

MICROGEN BIOPRODUCTS	Microgen™ Bacillus-ID System
KMTKS-MGEN-ID-05	15.09.2019 ver.01 Sayfa 1/6

A. HEDEF MİKROORGANİZMALAR

Microgen™ Bacillus-ID mezofilik *Bacillus* türlerinin identifikasyonuna yönelik geliştirilmiş her biri 12 substrat içeren iki adet test sribinden (**BAC 1** ve **BAC 2**) oluşan toplam 24 kuyucuklu bir minyatürize identifikasyon sistemidir.

B. PROSEDÜR

 **Uygun olmayan inkübasyon şartları, kuyucukların yetersiz doldurulması veya inokulum yoğunluğunun yetersiz olması yanlış sonuçlara neden olabilir.**

Potansiyel patojen mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda gerekli **biyogüvenlik önlemleri** alınmalıdır.

Test stripleri ve Bacillus Suspending Medium **2-8°C**'da muhafaza edilmelidir. Ambalajı açılmış stripler **2-8°C**'da **14 güne kadar** muhafaza edilebilir.

Microgen™ Bacillus-ID sisteminin termofilik ve psikrofilik izolatların identifikasyonuna yönelik olmadığı unutulmamalıdır.

B1. İnokulumun hazırlanması

- Selektif olmayan** katı besiyeri üzerindeki taze (18-24 saat) ve saf kültürler kullanılmalıdır.
- İnokulumun hazırlanmasından **önce Gram boyama** ve **katalaz testi** gerçekleştirilmelidir. **Gram pozitif** ve **katalaz pozitif** izolatlar identifikasyona alınmalıdır.
- Besiyerinden öze ile koloniler alınır ve oda sıcaklığındaki **Bacillus Suspending Medium** içinde karıştırılarak emülsifiye edilir. Bu amaçla vorteks kullanılabilir. Süspansiyonun yoğunluğu **2 McFarland standardına** ayarlanmalıdır.
- İnokulum saflığını kontrol amacıyla test striplerinin inokülasyonu öncesinde 1 damla inokulum selektif olmayan bir katı besiyerine inoküle edilir ve test ile eş zamanlı olarak 35-37°C'da 18-24 saat inkübe edilir.

B2. Test striplerinin inokülasyonu

- Strip(ler) üzerindeki yapışkan band kaldırılır. Bu band tekrar kullanacağı için **atılmamalıdır**.
- Her bir kuyucuğa **steril pastör pipeti ile 3-4 damla (100-125 µL) inokulum** ilave edilir. Bu işlem inokulumun hazırlanması sonrasında 10 dakika içinde yapılmalıdır.
- İnokülasyon sonrasında **21 numaralı** kuyucuğa **3-4 damla mineral yağ** ilave edilmelidir. Test stripleri üzerinde mineral yağ ilave edilmesi gereken kuyucuk **siyah halkasal çerçeve** ile belirtilmiştir.

B3. Test striplerinin inkübasyonu

- İnokülasyon sonrasında yapışkan band stripler üzerine tekrar yapıştırılır. Bu aşamada **band üzerindeki deliklerin BAC 2 test sribi üzerindeki sitrat ve ONPG kuyucuklarının üzerinde olmasına** dikkat edilmelidir.
- Stripler **30°C** da **24 saat** ve sonrasında **48 saate kadar** inkübe edilmelidir.

	Şipariş kodu	MID 66 (20 test)
	T: 0216 449 58 70	F: 0216 449 58 72 www.kemitekskimya.com.tr info@kemitekskimya.com.tr

MICROGEN BIOPRODUCTS	Microgen™ Bacillus-ID System
KMTKS-MGEN-ID-05	15.09.2019 ver.01 Sayfa 2/6

B4. Sonuçların değerlendirilmesi

- 24 saat inkübasyon** sonrasında stripler üzerindeki yapışkan band kaldırılır ve **1-18 numaralı** kuyucuklarda gözlenen renkler **24 numaralı kontrol kuyucuğu ile karşılaştırılır. Kontrol kuyucuğuna nazaran daha turuncu veya sarı renkler pozitif olarak kabul edilir. Arjinin, ONPG ve sitrat testi sonuçları renk kartı (Ek 2) ile değerlendirilir.** Sonrasında yapışkan band stripler üzerine tekrar yapıştırılır ve stripler **24 saat daha (Toplam 48 saat)** inkübe edilir
- 48 saat inkübasyonun sonunda, 24 saat inkübasyon sonunda pozitif olarak değerlendirilen fermentasyon testleri negatif olarak değerlendirilebilir. **Bu durumda bu kuyucuklar için sonuç pozitif kabul edilmelidir.**
- 48 saat inkübasyonun sonunda yeşil halkasal çerçeve** ile belirtilmiş kuyucuklardaki sonuçlar **ancak ayıraç ilavesi** sonrasında değerlendirilebilir;
 - 19 numaralı** kuyucuğa iki damla **Kovac's** ayırıcı damlatılır. **Bir dakika sonra** gözlenen **kırmızı** renk **pozitif** sonuç olarak kabul edilir.
 - 23 numaralı** kuyucuğa bir damla **VP I** ve bir damla **VP II** ayıraçları damlatılır. **15-30 dakika sonra** gözlenen **koyu pembe/kırmızı** renk **pozitif** sonuç olarak kabul edilir.
 - ONPG test sonucu kaydedildikten sonra 20 numaralı kuyucukta nitrat indirgenme testi gerçekleştirilir.** Kuyucuğa bir damla **Nitrate A** ve bir damla **Nitrate B** ayıraçları damlatılır. Bir dakika içinde gözlenen **kırmızı** renk **pozitif** sonuç olarak kabul edilir.

B5. İdentifikasyon

- Rapor formu (Şekil 1) 3 test sonucu için pozitif sonuçlara karşılık gelen rakamların (1,2 veya 4) toplamı ile bir rakam elde edilecek şekilde düzenlenmiştir. Böylece **8 haneli bir oktal kod** elde edilir.
- Elde edilen oktal kod **Microgen Identification System (MID-60)** yazılımına girildiğinde **veri tabanında** test sonuçlarına göre **en yüksek olasılıkla** mikroorganizmalar listelenecektir.

	Şipariş kodu	MID 66 (20 test)
	T: 0216 449 58 70	F: 0216 449 58 72
	www.kemitekskimya.com.tr	
	info@kemitekskimya.com.tr	

Şekil 1. Rapor formu

MICROGEN BACILLUS-ID 24 TEST																																																																																																																																																																																																										
REPORT FORM																																																																																																																																																																																																										
Lab. No. F4560	Specimen Type COOKED RICE Date 12-10-04																																																																																																																																																																																																									
<table><thead><tr><th></th><th colspan="12">Bacillus Strip 1 (BAC 1)</th><th colspan="10">Bacillus Strip 2 (BAC 2)</th></tr><tr><th>Well Number</th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th><th>13</th><th>14</th><th>15</th><th>16</th><th>17</th><th>18</th><th>19</th><th>20</th><th>21</th><th>22</th><th>23</th><th>24</th></tr></thead><tbody><tr><td>Reaction</td><td>ARA</td><td>CEL</td><td>INO</td><td>MAN</td><td>MNS</td><td>RAF</td><td>RVA</td><td>SAL</td><td>SOR</td><td>SUC</td><td>TRE</td><td>XYL</td><td>ADQ</td><td>GAL</td><td>MDM</td><td>MDG</td><td>INU</td><td>MLZ</td><td>IND</td><td>CHPG</td><td>ARG</td><td>CIT</td><td>VP</td><td>NT</td><td>NEG</td></tr><tr><td>24 hours</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>48 hours</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>Reaction Index</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td></tr><tr><td>Sum of Positive Reactions</td><td colspan="3">0</td><td colspan="3">0</td><td colspan="3">2</td><td colspan="3">6</td><td colspan="3">0</td><td colspan="3">0</td><td colspan="3">1</td><td colspan="3">3</td><td colspan="2"></td></tr></tbody></table>																									Bacillus Strip 1 (BAC 1)												Bacillus Strip 2 (BAC 2)										Well Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Reaction	ARA	CEL	INO	MAN	MNS	RAF	RVA	SAL	SOR	SUC	TRE	XYL	ADQ	GAL	MDM	MDG	INU	MLZ	IND	CHPG	ARG	CIT	VP	NT	NEG	24 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	48 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	Sum of Positive Reactions	0			0			2			6			0			0			1			3				
	Bacillus Strip 1 (BAC 1)												Bacillus Strip 2 (BAC 2)																																																																																																																																																																																													
Well Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24																																																																																																																																																																																		
Reaction	ARA	CEL	INO	MAN	MNS	RAF	RVA	SAL	SOR	SUC	TRE	XYL	ADQ	GAL	MDM	MDG	INU	MLZ	IND	CHPG	ARG	CIT	VP	NT	NEG																																																																																																																																																																																	
24 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																	
48 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																																																																	
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4																																																																																																																																																																																	
Sum of Positive Reactions	0			0			2			6			0			0			1			3																																																																																																																																																																																				
Profile No: 00260013												Final Identification: Bacillus cereus group																																																																																																																																																																																														

MICROGEN BIOPRODUCTS	Microgen™ Bacillus-ID System
KMTKS-MGEN-ID-05	15.09.2019 ver.01 Sayfa 4/6

EK 1 Substrat Referans Tablosu

Kuyucuk	Reaksiyon	Tanım	Pozitif	Negatif
1	Arabinoz	Karbonhidrat fermentasyonu	Sarı	Kırmızı
2	Sellobioz			
3	İnositol			
4	Mannitol			
5	Mannoz			
6	Rafinoz			
7	Ramnoz			
8	Salisin			
9	Sorbitol			
10	Sukroz			
11	Trehaloz			
12	Ksiloz			
13	Adenitol			
14	Galaktoz			
15	Metil-D-Mannozid			
16	Metil-D-Glukozid			
17	İnülin			
18	Melezitoz			
19	İndol	İndol	Kırmızı/pembe	Renksiz
20	ONPG	ONPG' nin B-galactosidaz ile hidrolizi	Sarı	Renksiz
20+	Nitrat	Nitratin Nitrite indirgenmesi	Kırmızı	Renksiz/sarı
21	Arjinin dihidrolaz	Arjininin ornitin, amonyak ve CO ₂ 'ye çevrimi	Yeşil/mavi	Sarı/sarı-yeşil
22	Sitrat	Karbon kaynağı olarak yalnızca sitartın kullanımı	Mavi	Sarı/açık yeşil
23	VP	Glukozdan aseton oluşturma	Koyu pembe/kırmızı	Renksiz/soluk pembe
24	Kontrol	Karbonhidrat kontrol		Kırmızı

	Şipariş kodu	MID 66 (20 test)		
	T: 0216 449 58 70	F: 0216 449 58 72	www.kemitekskimya.com.tr	info@kemitekskimya.com.tr

MICROGEN BIOPRODUCTS	Microgen™ Bacillus-ID System		
KMTKS-MGEN-ID-05	15.09.2019 ver.01	Sayfa 5/6	

EK 2 Renk Kartı

Kuyucuk	24	1-18	1-18	19	20	21	22	23	(20) + Nitrat ayıracağı
Reaksiyon	Karbohidrat Negatif Kontrol 24/48 saat	Karbohidrat Fermentasyonu 24 saat	Karbohidrat Fermentasyonu 48 saat	İndol 48 saat	ONPG 24/48 saat	Arjinin 24/48 saat	Sitrat 24/48 saat	VP 48 saat	Nitrat 48 saat
Negatif	 	 	  	 			 		 
Pozitif		  	 	 	 	 	 	 	 

	Şipariş kodu	MID 66 (20 test)		
	T: 0216 449 58 70	F: 0216 449 58 72	www.kemitekskimya.com.tr	info@kemitekskimya.com.tr

Ek 3 Akış Şeması



Hedef koloninin seçimi ve öze ile alınması



İnokulumun hazırlanması (2 McFarland)



Kuyucuklara inokulumun ilavesi



Anaerobik testler için mineral yağ ilavesi



İnkübasyon sonrası ayıraçların ilavesi

MICROGEN BACILLUS-ID 24 TEST		REPORT FORM																																																																																																																																																							
Lab. No.	Specimen Type	Date																																																																																																																																																							
F4560	COOKED RICE	12-10-04																																																																																																																																																							
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Well Number</th> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> <th>13</th><th>14</th><th>15</th><th>16</th><th>17</th><th>18</th><th>19</th><th>20</th><th>21</th><th>22</th><th>23</th><th>24</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Reaction</td> <td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td> <td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td> </tr> <tr> <td>24 hours</td> <td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td> <td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td> </tr> <tr> <td>48 hours</td> <td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td> <td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td> </tr> <tr> <td>Reaction Index</td> <td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td> <td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td> </tr> <tr> <td>Sum of Positive Reactions</td> <td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>6</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </tbody> </table>				Well Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	48 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	Sum of Positive Reactions	0	0	2	6	0	0	1	3																
Well Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24																																																																																																																																	
Reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																	
24 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																	
48 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																																																																																	
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1																																																																																																																																	
Sum of Positive Reactions	0	0	2	6	0	0	1	3																																																																																																																																																	
Profile No: 00260013		Final Identification: <i>Bacillus cereus</i> group																																																																																																																																																							

Sonuçların değerlendirilmesi

MICROGEN ID	
File Edit System Help	Open: 20/04/2005
Specimen Details	Lab. No: F4560
Results Entry	Specimen Type: Meat
Test System: Microgen ID Bacillus	Drug Code: J679827
Identification	Probability: 100% Percent Probability: 100% Excellent differentiation

Microgen Identification System (MID-60) ile identifikasyon