



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115760** (13) **U**  
(51) МПК (2017.01)  
**G01N 33/04** (2006.01)  
**A23C 7/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2016 11543</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Богатко Надія Михайлівна (UA),</b> <b>Букалова Наталія Володимирівна (UA),</b> <b>Приліпко Тетяна Миколаївна (UA),</b> <b>Кисельов Богдан Сергійович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>15.11.2016</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.04.2017</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.04.2017, Бюл.№ 8</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Богатко Надія Михайлівна,</b> вул. Академіка Вула, 6, кв. 97, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA), <b>Букалова Наталія Володимирівна,</b> вул. Героїв Чорнобиля, 5, кв. 78, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA), <b>Приліпко Тетяна Миколаївна,</b> вул. Князів Коріатовичів, 21/10, кв. 29, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 03245 (UA), <b>Кисельов Богдан Сергійович,</b> вул. Героїв Чорнобиля, 6, кв. 116, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA)

**(54) ГОРИЗОНТАЛЬНИЙ СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ КОАГУЛАЗОПОЗИТИВНИХ СТАФІЛОКОКІВ У МОЛОЦІ ТА МОЛОКОПРОДУКТАХ****(57) Реферат:**

Горизонтальний спосіб виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах в якому використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 з послідуочим інкубуванням отриманої суспензії упродовж  $18 \pm 2$  годин за температури  $35 \pm 1$  °C та наступним її посівом у кількості  $1,0-1,1 \text{ см}^3$  у велику чашку Петрі, що містить агарове середовище Беард-Паркера. У подальшому витримують за кімнатної температури ( $20 \pm 2$  °C) упродовж 10-15 хвилин та інкубують у термостаті за температури  $35 \pm 1$  °C упродовж  $24 \pm 1$  та  $48 \pm 1$  годин для отримання типових колоній коагулазопозитивних стафілококів упродовж  $24 \pm 1$  годин у вигляді чорних або сірих, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через  $48 \pm 1$  годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через  $24 \pm 1$  годин інкубації має опалесценцію кільця.

**UA 115760 U**



Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до ветеринарної медицини, і може бути використана для удосконалення горизонтального методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах при встановленні їх безпечності у виробничих лабораторіях на потужностях з переробки, виробництва, реалізації і зберігання

молока та молокопродуктів, у бактеріологічних відділах державних лабораторіях ветеринарної медицини. За результатами цього методу можна отримати якісні показники при удосконаленні горизонтального методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах.

Аналогом корисної моделі є спосіб визначення загальної кількості мікроорганізмів у молоці та молокопродуктах згідно з ДСТУ 7357:2013 [1], який базується на особливості аеробів та факультативних анаеробів рости на живильному агарі за температури  $37 \pm 0,5$  °C з утворенням колоній та послідовим їх підрахунком. Недоліком даного методу є те, що він довготривалий, громіздкий і значні грошові затрати на живильний агар. Крім цього даний метод дає похибку від 25 до 40 %.

Прототипом корисної моделі є горизонтальний метод виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молочних продуктах [2], у якому застосовують великий об'єм середовища для приготування вихідної суспензії, що готується у співвідношенні 1:10 (маса проби молока, молокопродуктів до об'єму середовища попереднього концентрування). Недоліком даного методу є те, що він громіздкий, з підвищеною вартістю середовищ, довготривалістю інкубування в агарі. Крім цього даний метод дає похибку у 25-30 %.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб удосконалення горизонтального методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах шляхом зміни кількості використовуваної дослідної суспензії, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см<sup>3</sup> (г) та 50-55 см<sup>3</sup> селективного середовища попереднього концентрування (бульйон Джоліті та Кантоні із Твіном-80), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж  $18 \pm 2$  годин за температури  $35 \pm 1$  °C та наступним посівом у кількості 1,0-1,1 см у велику чашку Петрі, що містить агарове середовище Беард-Паркера, у подальшому витримуючи за кімнатної температури ( $20 \pm 2$  °C) упродовж 10-15 хвилин та інкубуванням у термостаті за температури  $35 \pm 1$  °C упродовж  $24 \pm 1$  та  $48 \pm 1$  годин, щоб отримати типові колонії коагулазопозитивних стафілококів упродовж  $24 \pm 1$  годин у вигляді чорних або сірих, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через  $48 \pm 1$  годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через  $24 \pm 1$  годин інкубації має опалесценцію кільця.

Поставлена задача вирішується тим, що використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см (г) та 50-55 см<sup>3</sup> селективного середовища попереднього концентрування (бульйон Джоліті та Кантоні із Твіном-80), у подальшому проводять інкубування отриманої суспензії упродовж  $18 \pm 2$  годин за температури  $35 \pm 1$  °C. Потім проводять посіви отриманої суспензії у кількості 1,0-1,1 см у велику чашку Петрі, що містить агарове середовище Беард-Паркера, шляхом розтирання шпателем інокуляту по поверхні агару. Дають висохнути агару в чашці із закритою кришкою упродовж 10-15 хвилин за кімнатної температури ( $20 \pm 2$  °C). Потім проводять інкубування: ставлять чашку Петрі догори дном у термостат і витримують упродовж  $24 \pm 1$  та  $48 \pm 1$  годин за температури  $35 \pm 1$  °C, щоб отримати типові колонії коагулазопозитивних стафілококів упродовж  $24 \pm 1$  годин у вигляді чорних або сірих, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через  $48 \pm 1$  годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через  $24 \pm 1$  годин інкубації має опалесценцію кільця.

Етапи вирішення даного завдання наведено у нижчезазначених прикладах.

Приклад 1. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:6 (проби молока та молокопродуктів у кількості 14-15 см<sup>3</sup> (г) та 84-90 см<sup>3</sup> селективного середовища попереднього концентрування (бульйон Джоліті та Кантоні із Твіном-80), у подальшому проводять інкубування отриманої суспензії упродовж  $20 \pm 2$  годин за температури  $28 \pm 1$  °C. Потім проводять посіви отриманої суспензії у кількості 0,5-0,6 см у велику чашку Петрі, що містить агарове середовище Беард-Паркера, шляхом розтирання шпателем інокуляту по поверхні агару. Дають висохнути агару в чашці із закритою кришкою упродовж 15-16 хвилин за кімнатної температури ( $18 \pm 2$  °C). Потім проводять інкубування: ставлять чашку Петрі догори дном у термостат і витримують упродовж  $25 \pm 1$  та  $49 \pm 1$  годин за температури  $35 \pm 1$  °C, щоб отримати типові колонії коагулазопозитивних стафілококів упродовж  $25 \pm 1$  годин у вигляді чорних або сірих, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через  $49 \pm 1$  годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через  $25 \pm 1$  годин інкубації має опалесценцію кільця.

Приклад 2. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:8 (проби молока та молокопродуктів у кількості 21-22 см<sup>3</sup> (г) та 168-176 см<sup>3</sup> селективного середовища попереднього концентрування (бульйон Джоліті та Кантоні із Твіном-80), у подальшому проводять інкубування отриманої суспензії упродовж 24±2 годин за температури 29±1 °С. Потім проводять посіви отриманої суспензії у кількості 0,8-1,0 см<sup>3</sup> у велику чашку Петрі, що містить агарове середовище Беард-Паркера, шляхом розтирання шпателем інокуляту по поверхні агару. Дають висохнути агару в чашці із закритою кришкою упродовж 12-13 хвилин за кімнатної температури (25±2 °С). Потім проводять інкубування: ставлять чашку Петрі догори дном у термостат і витримують упродовж 22±1 та 46±1 годин за температури 38±1 °С, щоб отримати типові колонії коагулазопозитивних стафілококів упродовж 22±1 годин у вигляді чорних або сірих, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через 46±1 годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через 22±1 годин інкубації має опалесценцію кільця.

Приклад 3. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см<sup>3</sup> (г) та 50-55 см<sup>3</sup> селективного середовища попереднього концентрування (бульйон Джоліті та Кантоні із Твіном-80), у подальшому проводять інкубування отриманої суспензії упродовж 18±2 годин за температури 35±1 °С. Потім проводять посіви отриманої суспензії у кількості 1,0-1,1 см<sup>3</sup> у велику чашку Петрі, що містить агарове середовище Беард-Паркера, шляхом розтирання шпателем інокуляту по поверхні агару. Дають висохнути агару в чашці із закритою кришкою упродовж 10-12 хвилин за кімнатної температури (20±2 °С). Потім проводять інкубування: ставлять чашку Петрі догори дном у термостат і витримують упродовж 24±1 та 48±1 годин за температури 35±1 °С, щоб отримати типові колонії коагулазопозитивних стафілококів упродовж 24±1 годин у вигляді чорних або сірих, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через 48±1 годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через 24±1 годин інкубації має опалесценцію кільця.

Порівняльна оцінка результатів випробування вищезазначених способів удосконалення горизонтального методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктів до прототипу наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння способів удосконаленого горизонтального методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктів до прототипу

№ п/	Показники, що порівнюються	Прототип	Приклади		
			1	2	3
1.	Приготування дослідної суспензії:	25,0	14-15	21-22	10-11
	Кількість молока, молокопродуктів, см <sup>3</sup> або г				
	Кількість бульйону Джоліті та Кантоні із Твіном-80, см				
	Співвідношення	1:10	1:6	1:8	1:5
2.	Витримування суспензії в термостаті:				
	За температури	35 або 37 °С	28±1 °С	29±1 °С	35±1 °С
	Експозиція, год.	16-20	20±2	24±2	18±2
3.	Посів у чашки Петрі: кількість чашок	2 маленьких	1 велика	1 велика	1 велика
	Кількість вихідної суспензії, см <sup>3</sup>	0,1	0,5-0,6	0,8-1,0	1,0-1,1
	Середовище	агарове середовище Беард-Паркера	агарове середовище Беард-Паркера	агарове середовище Беард-Паркера	агарове середовище Беард-Паркера
4.	Висихання агару в чашках				
	За температури	20±2 °С	18±2 °С	25±2 °С	20±2 °С
	Експозиція, хв.	15 хв	15-16	12-13	10-12

Продовження таблиці 1

5.	Інкубування середовища агарового середовища Беард-Паркера із посівом за температури	35 або 37 °C	35 °C	38 °C	35±1 °C
	Експозиція, год.	24	25±1	22±1	24±1
6.	Ідентифікація типових колоній коагулазопозитивних стафілококів через 24 год.	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,0-1,5 мм і оточені чистою зоною з опалесценцією кільця	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,0-1,5 мм і оточені чистою зоною з опалесценцією кільця	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,0-1,5 мм і оточені чистою зоною з опалесценцією кільця	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,0-1,5 мм і оточені чистою зоною з опалесценцією кільця
7.	Інкубування середовища агарового середовища Беард-Паркера із посівом за температури	35 або 37 °C	35 °C	38 °C	35±1 °C
	Експозиція, год.	48	49±1	46±1	48±1
8.	Ідентифікація колоній коагулазопозитивних стафілококів через 48 год.	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,5-2,5 мм і оточені чистою зоною	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,5-2,5 мм і оточені чистою зоною	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,5-2,5 мм і оточені чистою зоною	чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,5-2,5 мм і оточені чистою зоною
9.	Швидкість визначення досліджу, год.	80-82 год.	84±2	81±2	67±2
10.	Стабільність показників по удосконаленому горизонтальному методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці, молокопродуктах, %	94,7	75,0	84,5	99,9
11.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності лістерій у молоці, молокопродуктах, у %	87,0-93,6	85,4-87,0	76,3-80,2	98,9-99,5
12.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності сальмонел у молоці, молокопродуктах, у %	84,9-87,8	87,3-89,8	83,7-85,1	98,2-99,6

Дані таблиці 1 свідчать, що більш достовірні дані у порівнянні з результатами досліджень щодо визначення наявності лістерій у молоці, молокопродуктах - у 98,9-99,5 % [3] та до результатів досліджень щодо визначення наявності сальмонел у молоці, молокопродуктах - у 98,2-99,6 % [4] були отримані при застосуванні методу за прикладом № 3. Також найвища стабільність показників по удосконаленому горизонтальному методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах була за прикладом № 3-99,9 %.

Використовуючи метод за прикладом № 3, ми провели виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах удосконаленим горизонтальним методом на 67 пробах: молоко сире (уміст жиру 3.7 %) -10 проб; молоко пастеризоване (уміст жиру 2,8 %) - 10 проб; вершки - 6 проб; вершки пастеризовані - 5 проб; сир кисломолочний - 6 проб; сир твердий

7 проб; сир плавлений - 8 проб; масло вершкове - 9 проб; спред - 6 проб. Результати наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Показники виявлення удосконаленого горизонтального методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах за прикладом № 3

№ п/п	Перелік видів досліджуваних проб молока та молокопродуктів	Виявлення коагулазопозитивних стафілококів за забарвленням та розміром колоній за прикладом № 3			
		Кількість проб	Наявність колоній коагулазопозитивних стафілококів	Кількість проб	Відсутність колоній коагулазопозитивних стафілококів
1	Молоко сире (уміст жиру 3,7 %), n=10	n=2	Через 24±1 год. типові колонії чорні або сірі, блискучі і випуклі діаметром 1,0-1,5 мм (через 48±1 годин – діаметром 1,5-2,5 мм) і оточені чистою зоною, яка через 24 год. інкубації має опалесценцію кільця	n=8	Нетипові колонії блискучі чорні
2	Молоко пастеризоване (уміст жиру 2,8 %), n=10	n=0		n=10	з/або без вузького білого краю, чиста зона
3	Вершки, n=6	n=3		n=3	відсутня,
4	Вершки пастеризовані, n=5	n=0		n=5	опалесцентне кільце теж
5	Сир кисломолочний, n=6	n=1		n=5	відсутнє чи ледве помітне; сірі
6	Сир твердий, n=7	n=1		n=6	колонії без
7	Сир плавлений, n=8	n=1		n=7	чистих зон
8	Масло вершкове, n=9	n=2		n=8	
9	Спред, n=6	n=2		n=4	

Проведеними дослідженнями встановлено, що були виявлені типові колонії коагулазопозитивних стафілококів через 24±1 та 48±1 годин за температури 35±1 °C у наступних пробах молока та молокопродуктах: у 3-х пробах вершків; у 2-х пробах молока сирого, масла вершкового та спреда; у 1 пробі сиру кисломолочного, сиру твердого, сиру плавленого. У молоці пастеризованому, вершках пастеризованих типових колоній коагулазопозитивних стафілококів не було виявлено.

Ці дані були стабільними та достовірними, отже, ці показники можна використовувати при оцінюванні безпечності молока та молокопродуктів. Крім того, слід зазначити, що метод є економним, простим у виконанні, а його результати дають конкретні якісні показники по забарвленню типових колоній коагулазопозитивних стафілококів чорного або сірого кольору, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через 48±1 годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через 24±1 годин інкубації має опалесценцію кільця.

Метод за прикладом № 3 нами пропонується як якісний спосіб удосконалення горизонтального методу виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах поряд з іншими методами визначення їх безпечності (визначення загальної кількості мікроорганізмів (КМАФАМ), визначення бактерій групи кишкової палички, лістерій, сальмонел) [5].

Метод має перевагу перед існуючими якісними методами визначення безпечності молока та молокопродуктів тому, що результати мають достовірні показники за забарвленням типових колоній коагулазопозитивних стафілококів.

Джерела інформації:

1. Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання: ДСТУ 7357:2013. - К.: Мінекономрозвитку України, 2014.-35 с. (Національний стандарт України).

2. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахування коагулазопозитивних стафілококів (*Staphylococcus aureus* та інших видів) (ISO 11290-1:1996, ITD): ДСТУ ISO 6888-1:2003. - К.: Держспоживстандарт України, 2005. - 10с. (Національний стандарт України).

3. Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення (ISO 11290-1:1996, ITD): ДСТУ ISO 11290-1:2003. К.: Держспоживстандарт України, 2005. - 18 с. (Національний стандарт України).

4. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella*: ДСТУ EN 12824:2004. - К.: Держспоживстандарт України, 2005. - 20 с. (Національний стандарт України).

- 5 5. Довідник мікробіологічних методів дослідження харчових продуктів і кормів для тварин згідно з міжнародними стандартами / В.М. Івченко, В.В. Шарандак, О.І. Горбатюк та ін. - Біла Церква, 2006. - 264 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Горизонтальний спосіб виявлення коагулазопозитивних стафілококів у молоці та молокопродуктах, який **відрізняється** тим, що використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см<sup>3</sup> (г) та 50-55 см<sup>3</sup> селективного середовища попереднього концентрування (бульйон Джоліті та Кантоні із Твіном-80), з послідуочим інкубуванням отриманої суспензії упродовж 18±2 годин за температури 35±1 °С та наступним її посівом у кількості 1,0-1,1 см<sup>3</sup> у велику чашку Петрі, що містить агарове середовище Беард-Паркера, у подальшому витримують за кімнатної температури (20±2 °С) упродовж 10-15 хвилин та інкубують у термостаті за температури 35±1 °С упродовж 24±1 та 48±1 годин для отримання типових колоній коагулазопозитивних стафілококів упродовж 24±1 годин у вигляді чорних або сірих, блискучих і випуклих, діаметром 1,0-1,5 мм (через 48±1 годин - діаметром 1,5-2,5 мм) і оточених чистою зоною, яка через 24±1 годин інкубації має опалесценцію кільця.

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601