



Nitrate Test

Rapid test for determining the ability of an organism to reduce nitrate to nitrite or free nitrogen.

INTENDED PURPOSE

Rapid test for the evaluation of reduction from nitrates to nitrites on bacterial isolates. This test is intended as an aid in the diagnosis, requiring further tests to complete the diagnostic results.

DESCRIPTION

Nitrate Test is used to determine the ability of an organism to reduce nitrates to nitrites. This test represents a useful component of biochemical test batteries for identification of bacteria, including differentiating members of the family Enterobacteriaceae from other gram-negative bacilli, identifying species of *Neisseria* and separating them from *Moraxella* and *Kingella* species, as well as facilitating species identification of *Corynebacterium* and other non-sporing gram-positive rods.

KIT CONTENTS

- 30 Tubes with a dehydrated culture medium containing Potassium Nitrate
- 1 Bottle of N,N-Dimethyl-alpha-naphthylamine reagent (3 ml)
- 1 Bottle of Sulphanilic acid reagent (3 ml)

METHOD PRINCIPLE

Reduction of nitrate (NO_3) to nitrite (NO_2), which is mediated by the bacterial enzyme nitrate reductase, indicates that the organism can use nitrate as an electron acceptor during anaerobic respiration. Nitrites are colourless and react with the reagents sulphanilic acid and alpha-naphthylamine to form a red compound.

Positive reaction: the microorganisms reduce nitrates to nitrites resulting in a red-orange color development after the addition of reagents to the culture medium.

Negative reaction: microorganisms that are unable to reduce nitrates to nitrites do not produce a colour development after the addition of the two reagents to the culture medium.

However, the formation of other end products of nitrate reduction, including nitric oxide (NO), nitrous oxide (N_2O) and ammonia (NH_3), that do not cause a color change of the medium, is also possible; Zinc dust is therefore used to detect unreduced nitrate. No color change after the addition of zinc dust to the medium indicates that nitrate has been reduced to nitrogen gas (N_2) and the organism is nitrate positive. The appearance of a red color after the addition of zinc dust to a colorless reaction tube indicates a negative reaction, i.e., the organism has failed to reduce NO_3 .

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: zinc dust, incubator, inoculating loop, pipettes, culture media, physiological solution (0.85% saline), test tubes, 0.5 McFarland turbidity standard, quality control organisms.

REAGENTS

- Dehydrated basal medium with Potassium Nitrate
- 0.6% N,N-Dimethyl-alpha-naphthylamine in 5N Acetic acid.
- 0.8% Sulphanilic acid in 5N Acetic acid.

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. Allow the kit components to reach room temperature before use.
2. Add 0.2 mL of physiological solution to a test tube.
3. Inoculate heavily with the test organism(*) from a fresh overnight pure culture.
4. Add 0.2 mL of sterile physiological solution to another tube. Do not inoculate this tube and use it as negative control;

5. Incubate both inoculated and uninoculated tubes at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for a minimum of 2 hours and up to 24 h(**).
6. Add one drop of Alpha-naphthylamine reagent and one drop of Sulphanilic acid reagent to each tube. Shake gently to mix reagents.
7. Observe for a red-orange colour development within 2 minutes.
8. In case of a negative test result (no color development) add a small quantity of zinc dust to the medium.
9. Observe for a red-orange colour development within 10 minutes.

* Microbial suspension equivalent to 0.5 McFarland turbidity standard (which corresponds to $1-2 \times 10^8$ CFU/ml for *E. coli*).

** Prolonged incubation may be required for some organisms to achieve a positive reaction.

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

INTERPRETING RESULTS

A positive nitrate reaction is indicated by either a colour change to orange-red after within 2 minutes addition of N,N-Dimethyl-alpha-naphthylamine and Sulphanilic acid reagents OR no orange-red colour development within 10 minutes after addition of zinc dust.

If the organism is nitrate negative there is no a color development after addition of N,N-Dimethyl-alpha-naphthylamine and Sulphanilic acid reagents AND an orange-red color appears after addition of zinc dust.

Further tests are required for confirmation.

STORAGE

2-8°C in its original packaging. Keep away from sources of heat and avoid excessive changes of temperature. Use until the expiry date indicated on the label. Eliminate without using if there are signs of deterioration.

SHELF LIFE

1 year

QUALITY CONTROL

Expected Response:

Control strain	Characteristic reactions	
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013 ATCC® 25922 NCTC 12241	Positive reaction: Color change to orange-red
<i>Listeria monocytogenes</i>	WDCM 00109 ATCC® 35152 NCTC 7973	Negative reaction: No color change

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis (CoA).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

LIMITATIONS

The test of nitrate reduction to nitrite is helpful for the bacterial identification. It must be followed yet by other tests as the Gram colouring, biochemical and serological tests, etc.

Interpretation of colour reactions should be made soon after addition of reagents.

Zinc dust must be added to any negative reaction to eliminate the possibility of a false negative reaction due to the organism's ability to reduce the nitrate to nitrogen gas.

The addition of an excessive quantity of zinc dust could result into false negative results.

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.
Nitrate Test	30 tests	88009

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)



Nitrate Test

Test rapido per evidenziare la riduzione dei nitrati a nitriti da parte dei batteri.

DESTINAZIONE D'USO

Test rapido per valutare la riduzione dei nitrati a nitriti da parte di isolati batterici. Il test è inteso come ausilio alla diagnosi, e sono necessari ulteriori test per completare i risultati diagnostici.

DESCRIZIONE

Il Nitrate Test viene utilizzato per determinare la capacità di un organismo di ridurre i nitrati a nitriti. Questo test rappresenta un componente utile delle batterie di test biochimici per l'identificazione dei batteri, inclusa la differenziazione dei membri della famiglia *Enterobacteriaceae* da altri bacilli gram-negativi, l'identificazione delle specie di *Neisseria* e la loro separazione dalle specie *Moraxella* e *Kingella*, oltre a facilitare l'identificazione delle specie di *Corynebacterium* e altri bastoncini gram-positivi non sporigeni.

CONTENUTO DELLE CONFEZIONI

- Terreno basale disidratato con Potassio Nitrate
- 0,6% N,N-Dimetil-alfa-naftilammina in acido acetico 5N.
- 0,8% di acido solfanilico in acido acetico 5N.

PRINCIPIO DEL METODO

La riduzione del nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2), mediata dall'enzima batterico nitrato reduttasi, indica che l'organismo può utilizzare il nitrato come accettore di elettroni durante la respirazione anaerobica. I nitriti sono incolori e reagiscono con i reagenti acido solfanilico e alfa-naftilammina formando un composto rosso.

Reazione positiva: i microrganismi riducono i nitrati a nitriti determinando uno sviluppo di colore rosso-arancio dopo l'aggiunta di reagenti al terreno di coltura.

Reazione negativa: i microrganismi che non sono in grado di ridurre i nitrati a nitriti non sviluppano uno sviluppo di colore dopo l'aggiunta dei due reagenti al terreno di coltura.

Tuttavia, è anche possibile la formazione di altri prodotti finali della riduzione dei nitrati, tra cui ossido nitrico (NO), protossido di azoto (N_2O) e ammoniaca (NH_3), che non provocano una colorazione arancione del terreno; La polvere di zinco viene quindi utilizzata per rilevare il nitrato non ridotto. Nessun viraggio di colore dopo l'aggiunta di polvere di zinco al terreno indica che il nitrato è stato ridotto ad azoto gassoso (N_2) e che l'organismo è positivo ai nitrati. La comparsa di una colorazione rossa dopo l'aggiunta di polvere di zinco a un tubo di reazione incolore indica una reazione negativa, cioè l'organismo non è riuscito a ridurre NO_3 .

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Forniture e attrezzature microbiologiche standard come: polvere di zinco, incubatrice, ansa per inoculo, pipette, terreni di coltura, physiological solution (0.85% saline), provette, standard di torbidità 0,5 McFarland, microrganismi per il controllo qualità.

REAGENTI

- Alpha-naphthylamine reagent è costituito da 0.5% Alpha-naphthylamine e 30.0% Acido acetico.
- Sulphanilic acid reagent è costituito da 0.8% Sulphanilic acid e 30.0 % Acetic acid.

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. Lasciare che i componenti del kit raggiungano la temperatura ambiente prima dell'uso.
2. Aggiungere 0,2 ml di soluzione fisiologica in una provetta.
3. Inoculare abbondantemente con il microrganismo da testare(*) da una coltura pura fresca durante la notte.

4. Aggiungere 0,2 mL di soluzione fisiologica sterile in un'altra provetta. Non inoculare questa provetta e utilizzarla come controllo negativo;
5. Incubare sia le provette inoculate che quelle non inoculate a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per un minimo di 2 ore e fino a 24 ore (**).
6. Aggiungere una goccia di reagente alfa-naftilammina e una goccia di reagente acido solfanilico a ciascuna provetta. Agitare delicatamente per miscelare i reagenti.
7. Osservare lo sviluppo del colore rosso-arancio entro 2 minuti.
8. In caso di risultato del test negativo (nessun sviluppo di colore) aggiungere una piccola quantità di polvere di zinco al terreno.
9. Osservare lo sviluppo del colore rosso-arancio entro 10 minuti.

* Sospensione microbica equivalente allo standard di torbidità 0,5 McFarland (che corrisponde a $1-2 \times 10^8$ CFU/ml per *E. coli*).

** Per alcuni microrganismi può essere necessaria un'incubazione prolungata per ottenere una reazione positiva.

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

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una reazione positiva al nitrato è indicata da un cambiamento di colore in rosso-arancio dopo l'aggiunta entro 2 minuti dei reagenti N,N-dimetil-alfa-naftilammina e acido solfanilico OPPURE assenza di sviluppo di colore rosso-arancio entro 10 minuti dall'aggiunta di polvere di zinco.

Se l'organismo è negativo ai nitrati, dopo l'aggiunta dei reagenti N,N-dimetil-alfa-naftilammina e dell'acido solfanilico non vi è sviluppo di colore E dopo l'aggiunta di polvere di zinco appare una colorazione rosso-arancio. Ulteriori test sono necessari per la conferma.

CONSERVAZIONE

2-8°C nella sua confezione originale. Tenere lontano da fonti di calore ed evitare eccessivi sbalzi di temperatura. Utilizzare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Eliminare senza utilizzare se vi sono segni di deterioramento.

VALIDITÀ

2 anni

CONTROLLO QUALITÀ

Risultati attesi:

Ceppi di controllo	Caratteristiche di reazione	
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013 ATCC® 25922 NCTC 12241	Reazione positiva: Cambiamento di colore in rosso-arancio
<i>Listeria monocytogenes</i>	WDCM 00109 ATCC® 35152 NCTC 7973	Reazione negativa: Nessun cambio di colore

Fare riferimento al certificato di analisi (CoA) relativo al lotto effettivo.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

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

LIMITAZIONI

Il test di riduzione dei nitrati a nitriti è utile per l'identificazione batterica. Deve essere seguito ancora da altri test come la colorazione di Gram, i test biochimici e sierologici, ecc.

L'interpretazione delle reazioni cromatiche deve essere effettuata subito dopo l'aggiunta dei reagenti.

La polvere di zinco deve essere aggiunta a qualsiasi reazione negativa per eliminare la possibilità di una reazione falsamente negativa dovuta alla capacità dell'organismo di ridurre il nitrato in azoto gassoso.

L'aggiunta di una quantità eccessiva di polvere di zinco potrebbe dare risultati falsi negativi.

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.

INFORMAZIONI D'ORDINE

Prodotto	Confezionamento	Rif.
Nitrate Test	30 tests	88009

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. Ewing 1986. Edwards & Ewing's. Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
2. MacFaddin 1980. Biochemical tests for the identification of medical bacteria, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore
3. Finegold and Baron. 1986 Bailey and Scott's. Diagnostic microbiology, 7th ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis.
4. Kelly, Brenner and Farmer. 1985. In Lennette, Balows, Hausler and Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 4th ed. ASM, Washington, D.C.

Table of Symbols / Tabella dei Simboli

	Batch code / Codice del lotto
	Catalogue number / Numero di catalogo
	<i>In Vitro</i> 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 liofilchem@liofilchem.com

