

## 암피실린/설박탐에 내성을 갖는 대장균과 포도상구균에 대한 베타-락타메이즈 억제제 CH2150과 설박탐의 항균효과 비교

박수현<sup>#</sup> · 김홍진 · 김기호

중앙대학교 약학대학

(Received November 4, 1996)

### Comparative Activities of CH2150 and Sulbactam as $\beta$ -Lactamase Inhibitors Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus* *Aureus* Resistant to Ampicillin/Sulbactam

Su-Hyun Park<sup>#</sup>, Hong-Jin Kim and Ki-Ho Kim

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract**—To overcome the problems of the resistance to clavulanic acid, many researchers are developing novel inhibitors that are not sensitive to new mutant  $\beta$ -lactamases. In order to evaluate newly synthesized compound CH2150 (Sodium (3S,5R)-6(Z)-[1-{1-(2-(2-benzoxazolyl)thioethyl)-1,2,3-triazol-4-yl}methylene] penicillanate-1,1-dioxide) as a  $\beta$ -lactamase inhibitor, we examined inhibitory activity of CH2150 against  $\beta$ -lactamases of clinical isolates resistant to ampicillin/sulbactam (12 strains of *Escherichia coli* and 13 strains of *Staphylococcus aureus*), and compared with that of sulbactam. Nitrocefin was used as substrate for  $\beta$ -lactamases, and the increase of absorbance was measured spectrophotometrically at 482 nm.  $\beta$ -Lactamase inhibition of CH2150 against  $\beta$ -lactamases was 73~96% in *E. coli* and 76~79% in *S. aureus*. Comparatively, that of sulbactam was 96~100% and 96~100%, respectively. The inhibitory activity of CH2150 was slightly lower than that of sulbactam. The MIC values of ampicillin combined with CH2150 (2:1) for the clinical isolates were 4~512  $\mu\text{g/ml}$  for *E. coli* and 1.0~64  $\mu\text{g/ml}$  for *S. aureus*, whereas 0.5~16  $\mu\text{g/ml}$  for *E. coli* and 0.25~8  $\mu\text{g/ml}$  for *S. aureus* when combined with sulbactam (2:1).

**Keywords** □ CH2150, sulbactam,  $\beta$ -lactamase, *E. coli*, *S. aureus*.

Penicillin, cephalosporin 등의  $\beta$ -lactam 항생제의 발견은 세균에 의한 감염성 질환과 그로 인한 사망률을 줄이는 데 크게 공헌을 했지만 잇달아 나타나는 내성균들 때문에 새로운 항생제의 개발이 요구되고 있다. 1946년 Hammersmith Hospital에서 분리한 황색포도상구균은 benzylpenicillin 내성균이 14%에 불과했지만 1947년에 38%, 1948년에는 59%, 1961년에는 80%로 나타났고 대장균도 1986년에 채취된 병원 임상균주의 30~50%가 이미 내성균으로서 전파속도가 빠르고 전파 범위가 넓다.<sup>1)</sup>

세균이  $\beta$ -lactam 항생제에 감수성을 갖는가 하는 문제는 다음 두 가지 요인에 의해 결정된다: 첫째는 개개 세균이 가지고 있는 본태적 내성이고, 둘째는  $\beta$ -lactam 항생제의  $\beta$ -lactam 결합을 가수분해하는  $\beta$ -lactamase의 생성인데, 특히 후자는 내성문제의 일반적인 원인이 된다.  $\beta$ -lactamase에는 AmpC와 같은 chromosome 매개성  $\beta$ -lactamase와 TEM-1, SHV-1, PSH-1 등의 plasmid 매개성  $\beta$ -lactamase가 있는데 plasmid에 의한  $\beta$ -lactamase는  $\beta$ -lactam 항생제의 무분별한 사용과 더불어 내성균주의 선별적인 증식과 내성의 빠른 전파를 초래했다.<sup>2)</sup> 내성의 문제를 극복하기 위한 방법으로는 크게 두 가지가 있는데 하나는  $\beta$ -lactamase에 분해되지 않는 새로운  $\beta$ -lactam 항생제

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5596 (팩스) 02-816-7338

를 개발하는 것이고 다른 하나는  $\beta$ -lactamase를 불활성화시키는 저해제를 동시에 투여하는 것이다.

첫 번째 방법의 일환으로서 광범위 cephalosporin, monobactam, carbapenem 등과 같은 강력한 반합성  $\beta$ -lactam 항생제들이 개발되었고, 두 번째 방법으로서 clavulanic acid, sulbactam, tazobactam 같은  $\beta$ -lactamase 저해제들이 개발되었다. 그러나 1983년에 plasmid에 의한 광범위  $\beta$ -lactamase가 출현하면서 광범위 cephalosporin이나 monobactam에 내성을 보이는 균주가 등장하기 시작했고<sup>3)</sup>, 1987년에는  $\beta$ -lactam 항생제와  $\beta$ -lactamase 저해제 병용투여에 대해서도 내성이 처음으로 보고되었다.<sup>4)</sup> *Nocardia brasiliensis*를 amoxicillin/clavulanic acid로 치료하던 중, 균이 이에 대한 내성을 획득하였다고 알려진 것을 필두로<sup>5)</sup>, Enterobacteriaceae에 속하는 균주의  $\beta$ -lactamase 저해제에 대한 내성의 원인이 TEM형  $\beta$ -lactamase의 sequence가 변화하여 생성된 변이  $\beta$ -lactamase임이 실험적으로 증명되었고<sup>6)</sup>, 1991년에는 실제로 임상 대장균주에서 clavulanic acid에 대해 내성을 갖는 TEM형 변이  $\beta$ -lactamase가 처음으로 발견되었다.<sup>7)</sup> 변이  $\beta$ -lactamase는 TRI-1, TRI-2로 명명되었다가 후에 TEM-1, TEM-2로 재명명되면서 유전적 특성들이 연구되었고, 이후에 임상 대장균주들에서  $\beta$ -lactamase 저해제에 내성인 TEM-1  $\beta$ -lactamase들이 계속 보고되었다.<sup>8-9)</sup> 또한 *Klebsiella* 등의 균주에서도  $\beta$ -lactamase 저해제에 내성인  $\beta$ -lactamase를 발견하였고, 그 유전정보를 밝혀 그 sequence와 효소활성과의 관계등을 확립하려는 노력이 이루어졌다.<sup>10-11)</sup> 이 과정 중  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase 저해제에 대한 내성의 기전으로서 초기에 제시되었던 multicopy plasmid에 의한 미변형  $\beta$ -lactamase의 과잉생산, 세포외막 단백질의 변형으로 인한  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase 저해제약물의 세포내 유입 억제 등과 더불어  $\beta$ -lactamase 억제제에 감수성을 가지지 않은 변이  $\beta$ -lactamase의 생성이 하나의 중요한 기전임이 증명되었다.<sup>13-14)</sup>

기존의  $\beta$ -lactamase 저해제에 내성을 갖는  $\beta$ -lactamase에 대해서도 억제효과가 좋은 저해제의 개발이 시도되었는데, clavulanic acid의 뒤를 이어서 sulbactam과 tazobactam이 사용되었다.<sup>15-18)</sup> 그러나 sulbactam과 tazobactam 역시 또 다른 내성  $\beta$ -lactamase의 출현함으로 인해 완전한 저해제가 되지 못하고 있다. 본 연구팀은 이러한 내성  $\beta$ -lactamase를 효율

적으로 억제하는 저해제를 찾기 위해 새로운 합성물인 CH2150의  $\beta$ -lactamase 억제력을 검토하였다. 이 신물질의  $\beta$ -lactamase 억제력이 내성  $\beta$ -lactamase에 특이성을 갖는지 고려하기 위해 ampicillin/sulbactam에 의해 증식이 억제되지 않는 임상 대장균과 포도상구균 및 그 균주로부터 추출한  $\beta$ -lactamase를 대상으로  $\beta$ -lactamase 억제력을 sulbactam과 비교 고찰하였다.

## 실험방법

**실험균주** - 종합병원 한국병원(서울 종로구)으로부터 1996년 1월과 3월에 수집된 것으로 Disk 확산법에 의해 sulbactam과 ampicillin의 1:2 혼합제제인 Unasyn<sup>®</sup>(Pfeizer)에 대한 내성을 가진 것을 선별하였다. 균종은 대장균 12균주, 황색포도상구균 13균주이며 그 채집원은 pus(9균주), urine(13균주), vaginal(2균주), throat scrub(1균주), ascitic fluid(1균주)였다.

**배지** - MIC(Minimal Inhibitory Concentration) test를 위해서는 Mueller-Hinton broth(Difco)와 Mueller-Hinton agar(Difco)를 사용하였고 enzyme solution을 위한 생육배지로는 Tryptic soy broth(Difco)를 사용하였다. Nitrocefin assay<sup>19)</sup> Chromogenic cephalosporin인 nitrocefin은  $\beta$ -lactam ring이 가수분해 될 때 노란색에서 빨간색으로 변색되기 때문에 실험균주가  $\beta$ -lactamase를 가지고 있는지를 확인하기 위해 nitrocefin assay를 실시하였다. Nitrocefin 10 mg을 DMSO 1 ml에 녹여 차광하여 냉장고에 보관하다가 사용시에 500  $\mu$ g/ml로 희석한 후, 이 용액 0.1 ml에 agar plate에서 18~20시간 배양한 실험 균주의 colony 몇 개를 넣고 색 변화를 관찰하였다. Negative control로서  $\beta$ -lactamase 비생산 균주를 사용하였다.

**Isoelectrofocusing<sup>20-23)</sup>** - Nitrocefin assay에 의해  $\beta$ -lactamase를 생산하는 것으로 확인된 균주를 tryptic soy broth 10 ml에 배양하고 대수성장 시기에 3000 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 pellet을 sonication 한 후, 25000 g에서 60분간 원심분리하여 cell-free lysate를 얻었다. Acrylamide/bisacrylamide 용액, ampholyte solution 혼합액에 ammonium persulfate와 TEMED를 넣어 만든 gel solution을 gel plate안에 넣고 굳힌 후, inner cooling core에 gel을 붙이고 isoelectrofocusing tank안에 넣었다. Glycerol

및 ampholyte solution으로 만든 sample loading buffer에 crude sonic extract를 동량 넣어 섞고 Eppendorf centrifuge로 10,000 g에서 5분 동안 회전시켜 뭉쳐 있는 protein을 제거한 후 well 바닥에 sample 15  $\mu$ 씩을 Hamilton syringe로 넣었다. Upper chamber는 20 mM 수산화나트륨용액, lower chamber에는 10 mM 인산용액으로 하여 90분동안 200V, 90분동안 400V로 전기영동 시켰다.<sup>32)</sup> 관독시는 gel 조각을 10 mM KCl 용액에 담군 후 pH를 읽고 gel은 100  $\mu$ g/ml nitrocefin용액에 담구어 발색시킨다.

**Spectrophotometer**<sup>12,19)</sup> - Crude sonic extract 0.3 ml에 nitrocefin 용액을 최종 농도가 100  $\mu$ g/ml가 되도록 가하여 482 nm에서 흡광도를 연속 측정(A<sub>0</sub>)하였고  $\beta$ -lactamase 억제제로서 CH2150과 sulbactam을 preincubation을 시킨 후 측정(A<sub>1</sub>)하여 저해제의  $\beta$ -lactamase inhibition을 다음과 같이 계산하였다.

$$\beta\text{-lactamase inhibition (\%)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0} \times 100$$

단 spectrophotometer는 nitrocefin assay에 의해  $\beta$ -lactamase가 있음이 확인되고 Unasyn<sup>®</sup>에 대한 MIC값이 0.375  $\mu$ g/ml가 넘는 균주에 한하여 실시하였다.

**MIC test** - 최소 억제 농도(MIC) 측정을 하기 위해서 agar plate에서 colony를 채취하여 Mueller-Hinton broth 10 ml에 넣고 하룻밤 배양시킨 균주를  $1 \times 10^5$  cfu로 희석하고, 항생제 용액은 인산완충액 (pH 7)에 용해시킨 후 여과 멸균하여 조제한다. 96 well plate에 희석한 균주를 100  $\mu$ 씩을 넣고 항생제 용액을 2배 연속 희석방식으로 넣어서 18~20시간 배양시킨 후 균의 성장하지 않은 최소 농도를 MIC로 하였다. 항생제 용액은 sulbactam과 CH2150 각 저해제를 ampicillin과 1:2 용액으로 병용하였다. 단 nitrocefin assay에 의해  $\beta$ -lactamase가 확인된 균주에 한하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

Nitrocefin assay는 가장 간편한 방법으로  $\beta$ -lac-

**Table I**— MIC value of the clinical isolates and isoelectric point of their  $\beta$ -lactamases

No.	Species	Source	MIC( $\mu$ g/ml) <sup>1)</sup> of Unasyn <sup>®</sup>	Presence of $\beta$ -Lactamase	pI <sup>2)</sup> of $\beta$ -Lactamase
1	<i>E. coli</i>	pus	3	+	5.2
2	<i>E. coli</i>	urine	6	+	5.2
3	<i>E. coli</i>	vaginal	12	+	5.4
4	<i>E. coli</i>	urine	3	+	5.2
5	<i>E. coli</i>	throat scrab	3	+	9
6	<i>E. coli</i>	urine	$\leq 24$	+	5.2
7	<i>E. coli</i>	pus	6	+	5.4
8	<i>E. coli</i>	ascitic fluid	0.75	+	10
9	<i>E. coli</i>	urine	12	+	5.2
10	<i>E. coli</i>	urine	12	+	5.2
11	<i>E. coli</i>	vaginal	$\leq 12$	+	10
12	<i>E. coli</i>	urine	12	+	5.2
13	<i>S. aureus</i>	pus	$\leq 0.375$	+	ND <sup>3)</sup>
14	<i>S. aureus</i>	pus	3	+	ND
15	<i>S. aureus</i>	pus	0.375	-	ND
16	<i>S. aureus</i>	urine	0.375	-	ND
17	<i>S. aureus</i>	urine	0.188	+	ND
18	<i>S. aureus</i>	pus	3	-	5.2
19	<i>S. aureus</i>	urine	1.5	-	ND
20	<i>S. aureus</i>	urine	0.375	-	ND
21	<i>S. aureus</i>	urine	<0.047	+	ND
22	<i>S. aureus</i>	pus	0.75	-	10, 5.2
23	<i>S. aureus</i>	vaginal	3	-	ND
24	<i>S. aureus</i>	urine	0.094	+	ND
25	<i>S. aureus</i>	urine	12	-	5.2

<sup>1)</sup> MIC=Minimal Inhibitory Condentration

<sup>2)</sup> pI= Isoelectric Point

<sup>3)</sup> ND=Not Done

Table II— $\beta$ -Lactamase inhibition by sulbactam and CH2150

No.	Species	$\Delta A_0^{1)}$	$\Delta A_s^{2)}$	Inhibition(%) by sulbactam	$\Delta A_c^{3)}$	Inhibition(%) by CH2150
1	<i>E. coli</i>	0.2944	0.0008	99.83	0.0140	95.24
2	<i>E. coli</i>	0.5227	0.0033	99.37	0.0276	94.72
3	<i>E. coli</i>	0.0994	0.0000	100.00	0.0216	78.27
4	<i>E. coli</i>	0.0415	0.0000	100.00	0.0180	95.52
5	<i>E. coli</i>	0.1138	0.0000	100.00	0.0098	91.39
6	<i>E. coli</i>	0.4116	0.0000	100.00	0.0316	92.32
7	<i>E. coli</i>	0.5668	0.0054	99.05	0.0394	93.05
8	<i>E. coli</i>	0.0524	0.0000	100.00	0.0070	86.64
9	<i>E. coli</i>	0.4197	0.0148	96.47	0.0662	84.23
10	<i>E. coli</i>	0.5604	0.0070	98.75	0.0756	86.51
11	<i>E. coli</i>	0.2456	0.0084	96.58	0.0658	73.21
12	<i>E. coli</i>	0.5139	0.0046	99.10	0.0416	91.91
14	<i>S. aureus</i>	ND <sup>4)</sup>	ND	ND	ND	ND
18	<i>S. aureus</i>	0.0596	0.0000	100.00	0.0124	79.19
22	<i>S. aureus</i>	0.1913	0.0063	96.71	0.0574	69.99
25	<i>S. aureus</i>	0.0817	0.0029	96.45	0.0196	76.01

<sup>1)</sup>  $\Delta A_0 = \Delta \dot{A}$ /time when inhibitor does not exist

<sup>2)</sup>  $\Delta A_s = \Delta \dot{A}$ /time when sulbactam exists as inhibitor

<sup>3)</sup>  $\Delta A_c = \Delta \dot{A}$ /time when CH2150 exists as inhibitor

<sup>4)</sup> ND = not done

tamase의 유무를 확인할 수 있는 시험이다. 25개 임상 균주에 대해 실시한 결과 12개 대장균 모두와 6개의 황색포도상구균이  $\beta$ -lactamase를 생산하고 있었다. 대장균이 대부분  $\beta$ -lactamase를 생산하는 것은 그람 양성균 보다는 그람 음성균이 plasmid에 의한  $\beta$ -lactamase의 전달이 용이하기 때문인 것으로 보이며 황색포도상구균은  $\beta$ -lactamase를 생산하지는 않더라도 PBP(penicillin binding protein)의 변화 등에 의하여 내성을 나타낼 수 있으리라 생각된다.  $\beta$ -Lactamase를 생산하는 균주들의  $\beta$ -lactamase의 분포양상을 보기 위해서 isoelectrofocusing을 실시하였다. 대장균과 황색포도상구균 두가지 균에서  $\beta$ -lactamase의 등전점이 5가지로 나타났다. 대장균은 5.2(6균주), 5.4(2균주), 9(1균주), 10(1균주)이었고, 황색포도상구균은 5.2(2균주), 10과 5.2(1균주)로 나타났다(Table I). 이 결과로 볼 때 이들  $\beta$ -lactamase는 균주에 관계없이 여러 가지의  $\beta$ -lactamase가 고르게 분포하고 있음을 알 수 있고, 특히 한 황색포도상구균에는 두가지의  $\beta$ -lactamase를 동시에 생산하고 있어  $\beta$ -lactamase의 전달이 많이 일어났음을 확인할 수 있었다.

$\beta$ -Lactamase가 저해제에 의해서 얼마나 억제되는지를 알기 위해 추출한 enzyme solution을 nitrocefin을 기질로 하여 흡광도측정법으로 enzymatic assay를 실시하였다. Enzymatic assay는 cell free system으로 실험하므로 효과를 빨리 볼 수 있다는 장점이 있어 스크

리닝에 있어 많이 이용되는 방법이다. Nitrocefin이 가수분해되어 482 nm에서 흡광도를 증가시키는데 CH2150이나 sulbactam 등의 저해제에 의해 분해가 억제된다. 이 억제 정도를 %로 나타낸 결과, CH2150이 대장균에서 73.2~95.5%, 황색포도상구균에서 70.0~79.2%로서 각각 96.5~100.0%, 96.5~100.0%의 억제 효과를 보인 sulbactam에 비해 조금 낮은 수치였다(Table II). 이 실험 결과로 CH2150의 활성이 sulbactam의 활성에 비해 그다지 좋지 않음을 알 수 있었으나 약물의 내성 정도가  $\beta$ -lactamase 활성 단독요인에 의해 결정되는 것은 아니므로 MIC test를 하여 비교 검토하였다. CH2150과 ampicillin을 1:2 비율로 병용했을 때 MIC값은 ampicillin의 농도로 대장균에서 4~512  $\mu$ g/ml, 황색포도상구균에서 1.0~64  $\mu$ g/ml였다(Table III). 한편, CH2150 대신 같은 조건으로 sulbactam을 병용했을 때에는 각각 0.5~16  $\mu$ g/ml, 0.25~8  $\mu$ g/ml였다(Table III). Sulbactam 병용시보다 CH2150 병용시 MIC값이 적게는 4배, 많게는 32배 높게 나타나, CH2150은 sulbactam의 대체약물로는 부적합하다고 판명되었다. 그러나 MIC 효과가 enzymatic assay상의  $\beta$ -lactamase의 저해정도와 큰 상관관계가 없어 CH2150 약물의 작용지점 내 유입정도라든가 안정성등의 다른 요인들이 작용하는 것으로 보인다.

$\beta$ -Lactamase 저해제의 개발이 내성이 많이 전파된 기존의 저해제에 대한 대체 약물에 주안이 있는 만큼,

**Table III**—MIC value of CH2150 and sulbactam when combined with ampicillin<sup>1)</sup>

No.	Species	MIC <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		with sulbactam	with CH2150
1	<i>E. coli</i>	2	64
2	<i>E. coli</i>	4	128
3	<i>E. coli</i>	8	256
4	<i>E. coli</i>	2	64
5	<i>E. coli</i>	2	32
6	<i>E. coli</i>	$\leq 16$	256
7	<i>E. coli</i>	4	64
8	<i>E. coli</i>	0.5	4
9	<i>E. coli</i>	8	256
10	<i>E. coli</i>	8	256
11	<i>E. coli</i>	$\leq 8$	256
12	<i>E. coli</i>	8	512
13	<i>S. aureus</i>	$\leq 0.25$	1.0
14	<i>S. aureus</i>	2	32
15	<i>S. aureus</i>	0.25	2
18	<i>S. aureus</i>	2	64
22	<i>S. aureus</i>	0.5	2
25	<i>S. aureus</i>	8	64

<sup>1)</sup> Combination ratio is inhibitor 1 : ampicillin 2

<sup>2)</sup> MICs are expressed as ampicillin concentration.

앞으로 개발되는 새로운 저해제들에 대한 스크리닝에 있어 본 연구처럼 저해제에 내성인 균주들을 대상으로 약물 검색을 해 나간다면 내성균에 효과적인 약물을 더 빨리 찾을 수 있을 것이다.

## 결 론

$\beta$ -Lactam 항생제에 내성을 갖는 균주들이 늘어나면서 이를 극복하기 위해  $\beta$ -lactamase 억제제를 동시에 투여하였으나 억제제의 spectrum의 한계와 내성을 갖는 변이  $\beta$ -lactamase의 등장으로 새로운 억제제의 개발이 요구되고 있다. 본 연구에서는 신물질 CH2150(Sodium (3S,5R)-6(Z)-[1-{1-(2-{2-benzoxazolyl}thioethyl)-1,2,3-triazol-4-yl}methylene] penicillanate-1,1-dioxide)를 대장균과 황색포도상구균의 임상균주와 이 세균에서 추출한  $\beta$ -lactamase를 대상으로  $\beta$ -lactamase에 대한 억제능력과 최소억제농도를 측정하여 sulbactam과 비교하였다.

Nitrocefin을 기질로 하여 흡광도를 측정한 CH2150의  $\beta$ -lactamase 억제효과는 대장균에서 73.2~95.5%, 황색포도상구균에서 70.0~79.2%로 나타났는데, 이는 각각 96.5~100.0%, 96.5~100.0%의 억제효과를 보인 sulbactam에 비해 조금 낮았다. 두배희석법으로 실시한 최소억제농도시험에서도 ampicillin과 1:

2 병용시 대장균에서 4~512  $\mu\text{g/ml}$ , 황색포도상구균에서 1.0~64  $\mu\text{g/ml}$ (ampicillin의 농도로 표시)였으며, 같은 조건으로 sulbactam을 병용한 경우 얻어진 각각 0.5~16  $\mu\text{g/ml}$ , 0.25~8  $\mu\text{g/ml}$ 의 최소억제농도에 비해 효과가 훨씬 낮게 나타났다.

## 문 헌

- Phillipon, A., Paul, G. and Nevot, P. : Mécanisme de résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines. *Press Med.* **46**, 2290 (1986).
- Jacoby, G. A. and Archer, G. L. : New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New Eng. J. of Med.* **324**, 9, 601 (1991).
- Konthe, H., Shah, P., Kremery, V., Antal, M. and Mitsuhashi, S. : Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**, 315 (1983).
- Martinez, J. L., Cercenado, E., Rodriguez-Creixems, M., Vicente-Perez, M. F., Delgado-Iribarren, A. and Baquero, F. : Resistance to beta-lactam/clavulanate. *Lancet* **2**, 1473 (1987).
- Steungrube, V. A., Wallace, R., Brown, B. A., Pang, Y., Zeluff, B., Steele, L. C. and Zhang, Y. : Acquired resistance of *Norcardia brasiliensis* to clavulanic acid related to a change in  $\beta$ -lactamase following therapy with amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **35**, 524 (1991).
- Manavathu, E. K., Lerner, S. A., and Mobashery, S. : Effect of amino acid substitution at position 241 of TEM-1  $\beta$ -lactamase on inactivation by  $\beta$ -lactamase inactivators. *Abstr. 31st Intersci. Conf. Antimicrob. Ag. Chemother.* **16** (1991).
- Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Vedel, G., Nevot, P., Krishnamoorthy, R. and Paul, G. : Modifications structurales spontanées de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 entraînant la perte de la synergie entre les  $\beta$ -lactamines et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. *Abstr. 11th Interdisc. Meet. Antimicrob. Chemother.* 25/C3 (1991).
- Lemozy, J., Sirot, D., Chanal, C., Huc, C., Labia,

- R., Dabernat, H. and Sirot, J. : First characterization of inhibitor-resistant TEM(IRT)  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **33**, 2580 (1995).
- 9) Xiang, Y., Bordon, F., Sirot, D., Kitzis, M. D. and Gutman, L. : Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1  $\beta$ -lactamases conferring resistance to  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **38**, 1085 (1994).
  - 10) Thomson, C. J. and Amyes, S. J. B. : TRC-1 : Emergence of a clavulanic acid-resistant TEM  $\beta$ -lactamase in a clinical strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 113 (1992).
  - 11) Vedel, G., Belaouaj, A., Gilly, L., Labia, R., Philippon, A. and Nevot, P. : Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI  $\beta$ -lactamase inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**, 449 (1992).
  - 12) Henquell, C., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R. and Sirot, J. : Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor resistant TEM  $\beta$ -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*, *Amer. soc. Microbiol.* **39**, 427 (1995).
  - 13) Blazquez, J., Baquero, M., Cantan, R., Alos, I. and Baquero, F. : Characterization of a new TEM  $\beta$ -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **37**, 2059 (1993).
  - 14) Mabilat C. and Courvalin, P. : Development of "Oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **34**, 2210 (1990).
  - 15) Retsema, J. A., English, A. R., Girard, A., Lynch, J. E., Anderson, M., Brennan, L., Cimochowski, C., Haiella, J., Norcia, W. and Sawyer, P. : Sulbactam/ampicillin: *in vitro* spectrum, potency, and activity in models of acute infection, *Rev. Infect. Dis.* **8**, S528 (1986).
  - 16) Kuck, N. A., Jacobus, N. V., Petersen, P. J., Weiss, W. J. and Testa, R. T. : Comparative *in vitro* and *in vivo* activities of piperacillin combined with the  $\beta$ -lactamase inhibitors tazobactam, clavulanic acid, and sulbactam, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **33**, 1964 (1989).
  - 17) Jacobs, M. R., Arnoff, S. C., Johenning, S., Shlaes, D. M., and Yamabe, S. : Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR 830, clavulanate, and sulbactam combined with ampicillin and broad spectrum penicillins against defined  $\beta$ -lactamase-producing aerobic Gram-negative bacilli, *Antimicrob. Agent. Chemother.* **29**, 980 (1986).
  - 18) Arnoff, S. C., Jacobs, M. R., Johenning, S. and Yamabe, S. : Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **26**, 580 (1986).
  - 19) O'Challaghan, C. H., Morris, A., Curby, S. A. and Shingler, A. H. : Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **1**, 283 (1972).
  - 20) Marchall, M. J., Ross, G. W., Chanter, K. V. and Harris, A. M. : Comparison of the substrate specificities of the  $\beta$ -lactamases from *Klebsiella aerogenes* 1082E and *Enterobacter cloacae* p99, *Appl. Microbiol.* **23**, 765 (1972).
  - 21) Matthew, M., Harris, A. M., Marshall, M. J. and Ross, G. W. : The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases, *J. Gen. Microbiol.* **88**, 169 (1975).
  - 22) Giulian, G. G., Moss, R. L. and Greaser, M. : Analytical isoelectric focusing using a high voltage vertical slab polyacrylamide gel system, *Anal. Biochem.* **142**, 421 (1984).
  - 23) Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J. and Reeves H. C. : Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system, *Anal. Biochem.* **167**, 290 (1987).