

Påvisning av betalaktamaseproduksjon 2009

Kløverbladmetoden:

Ved kløverbladmetoden brukes en penicillinfølsom indikatorstamme (f. eks. *Staphylococcus aureus* ATCC 9144) og et medium som gir vekst av den stammen som skal undersøkes (teststammen). Indikatorstammen sås ut over hele skålen, enten ved å spre en suspensjon over agarflaten eller ved å så tett ut med en pensel. Når agarflaten er helt tørr, såes teststammen ut som to tykke streker i et kryss. En lapp eller tablett med benzylpenicillin (Pen G) plasseres der strekene (fra teststammen) krysser hverandre, og skålene inkuberes over natten ved 35-37°C. Dersom teststammen produserer betalaktamase, vil penicillin som er diffundert ut fra depotet, bli inaktivert av enzym produsert av teststammen. Det oppstår dermed soner av veksthemning som sammen danner mønster som et kløverblad. Som kontrollstammer kan benyttes *S. epidermidis* ATCC 12228 (+) og *H. influenzae* ATCC 35039 (-).

Acidometrisk metode:

Acidometrisk metode baseres på at det dannes syre når betalaktamringen hos penicillin blir spaltet. Dette kan påvises med en pH-indikator (fenolrødt). Undersøkelsen kan utføres både med fast og flytende medium.

Fast medium: Et tykt inokulum av den aktuelle stammen sås ut i et 50-øre stort område på et næringsfattig medium tilsatt 3,6 mg/l penicillin G og fenolrødt. Skålen inkuberes ved 35-37°C i én time og avleses. Hvis stammen produserer betalaktamase dannes syre, og indikatoren slår om fra rødt til gult. Fargeforandring som oppstår senere enn etter én time, skal det ikke tas hensyn til. Enkelte har imidlertid erfaring for at gult fargeomslag kan komme senere og stemme godt med resultat av kløverblad eller nitrocefin.

Flytende medium: Undersøkelsen kan utføres i små reagensrør eller på mikrotiterplate. Flere kolonier suspenderes i mediet som er tilsatt penicillin G og fenolrødt. Fargeomslag vil oppstå i løpet av få minutter dersom stammen danner betalaktamase. Det skal ikke tas hensyn til fargeomslag som oppstår først etter 15 min. eller mer. Acidometrisk metode påviser hovedsakelig ekstracellulære betalaktamaser og egner seg dårlig for påvisning av intracellulære enzymer.

Nitrocefinmetoden:

Nitrocefin er et kromogent cefalosporin. Det er fargeløst eller svakt gult, men hvis betalaktamringen hydrolyseres sees fargeomslag til rødt. Nitrocefinmetoden kan utføres både på fast eller i flytende medium.

Fast medium: En nitrocefinlapp plasseres direkte på kolonier av stammen som skal undersøkes. Det kan være hensiktsmessig å bruke en vanlig resistensskål og legge nitrocefinlappen ved randen av hemninssonen rundt et depot med et betalaktamase-stabilt penicillin, f. eks. oxacillin. Dette øker muligheten for å påvise induserbar betalaktamase. Ved kraftig betalaktamaseproduksjon kommer fargeomslaget straks. Ved svakere enzymproduksjon kan det gå opptil 30 min. før det sees noen fargeforandring. Medier som inneholder blod, kan føre til falsk positiv reaksjon. Kolonier fra blod- eller sjokoladeagar, kan imidlertid undersøkes i flytende medium.

Flytende medium: Kolonier av stammen suspenderes i 0,5 ml NaCl til tetthet 2-4 McFarland, og en indikatorlapp med nitrocefin tilsettes. Fargeomslag kan oppstå etter få min., men ved svak enzymproduksjon kan det gå opptil 30 min. før det kan registreres (enkelte setter grensen på 2 t).