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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 13366-1/IDF 148-1–2014

МОЛОКО
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Часть 1

Метод с применением микроскопа (контрольный метод)

(ISO 13366-1:2008, IDT)
(IDF 148-1:2008, IDT)

Издание официальное

Зарегистрирован
№ 9641
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 Госстандартом 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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
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 13366-1:2008 | IDF 148-1:2008 Milk – Enumeration of somatic cells – Part 1: Microscopic method (reference method) (Молоко. Определение количества соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (контрольный метод)), включая техническую поправку к нему Cor.1:2009.

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).

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

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

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 Термины и определения ... 1
3 Сущность метода ... 1
4 Реактивы ... 1
4.1 Красящие растворы ... 1
4.2 Фосфатно-буферный раствор (ФБР) ... 2
5 Аппаратура ... 3
6 Отбор проб ... 3
7 Подготовка пробы к испытанию ... 3
7.1 Хранение ... 3
7.2 Подготовка пробы ... 3
8 Методика испытания ... 4
8.1 Приготовление мазка и окрашивание ... 4
8.2 Определение ... 4
9 Подсчет и выражение результатов ... 8
9.1 Подсчет с использованием прямоугольного контура в полях, следующих друг за другом ... 8
9.2 Подсчет в полосах при использовании прямоугольного контура ... 8
9.3 Подсчет в полях, следующих друг за другом, при использовании круглого контура ... 9
9.4 Выражение результатов ... 9
10 Прецизионность ... 9
10.1 Сходимость ... 9
10.2 Воспроизводимость ... 10
11 Протокол испытания ... 10
Приложение А (справочное) Совместное испытание ... 11
Приложение В (справочное) Окрашивание козьего молока ... 12
Приложение С (справочное) Распределение Пуассона ... 13
Библиография ... 14

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК
Часть 1
Метод с применением микроскопа (контрольный метод)

Milk. Enumeration of somatic cells
Part 1
Microscopic method (reference method)

Дата введения -

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения количества соматических клеток в сыром и химически консервированном молоке. Метод применяется для проведения испытаний исследуемых проб и для градуировки механизированных и автоматизированных систем подсчета клеток.

Предупреждение – При применении настоящего стандарта могут использоваться опасные вещества и оборудование. Настоящий стандарт не предусматривает рассмотрения всех проблем безопасности, связанных с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности и охраны здоровья, а также установление соответствующих ограничений по применению настоящего стандарта несет пользователь.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

2.1 **соматические клетки** (somatic cells): Ядросодержащие клетки лейкоцитов и эпителия.

3 Сущность метода

Порцию исследуемой пробы молока распределяют тонким слоем на предметном стекле. Подсушивают и окрашивают, затем под микроскопом подсчитывают количество окрашенных клеток. Для определения количества клеток в 1 мл пробы число клеток, подсчитанное на определенной площади, умножают на рабочий коэффициент.

4 Реактивы

Используют реактивы только требуемой аналитической чистоты, дистиллированную и/или деминерализованную воду или воду, эквивалентную по чистоте.

4.1 Красящие растворы

Предупреждение – Тетрахлорэтан – яд. Этидиум бромид – токсичен. При проливе необходимо немедленно принять меры по обеззараживанию. Приготовление и применение красящих растворов необходимо проводить в вытяжном шкафу, используя средства индивидуальной защиты.

4.1.1 Модифицированный красящий раствор Newman-Lampert (модификация Lewowitz-Weber)

4.1.1.1 Состав

Этанол с объемной долей спирта 95 %	54,0 мл
Тетрахлорэтан	40,0 мл
Метиленовый синий	0,6 г
Ледяная уксусная кислота	6,0 мл
Примечание – Допускается заменять тетрахлорэтан таким же количеством ксилола.	

Издание официальное

4.1.1.2 Приготовление

В колбе смешивают этанол и тетрахлорэтан, укупоривают пробкой. Смесь нагревают на водяной бане (5.1) до температуры 65 °С. Добавляют метиленовый голубой в вытяжном шкафу и тщательно перемешивают. Охлаждают в холодильнике до 4 °С и затем добавляют ледяную уксусную кислоту.

Раствор фильтруют через фильтр (5.2) в герметичную колбу и в ней хранят. Красящий раствор Newman-Lampert фильтруют перед использованием.

4.1.2 Красящий раствор бромида этидия

4.1.2.1 Основной красящий раствор

4.1.2.1.1 Состав

Бромид этидия	0,25 г
Деминерализованная вода	100 мл

4.1.2.1.2 Приготовление

Бромид этидия растворяют в деминерализованной воде, предварительно нагретой до 40 °С. Охлаждают раствор до комнатной температуры. Доводят до 100 мл деминерализованной водой.

Основной красящий раствор бромида этидия хранят не более двух месяцев в темном месте при температуре (2 ± 2) °С.

4.1.2.2 Буферный раствор

4.1.2.2.1 Состав

Гидрофталат калия	0,51 г
Гидроксид калия	0,162 г
Деминерализованная вода	100 мл

4.1.2.2.2 Приготовление

Гидрофталат калия и гидроксид калия растворяют раздельно в деминерализованной воде.

Буферный раствор хранят не более 2 мес в темном месте при температуре (2 ± 2) °С.

4.1.2.3 Красящий рабочий раствор бромида этидия

4.1.2.3.1 Состав

Красящий основной раствор бромида этидия (4.1.2.1)	2 мл
Буферный раствор (4.1.2.2)	8 мл
Triton X-100	0,1 мл
Деминерализованная вода	90 мл
Примечание – Высокая температура может снизить красящую способность бромида этидия.	

4.1.2.3.2 Приготовление

Добавляют последовательно красящий основной раствор бромида этидия, буферный раствор и Triton X-100 в деминерализованную воду, тщательно перемешивают.

Красящий рабочий раствор бромида этидия готовят непосредственно перед использованием.

4.2 Фосфатно-буферный раствор (ФБР)

4.2.1 Состав

NaCl	8 г
KCl	0,2 г
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	1,15 г
KH_2PO_4	0,2 г
Деминерализованная вода	1000 мл

4.2.2 Приготовление

Растворяют соли в деминерализованной воде. Доводят объем раствора водой до 1000 мл и перемешивают.

Регулируют уровень pH на (7,2 ± 0,1).

Примечание – Допускается использовать фосфатно-буферный раствор с уровнем pH = 7,2 (имеющийся в продаже).

5 Аппаратура

Применяют следующее лабораторное оборудование:

5.1 **Водяные бани,** обеспечивающие поддержание температуры в диапазонах (40 ± 2) °С, (50 ± 2) °С и (65 ± 2) °С.

5.2 **Фильтр,** устойчивый к применяемым растворам, с размером пор 10 – 12 мкм.

5.3 **Микроскоп** с увеличением от 500× до 1000×. Допустимо использовать объективы для масляной иммерсии.

При использовании бромида этидия применяют люминесцентный микроскоп.

5.4 **Микрошприц** для распределения фиксированного объема 0,01 мл молока с предельно допускаемой погрешностью 2 %.

5.5 **Микрометр** сертифицированный.

5.6 **Предметные стекла** с предварительно нанесенным контуром (прямоугольным или круглым), с площадью 1 $см^2$ ± 5 % (95 – 105 $мм^2$) или стандартные предметные стекла в комплекте с шаблоном размером 20 × 5 мм или диаметром d = 11,28 мм.

5.6.1 Подбор предметных стекол

Рекомендуется работать с предварительно нанесенным контуром или шаблоном, чтобы избежать пересчета рабочего фактора при каждом подсчете.

5.6.2 Контуры

При использовании прямоугольного контура внутренние размеры противоположных сторон не должны различаться более чем на 0,2 мм.

При использовании круглого контура вертикальный и горизонтальный внутренние диаметры не должны различаться более чем на 0,2 мм.

6 Отбор проб

Проба, представленная в лабораторию для исследования, не должна быть поврежденной или измененной во время транспортирования или хранения.

Метод отбора проб не регламентирован настоящим стандартом. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 707.

Используемые автоматические пробоотборники должны быть предварительно аттестованы.

7 Подготовка пробы к испытанию

7.1 Хранение

До начала испытаний или консервации исследуемые пробы хранят при температуре (4 ± 2) °С.

Если отобранные пробы не были испытаны в течение 6 ч, то их необходимо законсервировать, добавляя химические консерванты, например борную кислоту, бронопол или дихромат калия. Максимальная концентрация борной кислоты должна быть не более 0,6 г на 100 мл исследуемой пробы. Максимальная концентрация бронопола должна быть не более 0,05 г на 100 мл исследуемой пробы. Максимальная концентрация дихромата калия должна быть не более 0,1 г на 100 мл исследуемой пробы. Срок хранения консервированных проб при температуре (4 ± 2) °С – не более 6 дн.

Во избежание негативного влияния на экологическую обстановку рекомендуется ограничить использование дихромата калия в пробах, законсервированных для хранения.

7.2 Подготовка пробы

Исследуемую пробу (см. 7.1) нагревают на водяной бане (5.1) до температуры 40 °С. Тщательно перемешивают. Охлаждают пробу до температуры, на которую калиброван микрошприц (5.4), например до 20 °С.

Разводят исследуемые пробы с предполагаемым количеством соматических клеток выше 1000000 клеток/мл фосфатно-буферным раствором (4.2), чтобы получить количество соматических клеток выше 500000 клеток/мл в каждой разведенной исследуемой пробе.

$$d = \frac{V_s}{V_s + V_b},$$

где d – коэффициент разведения для получения в исследуемой пробе содержания соматических клеток 500000 клеток/мл;

V_s – объем исследуемой пробы, мл;

V_b – объем буферного раствора, используемого для разведения исследуемой пробы, мл.

Фиксируют искомый коэффициент разведения d, объем исследуемой пробы V_s и объем буферного раствора V_b, используемые для получения требуемого разведения.

8 Методика испытания

Из каждой анализируемой пробы готовят и распределяют на предметном стекле минимум два препарата. Стекла (5.6) моют, например этанолом (с объемной долей спирта 95 %), сушат чистой фильтровальной бумагой, фламбируют и охлаждают.

8.1 Приготовление мазка и окрашивание

Приготовление мазка и окрашивание проводят в соответствии с 8.1.1 или 8.1.2.

Примечание – Окрашивание мазка козьего молока представлено в приложении В.

8.1.1 Приготовление мазка и окрашивание красящим раствором Newman-Lampert

Микрошприцом (5.4) отбирают 0,01 мл исследуемой пробы (разведенной соответствующим образом) (см. 7.2). Промывают микрошприц исследуемой пробой. При необходимости тщательно и осторожно протирают наружную сторону шприца, которая соприкасалась с исследуемой пробой.

Пробу помещают на чистое предметное стекло площадью 1 $см^2$ (5.6) и равномерно распределяют иглой по всей указанной площади, контролируя равномерное покрытие площади, близкой к периметру. Мазок полностью высушивают при комнатной температуре.

Погружают высушенный мазок на предметном стекле в модифицированный красящий раствор Newman-Lampert (4.1.1) не менее чем на 15 мин. Мазок высушивают при комнатной температуре.

Затем осторожно промывают водопроводной водой для удаления излишков краски. Опять высушивают и хранят, защищая от пыли.

8.1.2 Окрашивание красящим раствором этидиум бромида и приготовление мазка

Смешивают 1 мл подготовленной исследуемой пробы (см. 7.2) с 1 мл красящего рабочего раствора бромида этидия (4.1.2.3) в пробирке. Избегают попадания света на смесь. Нагревают пробирку на водяной бане (5.1) до 50 °С в течение 3 мин. Охлаждают до комнатной температуры.

При помощи микрошприца (5.4) отбирают 0,01 мл смеси. Промывают микрошприц смесью. При необходимости тщательно и осторожно протирают наружную сторону шприца, которая соприкасалась со смесью.

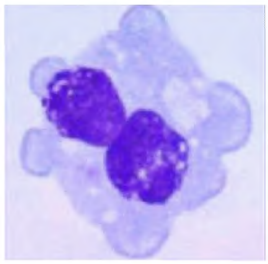
Помещают смесь на чистое предметное стекло площадью 1 $см^2$ (5.6). При помощи иглы равномерно распределяют исследуемую пробу по всей указанной площади, одновременно проверяя, чтобы площадь, близкая к периметру, была равномерно покрыта. Высушивают мазок при комнатной температуре.

8.2 Определение

8.2.1 Оптимизация показаний микроскопа

С помощью микроскопа (5.3) в полученном мазке (8.1.1 или 8.1.2) подсчитывают ядра клеток на полях, полностью покрытых мазком молока. Выбирают наиболее приемлемое увеличение (500× – 1000×), чтобы получить в среднем не более 20 клеток в каждом поле.

Клетки содержат окрашенные ядра. Размер клеток, как правило, не менее 8 мкм. При подсчете не учитывают клетки менее 4 мкм (см. рисунок 1). При подсчете учитывают фрагменты при возможности идентификации более 50 % ядерного материала. При подсчете кластеры клеток учитывают как одну клетку, если ядерные единицы разделены не отчетливо. См. также рисунки 2 и 3.

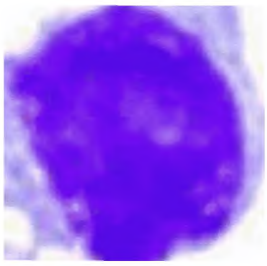


Макрофаг

8 – 30 мкм
Высокое соотношение цитоплазма/ядро. Фагоцитоз, представление антигена, секреция хемоаттрактантов

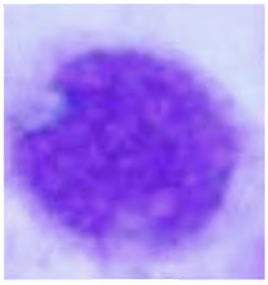


Полиморфонуклеарные лейкоциты (PMN)
10 – 14 мкм
90 % – острый мастит, 60 % – хронический мастит. Низкое соотношение цитоплазма/ядро. Фагоцитоз. Первая линия защиты от мастита



Лимфоцит

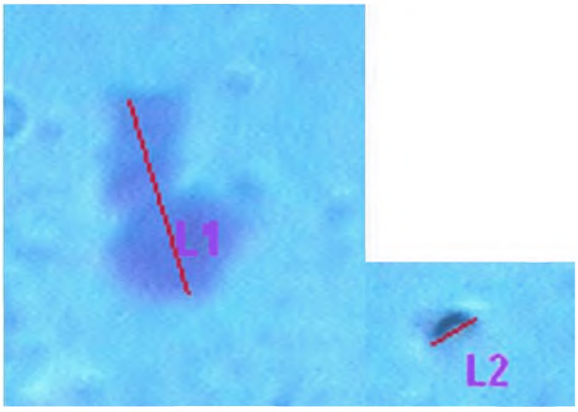
5 – 10 мкм
Низкое соотношение цитоплазма/ядро. Интенсивно окрашенное ядро
Т-хелпера, Т-супрессора, В-клетки



Эпителиальная клетка

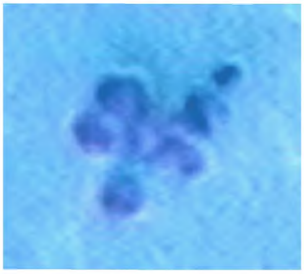
10 – 14 мкм
Ядро круглое. Цитоплазма слабо окрашена

Рисунок 1 – Примеры клеток

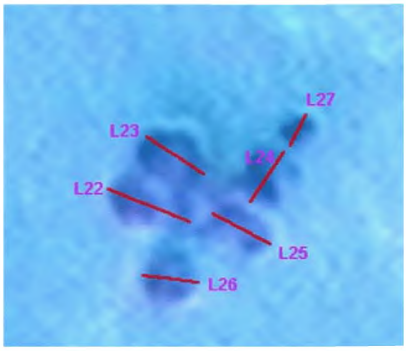


Длины клеток: L1 = 9,79 мкм и
L2 = 2,77 мкм

Рисунок 2 – Примеры клеток коровьего молока (увеличение 1000×)



(увеличение 500×)



(увеличение 1000×)

Длина клетки: L22 = 9,08 мкм; L23 = 8,27 мкм; L24 = 4,95 мкм; L25 = 7,39 мкм; L26 = 6,37 мкм и L27 = 3,58 мкм

Рисунок 3 – Примеры клеток коровьего молока

В примере кластера, приведенного на рисунке 3, следует считать пять клеток. Клетка L27 пропущена, так как ее диаметр меньше 4 мкм.

Примечание – Высокая квалификация лаборанта является основным условием получения объективных результатов метода. Для ее повышения необходимо частое использование метода и участие в межлабораторных исследованиях.

Как правило, клетки в молоке расположены согласно распределению Пуассона (см. приложение С). Минимальное число клеток *N*, которое следует подсчитать в зависимости от уровня подсчета клеток для получения приведенного коэффициента вариации, установлено в таблице 1.

Достоверность результатов обеспечивается подсчитыванием минимально приведенного числа клеток. Поля и полосы, на которых проводят подсчет, выбирают таким образом, чтобы получить репрезентативное количество на всем мазке.

Таблица 1 – Минимальное число клеток *N*

Концентрация (×1000 клеток/мл)	*CV* (коэффициент вариации), %	*N* (число клеток)
< 150	10	100
150 – 250	7	200
250 – 400	6	300
≥ 400	5	400

8.2.2 Подсчет ядер в полях, следующих друг за другом

Подсчитывают ядра в следующих друг за другом полях, в вертикальных участках в полях, расположенных на равном расстоянии друг от друга (см. рисунок 4 и таблицу 1).

Начинают подсчет с левой стороны приблизительно с расстояния d_L. При использовании круглого контура подсчет начинают с левой стороны горизонтального диаметра с соответствующего расстояния d_L, так, чтобы можно было провести подсчет минимум на пяти полях вверху участка. Для прямоугольного и круглого контура, как правило, используют расстояние d_L, равное 0,5 мм.

Помещают верхний и нижний край поля окружности тангенциально на внутреннюю верхнюю или нижнюю границу шаблона (последний не должен появляться на поле). В случае непокрытой плоскости рядом с границей шаблона регулируют поле в соответствии с границами мазка.

После подсчета на первом поле смещают объектив микроскопа на фиксированное расстояние d_H вниз или вверх к следующему полю в направлении нижнего или верхнего края и на новом поле проводят подсчет. Как правило, используют расстояние d_H, равное 1 мм.

После подсчета на последующем поле повторяют действия, описанные в перечислении c), до достижения противоположной стороны (вверху или внизу) участка. Далее выбирают один из следующих вариантов:

– вариант 1. На следующем поле не проводят подсчет.

– вариант 2. При появлении нижней или верхней границы, занимающей меньше половины плоскости поля, смещают объектив до тех пор, пока граница вновь полностью не исчезнет с поля, которое после этого покрывает только мазок, и выполняют подсчет.

Затем перемещают объектив вправо на расстояние d_w (например, d_w = 1,5 мм или d_w = 2 мм, в зависимости от числа требуемых полей) и начинают подсчет на новом участке в противоположном направлении (вверх или вниз).

Повторяют методику, описанную в перечислениях b) – e), до достижения правой стороны шаблона.

Если для проведения подсчета полей недостаточно (см. таблицу 1), подсчитывают на дополнительных полях. Для этого необходимо сфокусировать объектив микроскопа на другие места (например, изменяя исходную точку и/или постепенно изменяя расстояния перемещения) так, чтобы получить соответствующие числа клеток на полях, которые являются репрезентативными для всего мазка.

Проводят подсчет согласно 9.1 при использовании прямоугольного контура или согласно 9.3 при использовании круглого контура.

Примечание – При использовании прямоугольного контура на вертикальных участках размещают 5 полей на расстоянии 1 мм и 10 участков на расстоянии 2 мм, что позволяет производить подсчеты на 50 полях. Приблизительно такое же число полей получают при применении контура круглой формы, используя те же расстояния. Длины отступа (промежутка) измеряют от одного и того же места на поле при помощи верньера (регулировка по верхней или нижней границе) так, чтобы они включали диаметр поля.

8.2.3 Подсчет при помощи полос с использованием прямоугольного контура

Подсчитывают ядра в вертикальных полосах, расположенных на равном расстоянии друг от друга (см. рисунок 5 и таблицу 1).

Начинают подсчет с левой стороны на расстоянии d_L. Как правило, используют расстояние d_L, равное 0,5 мм.

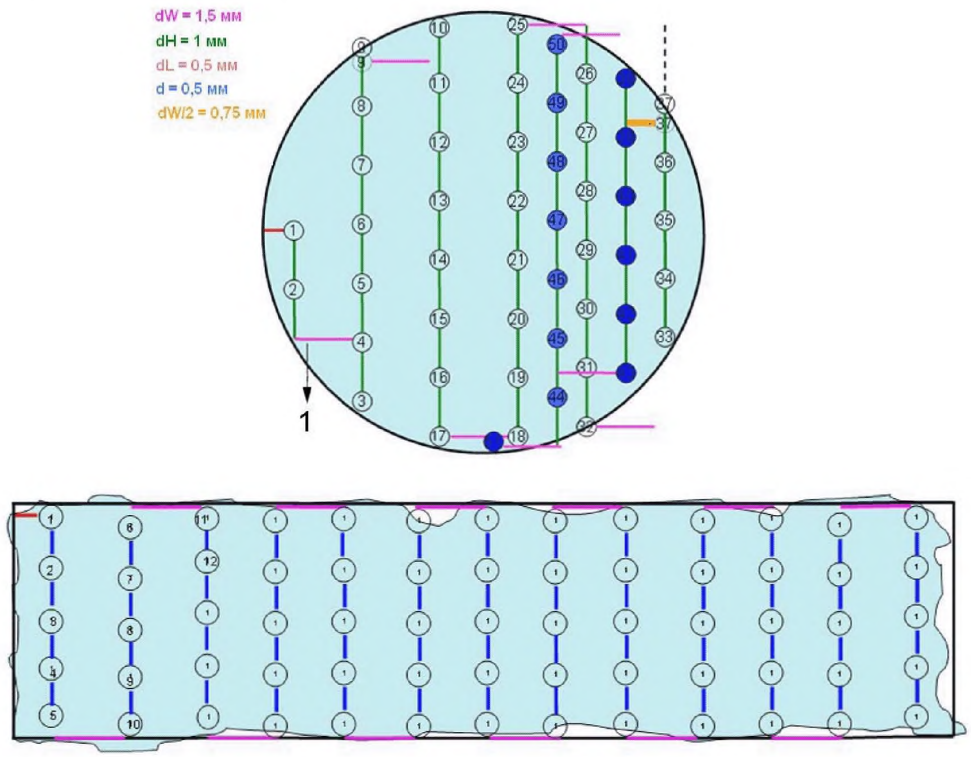
Начинают подсчет с верхней или нижней границы прямоугольной области. Помещают границу области в середину поля микроскопа. После подсчета всех клеток перемещают объектив в направлении противоположной границы и подсчитывают все клетки, которые появились в данной полосе, пока не будет достигнута противоположная граница. Записывают число подсчитанных клеток.

Затем перемещают объектив вправо на расстояние d_w (например, d_w = 3 – 4 мм, в зависимости от числа полос, необходимых для репрезентативного количества всего мазка) и начинают подсчет на новой полосе.

Повторяют b) и c), пока не будет достигнута правая сторона шаблона.

Если для проведения подсчета полос недостаточно (см. таблицу 1), подсчитывают на дополнительных полосах. Для этого необходимо сфокусировать объектив микроскопа на другие места (например, изменяя исходную точку и/или постепенно изменяя расстояния перемещения d_w) так, чтобы получить числа клеток на полях, репрезентативные для всего мазка.

Подсчитывают результат, как описано в 9.2.



1 – вниз до нижнего края

Рисунок 4 – Вертикальные участки на полях, расположенных на равном расстоянии друг от друга, при использовании круглого или прямоугольного контура

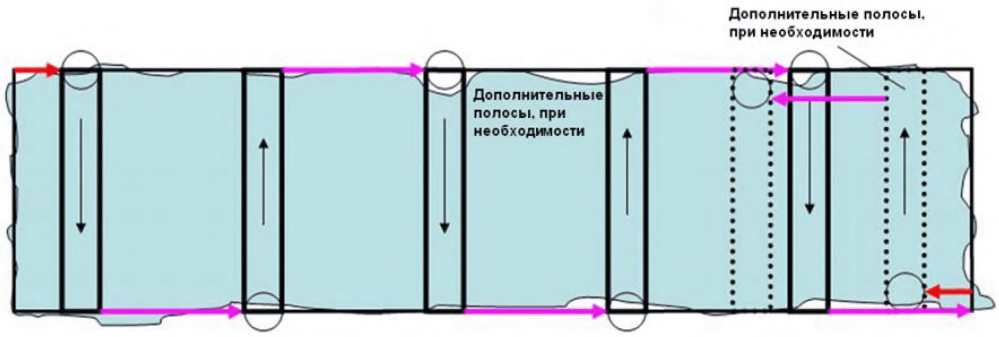


Рисунок 5 – Вертикальные полосы, расположенные на равном расстоянии друг от друга

9 Подсчет и выражение результатов

9.1 Подсчет с использованием прямоугольного контура в полях, следующих друг за другом

Проверяют установленные значения 20,0 и 5,0 мм длины L_s и ширины W_s мазка, используя градуировки и верньер микроскопа.

Вычисляют общую концентрацию c клеток по формуле

$$c = \frac{W_s \times L_s \times N_t}{\pi \times \left(\frac{D_f}{2}\right)^2 \times N_f \times V_m} \times \frac{1}{d}, \quad (1)$$

или

$$c = f_w \times \left[\frac{N_t}{N_f} \times \frac{1}{d}\right],$$

с постоянным рабочим фактором f_w

$$f_w = \frac{W_s \times L_s}{\pi \times \left(\frac{D_f}{2}\right)^2 \times V_m},$$

где c – общая концентрация, выраженная в количестве клеток на миллилитр;

W_s – ширина мазка, мм;

L_s – длина мазка, мм;

N_t – общее количество подсчитанных клеток;

D_f – диаметр поля микроскопа, мм;

N_f – количество полностью подсчитанных полей;

V_m – объем исследуемой пробы, распределенной на предметном стекле (см. 8.1.1 или 8.1.2), мл (если для окрашивания использовали модифицированный красящий раствор Newman-Lampert (8.1.1), V_m = 0,01 мл; если для окрашивания использовали красящий раствор бромида этидия (8.1.2), V_m = 0,005 мл);

d – коэффициент разведения, используемый в 7.2 (без разведения d = 1; при разведении 1 : 1 d = 0,5).

9.2 Подсчет в полосах при использовании прямоугольного контура

Проверяют установленные значения 20,0 и 5,0 мм длины и ширины мазка с использованием градуировок и верньера микроскопа.

Вычисляют общую концентрацию c клеток по формуле

$$c = \frac{W_s \times N_t}{D_f \times N_b \times V_m} \times \frac{1}{d} \quad (2)$$

или

$$c = f_w \times \left[\frac{N_t}{N_b} \times \frac{1}{d} \right],$$

с постоянным рабочим фактором f_w

$$f_w = \frac{W_s}{D_f \times V_m},$$

где N_b – количество полностью подсчитанных полос.

Пояснения других символов указаны в 9.1.

9.3 Подсчет в полях, следующих друг за другом, при использовании круглого контура

Проверяют диаметр мазка, равный 11,28 мм, используя градуировки и верньер микроскопа.

Вычисляют общую концентрацию c по формуле

$$c = \frac{D_c^2 \times N_t}{D_f^2 \times N_f \times V_m} \times \frac{1}{d} \quad (3)$$

или

$$c = f_w \times \left[\frac{N_t}{N_f} \times \frac{1}{d} \right],$$

с постоянным рабочим фактором f_w

$$f_w = \frac{D_c^2}{D_f^2 \times V_m},$$

где D_c – диаметр мазка, мм.

Пояснения других символов указаны в 9.1.

9.4 Выражение результатов

Результаты испытания выражают в целых числах, округленных до тысяч (например, записывают 401586 клеток/мл как 402000 клеток/мл).

10 Прецизионность

Значения сходимости и воспроизводимости были получены из результатов межлабораторного испытания, проведенного в соответствии с ISO 5725-1 и ISO 5725-2. Подробности данного межлабораторного испытания кратко изложены в приложении А.

Значения, установленные в ходе межлабораторного испытания, могут не входить в диапазон концентраций и матриц, которые отличаются от установленных.

10.1 Сходимость

Абсолютная разница между двумя результатами независимых испытаний, полученными при использовании одного метода на идентичных пробах материала в одной лаборатории одним испытателем при использовании одного оборудования в течение короткого периода времени, не должна более чем в 5 % случаев быть больше значений, указанных в таблице 2.

Таблица 2 – Значения сходимости

Концентрация (×1000 клеток/мл)	Стандартное отклонение сходимости s_r (×1000 клеток/мл)	Предел сходимости r (×1000 клеток/мл)
245	38	107
455	43	121
679	69	192
791	110	308

10.2 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя результатами независимых испытаний, полученными при использовании одного метода на идентичных пробах материала в разных лабораториях разными испытателями при использовании разного оборудования, не должна более чем в 5 % случаев быть больше значений, указанных в таблице 3.

Таблица 3 – Значения воспроизводимости

Концентрация (×1000 клеток/мл)	Стандартное отклонение воспроизводимости s_R (×1000 клеток/мл)	Предел воспроизводимости R (×1000 клеток/мл)
245	41	114
455	62	174
679	78	218
791	110	308

11 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) метод отбора проб, если он известен;

c) метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все детали, не описанные в настоящем стандарте или необязательные, вместе с подробностями любых непредвиденных случайностей, которые могут повлиять на результат (ы) анализа;

e) полученные результаты испытаний или окончательный заявленный результат, если была проверена повторяемость.

Приложение А
(справочное)

Совместное испытание

А.1 Общие положения

Международное совместное исследование коровьего молока, включающее восемнадцать лабораторий и тринадцать стран, было проведено в октябре 2005 г. Было исследовано 8 проб при четырех уровнях концентрации клеток на миллилитр и поделенных на 16 «слепых» дубликатов.

Средние значения каждого уровня концентрации были следующими:

– уровень 1, пробы A и B: 245000 клеток/мл;

– уровень 2, пробы C и D: 455000 клеток/мл;

– уровень 3, пробы E и F: 679000 клеток/мл;

– уровень 4, пробы G и H: 791000 клеток/мл.

Испытание было организовано A.I.A. (авторитетным инспекционным органом) Laboratorio Standard Latte (Лаборатория стандартов молока), Маккарезе, Рим (Италия). Были проведены статистические исследования в соответствии с ISO 5725-1 и ISO 5725-2 и получены прецизионные данные, указанные в таблице А.1.

Таблица А.1 – Результаты межлабораторного испытания

	Уровень			
	1	2	3	4
Не участвовавшие после устранения резко отклоняющихся значений	24	23	24	24
Среднее значение, ×1000 клеток/мл	245	455	679	791
Стандартное отклонение сходимости s_r, ×1000 клеток/мл	38	43	69	110
Коэффициент вариации стандартного отклонения сходимости, %	169	9	10	14
Предел сходимости r (2,8 s_r), ×1000 клеток/мл	107	121	192	308
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, ×1000 клеток/мл	41	62	78	110
Коэффициент вариации стандартного отклонения воспроизводимости, %	17	14	11	14
Предел воспроизводимости R (2,8s_R), ×1000 клеток/мл	114	174	218	308

Приложение В
(справочное)

Окрашивание козьего молока

В.1 Красящие растворы для козьего молока [8]

В.1.1 Фиксатор Карнуа

В.1.1.1 Компоненты

Хлороформ	60 мл
Уксусная кислота ледяная	20 мл
100%-ный этиловый спирт	120 мл

В.1.1.2 Приготовление

Добавляют последовательно хлороформ и уксусную кислоту ледяную в этиловый спирт и тщательно перемешивают.

В.1.2 Красящий раствор метилового зеленого и пиронина-Y

В.1.2.1 Состав

Пиронин-Y	1,0 г
Метиловый зеленый	0,56 г
Деминерализованная вода	196 мл

В.1.2.2 Приготовление

Добавляют последовательно пиронин-Y и метиловый зеленый в колбу с деминерализованной водой и тщательно перемешивают. Фильтруют через фильтр (5.2) и хранят в колбе из коричневого стекла. Перед использованием раствор снова фильтруют через фильтр (5.2).

В.2 Приготовление мазка

Проводят окрашивание мазка на предметном стекле по следующей схеме:
1 Фиксатор Карнуа (В.1.1) в течение 5 мин.
2 50%-ный этанол в течение 1 мин.
3 30%-ный этанол в течение 1 мин.
4 Вода в течение 1 мин.
5 Окрашивание в красящем растворе пиронина-Y и метилового зеленого в течение 6 мин.
6 Быстрая промывка н-бутиловым спиртом и затем ксилолом.
7 Хранение предметных стекол в защищенном от пыли месте.

Приложение С
(справочное)

Распределение Пуассона

Как правило, клетки в молоке расположены согласно распределению Пуассона. Распределение Пуассона допускает, что:

$$M = V = s^2,$$

где M – среднее значение;
V – вариация;
s – стандартное отклонение.

Соответственно, коэффициент вариации CV:

$$CV = \frac{s}{M} \times 100\ \%,$$

или

$$CV = \frac{100\ \%}{s},$$

или

$$CV = \frac{100\ \%}{\sqrt{M}},$$

где M – среднее значение, представляющее собой число подсчитанных единиц (клеток) при подсчете количества соматических клеток.

Библиография

[1] ISO 78-2:1999 — Chemistry – Layouts for standards – Part 2: Methods of chemical analysis (Химия. Структура стандартов. Часть 2. Методы химического анализа)

[2] ISO 5155:1995 — Household refrigerating appliances – Frozen food storage cabinets and food freezers – Characteristics and test methods (Бытовые холодильники. Морозильники и пищевые фризеры. Основные характеристик и методы испытаний)

[3] ISO 5538:2004 | IDF 113:2004 — Milk and milk products – Sampling – Inspection by attributes (Молоко и молочные продукты. Отбор проб. Контроль по качественным признакам)

[4] ISO 7218:2007 — Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям)

[5] ISO 8197:1988 (IDF 136A) — Milk and milk products – Sampling – Inspection by variables (Молоко и молочные продукты. Отбор проб. Контроль по количественным признакам)

[6] ISO/IEC 17025:2005 — General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

[7] ISO 22935-2:2009 | IDF 99-2:2009 — Milk and milk products – Sensory analysis – Part 2: Recommended methods for sensory evaluation (Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки)

[8] ISO 22935-3:2009 | IDF 99-3:2009 — Milk and milk products – Sensory analysis – Part 3: Evaluation of compliance with product specifications for sensory properties by scoring (Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 3. Руководство по методу оценки соответствия органолептических свойств продукции спецификациям путем подсчета очков)

[9] International Dairy Federation. Guidelines for sampling equipment and data collection on milk collecting tankers. Bull. Int. Dairy Fed., 1990, (252), pp. 35–48 (Требования Международной молочной федерации к оборудованию по отбору проб и сбора информации для молоковозов)

[10] Ramsey, M. H. and Ellison, S. L. R., editors. Measurement uncertainty arising from sampling – A guide to methods and approaches. EURACHEM, Teddington, 2007. 102 p. (EURACHEM/CITAC Guide.) Available (2008-03-19) at: gost.e-ecolog.ru (Погрешность измерения, обусловленная процедурой отбора проб. Руководства по методам и подходы)

УДК 637.13.074:543.08(083.74)(476) МКС 67.100.10 IDT

Ключевые слова: молоко, соматические клетки, метод определения

gost.e-ecolog.ru