ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 13366-1— 2010

МОЛОКО ПОДСЧЕТ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Часть 1

Метод с применением микроскопа (Контрольный метод)

ISO 13366-1:2008
Milk — Enumeration of somatic cells —
Part 1: Microscopic method (Reference method)
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе собственного аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2010 г. № 686-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 13366-1:2008 «Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (Контрольный метод)» [ISO 13366-1:2008 «Milk — Enumeration of somatic cells — Part 1: Microscopic method (Reference method)»].

В настоящем стандарте исключен пункт «Протокол испытания» в связи с различиями форм записи результатов испытаний в различных лабораториях

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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, 2011

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
5 Аппаратура и материалы . . . 3
6 Отбор проб . . . 3
7 Приготовление анализируемой пробы . . . 3
8 Проведение определения . . . 4
9 Обработка результатов . . . 8
10 Прецизионность . . . 10
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний . . . 11
Приложение В (справочное) Окрашивание козьего молока . . . 12
Приложение С (справочное) Распределение Пуассона . . . 13
Библиография . . . 14

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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 — 2012 — 01 — 01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод подсчета соматических клеток с применением микроскопа в сыром и химически консервированном молоке.

Стандарт *допускается применять* для подготовки стандартных проб при калибровке механизированных и автоматизированных способов подсчета клеток.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Использование настоящего стандарта может быть сопряжено с применением опасных материалов, операций и оборудования. Настоящий стандарт не имеет целью решение всех вопросов безопасности, обусловленных его применением. На пользователя настоящего стандарта возлагается вся ответственность по установлению надлежащих правил безопасности и охраны здоровья и определения применимости регулятивных ограничений, разработанных до использования.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 **соматические клетки (somatic cells):** Клетки с ядрами, то есть все лейкоциты и эпителиальные клетки, определяемые в соответствии с процедурой, приведенной в настоящем стандарте.

3 *Сущность метода*

Анализируемую пробу молока распределяют на предметном стекле и получают мазок, который высушивают. После высушивания мазок окрашивают. Далее окрашенные клетки подсчитывают с использованием микроскопа. Количество подсчитанных клеток на четко установленной площади умножают на рабочий коэффициент с целью определения количества клеток на миллилитр.

4 Реактивы

Используют только реактивы признанной аналитической чистоты, если нет других указаний, и дистиллированную или деминерализованную воду или воду аналогичной чистоты.

4.1 Растворы красителей

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Тетрахлорэтан является ядовитым веществом. Бромистый этидий является мутагенным веществом. В случае проливания следует предпринять надлежащие действия по обезвреживанию. Подготовка и применение растворов красителей должны осуществляться под вытяжным шкафом с использованием защитного оборудования.

Издание официальное

4.1.1 Модифицированный окрашивающий раствор

4.1.1.1 Состав

Этанол, 95 % (по объему), $см^3$	54,0
Тетрахлорэтан[a], $см^3$	40,0
Метиленовый синий, г	0,6
Кислота уксусная, безводная, $см^3$	6,0

[a] Допускается применять ксилол в том же объеме, какой указан для тетрахлорэтана.

4.1.1.2 Приготовление модифицированного окрашивающего раствора

Смешивают этанол и тетрахлорэтан и закрывают сосуд. Смесь нагревают на водяной бане (5.1) при температуре 65 °С. Добавляют метиленовый синий под вытяжным шкафом и тщательно перемешивают. Смесь охлаждают до температуры 4 °С.

Затем добавляют безводную уксусную кислоту и вновь тщательно перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр (5.2) и помещают в герметичный сосуд на хранение.

Перед использованием окрашивающий раствор снова фильтруют.

4.1.2 Окрашивающий раствор бромистого этидия

4.1.2.1 Основной окрашивающий раствор

4.1.2.1.1 Состав

Бромистый этидий, г	0,25
Деминерализованная вода, $см^3$	100

4.1.2.1.2 Приготовление основного окрашивающего раствора

Бромистый этидий растворяют в деминерализованной воде, предварительно нагретой до 40 °С. Раствор охлаждают до комнатной температуры. Доводят объем до 100 $см^3$ деминерализованной водой.

Основной окрашивающий раствор бромистого этидия хранят в темном месте при температуре (2 ± 2) °С не более 2 мес.

4.1.2.2 Буферный раствор

4.1.2.2.1 Состав

Калия гидрофталат, г	0,51
Калия гидроксид, г	0,162
Вода деминерализованная, $см^3$	100

4.1.2.2.2 Приготовление буферного раствора

Растворяют по отдельности калия гидрофталат и калия гидроксид 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 бромистого этидия

4.1.2.3.1 Компоненты

Основной окрашивающий раствор бромистого этидия[a] (4.1.2.1), $см^3$	2
Буферный раствор (4.1.2.2), $см^3$	8
Тритон X-100, $см^3$	0,1
Вода деминерализованная, $см^3$	90

[a] Высокая температура может привести к снижению окрашивающей способности бромистого этидия.

4.1.2.3.2 Приготовление рабочего окрашивающего раствора бромистого этидия

Последовательно добавляют основной окрашивающий раствор бромистого этидия, буферный раствор и Тритон X-100 к деминерализованной воде и тщательно перемешивают.

Свежий рабочий окрашивающий раствор бромистого этидия готовят непосредственно перед использованием.

4.2 Фосфатный буферный раствор (PBS)

4.2.1 Компоненты

NaCl, г	8
KCl, г	0,2
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, г	1,15
KH_2PO_4, г	0,2
Вода деминерализованная, $см^3$	1 000

4.2.2 Приготовление фосфатного буферного раствора (PBS)

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

Устанавливают pH на уровне 7,2 ± 0,1.

Примечание — Допускается использовать готовый фосфатный буферный раствор с pH = 7,2.

5 *Аппаратура и материалы*

Используют обычное лабораторное оборудование и, в частности, нижеприведенное.

5.1 Бани водяные, работающие при температуре (40 ± 2) °С, (50 ± 2) °С и (65 ± 2) °С.

5.2 Фильтр, устойчивый к используемым растворителям, с диаметром пор 10—12 мкм.

5.3 Микроскоп, имеющий увеличение 500× — 1000×. Допускается использовать масляно-иммерсионные объективы.

При использовании бромистого этидия микроскоп должен иметь флуоресцентное оборудование.

5.4 Микрошприц, для дозирования установленного объема молока 0,01 $см^3$, с максимальным допуском 2 %.

5.5 Микрометр

5.6 Стекла предметные, с предварительно нанесенными очерченными контурами (прямоугольным или круговым), площадью 1 $см^2$ ± 5 % (95 — 105 $мм^2$), или стандартное предметное стекло 20 × 5 мм или имеющее диаметр 11,28 мм.

5.6.1 Формы предметных стекол

При использовании предметного стекла прямоугольной формы 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 предметных стекол круглой формы вертикальный и горизонтальный внутренние диаметры не должны отличаться более чем на 0,2 мм.

6 Отбор проб

В лабораторию доставляют представительную пробу. Проба не должна быть повреждена или модифицирована при транспортировании или хранении.

Отбор проб не является частью метода, устанавливаемого в настоящем стандарте.

Отбор проб — по [1].

7 Приготовление *анализируемой* пробы

7.1 Хранение

До проведения определения или химического консервирования анализируемые пробы хранят при температуре (4 ± 2) °С.

Определение проводят в течение 6 ч после отбора проб.

В случае более длительного хранения в пробы добавляют химические консерванты, такие как борная кислота, бронопол или дихромат калия. Массовая концентрация борной кислоты в анализируемой пробе не должна превышать 0,6 г на 100 см^3. Массовая концентрация бронопола в анализируемой пробе не должна превышать 0,05 г на 100 см^3. Массовая концентрация дихромата калия в анализируемой пробе не должна превышать 0,1 г на 100 см^3.

Консервированные пробы хранят при температуре (4 ± 2) °С не более 6 дней.

Рекомендуется ограничить использование дихромата калия в случае проб, для которых предусмотрен только длительный срок хранения.

7.2 Приготовление пробы

Анализируемую пробу молока нагревают (см. 7.1) на водяной бане (5.1) при температуре 40 °С, постоянно перемешивая. Охлаждают пробу до температуры 20 °С.

Разбавляют анализируемую пробу фосфатно-буферным раствором (4.2) до получения около 500 000 соматических клеток/см^3 для каждой разбавленной анализируемой пробы.

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

где d — коэффициент разбавления для получения надлежащего количества соматических клеток в анализируемой пробе, примерно 500 000 клеток/см^3;

V_s — объем, см^3, анализируемой пробы;

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

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

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 (5.6) в этанол (95 % по объему). Стерилизуют пламенем и охлаждают.

8.1 Приготовление мазка и окрашивания

Для приготовления мазка и окрашивания следуют рекомендациям, приведенным в 8.1.1 или 8.1.2.

Примечание — Окрашивание в случае козьего молока описано в приложении В.

8.1.1 Приготовление мазка и окрашивания с использованием окрашивающего раствора

Используя микрошприц (5.4), отбирают 0,01 см^3 анализируемой пробы (при необходимости разбавленной) (см. 7.2). Микрошприц промывают анализируемой пробой. При необходимости тщательно и аккуратно очищают внешнюю сторону микрошприца, которая контактировала с анализируемой пробой.

Помещают смесь на чистое предметное стекло площадью 1 см^2 (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.

Высушенный на предметном стекле мазок погружают в модифицированный окрашивающий раствор (4.1.1) в течение не менее 15 мин. Высушивают мазок при комнатной температуре.

Затем осторожно вносят мазок под водопроводную воду до полного смыва всех излишков красителя. Высушивают вновь и хранят в условиях защиты от пыли.

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

8.1.2 Окрашивание с использованием окрашивающего раствора бромистого этидия и приготовление мазка

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

Используя микрошприц (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 (5.6). Используя иглу, равномерно распределяют смесь на всей указанной поверхности, при этом контролируют, чтобы площадь, прилегаю-

щая к внешним границам, была также равномерно покрыта. Мазок подсушивают при комнатной температуре до состояния полной сухости.

8.2 Определение

8.2.1 Оптимизация считывания

Используя микроскоп (5.3), подсчитывают ядра клеток в полученном мазке (8.1.1 или 8.1.2) в полях микроскопа, целиком заполненных только мазком молока. Выбирают наилучшее увеличение (от 500× до 1000×), чтобы в каждом поле максимальное количество клеток в среднем было 20.

Клетки имеют окрашенное ядро. Размер клетки — не менее 8 мкм. Не следует подсчитывать клетки с размером не более 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. рисунки 2 и 3.

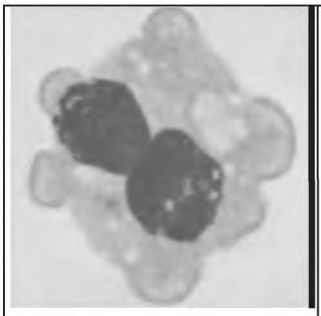
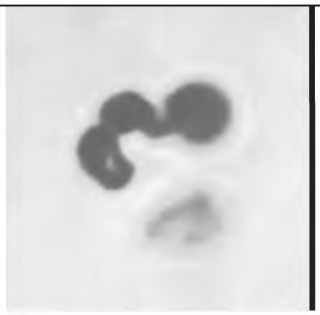
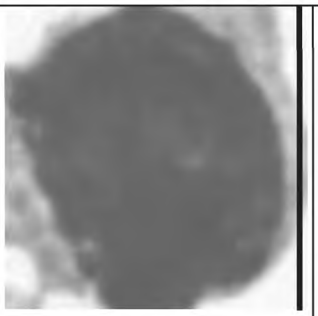
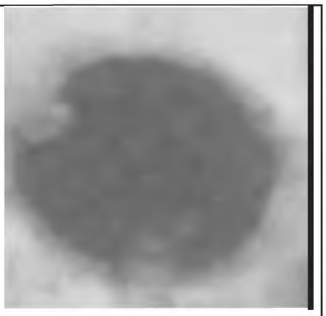
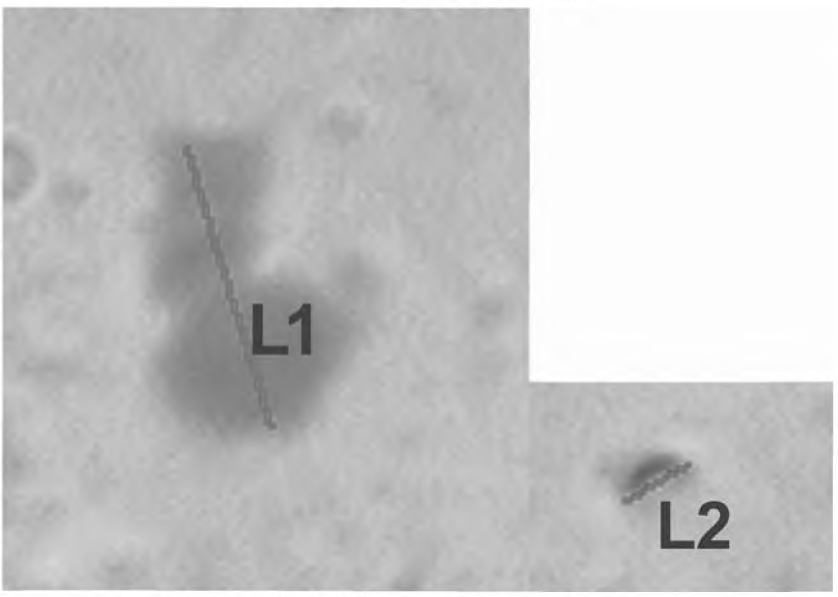
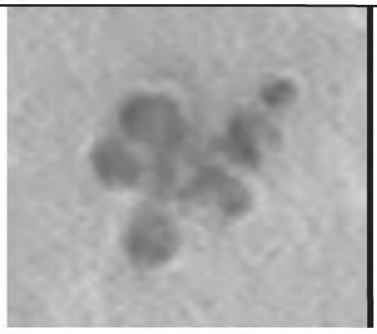
			
Макрофаг **8—30 мкм** Связь между цитоплазмой и ядром прочная. Фагоцитоз, презентация антигена, секреция хемоаттрактантов.	Полиморфоядерный нейтрофил **10—14 мкм** 90 % в случае острого мастита 60 % в случае хронического Связь между цитоплазмой и ядром незначительная. Фагоцитоз. Первая линия защиты от мастита.	Лимфоцит **5—10 мкм** Связь между цитоплазмой и ядром незначительная. Т-клетка-хелпер, Т-клетка-супрессор, В-клетка с интенсивно окрашенным ядром.	Эпителиальная клетка **10—14 мкм** Круглое ядро. Цитоплазма окрашена слабо.

Рисунок 1 — Примеры клеток

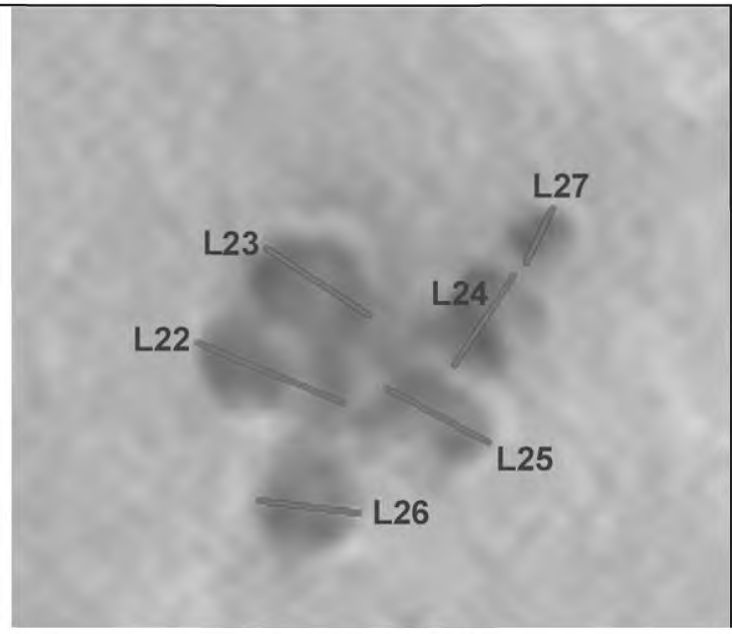


Длина клетки: *L*1 = 9,79 мкм и *L*2 = 2,77 мкм

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 (увеличение 500× и 1000×)

На примере кластера, представленного на рисунке 3, следует подсчитать 5 клеток. *L*27 опущен из-за своего диаметра, который имеет размеры не более 4 мкм.

Примечание — Подготовка и профессиональное мастерство аналитика являются основными решающими факторами успешного использования метода. Частое использование данного метода и участие в межлабораторных испытаниях играют существенную роль в плане обеспечения надлежащего уровня подсчета.

Клетки в молоке распределяются по закону 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.

Для правильного выполнения метода важно, чтобы указанное минимальное количество клеток было подсчитано. Подсчитываемые поля и полосы выбирают таким образом, чтобы получить представительный подсчет для всего мазка.

Таблица 1 — Минимальное количество клеток (*N*)

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

8.2.2 Подсчет в последовательных полях микроскопа

Подсчитывают ядра в последовательных полях, в вертикальных полосах на равномерно размещенных полях (см. рисунок 4 и таблицу 1).

а) Начинают приблизительно на расстоянии d_L от левой стороны. В случае круглой формы начинают на достаточном расстоянии d_L от левой стороны горизонтального диаметра таким образом, чтобы обеспечить подсчет минимум 5 полей от верхней части полосы. Расстояние d_L 0,5 мм подходит для прямоугольной и круглой формы.

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 наличия непокрытой поверхности вблизи границы шаблона корректируют поле по границе мазка.

c) После подсчета первого поля объектив передвигают на установленное расстояние d_H вниз или вверх, до следующей градации в направлении нижнего или верхнего края и подсчитывают новое поле. Расстояние d_H = 1 мм считается пригодным.

d) С последнего подсчитанного поля повторяют операцию c), вплоть до достижения противоположной стороны (верхней или нижней) полосы. Выбирают один из двух приведенных вариантов.

- Вариант 1: последнее поле не подлежит подсчету.

- Вариант 2: если появляется верхняя или нижняя граница и она заполняет менее половины поверхности поля, подсчет производится после передвижения объектива до полного исчезновения границы с поля, которое в этом случае только покрывает мазок.

e) Затем объектив передвигают вправо на расстояние d_W (например, 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 (вверх или вниз).

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

g) В случае недостаточного количества подсчитываемых полей (см. таблицу 1) можно подсчитать 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) Результат рассчитывают в соответствии с указаниями 9.1 для прямоугольной формы или 9.3 для круглой формы.

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. Приблизительно такое же количество полей получается при круглой форме 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 прямоугольной форме по полосам

Ядра подсчитывают в расположенных с равными интервалами вертикальных полосах (см. рисунок 5 и таблицу 1):

a) Начинают приблизительно на расстоянии d_L от левой стороны. Расстояние d_L 0,5 мм считается пригодным.

b) 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.

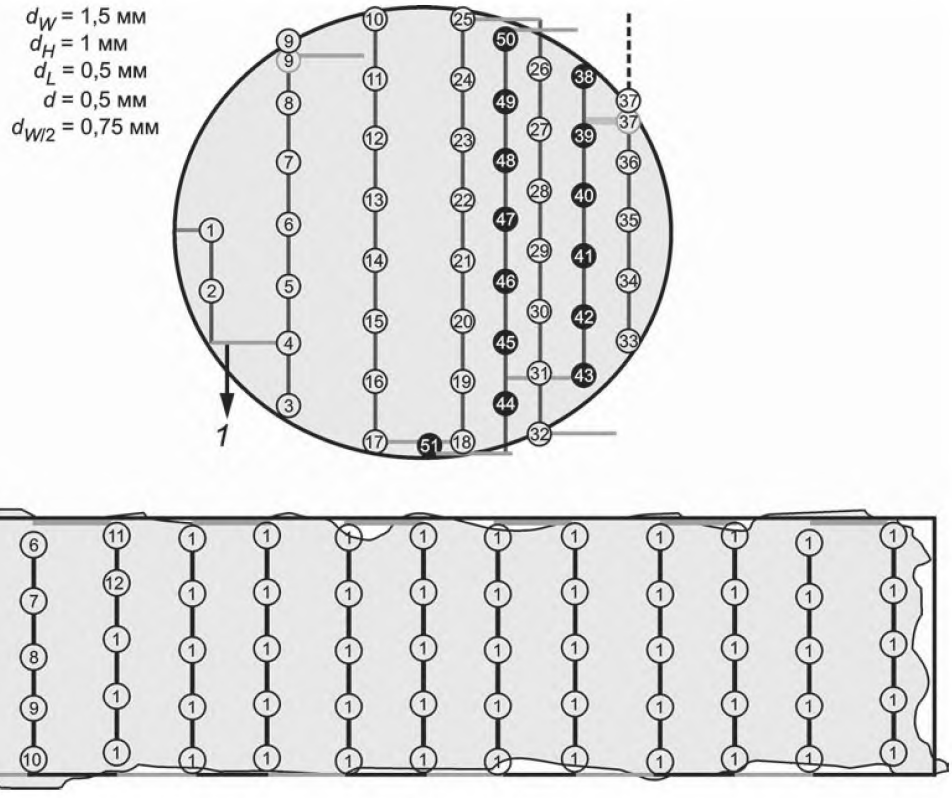
c) Затем объектив передвигают вправо на расстояние d_W и начинают подсчет новой полосы (например, d_W = 3—4 мм в зависимости от необходимого числа полей для репрезентативного подсчета всего мазка).

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

В случае недостаточного количества подсчитываемых полос (см. таблицу 1) можно подсчитать 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 указано в 9.2.

Пояснение



1 — вниз вплоть до нижней границы

Рисунок 4 — Вертикальные полосы, образованные равноудаленными полями в случае круглой или прямоугольной формы

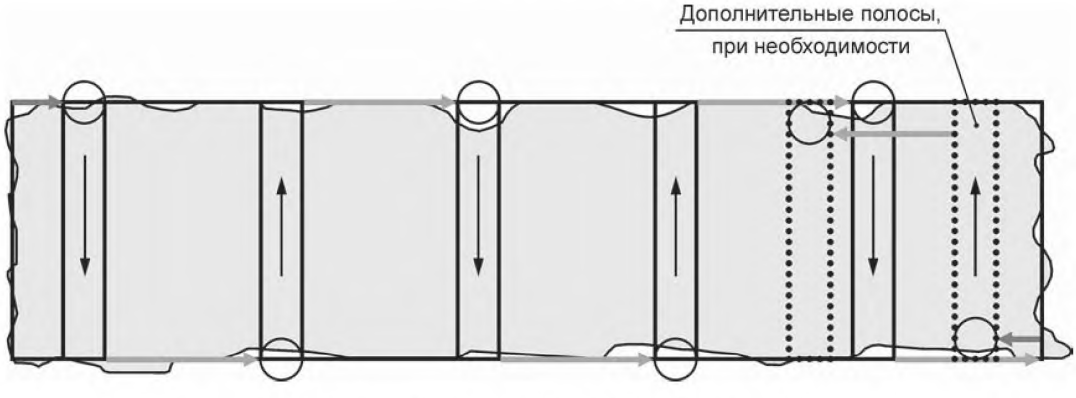


Рисунок 5 — Равноудаленные вертикальные полосы

9 *Обработка* результатов

9.1 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 *c* клеток, используя следующее уравнение:

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

или

$$c = f_w \times \left[\frac{N_t}{N_f} \times \frac{1}{d}\right] \quad (3)$$

с постоянным рабочим коэффициентом f_w

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

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, шт.;

D_f — диаметр поля микроскопа, мм;

N_f — количество полностью подсчитанных полей, шт.;

V_m — объем, $см^3$, испытуемой пробы мазка (см. 8.1.1 или 8.1.2) [V_m, равный 0,01 $см^3$, в случае использования для окрашивания (8.1.1) модифицированного рабочего окрашивающего раствора; V_m, равный 0,005 $см^3$, в случае использования для окрашивания (8.1.2) окрашивающего раствора бромистого этидия].

d — коэффициент разбавления, используемый в 7.2 (если разбавление не требуется, $d = 1$; при разбавлении 1:1 $d = 0,5$).

9.2 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 *c* клеток, используя следующее уравнение:

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

или

$$c = f_w \times \left[\frac{N_t}{N_b} \times \frac{1}{d}\right] \quad (6)$$

с постоянным рабочим коэффициентом f_w

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

где N_b – количество полностью подсчитанных полос.

Остальные обозначения приведены в 9.1.

9.3 Подсчет для круглой формы в последовательных полях

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

Рассчитывают общую концентрацию *c* клеток, используя следующее уравнение:

$$c = \frac{D_c^2 \times N_t}{D_f^2 \times N_f \times V_m} \times \frac{1}{d} \quad (8)$$

или

$$c = f_w \times \left[\frac{N_t}{N_f} \times \frac{1}{d}\right] \quad (9)$$

с постоянным рабочим коэффициентом f_w

$$f_w = \frac{D_c^2}{D_f^2 \times V_m} \quad (10)$$

где D_c — диаметр мазка, мм.

Остальные обозначения приведены в 9.1.

9.4 Выражение результатов

Результаты испытаний округляют до тысячи клеток (например, 401 586 клеток/см^3 выражают как 402 000 клеток/см^3).

10 Прецизионность

Точность настоящего метода установлена в соответствии с [2] и [3]. Значения, полученные для повторяемости и воспроизводимости, выражены при уровне вероятности 95 %.

10.1 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 2.

Таблица 2 — Значения повторяемости

Концентрация клеток (× 1 000 клеток/см^3)	s_r (× 1 000 клеток/см^3)	r (× 1 000 клеток/см^3)
245	38	107
455	43	121
679	69	192
791	110	308

10.2 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 3.

Таблица 3 — Значения воспроизводимости

Концентрация клеток (× 1 000 клеток/см^3)	s_R (× 1 000 клеток/см^3)	R (× 1 000 клеток/см^3)
245	41	114
455	62	174
679	78	218
791	110	308

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

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/мл и включало 16 дублирующих проб без указания источника поступления. Среднее значение каждого уровня соответственно составляет:

- Уровень 1, пробы A и B: 245 000 клеток/см^3;
- Уровень 2, пробы C и D: 455 000 клеток/см^3;
- Уровень 3, пробы E и F: 679 000 клеток/см^3;
- Уровень 4, пробы G и H: 791 000 клеток/см^3.

Испытание было организовано A.I.A. Laboratorio Standard Latte, Maccarese-Roma (Италия), которая также провела статистический анализ согласно [2] и [3] с целью предоставления прецизионных данных, приведенных в таблице А.1.

Т а б л и ц а А.1 — Результаты межлабораторных испытаний

Наименование показателя	Уровень			
	1	2	3	4
Число участников после исключения лабораторий с резко отклоняющимися результатами	24	23	24	24
Среднее значение (× 1000 клеток/см^3)	245	455	679	791
Среднее квадратичное отклонение повторяемости s_r (× 1000 клеток/см^3)	38	43	69	110
Коэффициент вариации повторяемости (%)	169	9	10	14
Предел повторяемости r (2,8s_r) (× 1000 клеток/см^3)	107	121	192	308
Среднее квадратичное отклонение воспроизводимости s_R (× 1000 клеток/см^3)	41	62	78	110
Коэффициент вариации 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

В.1.1 Фиксатор Карнуа

В.1.1.1 Состав

Хлороформ	60 $см^3$
Кислота уксусная безводная	20 $см^3$
Этанол 100 %	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
Вода деминерализованная	196 $см^3$

В.1.2.2 Приготовление

Последовательно добавляют пиронин-Y и метиловый зеленый в сосуд с деминерализованной водой и тщательно перемешивают. Фильтруют через подходящий фильтр (5.2) и хранят в коричневой емкости. Перед использованием раствор фильтруют снова через подходящий фильтр (5.2).

В.2 Приготовление мазка

Работают с предметным стеклом, выполняя следующие этапы окрашивания:

1 Используют фиксатор Карнуа (В.1.1) в течение 5 мин.

2 Используют этанол в концентрации 50 % в течение 1 мин.

3 Используют этанол в концентрации 30 % в течение 1 мин.

4 Используют воду в течение 1 мин.

5 Используют окрашивающий раствор пиронина-Y и метилового зеленого (В.1.2) для окрашивания в течение 6 мин.

6 Кратковременно промывают н-бутиловым спиртом, затем ксилолом.

7 Предметные стекла хранят в условиях защиты от пыли не более 12 мес.

Приложение С
(справочное)

Распределение Пуассона

Клетки в молоке распределяются по закону Пуассона. Распределение Пуассона по формуле

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

где M — среднее значение, которое, в случае подсчета количества соматических клеток, представляет собой число подсчитанных частиц (клеток);

V — дисперсия;

s — стандартное отклонение.

Коэффициент вариации (CV) будет равен

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

или

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

или

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

Библиография

[1] ИСО 707:2008* Молоко и молочные продукты. Руководящие указания по подбору проб

[2] ИСО 5725-1:2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения

[3] ИСО 5725-2:2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

* Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе соответствующего ИСО.

УДК 637.11.001:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молоко сырое, молоко химически консервированное, соматические клетки, микроскоп, мазки, ядро клетки, окрашивание мазков, поля просмотра, обработка результатов

Редактор *М. Е. Никулина*
Технический редактор *В. Н. Прусакова*
Корректор *Е. Ю. Митрофанова*
Компьютерная верстка *А. П. Финогеновой*

Сдано в набор 26.09.2011. Подписано в печать 20.10.2011. Формат $60\times84^{1}/_{8}$. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,55. Тираж 201 экз. Зак. 1136.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов, 248021 Калуга, ул. Московская, 256.

gost.e-ecolog.ru