
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

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

© Стандартиформ, 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.

4.1.1 Модифицированный окрашивающий раствор

4.1.1.1 Состав

Этанол, 95 % (по объему), см ³	54,0
Тетрахлорэтан ^{а)} , см ³	40,0
Метиленовый синий, г	0,6
Кислота уксусная, безводная, см ³	6,0
а) Допускается применять ксилол в том же объеме, какой указан для тетра-хлорэтана.	

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 см³ 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 ^{а)} (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
а) 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 ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O, г	1,15
KH ₂ PO 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 см³ оставшимся количеством деминерализованной воды.

Устанавливают pH на уровне $7,2 \pm 0,1$.

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 $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$, $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и $(65 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

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

5.3 Микроскоп, имеющий увеличение $500\times$ — $1000\times$. Допускается использовать масляно-иммерсионные объективы.

При использовании бромистого этидия микроскоп должен иметь флуоресцентное оборудование.

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

5.5 Микрометр

5.6 Стекла предметные, с предварительно нанесенными очерченными контурами (прямоугольным или круговым), площадью $1 \text{ см}^2 \pm 5\%$ (95 — 105 мм^2), или стандартное предметное стекло $20 \times 5 \text{ мм}$ 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 $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Определение проводят в течение 6 ч после отбора проб.

В случае более длительного хранения в пробы добавляют химические консерванты, такие как борная кислота, бромпол или дихромат калия. Массовая концентрация борной кислоты в анализируемой пробе не должна превышать 0,6 г на 100 см³. Массовая концентрация бромпола в анализируемой пробе не должна превышать 0,05 г на 100 см³. Массовая концентрация дихромата калия в анализируемой пробе не должна превышать 0,1 г на 100 см³.

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/см³ 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/см³;

V_s — объем, см³, анализируемой пробы;

V_b — объем, см³, 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 готовят, 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 см³ 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 см² (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 см³ приготовленной анализируемой пробы (см. 7.2) с 1 см³ 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 см³ 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 см² (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 $500\times$ до $1000\times$), 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.

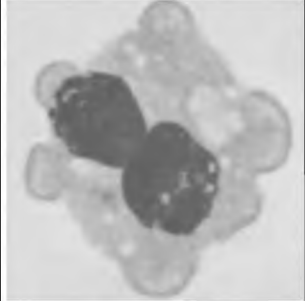
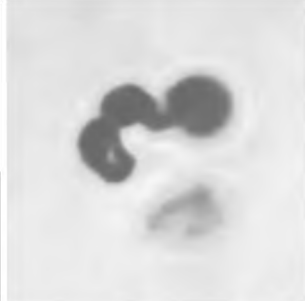
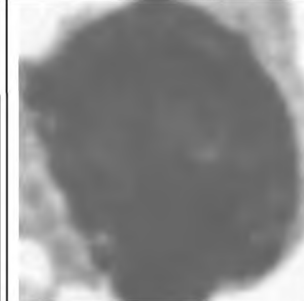
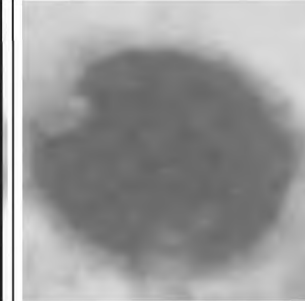
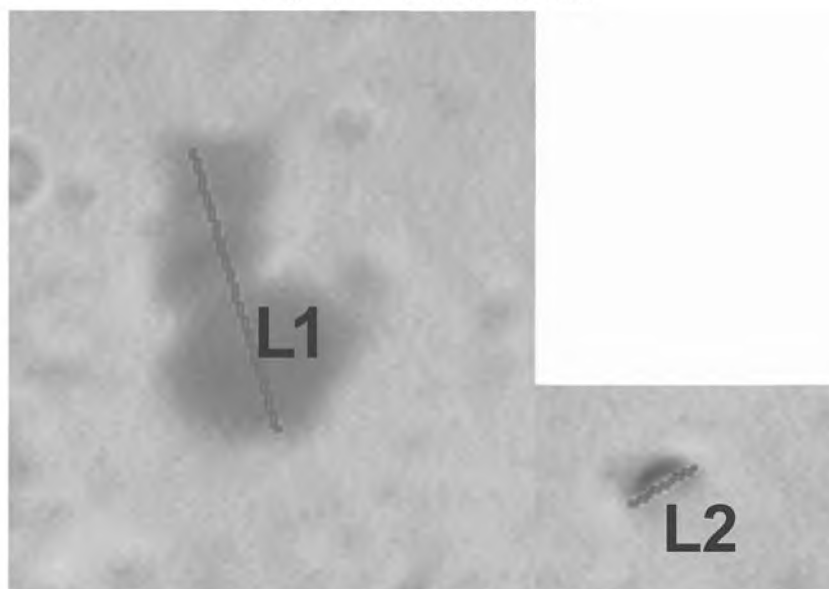
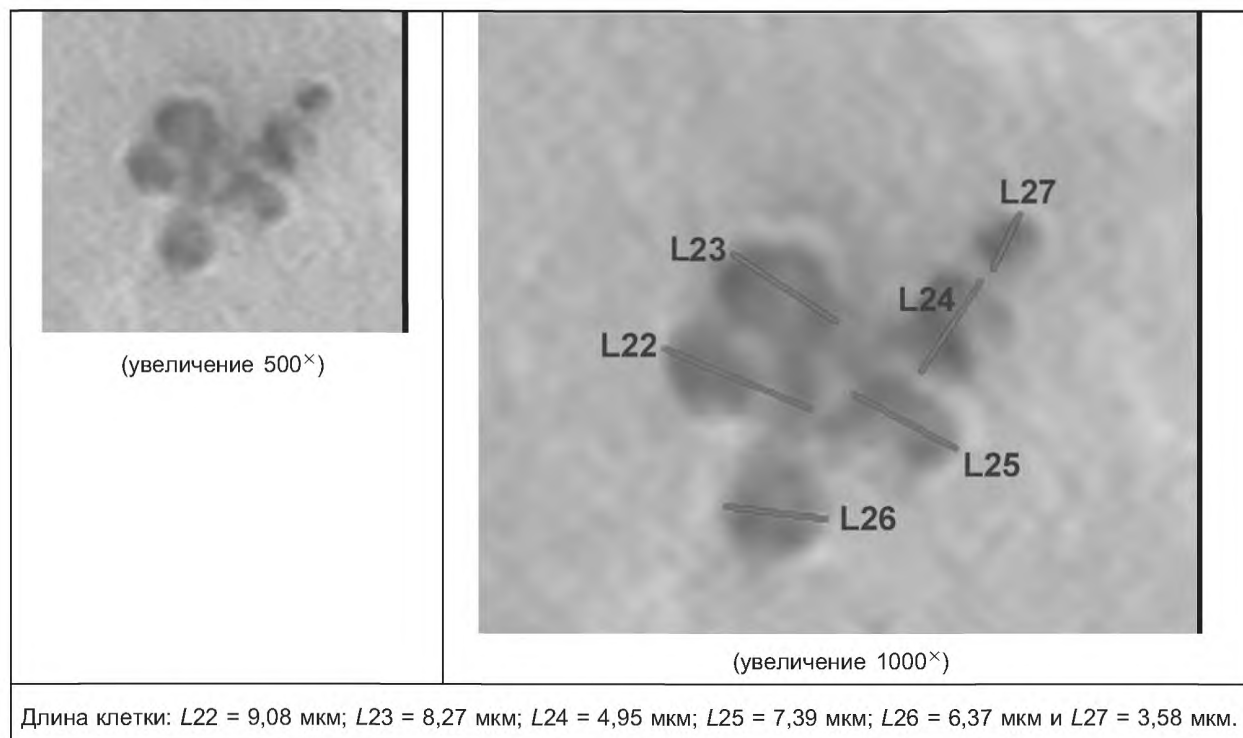
			
Макрофаг 8—30 мкм Связь между цитоплазмой и ядром прочная. Фагоцитоз, презентация антигена, секреция хемоаттрактантов.	Полиморфоядерный нейтрофил 10—14 мкм 90 % в случае острого мастита 60 % в случае хронического Связь между цитоплазмой и ядром незначительная. Фагоцитоз. Первая линия защиты от мастита.	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: $L1 = 9,79$ мкм и $L2 = 2,77$ мкм

Рисунок 2 — Примеры клеток сборного коровьего молока (увеличение $1000\times$)

Рисунок 3 — Примеры клеток сборного коровьего молока (увеличение $500\times$ и $1000\times$)

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.

П р и м е ч а н и е — 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.

Т а б л и ц а 1 — Минимальное количество клеток (N)

Концентрация клеток ($\times 1000$ 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.

с) 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.

П р и м е ч а н и е — 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.

с) 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).

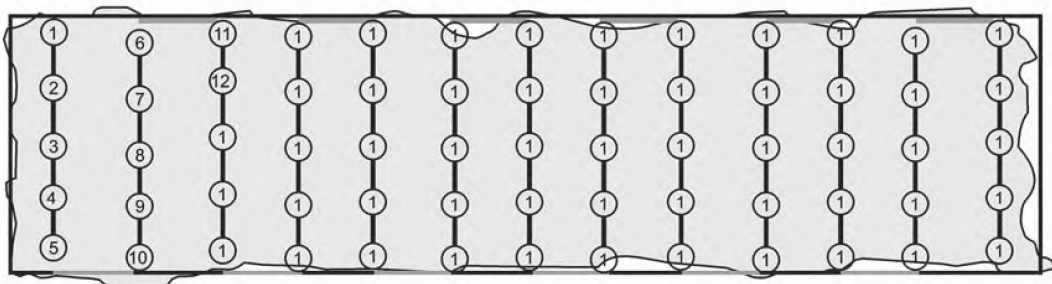
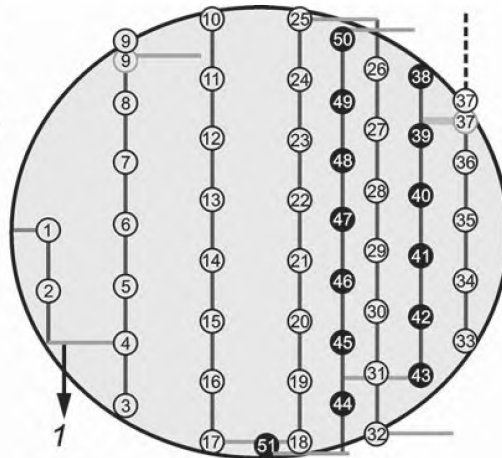
Операции b)–c) повторяют до достижения правой стороны шаблона.

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

$d_W = 1,5 \text{ мм}$
 $d_H = 1 \text{ мм}$
 $d_L = 0,5 \text{ мм}$
 $d = 0,5 \text{ мм}$
 $d_{W/2} = 0,75 \text{ мм}$



1 — вниз вплоть до нижней границы

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

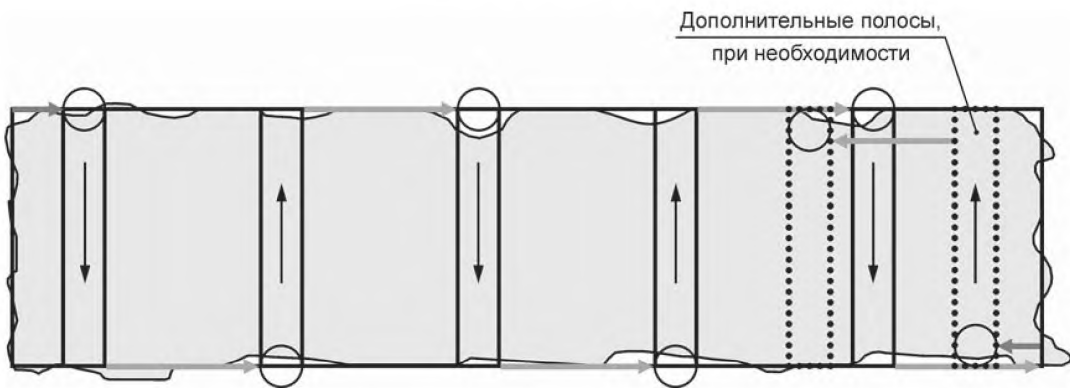


Рисунок 5 — Равноудаленные вертикальные полосы

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, см³, испытываемой пробы мазка (см. 8.1.1 или 8.1.2) [V_m , равный 0,01 см³, в случае использования для окрашивания (8.1.1) модифицированного рабочего окрашивающего раствора; V_m , равный 0,005 см³, 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 коррективки 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 коррективки 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/см³ выражают как 402 000 клеток/см³).

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.

Т а б л и ц а 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.

Т а б л и ц а 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 А и В: 245 000 клеток/см³;
- Уровень 2, пробы С и D: 455 000 клеток/см³;
- Уровень 3, пробы Е и F: 679 000 клеток/см³;
- Уровень 4, пробы G и H: 791 000 клеток/см³.

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 ($\times 1000$ клеток/см ³)	245	455	679	791
Среднее квадратичное отклонение повторяемости s_r ($\times 1000$ клеток/см ³)	38	43	69	110
Коэффициент вариации повторяемости (%)	169	9	10	14
Предел повторяемости r ($2,8s_r$) ($\times 1000$ клеток/см ³)	107	121	192	308
Среднее квадратичное отклонение воспроизводимости s_R ($\times 1000$ клеток/см ³)	41	62	78	110
Коэффициент вариации воспроизводимости (%)	17	14	11	14
Предел воспроизводимости R ($2,8s_R$) ($\times 1000$ 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-У и метилового зеленого

В.1.2.1 Состав

Пиронин-У	1,0 г
Метиловый зеленый	0,56 г
Вода деминерализованная	196 см ³

В.1.2.2 Приготовление

Последовательно добавляют пиронин-У 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-У 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 60×84¹/₈. 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.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов, 248021 Калуга, ул. Московская, 256.