ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 13366-1-2012

МОЛОКО

Часть 1

Метод определения количества соматических клеток с применением микроскопа (контрольный метод)

МАЛАКО

Частка 1

Метад вызначэння колькасці саматычных клетак з выкарыстаннем мікраскопа (кантрольны метад)

(ISO 13366-1:2008, IDT)

Издание официальное

БЗ 9-2011



Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.14.075(083.74)(476) МКС 67.100.10 КП 03 IDT

Ключевые слова: молоко, соматические клетки, метод определения

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

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

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 18 января 2012 г. № 4

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 13366-1:2008 Milk – Enumeration of somatic cells – Part 1: Microscopic method (Reference method) [Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (контрольный метод)], включая поправку Cor.1:2009.

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

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, имеется в Национальном фонде ТНПА.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВЗАМЕН СТБ ИСО 13366-1-2005

© Госстандарт, 2012

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 1
5 Аппаратура 3
6 Отбор проб 3
7 Подготовка пробы к испытанию 3
8 Методика испытания 4
9 Подсчет и выражение результатов 9
10 Прецизионность 10
11 Протокол испытания 11
Приложение А (справочное) Совместное испытание 12
Приложение В (справочное) Окрашивание козьего молока 13
Приложение С (справочное) Распределение Пуассона 14
Библиография 15

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МОЛОКО
Часть 1
Метод определения количества соматических клеток с применением микроскопа (контрольный метод)

МАЛАКО
Частка 1
Метад вызначэння колькасці саматычных клетак з выкарыстаннем мікраскопа (кантрольны метад)

Milk
Part 1
Method for determinaton of number of somatic cells using microscope

Дата введения 2012-07-01

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.

Предостережение. 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 применяют 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

Предостережение. 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

Издание официальное

Метиленовый синий	0,6 г
Ледяная уксусная кислота	6,0 мл

Примечание – Допускается заменять тетрахлорэтан таким же количеством ксилола.

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 двух месяцев 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	1 000 мл

4.2.2 Приготовление

Растворяют соли в деминерализованной воде. Доводят объем раствора водой до 1 000 мл и перемешивают.

Регулируют уровень pH на (7,2 ± 0,1).

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

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 500× – 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 1 000 000 клеток/мл фосфатно-буферным раствором (4.2), чтобы получить количество соматических клеток выше 500 000 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 500 000 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

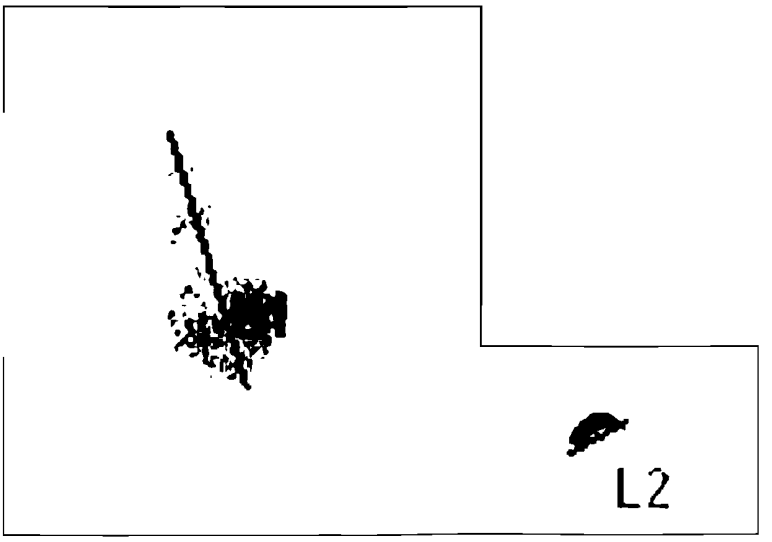
С помощью микроскопа (5.3) в полученном мазке (8.1.1 или 8.1.2) подсчитывают ядра клеток на полях, полностью покрытых мазком молока. Выбирают наиболее приемлемое увеличение (500× – 1 000×), чтобы получить в среднем не более 20 клеток в каждом поле.

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.



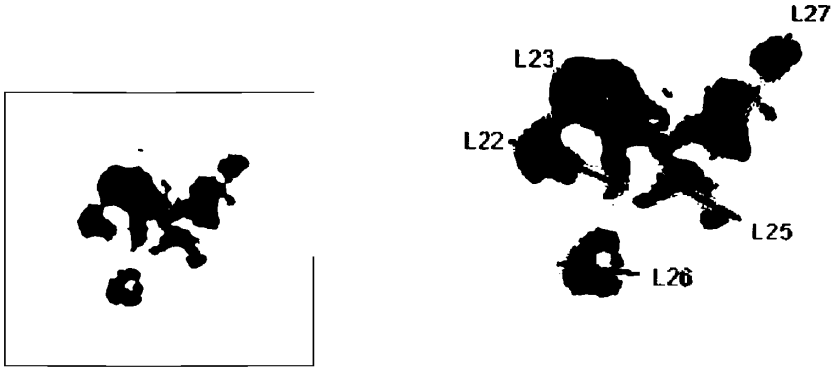
Макрофаг	Полиморфонуклеарные лейкоциты (PMN)	Лимфоцит	Эпителиальная клетка
8 – 30 мкм	**10 – 14 мкм**	**5 – 10 мкм**	**10 – 14 мкм**
Высокое соотношение цитоплазма/ядро. Фагоцитоз, представление антигена, секреция хемоаттрактантов	90 % – острый мастит, 60 % – хронический мастит. Низкое соотношение цитоплазма/ ядро. Фагоцитоз. Первая линия защиты от мастита	Низкое соотношение цитоплазма/ядро. Интенсивно окрашенное ядро Т-хелпера, Т-супрессора, В-клетки	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 1 000×)



(увеличение 500×) (увеличение 1 000×)

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 (× 1 000 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).

a) 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.

b) 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.

c) 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.

d) 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.

e) 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).

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

g) Если для проведения подсчета не достаточно полей (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.

h) 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).

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

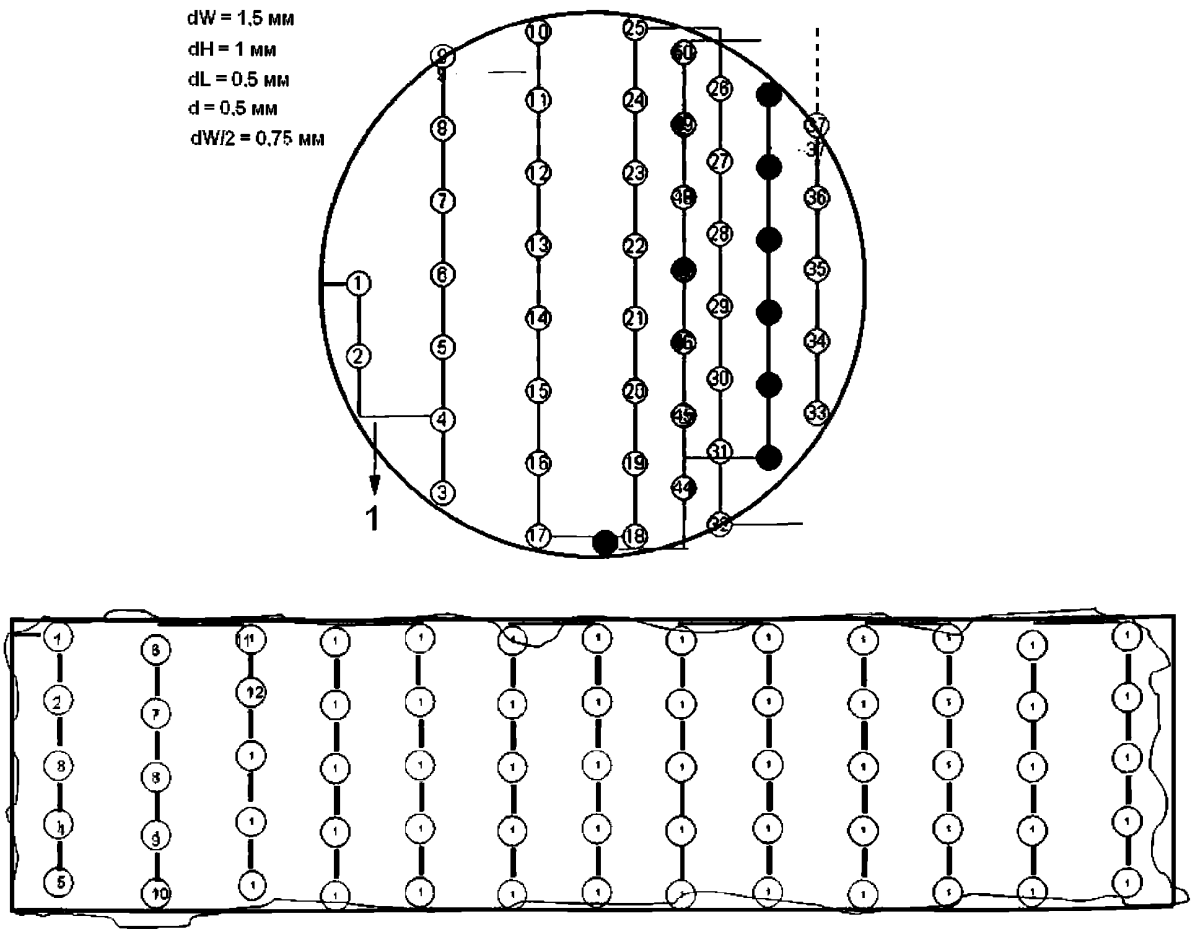
b) Начинают подсчет с верхней или нижней границы прямоугольной области. Помещают границу области в середину поля микроскопа. После подсчета всех клеток перемещают объектив в направлении противоположной границы и подсчитывают все клетки, которые появились в данной полосе, пока не будет достигнута противоположная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

c) 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 не достаточно полос (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

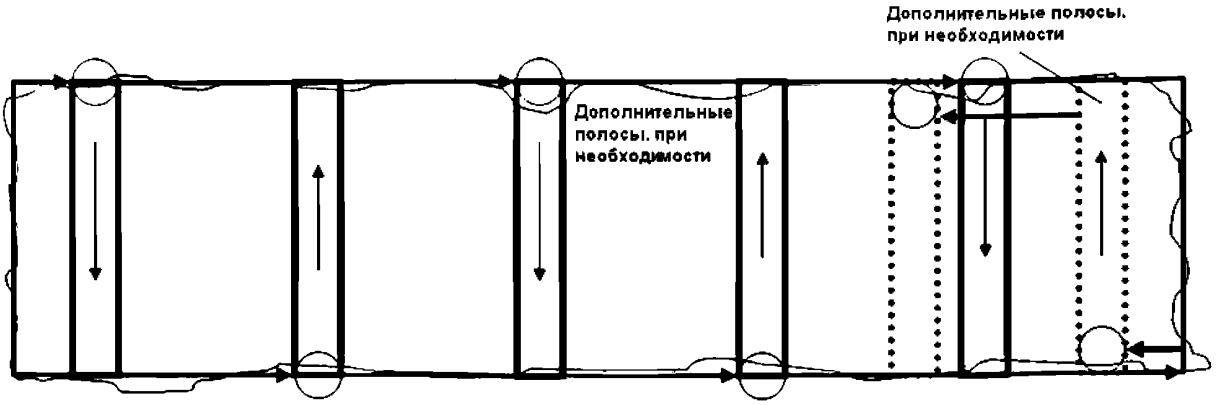


Рисунок 5 – Вертикальные полосы, расположенные на равном расстоянии друг от друга

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

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

или

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

с постоянным рабочим фактором f_w

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

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 коэффициентом 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 401 586 клеток/мл как 402 000 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 (×1 000 клеток/мл)	Стандартное отклонение сходимости s_r (×1 000 клеток/мл)	Предел сходимости r (×1 000 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 (×1 000 клеток/мл)	Стандартное отклонение воспроизводимости S_R (×1 000 клеток/мл)	Предел воспроизводимости R (×1 000 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 не обязательные, 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: 245 000 клеток/мл;
– уровень 2, пробы C и D: 455 000 клеток/мл;
– уровень 3, пробы E и F: 679 000 клеток/мл;
– уровень 4, пробы G и H: 791 000 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
Неучаствовавшие после устранения резко отклоняющихся значений	24	23	24	24
Среднее значение, ×1 000 клеток/мл	245	455	679	791
Стандартное отклонение сходимости s_r, ×1 000 клеток/мл	38	43	69	110
Коэффициент вариации стандартного отклонения сходимости, %	16	9	10	14
Предел сходимости r (2,8s_r), ×1 000 клеток/мл	107	121	192	308
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, ×1 000 клеток/мл	41	62	78	110
Коэффициент вариации стандартного отклонения воспроизводимости, %	17	14	11	14
Предел воспроизводимости R (2,8s_R), ×1 000 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 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] ISO 13366-2/ IDF 148-2:2006 — Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters
(Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 2. Руководство по работе флуорооптоэлектронных счетчиков)

[5] — Department of Health and Human Services. Public Health Services. Food and Drug Administration. Milk laboratory evaluation form. *Direct microscopic somatic cell count,* FDA/2400d, check list
(Министерство здравоохранения и социального обеспечения. Здравоохранение. Управление по контролю за продуктами и лекарствами. Образец лабораторной оценки молока. Прямой микроскопический подсчет соматических клеток, FDA/2400d, контрольный лист)

[6] — PACKARD, V.S. et al. 1992. Direct microscopic methods for bacterial or somatic cells. In Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. Washington, DC, pp. 309-325
(Прямые микроскопические методы для бактериальных или соматических клеток. В стандартных методах для исследования молочной продукции. Американская ассоциация общественного здравоохранения)

[7] — DULIN et al.1982, Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. J.Food Prot. 45, pp. 435-439
(Дифференциация и подсчет соматических клеток в козьем молоке)

[8] — QUERVEL, X. & TROSSAT, Ph. 2005, Study report – Enumeration of somatic cells in goat milk. Cecalait (France)
(Протокол исследования. Подсчет соматических клеток в козьем молоке)

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 14.02.2012. Подписано в печать 02.03.2012. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 2,20 Уч.- изд. л. 1,31 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru