



# EUCAST ESBL disc kit

ENGLISH

Disc tests for confirmation of ESBL in Enterobacterales.

## DESCRIPTION

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) are enzymes hydrolyzing most penicillins and cephalosporins, including oxyimino- $\beta$ -lactam compounds but not cephamycins and carbapenems. Most ESBLs belong to the Ambler class A of  $\beta$ -lactamases and are inhibited by  $\beta$ -lactamases inhibitors: clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. ESBL production has been observed mostly in Enterobacterales, particularly *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, but all other clinically-relevant Enterobacterales species are also common ESBL-producers. In many areas, ESBL detection and characterization is recommended or mandatory for infection control purpose.

ESBL detection involves two important steps. The first is a screening test with an indicator cephalosporin which looks for resistance or diminished susceptibility, thus identifying isolates likely to be harboring ESBLs. The second step is a confirmation test which evaluates the synergy between an oxyimino cephalosporin and clavulanic acid, distinguishing isolates with ESBLs from those that are resistant for other reasons.

## CONTENTS OF THE PACKAGES

6 x 50 discs cartridges, each packaged in a "blister" with a dryer.

## METHOD PRINCIPLE

Enterobacterales suspected to be producers of ESBL enzymes may be confirmed by evaluating the inhibition of ESBL activity by **Clavulanic acid**.

### Combination Disc Test (CDT)

For each test, discs containing cephalosporin alone (cefotaxime AND ceftazidime, OR cefepime) and in combination with clavulanic acid are applied. The inhibition zone around the cephalosporin disc combined with clavulanic acid is compared with the zone around the disc with the cephalosporin alone. The test is positive if the inhibition zone diameter is  $\geq 5$  mm larger with clavulanic acid than without.

When high level expression of AmpC  $\beta$ -lactamases is suspected, use cefepime as the indicator cephalosporin, as cefepime is not hydrolyzed by AmpC  $\beta$ -lactamases. Resistance to cephamycins, e.g. a ceftaxime MIC  $> 8$   $\mu\text{g/ml}$ , may be indicative of high level expression of AmpC  $\beta$ -lactamases.

## GATHERING AND KEEPING SAMPLES

The colonies that are to be subjected to the susceptibility test are taken up by culture media that have been previously swabbed with the sample under examination.

## TEST PROCEDURE

- Using a fresh, pure culture prepare a suspension of the test organism equal to 0.5 McFarland Standard.
- Using a sterile cotton swab, spread the adjusted suspension over the entire area of a Mueller Hinton agar plate.
- Apply the discs onto the inoculated plate, ensuring sufficient space between individual discs to allow for proper measurement of inhibition zones.
- Incubate at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  for 16-20 hours.

## EVALUATING THE RESULTS

At the end of the incubation period, measure the inhibition halos and interpret as indicated in the following table.

### Interpretative Table. CDT method for confirmation of ESBL.

Antibiotic Disc	Confirmation is positive if
Cefotaxime alone and with Clavulanic acid *    CTX 5 $\mu\text{g}$ and CTL 5+10 $\mu\text{g}$ AND/OR	$\geq 5$ mm increase in inhibition zone of cephalosporin with Clavulanic acid
Ceftazidime alone and with Clavulanic acid    CAZ 10 $\mu\text{g}$ and CAL 10+10 $\mu\text{g}$	
Cefepime alone and with Clavulanic acid **    FEP 30 $\mu\text{g}$ and FEL 30+10 $\mu\text{g}$	
* <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.	
** <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>Hafnia alvei</i> (all producing chromosomal AmpC)	

## QUALITY CONTROL

To check the performance of discs, MHA plates, inoculum and procedure used, test *Escherichia coli* ATCC® 25922 as a negative control for ESBL. As a positive control either *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 (SHV-18 ESBL) or *Escherichia coli* NCTC 13353 (CTX-M-15 ESBL) can be used, depending on the combination disc. See tables on the following page for specific criteria. Target values and ranges for Cefotaxime 5  $\mu\text{g}$ , Ceftazidime 10  $\mu\text{g}$  and Cefepime 30  $\mu\text{g}$  can be found in the EUCAST QC Tables available at [www.eucast.org](http://www.eucast.org).

Control strain	Cefotaxime (5 µg)	Ceftazidime (10 µg)	Result
	Increase in zone diameter with Clavulanic acid (10 µg) compared with the cephalosporin alone		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603 <sup>a</sup>	≥ 3 mm	≥ 5 mm	Positive
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 <sup>a,b</sup>	≥ 3 mm	≥ 5 mm	Positive
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm	± 1 mm	Negative

Control strain	Increase in zone diameter with Cefepime (30 µg) + Clavulanic acid (10 µg) compared with Cefepime alone	Result
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 <sup>b,c</sup>	≥ 5 mm	Positive
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm	Negative

<sup>a</sup> Strain free of choice; one of the strains has to be used as a minimum.

<sup>b</sup> CTX-M-15-producing strain *E. coli* NCTC 13353, which is recommended by CLSI for quality control of various cephalosporins and beta-lactam combination agents, is not included in the EUCAST guidelines.

<sup>c</sup> Zone diameter QC range for Cefepime 30 µg is 6-15 mm; If discrete colonies or a haze of growth are present inside the zone of inhibition, measure the colony-free inner zone (CLSI M100 ED33:2023).

## LIMITS

Diffusion susceptibility tests use an *in vitro* technique and cannot therefore reproduce the extremely complex *in vivo* conditions. Nevertheless, it is a useful and important tool that helps the clinician choose the correct therapy. Many variable factors influence the final result of the diffusion susceptibility test. The main ones are: the culture medium used, impregnation of the discs, inoculation of the medium, temperature, time and incubation atmosphere of the plates, pre-incubation and pre-diffusion conditions, depth of the medium, etc.

## PRECAUTIONS

The disc cannot be classified as being hazardous according to current legislation but fall within the specific field of application where a safety data sheet must be supplied because they can cause phenomena of sensitization in sensitive subjects if they come into contact with the skin. The discs are disposable products for *in-vitro* diagnostic use (\*). They must be used in the laboratory by properly trained operators using approved aseptic and safety methods for pathogenic agents.

\* In USA, these products are available for Research Use Only (RUO) and should not be used for diagnostic purposes.

## STORAGE

Store the unopened blister at -20°C to +8°C till the expiry date. Allow unopened cartridge to come to room temperature before removing it from the blister for minimizing condensation on the discs. Leftover discs from an opened cartridge should be stored at 2-8°C for no more than 7 days. Return unused discs to the refrigerator as soon as the application of the discs has been completed. Dispose of expire discs.

## ELIMINATING USED MATERIAL








After use, the discs and the material that comes into contact with the sample must be decontaminated and disposed of in accordance with current laboratory techniques for the decontamination and disposal of potentially infected material.

## REFERENCES

- EUCAST technical guidance on the use of the combination disk test (CDT) for confirmation of ESBL in Enterobacterales - New disk potencies for combination disks containing cefotaxime and ceftazidime without and with clavulanic acid (12 February 2019).
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 2017.

Disc	µg	Disc	µg	Σ	REF
Cefotaxime	CTX 5	Cefotaxime + Clavulanic acid	CTL 15 (5+10)	50 Test	99002
Ceftazidime	CAZ 10	Ceftazidime + Clavulanic acid	CAL 20 (10+10)		
Cefepime	FEP 30	Cefepime + Clavulanic acid	FEL 40 (30+10)		

## TABLE OF SYMBOLS

<b>LOT</b> Batch code	<b>IVD</b> In Vitro Diagnostic Medical Device	 Manufacturer	 Use by	 Fragile, handle with care
<b>REF</b> Catalogue number	 Temperature limitation	 Contains sufficient for <n> tests	 Consult instructions for use	 Do not reuse

## Revision History

Revision	Release Date	Change Summary
1	2024-02-06	Revised QUALITY CONTROL



# EUCAST ESBL disc kit

Dischi per i test di conferma di Enterobacterales produttori di ESBL.

## DESCRIZIONE

Le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) sono enzimi che idrolizzano la maggior parte delle penicilline ed oximino-cefalosporine ma non le cefamicine ed i carbapenemi. La maggior parte delle ESBL, secondo la classificazione di Ambler, sono beta-lattamasi di classe A e sono inibite da acido clavulanico, sulbactam e tazobactam. La produzione di ESBL è stata osservata principalmente nelle Enterobacterales, in particolare *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, ma tutte le altre specie di rilevanza clinica producono comunemente ESBL. In molte aree, ai fini del controllo delle infezioni la ricerca e la caratterizzazione di ESBL è raccomandata od obbligatoria.

La ricerca di ESBL comporta due passaggi fondamentali. Il primo è il test di screening con un antibiotico indicatore appartenente alle cefalosporine, al fine di individuare i microrganismi resistenti o con ridotta sensibilità, e quindi probabilmente produttori di ESBL. Lo step successivo è il test di conferma che valuta la sinergia tra una oximino-cefalosporina e l'acido clavulanico, in modo da distinguere gli isolati con ESBL da quelli che sono resistenti per altri motivi.

## CONTENUTO DEL KIT

6 cartucce da 50 dischi, ciascuna confezionata in un "blister" con essiccante.

## PRINCIPIO DEL METODO

La presenza di ESBL nelle Enterobacterales viene confermata valutando l'inibizione delle beta-lattamasi ESBL causata dall'**acido clavulanico**:

### Combination Disc Test (CDT)

Per ciascun test combinato (CDT), vengono applicati i dischi contenenti la cefalosporina (cefotaxime E ceftazidime, O cefepime) da sola e in combinazione con l'acido clavulanico. Al termine dell'incubazione vengono quindi confrontate le zone di inibizione. Il test è positivo se il diametro di inibizione formato dal disco con l'acido clavulanico è  $\geq 5$  mm rispetto a quello generato dal disco senza acido clavulanico.

Quando si sospetta una presenza di beta-lattamasi inducibili di classe C, si raccomanda di utilizzare il cefepime come indicatore, poiché tale antibiotico non è idrolizzato dalle beta-lattamasi AmpC. La resistenza alle cefamicine, ad es. cefoxitina con MIC > 8 µg/ml, può essere indicativa della iperproduzione di AmpC.

## RACCOLTA E MANTENIMENTO DEI CAMPIONI

Le colonie da sottoporre al test di sensibilità sono prelevate da terreni di coltura precedentemente inoculati con il campione da esaminare.

## PROCEDURA DEL TEST

1. Utilizzare una coltura pura recente per preparare una sospensione del microrganismo equivalente allo standard 0.5 McFarland.
2. Utilizzare un tampone di cotone sterile per diffondere la sospensione sull'intera superficie di una piastra di Mueller Hinton agar.
3. Applicare i dischi sulla piastra inoculata, assicurandosi di lasciare uno spazio sufficiente tra i dischi che permetta di misurare correttamente le zone di inibizione.
4. Incubare a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  per 16-20 ore.

## VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Alla fine del periodo di incubazione, misurare gli aloni di inibizione ed interpretare come indicato nella tabella sottostante.

### Tabella Interpretativa. Metodo CDT per la conferma di ESBL.

Disco Antibiotico		Test di Conferma positivo se
Cefotaxime da solo e con Acido clavulanico E/O	* CTX 5 µg e CTL 5+10 µg	si osserva un incremento $\geq 5$ mm nella zona di inibizione della cefalosporina con l'Acido clavulanico
Ceftazidime da solo e con Acido clavulanico	CAZ 10 µg e CAL 10+10 µg	
Cefepime da solo e con Acido clavulanico	** FEP 30 µg e FEL 30+10 µg	
* <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.		
** <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>Hafnia alvei</i> (all producing chromosomal AmpC)		

## CONTROLLO QUALITÀ

Per verificare le prestazioni dei dischi, delle piastre MHA, dell'inoculo e della procedura utilizzata, testare *Escherichia coli* ATCC® 25922 come controllo negativo per ESBL. Come controllo positivo è possibile utilizzare *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 (SHV-18 ESBL) o *Escherichia coli* NCTC 13353 (CTX-M-15 ESBL), a seconda della combinazione di dischi.

Vedere le seguenti tabelle per i criteri specifici. I valori target e i range per Cefotaxime 5 µg, Ceftazidime 10 µg e Cefepime 30 µg sono disponibili sul sito web [www.eucast.org](http://www.eucast.org) (EUCAST QC Tables).

Ceppo di controllo	Cefotaxime (5 µg)	Ceftazidime (10 µg)	Risultato
	Incremento del diametro della zona di inibizione con Acido clavulanico (10 µg) in confronto alla cefalosporina da sola		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603 <sup>a</sup>	≥ 3 mm	≥ 5 mm	Positivo
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 <sup>a,b</sup>	≥ 3 mm	≥ 5 mm	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm	± 1 mm	Negativo

Ceppo di controllo	Incremento del diametro della zona di inibizione con Cefepime (30 µg) + Acido clavulanico (10 µg) in confronto al Cefepime da solo	Risultato
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 <sup>b,c</sup>	≥ 5 mm	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm	Negativo

<sup>a</sup> Scegliere uno dei ceppi; almeno uno dei ceppi deve essere utilizzato.

<sup>b</sup> Il ceppo di *E. coli* NCTC 13353 produttore di CTX-M-15, che è raccomandato dalla CLSI per il controllo di qualità di varie cefalosporine ed agenti beta-lattamici combinati, non è incluso nelle linee guida EUCAST.

<sup>c</sup> Il range CQ per Cefepime 30 µg è 6-15 mm; Se all'interno della zona di inibizione sono presenti colonie isolate o una crescita "offuscata" (haze), misurare la zona interna priva di colonie (CLSI M100 ED33:2023).

## LIMITI

I test di sensibilità per diffusione utilizzano tecniche *in vitro* e non possono riprodurre esattamente le condizioni che si trovano *in vivo*. Ciononostante, rappresentano uno strumento utile ed importante che aiuta il clinico nella scelta della terapia corretta. Diverse variabili influenzano il risultato finale di tale test: Le principali sono: il terreno di coltura utilizzato, l'impregnazione dei dischi, l'inoculo del terreno, temperatura, tempo ed atmosfera di incubazione delle piastre, condizioni di pre-incubazione e pre-diffusione, spessore del terreno, ecc.

## PRECAUZIONI

I dischi non possono essere classificati come pericoloso ai sensi della legislazione vigente, ma rientrano nello specifico campo di applicazione della normativa relativa all'obbligo di fornitura di scheda di sicurezza, perché può causare fenomeni di sensibilizzazione in soggetti sensibili in caso di contatto con la pelle. I dischi sono dispositivi monouso. Sono destinati esclusivamente ad uso diagnostico *in vitro*(\*), in ambito professionale. Devono essere utilizzati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.

\* Negli Stati Uniti, questi prodotti sono disponibili solo per uso ricerca (Research Use Only - RUO) e non devono essere utilizzati a fini diagnostici.

## CONSERVAZIONE

Il blister integro deve essere conservato a -20°C/+8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Portare le cartucce a temperatura ambiente prima di rimuoverle dal blister per minimizzare la formazione di condensa su dischi. I dischi rimasti in una cartuccia aperta devono essere conservati a 2-8°C per non più di 7 giorni. Riporre i dischi inutilizzati in frigorifero non appena l'applicazione è stata completata. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

## ELIMINAZIONE DEL MATERIALE USATO








Dopo l'utilizzazione i dischi ed il materiale venuto a contatto con il campione devono essere decontaminati e smaltiti in accordo con le tecniche in uso in laboratorio per la decontaminazione e lo smaltimento di materiale potenzialmente infetto.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- EUCAST technical guidance on the use of the combination disk test (CDT) for confirmation of ESBL in Enterobacterales - New disk potencies for combination disks containing cefotaxime and ceftazidime without and with clavulanic acid (12 February 2019).
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 2017.

Disco	µg	Disco	µg	Σ	REF
Cefotaxime	CTX 5	Cefotaxime + Clavulanic acid	CTL 15 (5+10)	50 Test	99002
Ceftazidime	CAZ 10	Ceftazidime + Clavulanic acid	CAL 20 (10+10)		
Cefepime	FEP 30	Cefepime + Clavulanic acid	FEL 40 (30+10)		

## TABELLA DEI SIMBOLI

<b>LOT</b>	Codice del lotto	<b>IVD</b>	Dispositivo Medico Diagnostico <i>in Vitro</i>		Fabbricante		Utilizzare entro		Fragile, utilizzare con cura
<b>REF</b>	Numero di catalogo		Limiti di temperatura		Contenuto sufficiente per <n> test		Consultare i le istruzioni per l'uso		Non riutilizzare

## Cronologia delle Revisioni

Revisione	Data di rilascio	Descrizione della modifica
1	2024-02-06	Modificato CONTROLLO QUALITÀ



**Liofilchem srl**

Via Scozia 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy  
 Tel +39 0858930745 Fax +39 0858930330  
 Headquarters, Manufacturing Site, International distribution  
[www.liofilchem.com](http://www.liofilchem.com)



**Liofilchem, Inc.** In US available as RUO device

465 Waverley Oaks Rd. Suite 317, Waltham, MA 02452, USA  
 Tel 781-902-0312  
 US Distribution Center

