МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 23453— 2014

МОЛОКО СЫРОЕ

Методы определения соматических клеток

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом маслоделия и сыроделия Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 46-2014 от 05 декабря 2014 г.)

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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 08 декабря 2014 г. № 1950-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 23453—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01 января 2016 г.

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от08 декабря 2014 г. № 1950-ст отменен ГОСТ Р 54077—2010 с 01 января 2016 г.

Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 54077—2010

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

© Стандартинформ, 2015

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

Поправка к ГОСТ 23453—2014 Молоко сырое. Методы определения соматических клеток

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Подраздел 5.5. Таблица 1. Графа «Ориентировочное количество соматических клеток в 1 $см^3$ сырого молока»	От 500 тыс до 1 млн	От 500 тыс. до 1 млн
Подпункт 8.4.2.2. Девятый и десятый абзацы	Затем объектив передвигают вправо на расстояние d_w = 1,5 мм или d_w = 2 мм в зависимости от необходимого числа полей и начинают работать с новой полосой в противоположном направлении. Операции повторяют до достижения правой стороны шаблона.	Затем объектив передвигают вправо на расстояние d_w = 1,5 мм или d_w = 2 мм в зависимости от необходимого числа полей и начинают работать с новой полосой в противоположном направлении. Операции повторяют до достижения правой стороны шаблона.

(ИУС № 11 2015 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 СЫРОЕ

Методы определения соматических клеток

Milk. Methods for determination of somatic cells

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое молоко и устанавливает методы определения соматических клеток.

Стандарт не распространяется на термически обработанное, фальсифицированное химическими агентами (мочевина, перекись водорода, формалин и д.р.) и подмороженное молоко, а также на сырое молоко титруемой кислотностью более 21 °Т.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 61–75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ OIMLR 76-1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 745–2003 Фольга алюминиевая для упаковки. Технические условия

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4198–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234–77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5262–67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 11773–76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 14919–83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 23455–79 Препарат «Мастоприм». Технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26809.1–2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, отбор проб и подготовка их к анализу. Часть 1. Молоко, молочные и молочные составные, молокосодержащие продукты

ГОСТ 28498–90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29169–91 (ИСО 648–77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по [1], а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **соматические клетки**: Клетки, составляющие тело (сому) многоклеточных организмов и не принимающие участия в половом размножении (все клетки животного или растения за исключением половых клеток (гамет)).

3.2 **флуоресцентная микроскопия**: Метод получения увеличенного изображения с использованием люминесценции возбужденных атомов и молекул образца после его облучения светом с большей частотой. Излучение образца пропускается через фильтр, отсекающий свет на частоте возбуждения. Изображение флуоресцентного препарата в оптическом спектре фиксируется специальной цифровой камерой.

4 Отбор проб

4.1 Отбор проб и подготовка их к испытанию – по ГОСТ 26809.1.

5 Визуальный метод определения соматических клеток по изменению вязкости

5.1 Сущность метода

Метод основан на воздействии сульфанола (поверхностно-активного вещества, входящего в состав препарата «Мастоприм») на клеточную оболочку соматических клеток, приводящем к нарушению ее целостности и выходу содержимого клеток во внешнюю среду. При этом изменяется вязкость (консистенция) сырого молока, что оценивают визуально.

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и материалы

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIMLR 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,1 г.

Колбы мерные 1(2, 3, 4)–100–2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 2(3)–1–1 по ГОСТ 29169.

Пластинки молочно-контрольные ПМК-1 и ПМК-2.

Термометр стеклянный жидкостной (нертутный) по ГОСТ 28498 диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С и ценой деления шкалы 1 °С.

Стаканы 1(2)–50 по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные или пластмассовые с оплавленным концом диаметром не более 5 мм.

Плитка электрическая по ГОСТ 14919.

Секундомер механический или цифровой ценой деления 0,2 с.

Препарат «Мастоприм» по ГОСТ 23455.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода питьевая по нормативным и техническим документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

Допускается применение других средств измерения, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

5.3 Подготовка к анализу

5.3.1 Приготовление кипяченой питьевой воды

Питьевую воду кипятят в течение 5 – 10 мин, охлаждают до температуры 30 °С – 35 °С и используют для приготовления раствора препарата «Мастоприм».

5.3.2 Приготовление раствора препарата «Мастоприм»

2,5 г препарата вносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доливают до метки дистиллированной или кипяченой питьевой водой температурой 30 °С – 35 °С. Раствор должен быть прозрачным белого цвета. Допускается помутнение и образование незначительного осадка, который растворяется при нагреве до температуры 30 °С – 35 °С. Раствор перед применением перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре хранения 10 °С – 30 °С – не более 1 сут.

5.4 Проведение анализа

От тщательно перемешенной пробы анализируемого сырого молока пипеткой отбирают 1 $см^3$, помещают в луночку пластинки ПМК-1 и добавляют 1 $см^3$ раствора препарата «Мастоприм».

Сырое молоко с раствором препарата «Мастоприм» интенсивно перемешивают стеклянной или пластмассовой палочкой в течение 10 с. Не прекращая интенсивного перемешивания смеси в луночке, поднимают палочку вверх на 5 – 7 см и визуально оценивают изменение вязкости смеси. Наблюдение ведут не более 60 с.

5.5 Обработка результатов

Количество соматических клеток в анализируемом сыром молоке устанавливают визуально по изменению вязкости (консистенции) смеси сырого молока с препаратом «Мастоприм» в соответствии с требованиями таблицы 1.

Таблица 1

Характеристика вязкости (консистенции) смеси	Ориентировочное количество соматических клеток в 1 $см^3$ сырого молока
Однородная жидкость или слабый сгусток, который слегка тянется за палочкой	Не более 500 тыс*
От сгустка, тянущегося за палочкой в виде нити, до выраженного сгустка, при перемешивании которого хорошо видна выемка на дне луночки пластинки. Сгусток не выбрасывается палочкой из луночки пластинки	От 500 тыс до 1 млн
Плотный сгусток, который выбрасывается палочкой из луночки пластинки	Св. 1 млн
* Нижний предел точности визуального метода – 500 тыс. соматических клеток в 1 $см^3$ сырого молока, что соответствует международно признанной границе физиологической нормы и говорит об отсутствии или незначительной примеси (до 6 %) маститного молока в сборном. Для определения в сыром молоке меньшего количества соматических клеток и получения конкретных числовых значений необходимо применять инструментальные методы.	

6 Метод определения количества соматических клеток с применением вискозиметра

6.1 Сущность метода

Метод основан на воздействии сульфанола (поверхностно-активного вещества, входящего в состав препарата «Мастоприм») на клеточную оболочку соматических клеток, приводящем к нарушению ее целостности и выходу содержимого клеток во внешнюю среду. При этом изменяется вязкость (консистенция), что оценивают вискозиметром.

6.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и материалы

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIMLR 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,1 г.

Вискозиметр капиллярного типа, откалиброванный производителем прибора на определение количества соматических клеток в сыром молоке, с диаметром капилляра рабочего сосуда (1,50 ± 0,05) мм и длиной капилляра (1,00 ± 0,05) мм.

Колбы мерные 1(2, 3, 4)–100–2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 2(3)–1–5(10) по ГОСТ 29169.

Термометр стеклянный жидкостной (нертутный) по ГОСТ 28498 диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С и ценой деления шкалы 1 °С.

Секундомер электронный, тип СТЦ-2.

Стаканы 1(2)–50 по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные или пластмассовые с оплавленным концом диаметром не более 5 мм.

Плитка электрическая по ГОСТ 14919.

Препарат «Мастоприм» по ГОСТ 23455.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода питьевая по нормативным и техническим документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

Допускается применение других средств измерения, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6.3 Подготовка к анализу

6.3.1 Приготовление кипяченой питьевой воды

Питьевую воду кипятят в течение 5 – 10 мин, охлаждают до температуры 30 °С – 35 °С и используют для приготовления раствора препарата «Мастоприм».

6.3.2 Приготовление раствора препарата «Мастоприм»

3,5 г препарата вносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доливают до метки дистиллированной или кипяченой питьевой водой при температуре 30 °С – 35 °С. Раствор должен быть прозрачным белого цвета. Допускается помутнение и образование незначительного осадка, который растворяется при нагреве до температуры 30 °С – 35 °С. Раствор перед применением перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре хранения 10 °С – 30 °С – не более 1 сут.

6.3.3 Подготовка пробы сырого молока для анализа

Перед проведением анализа устанавливают температуру сырого молока в пределах от 18 °С до 22 °С.

6.4 Проведение анализа

5 $см^3$ раствора препарата «Мастоприм» и 10 $см^3$ анализируемого сырого молока отбирают пипетками и вносят в сосуд вискозиметра. Анализируемое сырое молоко перед отбором пробы необходимо тщательно перемешать и при необходимости очистить от механических примесей.

Смесь анализируемого сырого молока с раствором препарата «Мастоприм» в сосуде вискозиметра перемешивают в течение (30 ± 10) с в ручном или автоматическом режиме. По окончании перемешивания определяют количество соматических клеток в анализируемом сыром молоке по времени вытекания смеси из капилляра. Продолжительность вытекания определяется вязкостью смеси сырого молока с раствором препарата «Мастоприм», которая коррелирует с исходным содержанием в нем соматических клеток.

Диапазон определения количества соматических клеток при использовании капиллярных вискозиметров составляет от 90 до 1500 тыс в 1 $см^3$ сырого молока и продолжительность вытекания смеси из капилляра колеблется от 12 до 58 с, что указано в таблице 2.

Таблица 2

Продолжительность вытекания*, с	Количество соматических клеток, тыс/$см^3$
От 12,0 до 15,0	От 90 до 200
» 15,0 » 18,0	» 200 » 300
» 18,0 » 21,5	» 300 » 400
» 21,5 » 25,0	» 400 » 500
» 25,0 » 27,5	» 500 » 600
» 27,5 » 30,0	» 600 » 700
» 30,0 » 32,0	» 700 » 800
» 32,0 » 34,5	» 800 » 900
» 34,5 » 37,0	» 900 » 1000
» 37,0 » 40,5	» 1000 » 1100
» 40,5 » 44,0	» 1100 » 1200
» 44,0 » 48,5	» 1200 » 1300
От 48,5 до 53,0	От 1300 до 1400
» 53,0 » 58,0	» 1400 » 1500
* Продолжительность вытекания смеси из капилляра вискозиметра диаметром капилляра рабочего сосуда (1,50 ± 0,05) мм и длиной капилляра (1,00 ± 0,05) мм.	

После проведения анализа смеси для каждой анализируемой пробы сырого молока сосуд прибора следует подготовить для проведения следующего анализа согласно процедуре, описанной в инструкции по применению прибора.

6.5 Обработка результатов

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не должно превышать:

- 1 с для времени вытекания смеси от 12,0 до 18,0 с;
- 2 с » » » » от 18,1 до 25,0 с;
- 3 с » » » » от 25,1 до 31,0 с;
- 4 с » » » » от 31,1 до 37,0 с;
- 5 с » » » » от 37,1 до 46,0 с;
- 6 с » » » » от 46,1 до 58,0 с.

Предел допускаемой погрешности результатов измерений составляет 10 % в интервале доверительной вероятности $P = 0,95$.

7 Метод контроля соматических клеток флуоресцентной микроскопией с использованием анализатора соматических клеток DCC

7.1 Сущность метода

Метод основан на разрушении цитоплазматической мембраны соматических клеток под действием лизогенного буфера. При этом ядра клеток становятся доступными для действия флуоресцентного красителя, в качестве которого используется йодид пропидия. Йодид пропидия связывается с двухспиральной ДНК соматических клеток, и образует флуоресцентное вещество, поглощающее зеленый свет и излучающее красный, идентифицирующее клетки. Система дает изображение клеток, а встроенный в анализатор компьютер с помощью программного обеспечения подсчитывает количество белых точек, что соответствует количеству соматических клеток.

7.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и материалы

Анализатор клеток DCC, работающий на принципе флуоресцентной микроскопии, оснащенный приемным устройством для кассеты (съемная оправка), жидкокристаллическим дисплеем с подсветкой, в комплекте с кассетами (Nucleo-кассета), флаконами для проб.

Nucleo-кассета, откалиброванная по объему, состоящая из поршня, проточной системы с флуоресцентным красителем йодидом пропидия и измерительной камеры.

Проверочная кассета с определенным фиксированным количеством имитаторов соматических клеток.

Термометр стеклянный жидкостной (нертутный) по ГОСТ 28498, диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С и ценой деления шкалы 1 °С.

Флакон для проб.

Стаканы 1(2)–50 по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные или пластмассовые с оплавленным концом диаметром не более 5 мм.

Допускается применение других средств измерения, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения.

7.3 Подготовка к проведению измерений

Тестирование анализатора DCC и партии кассет проводят в соответствии с приложением А.

7.4 Проведение измерений

Аккуратно перемешивают пробу сырого молока во флаконе для проб или стеклянном стакане при помощи стеклянной палочки, не допуская вспенивания. Температура пробы молока должна быть в диапазоне от 10 °С до 40 °С.

Вскрывают пакет с Nucleo-кассетой и вынимают ее для проведения измерений. Nucleo-кассета не должна находиться на свету более 3 мин.

Набирают сырое молоко в Nucleo-кассету, опуская всасывающее устройство кассеты во флакон с пробой сырого молока и нажимая на поршень. Сырое молоко должно дойти до половины дорожки 3.

Помещают кассету в счетчик так, чтобы всасывающее устройство располагалось слева, после чего закрывают крышку отсека для кассеты.

Проводят измерение в режиме «Run».

Через 1 мин фиксируют результат, отображенный на дисплее прибора.

7.5 Обработка результатов измерений

Количество соматических клеток в анализируемом сыром молоке устанавливают по результатам, полученным на дисплее прибора, и выражают в тысячах клеток на 1 $см^3$.

7.6 Контроль точности результатов измерений

7.6.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Разница между двумя независимыми отдельными результатами определений, полученными с использованием одного и того же прибора применительно к идентичному анализируемому материалу в той же лаборатории, одним и тем же оператором с использованием одной и той же партии кассет в течение короткого периода времени зависит от уровня соматических клеток в молоке и при уровне доверительной вероятности $P = 0,95$ не должна превышать:

12 % при содержании до 100 тыс клеток/$см^3$;

8 % при содержании от 100 до 400 тыс клеток/$см^3$;

7 % при содержании более 400 тыс клеток/$см^3$.

7.6.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Разница между двумя независимыми отдельными результатами определений, полученными с использованием одного и того же метода применительно к идентичному анализируемому материалу в различных лабораториях, различными операторами с использованием различного оборудования, при уровне доверительной вероятности $P = 0,95$ не должна превышать 15 %.

8 Прямой метод определения соматических клеток путем микроскопирования

8.1 Сущность метода

Метод основан на высушивании распределенной на предметном стекле анализируемой пробы сырого молока с последующим окрашиванием мазка и подсчете с использованием микроскопа количества окрашенных соматических клеток на установленной площади.

8.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIMLR 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,2 мг.

Бани водяные с терморегулятором, позволяющим поддерживать температуру (40 ± 2) °С, (50 ± 2) °С, (65 ± 2) °С.

Микроскоп световой биологический с увеличение от 500^x до 1000^x. Допускается использовать масляно-иммерсионные объективы.

Термометр стеклянный жидкостной (нертутный) по ГОСТ 28498, диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С и ценой деления шкалы 1 °С.

pH-метры или иономеры, имеющие следующие технические и метрологические характеристики: диапазон измерений от 0 до 12 (14) ед. pH, ручную и/или автоматическую термокомпенсацию, пределы допускаемого значения основной (абсолютной) погрешности преобразователя не более ± 0,02 ед.pH.

Микрошприц типа МШ-10, для дозирования установленного объема молока 0,01 $см^3$, с максимальной погрешностью ± 2 %.

Стекла предметные, с предварительно нанесенным очерченными прямоугольными контурами, площадью от 95 до 105 $мм^2$ или стандартное предметное стекло размером 20 х 5 мм или стекла с шаблоном.

Стеклянные емкости с плотно притертыми крышками для хранения растворов красителя.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Фольга алюминиевая по ГОСТ 745.

Чашки Петри ЧБН–1–100 или ЧБН–2 по ГОСТ 25336.

Колба коническая Кн–2–250 ТС по ГОСТ 25336.

Пинцет.

Спиртовка СЛ–1 по ГОСТ 25336.

Цилиндры 1(2)–50(100)–1 по ГОСТ 1770.

Ксилол, массовой долей основного вещества не менее 99,5 %.

Метиленовый синий, индикатор.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5262 и спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, х.ч. или ледяная.

Хлорид натрия по ГОСТ 4233, х.ч. или ч.д.а.

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х.ч. или ч.д.а.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный 7-водный по ГОСТ 11773, ч.д.а.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х.ч. или ч.д.а.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деминерализованная.

Допускается применение других средств измерения, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

8.3 Подготовка к анализу

8.3.1 Приготовление окрашивающего раствора

В конической колбе вместимостью 250 см^3 смешивают 54,0 см^3 этанола объемной долей 95 % и 40,0 см^3 ксилола, колбу закрывают алюминиевой фольгой. Смесь нагревают на водяной бане до температуры (65 ± 1) °С. В вытяжном шкафу в смесь добавляют 0,6 г метиленового синего и тщательно перемешивают. Смесь охлаждают до температуры (4 ± 1) °С.

Затем добавляют 6,0 см^3 ледяной уксусной кислоты и вновь тщательно перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр и помещают в герметичный сосуд на хранение.

8.3.2 Приготовление фосфатного буферного раствора

В мерной колбе вместимостью 1000 см^3 в деминерализованной воде растворяют 8,0 г хлористого натрия, 0,2 г хлористого калия, 1,15 г двузамещенного фосфата натрия и 0,2 г однозамещенного фосфата калия. Доводят объем метки деминерализованной водой.

Устанавливают активную кислотность раствора на уровне (7,2±0,1) ед. pH.

Примечание – Допускается использовать готовый буферный раствор с активной кислотностью, равной 7,2 ед. pH.

8.3.3 Приготовление анализируемой пробы

До проведения определения анализируемые пробы сырого молока хранят при температуре (4 ± 2) °С. Определение проводят в течение 6 ч после отбора проб.

100 см^3 анализируемой пробы сырого молока нагревают на водяной бане до температуры 40 °С, постоянно перемешивая, охлаждают до температуры 20 °С.

Разбавляют анализируемую пробу фосфатно-буферным раствором до получения соматических клеток на уровне 500 тыс клеток/см^3.

Для каждой разбавленной пробы рассчитывают коэффициент разбавления по формуле

$$d = \frac{V_s}{V_s + V_b} \quad (1)$$

где d – коэффициент разбавления для получения надлежащего количества соматических клеток в анализируемой пробе, примерно 500 тыс клеток/см^3;

V_s – объем анализируемой пробы, см^3;

V_b – объем буферного раствора, используемого для разбавления анализируемой пробы, см^3.

Записывают коэффициент разбавления d, объем анализируемой пробы V_s и объем буферного раствора V_b, используемый для получения нужного разбавления.

8.4 Проведение анализа

Для каждой анализируемой пробы готовят не менее двух мазков и отбирают стандартный.

8.4.1 Приготовление мазка

Перед приготовлением мазка предметное стекло необходимо обезжирить и простерилизовать. Для этого предметное стекло погружают в 95 %-ный раствор этанола и стерилизуют пламенем, после чего охлаждают.

Используя микрошприц, отбирают 0,01 $см^3$ анализируемой пробы (при необходимости разбавленной). Микрошприц промывают анализируемой пробой. При необходимости тщательно и аккуратно очищают внешнюю сторону микрошприца, которая контактировала с анализируемой пробой.

Смесь помещают на чистое предметное стекло площадью 1 $см^2$. 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.

Высушенный на предметном стекле мазок погружают в окрашивающий раствор метилового синего и выдерживают в нем в течение 15 – 30 мин. Высушивают мазок при комнатной температуре.

Затем осторожно смывают излишки красителя в стакане с водопроводной водой. Высушивают вновь и хранят в условиях защиты от пыли.

Срок хранения предметных стекол с мазками – не более 12 мес.

8.4.2 Подсчет соматических клеток

8.4.2.1 Общие положения

Используя микроскоп, подсчитывают соматические клетки в полученном мазке по 8.4.1 в полях микроскопа, целиком заполненных мазком молока. Выбирают наилучшее увеличение (от 500^x до 1000^x).

Подсчету подлежат соматические клетки, к числу которых относятся: макрофаги (размер клеток 8 – 30 мкм), полиморфоядерные нейтрофилы (размер клеток 10 – 14 мкм), лимфоциты (размер клеток 5 – 10 мкм), лейкоциты (размер клеток 5 – 10 мкм) и эпителиальные клетки (размер клеток 10 – 14 мкм). Количество соматических клеток подсчитывается в целом, поэтому нет необходимости дифференцировать их между собой.

Примечания

1 Лаборант должен уметь отличать соматические клетки от бактериальных, а также клеток дрожжей, плесневых грибов и от жировых шариков.

2 Под микроскопом бактериальные клетки, не зависимо от формы, имеют значительно меньший размера, чем соматические. Их размер колеблется от 0,3 до 4 - 5 мкм.

3 Дрожжи имеют клетки круглой, овальной или продолговатой формы, часто почкующиеся, с выраженным ядром или без него, зерненные или нет, размером 2,5 – 10 × 2,5 – 30 мкм. Соматические клетки труднее всего дифференцировать от клеток дрожжей, однако, они в среднем более крупные и в препаратах имеют неровный и менее прокрашенный край.

4 Споры плесневых грибов размером с бактериальную клетку и имеют круглую, овальную или яйцевидную форму. Гифы (вегетативные тела) обычно крупные 5 – 50 мкм, однако имеют характерную палочковидную форму с перегородками или без них и хорошо отличаются от соматических клеток.

5 Жировые шарика имеют окрашенные контуры и слабую окраску внутри, крупных размеров и создают фон, на котором просматриваются соматические и бактериальные клетки.

Не следует подсчитывать клетки с размером менее 8 мкм. Фрагменты клеток подсчитывают как одну клетку, если ядра четко не разделены.

8.4.2.2 Подсчет в последовательных полях микроскопа

Подсчитывают соматические клетки в последовательных полях, в вертикальных полосах на равномерно размещенных полях.

Подсчет начинают приблизительно на расстоянии d_L = 0,5 мм от левой стороны.

Помещают нижний (верхний) край окружности поля микроскопа к внутренней нижней (верхней) границе мазка.

После подсчета первого поля объектив передвигают на установленное расстояние $d_н$ вверх или вниз до следующей градации и подсчитывают новое поле. Расстояние $d_н$ = 1 мм считается пригодным.

Так повторяют вплоть до достижения противоположной стороны полосы.

Выбирают один из двух приведенных вариантов:

- последнее поле не подлежит подсчету;

- подсчет проводится после передвижения объектива до полного исчезновения границы мазка с поля, если появляется верхняя или нижняя граница мазка и она заполняет менее половины поверхности поля.

Затем объектив передвигают вправо на расстояние d_w = 1,5 мм или d_w = 2 мм в зависимости от необходимого числа полей и начинают работать с новой полосой в противоположном направлении.

Операции повторяют до достижения правой стороны шаблона.

Результат определяют в соответствии с формулой (2).

Примечание – В случае прямоугольной формы возможно расположение 5 полей на 1 мм в вертикальных полосах и 10 полос, расположенных на расстоянии 2 мм, что позволяет подсчитать 50 полей.

8.4.2.3 Подсчет в прямоугольной форме по полосам

Соматические клетки подсчитывают в расположенных с равными интервалами вертикальных полосах.

Подсчет начинают приблизительно на расстоянии d_L от левой стороны. Расстояние d_L = 0,5 мм считается пригодным.

Начинают подсчитывать от верхней или нижней границы прямоугольной площади. Помещают границу поверхности в центр зрения микроскопа. После подсчета всех клеток объектив передвигают в направлении, противоположном границе, и подсчитывают все клетки, видимые в этой полосе, вплоть до достижения противоположной границы. Записывают число подсчитанных клеток.

Затем объектив передвигают вправо на расстояние d_w и начинают подсчет новой полосы (например, d_w = 3 - 4 мм в зависимости от необходимого числа полей для репрезентативного подсчета всего мазка).

Операции повторяют до достижения правой стороны шаблона.

Результат подсчитывают, как указано в 8.5.

8.5 Обработка результатов

8.5.1 Подсчет для прямоугольной формы в последовательных полях

Проверяют контрольные значения 20,0 и 5,0 мм для длины L_s и ширины W_s мазка с использованием градуировки и прибора корректировки микроскопа.

Рассчитывают общую концентрацию клеток, используя следующее уравнение

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

или

$$c = fw \cdot \left[\frac{N_t}{N_f} \cdot \frac{1}{d} \right], \quad (3)$$

с постоянным рабочим коэффициентом f_w

$$fw = \frac{W_s \cdot L_s}{\pi \cdot \left(\frac{D_f}{2} \right)^2 \cdot V_m}, \quad (4)$$

где c – общая концентрация, выраженная в количестве клеток на 1 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 испытуемой пробы мазка, равный 0,01 см^3

d – коэффициент разбавления, используемый в 6.3.3.

8.5.2 Подсчет для прямоугольной формы в полосах

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

Рассчитывают общую концентрацию с клеток, используя следующее уравнение

$$c = \frac{W_s \cdot N_t}{D_f \cdot N_b \cdot V_m} \cdot \frac{1}{d}, \quad (5)$$

или

$$c = f_w \cdot \left\lfloor \frac{N_t}{N_b} \cdot \frac{1}{d} \right\rfloor, \quad (6)$$

с постоянным рабочим коэффициентом f_w

$$f_w = \frac{W_s}{D_f \cdot V_m}, \quad (7)$$

где N_b – количество полностью подсчитанных полос.

Остальные обозначения приведены в 8.5.1

8.5.3 Выражение результатов

Результаты испытаний округляют до тысячи клеток (например 401586 клеток/см^3 выражают как 402000 клеток/см^3).

8.6 Прецизионность

Точность настоящего метода установлена с учетом требований нормативных документов, действующих на территории государств, принявшихстандарт*.

Значения, полученные для повторяемости и воспроизводимости, выражены при уровне вероятности P = 95 %.

8.6.1 Повторяемость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами определений, полученными с использованием одного и того же метода применительно к идентичному анализируемому материалу в той же лаборатории, одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение короткого периода времени, должна не более чем в 5 % случаев превышать значения, приведенные в таблице 3.

Таблица 3 – Значения повторяемости

Концентрация, тыс клеток в 1 см^3	Среднее квадратичное отклонение повторяемости, s_r, тыс клеток в 1 см^3	Предел повторяемости, r, тыс клеток в 1 см^3
245	38	107
455	43	121
679	69	192
791	110	308

8.6.2 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами определений, полученными с использованием одного и того же метода применительно к идентичному анализируемому материалу в различных лабораториях, различными операторами с использованием различного оборудования, должна не более чем в 5 % случаев превышать значения, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Значения воспроизводимости

Концентрация, тыс клеток в 1 см^3	Среднее квадратичное отклонение воспроизводимости, S_R, тыс клеток в 1 см^3	Предел воспроизводимости, R, тыс клеток в 1 см^3
245	41	114
455	62	174
679	78	218
791	110	308

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

Приложение А
(обязательное)

Тестирование анализатора DCC и партии кассет

А.1 Тестирование анализатора DCC

Тестирование проводят с использованием проверочной кассеты, в которой находится определенное количество имитаторов соматических клеток. Для выполнения тестирования необходимо войти в сервисное меню анализатора DCC, поместить проверочную кассету в анализатор, провести измерение путем последовательного нажатия кнопок 

и записать результат (измерение 1). Аналогично выполняют повторное измерение проверочной кассеты (измерение 2), находят среднеарифметическое между двумя измерениями и сравниваютс допустимыми предельными величинами, которые составляют ± 10 % от указанного на кассете количества имитаторов соматических клеток.

Пример – В тестовой кассете содержится имитаторов соматических клеток 593. При получении среднеарифметического по результатам двух измерений в пределах от 534 (минус 10 %) до 652 (плюс 10 %) делается вывод о пригодности прибора для работы. В противном случае анализатор подлежит тестированию в сервисном центре.

А.2 Тестирование партии кассет

А.2.1 Для выполнения тестирования партии кассет требуется 5 кассет из проверяемой партии и одну пробу молока с содержанием соматических клеток от 200 до 600 тыс клеток/см^3.

А.2.2. Проводят измерения с кассетой №1.

Аккуратно перемешивают пробу молока во флаконе для проб, не допуская вспенивания. Температура пробы молока должна быть в диапазоне от 10 °С до 40 °С.

Набирают молоко в кассету, опуская всасывающее устройство кассеты во флакон с пробой молока и нажимая на поршень. Молоко должно дойти до половины дорожки 3.

Помещают кассету в анализатор так, чтобы всасывающее устройство располагалось слева, после чего крышку отсека закрываем.

Проводят измерение, нажимая кнопку «Run», записывают результат.

А.2.3 Через 1 мин проводят измерение той же кассеты путем нажатия кнопок 

и также записывают результат.

А.2.4 Аналогичные измерения проводят с кассетами № 2 – 5.

А.2.5 Находят среднеарифметическое измерений пробы молока в режиме «Run» с использованием пяти кассет и устанавливают предельные величины, которые составляют ± 10 % от среднеарифметического.

Затем рассчитывают среднеарифметическое измерений, выполненных через 1 мин путем последовательного нажатия кнопок «Del», «3», «⇧». Данное значение должно укладываться в допустимые 10-ти процентные пределы разброса данных, полученных в режиме «Run».

Таблица А.1 – Пример тестирования кассет

Номер кассеты	Значения измерений в режиме «Run»	Значения измерений в режиме «Del», «3», «⇧»
Кассета 1	592	582
Кассета 2	575	574
Кассета 3	552	532
Кассета 4	521	520
Кассета 5	521	511
	Среднеарифметическое 554	Среднеарифметическое 545
	Предел измерения от 499 до 609	Полученное значение 545 находится внутри установленных пределов

Если среднеарифметическое результатов измерений не укладывается в установленные пределы, то данная партия кассет бракуется.

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», принятый Решением Совета Евразийской Экономической комиссии № 67 от 09 октября 2013 г.

УДК 576.8:006.354 ОКС 67.100.10 Н19

Ключевые слова: сырое молоко, методы микробиологического анализа, соматические клетки, клеточная оболочка, визуальная оценка, вискозиметр, флуоресцентная микроскопия, микроскопирование

Подписано в печать 20.03.2015. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 31 экз. Зак. 1202

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru