



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115758** (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

(21) Номер заявки: u 2016 11541	(72) Винахідник(и): Богатко Надія Михайлівна (UA), Букалова Наталія Володимирівна (UA), Приліпко Тетяна Миколаївна (UA), Томишинець Василь Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки: 15.11.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2017, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): Богатко Надія Михайлівна, вул. Академіка Вула, 6, кв. 97, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA), Букалова Наталія Володимирівна, вул. Героїв Чорнобиля, 5, кв. 78, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA), Приліпко Тетяна Миколаївна, вул. Князів Коріатовичів, 21/10, кв. 29, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 03245 (UA), Томишинець Василь Іванович, вул. Героїв Чорнобиля, 6, кв. 34, м. Біла Церква, Київська обл., 09100 (UA)

(54) ГОРИЗОНТАЛЬНИЙ СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ LISTERIA MONOCYTOGENES У МОЛОЦІ ТА МОЛОКОПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Горизонтальний спосіб виявлення *Listeria monocytogenes* у молоці та молокопродуктах, в якому використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5, з послідуочим інкубуванням отриманої суспензії упродовж 21-23 годин за температури 31 ± 1 °C та наступним вторинним збагаченням. Отриману культуру у кількості 0,05-0,06 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см³ вторинно збагаченого середовища. Проводять інкубування середовища з посівами упродовж 46-48 годин за температури 37 °C. Проводять посів із первинно (5-6 см³) та вторинно (2,5-3,0 см³) збагаченої культури на селективне середовище ПАЛКАМ-агар для отримання чітко відокремлених колоній *Listeria monocytogenes* діаметром 1,5-2 мм упродовж 24±2 годин за температури 37 ± 1 °C у вигляді маленьких сіро-зелених чи оливково-зелених колоній та через 46±2 годин за температури 37 ± 1 °C - у формі зелених колоній із впалим центром та чорним ореолом навколо.

UA 115758 U

Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до ветеринарної медицини, і може бути використана для удосконалення горизонтального методу виявлення *Listeria monocytogenes* 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 *Listeria monocytogenes* 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 послідовним 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 20 до 35 %.

Прототипом корисної моделі є горизонтальний метод виявлення *Listeria monocytogenes* у молоці та молокопродуктах [2], у якому застосовують великий об'єм первинно та вторинно селективних рідких збагачених середовищ (половинний бульйон Фрезера та бульйон Фрезера) і для дослідження береться вихідна суспензія, що готується у співвідношенні 1:9 (маса проби молока, молокопродуктів до об'єму селективного первинно збагаченого середовища).

Недоліком даного методу є те, що він громіздкий, з підвищеною вартістю середовищ, реактивів та інкубування в селективному середовищі Оксфорд-агарі за температури 30 °C прийнятне лише для кормів. Крім цього даний метод дає похибку у 15-25 %.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб удосконалення горизонтального методу виявлення *Listeria monocytogenes* у молоці та молокопродуктах шляхом використання дослідної суспензії, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см³ (г) та 50-55 см³ первинно селективного збагаченого середовища - половинного бульйону Фрезера), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 21-23 годин за температури 31 ± 1 °C та наступним вторинним збагаченням: після первинного збагачення отриману культуру у кількості 0,05-0,06 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см³ вторинно збагаченого середовища (бульйон Фрезера), потім інкубують середовище з посівами упродовж 46-48 годин за температури 37 °C, у подальшому проводять посів із первинно (5-6 см³) та вторинно (2,5-3,0 см³) збагаченої культури на селективне середовище ПАЛКАМ-агар, щоб отримати чітко відокремлені колонії *Listeria monocytogenes* упродовж 24 ± 2 годин за температури 37 ± 1 °C у вигляді маленьких сіро-зелених чи оливково-зелених колоній, діаметром 1,5-2 мм, інколи з чорним ореолом, через 48 годин - у формі зелених колоній діаметром 1,5-2 мм із впалим центром та чорним ореолом навколо.

Поставлена задача вирішується тим, що використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см³ (г) та 50-55 см³ первинно селективного збагаченого середовища - половинного бульйону Фрезера), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 21-23 годин за температури 31 ± 1 °C та наступним вторинним збагаченням: після первинного збагачення отриману культуру у кількості 0,05-0,06 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см³ вторинно збагаченого середовища (бульйон Фрезера), потім інкубують середовище з посівами упродовж 46-48 годин за температури 37 °C, у подальшому проводять посів із первинно (5-6 см³) та вторинно (2,5-3 см³) збагаченої культури на селективне середовище ПАЛКА М-агар, щоб отримати чітко відокремлені колонії *Listeria monocytogenes* упродовж 24 ± 2 годин за температури 37 ± 1 °C у вигляді маленьких сіро-зелених чи оливково-зелених колоній, діаметром 1,5-2 мм, інколи з чорним ореолом, та через 46 ± 2 годин за температури 37 ± 1 °C - у формі зелених колоній діаметром 1,5-2 мм із впалим центром та чорним ореолом навколо.

Етапи вирішення даної задачі наведено у нижчезазначених прикладах.

Приклад 1. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:6 (проби молока та молокопродуктів у кількості 15-16 см³ (г) та 90-96 см³ первинно селективного збагаченого середовища - половинного бульйону Фрезера), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 20-21 годин за температури 28 ± 1 °C та наступним вторинним збагаченням: після первинного збагачення отриману культуру у кількості 0,2-0,4 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 20-22 см³ вторинно збагаченого середовища (бульйон Фрезера), потім інкубують середовище з посівами упродовж 48-50 годин за температури 37 °C, у подальшому проводять посів із первинно (10-11 см) та вторинно (1,5-2,0 см³) збагаченої культури на селективне середовище ПАЛКАМ-агар, щоб отримати чітко відокремлені колонії *Listeria monocytogenes* упродовж 22 ± 2 годин за температури 34 ± 1 °C у вигляді маленьких сіро-зелених чи оливково-зелених колоній, діаметром 1,5-2 мм, інколи з

чорним ореолом, та через 44 ± 2 годин за температури 35 ± 1 °C - у формі зелених колоній діаметром 1,5-2 мм із впалим центром та чорним ореолом навколо.

Приклад 2. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:8 (проби молока та молокопродуктів у кількості 30-31 см³ (г) та 240-248 см³ первинно селективного збагаченого середовища - половинного бульйону Фрезера), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 24-25 годин за температури 29 ± 1 °C та наступним вторинним збагаченням: після первинного збагачення отриману культуру у кількості 0,1-0,2 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 10-12 см³ вторинно збагаченого середовища (бульйон Фрезера), потім інкубують середовище з посівами упродовж 46-48 годин за температури 38 °C, у подальшому проводять посів із первинно (6-8 см³) та вторинно (3,5-4,0 см³) збагаченої культури на селективне середовище ПАЛКАМ-агар, щоб отримати чітко відокремлені колонії *Listeria monocytogenes* упродовж 23 ± 2 годин за температури 35 ± 1 °C у вигляді маленьких сіро-зелених чи оливково-зелених колоній, діаметром 1,5-2 мм, інколи з чорним ореолом, та через 45 ± 2 годин за температури 37 ± 1 °C - у формі зелених колоній діаметром 1,5-2 мм із впалим центром та чорним ореолом навколо.

Приклад 3. Для розробки методу використовують дослідну суспензію, яка готується у співвідношенні 1:5 (проби молока та молокопродуктів у кількості 10-11 см³ (г) та 50-55 см³ первинно селективного збагаченого середовища - половинного бульйону Фрезера), послідовним інкубуванням отриманої суспензії упродовж 21-23 годин за температури 31 ± 1 °C та наступним вторинним збагаченням: після первинного збагачення отриману культуру у кількості 0,05-0,06 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см³ вторинно збагаченого середовища (бульйон Фрезера), потім інкубують середовище з посівами упродовж 46-48 годин за температури 37 °C, у подальшому проводять посів із первинно (5-6 см) та вторинно (2,5-3,0 см³) збагаченої культури на селективне середовище ПАЛКАМ-агар, щоб отримати чітко відокремлені колонії *Listeria monocytogenes* упродовж 24 ± 2 годин за температури 37 ± 1 °C у вигляді маленьких сіро-зелених чи оливково-зелених колоній, діаметром 1,5-2 мм, інколи з чорним ореолом, та через 46 ± 2 годин за температури 37 ± 1 °C - у формі зелених колоній діаметром 1,5-2 мм із впалим центром та чорним ореолом навколо.

Порівняльна оцінка результатів випробування вищезазначених способів удосконалення горизонтального методу виявлення *Listeria monocytogenes* у молоці та молокопродуктах до прототипу наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння способів удосконаленого горизонтального методу виявлення *Listeria monocytogenes* у молоці та молокопродуктах до прототипу

№ п/п	Показники, що порівнюються	Прототип	Приклади		
			1	2	3
1.	Приготування дослідної суспензії: Кількість молока, молокопродуктів, см ³ або г Кількість половинного бульйону Фрезера, см ³ Співвідношення	25,0 225 1:9	15-16 90-96 1:6	30-31 240-248 1:8	10-11 50-55 1:5
2.	Отримання первинно збагаченої культури: Інкубування отриманої суспензії за температури Експозиція, год.	30 °C 24	28±1 °C 20-21	29±1 °C 24-25	31±1 °C 21-23

Продовження таблиці 1

3.	Вторинне збагачення культури: Кількість культури після первинного збагачення, см ³ Кількість бульйону Фрезера, см ³	0,1 10	0,2-0,4 20-22	0,1-0,2 10-12	0,05-0,06 5-6
4.	Інкубування середовища Фрезера із посівом за температури Експозиція, год.	35 або 37 °C 48±2	35 °C 48-50	38 °C 46-48	37 °C 46-48
5.	Посів на чашки первинно збагаченої культури: Кількість культури, см ³ Середовище Інкубування за температури Експозиція, год.	10-12 Оксфорд-агар 30±1 °C 24	10-11 ПАЛКАМ-агар 34±1 °C 22±2	6-8 ПАЛКАМ-агар 35±1 °C 23±2	5-6 ПАЛКАМ-агар 37±1 °C 24±2
6.	Ідентифікація колоній <i>Listeria monocytogenes</i> : Розмір колоній, мм Забарвлення колоній через 24 год.	1 мм сіруватого кольору, оточені чорними ореолами	1,5-2, колонії маленькі сіро-зелені чи оливково-зелені, інколи з чорним ореолом	1,5-2, колонії маленькі сіро-зелені чи оливково-зелені, інколи з чорним ореолом	1,5-2, колонії маленькі сіро-зелені чи оливково-зелені, інколи з чорним ореолом
7.	Посів на чашки вторинно збагаченої культури: Кількість культури, см Середовище Інкубування за температури Експозиція, год.	10-12 Оксфорд-агар 35 або 37 °C 48±2	1,5-2,0 ПАЛКАМ-агар 35±1 °C 44±2	3,5-4,0 ПАЛКАМ-агар 37±1 °C 45±2	2,5-3,0 ПАЛКАМ-агар 37±1 °C 46±2
8.	Ідентифікація колоній <i>Listeria monocytogenes</i> : Розмір колоній, мм Забарвлення колоній через 48 год.	2 мм, колонії темніють, зеленкуватий відтінок з чорним ореолом та западинами центрами	1,5-2 мм, колонії зелені із впалим центром та чорним ореолом	1,5-2 мм, колонії зелені із впалим центром та чорним ореолом	1,5-2 мм, колонії зелені із впалим центром та чорним ореолом
9.	Швидкість визначення досліджу, год.	118 год.	114-115год.	115-116 год.	113-114год.
10.	Стабільність показників по удосконаленому горизонтальному методу виявлення <i>Listeria monocytogenes</i> у молоці, молокопродуктах, %	94,2	90,1	78,9	99,8
11.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності сальмонел у молоці, молокопродуктах, у %	89,5-92,2	81,3-83,0	85,4-87,0	97,5-98,9
12.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності стафілококів у молоці, молокопродуктах, у %	87,1-89,0	82,5-85,1	87,3-89,3	97,8-99,0

Дані таблиці 1 свідчать, що більш достовірні дані у порівнянні з результатами досліджень щодо визначення наявності сальмонел у молоці, молокопродуктах - у 97,5-98,9 % [3] та до

результатів досліджень щодо визначення наявності стафілококів у молоці, молокопродуктах - у 97,8-99,0 % [4] були отримані при застосуванні методу за прикладом № 3. Також найвища стабільність показників по удосконаленому горизонтальному методу виявлення *Listeria monocytogenes* у молоці та молокопродуктах була за прикладом № 3-99,8 %.

Використовуючи метод за прикладом № 3, ми провели виявлення *Listeria monocytogenes* 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 удосконаленого горизонтального методу виявлення
Listeria monocytogenes у молоці та молокопродуктах за
прикладом № 3

№ п/п	Перелік видів досліджуваних проб молока та молокопродуктів	Виявлення <i>Listeria monocytogenes</i> за забарвленням та розміром колоній за прикладом № 3			
		Кількість проб	Наявність колоній <i>Listeria monocytogenes</i>	Кількість проб	Відсутність колоній <i>Listeria monocytogenes</i>
1.	Молоко сире (уміст жиру 3,7 %), n=10	n=3	Через 24±2 год. колонії маленькі (1,5-2,0 мм) сіро-зелені чи оливково-зелені, інколи з чорним ореолом. Через 46±2 год. колонії (1,5-2,0 мм) зеленого кольору із впалим центром та чорним ореолом	n=8	Характерних колоній <i>Listeria monocytogenes</i> не виявлено
2.	Молоко пастеризоване (уміст жиру 2,8 %), n=10	n=0		n=10	
3.	Вершки, n=6	n=2		n=4	
4.	Вершки пастеризовані, n=5	n=0		n=5	
5.	Сир кисломолочний, n=6	n=2		n=4	
6.	Сир твердий, n=7	n=1		n=6	
7.	Сир плавлений, n=8	n=3		n=5	
8.	Масло вершкове, n=9	n=2		n=7	
9.	Спред, n=6	n=1		n=5	

Проведеними дослідженнями встановлено, що були виявлені колонії *Listeria monocytogenes* через 24±2 години маленькі розміром 1,5-2,0 мм сіро-зеленого чи оливково-зеленого кольору, інколи з чорним ореолом; через 46±2 год. - зеленого кольору із впалим центром та чорним ореолом у наступних пробах молока та молокопродуктах: у 3-х пробах молока сирого та сиру плавленого; у 2-х пробах вершків, сиру кисломолочного та масла вершкового; у 1 пробі сиру твердого та спреда. У пробах молока та вершках пастеризованих характерних колоній *Listeria monocytogenes* 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 та розміру колоній *Listeria monocytogenes*.

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

Метод має перевагу перед існуючими якісними методами визначення безпечності молока та молокопродуктів тому, що результати мають достовірні показники за забарвленням та розміром колоній *Listeria monocytogenes*.

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 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).

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

4. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахування коагулазопозитивних стафілококів. Частина 1. Метод з використанням агарового середовища Беард-Паркера (ISO 6888-1:1999, ITD): ДСТУ ISO 6888-1:2003. - К.: Держспоживстандарт України, 2005. - 10 с. (Національний стандарт України).

5. Івченко В.М. 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

Горизонтальний спосіб виявлення *Listeria monocytogenes* 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 см³ (г) та 50-55 см³ первинно селективного збагаченого середовища - половинного бульйону Фрезера), з послідуочим інкубуванням отриманої суспензії упродовж 21-23 годин за температури 31±1 °С та наступним вторинним збагаченням: отриману культуру у кількості 0,05-0,06 см³ переносять у пробірку, в якій міститься 5-6 см³ вторинно збагаченого середовища (бульйону Фрезера), потім проводять інкубування середовища з посівами упродовж 46-48 годин за температури 37 °С, та в подальшому проводять посів із первинно (5-6 см³) та вторинно (2,5-3,0 см³) збагаченої культури на селективне середовище ПАЛКАМ-агар для отримання чітко відокремлених колоній *Listeria monocytogenes* діаметром 1,5-2 мм упродовж 24±2 годин за температури 37±1 °С у вигляді маленьких сіро-зелених чи оливково-зелених колоній, інколи з чорним ореолом, та через 46±2 годин за температури 37±1 °С - у формі зелених колоній із впалим центром та чорним ореолом навколо.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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

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