



## E.coli Test

Rapid test for detection of  $\beta$ -galactosidase activity, indole production and MUG fluorescence.

### INTENDED PURPOSE

Rapid test for *Escherichia coli* presumptive identification. This test is intended as an aid in the diagnosis, requiring further tests to complete the diagnostic results.

### DESCRIPTION

E.coli Test is used for *E. coli* detection through the qualitative determination of activity of three enzymes:  $\beta$ -galactosidase, tryptophanase and  $\beta$ -glucuronidase.

### KIT CONTENT

- 30 Tubes of E.coli Test
- 1 Tube of Kovac's Reagent (3.0 ml)

### METHOD PRINCIPLE

The enzyme  $\beta$ -galactosidase, which allows bacteria to metabolize lactose by splitting it into glucose and galactose, hydrolyzes the colourless substrate ONPG (ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) with the formation of o-nitrophenol, a yellow compound. Bacteria that produce the enzyme tryptophanase are able to degrade the amino acid tryptophan into pyruvic acid, ammonium and indole. The indole produced reacts with p-dimethylaminobenzaldehyde of the Kovac's (indole) reagent to form a red-violet compound. The enzyme  $\beta$ -glucuronidase cleaves the colourless substrate MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) to produce 4-methylumbelliferone, which fluoresces under long-wave ultra-violet light (approximately 366 nm).

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: incubator, inoculating loop, pipettes, physiological solution (0.85% saline), culture media, Wood's lamp, quality control organisms.

### REAGENTS

- A tube of E.coli Test contains desiccated biochemical substrates and nutritive components such as ONPG, MUG and tryptone, which includes tryptophane.
- Kovac's Reagent consists of 5% p-dimethylaminobenzaldehyde dissolved in a solution of 25% hydrochloric acid and 75% isobutyl alcohol.

### SPECIMEN

Collect specimens in sterile containers or with sterile swabs and transport to the laboratory. Process each specimen using procedures appropriate for that sample. This product is recommended for use only with pure cultures.

Refer to specific guidelines for more detailed information.

### TEST PROCEDURE

1. Take the number of E.coli Test tubes needed from the fridge and allow them to reach room temperature.
2. Add 0.25 ml of physiological solution to each tube.
3. With a sterile loop pick up one or more than one well isolated colony from a fresh culture plate (18-24 hours old) and emulsify in the tube.
4. Incubate tubes at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for up to 24 hours.
5. Examine tubes at intervals of 1, 4 and 24 hours for broth colour change and fluorescence under long-wave UV light.
6. Add 2 drops of Kovac's Reagent to perform the Indole Test.

**Note:** Positive and negative controls should be run simultaneously with the organism to be tested (see QUALITY CONTROL).

## INTERPRETING RESULTS

A broth colour change to yellow (ONPG positive), blue fluorescence (MUG positive) and development of a red ring (Indole positive) at the surface of the broth within 30 seconds after addition of Kovac's Reagent, indicate the presence of *E. coli*.

## STORAGE

Store at 2-8°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

## SHELF LIFE

1 year.

## QUALITY CONTROL

**Appearance of E.coli Test:** yellowish powder, yellow solution once reconstituted

**Appearance of Kovac's Reagent:** yellow-green liquid, clear

| Control strain               |             | Characteristic reactions                                                                                                                                    |
|------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC® 13383 | Positive ONPG reaction:<br>Development of a yellow colour<br>Negative MUG reaction:<br>No fluorescence<br>Negative indole reaction:<br>Yellow/brown ring    |
| <i>Escherichia coli</i>      | ATCC® 25922 | Positive ONPG reaction:<br>Development of a yellow colour<br>Positive MUG reaction:<br>Fluorescence<br>Positive indole reaction:<br>Formation of a red ring |
| <i>Proteus mirabilis</i>     | ATCC® 25923 | Negative ONPG reaction:<br>No colour change<br>Negative MUG reaction:<br>No fluorescence<br>Negative indole reaction:<br>Yellow/brown ring                  |

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance testing of E.coli Test was carried out using the QC strains listed above. The results obtained met the established criteria.

## LIMITATIONS

This test is only part of the overall scheme for the identification of *E. coli*. Further biochemical and/ or serological testing is required for definitive identification.

Due to nutritional variation, some strains may result in poor growth or fail to grow on this medium providing false negative results.

Inoculation of test organism should be done only from lactose-containing medium.

The reaction speed depends on the size of the inoculum.

Allow at least 30 seconds for the color to develop before considering the indole test negative. Pigmented organisms may yield ambiguous results.

Indole produced by certain anaerobes, such as *Clostridium* species, can be rapidly degraded resulting in false negative reactions.

## WARNING AND PRECAUTIONS

- 1) **For *in vitro* diagnostic use (IVD).**
- 2) **For laboratory professional use only.**

- 3) Operators must be trained and have certain experience. Please read the instructions carefully before using the product. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this document.
- 4) Consult the Safety Data Sheet (SDS) for information regarding hazards and safe handling practices.
- 5) Do not use if the product or packaging appears to be damaged.
- 6) Follow standard precautions. All patient specimens should be considered potentially infectious and handled accordingly.
- 7) Handle all specimens as if infectious using safe laboratory procedures. Dispose of hazardous or biologically contaminated materials according to the practices of your institution.
- 8) Avoid cross-contamination of samples by using disposable tips and changing them after each sample.
- 9) Do not mix reagents of different batches. Please use the product within the validity period.
- 10) Do not eat, drink, smoke, apply cosmetics or handle contact lenses in areas where reagents and human specimens are handled.
- 11) Results should be interpreted by a trained professional in conjunction with the patient's history and clinical signs and symptoms, and epidemiological risk factors.
- 12) Ensure laboratory equipment is calibrated and maintained in accordance with the laboratory's procedure.
- 13) When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.

### DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

### BIBLIOGRAPHY

See the references at the end of this document.

### TABLE OF SYMBOLS

See the table of symbols at the end of this document.

### ORDER INFORMATION

| Product     | Packaging | Ref.  |
|-------------|-----------|-------|
| E.coli Test | 30 tests  | 88006 |

### Revision History

| Revision | Release Date | Change Summary                                                                           |
|----------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1        | 2024-09-16   | Added notice to report any malfunction, defect or incident.                              |
| 0        | 2023-05-15   | Updated layout and content in compliance with IVDR 2017/746, version reset to revision 0 |

In case of malfunctions or defects, contact immediately Liofilchem (\*) or the local representative.

In case of incident associated with the device, notify immediately Liofilchem (\*) or its local representative and the National Competent Authority.

\*Please login to <https://www.liofilchemstore.it/login.php> (user ID and password required) and click on Complaint.

This IFU document and the SDS are available from the online Support Center:

[liofilchem.com/ifu-sds](https://www.liofilchem.com/ifu-sds)



## E.coli Test

Test rapido per la rilevazione dell'attività  $\beta$ -galattosidasi,  
produzione di indolo e fluorescenza MUG.

### DESTINAZIONE D'USO

Test rapido per l'identificazione presuntiva di *Escherichia Coli*. Il test è inteso come ausilio alla diagnosi, e sono necessari ulteriori test per completare i risultati diagnostici.

### DESCRIZIONE

E.coli Test viene utilizzato per il rilevamento di *E. coli* mediante la determinazione qualitativa dell'attività di tre enzimi:  $\beta$ -galattosidasi, triptofanasi e  $\beta$ -glucuronidasi.

### CONTENUTO DEL KIT

- 30 provette di E.coli Test
- 1 flacone di Kovac's Reagent (3.0 ml)

### PRINCIPIO DEL METODO

L'enzima  $\beta$ -galattosidasi, che permette ai batteri di metabolizzare il lattosio scindendolo in glucosio e galattosio, idrolizza il substrato incolore ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside) con formazione di o-nitrofenolo, un composto giallo. I batteri che producono l'enzima triptofanasi sono in grado di degradare l'amminoacido triptofano in acido piruvico, ammonio e indolo. L'indolo prodotto reagisce con la p-dimetilamminobenzaldeide del Kovac's Reagent (indolo) formando un composto rosso-violetto. L'enzima  $\beta$ -glucuronidasi scinde il substrato incolore MUG (4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide) per produrre 4-metilumbelliferone, che emette fluorescenza sotto la luce ultravioletta a onde lunghe (circa 366 nm).

### MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Forniture e apparecchiature microbiologiche standard come: incubatore, ansa da inoculo, pipette, soluzione fisiologica (0.85% salina), terreni di coltura, lampada di Wood, microrganismi per il controllo qualità.

### REAGENTI

- Una provetta di E.coli Test contiene substrati biochimici essiccati e componenti nutritivi come ONPG, MUG e triptone, che include il triptofano.
- Kovac's Reagent è costituito dal 5% di p-dimetilamminobenzaldeide disciolto in una soluzione di acido cloridrico al 25% e alcool isobutilico al 75%.

### CAMPIONI

Raccogliere i campioni prelevati in contenitori sterili o con tamponi sterili e trasportarli in laboratorio. Trattare i campioni secondo la procedura appropriata per ognuno di loro. Questo prodotto è consigliato per l'uso esclusivamente con colture pure.

Fare riferimento alle linee guida specifiche per informazioni più dettagliate.

### PROCEDURA DEL TEST

1. Prelevare dal frigorifero il numero necessario di provette E.coli Test e lasciare che raggiungano la temperatura ambiente.
2. Aggiungere in ogni provetta 0,25 ml di soluzione fisiologica.
3. Con un'ansa sterile prelevare una o più colonie ben isolate da una piastra di coltura fresca (di 18-24 ore) ed emulsionare nella provetta.
4. Incubare le provette a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per un massimo di 24 ore.
5. Esaminare le provette a intervalli di 1, 4 e 24 ore per il viraggio del colore del brodo e la fluorescenza alla luce UV a onde lunghe.
6. Aggiungere 2 gocce di Kovac's Reagent per eseguire il test dell'indolo.

**Nota:** i controlli positivi e negativi devono essere eseguiti simultaneamente con l'organismo da testare (vedere CONTROLLO DI QUALITÀ).

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il cambiamento di colore del brodo in giallo (ONPG positivo), la fluorescenza blu (MUG positivo) e lo sviluppo di un anello rosso (indolo positivo) sulla superficie del brodo entro 30 secondi dall'aggiunta del Kovac's Reagent indicano la presenza di *E. coli*.

## CONSERVAZIONE

Conservare a 2-8°C nella sua confezione originale. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento.

## VALIDITÀ

1 anno.

## CONTROLLO QUALITÀ

**Aspetto di E.coli Test:** Polvere giallastra, soluzione gialla una volta ricostruita.

**Aspetto del Kovac's Reagent:** Liquido giallo verde, limpido

| Ceppi di controllo           |             | Caratteristiche di reazione                                                                                                                                   |
|------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC® 13383 | Reazione ONPG positiva:<br>Sviluppo del colore giallo<br>Reazione MUG negativa:<br>Nessuna fluorescenza<br>Reazione indolo positiva:<br>Anello marrone/giallo |
| <i>Escherichia coli</i>      | ATCC® 25922 | Reazione ONPG positiva:<br>Sviluppo del colore giallo<br>Reazione MUG positiva:<br>Fluorescenza<br>Reazione indolo positiva:<br>Anello marrone/giallo         |
| <i>Proteus mirabilis</i>     | ATCC® 25923 | Reazione ONPG negativa:<br>Nessun cambio di colore<br>Reazione MUG negativa:<br>Nessuna fluorescenza<br>Reazione indolo negativa:<br>Anello marrone/giallo    |

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il controllo delle prestazioni di E.coli Test è stato eseguito utilizzando i ceppi sopra elencati. I risultati ottenuti hanno soddisfatto i criteri stabiliti.

## LIMITAZIONI

Questo test è solo una parte dello schema generale per l'identificazione di *E. coli*. Per l'identificazione definitiva sono necessari ulteriori test biochimici e/o sierologici.

A causa della variazione nutrizionale, alcuni ceppi possono causare una scarsa crescita o non crescere su questo terreno, fornendo risultati falsi negativi.

L'inoculazione del microrganismo da testare deve essere effettuata solo da terreno contenente lattosio.

La velocità di reazione dipende dalla dimensione dell'inoculo.

Attendere almeno 30 secondi affinché il colore si sviluppi prima di considerare negativo il test dell'indolo. Gli organismi pigmentati possono produrre risultati ambigui.

L'indolo prodotto da alcuni anaerobi, come la specie *Clostridium*, può essere rapidamente degradato provocando reazioni false negative.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- 1) Per uso diagnostico in vitro (IVD).
- 2) Solo per uso professionale di laboratorio.

- 3) Gli operatori devono essere formati e avere una certa esperienza. Si prega di leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il prodotto. L'affidabilità dei risultati del test non può essere garantita in caso di deviazioni dalle istruzioni contenute in questo documento.
- 4) Consultare la scheda di sicurezza (SDS) per informazioni sui pericoli e sulle pratiche di manipolazione sicure.
- 5) Non utilizzare se il prodotto o la confezione sembrano danneggiati.
- 6) Seguire le precauzioni standard. Tutti i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infetti e maneggiati di conseguenza.
- 7) Maneggiare tutti i campioni come infetti utilizzando procedure di laboratorio sicure. Smaltire materiali pericolosi o biologicamente contaminati secondo le pratiche del proprio istituto.
- 8) Evitare la contaminazione incrociata dei campioni utilizzando puntali monouso e sostituendole dopo ogni campione.
- 9) Non mescolare reagenti di lotti diversi. Si prega di utilizzare il prodotto entro il periodo di validità.
- 10) Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto nelle aree in cui vengono manipolati reagenti e campioni umani.
- 11) I risultati devono essere interpretati da un professionista qualificato insieme alla storia del paziente, ai segni e sintomi clinici e ai fattori di rischio epidemiologici.
- 12) Assicurarsi che le apparecchiature di laboratorio siano calibrate e mantenute in conformità con la procedura del laboratorio.
- 13) Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un centro informatico, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.

#### **SMALTIMENTO DEI RIFIUTI**

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.

#### **BIBLIOGRAFIA**

Vedere i riferimenti bibliografici alla fine di questo documento.

#### **TABELLA DEI SIMBOLI**

Vedere la tabella dei simboli alla fine di questo documento.

#### **INFORMAZIONI PER L'ORDINE**

| Prodotto    | Confezionamento | Rif.  |
|-------------|-----------------|-------|
| E.coli Test | 30 test         | 88006 |

In caso di malfunzionamenti o difetti, contattare immediatamente Liofilchem (\*) o il rappresentante locale.

In caso di incidente associato al dispositivo, avvisare immediatamente Liofilchem (\*) o il suo rappresentante locale e l'Autorità Nazionale Competente.

\*Si prega di effettuare il login su <https://www.liofilchemstore.it/login.php> (user ID e password richiesti) e cliccare su "Complaint".

Questo documento IFU e la SDS sono disponibili dal Support Center online: [liofilchem.com/ifu-sds](https://www.liofilchem.com/ifu-sds)

## References / Riferimenti

1. Public Health England. (2018). ONPG ( $\beta$ -Galactosidase) test. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 24 Issue 4. <https://www.gov.uk/guidance/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>
2. Lenette EH (1995) Manual of Clinical Microbiology.
3. Blazevic DJ, Ederer GM (1975) Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. 63-67. New York, John Wiley & Sons Lapage SP, Jayaraman MS (1964). Beta-galactosidase and lactose fermentation in the identification of enterobacteria including salmonellae. J Clin Path. 17:117.
4. Lederberg J (1950) The  $\beta$ -galactosidase of escherichia coli, strain K-12. J Bact. 60:381.

## Table of Symbols / Tabella dei Simboli

|                                                                                     |                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Batch code / Codice del lotto                                                       |
|    | Catalogue number / Numero di catalogo                                               |
|    | In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositivo Medico Diagnostico <i>in vitro</i> |
|    | Manufacturer / Fabbricante                                                          |
|    | Use by / Utilizzare entro                                                           |
|    | Fragile, handle with care / Fragile, maneggiare con cura                            |
|   | Temperature limitation / Limiti di temperatura                                      |
|  | Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi             |
|  | Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso                   |
|  | Do not reuse / Non riutilizzare                                                     |
|  | Keep away from sunlight / Tenere al riparo dalla luce solare                        |



**Liofilchem® s.r.l.**

Via Scozia, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy

Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 [www.liofilchem.com](http://www.liofilchem.com) [liofilchem@liofilchem.com](mailto:liofilchem@liofilchem.com)

