

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРНОГО И
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО НАДЗОРА**

**РУП «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМ. С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО»**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра, директор
Департамента ветеринарного и
продовольственного надзора Министерства
сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь

А.М. Субботин



2016 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по проведению видовой идентификации
и определению антибиотикочувствительности
бактерий и грибов с помощью автоматического
биохимического анализатора Vitek 2 Compact**

Минск – 2016

Настоящие методические рекомендации по проведению видовой идентификации и определению антибиотикочувствительности бактерий и грибов с помощью автоматического биохимического анализатора Vitek 2 Compact подготовили:

Ломако Ю.В. – заведующий отделом бактериальных инфекций крупного рогатого скота РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук, доцент;

Зубовская И.В. – старший научный сотрудник отдела бактериальных инфекций крупного рогатого скота РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

Амосова Л.А. – старший научный сотрудник отдела бактериальных инфекций крупного рогатого скота РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

Рецензенты:

Ястребов А.С. – главный научный сотрудник отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, доцент;

Медведев А.П. – профессор кафедры микробиологии и вирусологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», доктор ветеринарных наук, профессор.

Методические указания рассчитаны на специалистов диагностических и испытательных лабораторий, занимающихся оценкой и изучением штаммов при формировании и поддержании коллекций микроорганизмов, научных работников, аспирантов и магистрантов, а также студентов факультетов ветеринарной медицины, занимающихся проблемами инфекционных болезней животных.

Методические указания рассмотрены и одобрены на заседании Ученого совета РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (протокол № 2 от « 18 » февраля 2016 г.).

ВВЕДЕНИЕ

Современные глобальные проблемы в ветеринарии и в здравоохранении, например, такие как множественная лекарственная устойчивость микроорганизмов означают, что микробиологические лаборатории должны быть гибкими и реагировать быстро, чтобы обеспечить нужную информацию в нужное время.

Автоматический биохимический анализатор VITEK® 2 Compact совместно с программным обеспечением VITEK® 2 обеспечивает надежную идентификацию микроорганизмов (ID) и определение чувствительности к антибиотикам (AST).

Анализатор предназначен для идентификации грамотрицательных палочек, грамположительных кокков, анаэробных бактерий, нейссерий, гемофильных палочек, других бактерий, коринбактерий, лактобактерий, бацилл, грибов (более 450 таксонов), а также для определения чувствительности (минимальных ингибирующих концентраций к широкому кругу антимикробных препаратов (более 100 препаратов).

Среднее время получения результата идентификации: 5–6 часов. Среднее время получения результата чувствительности к антимикробным препаратам – 9–12 часов.

Высокая степень автоматизации системы позволяет сократить длительность ручных операций и оптимизировать режим работы.

Вручную производится:

- приготовление суспензии для идентификации. Стандартизация инокулума при помощи автоматического денситометра DENSICHEK (входит в комплект);

- приготовление суспензии для определения чувствительности при помощи автоматических пипеток с фиксированным объемом и дозатора жидкости (входят в комплект);

- установка пробирок с суспензией и соответствующих карт на кассету;

- установка кассеты в вакуумную камеру для заполнения карт;

- перенос кассеты после заполнения в камеру инкубации-считывания.

Среднее время подготовки одной карты на идентификацию + одной карты на чувствительность - около 1 минуты, включая подготовку образца и загрузку в прибор

Автоматически производится:

- заполнение карт суспензией;

- считывание штрих-кода и регистрация позиции карты;

- запаивание карт (герметизация);

- инкубация и считывание;

- удаление карт из прибора по окончании анализа в корзину для отходов.

Вместимость прибора – 30 карт одновременно (2 модуля можно присоединить к одному компьютеру).

1. ВКЛЮЧЕНИЕ ПРИБОРА

1.1. Прибор необходимо включить не менее чем за **20 минут** до начала загрузки карт (если он отключен). Выключатель находится на задней панели справа. Компьютер также должен быть включен.

1.2. Далее нужно запустить программу V2C (Vitek 2 Compact) – ярлык на рабочем столе. Ввести свое имя и пароль.

Имя и пароль нужно вводить без ошибок, иначе система будет заблокирована.

1.3. Когда прибор прогреется и будет готов к работе, его дисплей будет выглядеть так, как показано на рисунке 1 (нужно дождаться пока в нижнем левом углу дисплея загорится «ОК»).

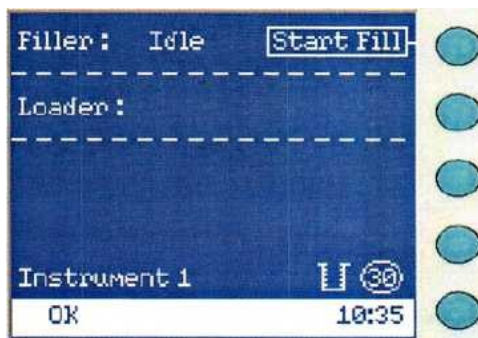


Рисунок 1 – Внешний вид дисплея прибора, готового к работе

1.4. На мониторе компьютера основное меню должно выглядеть так, как изображено на рисунке 2. Кружок слева и квадрат справа должны быть зеленого цвета. Красный цвет сообщает об ошибке, которую следует устранить, нажав на данную иконку, а затем «ОК» в окне.



Рисунок 2 – Основное меню программного обеспечения VITEK® 2

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ

Для приготовления бактериальной суспензии исследуемого микроорганизма нужно использовать только чистую культуру, выращенную на

твёрдой питательной среде без красителей (например мясо-пептонный агар, сердечно-мозговой агар). Не рекомендуется брать колонии с цветных сред (например среда Эндо), так как это может исказить результат.

2.1. Для приготовления бактериальной суспензии используется **специальный солевой раствор** (кат. № VI204) производства фирмы Biomerieux, использование растворов собственного изготовления запрещено.

2.2. Кроме того, для приготовления суспензии удобно пользоваться поставляемым вместе с прибором *диспенсером-дозатором* с установленным объемом, равным 3мл.*

***каждый раз при замене емкости с физраствором диспенсер необходимо автоклавировать, завернув его в крафт бумагу и ослабив все соединения, (температура 121°C, 1 АТМ, 15–20 минут).**

Бактериологической петлей либо тампоном необходимо взять одну **изолированную колонию** (желательно), перенести в пробирку с раствором, хорошо перемешать. Рекомендуется использовать Vortex.

В процессе приготовления бактериальной суспензии необходимо постоянно измерять ее **оптическую плотность** на денситометре (нефелометре) VITEK 2 Compact. Использование других приборов недопустимо, равно как и измерение оптической плотности других растворов на данном приборе.

На рисунке 3 изображена карта для идентификации.



Рисунок 3 –
Карта для идентификации

Для карт на идентификацию используются следующие значения оптической плотности по шкале МакФарланда:

- | | |
|---------------------------------|-----------------|
| - грам-положительные кокки | 0,5 – 0,63 McF |
| - грам-отрицательные палочки | 0,5 – 0,63 McF |
| - нейсерии, гемофильные палочки | 1,80 – 2,20 McF |
| - грибы, дрожжи, бациллы | 1,80 – 2,20 McF |
| - анаэробы | 2,70 – 3,30 McF |

Карты на чувствительность:

Суспензия готовится методом отбора **автоматической пипеткой** фиксированного объема бактериальной суспензии (145 или 280 мкл), приготовленной для карт на идентификацию и переносом данного объема во вторую пробирку с 3 мл чистого раствора, тщательно перемешанного. Пипетки для осуществления данной процедуры поставляются в комплекте. Оптическая плотность суспензии в данном случае не измеряется.

Распаковка карт осуществляется крайне осторожно, нельзя прикасаться к картам сбоку (стороны с ячейками), категорически запрещается трогать заправочную трубочку во избежание контаминации образцов.

Разместить карты в загрузочной кассете, начиная с первой ячейки (номер 1), вставив трубочки в пробирки по порядку следующим образом: сначала карта на идентификацию, затем карта на чувствительность, далее – то же самое для других образцов. (И1+Ч1, И2+Ч2,). Возможно проведение только идентификации или только определение чувствительности отдельно.

3. ВВОД ИНФОРМАЦИИ ОБ ОБРАЗЦАХ

3.1. На дисплее в главном меню нажмите на иконку с изображением кассеты (рисунок 4).



Рисунок 4 – Иконка с изображением кассеты

3.2. Затем в открывшемся окне нажмите на иконку создания **виртуальной кассеты** (слева сверху, на ней изображена неяркая кассета на синем фоне, под значком с изображением зеленого домика)

3.3. После этого в открывшемся окне нажмите на иконку **«Новая кассета»** (рисунок 5).



Рисунок 5 – Иконка «новая кассета»

3.4. В открывшемся окне введите следующую информацию:

- номер кассеты – самая верхняя строка (вручную или сканером);
- штрих-коды всех карт, находящихся в кассете, **в той последовательности, в которой они расположены**. Для этого необходимо нажать

мышкой в пустой строке под названием Bar Code, а потом сканировать штрих-коды карт.

3.5. После этого нужно **объединить карты на идентификацию с картами на чувствительность попарно** (в соответствии с образцами). Для этого выделить мышкой карту на идентификацию, а потом, не отпуская левую кнопку мышки, выделить и вторую карту, относящуюся к данному образцу. После выделения двух карт нажать на иконку с изображением листа и ручки (рисунок 6).



Рисунок 6 – Иконка с изображением листа и ручки

В открывшемся окне в верхней строке нужно ввести **Lab ID** – лабораторный номер (порядковый номер культуры по журналу) – самый важный параметр, он никогда не должен повторяться.

Если проводится лишь тест на чувствительность (без идентификации), нужно выбрать микроорганизм вручную в открывшемся меню в следующей строчке.

3.6. Сохранить введенную информацию, нажав значок дискеты.

ЗАГРУЗКА КАРТ В ПРИБОР

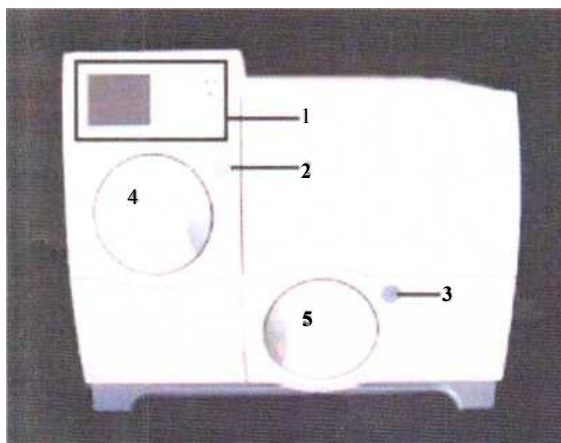


Рисунок 7 – Внешний вид прибора Vitek 2 Compact

- 1 – дисплей;
- 2 – индикатор заполнения карт
- 3 – индикатор загрузки карт
- 4 – дверца отсека заполнения
- 5 – дверца отсека загрузки

4.1. Открыть дверцу отсека заполнения (4), поместить туда кассету с картами. Плотно закрыть дверцу, нажать верхнюю левую кнопку, расположенную ближе к дисплею прибора, рядом с надписью Start Fill.

4.2. Подождать, пока карты заполнятся. Об этом сообщит звуковой сигнал, а также мигающая стрелка индикатора 2.

4.3. По завершении процесса заполнения открыть дверцу 4, достать кассету, и перенести ее в отсек загрузки 5. Плотно закрыть дверцу.

4.4. Перенести кассету из отсека 4 в отсек 5 необходимо в течение **10 минут** после звукового сигнала. В противном случае, прибор выдаст ошибку, а карты станут непригодными для использования и придется их выбросить.

4.5. Когда индикатор 3 начнет моргать, необходимо открыть дверцу и достать пустую кассету. Дверца открывается только при моргающем индикаторе.

4.6. Плотно закрыть дверцу отсека 5 и не пытаться ее открыть в дальнейшем. Открывать данный отсек можно только при переносе лотка с картами из отсека 4.

После этого прибор готов к загрузке новых карт. Одновременно в приборе может находиться до 30 карт. По мере опустошения прибора карты можно добавлять. Количество свободных мест указано в кружке в правом нижнем секторе дисплея. Будьте внимательны и не превышайте это количество (нельзя загружать больше карт, чем имеется свободных мест).

5. ПРОСМОТР РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1. Для просмотра результатов исследования необходимо в главном меню нажать на иконку с изображением отчетов (рисунок 8).



Рисунок 8 - Иконка с изображением отчетов

5.2. В строке слева сверху, рядом с «Filter by» нужно выбрать «SHOW ALL»

5.3. Далее необходимо выбрать образец из списка слева ниже, нажав на плюсик, чтобы «развернуть» данный файл.

5.4. В появившемся списке появится карта на идентификацию и карта на чувствительность. Нужно нажать на каждую из них, чтобы увидеть более подробную информацию (маленькие квадратики с различными рисунками также несут смысловую нагрузку, их значение можно посмотреть в инструкции «ОБОЗНАЧЕНИЯ»).

5.5. Для печати результатов исследования нажать на кнопку с изображением принтера.

6. ВЫКЛЮЧЕНИЕ ПРИБОРА

Прибор вместе с компьютером выключать нельзя, ЕСЛИ В НЕМ ЕСТЬ КАРТЫ. При желании можно лишь отключить дисплей компьютера.

Если же карт в приборе нет, можно произвести его полное отключение. Для этого:

1. Зайти в главное меню;
2. Выбрать подпункт «Maintenance», нажав на кнопку, расположенную рядом;
3. В открывшемся меню выберите последний пункт, нажав на стрелку «ВНИЗ», а затем на кнопку, расположенную напротив пункта «Shutdown»;
4. Выключить прибор с помощью выключателя, расположенного на задней панели справа, возле провода электропитания. Выключить компьютер.

7. ПРОСМОТР И УДАЛЕНИЕ ОШИБОК

На наличие ошибки оборудования указывает звуковой сигнал и мигающий дисплей прибора.

В нижней части экрана будет гореть восклицательный знак (!) и надпись ERROR:

Чтобы просмотреть и убрать ошибку, нужно нажать на клавиатуре прибора кнопку с символом «!». На экране отобразится список всех ошибок. Непрочитанные ошибки будут промаркированы звездочками (*).

Нужно выбрать непрочитанную ошибку с помощью стрелок вверх-вниз и нажать «!» еще раз.

Проделать то же самое со всеми непрочитанными ошибками.

Вернуться в главное меню, нажав соответствующую кнопку.

Нормативное производственно-практическое издание

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по проведению видовой идентификации
и определению антибиотикочувствительности
бактерий и грибов с помощью автоматического
биохимического анализатора Vitek 2 Compact**

Подписано в печать 02.12.2016.
Формат 60x90 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 0,47 Тираж 20 экз. Заказ № 158.
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28
Тел./факс (+375 17) 50 88 131
E-mail: bievm@tut.by

Отпечатано на полиграфической базе
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»