

Detekcija beta-laktamaza

Branka Bedenić

Škola narodnog zdravlja "Andrija Štampar",
Zagreb

Pregled
UDK 616-093/-098-078
Prispjelo: 20. svibnja, 1993.

Postoje različite metode za detekciju β -laktamaza. Metoda koja će biti korištena u određenom slučaju, ovisi o materijalu, tipu enzima i hitnosti rezultata. Većina β -laktamaza koje proizvode gram-pozitivni organizmi su inducibilne i pojavljuju se u značajnim količinama jedino u prisustvu induktora. Mnogo je jednostavnije vršiti detekciju β -laktamaza gram-pozitivnih bakterija, jer one proizvode navedene enzime u većim količinama i izlučuju ih u okolni medij. Beta-laktamaze gram-negativnih bakterija su smještene intracelularno

u periplazmatskom prostoru, pa ih je u većini slučajeva potrebno osloboditi iz stanice sonifikacijom ili osmotskim šokom. Iznimke su *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *B. fragilis*. Kod tih vrsta nema barijere između enzima ili supstrata, ili je ona vrlo slabo izražena.

Metode koje koristimo za detekciju β -laktamaza se dijele na acidimetrijske, jodometrijske, mikrobiološke, kromogene i fluorescentne.

Ključne riječi: beta-laktamaza

β -laktamaze su enzimi koji hidroliziraju cikličku amidnu vezu u β -laktamskom prstenu penicilina i cefalosporina. I drugi mikrobnog enzimi, kao što su acilaze i esteraze, mogu razgraditi β -laktamski antibiotik. Esteraze mikrobnog porijekla su relativno rijetke i nemaju većeg značenja. Acilaze koje proizvodi veliki broj mikroorganizama, uklanjaju acilni postranični lanac i dovode do formiranja 6-aminopenicilinske kiseline (6-APA) što rezultira u smanjenju antimikrobne aktivnosti (27,21,6). Amilaze djeluju na peptidnu vezu prostetične grupe (10).

Tehnike koje koristimo za određivanje β -laktamaze ovisi o materijalu iz kojeg se vrši mjerenje, o tipu enzima i hitnosti rezultata. Većina β -laktamaza, koje proizvode gram-pozitivne bakterije, su inducibilni enzimi koji se pojavljuju u značajnim količinama jedino u prisustvu induktora. Ti enzimi su također u većini slučajeva ekstracelularni i secerniraju se u okolni medij.

Ekstracelularna priroda gram-pozitivnih β -laktamaza omogućava relativno laku detekciju, iako je u većini slučajeva potrebna indukcija da bi se odredio puni kapacitet proizvodnje enzima (21,28,19).

Gram-negativni organizmi imaju intracelularne β -laktamaze, pa je zbog toga potrebno izvršiti oslobađanje enzima iz stanice ultrazvučnim vibracijama ili osmotskim šokom (27). Izuzetak su najserije i *Haemophilus influenzae* kod kojih nije potrebna prethodna obrada. β -laktamaze gram-ne-

gativnih organizama mogu biti konstitutivne ili inducibilne. Ako sumnjamo na inducibilne β -laktamaze, potrebno je da organizam preinkubiramo u prisustvu benzilpenicilina (100-200mg/L). Indukcija se može djelotvorno dokazati jedino određivanjem slobodnog enzima (uklanjanjem staničnog detritusa).

Kada određujemo produkciju β -laktamaze gram-pozitivnih organizama, najpovoljnije je koristiti benzilpenicilin kao supstrat, jer su ti enzimi uglavnom penicilinaza tipa (27). Među gram-negativnim organizmima proizvođači grupe I trebaju biti testirani uz cefalosporin kao supstrat, najbolje cefaloridin. Svi ostali organizmi te skupine mogu se testirati pomoću ampicilina ili benzilpenicilina kao supstrata (27).

Najčešće korištene metode su acidimetrijske, jodometrijske, mikrobiološke ili kromogene (27,28).

1. ACIDIMETRIJSKE METODE

Hidroliza penicilina ili cefalosporina katalizirana β -laktamazama izaziva stvaranje dodatne karboksilne grupe, što se može dokazati pH indikatorom, kao što je fenilno crvenilo (27,28,1).

a. Acidimetrijski test na trakama filter papira

600 mg benzilpenicilina se otapa u 4 ml 0.1% vodene otopine bromkrezol purpura koji sadržava 0.05 ml 0.1 M natrijevog hidroksida. Filter papir se uranja u navedenu otopinu i odmah suši u desikatoru. Nakon sušenja se izreže u trake (0.6 x 1.2 cm).

Trake se mogu koristiti nekoliko mjeseci ako se čuvaju na 4° C uz silika gel da ne upiju vlagu. Pri izvođenju testa jednu kap destilirane vode kapnemo na traku filter papira. Ezom se pokupi nekoliko kolonija ispitivanog soja i povuče se crta uzduž trake. β-laktamaza producenti mijenjaju boju trake iz ljubičaste u žutu u roku od 5 do 10 minuta. Sojevi koji ne proizvode β-laktamazu, ne mijenjaju boju trake, ili je čine još tamnije purpurnom (27,23). Postoji modifikacija te metode uz korištenje Andradeovog indikatora. β-laktamaza producenti mijenjaju boju indikatora u ružičastu (25,24).

b. Acidimetrijski test u kapilarnim cjevčicama

Reagens pripremamo dodavanjem 2 ml 0.5% otopine fenolnog crvenila u 16.6 ml sterilne destilirane vode koja sadrži 2¹⁰ jedinica penicilina (12g). Natrijev hidroksid (1M) se dodaje kap po kap dok otopina ne poprimi ljubičastu boju. Test-otopina se razlijeva u epruvetu. Reagens može stajati na -60 °C tjedan dana. Kada se epruvete otope, mogu se držati na 4 °C tokom jednog radnog dana. Duže čuvanje se ne preporučuje zbog hidrolize penicilina. Test se izvodi u kapilarnim cjevčicama. One se uranjaju u reagens tako da tekućina ulazi u cjevčicu u dužini od 1 do 2 cm. Nakon toga se vrhom cjevčice pokupi nekoliko kolonija sa krute hranjive podloge, tako da uđu u donji dio cjevčice u obliku čepa. Prazni kraj cjevčice se začepi plastičnim čepom i inkubira na sobnoj temperaturi. β-laktamaza pozitivni sojevi mijenjaju boju reagensa u žuto u roku od 5 do 15 minuta. Benzilpenicilin se u pokusu može zamijeniti ampicilinom. Kod izvođenja testa treba paziti da zrak ne uđe između sloja bakterija i reagensa (27,20,10). Metoda je pogodna za detekciju rezistencije na penicilin *Staphylococcus-a aureus-a*.

c. Acidimetrijski test na agar-pločama

Acidimetrijski test na agar-pločama naročito je pogodan za detekciju β-laktamaze *S. aureus-a*. Za izvođenje tog testa potrebno je pokupiti nekoliko kolonija sa krute hranjive podloge i zasijati ih na Muller-Hinton agar tako da se dobije konfluentni rast soja na površini ploče. Zatim se postave dikloksacilinski (1 μg) i cefalotinski (30 μg) disk na zasijanu podlogu. Inkubira se na 35 do 37 °C 4 do 5 sati kako bi se omogućio porast stafilokoka. Produkcija penicilaze je inducirana dikloksacilinom i cefalotinom, koji difundiraju na agar. Nakon inkubacije treba prelitati ploču sa 4 ml 1.5% vodene otopine agara (ohlađene do 50 °C) koja sadržava 1 ml PNCB reagensa (N-fenil-1 naftilamin-azo-0-karboksibenzen). Treba pričekati dok se agar ne skrutne i zatim prelitati rubove inhibicijske zone, oko 2 diska, sa nekoliko kapi 10% otopine penicilina G koji služi kao supstrat za enzim. Hidroliza penicilina oslobađa dodatnu karboksilnu grupu, što snižava pH. PNCB indikator formira purpurni precipitat oko penicilinaze

producirajućih kolonija. Najbolje je upotrebljavati Mueller-Hinton agar. Infuzijski krvni i moždano-srčani infuzijski agar ne zadovoljavaju i treba ih izbjevati. Većina sojeva daje pozitivnu reakciju unutar 4 do 5 minuta, ali za neke sojeve je potrebno produžiti inkubaciju na 35 do 45 minuta (1).

d. Acidimetrijski test na celuloznim acetatnim membranama

Soj se inokulira na površini celulozne acetatne membrane, koja je prethodno položena na ploču hranjivog agara. Inokulum se nanosi u količini od 0.1 ml pogodno razrijeđene kulture, koji se sa staklenim štapićem razmaže po površini membrane tako da se dobije 100 - 200 kolonija po membrani. Inokulirane membrane se inkubiraju preko noći. Nakon inkubacije, membrane se odstranjuju sa ploče i polažu na Whatman 1 filter papir, prethodno urođen u otopinu penicilina G (25000 jedinica/ml sa 2% Andradeovim indikatorom). Nakon nekoliko minuta β-laktamaza producirajuće kolonije razvijaju ružičastu boju koja sporo prodire u filter papir. Za slabe proizvođače β-laktamaze potrebno je produžiti period inkubacije do 2 sata (12).

e. Acidimetrijski test u epruvetama

Reagens za detekciju β-laktamaze se priprema otapanjem 1,000.000 jedinica penicilina G u 4.5 ml destilirane vode. Zatim se dodaje 0.5 ml 0.5% vodene otopine fenolnog crvenila. Na kraju se dodaje 1 kap 1M natrijeve lužine što daje otopini ljubičastu boju.

Inokulum za test se priprema suspendiranjem kolonija starih 18 do 24 sata sa krute podloge, u sterilnoj fiziološkoj otopini, tako da se dobije zamućenje koje odgovara standardnoj suspenziji po Mc Farlandu br. 5.

Tri kapi β-laktamaza reagensa se dodaju u 0.5 ml bakterijske suspenzije i sadržaj se lagano mućka. Ako dođe do promjene boje iz ljubičaste u žutu unutar jedne minute, test se interpretira kao pozitivan. Dvije epruvete služe kao kontrole. Negativna kontrola sadrži 0.5 ml fiziološke otopine i tri kapi test reagensa. Pozitivna kontrola sadržava 0.5 ml fiziološke otopine, 1 kap otopine penicilina (400.000 jedinica/ml) i tri kapi test reagensa.

Ako se boja reagensa ne mijenja ili se mijenja u crvenkastu ili ružičastu boju, test se interpretira kao negativan. Promjena boje nakon 45 sekundi se ne uzima u obzir jer može biti posljedica spontane hidrolize penicilina (8,15).

2. JODOMETRIJSKE METODE

Produkti β-laktamske hidrolize djeluju kao reducenski, uklanjajući jod iz kompleksa sa škrobom što rezultira gubitkom plave boje (27,28,3,17,26,30,22,14).

a. Jodometrijski test na traci filter papira

Trake Whatman 3 filter papira se uranjaju u 1% otopinu benzilpenicilina uz 0.2% škroba. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, trake se pohranjuju na -20°C. Prilikom izvođenja testa trake se vlaže jednom otopinom (2.03 g joda i 53.2 g kalijevog jodida u 100 ml vode) tako da nastane plava boja. Zatim se ezom pokupi nekoliko kolonija sa krute hranjive podloge i povuče crta uzduž trake. U prisutnosti β-laktamaze doći će do hidrolize supstrata do peniciloične kiseline, što dovodi do dekolorizacije kompleksa škrob-jod, ostavljajući bijelu crtu uzduž poteza eze. Pozitivni rezultat je vidljiv unutar 2 do 5 minuta (27,28,9).

b. Jodometrijski test u epruveti

Reagensi:

- 1% otopina škroba u destiliranoj vodi (prokuhana do otapanja),
- jodni reagens,
- benzilpenicilin 10000 jedinica (6.06mg/L) u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7).

Otopina penicilina se rastaće u epruvete u količini od 0.5 ml. Test se može izvoditi i kao mikrometoda u mikrotitar pločicama. Testirani soj se pokupi ezom sa krute podloge i suspendira u otopini penicilina tako da se postigne gustoća od najmanje 10⁹ stanica /ml. Nakon jednog sata stajanja na sobnoj temperaturi, dvije kapi škroba se dodaju suspenziji, nakon čega se umiješa jedna kap jednog reagensa. Plava boja nastaje odmah zbog formiranja kompleksa škrob-jod. Perzistencija plave boje duže od 10 minuta znači negativan ishod testa. Rapidna dekolorizacija indicira aktivnost β-laktamaze uz uvjet da negativne kontrole ne pokazuju takvu reakciju (27,28,15).

c. Jodometrijski test na agar pločama

Organizam se zasije u obliku crte na agar ploče koje sadržavaju 2% škroba. Ploče se inkubiraju preko noći, a zatim se preliju sa 1% otopinom benzilpenicilina i ostave 15 minuta stajati na sobnoj temperaturi. Nakon toga se penicilin odlje sa ploče i zamijeni jednom solucijom. β-laktamaza producirajuće kolonije imaju bezbojni halo koji odudara od plave pozadine (27,28).

3. MIKROBIOLOŠKE METODE

Nakon hidrolize pod djelovanjem β-laktamaza, β-laktamski antibiotici gube svoju antibakterijsku aktivnost što je osnova za testiranje mikrobiološkim metodama. Mikrobiološke metode nisu specifične za aktivnost β-laktamaze. Aktivnost acilaze možemo eliminirati drugim tehnikama (27).

A. TEST LISTA DJETELINE ("CLOVER LEAF")

Ploča agara se prelije sa kulturom stafilocoka NTCC 6571 da se dobije konfluentni rast. Ampici-

linski disk se stavlja u centar ploče, a testirani sojevi se zasiju u obliku crte radijarno od diska. Ploča se inkubira preko noći. Ukoliko testirani mikroorganizam proizvodi β-laktamazu, porast će u obliku ureza unutar cirkularne zone inhibicije stafilocoka. Ako koristimo čokoladni agar ili drugi obogaćeni medij, metodu možemo koristiti za detekciju β-laktamaze. *N. gonorrhoeae* i *H. influenzae*. Metoda je vrlo osjetljiva. Nedostatak je veliki utrošak vremena (27).

Modifikacija te metode je opisana za *H. influenzae*. Sojevi *H. influenzae* koji su rezistentni na ampicilin obično proizvode β-laktamazu. Test za β-laktamazu se može koristiti ako se otkrije taj specifičan vid rezistencije.

Izvodi se tako da se kultura *Staphylococcus-aureus*-prelije ili premaže brisom na ploču čokoladnog agara, tako da se dobije konfluentni rast. Ampicilinski disk (10 μg) se stavlja u centar ploče i obilni inokulum testiranog soja se zasijava radijarno u jednom smjeru i kontrolni soj u suprotnom smjeru tako da se dobije rast kolonija širok oko 0.25 cm. Ploča se inkubira u 5% CO₂ na 37°C 18 sati. Ako soj *H. influenzae* proizvodi β-laktamazu, porast stafilocoka i hemofilusa se sastaju u oštrom kutu formirajući vršak usmjeren prema antibiotskom disku, a zona inhibicije ima oblik srca. Nekoliko sojeva može biti testirano na jednoj ploči (16).

B. DVOSTRUKI DISK DIFUZIJSKI TEST

Ploče se zasijavaju sa sojem stafilocoka NCTC 6571. Disk ampicilina ili cefaloridina (30 μg) se stavlja u sredinu ploče. Diskovi filter papira se uranjaju u bujonsku kulturu testiranog mikroorganizma staru 6 sati i lociraju se na ploču na udaljenosti od 20 mm od antibiotiskog diska. Ploče se inkubiraju preko noći na 37°C. Porast stafilocoka oko vanjskog satelitskog diska dokazuje produkciju β-laktamaze (27).

Metoda je vrlo osjetljiva i može se koristiti za detekciju cefalosporinaza (grupa I enzima po Richmondu i Sykesu).

4. KROMOGENE METODE

Hidroliza određene molekule koja sadržava β-laktamski prsten, dovodi do formiranja produkta koji ima apsorpcijski maksimum u drugom dijelu vidnog spektra u odnosu na početnu komponentu. U tom smislu prisutnost β-laktamaze može biti dokazana promjenom boje otopine (27).

A. CEFALOSPORIN 87/312 (NITROCEFİN)

U vodenoj otopini pri pH 7, ta molekula ima apsorpcijski maksimum kod 368 nm, što je vezano uz intaktni β-laktamski prsten. Hidroliza te komponente, pod djelovanjem β-laktamaze, rezultira u pomaku apsorpcijskog maksimuma sa 368 na 483 nm. Ta promjena apsorpcijskog spektra re-

zultira u promjeni boje solucije iz žute u crvenu (27,28,18,13,7). Komponenta se koristi u koncentraciji od 200 do 500 mg/L, otapa se u dimetilsulfoksidu i zatim diluira u fosfatnom puferu pH 7. Ako otopinu držimo u mraku na 4°C, ona može zadržati svoju aktivnost mjesecima. Postoje različite metode detekcije β-laktamaze upotrebom nitrocefina.

METODA NA PLOČI

Ako otopinu nitrocefina kapnemo na β-laktamaza producirajuće kolonije na krutoj podlozi, kolonije i okolni medij poprime crvenu boju. Produkcija boje najčešće nastupa odmah, ali kod slabih produkatora β-laktamaze može proteći do 15 minuta. U prisutnosti agara, promjena boje je prolazna i nestaje za 2 do 3 sata.

METODA U TEKUĆOJ KULTURI

Otopinu Nitrocefina možemo dodati u tekuću kulturu mikroorganizama. Kultura mijenja boju u crvenu ukoliko se radi o β-laktamaza producirajućem soju. Za slabe produktore β-laktamaze potreban je duži period inkubacije (do 30 minuta).

METODA SA STANIČNOM SUSPENZIJOM

Bakterijska suspenzija se pripremi tako da se pokupi nekoliko kolonija testiranog mikroorganizma sa krute podloge i emulzificira ih se u sterilnoj fiziološkoj otopini. Alikvoti od 50 μl se razlijevaju u bunariće u pločicama koji sadržavaju 50 μl otopine Nitrocefina. Pojava crvene boje unutar 30 minuta ukazuje na prisustvo β-laktamaze (27).

Kromogena metoda sa Nitrocefinom predstavlja jednu od najosjetljivijih metoda za detekciju β-laktamaze gram-pozitivnih bakterija osim β-laktamaze tipa I *B. cereus-a*. Vrlo je jednostavna za korištenje i daje odmah rezultat. Specifična je za β-laktamaze. Za veliki broj mikroorganizama najbolje je kapnuti otopinu Nitrocefina na kolonije na krutoj podlozi. Metoda sa staničnom suspenzijom pouzdana je detekcija β-laktamaza gram-pozitivnih organizama i za β-laktamaza producirajuće sojeve *B. fragilisa*, *N. gonorrhoeae* i *H. influenzae*. Za većinu gram-negativnih organizama potrebno je razbiti stanicu sonifikacijom da bi se oslobodio enzim vezan u periplazmatskom prostoru (27).

B. N-(2-FURYL) ACRYLOYL PENICILIN

Ta komponenta podliježe hidrolizi β-laktamazom tipa I, izoliranom iz *B. cereusa* 569/H. Hidroliza β-laktamskog prstena je praćena promjenom apsorpcije, uz smanjenje apsorpcije na 330 nm. Nije poznato kako supstanca reagira sa ostalim β-laktamazama (27).

C. PYRIDINIUM 2-AZO-P-DIMETILANILIN KROMOFOR (PADAC)

Pyridinium 2-azo-p-dimetilanilin (PADAC) je β-laktamaza labilni kromogeni cefalosporin. On se dodaje u agar ploče koje se nakon toga zasiju testiranim sojem u obliku mrlje i inkubiraju na 37°C

18 sati. Ukoliko soj proizvodi β-laktamazu nastat će žuta zona hidrolize PADAC-a oko kolonija. Metoda je semikvantitativna jer je promjer zone hidrolize proporcionalan sa aktivnošću β-laktamaze.

PADAC se otapa u dimetilsulfoksidu i razrjeđuje u 100 mM fosfatnom puferu (pH7) tako da se dobije 500 μM otopina PADAC-a. Srčani infuzijski agar se priprema sa 90% destilirane vode, autoklavira i hladi na 50°C. PADAC otopina se zatim miješa u omjeru 1:9 (v/v) sa agarom i mješavina se razlijeva u količini od 16 ml u Petrijeve zdjelice. Agar ploče se mogu čuvati na 4°C kroz 2 tjedna. Prije upotrebe treba ih osušiti na 37°C 30 minuta. Nakon toga se svježa kultura testiranog soja nanosi u količini od 5 μl (10⁴ stanica) u obliku mrlje. Nakon inkubacije od 18 sati, na 37°C očitava se promjer hidrolize PADAC-a oko kolonija. Rezultat se izražava u mm. Ako nema zone hidrolize oko kolonija, rezultat se izražava kao 6 mm, što je prosječni promjer bakterijske kolonije nakon 18 sati inkubacije (13,2,11,15).

5. FLUORESCENTNE METODE

Fluorescentne metode dokazuju razgradne produkte β-laktamskog prstena koji nastaju pod djelovanjem β-laktamaza. Utvrđeno je da su produkti alkalne hidrolize ampicilina i cefaleksina visoko fluorescentni kod pH 4.2 i 5 u prisutnosti formaldehida, nakon zagrijavanja na 100°C kroz 30 minuta, što je osnova za fluorimetrijsko mjerenje tih antibiotika. Ukoliko se reakcijska smjesa grije na 45°C 10 minuta u prisutnosti 0.78 M natrijevog tartarata, otopljenog u 12% formaldehidu (pH 4.5), samo razgradni produkti postaju fluorescentni. To je omogućilo razvoj nove metode za detekciju β-laktamaze (4).

β-laktamski antibiotik se otapa prema preskripciji i razlijeva u epruvete u količini od 250 μl. Nakon toga se unosi inokulum pomoću posebnog aplikatora koji pokupi sa podloge količinu soja koja bi stala u ezu promjera 2 mm, miješa se supstratom i inkubira se 5 minuta na 45°C ili 15 minuta na 37°C. Neinokulirane supstratne kontrole se pripremaju na isti način. Nakon inkubacije dodaje se 50 μl fluorescentne otopine. Reakcijska mješavina se inkubira na 45°C 10 minuta. Nakon toga se aplikatorom nanosi smjesa na 3 MM Whatmann filter papir da se formira mrlja veličine 8 mm. Intenzitet fluorescencije svake mrlje se uspoređuje sa neinokuliranim kontrolom pod UV lampom, a rezultat se očitava kao negativan, *slabo pozitivan* ili *pozitivan* (5,29).

Fluorescentna metoda je specifična za mikrobe β-laktamaze, omogućuje simultanu detekciju i diferencijaciju penicilinaze i cefalosporinaze, razlikuje β-laktamaze od acilaze i važna je za direktnu detekciju β-laktamaza u kliničkom materijalu (4,5).

LITERATURA

1. Adams AP, Barry AL, Benner EJ. A simple, rapid test to differentiate penicillin-susceptible from penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1970;122(6):544-6.
2. Anhalt JP, Nelson R. Failure of Padac test strips to detect staphylococcal β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21:993-4
3. Catlin BW. Iodometric detection of *Haemophilus influenzae* β -lactamase: rapid presumptive test for ampicillin resistance. *Antimicrob Agent Chemother* 1975; 7(3): 265-70.
4. Chen KCS, Knapp JS, Holmes KK. Rapid, inexpensive method for specific detection of microbial β -lactamases by detection of fluorescent end products. *J Clin Microbiol* 1984; 19(6):818-25.9
5. Chen KCS, Holmes KK. Enhancement of fluorescence development of end products by use of a fluorescence developer solution in a rapid and sensitive fluorescent spot test for specific detection of microbial β -lactamases. *J Clin Microbiol* 1986;23(3):539-44.
6. Cole M, Sutherland R. The role of penicillin acylase in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins. *J Gen Microbiol* 1966;42:345-56.
7. Comelis G, Abraham EP. Beta-lactamases from *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* 1975;87:273-284.
8. Escamilla J. Susceptibility of *Haemophilus influenzae* to ampicillin as determined by use of a modified, one-minute β -lactamase test. *Antimicrob Agent Chemother* 1976;9(1):196-198.
9. Foley JM, Perret CJ. Screening bacterial colonies for penicillinase production. *Nature* 1962;195:287-8.
10. Holt RJ, Stewart GT. Production of amidase and β -lactamase by bacteria. *J Gen Microbiol* 1964;36:203-13.
11. Jorgensen JH, Crawford SA, Alexander GA. Pyridinium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore, a new chromogenic cephalosporin for rapid β -lactamase testing. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:162-4.
12. Knox R, Smith JT. Use of cellulose acetate membranes for detecting penicillinase-producing organisms. *Nature* 1961;191:926-7.
13. Kobazashi S, Arai S, Hayashi S, Sakaguchi T. Simple assay of β -lactamase with agar medium containing a chromogenic cephalosporin, pyridinium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore (PADAC). *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(7):1040-5.
14. Lampen JO. Cell-bound penicillinase of *Bacillus licheniformis*; properties and purification. *J Gen Microbiol* 1967;48:249-59.
15. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology* p. 1005-1007. Washington: American Society for Microbiology, 1985.
16. Mc Ghie D, Clarke PD, Johnson T, Hutchinson JGP. Detection of β -lactamase activity of *Haemophilus influenzae*.
17. Novick RP. Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem J* 1962; 83:263-40.
18. O' Callaghan CM, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 1(4): 238-8.
19. Richmond MH, Sykes RB. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; 9:31-8.
20. Rosen GI, Jacobson J, Rudderman R. Rapid capillary tube method for detecting penicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* 1972; 23(3:) 649-50.
21. Sabath LD, Jago M, Abraham EP. Cephalosporinase and Penicillinase activities of a β -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. *Biochem J* 1965; 96:739-52.
22. Sargent MG. Rapid fixed-time assay for penicillinase. *J Bacteriol* 1968; 95(4):1493-1494.
23. Slack MPE, Turck DC, Wheldon DB. A rapid test for β -lactamase production by *Haemophilus influenzae*. *Lancet* 1977; 29:906.
24. Slack MPE, Turk DC, Wheldon DB. A rapid test for β -lactamase production by *Haemophilus influenzae*. *Lancet* 1977; 29:906.
25. Smith JT. Penicillinase and ampicillin resistance in a strain of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1963; 30:299-306.
26. Smith JT, Dale JW. The purification and properties of the β -lactamase specified by the resistance factor R-1818 in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Biochem J* 1971;123:493-500.
27. Sykes RB, Matthew M, 1979. Detection, assay and immunology of β -lactamases, p. 17-49.. In Hamilton-Miller JMT, Smith JT, ed, β -Lactamases London: Academic Press, Inc; New York.
28. Sykes RB, Bush K, 1982. Physiology, biochemistry and inactivation of β -lactamases p. 155-207. In R. B. Morin and M. Gorman (ed). *Chemistry and biology of β -lactam antibiotics*, vol. 3. Academic Press, Inc; New York.
29. Taylor DN, Chen KCS, Panikabutra K, Wongba C, Chitwarakern A, Echeverria P, Holmes KK. Rapid identification of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* by detection of beta-lactamase in urethral exudates. *Lancet* 1985;21:625-6.
30. Weiss PJ. A consideration of factors affecting the iodometric assay of penicillin. *Antibiot Chemother* 1959;11(11):660-6.

Abstract

DETECTION OF BETA-LACTAMASES

Branka Bedenić

"Andrija Štampar" school of public health, Zagreb

There are different methods for detection of β -lactamases. The method that will be used depends on the material, type of enzyme and urgency of results. Most β -lactamases produced by gram-positive organisms are inducible enzymes that appear in significant amounts only in the presence of an inducer. It is easier to detect β -lactamase production in gram-positive organisms because they produce these enzymes in

higher amounts and they are secreted extracellularly. Gram-negative organisms produce β -lactamases that are located intracellularly in the periplasmic space and it is therefore much more difficult to detect them. In most cases the enzymes must be released from the cells by sonication or osmotic shock. The exceptions are *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *B. fragilis*. In these strains there is little or no barrier separating enzyme and substrate. The methods most frequently used for the detection of β -lactamase are acidimetric, iodometric, microbiological, chromogenic and fluorescent methods.

Key words: β -lactamase

Received: May 20, 1993