



Kovac's Reagent

Reagent for indole test of Enterobacteriaceae.

INTENDED PURPOSE

Reagent for execution of indole test for *Enterobacteriaceae*. This test is intended as an aid in the diagnosis, requiring further tests to complete the diagnostic results.

DESCRIPTION

Kovac's Reagent is used in determining the ability of bacteria, primarily Enterobacteriaceae, to produce indole by the deamination of tryptophan.

KIT CONTENT

- 4 Bottles of Kovac's Reagent (25 ml).

METHOD PRINCIPLE

The production of indole has been widely used as an aid in differentiating certain genera and species within the same genus. 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 chief requirement for culturing an organism prior to performing the indole test is that the medium contains a sufficient quantity of tryptophan.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: inoculating loop, pipettes, culture media, physiological solution (0,85% saline), quality control organisms.

REAGENTS

- 5% (w/v) p-dimethylaminobenzaldehyde dissolved in a solution of 25% hydrochloridric 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. Inoculate a pure culture of the organism to be tested into a tube with a tryptophan containing medium, such as peptone water or tryptic soy broth.
2. Incubate tubes at $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 24-48 hours.
3. Add 2-3 drops of Kovac's Reagent directly to the tube.

INTERPRETING RESULTS

The formation of a red to purple color ("cherry-red ring") at the surface of the broth within 30 seconds (after addition of Kovac's Reagent) indicates a positive reaction for indole production. No color change (the reagent layer remains yellow/brown) is considered as a negative result.

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

2 years.

QUALITY CONTROL

Appearance of Kovac's Reagent: Yellow-green liquid, clear.

Control strain	Characteristic reactions	
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013 ATCC® 25922 NCTC 12241	Positive reaction: Development of a red ring
<i>Proteus mirabilis</i>	WDCM 00023 ATCC® 29906 NCTC 11938	Negative reaction: Yellow/brown ring

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance testing of Kovac's Reagent was carried out using the QC strains listed above. The results obtained met the established criteria.

LIMITATIONS

Organisms to be tested must be grown in a tryptophan containing media (for example tryptone water). Media such as MacConkey Agar should not be used as they contain indicators which could result in the carryover of colour resulting in false positive colour interpretations. Media containing glucose should not be used as acid production may inhibit indole production. Only pure cultures should be tested as false positive reactions with mixed cultures (of both indole positive and indole negative) are possible.

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.
Kovac's Reagent	4 x 25 ml (100-200 tests)	80271

Revision History

Revision	Release Date	Change Summary
1	2024-05-13	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



Kovac's Reagent

Reagente per il test dell'indolo sulle Enterobacteriaceae.

DESTINAZIONE D'USO

Reagente per l'esecuzione del test dell'indolo sulle Enterobacteriaceae. Il test è inteso come ausilio alla diagnosi, e sono necessari ulteriori test per completare i risultati diagnostici.

DESCRIZIONE

Kovac's Reagent è utilizzato per determinare la capacità di batteri, soprattutto *Enterobacteriaceae*, di produrre indolo attraverso la deaminazione del triptofano.

CONTENUTO DEL KIT

- 4 flaconi di Kovac's Reagent (25ml)

PRINCIPIO DEL METODO

La produzione di indolo è stata ampiamente utilizzata come aiuto nella differenziazione di alcuni generi e specie all'interno dello stesso genere. 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-dimetilaminobenzaldeide del Kovac's Reagent (indolo) formando un composto rosso-violetto. Il requisito principale per la coltura di un microrganismo prima di eseguire il test dell'indolo è che il terreno contenga una quantità sufficiente di triptofano.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Forniture e apparecchiature microbiologiche standard come: ansa da inoculo, pipette, provette, soluzione fisiologica (0.85% salina), acqua peptonata, microrganismi per il controllo qualità.

REAGENTI

- p-Dimetilaminobenzaldeide al 5% (p/v) disiolta in una soluzione di acido cloridrico al 25% ed alcol 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. Inoculare una coltura pura dell'organismo da testare in una provetta con un terreno contenente triptofano, come acqua peptonata o brodo di soia triptico.
2. Incubare le provette a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 24-48 ore.
3. Aggiungere 2-3 gocce di Kovac's Reagent direttamente nella provetta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La formazione di un colore da rosso a viola ("anello rosso ciliegia") sulla superficie del brodo entro 30 secondi (dopo l'aggiunta del Kovac's Reagent) indica una reazione positiva per la produzione di indolo. Nessun cambiamento di colore (lo strato di reagente rimane giallo/marrone) è considerato un risultato negativo.

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

Aspetto Kovac's Reagent: Liquido giallo-verde, limpido.

Ceppi di controllo		Caratteristiche di reazione
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013 ATCC® 25922 NCTC 12241	Reazione positiva: Sviluppo di un anello rosso
<i>Proteus mirabilis</i>	WDCM 00023 ATCC® 29906 NCTC 11938	Reazione negativa: Sviluppo di un anello giallo/marrone

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

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il controllo delle prestazioni del Kovac's Reagent è stato eseguito utilizzando i ceppi sopra elencati. I risultati ottenuti hanno soddisfatto i criteri stabiliti.

LIMITAZIONI

Gli organismi da testare devono essere coltivati in un terreno contenente triptofano (ad esempio acqua triptonica). Terreni come l'agar MacConkey non devono essere utilizzati in quanto contengono indicatori che potrebbero provocare il cambiamento del colore con conseguenti interpretazioni del colore falsamente positive.

I terreni contenenti glucosio non devono essere utilizzati poiché la produzione di acido può inibire la produzione di indolo. Solo le colture pure devono essere testate poiché (sia indolo positive che indolo negative) sono possibili reazioni false positive.

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 le 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.
Kovac's Reagent	4 x 25 ml (100-200 tests)	80271

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

References / Bibliografia

1. Murray, Baron, Pfaller, Tenorev and Yolken: Manual of Clinical Microbiology (1995).
2. Bayley and Scott's: Diagnostic Microbiology (1986).
3. Edwin H.Lenette: Manual of Clinical Microbiology (1995).

Table of Symbols / Tabella dei Simboli

LOT	Batch code / Codice del lotto
REF	Catalogue number / Numero di catalogo
IVD	<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

