



# EUCAST ESBL disc kit

## Disc tests for confirmation of ESBL in Enterobacteriales.

### DESCRIPTION

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) are enzymes hydrolyzing most penicillins and cephalosporins, including oxyimino- $\beta$ -lactam compounds but not cephemycins and carbapenems. Most ESBLs belong to the Ambler class A of  $\beta$ -lactamases and are inhibited by  $\beta$ -lactamases inhibitors: clavulanic acid, sulbatam and tazobactam. ESBL production has been observed mostly in Enterobacteriales, particularly *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, but all other clinically-relevant Enterobacteriales 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

Enterobacteriales 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 cephemycins, e.g. a cefoxitin 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

1. Using a fresh, pure culture prepare a suspension of the test organism equal to 0.5 McFarland Standard.
2. Using a sterile cotton swab, spread the adjusted suspension over the entire area of a Mueller Hinton agar plate.
3. Apply the discs onto the inoculated plate, ensuring sufficient space between individual discs to allow for proper measurement of inhibition zones.
4. 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 * AND/OR Ceftazidime alone and with Clavulanic acid	CTX 5 $\mu\text{g}$ and CTL 5+10 $\mu\text{g}$ 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

EUCAST recommended QC strains and criteria for combination discs are summarized in the CDT QC Table on the next page. Target values and ranges for Cefotaxime 5  $\mu\text{g}$  and Ceftazidime 10  $\mu\text{g}$  can be found in the EUCAST QC Tables available at [www.eucast.org](http://www.eucast.org)

**CDT QC Table.**

Microorganism		Cefotaxime (5 µg)	Ceftazidime (10 µg)	Cefepime (30 µg)	Result
		Increase in zone diameter with Clavulanic acid (10 µg) compared with the cephalosporin alone			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 700603	≥ 3 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm	Positive
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	± 1 mm	± 1 mm	± 1 mm	Negative

**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 Enterobacteriales - New disk potencies for combination disks containing cefotaxime and ceftazidime without and with clavulanic acid.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 2017.

**PRESENTATION**

DESCRIPTION	µg	Packaging	Ref.
Cefotaxime	CTX 5		
Cefotaxime + Clavulanic acid	CTL 15 (5+10)		
Ceftazidime	CAZ 10		
Ceftazidime + Clavulanic acid	CAL 20 (10+10)	50 Test	99002
Cefepime	FEP 30		
Cefepime + Clavulanic acid	FEL 40 (30+10)		

**TABLE OF SYMBOLS**

LOT	Batch code	IVD	<i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i>		Manufacturer		Use by		Fragile, handle with care	
REF	Catalogue number			Temperature limitation		Contains sufficient for <n> tests		Caution, consult accompanying documents		Do not reuse



Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy  
Tel +39 0858930745 Fax +39 0858930330  
Headquarter, 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



# EUCAST ESBL disc kit

Dischi per i test di conferma di Enterobacteriales 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 Enterobacteriales, 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 Enterobacteriales 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

- Utilizzare una coltura pura recente per preparare una sospensione del microrganismo equivalente allo standard 0.5 McFarland.
- Utilizzare un tampone di cotone sterile per diffondere la sospensione sull'intera superficie di una piastra di Mueller Hinton agar.
- Applicare i dischi sulla piastra inoculata, assicurandosi di lasciare uno spazio sufficiente tra i dischi che permetta di misurare correttamente le zone di inibizione.
- 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

\* *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.

\*\* *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Hafnia alvei* (all producing chromosomal AmpC)

## CONTROLLO QUALITÀ

I ceppi CQ raccomandati nelle linee guida EUCAST ed i criteri di accettabilità sono riassunti nella Tabella CQ CDT alla pagina seguente.

I valori target e i range sono disponibili sul sito web [www.eucast.org](http://www.eucast.org) (EUCAST QC Tables).

**Tabella CQ CDT.**

<b>Microrganismo</b>		<b>Cefotaxime (5 µg)</b>	<b>Ceftazidime (10 µg)</b>	<b>Cefepime (30 µg)</b>	<b>Risultato</b>
		<b>Incremento del diametro della zona di inibizione con Acido clavulanico (10 µg) in confronto alla cefalosporina da sola</b>			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 700603	≥ 3 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm	Positivo
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	± 1 mm	± 1 mm	± 1 mm	Negativo

**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 Enterobacteriales - New disk potencies for combination disks containing cefotaxime and ceftazidime without and with clavulanic acid.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 2017.

**PRESENTAZIONE**

<b>Descrizione</b>	<b>µg</b>	<b>Confezionamento</b>	<b>Ref.</b>
Cefotaxime	CTX 5		
Cefotaxime + Clavulanic acid	CTL 15 (5+10)		
Ceftazidime	CAZ 10		
Ceftazidime + Clavulanic acid	CAL 20 (10+10)	50 Test	99002
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		Temperatura limitata		Contenuto sufficiente per <n> test		Attenzione, consultare i documenti in accompagnamento		Non riutilizzare



Liofilchem srl

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



Liofilchem, Inc.

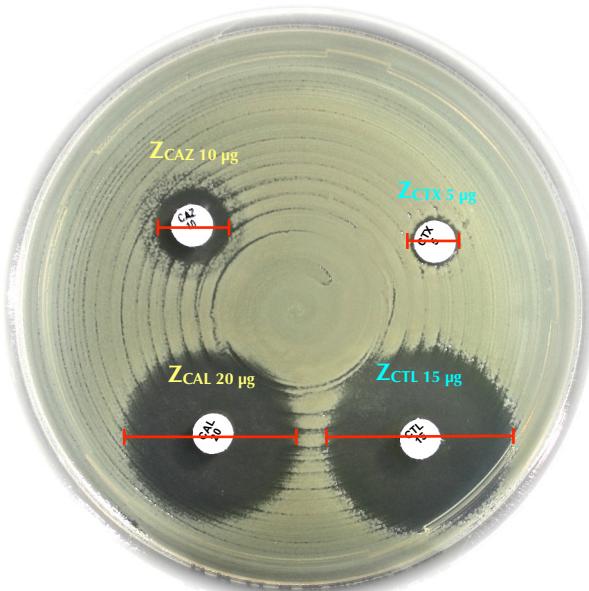
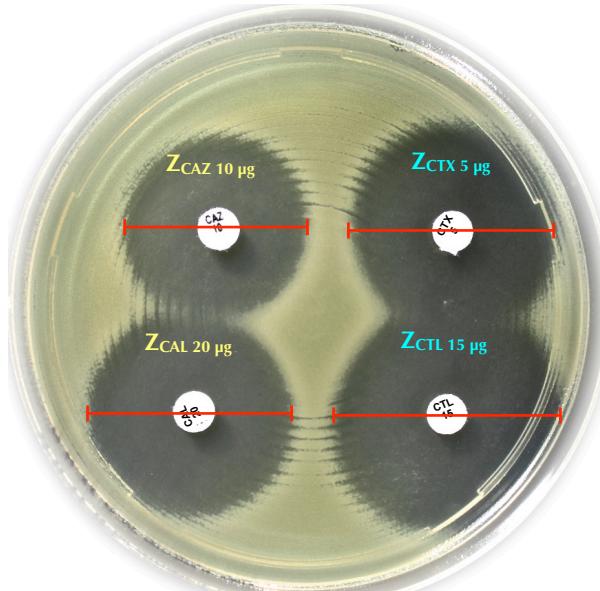
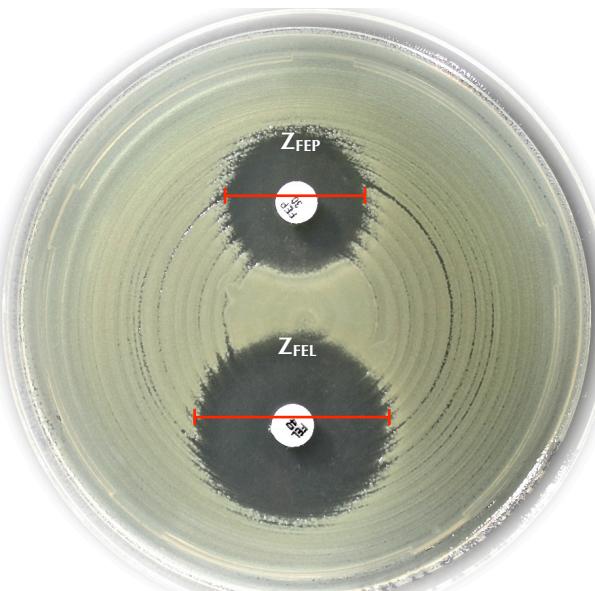
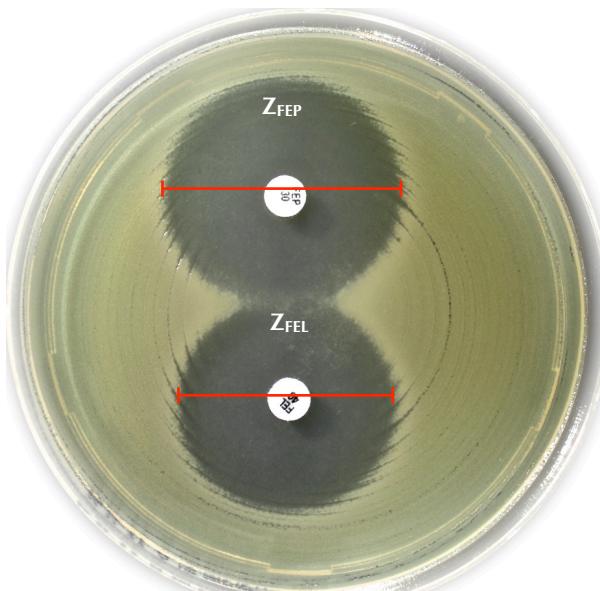
In US available as RUO device

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



# EUCAST ESBL disc kit

Disc tests for confirmation of ESBL in Enterobacteriales.

**ESBL positive strain**
 $Z_{CAL\ 20\ \mu g} - Z_{CAZ\ 10\ \mu g} \geq 5\ mm$   
 $Z_{CTL\ 15\ \mu g} - Z_{CTX\ 5\ \mu g} \geq 5\ mm$ 
**ESBL negative strain**
 $Z_{CAL\ 20\ \mu g} - Z_{CAZ\ 10\ \mu g} < 5\ mm$   
 $Z_{CTL\ 15\ \mu g} - Z_{CTX\ 5\ \mu g} < 5\ mm$ 

 $Z_{FEL} - Z_{FEP} \geq 5\ mm$ 

 $Z_{FEL} - Z_{FEP} < 5\ mm$ 
**Liofilchem srl**

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy  
 Tel +39 0858930745 Fax +39 0858930330  
*Headquarter, 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*