것으로 생각된다(5). Integron이나 gene cassette의 기원은 아직 확실하지 않지만, 계속 진화하고 있다. 즉, 대부분의 integron이 오래된 항균제에 대한 내성 유전자를 갖고 있지만, 최근에는 새로운 항균제에 대한 내성 유전자를 가진 gene cassette가 보고되고 있다(11-14).

### Integron의 분포

Integron은 최근 임상 검체에서 분리되는 *Enterobacteriaceae*와 *Pseudomonas* 균종에 흔한 것으로 알려져 있다(18). 최근 유럽에서 분리된 그람음성 세균 중의 43-50%에 integron이 있으며, 이들 균주는 integron 음성 균주보다 내성인 것이 많았다(19, 20). 또한 *Enterobacteriaceae*의 일부 균주 중에는 한 세균에 여러 개의 integron이 있을 수 있고(21), Tonsini 등(22)은 다제 내성인 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium에서 3종류의 class 1 integron이 2개의 plasmid에 있음을 보고 하였다. Integron 중에 들어 있는 내성 유전자는 aminoglycoside에 대한 것이 많으며, *ant(3'')-Ia* 유전자가 transposon Tn21이나 Tn7의 integron In2에 있는 경우가 많다고 하였다(4).

*Acinetobacter baumannii* 중에는 여러 항균제에 내성인 균주가 많고, 근래 중요한 원내감염균으로 알려져 있다. Seward와 Towner(15)는 세계 여러 나라의 원내 감염 환자에서 분리된 *A. baumannii* 25주 중 17주에서 class 1 integron이, 1주에서는 class 2 integron이 있었으나, class 3 integron은 검출하지 못했으며, 이들 integron은 모두 염색체에 있었고, aminoglycoside 내성 유전자가 흔하였다고 하였다.

제3세대 cephalosporin제와 monobactam은 그람음성 간균에 대한 항균력이 우수하여 이 세균 감염증 치료에 유용한 항균제이었다. 그러나 이들 항균제를 분해하는 효소인 extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)을 생성하는 세균이 1980년 초반에 보고된 이후 현재는 우리나라를 포함한 세계 여러나라에서 매우 흔해졌다(23, 24). 또한 근래에는 TEM과 SHV형 이외의 새로운 형의  $\beta$ -lactamase가 많이 보고되었고, *Klebsiella* spp.와 *Escherichia coli* 이외의 그람음성 간균에도 증가하고 있음이 보고되고 있어 심각한 문제가 되고 있다(23, 25). 1999년 전까지는 ESBL 유전자가 integron에 있음이 보고된 바 없었는데, 최근 VEB-1과 GES-1 유전자가 integron에 있음이 보고되어(11, 12), 이러한 내성 유전자가 확산될 것이 염려된다. 또한 AmpC  $\beta$ -

lactamase 유전자인 DHA-1도 *S. enterica* serovar Enteritidis의 integron에 있음이 처음 보고되었다[26].

Carbapenem은 여러 가지  $\beta$ -lactamase에 안정하여 다제 내성인 그람 음성 간균에 대해 강한 항균력을 갖고 있다. 그러나 carbapenem을 분해하는 metallo- $\beta$ -lactamase의 유전자가 근래 integron에 있음이 보고되어 이러한 내성 유전자가 다른 지역이나 균종으로 확산될 것을 우려하고 있다. IMP-1 carbapenemase 유전자는 일본에서 분리한 *Serratia marcescens* 균주의 염색체에서 처음 관찰되었고[27], 그 유전자 상류의 염기서열이 integron의 보존서열과 같았고, *K. pneumoniae*의 plasmid인 RDK4에서 관찰된 integron의 바로 하류에서는 IMP-1 유전자가 관찰되었다[5]. 일본에서 분리된 또 다른 *S. marcescens* 균주의 plasmid에 IMP-1 유전자가 있고, 그 구조의 상류에는 또 다른 integrase 유전자가 있었는데, 그것은 pVS1 integrase (60% 상동)와 Tn7 integrase (45% 상동)와 비슷하였고, IMP-1 cassette의 말단에는 *aacA4* cassette가 있다. 따라서 이들은 class 3 integron으로 추정하였다[5, 15]. 최근 이태리에서 IMP-2 유전자를 가진 integron이 *A. baumannii*에 있음이, 일본에서는 IMP-3 유전자가 들어 있는 integron이 *Shigella flexneri*에 있음이 각각 보고되었다 [28, 29]. 또한 새로운 carbapenemase 유전자인 *bla*<sub>VIM-1</sub>이 이태리 환자에서 분리한 *P. aeruginosa* 염색체의 integron에 있고[13], 이와 유사한 VIM-2 유전자가 들어 있는 integron (In56)이 프랑스 분리주의 plasmid에 있음이 보고되었다[14]. 저자들은 우리나라에서도 최근 carbapenem 내성인 *P. aeruginosa*가 증가하고 있음을 보고한 바 있고[1, 30], 국내에서 분리된 carbapenem 내성인 *Pseudomonas*와 *A. baumannii* 균종 중에 integron에 들어있는 VIM-2 유전자가 적지 않음을 경험하였다[31].

Integron은 그람 음성 간균 이외에 그람 양성 세균, 즉 *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium glutamicum* 등에도 있고[32, 33], 소, 돼지, 조류 등에서 분리된 그람 음성 세균에도 aminoglycoside 등의 내성 유전자가 class 1 integron에 들어 있음이 보고되었다 [34, 35].

## 요 약

Integron은 그람 음성 세균에 흔하고, 여러 가지 항균제에 대한 내성 유전자를 가지며 이동성이 있어서, 다제 내성 세균의 출현 및 증가에 중요한 역할을 할 것이며, 항균제의 선택 압력에 의해 내성 유전자를 가진 cassette의 위치가 integron 내에서 이동할 수 있어 내성 발현의 변화를 초래할 수 있다. 따라서 내성 문제가 심각한 우리 나라에서는 이에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. Lee K, Chang CL, Lee NY, Kim HS, Hong KS, Cho HC. Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance of bacteria in 1998. *Yonsei Med J* 2000;41:497-506.
2. 정윤섭, 이경원. 병원균의 항균제 내성과 기전, 서울, 서흥출판사, 1997
3. Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann NY Academy Sci* 1999;870:68-80.
4. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:185-91.
5. Roy PH. Integrons: novel mobile genetic elements mediating antibiotic resistance in enterobacteria and *Pseudomonas*. *APUA Newsletter* 1995;13(Fall):1-6
6. Bissonnette L, Roy PH. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J bacteriol* 1992;174:1248-57.
7. Stokes HW, Hall RM. Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation. *Plasmid* 1991;26:10-9.
8. Laraki N, Galleni M, Tham I, Riccio ML, Amicosante G, Frere J, et al. Structure of In31, a *bla*<sub>IMP</sub>-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:890-901.
9. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of the integron. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:155-62
10. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integron, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:761-70.
11. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by and *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:573-81.
12. Poirel L, Thomas IL, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analysis of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class

- 1 integron In52 from Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:622-32
13. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. *Cloning and characterization of bla<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584-90.
  14. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD. *Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in France. Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:891-97.
  15. Seward RJ, Towner KJ. *Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of Acinetobacter spp. Clin Microbiol Infect* 1999;5:308-18.
  16. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, et al. *A novel integron-like element carrying the metallo-β-lactamase gene bla<sub>IMP</sub>. Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1612-15.
  17. Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP, Hall RM. *Nucleotide sequence of the AAD(2") aminoglycoside adenylyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388. Nucleic Acids Res* 1986;14:8625-35.
  18. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. *Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1568-74.
  19. Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J. *Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. Lancet* 1997;349:1742-3.
  20. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VSC, Verhoef J, Jones ME. *Class I integrons in gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. J Antimicrob Chemother* 1998;42:689-96.
  21. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. *Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. Microb Drug Resistance* 1995;1:195-202.
  22. Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, et al. *Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M Plasmids in Salmonella enterica serotype Typhimurium. Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3053-58.
  23. Medeiros AA. *Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generation of β-lactam antibiotics. Clin Infect Dis* 1997;24 (Suppl):19-45.
  24. 용동은, 임종백, 이경원, 김선주, 정석훈, 장철훈 등. *ESBL 생성 세균의 국내 발생 빈도. 대한화학요법학회지* 2000;15:267.
  25. Nordmann P, Guibert M. *Extended-spectrum β-lactamases in Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother* 1998;42:128-31.
  26. Verdet C, Arlet G, Barnaud G, Lagrange PH, Philippon. *A novel integron in Salmonella enterica serovar Enteritidis, carrying the bla<sub>DHA-1</sub> gene and its regulator gene ampR, originated from Morganella morganii. Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:222-5.
  27. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. *Molecular characterization of an enterobacterial metallo β-lactamase found in a clinical isolate of Serratia marcescens that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:71-8.
  28. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. *Characterization of the metallo-β-lactamase determinant of Acinetobacter baumannii AC-54/97 reveals the existence of bla<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassette of different phylogeny. Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1229-35.
  29. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, Matsumura N, Minami S, Haruta S, et al. *Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2023-7.
  30. Lee K, Chong Y, Shin HB, Yong D. *Rapid increase of imipenem hydrolyzing Pseudomonas aeruginosa in a Korean hospital. 101-E, E85, p195, abstract, 38th ICAAC, 1998*
  31. Lee K, Lim JB, Yum J, Yong D, Choi JR, Chong Y, et al. *Emergence of VIM metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas and Acinetobacter in Korea. 2000, 40th ICAAC*
  32. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. *Distribution of the antiseptic-resistance gene qacEΔ1 in gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Letters* 1998;165:295-9.
  33. Nesvera J, Hochmannova J, Patek M. *An integron class 1 present on the plasmid pCG4 from gram-positive*

- bacterium Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Letters* 1998;169:391-5.
34. Sandvang D, Aarestrup FM. *Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance* 2000;6:19-27.
35. Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, et al. *Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2925-9.