

グラム陰性菌の産生する β -lactamase に対する Cefuroxime の安定性と抗菌力への影響

奥村 和夫・横田 健

順天堂大学医学部細菌学教室

加藤 日出子・遠 彦 二

新日本実業株式会社東京研究所

Cefuroxime の各種 β -lactamase に対する抵抗力と β -lactamase の抗菌作用におよぼす影響について検討した。

各 β -lactam 薬に対する MIC は、R 因子性 β -lactamase 産生菌では TEM 型のみ Cefazolin Cephaloridine などの現用 Cephalosporin に対し MIC の上昇を示したが Cefuroxime, Cefoxitin に対しては recipient と同一の MIC であった。菌種特異的 β -lactamase 産生菌である *P. inconstans*, *P. vulgaris* および *C. freundii* などでは Cefuroxime に対して若干 MIC が上昇したが、Cefazolin, Cephaloridine に比べると軽度であった。

酵素化学的検討では、 V_{max} 値は *P. vulgaris* を除いて、いずれも低い V_{max} 値を持ち *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. rettgeri* および *P. mirabilis* の β -lactamase に対しては強い抵抗力を示した。

比較的水解性のよい *P. vulgaris* および *E. coli* RGN 823 について K_m 値を測定すると 182 μ M, 1,250 μ M と Cefazolin, Cephaloridine に比べ高い K_m 値を示していた。

V_{max} , K_m の測定不能な CESase について Cephaloridine を基質とした場合の K_i 値を測定すると水解性が低いにもかかわらず、低い K_i 値を示し強い親和性を示唆しており、これは cloxacillin, Cefoxitin でも同様で、高い K_m 値と低い K_i 値がこれら β -lactamase 抵抗力抗生物質の特徴のように考えられた。

Cefuroxime (以下 CXM) は英国 GLAXO 社で開発された、グラム陰陽性菌に広い抗菌スペクトルを有する新しい半合成 Cephalosporin 系抗生物質であり、その性状は現用の Cephalosporin, すなわち Cephaloridine (CER), Cephalothin (CET), Cephalixin (CEX), Cephaloglycin (CEG), Cefazolin (CEZ), Ceftezole (CTZ) と異なり Cephalosporinase (CESase) 型 β -lactamase に対しても強い抵抗力をもつ安定な抗菌薬である¹⁾。いうまでもなく、細菌の産生する β -lactamase は菌の β -lactam 抗生物質に対する耐性の主要な因子であることが知られている²⁾。

本抗生物質は *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis* 等、多くの β -lactamase 産生菌にも強い抗菌活性を示すことから、これらの菌の

産生する Penicillinase (PCase) 型 β -lactamase に対しても抵抗力を示すことが推察された。

CXM は Fig. 1 に示すように Cephalosporanic Acid 77 の位置に methoxyimino 基をもち、本構造が多くの β -lactamase に対する強い安定性の原因となっているものと考えられる。

本研究は CXM の各種 β -lactamase に対する安定性を検討して、現用の β -lactam 薬のそれと比較したものである。

I. 実験材料および方法

1. 供試菌株

本研究に使用した菌株は千葉大学薬学部、山岸三郎教授より分与された^{3,4)}代表的な各種 β -lactamase 産生菌で、その RICHMOND 分類による型別は次のとおりである。

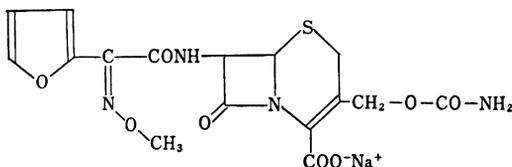
E. coli ML 1410 (β -lactamase 非産生株)

E. coli ML 1410 RGN 14 (Ⅲ : TEM 型 β -lactamase 産生株)

E. coli ML 1410 RGN 823 (Ⅲ : TEM 型 β -lactamase 産生株)

E. coli ML 1410 RGN 238 (Ⅴ型 β -lactamase 産生株)

Fig. 1 Chemical structure of Cefuroxime



上記の3株は *E. coli* ML 1410 株に耐性(R)-plasmid を伝達した plasmid 支配の β -lactamase 産生株である⁴⁾。

Citrobacter freundii GN 346 (Ia 型 β -lactamase 産生株)

Proteus inconstans GN 627 (Ia 型 β -lactamase 産生株)

Proteus rettgeri GN 624 (Ia 型 β -lactamase 産生株)

Proteus vulgaris GN 76 (Ic 型 β -lactamase 産生株)

Proteus mirabilis GN 79 (Iib 型 β -lactamase 産生株)

Klebsiella pneumoniae GN 69 (N 型 β -lactamase 産生株)

上記の6株は染色体性の β -lactamase 産生株である。

2. 供試薬

β -lactam 抗生物質は Ampicillin (ABPC), Chlloxacin (MCIPC): 明治製菓, Cefuroxime (CXM), Cephaloridine (CER), Cephalothin (CET), Penicillin G (PCG): GLAXO 社, Cefazolin (CEZ): 藤沢薬品工業および Cefoxitin (CFX): 第一製薬を使用した。

3. MIC の測定

各種 β -lactamase 産生菌の MIC 測定は化学療法学会

標準法に準じた。すなわち, tryptosoy broth (栄研) に 18 時間培養した菌液を 10^8 あるいは 10^6 cells/ml に希釈後, 1 白金耳量を試験薬を含む Heart infusion agar (栄研) 上に植菌して, 37°C , 20 時間培養後の生育により MIC を求めた。

4. 酵素液の調製

Nutrient broth (栄研) 200 ml を分注した 500 ml の坂口フラスコ 3~5 本に β -lactamase 産生被検菌を接種して, 37°C , 16 時間振盪培養後, $10,800 \times \text{g}$, 15 分間の冷却遠心で菌体を集めた。

R 因子支配の β -lactamase (III~V 型) は菌体を M/100 phosphate buffer (pH 7.0) で 2 回洗浄後, 30 ml の同緩衝液に懸濁し, 氷冷しながら 20 KHz, 5 分間超音波破碎後, 遠心分離により菌体を除いて, 上清を無菌濾過したあと同緩衝液に一夜透析したものを粗酵素液とした。染色体性の β -lactamase 粗酵素液は産生菌を洗浄後, $50 \mu\text{g/ml}$ の PCG で 37°C , 4 時間酵素誘導したあと, 上記に準じて酵素液を抽出した。

5. β -lactamase の活性測定

β -lactamase の比活性測定は macro iodometry⁶⁾ で各薬剤に対する V_{\max} 値を求め, 各 β -lactamase の酵素的化学的特性の検討には micro iodometry⁷⁾ を用いた。酵素単位は macro iodometry の条件または基質過剰の

Table 1 Resistance levels of various β -lactamase producing strains to β -lactam drugs

Strain	Inoculum size	Drug resistance MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		CXM	CFX	CEZ	CER	CET	ABPC	PCG	MCIPC
<i>E. coli</i> ML 1410	10^8	12.5	12.5	1.56	3.13	12.5	6.25	50	1,600
	10^6	6.25	3.13	1.56	3.13	12.5	6.25	50	800
<i>E. coli</i> ML 1410 RGN 14	10^8	12.5	12.5	3.13	12.5	25	3,200	1,600	1,600
	10^6	6.25	3.13	3.13	12.5	12.5	800	800	1,600
<i>E. coli</i> ML 1410 RGN 238	10^8	12.5	6.25	1.56	3.13	12.5	400	200	3,200
	10^6	6.25	3.13	1.56	3.13	12.5	400	200	3,200
<i>E. coli</i> ML 1410 RGN 823	10^8	12.5	12.5	25	200	100	>3,200	>3,200	3,200
	10^6	6.25	3.13	12.5	100	50	>3,200	>3,200	3,200
<i>K. pneumoniae</i> GN 69	10^8	6.25	12.5	6.25	25	12.5	1,600	1,600	800
	10^6	6.25	3.13	3.13	6.25	6.25	400	400	400
<i>P. mirabilis</i> GN 79	10^8	6.25	25	100	50	50	>3,200	>3,200	800
	10^6	6.25	25	50	25	25	3,200	3,200	400
<i>C. freundii</i> GN 346	10^8	100	200	>3,200	1,600	3,200	800	>3,200	800
	10^6	100	200	800	400	800	800	>3,200	400
<i>P. morgani</i> GN 125	10^8	6.25	12.5	400	800	1,600	6.25	50	400
	10^6	1.56	6.25	400	200	200	3.13	12.5	400
<i>P. vulgaris</i> GN 76	10^8	200	50	1,600	800	800	100	200	800
	10^6	50	12.5	400	400	800	25	50	400
<i>P. inconstans</i> GN 627	10^8	400	50	>3,200	1,600	1,600	400	3,200	800
	10^6	100	50	1,600	400	800	200	1,600	400
<i>P. rettgeri</i> GN 624	10^8	12.5	100	>3,200	1,600	3,200	400	3,200	100
	10^6	6.25	50	800	400	1,600	200	1,600	50
<i>E. coli</i> NIH JC-2	10^8	6.25	6.25	1.56	3.13	12.5	6.25	50	800
	10^6	6.25	6.25	1.56	3.13	6.25	6.25	50	800

micro iodometry の条件で1分間に1 μ モルの基質を水解する酵素量を1単位(unit)とした。

また、比活性測定のための粗酵素液の蛋白定量には Folin 法を用いた。

6. CXM加水分解物のヨード消費量の測定

CXMの β -lactamase水解産物のヨード消費量を求めるため、CXMの水解産物を調製した。CXM 100 μ g/mlを含む0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) に Ic 型 β -lactamase (この酵素は例外的に CXM を水解する) を種々の濃度に加え、30°C, 30分反応させたのち、100°C, 1分間の加熱で反応をとめ、*Bacillus subtilis* ATCC 6633を用いた bioassay による不活化率と micro-iodometry におけるヨード消費量から CXM 1モル当りのヨード消費量を計算した。

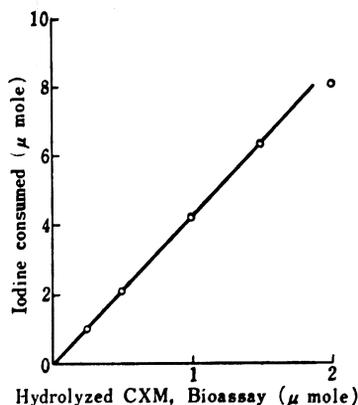
II. 実験成績

1. β -lactamase 産生株の MIC

使用した被検菌株の MIC を Table 1 に示した。*E. coli* ML 1410 を宿主とした R 因子支配の β -lactamase 産生株のうち RGN 14 (RICHMOND 分類 III 型: TEM 型 β -lactamase) と RGN 238 (同 V 型: Oxacillin 水解酵素) をもつ菌は CXM, CFX, CEZ, CER, CET と同 R-菌に比べ MIC の大きな上昇はみられなかった。RGN-14 と同じ RICHMOND 分類 III 型の β -lactamase 産生を支配する RGN 823 plasmid をもつ株では CEZ, CER, CET 等に対し 4~8 倍の MIC 値の上昇がみられる。これは RGN 823 保有菌は RGN 238 株に比べて酵素産生能が高いためと考えられる。しかし、すべての R-plasmid 保有株は β -lactamase 抵抗性の高い CXM, CFX に対しては MIC 値の上昇はみられなかった。染色体支配の CESase 型 β -lactamase 産生菌はすべて CEZ, CER および CET に高い耐性を示したが CXM に対しては感受性または中等度耐性を示すに止った。*C. freundii* GN 346, *P. vulgaris* GN 76 および *P. inconstans* が CXM に対するのみならず、これと同じように CESase に安定な CFX に対しても 50~200 μ g/ml の耐性を示したことは β -lactamase による試験薬の不活化と耐性の関係を考えると興味ある問題である。

いずれにしても β -lactamase に対し抵抗性の高い抗生物質であることが知られている CXM, CFX はともに既存の Cephalosporin に対する高度耐性菌に対しかなり低い MIC を示した。この2薬間の菌種別感受性度の差をみると、R 因子支配の β -lactamase 産生菌は両薬に高い感受性を示し、染色体支配の β -lactamase 産生菌では、CXM は *C. freundii*, *P. morganii*, *P. rettgeri* で MIC 値が低く、一方、CFX は *P. vulgaris* および *P. inconstans* において低い MIC 値を示している。

Fig. 2 Inter relationships between amounts of hydrolyzed Cefuroxime and their consumption of iodine



2. CXM のヨード消費量

CXM を Ic 型 β -lactamase で酵素的水解を行ない、bioassay 法により定量された不活化薬物量と macroiodometry によるヨード消費量の相関を Fig. 2 に示した。CXM の水解物のヨード消費量と bioassay による失活量との間にはよい比例関係が得られ、CXM 水解物 1モル当りのヨード消費量は 4.2モルであった。

3. CXM の各種 β -lactamase に対する安定性

R 因子支配の RICHMOND 分類 III 型 (TEM 型: PCase) と V 型 (Oxacillin 水解酵素) β -lactamase および染色体性の Ia, Ic, II および N 型 β -lactamase の CXM, CER, CEZ, CET, ABPC, PCG および MCIPC に対する基質特異性 (substrate specificity) を Table 2 に示した。

CXM は PCase type の II, III, N および V 型 β -lactamases すべてに対してきわめて安定な性質を有し、これらによってはほとんど水解されない。この性質は K_m 値は大きい (親和性は低い) が、薬剤濃度が高ければこれら PCase 型 β -lactamase によっても相当水解される現用の CER, CEZ, CET など比べて明らかな改良点と考えられる。さらに現用のすべての Cephalosporin 系薬に強い親和性をもち (K_m 値が小さく) それらをよく水解する (V_{max} 値が高い) Ia 型 β -lactamase に対しても安定でほとんど水解されない (V_{max} 値が非常に小さい)。

使用した各種 β -lactamase のうち、唯一の例外は *P. vulgaris* が染色体性に産生する Ic 型 CESase で、これは CXM を CER や CEZ と同様よく分解した。しかし、この型の酵素の存在は *P. vulgaris* に限られ、しかも酵素産生量が少ない (比活性が小さい) ので、耐性菌との関係はそれほど重要でないと思われる。

Table 2 Substrate specificity of β -lactamases from gram-negative bacteria determined by macro-iodometry

PCase from	RICHMOND clas- sification ClassType	PCG Activity U/mg protein	Relative V_{max}						
			CXM	CER	CEZ	CET	ABPC	PCG	MCIPC
<i>E. coli</i> ML 1410 RGN 14 ⁺	III	2.1	0.2	82	17	7.3	132	100	1.6
<i>E. coli</i> ML 1410 RGN 238 ⁺	V a	0.025	5.7	65	49	54	407	100	122
<i>E. coli</i> ML 1410 RGN 823 ⁺	III	19	0.4	117	19	0.6	185	100	1.6
<i>K. pneumoniae</i> GN 69 ⁺	N	0.9	0.008	48	4.4	2.6	195	100	3.6
<i>P. mirabilis</i> GN 79 ⁺	II b	2.4	0.05	4.5	0.36	0.08	150	100	3.3

CSase from	RICHMOND clas- sification ClassType	CER Activity U/mg protein	Relative V_{max}						
			CXM	CER	CEZ	CET	ABPC	PCG	MCIPC
<i>C. freundii</i> GN 346 ⁺	I a	15	0.0004	100	109	55	0.2	1.8	0.015
<i>P. morgani</i> GN 125 ⁺		0.77	<1.3	100	90	44	2.1	20	<1.0
<i>P. vulgaris</i> GN 76 ⁺	I c	0.06	125	100	407	104	6.8	4.1	<4.1
<i>P. inconstans</i> GN 627 ⁺		1.3	0.05	100	55	7.3	0.03	1.4	<0.01
<i>P. rettgeri</i> GN 624 ⁺		8.4	0.01	100	98	22	0.35	1.5	<0.01

Table 3 Kinetic parameters of β -lactam drugs against various β -lactamase from gram-negative bacilli

Source of enzyme		Substrate					
		CXM	CER	CEZ	CET	MCIPC	CFX
<i>C. freundii</i> GN 346	$V_{max}^a)$	* ^{c)}	100	101	52.3	*	*
	$K_m^b)$		290	385	26.1		
	V_{max}/K_m		0.34	0.26	2.0		
<i>P. vulgaris</i> GN 76	V_{max}	514	100	366	220	*	*
	K_m	182	79.6	71.4	24.1		
	V_{max}/K_m	2.8	1.26	5.1	15.6		
<i>P. morgani</i> GN 125	V_{max}	*	100	106	97.5	*	*
	K_m		143	185	12.5		
	V_{max}/K_m		0.70	0.57	7.8		
<i>P. rettgeri</i> GN 624	V_{max}	*	100	61.6	99.3	*	*
	K_m		178	31.2	11.1		
	V_{max}/K_m		0.56	1.97	8.9		
<i>P. inconstans</i> GN 627	V_{max}	*	100	51.5	14.8	*	*
	K_m		526	196	15.4		
	V_{max}/K_m		0.19	0.26	0.97		
<i>E. coli</i> ML 1410 RGN 823	V_{max}	1.77	100	41.2	17.8	39.1	*
	K_m	1,250	312	425	695	23.8	
	V_{max}/K_m	0.0014	0.32	0.097	0.026	1.64	

a) : V_{max} relative to CERb) : K_m determined by LINEWEAVER-BURK plot (μ M)

c) : No hydrolysis even after 1 hr at 37°C with 2,000 M of substrates

4. CXM の各種 β -lactamase に対する酵素化学的定数 K_m , V_{max} および K_i 値の測定

使用した各種 β -lactamase のうち, Cephalosporin 系抗生物質に強い分解性を示すものについて, micro iodo-

metry によって酵素化学定数, すなわち K_m , V_{max} および K_i 値の測定を行ない, Table 3 にそれを示した。

CXM は *P. vulgaris* GN 76 の産生する Ic 型 CESase に比較的よくこわされ, また RGN 823 plasmid

Table 4 Inhibition constants of various β -lactam drugs against β -lactamases mediated by the chromosome of gram-negative bacilli

Source of enzyme	K_m of CER (μM)	K_i (μM) ^{a)}		
		CXM	MCIPC	CFX
<i>C. freundii</i> GN 346	290	0.0064	0.0012	0.50
<i>P. morgani</i> GN 125	143	0.035	0.00032	0.28
<i>P. rettgeri</i> GN 624	178	0.57	0.077	0.050
<i>P. inconstans</i> GN 627	526	0.143	0.024	0.035
<i>P. vulgaris</i> GN 76	79.6	—	0.55	1.0

a) : K_i value determined by DIXON plot with CER as the substrate

支配のⅢ型 PCase にわずかに水解されるので、両者に対する K_m および V_{max} 値は測定可能であるが、いずれの酵素に対しても現用の Cephalosporin 剤に比べ高い K_m 値をもち CER に比較すると Ic 型 CESase (*P. vulgaris*) に対して 2.3 倍、Ⅲ型 PCase (RGN 823) で 4.0 倍、CEZ ではそれぞれに対し 7.6 倍および 1.8 倍の高い K_m 値を示した。したがって CXM は多くの β -lactamase に対し安定なだけでなく、例外的にこれを分解する酵素に対しても親和性が低く、これが多くの β -lactamase 産生菌に対して CXM が有効な原因と考えられる。

CXM がまったく水解されないため K_m 値の測定できない大部分の β -lactamase については CER を基質としたときの CXM の阻害定数 K_i を DIXON-plot で測定し Table 4 に示した。

CXM, CFX および MCIPC は各種 β -lactamase に対し、いずれも拮抗阻害型の阻害形式を示し、しかもいずれも CER の K_m 値の 10^{-2} ~ 10^{-6} の低い K_i 値をもつことが明らかにされた。

III. 考 察

新Cephalosporin 誘導体 CXM の各種 β -lactamase 産生菌に対する抗菌力とこれらの菌株の産生する種々の β -lactamase に対する安定性、その他の酵素化学的性状を現用の β -lactam 薬のそれと比較検討した。

まず、CXM は CER, CEZ および CET などと比べて R 因子支配のⅢおよびⅤ型 (PCase type) β -lactamase に対してはるかに強い安定性を示した。これらの酵素は Penicillin 類に対しては強い親和性をもつが Cephalosporin 類には親和性が低い (K_m が大きい) のでⅢ型 β -lactamase に比較的 V_{max} 値の高い CER なども MIC 付近の低濃度ではあまり分解されず、多くの R⁺ 菌は Cephalosporin 類に感受性であるか、または中等度の耐性を示すに止る場合が多い。また、酵素産生量の多い RGN 823 保有菌のような場合には、これによく分解さ

れる (V_{max} 値の高い) CER, CEZ および CET などに対しては相当高い耐性を示すこともあり、このような時にもこれに安定性が高く (V_{max} が小さい) また親和性のより低い (K_m がより大きい) CXM はその特性を反映し、比較的強い抗菌力を示している。

一方、グラム陰性菌の染色体支配で産生される菌種特異性の高い CESase 型 β -lactamase に対しても CXM は現用の CER や CEZ よりはるかに安定で分解されにくく、その産生菌である *P. inconstans* GN 627 や *P. rettgeri* GN 624 に対しかなり小さい MIC 値を示した。酵素産生量の高い *C. freundii* GN 346 は CXM に対するその β -lactamase の V_{max} 値が極度に低い (ほとんど分解されない) にもかかわらず、この菌のこの菌に対する抗菌力はそれほど強くない。これは β -lactamase による耐性は必ずしもこの酵素による薬物の不活化だけで説明できないことがある一つの例であろう⁹⁾。

例外的に CXM を水解する Ic 型 CESase を産生する *P. vulgaris* の酵素は CXM に対する V_{max} 値が高いにもかかわらず、同様にこの菌の β -lactamase でよく分解される CER や CEZ に比べ CXM のこの菌に対する抗菌力は強い。これは CXM がこの酵素に対し比較的親和性が低いためかもしれない。

β -lactamase 産生菌に対する β -lactam 薬の抗菌力はこの酵素の産生量、酵素水解速度 (V_{max})、酵素と薬の親和性 (K_m) などが総合的に関係するものであるが、これだけでは説明できないこともあることは著者の 1 人がすでに明らかにしたとおりである⁹⁾。

今回の研究で CXM に対し水解作用の弱い酵素の酵素活性阻害定数 K_i を求めたところ、この酵素によりよく水解される CER の K_m よりはるかに小さい値が得られ、親和性に関する限り CXM の方が CER より高い酵素結合性を有する場合があります、しかもこのような β -lactamase を産生する菌は CER などだけでなく CXM にも相当程度の耐性を示し、この酵素に β -lactam 薬が結合すると水解されなくとも耐性化することがあることを示唆している⁹⁾。

結論として CXM の β -lactamase 産生菌に対する抗菌力は多くの菌株ではこの抗菌薬が β -lactamase に安定なため強い抗菌力を示すことが多いが、なかには例外もあり、それには酵素と β -lactam 薬複合体を形成するときの親和性 (K_m , K_i) に関係した未知の機構が関係していることが考えられた。

文 献

- 1) O'CALLAGHAN, C. H. ; R. B. SYKES, A. GRIF-FITHS & J. E. THORNTON : Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotics : Activity *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 9 : 511~519,

- 1976
- 2) RICHMOND, M. H. & N. A. CURTIS: The interpret of β -lactamase and intrinsic factors in the resistance of gram-negative bacteria to penicillin and cephalosporins. Ann. New York Acad. Sci. 235: 553~568, 1974
- 3) 山岸三郎, 沢井哲夫: グラム陰性菌の β -lactamase について。日本細菌学雑誌, 30: 615~628, 1975
- 4) SAWAI, T.; S. MITSUHASHI & S. YAMAGISHI: Drug resistance of enteric bacteria, XIV. Comparison of β -lactamases in gram-negative rod bacteria resistance to α -aminobenzylpenicillin. Jap. J. Microbiol. 12: 423~434, 1968
- 5) MIC 測定法改定委員会 (小酒井望, ほか): 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 6) YAMAMOTO, T. & T. YOKOTA: Beta-lactamase-directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying R plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 836~840, 1977

COMPARATIVE STUDY OF CEFUROXIME AND OTHER BETA-LACTAM ANTIBIOTIC; SUSCEPTIBILITY TO BETA-LACTAMASES AND RESISTANCE TO BETA-LACTAMASE PRODUCING STRAINS

KAZUO OKUMURA and TAKESHI YOKOTA

Department of Bacteriology, School of Medicine Juntendo University, Tokyo

HIDEKO KATO and HIROJI TSUJI

Tokyo Research Laboratories, Shin Nihon Jitsugyo Co., Ltd.

Cefuroxime is a new beta-lactamase resistant cephalosporin antibiotic. The properties of Cefuroxime have been compared with those of Cephaloridine, Cephalothin, Cefazolin, Cefoxitin, Cloxacillin, Aminobenzylpenicillin and Penicillin G.

The properties examined included the resistance of beta-lactamase producing strains and the susceptibility to a range of beta-lactamses encountered commonly in gram-negative bacteria. Cefuroxime had less V_{max} and higher K_m values except for the beta-lactamase from *P. vulgaris*. K_i estimation for the beta-lactamases showed strong affinity to the enzymes. The susceptibility of Cefuroxime to the beta-lactamases was thus regulated the step of beta-lactam bond hydrolysis from E-S complex. These results reflected the resistance of beta-lactamase producing strains, and Cefuroxime was effectively resistant to all beta-lactamase producing strains tested and the clinically isolated gram-negative organisms.