



ESBL disc kit (acc. to EUCAST)

ENGLISH

Disc tests for confirmation of ESBL-producing Enterobacteriaceae.

DESCRIPTION

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

Enterobacteriaceae 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 ≥ 5 mm larger with clavulanic acid than without.

When high level expression of AmpC β -lactamases is suspected, use cefepime as the indicator cephalosporin, as cefepime is not hydrolyzed by AmpC β -lactamases. Resistance to cephamycins, e.g. a ceftaxime MIC > 8 $\mu\text{g/ml}$, may be indicative of high level expression of AmpC β -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 30 μg and CTL 30+10 μg AND	≥ 5 mm increase in inhibition zone of cephalosporin with Clavulanic acid
Ceftazidime alone and with Clavulanic acid CAZ 30 μg and CAL 30+10 μg	
Cefepime alone and with Clavulanic acid ** FEP 30 μg and 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)	

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.

Control strain	Cefotaxime (30 µg)	Ceftazidime (30 µg)	Result
	Increase in zone diameter with Clavulanic acid (10 µg) compared with the cephalosporin alone		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603 ^a	≥ 3 mm	≥ 5 mm	Positive
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 ^{a,b}	≥ 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 ^{b,c}	≥ 5 mm	Positive
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm	Negative

^a Strain free of choice; one of the strains has to be used as a minimum.

^b 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.

^c 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. They are only for diagnostic *in vitro* use and are intended for professional use. They must be used in the laboratory by properly trained operators using approved aseptic and safety methods for pathogenic agents.

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 minimising 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 30	Cefotaxime + Clavulanic acid	CTL 40 (30+10)	50 Test	99004
Ceftazidime	CAZ 30	Ceftazidime + Clavulanic acid	CAL 40 (30+10)		
Cefepime	FEP 30	Cefepime + Clavulanic acid	FEL 40 (30+10)		

TABLE OF SYMBOLS

LOT Batch code	IVD In Vitro Diagnostic Medical Device	 Manufacturer	 Use by	 Fragile, handle with care
REF 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 TEST PROCEDURE (incubation) and QUALITY CONTROL; Updated REFERENCES



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330

www.liofilchem.com

liofilchem@liofilchem.com





ESBL disc kit (acc. to EUCAST)

Prueba para la confirmación de Enterobacteriaceae productoras de ESBL a través de discos.

DESCRIPCIÓN

Las β -lactamasas de amplio espectro (ESBLs) son enzimas que hidrolizan la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo los compuestos oximino- β -lactámicos exceptuando las cefamicinas y carbapenémicos. La mayoría de las ESBLs pertenecen al grupo de las β -lactamasas de la clase Ambler A y son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. La producción de ESBL se ha observado principalmente en Enterobacteriaceae, especialmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, pero el resto de las especies de Enterobacteriaceae clínicamente importantes son también productores de ESBL. En algunos sitios, la detección y caracterización de ESBL es obligatoria o aconsejada para el control de infecciones.

La detección de ESBL se lleva a cabo en 2 fases. La primera es una prueba de cribado con una cefalosporina indicadora que busca una resistencia o una disminución de susceptibilidad, identificando cepas que contengan ESBLs. El segundo paso es una prueba de confirmación que evalúa la sinergia entre una oximino cefalosporina y el ácido clavulánico, distinguiendo las cepas con ESBLs de las cepas que son resistentes por otras razones.

CONTENIDO DEL KIT

6 x 50 discos en cartuchos, cada uno empaquetado en "blíster" con desecante.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las Enterobacteriaceae aparentemente productoras de enzimas ESBL deben confirmarse evaluando la inhibición de su actividad por la acción del **Ácido Clavulánico**.

Prueba de combinación de discos (CDT)

Para cada prueba, se utilizan discos que contienen cefalosporina a solas (cefotaxime Y ceftazidime, Ó cefepime) y en combinación con ácido clavulánico. La zona de inhibición alrededor del disco de cefalosporina combinado con el ácido clavulánico se compara con la zona alrededor del disco que contiene la cefalosporina a solas. La prueba es positiva si el diámetro de la zona de inhibición es ≥ 5 mm mayor en presencia del ácido clavulánico que sin él.

Cuando hay sospechas de una elevada expresión de β -lactamasas AmpC, utilizar el cefepime como cefalosporina de referencia, ya que no es hidrolizado por las β -lactamasas AmpC. La resistencia a las cefamicinas, ejemplo: cefoxitina MIC > 8 μ g/ml, puede ser el resultado de una elevada expresión de β -lactamasas AmpC.

RECOGIDA Y MANTENIMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las colonias que van a ser analizadas con las pruebas de susceptibilidad se deben retirar del medio de cultivo que se ha inoculado previamente con la muestra a examinar.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Utilizar colonias puras, frescas para preparar la suspensión equivalente a 0.5 McFarland Standard.
2. Utilizar un hisopo de algodón estéril y extender la suspensión sobre la superficie de una placa de Mueller Hinton.
3. Aplicar los discos en la placa inoculada, asegurándose de que haya suficiente espacio entre los discos para poder leer correctamente las zonas de inhibición.
4. Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16-20 horas.

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Al finalizar el tiempo de incubación, medir los halos de inhibición e interpretar siguiendo la tabla aquí presente.

Tabla interpretativa. Método CDT para la confirmación de ESBL.

Disco Antibiótico		La confirmación es positiva si
Cefotaxime sólo y con Ácido Clavulánico * Y	CTX 30 μ g y CTL 30+10 μ g	≥ 5 mm incremento en una zona de inhibición de cefalosporina con Ácido Clavulánico
Ceftazidime sólo y con Ácido Clavulánico	CAZ 30 μ g y CAL 30+10 μ g	
Cefepime sólo y con Ácido Clavulánico **	FEP 30 μ g y FEL 30+10 μ 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> (todas productoras de AmpC cromosómico)		

CONTROL DE CALIDAD

Para comprobar el rendimiento de los discos, placas MHA, inóculo y procedimiento utilizado, utilizar *Escherichia coli* ATCC® 25922 como control negativo para ESBL. Para el control positivo se puede utilizar *Klebsiella pneumoniae* ATCC®

700603 (SHV-18 ESBL) o *Escherichia coli* NCTC 13353 (CTX-M-15 ESBL), dependiendo de la combinación de discos. Consulte las tablas siguientes para criterios específicos.

Cepa de control	Cefotaxime (30 µg)	Ceftazidime (30 µg)	Resultado
	Incremento en el diámetro de la zona de inhibición con Ácido Clavulánico(10 µg) en comparación con la cefalosporina sólo		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603 ^a	≥ 3 mm	≥ 5 mm	Positivo
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 ^{a,b}	≥ 3 mm	≥ 5 mm	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm	± 1 mm	Negativo

Cepa de control	Incremento en el diámetro de zona de inhibición con Cefepime (30 µg) + Ácido clavulánico (10 µg) en comparación con Cefepime sólo	Resultado
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 ^{b,c}	≥ 5 mm	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm	Negativo

^a Elige una de las cepas; se debe utilizar al menos una de las cepas.

^b La cepa *E. coli* NCTC 13353 productora de CTX-M-15, la que está recomendada por el CLSI para el control de calidad de diversas cefalosporinas y agentes beta-lactámicos combinados, no está incluida en las directrices EUCAST.

^c Si hay colonias discretas o una neblina de crecimiento (haze) dentro de la zona de inhibición, se necesita medir la zona interior sin colonias (CLSI M100 ED33:2023).

LÍMITES

Las pruebas de susceptibilidad por difusión son una técnica in vitro y no pueden reproducir las complejas condiciones in vivo. Sin embargo, son una herramienta útil que ayuda al médico a elegir la terapia más adecuada. Existen muchas variables que pueden afectar al resultado de la prueba de susceptibilidad por difusión. Las principales son: el medio de cultivo empleado, el impregnado de los discos, el inóculo del medio, la temperatura, la atmósfera y tiempo de incubación de las placas, las condiciones de pre-incubación y pre-difusión, la profundidad del medio, etc.

PRECAUCIONES

Los discos no están considerados como peligrosos según la legislación vigente pero deben ir acompañados de una hoja de seguridad porque podrían causar fenómenos de sensibilización en personas sensibles si entran en contacto con su piel. Los discos son productos desechables. Su uso está restringido al ámbito diagnóstico in vitro para uso profesional. Deben ser utilizados en laboratorio por usuarios debidamente adiestrados en condiciones asépticas aprobadas y métodos de seguridad para agentes patógenos.

ALMACENAMIENTO

Almacenar el blister sin abrir a -20°C a +8°C hasta su fecha de caducidad. Permitir que el cartucho sin abrir se atempere antes de que el blister sea abierto para reducir la posible condensación en los discos. Los discos restantes sin utilizar del cartucho abierto deben almacenarse a 2-8°C durante un máximo de 7 días. Reintroducir los discos en el frigorífico tan pronto como se hayan utilizado. Eliminar los discos caducados.

DESECHADO DEL MATERIAL EMPLEADO








Después de su utilización, los discos y el material que ha entrado en contacto con las muestras deben ser descontaminados y desechados siguiendo las técnicas generales de laboratorio para la descontaminación y desecho de material potencialmente infectado.

REFERENCIAS

- 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 30	Cefotaxime + Clavulanic acid	CTL 40 (30+10)	50 Pruebas	99004
Ceftazidime	CAZ 30	Ceftazidime + Clavulanic acid	CAL 40 (30+10)		
Cefepime	FEP 30	Cefepime + Clavulanic acid	FEL 40 (30+10)		

TABLA DE SÍMBOLOS

LOT	Código de lote	IVD	Dispositivo médico diagnóstico in vitro		Fabricante		Utilizar antes de		Frágil, manipular con cuidado
REF	Número de catálogo		Límites de temperatura		Contenido suficiente para <n> análisis		Consultar instrucciones de uso		No reutilizar

Historial de Revisiones

Revisión	Fecha de Estreno	Resumen de Cambios
1	2024-02-06	Revisados PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA (incubación) y CONTROL DE CALIDAD; Actualizadas REFERENCIAS



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330

www.liofilchem.com

liofilchem@liofilchem.com

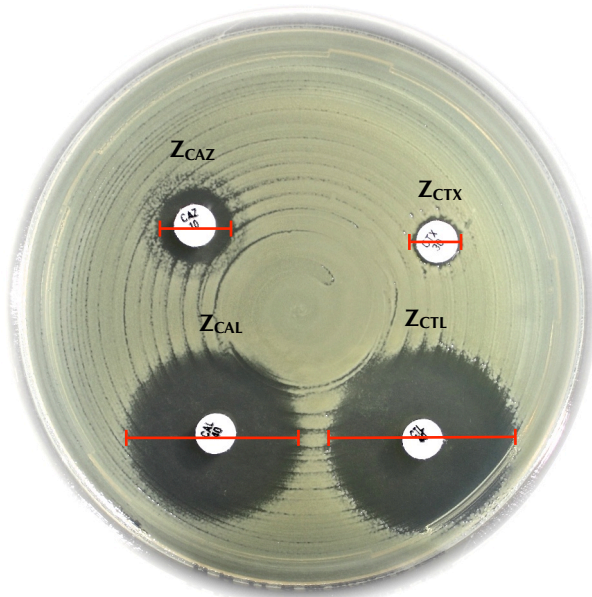




ESBL disc kit (acc. to EUCAST)

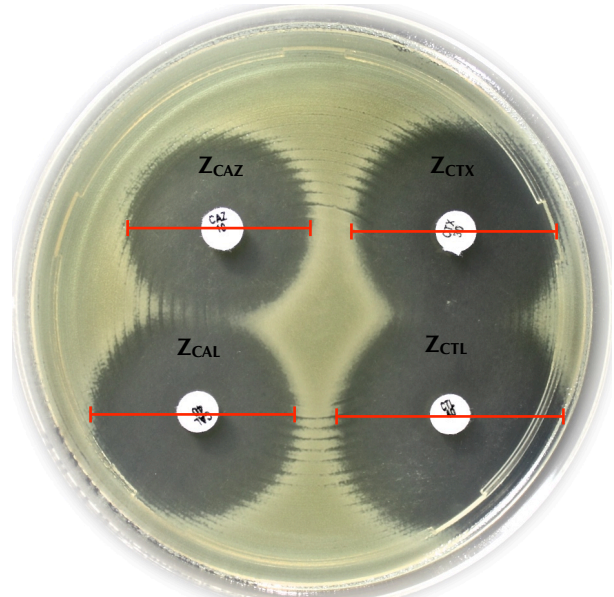
Disc tests for confirmation of ESBL-producing Enterobacteriaceae.

ESBL positive strain

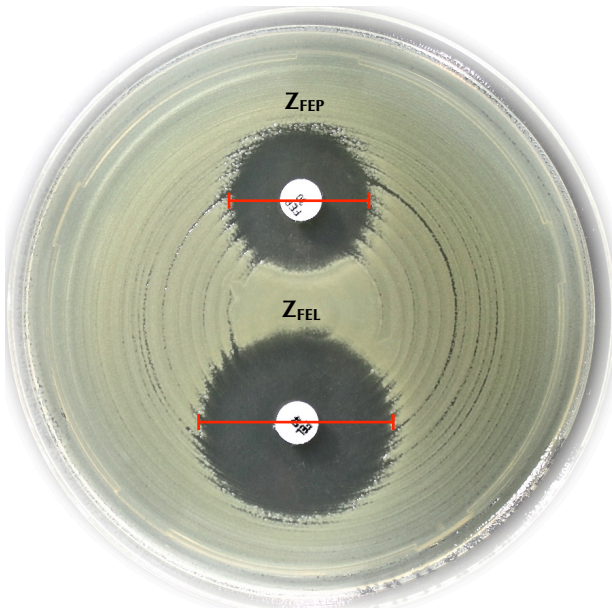


$Z_{CAL} - Z_{CAZ} \geq 5 \text{ mm}$
 $Z_{CTL} - Z_{CTX} \geq 5 \text{ mm}$

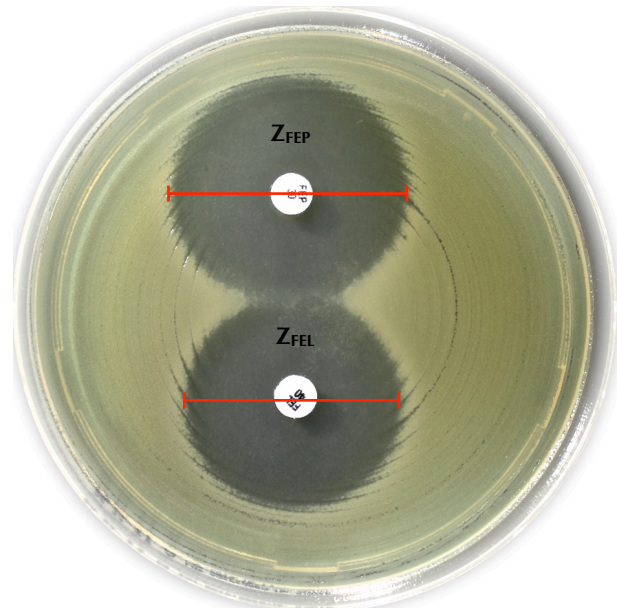
ESBL negative strain



$Z_{CAL} - Z_{CAZ} < 5 \text{ mm}$
 $Z_{CTL} - Z_{CTX} < 5 \text{ mm}$



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



$Z_{FEL} - Z_{FEP} < 5 \text{ mm}$



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy

Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.net

liofilchem@liofilchem.net

