



ESBL+AmpC screen disc kit

Disc tests for screening of ESBLs and/or AmpC producing organisms.

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, which are strongly inhibited by boronic acid and cloxacillin.

CONTENTS OF THE PACKAGES

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

METHOD PRINCIPLE

Organisms suspected to be producers of either ESBL or AmpC enzymes may be tested with cefotaxime for evaluating the synergistic effects when combined with the following inhibitors:

- **Clavulanic acid** inhibits ESBL β -lactamases;
- **Cloxacillin** inhibits AmpC β -lactamases.

Combination Disc Tests (CDT) are carried out. Discs containing cefotaxime alone and in combination with clavulanic acid, cloxacillin and both of these inhibitors are applied. The inhibition zone around the cefotaxime disc combined with inhibitors is compared with the zone around the disc without the inhibitors.

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 II agar plate.
3. Apply the discs on the inoculated plate, ensuring sufficient space between individual discs to allow for proper measurement of inhibition zones.
4. Incubate at $36\pm 1^\circ\text{C}$ for 18-24 hours.

EVALUATING THE RESULTS

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

Interpretative Table. CDT method for screening of ESBL and/or AmpC.

Antibiotic Disc	Difference in zone diameters when compared with			β -lactamase
	Cefotaxime (CTX)	Cefotaxime+ Clavulanic acid (CTL)	Cefotaxime+ Cloxacillin (CTC)	
Cefotaxime+Clavulanic acid (CTL) or	≥ 5 mm	-	-	ESBL
Cefotaxime+Clavulanic acid+Cloxacillin (CTLC)	-	< 5 mm	≥ 5 mm	
Cefotaxime+Cloxacillin (CTC) or	≥ 5 mm	-	-	AmpC
Cefotaxime+Clavulanic acid+Cloxacillin (CTLC)	-	≥ 5 mm	< 5 mm	
Cefotaxime+Clavulanic acid (CTL) and	< 5 mm	-	-	ESBL+AmpC
Cefotaxime+Clavulanic acid+Cloxacillin (CTLC)	-	≥ 5 mm (AmpC)	≥ 5 mm (ESBL)	

If all zones are within 2 mm of each other, it means that the organism being tested is neither ESBL or AmpC producer.

QUALITY CONTROL

Appropriate strains for quality control of ESBL and AmpC detection tests:

Microorganism		ESBL phenotype	AmpC phenotype
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 700603	+	-
<i>Enterobacater cloacae</i>	ATCC® BAA-1143	-	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	-	-

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

- Jacoby G.A. AmpC β -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1): 161–182.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, 2013.

PRESENTATION

DESCRIPTION		PACKAGING	REF	TESTS
Cefotaxime 30 µg	CTX	1 x 50 Discs	99008	50
Cefotaxime 30 µg + Clavulanic acid	CTL	1 x 50 Discs		
Cefotaxime 30 µg + Cloxacillin	CTC	1 x 50 Discs		
Cefotaxime 30 µg + Clavulanic acid + Cloxacillin	CTLC	1 x 50 Discs		

TABLE OF SYMBOLS

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

**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





ESBL+AmpC screen disc kit

Dischi per i test di screening di microrganismi produttori di ESB� e/o AmpC.

DESCRIZIONE

Le β -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 ESB�, secondo la classificazione di Ambler, sono β -lattamasi di classe A e sono inibite da acido clavulanico, sulbactam e tazobactam. La produzione di ESB� è stata osservata principalmente nelle Enterobacteriaceae, in particolare *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, ma tutte le altre specie di rilevanza clinica producono comunemente ESB�. In molte aree, ai fini del controllo delle infezioni la ricerca e la caratterizzazione di ESB� è raccomandata od obbligatoria.

Le β -lattamasi AmpC sono enzimi codificati sul cromosoma di diverse Enterobacteriaceae e alcuni altri microorganismi. Gli enzimi AmpC appartengono alla classe C, sono attivi sulle penicilline e sulle cefalosporine e possono idrolizzare in maniera significativa le cefamicine come cefoxitina e cefotetan e le oximino-cefalosporine come ceftazidime, cefotaxime e ceftriaxone. Gli inibitori degli enzimi di classe A come acido clavulanico, sulbactam e tazobactam hanno un effetto considerevolmente inferiore sugli AmpC, che sono invece fortemente inibiti da acido boronico e cloxacillina.

CONTENUTO DEL KIT

Cartucce 4 x 50 dischi, ciascuna confezionata in un "blister" con essiccante.

PRINCIPIO DEL METODO

Gli organismi sospettati di essere produttori di enzimi ESB� o AmpC sono testati con il cefotaxime per valutare gli effetti sinergici quando è in combinazione con i seguenti inibitori:

- **Acido clavulanico** inibisce le β -lattamasi ESB�;
- **Cloxacillina** inibisce le β -lattamasi AmpC.

I test combinati (CDT) consistono nell'applicare sia il disco contenente cefotaxime da solo ed i dischi contenenti cefotaxime in combinazione con acido clavulanico e cloxacillina. Al termine dell'incubazione vengono quindi confrontate le zone di inibizione.

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 II 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 $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 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 lo screening di ESB� e/o AmpC.

Disco Antibiotico	Differenza nei diametri di inibizione confrontato con			β -lattamasi
	Cefotaxime (CTX)	Cefotaxime+ Acido clavulanico (CTL)	Cefotaxime+ Cloxacillina (CTC)	
Cefotaxime+Acido clavulanico (CTL) o	≥ 5 mm	-	-	ESBL
Cefotaxime+Acido clavulanico+Cloxacillina (CTLC)	-	< 5 mm	≥ 5 mm	
Cefotaxime+Cloxacillina (CTC) o	≥ 5 mm	-	-	AmpC
Cefotaxime+Acido clavulanico+Cloxacillina (CTLC)	-	≥ 5 mm	< 5 mm	
Cefotaxime+Acido clavulanico (CTL) e	< 5 mm	-	-	ESBL +AmpC
Cefotaxime+Acido clavulanico+Cloxacillina (CTLC)	-	≥ 5 mm (AmpC)	≥ 5 mm (ESBL)	

Se non ci sono differenze tra gli aloni superiori a 2 mm, significa che l'organismo esaminato non è produttore né di ESB� né di AmpC.

CONTROLLO QUALITÀ

Ceppi appropriati per il controllo qualità dei test per la ricerca di ESBL ed AmpC:

Microrganismo		Fenotipo ESBL	Fenotipo AmpC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 700603	+	-
<i>Enterobacater cloacae</i>	ATCC® BAA-1143	-	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	-	-

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 e 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.

CONSERVAZIONE

Il blister integro deve essere conservato a $-20^{\circ}\text{C}/+8^{\circ}\text{C}$ 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ 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

- Jacoby G.A. AmpC β -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1): 161–182.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, 2013.

PRESENTAZIONE

DESCRIZIONE		CONFEZIONAMENTO	REF	TEST
Cefotaxime 30 μg	CTX	1 x 50 Dischi	99008	50
Cefotaxime 30 μg + Clavulanic acid	CTL	1 x 50 Dischi		
Cefotaxime 30 μg + Cloxacillin	CTC	1 x 50 Dischi		
Cefotaxime 30 μg + Clavulanic acid + Cloxacillin	CTLC	1 x 50 Dischi		

TABELLA DEI SIMBOLI

LOT Codice del lotto	IVD Dispositivo Medico Diagnostico <i>in Vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Fragile, utilizzare con cura
REF Numero di catalogo	 Temperatura limitata	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Attenzione, consultare i documenti in accompagnamento	 Non riutilizzare

**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





ESBL+AmpC screen disc kit

Prueba para el cribado de organismos productores de ESB�s y/o AmpC 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, que son inhibidas más eficazmente por el ácido borónico y la cloxacilina.

CONTENIDO DEL KIT

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

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Organisms suspected to be producers of either ESB� or AmpC enzymes may be tested with cefotaxime for evaluating the synergistic effects when combined with the following inhibitors:

- **Ácido Clavulánico** inhibe las β -lactamasas ESB�
- **Cloxacilina** inhibe las β -lactamasas AmpC.

Se llevan a cabo pruebas de combinación de discos (CDT). Se utilizan discos que contienen cefotaxime a solas y en combinación con ácido clavulánico y/o cloxacilina. La zona de inhibición alrededor del disco de cefotaxime combinado con inhibidores se compara con la zona de inhibición del disco que no contiene inhibidores.

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 $35\pm 2^\circ\text{C}$ durante 18-24 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 el cribado de ESB� y/o AmpC.

Disco Antibiótico	Diferencias de diámetro en comparación con			β -lactamasa
	Cefotaxime (CTX)	Cefotaxime+Ácido Clavulánico (CTL)	Cefotaxime+Cloxacilina (CTC)	
Cefotaxime+Ácido Clavulánico (CTL) ó	≥ 5 mm	-	-	ESBL
Cefotaxime+Ácido Clavulánico+Cloxacilina (CTLC)	-	< 5 mm	≥ 5 mm	
Cefotaxime+Cloxacilina (CTC) ó	≥ 5 mm	-	-	AmpC
Cefotaxime+Ácido Clavulánico+Cloxacilina (CTLC)	-	≥ 5 mm	< 5 mm	
Cefotaxime+Ácido Clavulánico (CTL) y	< 5 mm	-	-	ESBL+AmpC
Cefotaxime+Ácido Clavulánico+Cloxacilina (CTLC)	-	≥ 5 mm (AmpC)	≥ 5 mm (ESBL)	

Si todas las zonas están dentro de 2 mm en comparación con las demás, significa que el organismo que estamos controlando no es productor de ESB� ni de AmpC

CONTROL DE CALIDAD

Cepas adecuadas para el control de calidad de las pruebas de detección de ESBL:

Microorganismo		Fenotipo ESBL	Fenotipo AmpC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 700603	+	-
<i>Enterobacater cloacae</i>	ATCC® BAA-1143	-	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	-	-

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

- Jacoby G.A. AmpC β -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1): 161–182.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, 2013.

PRESENTACIÓN

DESCRIPCIÓN		PRESENTACIÓN	REF	PRUEBAS
Cefotaxime 30 μ g	CTX	1 x 50 Discos	99008	50
Cefotaxime 30 μ g + Clavulanic acid	CTL	1 x 50 Discos		
Cefotaxime 30 μ g + Cloxacillin	CTC	1 x 50 Discos		
Cefotaxime 30 μ g + Clavulanic acid + Cloxacillin	CTLC	1 x 50 Discos		

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	 Atención, consultar el documento adjunto	 No reutilizar

**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

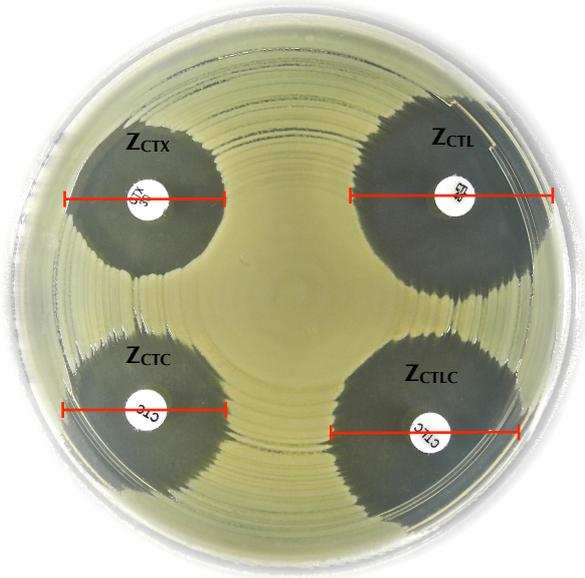




ESBL+AmpC screen disc kit

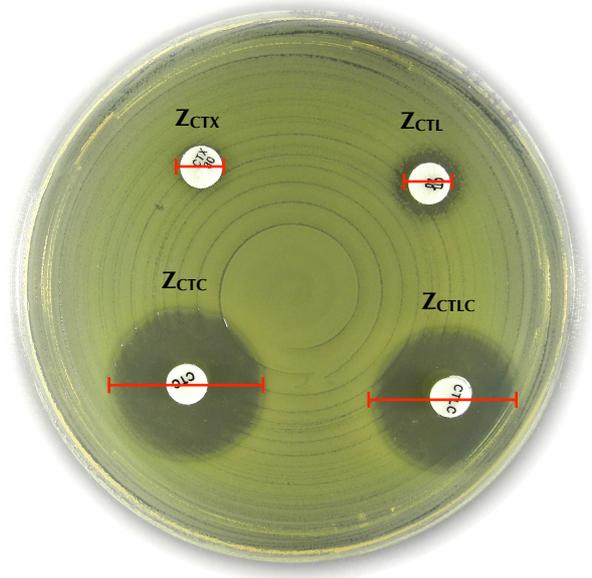
Disc tests for screening of ESBLs and/or AmpC producing organisms.

ESBL positive strain



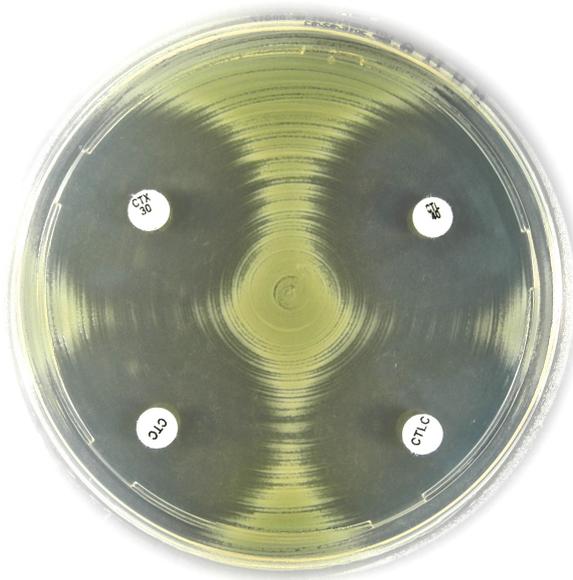
$Z_{CTL} - Z_{CTX} \geq 5 \text{ mm}$
or
 $Z_{CTLC} - Z_{CTC} \geq 5 \text{ mm}$
($Z_{CTLC} - Z_{CTL} < 5 \text{ mm}$)

AmpC positive strain



$Z_{CTC} - Z_{CTX} \geq 5 \text{ mm}$
or
 $Z_{CTLC} - Z_{CTL} \geq 5 \text{ mm}$
($Z_{CTLC} - Z_{CTC} < 5 \text{ mm}$)

Negative control



All zones within 2 mm of each other



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

