



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*

© 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



**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 <sup>3</sup>	54,0
Тетрахлорэтан <sup>a)</sup> , см <sup>3</sup>	40,0
Метиленовый синий, г	0,6
Кислота уксусная, безводная, см <sup>3</sup>	6,0

<sup>a)</sup> 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 <sup>3</sup>	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<sup>3</sup> 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 <sup>3</sup>	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 <sup>a)</sup> (4.1.2.1), см <sup>3</sup>	2
Буферный раствор (4.1.2.2), см <sup>3</sup>	8
Тритон X-100, см <sup>3</sup>	0,1
Вода деминерализованная, см <sup>3</sup>	90

<sup>a)</sup> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, г	1,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , г	0,2
Вода деминерализованная, см <sup>3</sup>	1 000

#### 4.2.2 Приготовление фосфатного буферного раствора (PBS)

Соли растворяют в деминерализованной воде. Доводят объем до 1000 см<sup>3</sup> оставшимся количеством деминерализованной воды.

Устанавливают pH на уровне 7,2 ± 0,1.

П р и м е ч а н и е — 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) °C, (50 ± 2) °C и (65 ± 2) °C.

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

5.3 **Микроскоп**, имеющий увеличение 500<sup>х</sup> — 1000<sup>х</sup>. 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<sup>3</sup>, с максимальным допуском 2 %.

#### 5.5 Микрометр

5.6 **Стекла предметные**, с предварительно нанесенными очерченными контурами (прямоугольным или круговым), площадью 1 см<sup>2</sup> ± 5 % (95 — 105 мм<sup>2</sup>), 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, установленного в настоящем стандарте.

Отбор проб — по [1].

## 7 Приготовление анализируемой пробы

#### 7.1 Хранение

До проведения определения или химического консервирования анализируемую пробу хранят при температуре (4 ± 2) °C.

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<sup>3</sup>. Массовая концентрация бронопола в анализируемой пробе не должна превышать 0,05 г на 100 см<sup>3</sup>. Массовая концентрация дихромата калия в анализируемой пробе не должна превышать 0,1 г на 100 см<sup>3</sup>.

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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup>;

$V_s$  — объем, см<sup>3</sup>, анализируемой пробы;

$V_b$  — объем, см<sup>3</sup>, 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.

П р и м е ч а н и е — 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<sup>3</sup> 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<sup>2</sup> (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<sup>3</sup> приготовленной анализируемой пробы (см. 7.2) с 1 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>2</sup> (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.

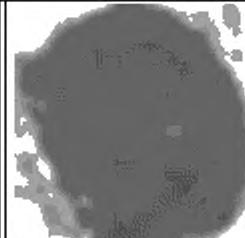
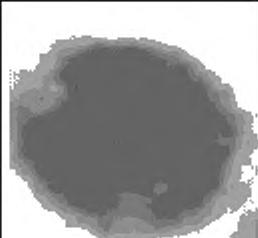
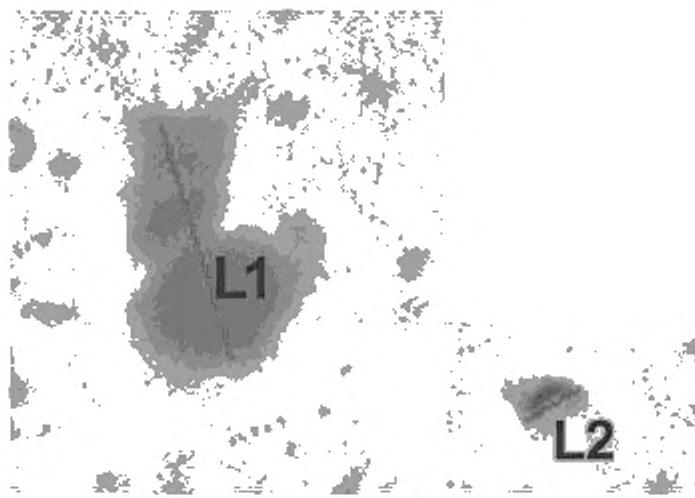
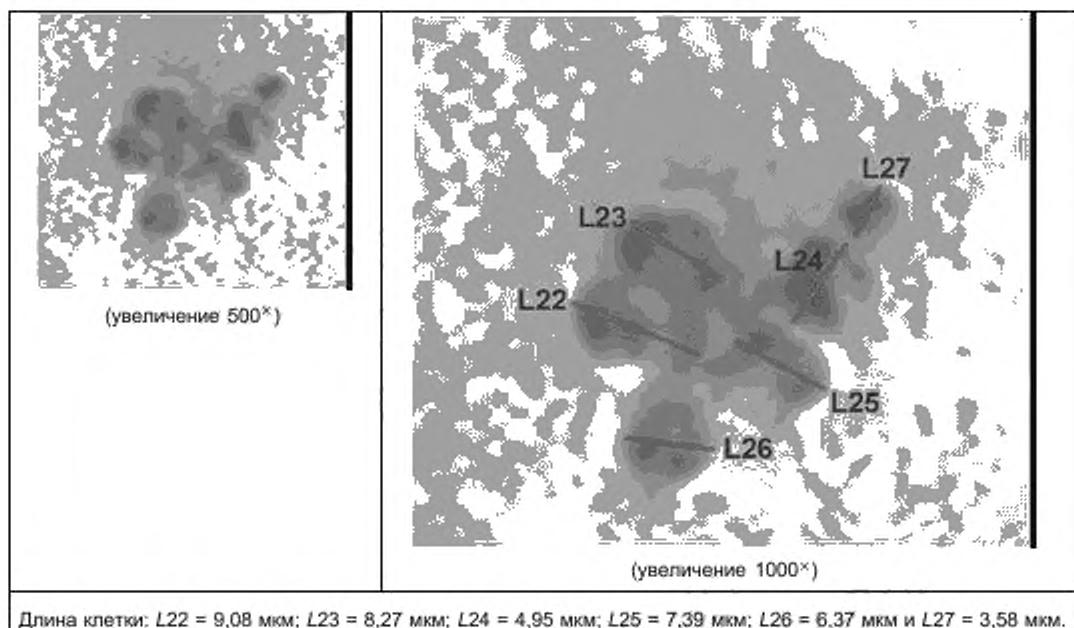
			
<p><b>Макрофаг</b> 8—30 мкм</p> <p>Связь между цитоплазмой и ядром прочная. Фагоцитоз, презентация антигена, секреция хемоатрактантов.</p>	<p><b>Полиморфоядерный нейтрофил</b> 10—14 мкм</p> <p>90 % в случае острого мастита 60 % в случае хронического Связь между цитоплазмой и ядром незначительная. Фагоцитоз.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

Рисунок 1 — Примеры клеток



Длина клетки: L1 = 9,79 мкм и L2 = 2,77 мкм

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



Длина клетки:  $L22 = 9,08 \text{ мкм}$ ;  $L23 = 8,27 \text{ мкм}$ ;  $L24 = 4,95 \text{ мкм}$ ;  $L25 = 7,39 \text{ мкм}$ ;  $L26 = 6,37 \text{ мкм}$  и  $L27 = 3,58 \text{ мкм}$ .

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

На примере кластера, представленного на рисунке 3, следует подсчитать 5 клеток.  $L27$  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 ( $\times 1000 \text{ клеток}/\text{см}^2$ )	Коэффициент вариации, %	Минимальное количество клеток ( $N$ )
< 150	10	100
150—250	7	200
250—400	6	300
$\geq 400$	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.

б) 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.

в) 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.

г) С последнего подсчитанного поля повторяют операцию с), 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.

д) 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).

е) Операции б)—е) повторяют до достижения правой стороны шаблона.

ж) 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.

и) 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):

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

б) 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.

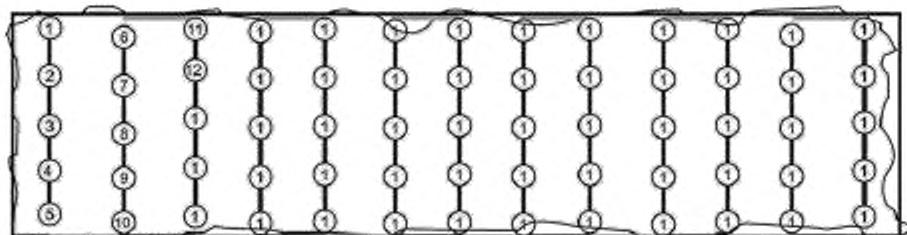
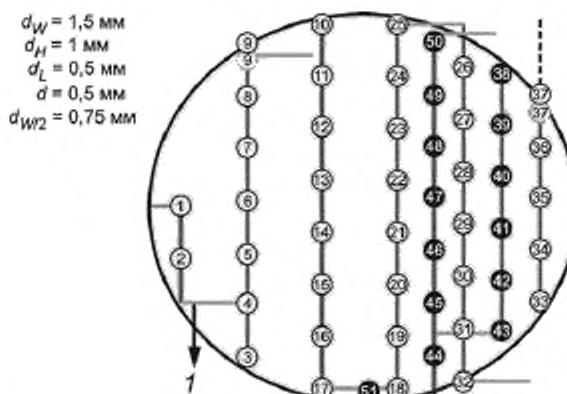
в) Затем объектив передвигают вправо на расстояние  $d_W$  и начинают подсчет новой полосы (например,  $d_W = 3—4$  мм в зависимости от необходимого числа полей для репрезентативного подсчета всего мазка).

Операции б)—в) повторяют до достижения правой стороны шаблона.

г) 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

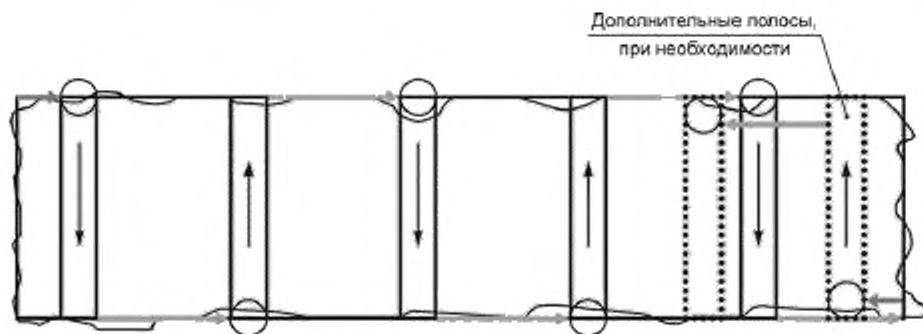


Рисунок 5 — Равноудаленные вертикальные полосы

## 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 с клеток, используя следующее уравнение:

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

или

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

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;

$N_t$  — количество полностью подсчитанных полей, шт.;

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

$d$  — 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 с 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 с клеток, используя следующее уравнение:

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

или

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

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<sup>3</sup> выражают как 402 000 клеток/см<sup>3</sup>).

### 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 ( $\times 1\ 000$ клеток/см <sup>3</sup> )	$s_r$ ( $\times 1\ 000$ клеток/см <sup>3</sup> )	$R$ ( $\times 1\ 000$ клеток/см <sup>3</sup> )
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 ( $\times 1\ 000$ клеток/см <sup>3</sup> )	$s_R$ ( $\times 1\ 000$ клеток/см <sup>3</sup> )	$R$ ( $\times 1\ 000$ клеток/см <sup>3</sup> )
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 тринацать 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/см<sup>3</sup>;
- Уровень 2, пробы С и D: 455 000 клеток/см<sup>3</sup>;
- Уровень 3, пробы Е и F: 679 000 клеток/см<sup>3</sup>;
- Уровень 4, пробы G и H: 791 000 клеток/см<sup>3</sup>.

Испытание было организовано А.И.А. 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.

Таблица 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 <sup>3</sup> )	245	455	679	791
Среднее квадратичное отклонение повторяемости $s_r$ ( $\times 1000$ клеток/см <sup>3</sup> )	38	43	69	110
Коэффициент вариации повторяемости (%)	169	9	10	14
Предел повторяемости $r$ ( $2,8s_r$ ) ( $\times 1000$ клеток/см <sup>3</sup> )	107	121	192	308
Среднее квадратичное отклонение воспроизводимости $s_R$ ( $\times 1000$ клеток/см <sup>3</sup> )	41	62	78	110
Коэффициент вариации воспроизводимости (%)	17	14	11	14
Предел воспроизводимости $R$ ( $2,8s_R$ ) ( $\times 1000$ клеток/см <sup>3</sup> )	114	174	218	308

Приложение В  
(справочное)

**Окрашивание козьего молока**

**В.1 Окрашивающие растворы для козьего молока**

**В.1.1 Фиксатор Карнua**

**В.1.1.1 Состав**

Хлороформ	60 см <sup>3</sup>
Кислота уксусная безводная	20 см <sup>3</sup>
Этанол 100 %	120 см <sup>3</sup>

**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 <sup>3</sup>

**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 Карнua (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 ксиолом.
- 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 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. 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](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)

Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов, 248021 Калуга, ул. Московская, 256.