



ESBL (Chromos. Induc. AmpC) disc kit (acc. to EUCAST)

Disc tests for confirmation of ESBLs in organisms with chromosomally encoded inducible AmpC.

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.

AmpC β -lactamases are enzymes encoded on the chromosome of many Enterobacteriaceae and a few other organisms. AmpC enzymes belong to class C, are active on penicillins but even more active on cephalosporins and can significantly hydrolyze cephamycins such as cefoxitin and cefotetan and oxyiminocephalosporins such as ceftazidime, cefotaxime, and ceftriaxone. Inhibitors of class A enzymes such as clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam have much less effect on AmpC, although some are inhibited by tazobactam or sulbactam. In many Enterobacteriaceae, AmpC expression is low but inducible in response to β -lactam exposure. β -lactamase inhibitors are also inducers, especially clavulanate. Overexpression confers resistance to broad-spectrum cephalosporins and is a problem especially in infections due to *E. aerogenes* and *E. cloacae*, where an isolate initially susceptible to these agents may become resistant upon therapy. Cefepime is a poor inducer of AmpC β -lactamase, rapidly penetrates through the outer cell membrane, and is little hydrolyzed by the enzyme, so many AmpC-producing organisms test cefepime susceptible.

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. On the contrary, organisms producing enough AmpC β -lactamase will typically give a positive ESBL screening test but fail the confirmatory test involving increased sensitivity with clavulanic acid. To recognize organisms which simultaneously produce both ESBL and AmpC enzymes cefepime is the antibiotic of choice.

CONTENTS OF THE PACKAGES

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

METHOD PRINCIPLE

Enterobacteriaceae suspected to be producers of both ESBL and AmpC enzymes may be confirmed by using cefepime to evaluate the inhibition of ESBL activity by **Clavulanic acid**.

Combination Disc Test (CDT)

For each test, discs containing cefepime alone and in combination with clavulanic acid are applied. The inhibition zone around the cefepime disc combined with clavulanic acid is compared with the zone around the disc with the cefepime alone. The test is positive if the inhibition zone diameter is ≥ 5 mm larger with clavulanic acid than without.

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 equivalent to 0.5 McFarland.
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 in Enterobacteriaceae producing chromosomal AmpC.

Antibiotic Disc		Confirmation is positive if
Cefepime alone and with Clavulanic acid	FEP 30 μg and FEL 30+10 μg	≥ 5 mm increase in inhibition zone of cefepime with Clavulanic acid

QUALITY CONTROL

To check the performance of discs, MHA plates, inoculum and procedure used, test *Escherichia coli* ATCC® 25922 and *Escherichia coli* NCTC 13353^a (CTX-M-15 ESBL) as a negative and positive control for ESBL, respectively. The following criteria should be met:

Control strain	Criteria	Result
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 ^a	≥ 5 mm increase in zone diameter with Cefepime (30 µg) + Clavulanic acid (10 µg) compared with Cefepime alone	Positive
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	± 1 mm difference in zone diameter with Cefepime (30 µg) + Clavulanic acid (10 µg) compared with Cefepime alone	Negative

^a 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; 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 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
Cefepime FEP	30	Cefepime + Clavulanic acid FEL	40 (30+10)	100 Test	99006

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 (Chromos. Induc. AmpC) disc kit (acc. to EUCAST)

Pruebas de confirmación de ESB�s en organismos con enzimas AmpC inducibles y con cromosomas codificados, 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 ESB�s 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 ESB� 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 ESB�. En algunos sitios, la detección y caracterización de ESB� es obligatoria o aconsejada para el control de infecciones.

Las β -lactamasas AmpC son enzimas codificadas en los cromosomas de muchas Enterobacteriaceae y de algunos otros organismos. Las enzimas AmpC pertenecen a la clase C, y son activas sobre las penicilinas y más aún sobre las cefalosporinas y pueden hidrolizar cefamicinas como la cefoxitina, el cefotetan y oximinocefalosporinas como el ceftazidime, cefotaxime, y la ceftriaxona. Los inhibidores de las enzimas de clase A, como el ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam son menos eficientes contra la AmpC, aunque algunas son inhibidas más eficazmente por el tazobactam o sulbactam. En muchas Enterobacteriaceae, la expresión de la AmpC es baja pero inducible como respuesta a la exposición a β -lactámicos. Los inhibidores de la β -lactamasa pueden ser inductores al mismo tiempo, como el clavulanato. Una sobreexpresión confiere resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y es un problema de gravedad, especialmente hablando de infecciones debidas a E. aerogenes y E. cloacae, donde un aislado inicialmente susceptible a estos fármacos puede llegar a ser resistente después de la terapia. El Cefepime es un inductor poco eficiente de la β -lactamasa AmpC, Atraviesa rápidamente la membrana celular externa, y es parcialmente hidrolizado por la enzima, muchos organismos productores de AmpC encuentran el Cefepime susceptible.

La detección de ESB� 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 ESB�s. El segundo paso es una prueba de confirmación que evalúa la sinergia entre una oximino cefalosporina y el ácido clavulánico, distinguiendo las cepas con ESB�s de las cepas que son resistentes por otras razones.

Por otro lado, los organismos que producen suficiente β -lactamasa AmpC darán un resultado positivo al cribado de ESB� pero negativo en la prueba de confirmación debido al aumento de sensibilidad con el ácido clavulánico. Para detectar organismos que producen a la vez enzimas ESB� y AmpC, el Cefepime será el antibiótico de elección.

CONTENIDO DEL KIT

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

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las Enterobacteriaceae aparentemente productoras de enzimas ESB� y AmpC deben confirmarse utilizando Cefepime para evaluar 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 Cefepime a solas y en combinación con ácido clavulánico. La zona de inhibición alrededor del disco que contiene Cefepime combinado con el ácido clavulánico se compara con la zona alrededor del disco que contiene el Cefepime 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.

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 a continuación.

Tabla interpretativa. Método CDT para la confirmación de ESBL en Enterobacteriaceae productoras de AmpC cromosómico.

Disco Antibiótico	La confirmación es positiva si
Cefepime a solas y con Ácido Clavulánico FEP 30 µg y FEL 30+10 µg	≥ 5 mm incremento en una zona de inhibición de Cefepime con Ácido Clavulánico

CONTROL DE CALIDAD

Para comprobar el rendimiento de los discos, placas MHA, inóculo y procedimiento utilizado, utilizar *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Escherichia coli* NCTC 13353a (CTX-M-15 ESBL) como control negativo y positivo para ESBL, respectivamente. Se deben cumplir los siguientes criterios:

Cepa de control	Criterios	Resultado
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 ^a	Incremento ≥ 5 mm en el diámetro de la zona de inhibición con Cefepime (30 µg) + Ácido Clavulánico (10 µg) en comparación con Cefepime solo	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Diferencia de ± 1 mm en el diámetro de la zona de inhibición con Cefepime (30 µg) + Ácido Clavulánico (10 µg) en comparación con Cefepime solo	Negativo

^a 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; 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 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
Cefepime FEP	30	Cefepime + Clavulanic acid FEL	40 (30+10)	100 Pruebas	99006

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

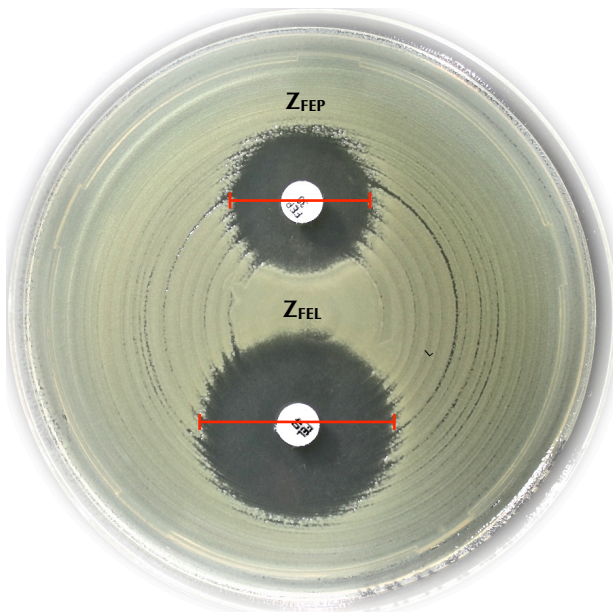




ESBL (Chromos. Induc. AmpC) disc kit (acc. to EUCAST)

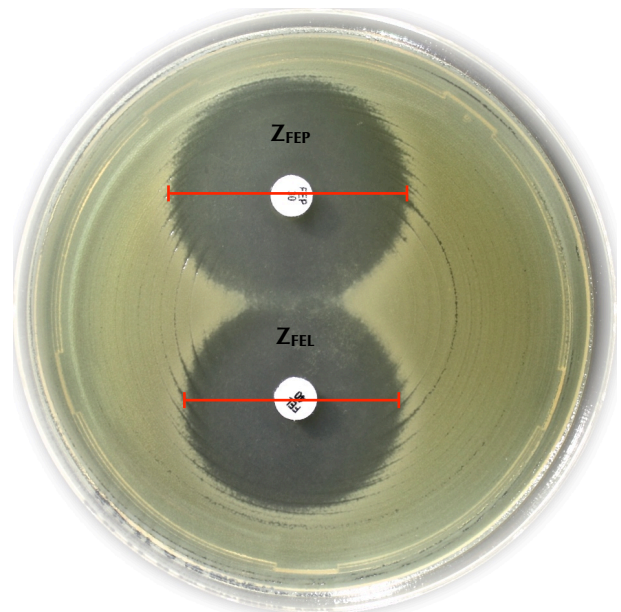
Disc tests for confirmation of ESBLs in organisms with
chromosomally encoded inducible AmpC.

ESBL positive strain



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

ESBL negative strain



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



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

