МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 13366-1— 2014

МОЛОКО

Подсчет соматических клеток

Часть 1

Метод с применением микроскопа (контрольный метод)

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

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «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) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии международного стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45—2014)

За принятие 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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 сентября 2016 г. № 1207-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 13366-1—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 13366-1:2008/IDF 148-1:2008 «Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (контрольный метод)» («Milk — Enumeration of somatic cells — Part 1: Microscopic method (reference method)», IDT), включая техническую поправку к нему Cor.1:2009.

Международный стандарт ISO 13366-1:2008/IDF 148-1:2008 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).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

В тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 1
4.1 Растворы красителей 1
4.2 Фосфатно-буферный раствор (PBS) 3
5 Аппаратура 3
6 Отбор проб 3
7 Подготовка пробы к анализу 3
7.1 Хранение 3
7.2 Подготовка пробы 4
8 Проведение определения 4
8.1 Приготовление мазка и окрашивание 4
8.2 Определение 5
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 9
9.3 Подсчет в последовательных полях при использовании круглого контура 9
9.4 Выражение результатов 10
10 Прецизионность 10
10.1 Сходимость 10
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

МКС 67.100.10

Поправка к ГОСТ ISO 13366-1—2014 Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (контрольный метод)

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 7 2019 г.)

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

Подсчет соматических клеток

Часть 1

Метод с применением микроскопа (контрольный метод)

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

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения количества соматических клеток в сыром и химически консервированном молоке.

Метод применяется для подсчета соматических клеток в коровьем молоке, при условии, что обнаружены предпосылки их присутствия.

Стандарт допускается применять для подготовки стандартных проб при калибровке механизированных и автоматизированных способов 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): Клетки с ядрами, то есть все лейкоциты и эпителиальные клетки, определяемые в соответствии с методом, приведенным в настоящем стандарте.

3 Сущность метода

Анализируемую пробу молока распределяют тонким слоем на предметном стекле, получая мазок. Мазок подсушивают и окрашивают, затем под микроскопом подсчитывают количество окрашенных клеток. Для определения количества клеток в 1 $см^3$ пробы число клеток, подсчитанное на четко установленной площади, умножают на рабочий коэффициент.

4 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет других указаний, дистиллированную или деминерализованную воду или воду, эквивалентную по чистоте.

4.1 Растворы красителей

Предупреждение — Тетрахлорэтан — яд. Этидиум бромид — мутагенное вещество. В случае проливания необходимо немедленно принять меры по обезвреживанию. Приготовление и

применение красящих растворов необходимо проводить в вытяжном шкафу, используя средства индивидуальной защиты.

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

4.1.1.1 Состав

Этанол с объемной долей спирта 95 %, $см^3$	54,0
Тетрахлорэтан, $см^3$	40,0
Метиленовый синий, г	0,6
Ледяная уксусная кислота, $см^3$	6,0
Примечание — Допускается применять ксилол в том же объеме, какой указан для тетрахлорэтана.	

4.1.1.2 Приготовление

В колбе смешивают этанол и тетрахлорэтан, укупоривают пробкой. Смесь нагревают на водяной бане (см. 5.1) до температуры 65 °С. Добавляют метиленовый голубой в вытяжном шкафу и тщательно перемешивают. Раствор охлаждают в холодильнике до 4 °С.

Затем добавляют ледяную уксусную кислоту и вновь тщательно перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр (см. 5.2) в герметичную колбу на хранение.

Перед использованием окрашивающий раствор Newman-Lampert снова фильтруют.

4.1.2 Окрашивающий раствор бромида этидия

4.1.2.1 Основной окрашивающий раствор

4.1.2.1.1 Состав

Бромид этидия, г	0,25
Деминерализованная вода, $см^3$	100

4.1.2.1.2 Приготовление основного окрашивающего раствора

Бромид этидия растворяют в деминерализованной воде, предварительно нагретой до 40 °С. Охлаждают раствор до комнатной температуры. Доводят до 100 $см^3$ деминерализованной водой.

Основной окрашивающий 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, г	0,51
Гидроксид калия, г	0,162
Деминерализованная вода, $см^3$	100

4.1.2.2.2 Приготовление буферного раствора

Гидрофталат калия и гидроксид калия растворяют раздельно в деминерализованной воде.

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

4.1.2.3 Рабочий окрашивающий раствор бромида этидия

4.1.2.3.1 Компоненты

Красящий основной раствор бромида этидия (см. 4.1.2.1), $см^3$	2
Буферный раствор (см. 4.1.2.2), $см^3$	8
Triton X-100, $см^3$	0,1
Деминерализованная вода, $см^3$	90
Примечание — Высокая температура может привести к снижению окрашивающей способности бромистого этидия.	

4.1.2.3.2 Приготовление рабочего окрашивающего раствора бромида этидия

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

Свежий рабочий окрашивающий раствор бромида этидия готовят непосредственно перед использованием.

4.2 Фосфатно-буферный раствор (PBS)

4.2.1 Компоненты

NaCl, г	8
KCl, г	0,2
$Na_2HPO_4 \cdot 7H2O$, г	1,15
KH_2PO_4, г	0,2
Деминерализованная вода, $см^3$	1000

4.2.2 Приготовление фосфатного буферного раствора

Соли растворяют в деминерализованной воде. Доводят объем раствора до 1000 $см^3$ оставшимся количеством деминерализованной воды и перемешивают.

Регулируют уровень pH на (7,2 ± 0,1) ед. pH.

Примечание — Допускается использовать фосфатно-буферный раствор с уровнем pH = 7,2 ед. pH.

5 Аппаратура

Используют обычное лабораторное оборудование и, в частности, нижеприведенное.

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×. Допускается использовать масляно-иммерсионные объективы.

При использовании бромида этидия применяют люминесцентный микроскоп.

5.4 Микрошприц, для дозирования установленного объема молока 0,01 $см^3$, с предельно допускаемой погрешностью 2 %.

5.5 Микрометр

5.6 Предметные стекла, с предварительно нанесенными очерченными контурами (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 числа клеток при каждом подсчете.

5.6.2 Контуры

При использовании прямоугольного контура верхняя и нижняя внутренняя ширина, с одной стороны, и левая и правая внутренняя высота, с другой стороны, не должны отличаться 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

В лабораторию доставляют представительную пробу. Проба, представленная в лабораторию для анализа, 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 анализу

7.1 Хранение

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

Определение проводят в течение 6 ч после отбора проб.

В случае более длительного хранения проб их необходимо законсервировать, добавляя химические консерванты, например борную кислоту, бронопол или дихромат калия. Максимальная концен-

трация борной кислоты не должна превышать 0,6 г на 100 см^3 анализируемой пробы. Максимальная концентрация бронопола не должна превышать 0,05 г на 100 см^3 анализируемой пробы. Максимальная концентрация дихромата калия не должна превышать 0,1 г на 100 см^3 анализируемой пробы. Срок хранения консервированных проб при температуре (4 ± 2) °С — не более 6 дней.

Во избежание негативного влияния на экологическую обстановку рекомендуется ограничить использование дихромата калия в пробах, для которых предусмотрен только длительный срок хранения.

7.2 Подготовка пробы

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

Разводят анализируемые пробы с предполагаемым количеством соматических клеток выше 1 000 000 клеток/см^3 фосфатно-буферным раствором (см. 4.2), чтобы получить количество соматических клеток около 500000 клеток/см^3 в каждой разведенной анализируемой пробе.

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

где d — коэффициент разведения для получения в анализируемой пробе содержания соматических клеток около 500000 клеток/см^3;

V_s — объем анализируемой пробы, см^3;

V_b — объем буферного раствора, используемого для разведения анализируемой пробы, см^3.

Записывают надлежащий коэффициент разбавления, d, объем анализируемой пробы, V_s, и объем буферного раствора, V_b, используемые для получения требуемого разведения.

8 Проведение определения

Для каждой анализируемой пробы приготовляют как минимум два мазка (см. 8.1) и отбирают лучший из них (например, мазок, не поврежденный в процессе окрашивания). Погружают предметные стекла (см. 5.6) в этанол (95 % по объему). Стерилизуют пламенем 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 приведено в приложении В.

8.1.1 Приготовление мазка и окрашивание окрашивающим раствором Newman-Lampert

Микрошприцем (см. 5.4) отбирают 0,01 см^3 анализируемой пробы (разведенной соответствующим образом) (см. 7.2). Промывают микрошприц анализируемой пробой. При необходимости тщательно и аккуратно очищают внешнюю сторону микрошприца, которая контактировала с анализируемой пробой.

Пробу помещают на чистое предметное стекло площадью 1 см^2 (см. 5.6). Используя иглу, равномерно распределяют анализируемую пробу на всей указанной поверхности, при этом контролируют, чтобы площадь, прилегающая к внешним границам, была также равномерно покрыта. Мазок подсушивают при комнатной температуре до состояния полной сухости.

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

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

8.1.2 Окрашивание с использованием окрашивающего раствора этидиум бромида и приготовление мазка

Смешивают 1 см^3 подготовленной анализируемой пробы (см. 7.2) с 1 см^3 окрашивающего рабочего раствора бромида этидия (см. 4.1.2.3) в пробирке. Смесь хранят в защищенном от света месте. Нагревают пробирку на водяной бане (см. 5.1) при температуре 50 °С в течение 3 мин. Охлаждают до комнатной температуры.

При помощи микрошприца (см. 5.4) отбирают 0,01 см^3 смеси. Микрошприц промывают смесью. При необходимости тщательно и аккуратно очищают внешнюю сторону микрошприца, которая контактировала со смесью.

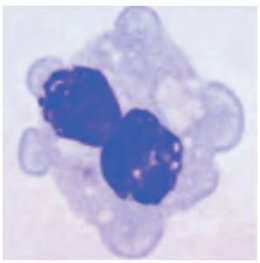
Помещают смесь на чистое предметное стекло площадью 1 см^2 (см. 5.6). При помощи иглы равномерно распределяют анализируемую пробу по всей указанной поверхности, при этом контролируют, чтобы площадь, прилегающая к внешним границам, была также равномерно покрыта. Мазок подсушивают при комнатной температуре до состояния полной сухости.

8.2 Определение

8.2.1 Оптимизация показаний микроскопа

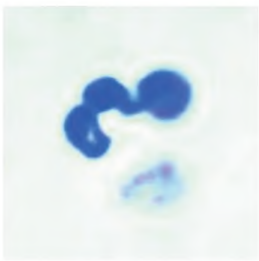
С помощью микроскопа (см. 5.3) в полученном мазке (см. 8.1.1 или 8.1.2) подсчитывают ядра клеток на полях, полностью покрытых мазком молока. Выбирают наилучшее увеличение (500×—1000×), чтобы получить в среднем не более 20 клеток в каждом поле.

Клетки содержат окрашенные ядра. Размер клеток — не менее 8 мкм. При подсчете не учитывают клетки менее 4 мкм (см. рисунок 1). Фрагменты клеток подсчитывают в окончательном результате, если видно более 50 % ядерного материала. Кластеры клеток подсчитывают как одну клетку, если ядра четко не разделены. См. также рисунки 2 и 3.



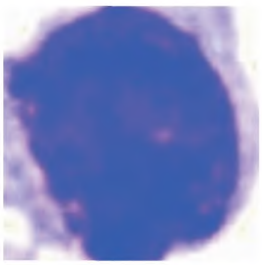
Макрофаг

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



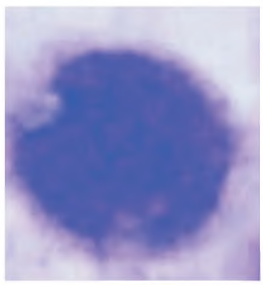
Полиморфонуклеарные лейкоциты (*PMN*)

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



Лимфоцит

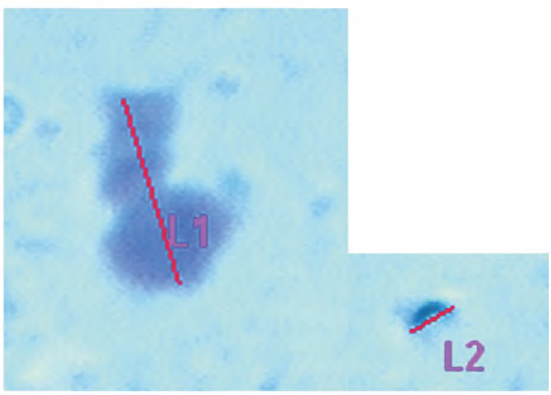
5 – 10 мкм
Низкое соотношение цитоплазма/ядро. Интенсивно окрашенное ядро Т-хелпера, Т-супрессора, В-клетки



Эпителиальная клетка

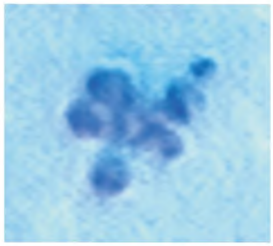
10 – 14 мкм
Ядро круглое. Цитоплазма слабо окрашена

Рисунок 1 — Примеры клеток

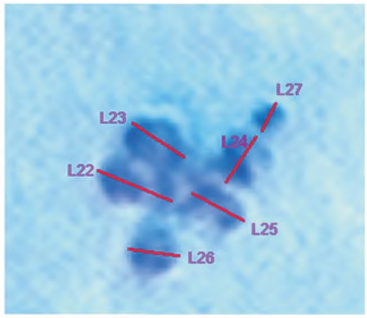


Длины клеток *L*1 = 9,79 мкм и *L*2 = 2,77 мкм

Рисунок 2 — Примеры клеток сборного коровьего молока (увеличение 1000×)



(увеличение 500×)



(увеличение 1000×)

Длина клетки: *L*22 = 9,08 мкм; *L*23 = 8,27 мкм; *L*24 = 4,95 мкм; *L*25 = 7,39 мкм; *L*26 = 6,37 мкм и *L*27 = 3,58 мкм

Рисунок 3 — Примеры клеток сборного коровьего молока

В примере кластера, приведенного на рисунке 3, следует подсчитать пять клеток. Клетка *L*27 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.

Клетки в молоке располагаются согласно распределению Пуассона (см. приложение С). Минимальное количество клеток (*N*), подсчитываемых с учетом требуемого уровня подсчета клеток, с целью достижения указанного коэффициента вариации, приведено в таблице 1.

Достоверность результатов обеспечивается подсчитыванием минимально указанного числа клеток. Поля и полосы, на которых проводят подсчет, выбирают таким образом, чтобы получить представительный подсчет для всего мазка.

Таблица 1 — Минимальное число клеток *N*

Концентрация клеток (×1000 клеток/см^3)	Коэффициент вариации *CV*, %	Число клеток *N*
< 150	10	100
150—250	7	200
250—400	6	300
≥ 400	5	400

8.2.2 Подсчет ядер в последовательных полях микроскопа

Подсчитывают ядра в последовательных полях, в вертикальных полосах в полях, расположенных на равном расстоянии друг от друга (см. рисунок 4 и таблицу 1).

a) Начинают подсчет приблизительно на расстоянии d_L от левой стороны. При использовании круглого контура подсчет начинают с соответствующего расстояния d_L от левой стороны горизонтального диаметра таким образом, чтобы обеспечить подсчет как минимум 5 полей от верхней части полосы. Для прямоугольного и круглого контура, как правило, используют расстояние d_L, равное 0,5 мм.

b) Помещают верхний или нижний край окружности поля тангенциально по отношению к внутренней верхней или нижней границе шаблона (шаблон не должен быть видимым в поле). В случае непокрытой плоскости рядом с границей шаблона регулируют поле в соответствии с границами мазка.

c) После подсчета первого поля объектив микроскопа передвигают на установленное 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) полосы. Далее выбирают один из следующих вариантов:

- вариант 1. Последнее поле не подлежит подсчету;

- 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 необходимого числа полей) и начинают подсчет на новом участке в противоположном направлении (вверх или вниз).

f) Операции b)—e) повторяют до достижения правой стороны шаблона.

g) Если для проведения подсчета полей недостаточно (см. таблицу 1), подсчитывают дополнительные поля. Для выполнения этой операции объектив микроскопа фокусируют на другие зоны (например, посредством изменения исходной позиции и/или адаптации расстояний при поэтапном передвижении) таким образом, чтобы получить надлежащее количество полей, которое является репрезентативным 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 в вертикальных полосах и 10 полос на расстоянии 2 мм, что позволяет производить подсчеты на 50 полях. Приблизительно такое же число полей получают при применении контура круглой формы при использовании тех же расстояний. Расстояния между сдвигами (пространства) измеряются от той же зоны полей с использованием прибора корректировки (выравнивание верхнего или нижнего края) таким образом, чтобы они включали в себя диаметр поля.

8.2.3 Подсчет в прямоугольном контуре по полосам

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

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

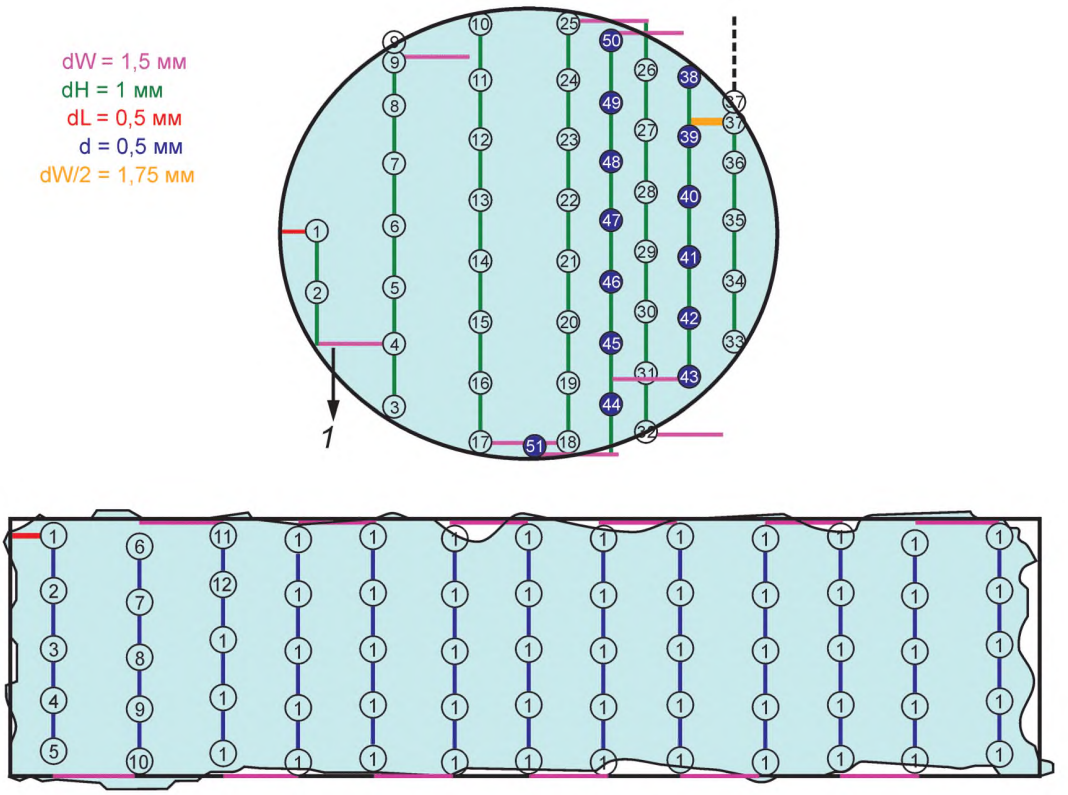
b) Начинают подсчет с верхней или нижней границы прямоугольной области. Помещают границу области в середину поля микроскопа. После подсчета всех клеток перемещают объектив в направлении противоположной границы и подсчитывают все клетки, видимые в этой полосе вплоть до достижения противоположной границы. Записывают число подсчитанных клеток.

c) Затем перемещают объектив вправо на расстояние d_W (например, d_W = 3—4 мм, в зависимости от необходимого числа полос для репрезентативного подсчета всего мазка) и начинают подсчет новой полосы.

Операции b) и c) повторяют до достижения правой стороны шаблона.

Если для проведения подсчета полос недостаточно (см. таблицу 1), подсчитывают дополнительные полосы. Для выполнения этой операции объектив микроскопа фокусируют на другие зоны (например, посредством изменения исходной позиции и/или адаптации d_W) таким образом, чтобы получить надлежащее количество полос, которое является репрезентативным для всего мазка.

Результат подсчитывают, как описано в 9.2.



1 — вниз до нижнего края

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

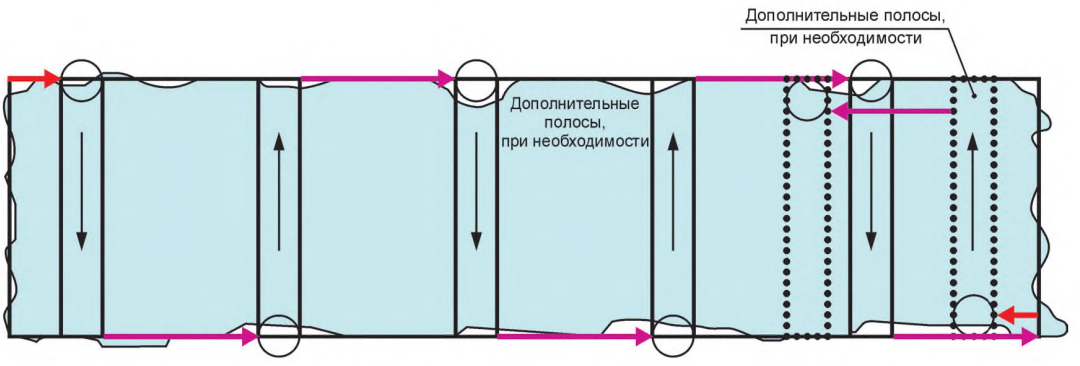


Рисунок 5 — Равноудаленные вертикальные полосы

9 Подсчет и выражение результатов

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

Проверяют контрольные значения 20,0 и 5,0 мм для длины L_s и ширины W_s мазка, используя градуировки и прибор корректировки 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 см^3;

W_s — ширина мазка, мм;

L_s — длина мазка, мм;

N_t — общее количество подсчитанных клеток, шт.;

D_f — диаметр поля микроскопа, мм;

N_f — количество полностью подсчитанных полей, шт.;

V_m — объем анализируемой пробы, распределенной на предметном стекле (см. 8.1.1 или 8.1.2), см^3 (если для окрашивания использовали модифицированный красящий раствор Newman-Lampert (см. 8.1.1), V_m = 0,01 см^3; если для окрашивания использовали красящий раствор бромида этидия (см. 8.1.2), V_m = 0,005 см^3);

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 контрольные значения 20,0 и 5,0 мм для длины и ширины мазка с использованием градуировок и прибора корректировки микроскопа.

Вычисляют общую концентрацию c клеток по формуле

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

или

$$c = f_w \left(\frac{N_t}{N_b} \cdot \frac{1}{d} \right),$$

с постоянным рабочим фактором f_w

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

где N_b — количество полностью подсчитанных полос.

Остальные обозначения приведены в 9.1.

9.3 Подсчет в последовательных полях при использовании круглого контура

Проверяют диаметр мазка, равный 11,28 мм, используя градуировки и прибор корректировки 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.

Остальные обозначения приведены в 9.1.

9.4 Выражение результатов

Результаты испытания выражают в целых числах, округленных до тысяч (например, 401586 клеток/см^3 выражают как 402000 клеток/см^3).

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/см^3)	Стандартное отклонение сходимости s_r (×1000 клеток/см^3)	Предел сходимости r (×1000 клеток/см^3)
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/см^3)	Стандартное отклонение воспроизводимости s_R (×1000 клеток/см^3)	Предел воспроизводимости R (×1000 клеток/см^3)
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

В октябре 2005 г. были проведены совместные международные исследования коровьего молока, в которых приняли участие восемнадцать лабораторий и тринадцать стран. Испытание включало 8 проб на четырех уровнях клеток/см^3 и включало 16 дублирующих проб без указания источника поступления.

Средние значения каждого уровня концентрации были следующими:

- уровень 1, пробы A и B: 245000 клеток/см^3;
- уровень 2, пробы C и D: 455000 клеток/см^3;
- уровень 3, пробы E и F: 679000 клеток/см^3;
- уровень 4, пробы G и H: 791000 клеток/см^3.

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 межлабораторных испытаний

Наименование показателя	Уровень			
	1	2	3	4
Не участвовавшие после устранения резко отклоняющихся значений	24	23	24	24
Среднее значение, ×1000 клеток/см^3	245	455	679	791
Стандартное отклонение сходимости s_r, ×1000 клеток/см^3	38	43	69	110
Коэффициент вариации стандартного отклонения сходимости, %	16	9	10	14
Предел сходимости r (2,8s_r), ×1000 клеток/см^3	107	121	192	308
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, ×1000 клеток/см^3	41	62	78	110
Коэффициент вариации стандартного отклонения воспроизводимости, %	17	14	11	14
Предел воспроизводимости R (2,8s_R), ×1000 клеток/см^3	114	174	218	308

Приложение В
(справочное)

Окрашивание козьего молока

В.1 Окрашивающие растворы для козьего молока [8]

В.1.1 Фиксатор Карнуа

В.1.1.1 Состав

Хлороформ	60 $см^3$
Уксусная кислота ледяная	20 $см^3$
100 %-ный этиловый спирт	120 $см^3$

В.1.1.2 Приготовление

Последовательно добавляют хлороформ и безводную уксусную кислоту в этанол и тщательно перемешивают.

В.1.2 Окрашивающий раствор пиронина-Y и метилового зеленого

В.1.2.1 Состав

Пиронин-Y	1,0 г
Метиловый зеленый	0,56 г
Деминерализованная вода	196 $см^3$

В.1.2.2 Приготовление

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

В.2 Приготовление мазка

Проводят окрашивание мазка на предметном стекле по следующей схеме:

1 Используют фиксатор Карнуа (см. В.1.1) в течение 5 мин.
2 Используют 50 %-ный этанол в течение 1 мин.
3 Используют 30 %-ный этанол в течение 1 мин.
4 Используют воду в течение 1 мин.
5 Используют окрашивающий раствор пиронина-Y и метилового зеленого в течение 6 мин.
6 Кратковременно промывают н-бутиловым спиртом и затем ксилолом.
7 Предметные стекла хранят в условиях защиты от пыли не более 12 мес.

Приложение С
(справочное)

Распределение Пуассона

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 характеристики 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 637.13:543.08:006.35 МКС 67.100.10 IDT

Ключевые слова: молоко, соматические клетки, метод определения

Редактор *Д.А. Мезинова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 29.09.2016. Подписано в печать 18.10.2016. Формат 60 ×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,90. Тираж 37 экз. Зак. 2561.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru