ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EACC)
EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 13366-2/IDF 148-2–2014

МОЛОКО
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Часть 2

Руководство по эксплуатации флуорооптоэлектронных счетчиков

(ISO 13366-2:2006, IDT)
(IDF 148-2:2006, IDT)

Издание официальное

Зарегистрирован
№ 9642
30 июня 2014 г.

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протоколом от 25 июня 2014 г. № 45-2014)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Институт стандартизации Молдовы
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 13366-2:2006 | IDF 148-2:2006 Milk — Enumeration of somatic cells — Part 2: Guidance of the operation of fluoro-opto-electronic counters. (Молоко. Определение количества соматических клеток. Часть 2. Руководство по эксплуатации флуороптоэлектронных счетчиков).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO) и Международной молочной федерацией (IDF).

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в национальных органах по стандартизации.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

Настоящий межгосударственный стандарт подготовлен на основе национального стандарта СТБ ISO 13366-2-2012

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств

Содержание

1 Область применения ... 1
2 Нормативные ссылки ... 1
3 Термины и определения ... 1
4 Сущность метода ... 2
5 Факторы, влияющие на результаты измерений ... 2
6 Калибровка ... 4
7 Отбор проб ... 6
8 Определение ... 7
9 Проверка режима при стандартной работе ... 7
10 Особые условия при использовании молока различных видов сельскохозяйственных животных ... 9
11 Прецизионность ... 9
12 Протокол испытания ... 10
Библиография ... 11
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам ... 12

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МОЛОКО
Определение количества соматических клеток
Часть 2
Руководство по эксплуатации флуорооптоэлектронных счетчиков

Milk
Enumeration of somatic cells
Part 2
Guidance on the operation of fluro-opto-electronic counters.

Дата введения

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает руководство по эксплуатации флуорооптоэлектронных счетчиков соматических клеток с использованием в секции подсчета метода вращающегося диска или проточной цитометрии, используемых при подсчете соматических клеток как в сыром, так и в химически консервированном молоке.

Настоящий стандарт применяют для подсчета соматических клеток как в сыром коровьем молоке, так и в сыром козьем, овечьем и буйволином молоке при соблюдении необходимых условий.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

ISO 8196-1:2009 Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 1. Аналитические признаки альтернативных методов

ISO 8196-2:2009 Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 2. Калибровка и контроль качества в лаборатории по анализу молочной продукции

ISO 13366-1:2008 Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа

ISO Guide 34:2009 Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов

ISO/IEC 17043:2010 [1)] Оценка соответствия. Общие требования к проверке квалификации

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют термины и определения, установленные в ISO 8196-1 и ISO 8196-2, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 контрольный метод (reference method): Метод подсчета соматических клеток, установленный в настоящем стандарте.

3.2 соматические клетки (somatic cells): Клетки, интенсивность флуоресценции которых при окрашивании ДНК в ядрах превышает пороговую.

Примечание – Выражается количеством соматических клеток в миллилитре.

4 Сущность метода

Флуорооптоэлектронные счетчики имеют системы ввода реагентов и пробы для анализа, секцию смешивания и секцию подсчета. В секции смешивания испытываемую пробу смешивают с буферной смесью и окрашивающим раствором. Часть полученной смеси перемещают в секцию подсчета и наносят на предметную плоскость. Каждая окрашенная частица, обнаруживаемая в флуоресцентном микроскопе, испускает электрический импульс, который фильтруется, усиливается и регистрируется. Распределение по высоте результирующего импульса обрабатывается электронным способом,

[1)] Действует взамен ISO/IEC Guide 43-1:1997.

посредством чего происходит разграничение между шумовыми сигналами и импульсами, которые испускаются окрашенными соматическими клетками. Уровень амплитудного селектора импульсов может быть фиксированным или динамичным.

В секции смешивания дозируют и смешивают строго контролируемые объемы пробы для анализа и буферного/окрашивающих растворов. Смешивание можно осуществлять в чашке, в смесительной камере, в центрифуге, в петле для образцов или в трубке, ведущей к проточной кювете.

В секции подсчета можно использовать дисковую или проточную цитометрию. В случае применения дисковой цитометрии тонкую пленку смеси наносят через насадку на верхнюю часть вертикально вращающегося диска. Эта вращающаяся поверхность служит подвижной предметной плоскостью флуоресцентного микроскопа. При использовании проточной цитометрии часть смеси помещают в высокоскоростной поток окружающей корпус жидкости в капиллярной проточной кювете. В результате ускорения смесь образует тонкую струю, в которой динамически фокусируются и выравниваются в линию соматические клетки. Эта струя проходит перед объективом флуоресцентного микроскопа.

В некоторых приборах в секции подсчета содержится два канала. Исходя из обеспечения аналитического качества, такая ситуация считается эквивалентной работе с двумя отдельными модулями, таким образом, что рабочие характеристики оцениваются отдельно для каждого канала.

5 Факторы, влияющие на результаты измерений

5.1 Сосуды для отбора проб

Сосуды для отбора проб должны быть пригодны для переноса проб с места отбора проб в лабораторию без загрязнения или изменения состава.

Сосуды для отбора проб должны быть герметичными и после заполнения иметь достаточно свободного объема. Слишком большой свободный объем может стать причиной вспенивания, слишком малый свободный объем затруднит смешивание.

5.2 Отбор проб

5.2.1 Общие положения

Оборудование для отбора проб (т. е. колбы для проб, лабораторные стаканы и пробоотборники) должно быть чистым и сухим. Автоматические пробоотборники при использовании должны соответствовать установленным требованиям.

Рекомендуется немедленно охладить образцы для анализа после отбора до температуры 0 °С – 6 °С и хранить при этой температуре до подсчета (5.4) во избежание необходимости консервирования. Следует избегать замораживания. При необходимости консервирования соответствующие способы химического консервирования образцов для анализа установлены в 5.3.

5.2.2 Пробы сборного молока

Перед отбором проб необходимо тщательно перемешать сырое сборное молоко. При недостаточном перемешивании соматические клетки будут концентрироваться в верхних и нижних слоях.

5.2.3 Пробы молока от конкретных животных

Выделение соматических клеток в молоко во время доения происходит неравномерно. Для получения репрезентативного результата подсчета для всего процесса доения необходимо получить репрезентативные пробы для всего процесса доения. Для диагностических целей достаточна выборка части надоенного молока.

5.3 Консервация

При необходимости химической консервации проба для анализа (5.2.1) должна быть законсервирована как можно быстрее, но не более чем через 24 ч после отбора. Проба для анализа должна храниться охлажденной (при температуре 0 °С – 6 °С) до внесения консерванта.

Для консервации используют следующие консерванты:

a) Борная кислота: концентрация в пробе для анализа не должна превышать 0,6 г/100 мл. Законсервированные таким образом пробы хранят при температуре 6 °С – 12 °С не более 24 ч.

b) Азид натрия: концентрация в пробе для анализа не должна превышать 0,024 г/100 мл. Законсервированные таким образом пробы хранят при температуре 2 °С – 10 °С не более 72 ч.

c) Бронопол (2-бромо-2-нитро-1,3-пропандиол): концентрация в пробе для анализа не должна превышать 0,05 г/100 мл. Законсервированные таким образом пробы хранят при температуре от 2 °С до 12 °С не более 6 сут.

d) Бихромат калия: концентрация в пробе для анализа не должна превышать 0,2 г/100 мл. Законсервированные таким образом пробы хранят при температуре 2 °С – 12 °С в течение последующих 6 сут.

Рекомендуются следующие цветовые индикаторы:

– патентованный синий V с концентрацией в пробе для анализа до 0,15 мг/100 мл;

– желтый оранжевый S (E110) с концентрацией в пробе для анализа до 1 мг/100 мл;

– смесь из патентованного синего V и эозина B с концентрацией в пробе для анализа до 0,03 мг/100 мл и 0,45 мг/100 мл соответственно.

Допустимо использование других консервантов и цветовых индикаторов при условии, что их эффективность и условия использования разрешены в соответствии с установленным порядком.

Необходимо проверить отсутствие влияния вышеуказанных веществ на подсчет для соответствующего оборудования.

При использовании флуороптоэлектронных счетчиков клеток, входящих в состав анализаторов молока, измеряющих в том числе и другие компоненты в пробах для анализа, необходимо принять меры, исключающие влияние используемых консервантов и цветовых индикаторов на результаты подсчета.

5.4 Хранение и транспортировка проб

Проведение подсчета в незаконсервированной пробе для анализа, хранящейся при температуре 0 °С – 6 °С, необходимо провести в течение 96 ч с момента отбора проб. Следует избегать замораживания проб для анализа. Хранение при повышенной температуре и/или более установленного времени может выразиться в занижении значений результатов анализа. При измерении проб после замораживания и оттаивания значения результатов анализа могут быть занижены на 10 % – 20 %. Время хранения проб при замораживании и способ оттаивания могут оказать влияние на результат подсчета.

5.5 Вещества, создающие помехи

Необходимо избегать использования веществ, затрудняющих подсчет. Веществами, оказывающими влияние на показание прибора, являются:

a) консерванты и цветовые индикаторы при концентрации выше, чем в 5.3;

b) метиленовый синий при концентрации более 0,06 мг/100 мл.

5.6 Качество пробы для анализа

При распаде соматических клеток (лизис) наблюдается увеличение более мелких фрагментов клеток. После окрашивания этих частиц более низкая интенсивность флуоресценции вызывает сдвиг влево в распределении амплитуды импульсов. Это приводит к затруднению правильной дифференциации от шумовых импульсов и к занижению значения содержания числа клеток.

Примечание – В некоторых типах приборов имеются функции определения положения и формы распределения амплитуды импульсов. Эта информация приводится в соответствующих инструкциях и руководстве изготовителя прибора.

После исследования проблематичных проб следует проверить и по возможности очистить систему потока проб. Необходимо протестировать прибор перед его дальнейшим использованием. Возможными проблематичными пробами для анализа являются:

a) пробы молока из инфицированного вымени, т. е. со сгустками крови;

b) пробы молока с загрязнениями;

c) пробы молока с высоким количеством эритроцитов;

d) молозиво;

e) молоко поздней лактации;

f) скисшее молоко.

Не рекомендуется проводить контроль проблематичных проб для анализа.

5.7 Используемые реагенты

Используемые реагенты должны быть признанного аналитического и бактериологического качества. Используемая вода должна быть деминерализованной (остаточная электропроводность менее 10 мкСм/см) или по крайней мере эквивалентной чистоты. Приготовление рабочих растворов, сроки хранения и требования к хранению должны соответствовать инструкциям изготовителя.

Необходимо соблюдать правила использования и утилизации применяемых реагентов и сточных вод.

5.8 Функционирование прибора

5.8.1 Необходимо обратить внимание на следующие факторы:

a) функционирование устройства для смешивания и мешалки;

b) возможные затруднения при вводе пробы и в системе потока вследствие наличия загрязнений, сгустков или засорения блока смешивания и инкубации;

c) состояние и функционирование источника света и фотоумножителя, регулировка усиления и качество сигнала.

5.8.2 Необходимо обратить внимание на следующие факторы работы дисковых цитометрических счетчиков:

a) расположение пленки на вращающемся диске;

b) чистота предметной плоскости и функционирование чистящей губки с учетом важности периодической замены губки;

c) тщательное опорожнение емкости для сбора промывочной жидкости.

5.8.3 При использовании проточных цитометрических счетчиков необходимо обратить внимание при изменении поведения струи пробы в проточной кювете и потока защитной жидкости. Некоторые изготовители приборов предлагают специальное программное обеспечение для их контроля, указывающее на возможные решения в случае отклонений.

5.9.Рабочий коэффициент

Рабочий коэффициент – это число, на которое умножается фактическое число соматических клеток, посчитанных прибором, чтобы получить итоговую сумму соматических клеток в пробе для анализа. Теоретически лучшие результаты по характеристикам прецизионности и точности должны быть при более низком рабочем коэффициенте.

5.10 Анализируемые объемы

Точное соотношение между объемом буферного/окрашивающего раствора и объемом пробы для анализа очень важно для точного подсчета.

6 Калибровка

6.1 Стандартные образцы

6.1.1 Общие положения

Стандартные образцы готовят в строго контролируемых условиях, т. е. при наличии системы обеспечения качества и соблюдения требований, установленных в ISO Guide 34.

Существует несколько типов стандартных образцов:

a) сертифицированные стандартные образцы (CRMs), изготовленные организацией, признанной компетентной в данной области деятельности;

b) вторичные стандартные образцы (SRMs), изготовленные сторонним поставщиком;

c) собственные стандартные образцы (IRMs), изготовленные пользователем для своего собственного применения при соблюдении прослеживаемости с CRMs, SRMs или через межлабораторные проверки лабораторий на качество проведения испытаний.

Примечание – CRMs для подсчета соматических клеток бывают недоступны. Примеры соответствующих процедур подготовки IRMs приведены ниже. Предпочтительно использование IRMs с составом, наиболее приближенным к натуральному молоку.

6.1.2 Подготовка образцов для калибровки

6.1.2.1 Подготовка путем добавления суспензии лейкоцитов крупного рогатого скота

a) Смешивают 1000 мл стерилизованного или пастеризованного молока, содержащего низкое число соматических клеток, с 1 мл полипропилена 2000 и 0,4 г бронопола.

b) Добавляют требуемое количество соответствующей суспензии лейкоцитов в различные образцы смеси для получения соответствующего диапазона числа клеток.

6.1.2.2 Подготовка путем микрофильтрации

a) Отбирают свежее сборное молоко и добавляют бронопол, доводя до концентрации 0,02 %.

b) Обезжиривают молоко на сепараторе-сливкоотделителе до массовой доли жира менее 0,1 %.

c) Концентрируют обезжиренное молоко в 20 раз, используя тангенциальную микрофильтрацию через мембрану с размером пор 0,8 мкм, получая в результате образец с высоким содержанием клеток (HCM) и образец с низким содержанием клеток (LCM).

d) Смешивают сливки HCM и LCM в пропорциях, обеспечивающих получение 5 – 8 образцов молока с массовой долей жира 3,5 % и различным содержанием клеток, охватывающим нужный интервал.

6.1.2.3 Подготовка центрифугированием

a) Отбирают свежее сборное молоко и добавляют бронопол, доводя до концентрации 0,02 %.

b) Фильтруют приготовленное таким образом молоко через металлический фильтр с размером пор 0,5 мм.

c) Обезжиривают профильтрованное молоко центрифугированием при радиальном ускорении 40 g в течение 10 мин до получения сливок, обезжиренного молока и осадка.

d) Смешивают обезжиренное молоко и осадок в пропорциях, обеспечивающих получение 5 – 8 образцов молока с различным количеством клеток, которые охватывают нужный диапазон.

e) При необходимости нормализуют сливками до достижения в образце массовой доли жира (3,3 ± 0,3) %.

f) Полученные образцы разделяют на отдельные пробы и нагревают их при 120 °C и 10^5 Па в течение 3 мин.

6.1.3 Задание стандартных значений

Стандартные значения определяют параллельными анализами с использованием контрольного метода, установленного в ISO 13366-1. Целесообразно проводить испытания не менее чем в двух различных лабораториях.

С целью устранения случайных отклонений при подсчете уровня содержания клеток с течением времени рекомендуется проводить параллельный анализ образцов для калибровки с использованием инструментального метода, точно калиброванного с помощью действующего предыдущего набора образцов для калибровки.

Как правило, приемлемое соотношение с учетом максимальной разницы между результатами контрольного метода и подсчетами с помощью прибора для отдельных образцов для калибровки составляет менее 10 %. В таких случаях значения, полученные контрольным методом, и подсчеты с помощью прибора можно соединить, в силу чего результат, полученный контрольным методом, должен быть включен в заданное стандартное значение с весовым коэффициентом по меньшей мере 0,5.

При использовании результатов подсчета в анализируемых образцах для проверки на соответствие официально установленным нормам методика установления стандартных значений должна быть утверждена компетентными органами.

6.1.4 Условия хранения и срок годности при хранении

Условия хранения и срок годности приготовленных стандартных образцов должны пройти соответствующее подтверждение. Как правило, минимальный срок годности – один месяц.

Химическую консервацию проводят в соответствии с типом и концентрацией используемого консерванта для проб (5.3).

6.2 Процедура калибровки

6.2.1 Калибровка

Перед началом калибровки необходимо убедиться в исправности прибора и его соответствии требованиям относительно контроля холостых проб (9.1), остаточного воздействия (9.2), объемной доли (9.3) и сходимости (9.6).

Допускается при калибровке использовать линейную регрессию.

Процедуру калибровки проводят в соответствии с ISO 8196-2 с использованием не менее пяти образцов для калибровки, охватывающих соответствующий диапазон концентраций соматических клеток.

Предварительные значения для соответствующих диапазонов концентраций соматических клеток образцов для калибровки приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Предварительные значения для соответствующих калибровочных диапазонов

Тип молока	Диапазон, клеток/мл
Коровье молоко (сборное от стада коров)	100000 – 1000000
Коровье молоко (отдельной коровы)	100000 – 2000000
Козье молоко	200000 – 2000000
Овечье молоко	100000 – 2000000
Буйволиное молоко	100000 – 2000000

Калибровку проводят не менее одного раза в месяц.

6.2.2 Проверка на линейность

Зависимость между показаниями прибора и стандартными значениями должна быть линейной в пределах соответствующего диапазона концентраций соматических клеток. Отклонения от линейности могут возникать от неспецифических сигналов и эффектов совпадений.

Сначала проводят визуальную проверку линейности, используя соответствующие диаграммы для получения ясной картины формы зависимости. Если отклонение от линейности очевидно, используют количественный параметр в качестве теста для определения приемлемости наблюдаемой тенденции.

Для этого допустимо использовать молоко с высокой концентрацией клеток, разведенное порциями молока с низкой концентрацией клеток с целью получения набора не менее чем из пяти выборок, охватывающих диапазон концентраций.

Измеряют молоко с высокой концентрацией клеток и молоко с низкой концентрацией клеток в соответствии с разделом 8 не менее четырех раз и рассчитывают средний результат для каждой пробы. Рассчитывают значения для промежуточных проб, исходя из примененного отношения концентраций компонентов смеси в среднем на пробу, получая в результате ожидаемое значение для каждой пробы. Затем измеряют все пробы в соответствии с разделом 8 не менее четырех раз и рассчитывают среднее арифметическое результатов измерений каждой пробы, которое эквивалентно среднему арифметическому результатов измерений проб.

Наносят линейную регрессию с ожидаемыми значениями в среднем на пробу на ось *X*, а измеренные значения в среднем на пробу – на ось *Y*. Вычисляют остаточные значения $e_i = y_i - (bx_i + a)$ из регрессии. На график наносят остаточные значения e_i (ось *Y*) как функцию ожидаемых значений (ось *X*). Визуальная проверка точек данных будет вполне достаточной информацией о линейности сигнала. Любое выпадающее остаточное значение должно привести к исключению соответствующего результата и пересчету перед продолжением контроля.

При рассмотрении кривая может быть выражена отношением r_C, используя формулу

$$r_C = \frac{(e_{max} - e_{min})}{(M_{max} - M_{min})} \times 100\ \%,$$

где e_{max} – численное значение максимального остатка из регрессии;

e_{min} – численное значение минимального остатка из регрессии;

M_{max} – численное значение верхнего измеренного значения для набора рассматриваемых проб;

M_{min} – численное значение нижнего измеренного значения для набора рассматриваемых проб.

Отношение r_C должно быть менее 2 %. При превышении этого значения лучшие функциональные характеристики могут быть получены при проведении отдельных калибровок для отдельных интервалов подсчета.

Примечание – Как правило, можно совместить проверку требуемой линейности с калибровкой.

7 Отбор проб

Репрезентативная выборка должна быть отправлена в лабораторию. Она не должна быть повреждена или перепутана при транспортировании или хранении. Особое внимание нужно обратить на 5.2 – 5.6.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Требования к отбору проб установлены в ISO 707.

8 Определение

До проведения испытания пробу (5.2.2 или 5.2.3) необходимо постепенно нагреть до (40 ± 3) °С и перемешать переворачивая. Пробу допустимо хранить при комнатной температуре до испытания при условии его проведения в течение 30 мин после достижения температуры (40 ± 3) °С. Непосредственно перед проведением испытания пробу необходимо дополнительно тщательно перемешать.

Следует пользоваться инструкциями производителя прибора для измерения проб для анализа.

Примечание – Увеличение продолжительности подсчета, которое предлагается в качестве варианта с некоторыми приборами, фактически совпадает со снижением рабочего коэффициента (5.9). Это может улучшить повторяемость и точность измерений.

9 Проверка режима при стандартной работе

9.1 Контроль холостых проб

Под контролем холостых проб подразумевают проверку пути движения потока через прибор для определения загрязнения примесями. При запуске контроль холостой пробы следует провести по меньшей мере пять раз.

Среднее значение не должно превышать 3000 клеток/мл, а конкретные значения должны быть ниже 8000 клеток/мл.

При стандартном испытании контроль холостой пробы необходимо выполнять максимум после 100 проб, но не реже чем через 2 ч.

9.2 Остаточное воздействие

Рабочая часть от одной анализируемой пробы может повлиять на результат следующей пробы. Это остаточное воздействие необходимо проверять ежемесячно посредством измерения по меньшей мере пяти серий проб для анализа с количеством соматических клеток не менее 750000 в миллилитре, после чего следует провести контроль двух холостых проб. Вычисляют значение остаточного воздействия ОВ, выраженное в процентах, по формуле

$$\text{ОВ} = \frac{(\sum B_1 - \sum B_2)}{(\sum M - \sum B_2)} \times 100\ \%,$$

где B_1 – численное значение показания для первой холостой пробы;

B_2 – численное значение показания для второй холостой пробы;

M – численное значение показания для анализируемой пробы.

Результирующее остаточное воздействие должно быть менее 2 %.

Обычно рассчитанное остаточное воздействие может быть автоматически компенсировано при стандартном испытании образцов.

Примечание – В некоторых приборах остаточное воздействие может наблюдаться также между непоследовательными пробами, например при использовании цикла с инкубационными емкостями.

9.3 Соотношение объема реактива и объема анализируемой пробы

Соответствующее соотношение объемов буферного/окрашивающего раствора и анализируемой пробы молока очень важно для правильного подсчета. Для цитометров с вращающимися дисками оно должно контролироваться регулярно. Для этого можно использовать смешивание дозированных объемов буферного/окрашивающего раствора и анализируемой пробы в предварительно взвешенных колбах или пробирках.

После взвешивания возможно рассчитать отношение. Рассчитанное отношение не должно отличаться от заданного более чем на 5 %.

9.4 Контрольные измерения

9.4.1 Общие положения

Измерение контрольных проб с заданными значениями для контрольного молока предназначено для проверки кратковременной стабильности прибора. Используют контрольное молоко со средним, а также предпочтительно высоким (более двух средних значений) числом соматических клеток в соответствующем диапазоне подсчета.

9.4.2 Контрольная проба молока

Для получения соответствующей пробы контрольного молока можно воспользоваться методикой приготовления референсных материалов (6.1). Альтернативой является выбор подходящих проб для анализа из обычных анализируемых партий и последующим приготовлением комбинированного молока с добавлением соответствующих консервантов (5.3). Эти пробы до использования хранят при температуре 0 °С – 6 °С. Следует избегать замораживания проб контрольного молока. Необходимо учесть, что срок использования незаконсервированных проб в основном ограничен одним или двумя днями после приготовления.

9.4.3 Установление значений контрольных проб молока

Проводят анализ по меньшей мере 10 контрольных проб (по два параллельных измерения для каждой пробы) на калиброванном приборе. Из результатов вычисляют предел сходимости *r* в соответствии с ISO 8196-2. При условии, что рассчитанное значение меньше, чем установленное значение сходимости, указанное в 11.1, вычисляют среднее арифметическое значение полученных результатов и определяют этот результат в качестве значения контрольной пробы молока.

9.4.4 Использование контрольных проб молока

Контрольные проверки должны проводиться в начале рабочего дня и постоянно (по меньшей мере три раза в час) при стандартном анализе проб. Контрольные пробы молока должны быть репрезентативными для анализируемого молока и подлежать той же процедуре предварительной обработки проб и анализу, что и пробы для анализа.

Для правильного мониторинга стабильности прибора можно использовать контрольную схему в соответствии с ISO 8196-2. Поэтому установленное значение контрольной пробы молока служит эталонным значением. Необходимо принять соответствующие меры, если одно или более из полученных значений выходит за рамки пределов для отдельного результата или среднего арифметического значения.

9.5 Дополнительный контроль с помощью прибора

Некоторые изготовители приборов предлагают пробы с искусственными частицами для использования в ежедневном контроле с помощью прибора.

9.6 Сходимость

Проверку сходимости осуществляют каждый рабочий день при запуске прибора в соответствии с инструкцией изготовителя. Можно использовать контрольные пробы молока.

При проведении стандартного испытания большого количества проб на оборудовании высокой производительности рекомендуется при запуске проводить 10 дублирующих определений в контрольной пробе. Кроме того, рекомендуется проверить дважды 20 различных отдельных проб для анализа при последовательном исполнении через регулярные интервалы, т. е. приблизительно один раз в неделю.

Относительное стандартное отклонение сходимости рассчитывают в соответствии с ISO 8196-2. При получении значений, превышающих установленные в 11.1, необходимо принять соответствующие меры.

9.7 Внутрилабораторная воспроизводимость

Для приборов, имеющих идентичную систему калибровки, следует проверять внутрилабораторную воспроизводимость (11.2) как правило в пределах одной лаборатории с несколькими приборами.

Термин «внутрилабораторная воспроизводимость» распространяется на анализы, выполненные в одной и той же лаборатории с использованием одного и того же метода на идентичном материале для анализа по возможности разными операторами, использующими разные приборы в разное время (в течение нескольких часов).

Полученные при проверке сходимости (9.6) отдельные результаты для контрольных проб молока могут быть использованы также для проверки внутрилабораторной воспроизводимости. При получении значений, превышающих установленные в 11.1, необходимо принять соответствующие меры.

9.8 Межлабораторные сличения

Участие в межлабораторных сличениях на качество проведения испытаний в соответствии с ISO/IEC 17043 как минимум два раза в год является необходимой частью схемы обеспечения качества флуорооптоэлектронного подсчета соматических клеток. Количество участников должно быть

не менее 10. Относительный диапазон подсчета должен охватывать минимум 10 выборок, которые должны быть предложены для удвоенного анализа, причем из каждого сосуда для отбора проб отбирают две пробы.

10 Особые условия при использовании молока различных видов сельскохозяйственных животных

10.1 Общие положения

Рекомендуется проверять отсутствие значительного влияния повышенной концентрации жира и белка, добавляя, например, сливки и ультраконцентрат.

При обнаружении значительного влияния необходимо произвести регулировку прибора и/или методики подсчета в соответствии с рекомендациями изготовителя прибора.

При необходимости используют следующие подгонки:

a) предварительное разбавление анализируемой пробы;

b) использование более концентрированного окрашивающего раствора;

c) регулирование количества буферного/окрашивающего раствора;

d) изменение температуры анализируемой пробы;

e) увеличение времени прохождения через проточную кювету;

f) регулирование математической обработки полученного распределения амплитуды импульса.

10.2 Коровье молоко

Для разных видов поставляемого коровьего молока с высоким содержанием жира и белка необходимо проводить проверки на возможное их влияние при подсчете соматических клеток.

10.3 Козье молоко

Размер соматических клеток козьего молока значительно меньше соматических клеток коровьего молока. Дополнительный клеточный материал, такой как цитоплазматические частицы, могут создавать дополнительные помехи. Для получения надлежащей избирательности необходимо учитывать этот фактор. Однако козье молоко можно анализировать при калибровке флуорооптоэлектронных счетчиков на коровье молоко при условии, что калибровочный набор [4] охватывает соответствующий диапазон чисел соматических клеток и общее содержание сухих веществ молока не очень высокое.

Содержание соматических клеток в козьем молоке и его диапазон, например, в зависимости от периода лактации, как правило выше содержания соматических клеток в коровьем молоке и на него в меньшей степени влияет здоровье вымени.

10.4 Овечье молоко

При флуорооптоэлектронном подсчете соматические клетки в овечьем молоке имеют такой же вид, что и в коровьем молоке. Однако овечье молоко можно анализировать при калибровке флуорооптоэлектронных счетчиков на коровье молоко при условии, что калибровочный набор [4] охватывает соответствующий диапазон чисел соматических клеток и общее содержание сухих веществ молока не очень высокое.

Содержание соматических клеток в овечьем молоке соответствует содержанию соматических клеток в коровьем молоке или может быть выше.

10.5 Буйволиное молоко

При флуорооптоэлектронном подсчете соматические клетки в буйволином молоке имеют такой же вид, что и в коровьем молоке. Содержание жира и белка может быть значительно выше, что требует проведения корректировки результатов проверки при возможном влиянии этого фактора на результаты анализа.

11 Прецизионность

Примечание – Предварительные оценки прецизионности, приведенные ниже, были получены при проверках качества проведения анализа коровьего молока. Значения для молока других видов могут быть менее подходящими.

11.1 Сходимость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами анализов *r*, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном анализируемом материале в той же лаборатории одним и тем же оператором, использовавшим то же самое оборудование в короткий промежуток времени, не должна более чем в 5 % случаев превышать значения, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 – Сходимость значений

Уровень числа клеток, клеток/мл	S_r, %	*r*, клеток/мл
150000	6	25000
300000	5	42000
450000	4	50000
750000	3	63000
1500000	3	126000

11.2 Внутрилабораторная воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами анализов R_{intra}, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном анализируемом материале в той же лаборатории по возможности разными операторами, использовавшими различные приборы в разное время (в течение нескольких часов), не должна более чем в 5 % случаев превышать значения, приведенные в таблице 3.

Таблица 3 – Значения внутрилабораторной воспроизводимости

Уровень числа клеток, клеток/мл	S_{Rintra}, %	R_{intra}, клеток/мл
150000	7	29000
300000	6	50000
450000	5	63000
750000	4	84000
1500000	4	168000

11.3 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами анализов *R*, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном анализируемом материале в разных лабораториях в течение короткого промежутка времени, не должна более чем в 5 % случаев превышать значения, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Значения воспроизводимости

Уровень числа клеток, клеток/мл	S_R, %	*R*, клеток/мл
150000	9	38000
300000	8	67000
450000	7	88000
750000	6	126000
1500000	6	252000

12 Протокол испытания

В протоколе испытания должны быть указаны:

a) вся информация, необходимая для полной идентификации пробы;

b) метод отбора проб, если известен;

c) дата отбора проб;

d) тип пробы;

e) использованный метод испытания;

f) все рабочие подробности, отличающиеся от основных положений настоящего стандарта, которые могли иметь влияние на результаты испытания (ий);

g) результат (ы) испытания, в тысячах клеток на мл или, если производилась проверка сходимости, то окончательный полученный приведенный результат испытания.

Библиография

[1]	ISO 707 IDF 50	Milk and milk products – Guidance on sampling (Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)
[2]	ISO 5725-1:1994	Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)
[3]	ISO 5725-2:1994	Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)
[4]	Программа FAIR 1 CT 95-0881:2002	Strategies de controle en fermes des comptages de cellules somatiques du lait de brebis et de chevre (Правила проведения на фермах подсчета соматических клеток овечьего и козьего молока)

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица Д.А.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 13366-1:2008 Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (контрольный метод)	IDT	ГОСТ ИСО 13366-1/IDF 148-1-2014 Молоко. Определение количества соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (контрольный метод)
ISO 8196-1:2009 Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 1. Аналитические признаки альтернативных методов	IDT	ГОСТ ИСО 8196-1-2015 * Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 1. Аналитические показатели альтернативных методов
ISO 8196-2:2009 Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 2. Калибровка и контроль качества в лаборатории по анализу молочной продукции	IDT	ГОСТ ИСО 8196-2-2015 ** Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 2. Поверка и контроль качества в молочной лаборатории

* На территории Республики Беларусь действует СТБ П ISO 8196-1-2009/2010.
** На территории Республики Беларусь действует СТБ П ISO 8196-2-2009/2010.

УДК 637.13.075.02(083.74)(476) МКС 67.100 IDT

Ключевые слова: молоко, определение соматических клеток, руководство по эксплуатации, флуоро-оптоэлектронные счетчики

gost.e-ecolog.ru