

グラム陰性菌の産生する各種 β -lactamase のヒト体液中安定性

荒木 春美・大懸 直子・南 新三郎

保田 隆・渡辺 泰雄

富山化学工業株式会社総合研究所*

萩 野 茂¹⁾・広野 禎 介

富山市民病院外科

¹⁾現:萩野病院

(平成5年5月31日受付・平成5年9月13日受理)

Penicillinase を構成的に産生する *Escherichia coli* TK-3, *Klebsiella pneumoniae* Y-4, oxyiminocephalosporinase を誘導的に産生する *Proteus vulgaris* T-178, cephalosporinase (CEPase) を構成的に産生する *Pseudomonas aeruginosa* GN 918, および CEPase を誘導的に産生する *Enterobacter cloacae* H-27 を培養し, その菌体内・外 β -lactamase 活性を調べた。構成型 β -lactamase 産生菌 3 株では, 培養 1 日後に菌体外 β -lactamase 活性は菌体内活性の 15~26%, 2 日後に 30~56% を示した。一方, 誘導型 β -lactamase 産生菌 2 株では, 薬剤無添加時の菌体外 β -lactamase 活性は低値 (≤ 1 mU/ml) であったが, インデューサーとして cefmetazole を作用させた時には菌体内・外の活性は上昇し, 菌体外活性は培養 2 日後に菌体内活性の 36~229% まで上昇した。これら 5 株由来の β -lactamase のヒト各種体液 (血清・尿・胆汁・腹水・胸水) 中安定性を検討した結果, いずれの β -lactamase も胆汁中において速やかに失活したが, 他の体液中においては安定で 8 日後でも 60% 以上の活性が残存していた。

Key words: グラム陰性菌由来 β -lactamase, 菌体外 β -lactamase, ヒト体液中安定性

β -lactamase は構成的あるいは誘導的に産生され, グラム陽性菌では主に菌体外に存在するのに対し, グラム陰性菌では主に菌体内 (主にペリプラスム内) に存在することが知られている¹⁾。しかしながら, Sanders ら²⁾はグラム陰性菌のペリプラスム内 β -lactamase が薬剤作用時に菌体外へ漏出することを報告している。我々も, *Enterobacter cloacae* や *Serratia marcescens* などの誘導型 β -lactamase 産生菌において cefmetazole (CMZ) 作用時に β -lactamase が菌体外へ多量に漏出すること, さらにその β -lactamase が培養液中やラット体液中で長期間安定に存在し, β -lactam 剤の治療効果に影響をおよぼすことを報告した³⁻⁵⁾。 β -lactamase 活性はヒトの胆汁⁶⁾, 腹水⁷⁾, 喀痰⁸⁻¹¹⁾, 膿汁^{12,13)}, 糞便¹⁴⁾等から検出されており, 道浦ら⁷⁾は無菌腹水中において, Giwercman ら¹¹⁾は喀痰の超遠心分離上清中において β -lactamase 活性を認めたことから, 菌体外へ放出された β -lactamase が β -lactam 剤を不活化する可能性を示唆している。したがって, 菌体内

のみならず菌体外の β -lactamase も β -lactam 剤治療に影響を与える可能性が考えられるが, 各種グラム陰性菌の菌体外 β -lactamase 量や β -lactamase のヒト体液中安定性についてはいまだ十分な検討がなされていない。そこで今回, タイプの異なる各種 β -lactamase 産生株の菌体外 β -lactamase 活性を調べるとともに, ヒト体液 (血清, 尿, 胆汁, 腹水, 胸水) 中での β -lactamase の安定性を検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

臨床分離株である *Escherichia coli* TK-3¹⁵⁾ (プラスミド性 penicillinase; PCase 産生菌), *Klebsiella pneumoniae* Y-4¹⁵⁾ (染色体性 PCase 産生菌), *Proteus vulgaris* T-178¹⁵⁾ (誘導型 oxyiminocephalosporinase; CXase 産生菌), *Pseudomonas aeruginosa* GN 918¹⁶⁾ (構成型 cephalosporinase; CEPase 産生菌), および *E. cloacae* H-27¹⁵⁾ (誘導型 CEPase 産生

菌)を用いた。

2. 使用薬剤

CMZ (三共), cephaloridine (CER, 日本グラクソ)を使用した。

3. 培養液中 β -lactamase 活性

各菌株をそれぞれ Brain heart infusion broth (BHIB, pH 7.4, 栄研) 中で 37°C, 18 時間静置培養した菌液を新鮮な Nutrient broth (NB, pH 7.0, 栄研) に 1% 接種し, 37°C で静置培養を行った。なお, 誘導型 β -lactamase 産生菌では, インデューサーとして CMZ を 2.5 μ g/ml となるように添加した場合についても同様に検討した。培養液は経日的に採取し, 4°C, 1,000 \times g, 30 分間の遠心分離により集菌した。この上清をフィルター (0.22 μ m) で無菌濾過した液 (cell-free medium) の β -lactamase 活性を測定し, 菌体外活性 (extracellular activity) とした。なお, 培養液中に薬剤が残存している場合は, 薬剤によって β -lactamase 活性が阻害されるので, 薬剤を除去するために, cell-free medium をセルロースチューブに入れて蒸留水中で 10°C, 一夜透析を行い, 薬剤除去後に活性を測定した。一方, 菌体は 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.0) で 1 回洗浄後, 集菌時の培養液と同量の同 PB に懸濁し, 超音波破碎 (Ultra-sonicator, Tomy-Seiko, 4°C) した。破碎液を遠心分離 (4°C, 10,000 \times g, 30 分) して得られた上清 (cell extract) の β -lactamase 活性を菌体内活性 (intracellular activity) として測定した。

また, 採取した培養液の 10 倍希釈系列を生理食塩水で作製し, Heart infusion agar (HIA, 栄研) 平板に 0.05 ml を塗布し, 37°C で一夜培養後生じたコロニー数から生菌数を算出した。

4. β -lactamase の調製

BHIB 中で 37°C, 18 時間静置培養した菌液を新鮮な BHIB に 10% 接種し, 37°C で 4 時間振盪培養を行った。なお, 誘導型 β -lactamase 産生菌の場合には, 培養 2 時間後にインデューサーとして CMZ を 10 μ g/ml となるように添加した。培養後, 遠心分離 (4°C, 1,000 \times g, 30 分) にて集菌し, 得られた菌体を 0.1 M PB (pH 7.0) で 2 回洗浄し, 適量の同 PB に再懸濁した。これを氷冷下で超音波破碎した後, 遠心分離 (4°C, 10,000 \times g, 30 分) して得られた上清を粗酵素液として実験に供した。

5. ヒト体液

血清および尿は健康成人 (3~4 名) から, 胆汁 (2~3 名), 腹水 (2~3 名), 胸水 (1~2 名) は入院患者から採取し, 実験開始時まで凍結保存した。なお,

各体液を実験に供する前に, Bioassay 法にて抗菌活性物質が検出されないこと, および UV 法¹⁷⁾ にて β -lactamase 活性が認められないことを確認した。

6. 各種 β -lactamase のヒト体液中安定性

各菌から調製した粗酵素液 (β -lactamase 活性: 約 5 U/ml) 0.1 ml に, 各種ヒト体液 (血清, 尿, 胆汁, 腹水, 胸水) をそれぞれ 0.9 ml 加えて攪拌後, 37°C フラン器中に静置し, 経日的にサンプリングして β -lactamase 活性を調べた。なお, 粗酵素液および体液は無菌濾過した後使用した。

7. β -lactamase 活性測定法

β -lactamase 活性の測定は, CER 100 μ M を基質とする UV 法¹⁷⁾ で行った。すなわち, 基質液 3 ml を 2 個の UV 用石英セルに入れ, 一方に 10~50 μ l の酵素液を加えて手早く攪拌し, ダブルビーム UV 計 (日立, 100-60 タイプ) にて β -lactamase の開裂に伴う OD 変化を 260 nm で測定した。 β -lactamase 活性は mU で表し, 1 mU は 30°C, 0.05 M PB (pH 7.0) 中で 1 分間に 1 nmol の基質を分解するのに必要な酵素量とした。

II. 結 果

1. 培養液中 β -lactamase 活性

E. coli TK-3, *K. pneumoniae* Y-4, *P. vulgaris* T-178, *P. aeruginosa* GN 918, *E. cloacae* H-27 を, それぞれ NB 中で 2 日間静置培養した時の菌体外および菌体内の β -lactamase 活性を Table 1 に示した。また, その時の生菌数を Table 2 に示した。

構成型 β -lactamase 産生菌の *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* では, 培養 1 日後に菌体外活性は菌体内活性の 15~26%, 2 日後に 30~56% となり, 菌体外活性は経日的に上昇する傾向が認められた (薬剤無添加時)。一方, 誘導型産生菌の *P. vulgaris*, *E. cloacae* では, 薬剤無添加時には菌体外 β -lactamase 活性は低値 (≤ 1 mU/ml) を示したが³⁾, インデューサー CMZ 作用時には菌体内・外の活性が上昇し, 培養 2 日後に菌体外活性は菌体内活性の 36~229% にまで上昇した。

生菌数は, 培養 1 日後と 2 日後で大きな差が見られなかった。なお, データは示さなかったが, 培養 1 日後と 2 日後で培養液 pH に大きな変化は認められなかった。

2. 各種 β -lactamase のヒト体液中安定性

E. coli TK-3, *K. pneumoniae* Y-4 由来の 2 種の PCase, *P. vulgaris* T-178 由来の CXase, および *P. aeruginosa* GN 918, *E. cloacae* H-27 由来の 2 種の CEPase について, ヒト各種体液中における安定性を

Table 1. β -Lactamase activity in cultures of various β -lactamase-producing strains

Strain	Type of β -lactamase	Inducer ^{b)}	β -Lactamase activity ^{a)} (mU/ml) at the following incubation times (days)					
			0		1		2	
			Intra ^{c)}	Extra ^{d)}	Intra	Extra (%) ^{e)}	Intra	Extra (%)
<i>E. coli</i> TK-3	Constitutive PCase	-	5	<1	103	27 (26)	88	40 (45)
<i>K. pneumoniae</i> Y-4	Constitutive PCase	-	<1	<1	12	3 (25)	9	5 (56)
<i>P. vulgaris</i> T-178	Inducible CXase	-	<1	<1	<1	<1	<1	<1
		+	<1	<1	37	4 (11)	14	5 (36)
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	Constitutive CEPase	-	<1	<1	13	2 (15)	10	3 (30)
<i>E. cloacae</i> H-27	Inducible CEPase	-	<1	<1	5	<1 (<20)	6	1 (17)
		+	<1	<1	71	40 (56)	35	80 (229)

^{a)} β -Lactamase activity was determined by spectrophotometry using CER (100 μ M) as the substrate.

^{b)} -: Uninduced. +: Cefmetazole (2.5 μ g/ml) was added to the culture as an inducer at the start of incubation.

^{c)} Intra: intracellular activity (cell extract).

^{d)} Extra: extracellular activity (cell-free medium).

^{e)} The extracellular activity (%) is expressed as a percentage of intracellular activity.

Table 2. CFU in cultures of various β -lactamase-producing strains

Strain	Type of β -lactamase	Inducer*	CFU (cells/ml) at the following incubation times (days)		
			0	1	2
<i>E. coli</i> TK-3	Constitutive PCase	-	1.2×10^7	1.8×10^8	1.6×10^8
<i>K. pneumoniae</i> Y-4	Constitutive PCase	-	1.2×10^7	6.2×10^8	8.8×10^8
<i>P. vulgaris</i> T-178	Inducible CXase	-	7.0×10^6	2.4×10^8	1.6×10^8
		+	7.0×10^6	3.4×10^8	1.8×10^8
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	Constitutive CEPase	-	3.2×10^7	1.3×10^8	1.4×10^8
<i>E. cloacae</i> H-27	Inducible CEPase	-	1.2×10^7	4.8×10^8	6.4×10^8
		+	1.2×10^7	4.5×10^8	6.5×10^8

* -: Uninduced. +: Cefmetazole (2.5 μ g/ml) was added to the culture as an inducer at the start of incubation.

経日的に調べた。その結果を、Table 3 に示した。

胆汁中 β -lactamase 活性は、いずれも 2 日後に 1% 以下に低下した。一方、他の体液中ではいずれも比較的安定に存在し、8 日後においても 60% 以上の活性が残存していた。また、胆汁以外の体液間では β -lactamase の安定性に大きな差は見られなかった。

体液の pH 変化は、血清では pH 7.9~8.5 から pH 8.0~8.5、尿では pH 5.5~7.1 から pH 5.6~8.7、胆汁では pH 6.4~8.2 から pH 6.4~8.5、腹水では pH 7.3~8.7 から pH 8.0~9.2、胸水では pH 7.7~8.2 から pH 8.3~8.9 であった。

III. 考 察

これまで我々は、グラム陰性菌の誘導型 β -lacta-

mase の菌体外への漏出と感染巣内残存を中心に検討し、インデューサーによって誘導産生された β -lactamase が菌体外に漏出しインデューサー消失後でも安定に存在して β -lactam 剤治療に影響をおよぼすことを報告してきた³⁻⁵⁾。今回、さらに菌種および β -lactamase の種類を広げ、 β -lactamase の菌体外への放出とヒト各種体液中安定性について検討した。

異なるタイプの β -lactamase を産生する 5 菌株を培養し、その時の菌体内・外の β -lactamase 活性を調べた結果、構成型 β -lactamase 産生菌では薬剤を作用させなくても菌体外に β -lactamase 活性が認められ、経日的に上昇する傾向が見られた。この菌体外 β -lactamase は、漏出あるいは溶菌に伴って菌体外へ

Table 3. *In vitro* stability of β -lactamases in various human body fluids

β -Lactamase source	Body fluid	N ^{b)}	Residual activity ^{a)} (%) of β -lactamases at the following incubation times (days)			
			2	4	6	8
<i>E. coli</i> TK-3	Serum	3	101.0 ± 6.1 ^{c)}	98.5 ± 4.1	98.3 ± 4.1	98.1 ± 7.1
	Urine	3	89.1 ± 4.6	74.0 ± 8.4	66.2 ± 7.2	61.1 ± 6.9
	Bile	3	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Peritoneal fluid	2	95.0	97.1	92.2	94.0
<i>K. pneumoniae</i> Y-4	Pleural fluid	1	97.2	101.1	95.0	93.1
	1/15 M-PB ^{d)}	1	99.0	99.2	97.1	96.0
	Serum	3	93.8 ± 15.5	89.0 ± 11.0	88.3 ± 8.2	83.2 ± 12.1
	Urine	3	98.6 ± 4.5	81.9 ± 8.6	80.1 ± 9.2	79.3 ± 7.9
<i>P. vulgaris</i> T-178	Bile	2	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Peritoneal fluid	3	95.6 ± 3.5	93.5 ± 8.1	90.9 ± 3.1	81.6 ± 6.0
	Pleural fluid	2	96.2	91.1	87.0	84.2
	1/15 M-PB	1	99.1	97.0	95.0	92.2
<i>P. aeruginosa</i> GN 918	Serum	3	80.9 ± 6.9	69.0 ± 7.7	65.0 ± 3.3	61.2 ± 4.0
	Urine	3	91.7 ± 7.0	85.1 ± 9.3	79.2 ± 7.2	77.2 ± 6.4
	Bile	2	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Peritoneal fluid	2	93.8	88.1	85.9	75.0
<i>E. cloacae</i> H-27	Pleural fluid	1	84.9	76.1	72.0	70.2
	1/15 M-PB	1	100.1	95.0	88.0	83.0
	Serum	3	94.1 ± 10.9	92.0 ± 6.6	92.1 ± 6.6	93.9 ± 4.5
	Urine	3	90.2 ± 3.5	83.1 ± 5.3	72.3 ± 9.2	68.0 ± 4.9
<i>E. cloacae</i> H-27	Bile	2	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Peritoneal fluid	2	92.2	85.1	80.0	77.9
	Pleural fluid	1	93.0	88.8	89.9	85.0
	1/15 M-PB	1	89.1	87.0	78.1	75.0
<i>E. cloacae</i> H-27	Serum	4	99.5 ± 2.3	80.8 ± 8.1	78.8 ± 9.8	71.9 ± 8.5
	Urine	4	102.3 ± 1.6	83.9 ± 9.2	78.1 ± 8.1	65.3 ± 6.7
	Bile	2	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Peritoneal fluid	3	101.8 ± 6.6	101.0 ± 4.0	101.4 ± 1.9	98.9 ± 2.9
<i>E. cloacae</i> H-27	Pleural fluid	2	91.3	86.6	76.2	70.9
	1/15 M-PB	1	102.2	104.0	102.1	100.1

^{a)} Residual activity (%) is expressed as a percentage of β -lactamase activity at the start of incubation.

^{b)} No. of samples used.

^{c)} Mean ± standard error.

^{d)} Phosphate buffer (pH 7.0).

放出されたものと思われる。なお、構成型菌については薬剤作用時の菌体内・外 β -lactamase 活性を記載しなかったが、作用薬剤あるいはその濃度によって菌体外への β -lactamase 漏出の程度は異なるので、今後詳細に検討して報告する予定である。一方、誘導型 CXase および CEPase 産生菌の場合には、薬剤無添加では菌体外 β -lactamase 活性は低値 (≤ 1 mU/ml)

であったが、インデューサー添加時には菌体外に β -lactamase 活性が認められ、構成型菌の場合と同様に経日的に上昇する傾向を示した。

以上より、グラム陰性菌の β -lactamase が薬剤作用あるいは長時間の培養によって菌体外に放出されることが示された。これら β -lactamase が安定に存在するならば、道浦ら⁷⁾も指摘しているように、ヒト体

液中において菌体外 β -lactamase が蓄積残存して β -lactam 剤治療に影響を与える可能性が考えられる。そこで、これら β -lactamase のヒト各種体液中安定性を検討した。その結果、胆汁中を除き各種 β -lactamase は比較的安定であり、5種の β -lactamase 間に大きな差が認められなかった。なお、*E. cloacae* 由来 CEPase のヒト体液中安定性は、ラット体液（血清，尿，pouch内浸出液，胆汁）中安定性の成績⁹⁾と類似していた。

胆汁中での β -lactamase の安定性は他の体液中より劣ったが、その原因については不明である。今回、2日以前のデータは示さなかったが、胆汁中 β -lactamase 活性はインキュベート1時間後では約15%に、1日後では1%以下に低下した。したがって、胆汁検体中の菌体外 β -lactamase 活性の測定は、検体採取後、短時間内に行う必要がある。ところで、青木ら⁹⁾は胆道感染症患者の胆汁中 β -lactamase 活性を測定し、PCase 活性や CEPase 活性を認めているが、検体採取後の測定までの時間経過、菌体内（ペリプラスム内） β -lactamase の存在、あるいは胆汁成分の変化などが胆汁中 β -lactamase 活性に影響している可能性が考えられる。いずれにしても、胆汁中での β -lactamase 活性の測定には注意が必要であろう。

以上、グラム陰性菌の β -lactamase は、薬剤作用あるいは長時間の培養によって菌体外にも認められ、胆汁以外のヒト各種体液中において長時間安定であった。

文 献

- Richmond M H, Sykes R B: The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. In *Advances in Microbial Physiology* (Rose A H & Tempest D W eds.) Vol.9, p.31~88, 1973
- Sanders C C, Sanders W E Jr, Goering R V, McCloskey R V: Leakage of β -lactamase: a second mechanism for antibiotic potentiation by amdinocillin. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1164~1168, 1987
- 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇: *Enterobacter cloacae* の菌体外 β -lactamase とその安定性. *Chemotherapy* 36: 725~731, 1988
- Araki H, Minami S, Watanabe Y, Yasuda T: Significance of inducible cephalosporinase remaining in the experimentally infected rat granuloma pouch after β -lactam therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1131~1136, 1991
- 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆: β -lactam 剤の治療に及ぼす残存誘導型 β -lactamase の影響—ラット pouch 内二次感染モデルを用いた検討—. *Chemotherapy* 40: 183~190, 1992
- 青木洋三, 谷村 弘, 坂本幸具, 川口富司, 佐々木政一: 外科感染症—胆道感染症. *化学療法の領域* 6: 2147~2155, 1990
- 道浦 準: 化膿性腹膜炎における腹水中 β -lactamase 活性に関する基礎的・臨床的検討. *Chemotherapy* 40: 602~612, 1992
- 中浜 力, 黒川幸徳, 上田 智, 副島林造, 山田真理恵, 荒木春美, 南新三郎, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇: 喀痰中誘導型 β -lactamase の測定—特に緑膿菌感染症における臨床的検討. *感染症学雑誌* 63: 400~409, 1989
- 千葉潤一, 加藤美和, 渡辺 彰, 大泉耕太郎, 本宮雅吉: 喀痰内の β -lactamase 活性に関する研究 (I) 喀痰分離株および喀痰内の β -lactamase 活性の相関と間接的病原性の意義. *Chemotherapy* 37: 1031~1039, 1989
- 中浜 力, 山田真理恵, 副島林造: 慢性気道感染症における化学療法. *化学療法の領域* 6: 246~255, 1990
- Giwerzman B, Meyer C, Lambert P A, Reinert C, Høiby N: High-level β -lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 71~76, 1992
- Bryant R E, Rashad A L, Mazza J A, Hammond D: β -Lactamase activity in human pus. *J Infect Dis* 142: 594~601, 1980
- Brook I: Presence of beta-lactamase-producing bacteria and beta-lactamase activity in abscesses. *Am J Pathol* 86: 97~101, 1986
- Chachaty E, Depitre C, Mario N, Bourneix C, Saulnier P, Corthier G, Andreumont A: Presence of *Clostridium difficile* and antibiotic and β -lactamase activities in feces of volunteers treated with oral cefixime, oral cefpodoxime proxetil, or placebo. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2009~2013, 1992
- 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 福岡義和, 四辻 彰, 南新三郎, 山城芳子, 荒木春美, 大懸直子: 新しいエステル型経口セフェム剤 T-2588 の抗菌作用について. *Chemotherapy* 34 (S-2): 66~84, 1986
- Yaginuma S, Sawai T, Ono H, Yamagishi S, Mitsuhashi S: Biochemical properties of a cephalosporin β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jap J Microbiol* 17: 141~149, 1973
- Waley S G: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem J* 139: 780~781, 1974

In vitro stability in human body fluids of various β -lactamases
from gram-negative bacteria

Harumi Araki, Naoko Ogake, Shinzaburo Minami,
Takashi Yasuda and Yasuo Watanabe

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., 2-4-1 Shimo-okui,
Toyama City, Toyama 930, Japan

Shigeru Hagino and Teisuke Hirono
Department of Surgery, Toyama City Hospital

Extracellular and intracellular β -lactamase activity in culture was studied using *Escherichia coli* TK-3 and *Klebsiella pneumoniae* Y-4, which produce constitutive penicillinases, *Proteus vulgaris* T-178, which produces an inducible oxyiminocephalosporinase, *Pseudomonas aeruginosa* GN 918, which produces a constitutive cephalosporinase (CEPase), and *Enterobacter cloacae* H-27, which produces an inducible CEPase. In the cultures of the three strains which produce constitutive β -lactamases, extracellular β -lactamase activity was increased (without any drugs), and amounted to 15~26% and 30~56% of intracellular activity on days 1 and 2 of incubation, respectively. In the cultures of the two inducible β -lactamase producers, on the other hand, extracellular β -lactamase activity was low (≤ 1 mU/ml) without an inducer, but upon the addition of cefmetazole (as an inducer) extracellular activity increased to 36~229% of intracellular activity on day 2. The *in vitro* stability of the β -lactamases from these five strains was studied in various human body fluids (serum, urine, bile, peritoneal fluid, and pleural fluid). All five enzymes were stable in these human body fluids, except bile, and their residual activity was greater than 60% after incubation for eight days. All of the β -lactamases used were rapidly inactivated in bile.