



**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ
БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА
ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ
ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ
ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЇ
ЕКСПЕРТИЗИ**

**ПІДРАХУНОК СОМАТИЧНИХ КЛІТИН
В СЕКРЕТІ ВИМ'Я ОКРЕМИХ КОРІВ ТА
В ЗБІРНОМУ СИРОМУ МОЛОЦІ КОРІВ
МІКРОСКОПІЧНИМ МЕТОДОМ,
ВИЗНАЧЕННЯ СЕРЕДНЬОЇ
ГЕОМЕТРИЧНОЇ ВЕЛИЧИНИ**

Методичні рекомендації

КИЇВ-2022

УДК 36.2:591.469:591.146.

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 2 від червня 2021 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол №2 від 29.12.2021 р.).

Розробники: Гаркавенко Т.О., Лотоцький В.В., Бергілевич О.М., Касянчук В.В., Козицька Т.Г., Дяченко Т.О.

Рецензенти:

Цвіліховський М.І. – доктор біологічних наук, професор, академік НААН України, декан факультету ветеринарної медицини НУБіП;

Хіцька О.А. – кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри ветеринарно-санітарної експертизи, гігієни продуктів тваринництва та патологічної анатомії імені Й.С. Загаєвського БНАУ;

Коваленко В.Л. – доктор ветеринарних наук, професор, доктор ветеринарних наук, професор, завідувач сектору розробки нормативно-правової бази з питань біобезпеки ДНКІБШМ;

Уховський В.В. – доктор ветеринарних наук, професор, старший науковий співробітник науково-дослідного епізоотологічного відділу, ДНДІЛДВСЕ.

Підрахунок соматичних клітин в секреті вим'я окремих корів та в збірному сирому молоці корів мікроскопічним методом, визначення середньої геометричної: Методичні рекомендації / Т. О. Гаркавенко, В. В. Лотоцький, О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук, Т. Г. Козицька, Т. О. Дяченко. – Київ: ДНДІЛДВСЕ, 2021. – 80 с.

У методичних рекомендаціях викладено методику підрахунку соматичних клітин в секреті вим'я окремих корів та в збірному сирому молоці корів мікроскопічним методом, визначення середньої геометричної величини.

Рекомендації призначені для фахівців регіональних, районних та міжрайонних державних лабораторій Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, операторів ринку молока та молочних продуктів, фахівців Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, що здійснюють контроль виробництва молока та його введення в обіг, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та здобувачів вищої освіти зі спеціальностей 211 «Ветеринарна медицина» і 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза».

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| Вступ..... | 6 |
| Скорочення, що використовуються в тексті даних методичних вказівок | 12 |
| Терміни та визначення понять..... | 13 |
| 1. Сфера застосування..... | 15 |
| 2. Метод підрахунку соматичних клітин із застосуванням мікроскопа (контрольний метод) відповідно з ISO 13366–1:2008 | 15 |
| 2.1 Суть методу..... | 15 |
| 2.2 Відбір зразків..... | 15 |
| 2.3 Реактиви, що застосовуються для виконання даного методу..... | 18 |
| 2.4 Апаратура, що використовується..... | 21 |
| 2.5 Приготування предметних скелець | 22 |
| 2.6 Форми мазку..... | 23 |
| 2.7 Приготування дослідної проби | 23 |
| 2.7.1 Зберігання зразків перед дослідженням..... | 23 |
| 2.7.2 Приготування зразків до дослідження..... | 24 |
| 2.7.3 Проведення дослідження..... | 24 |
| 2.7.4 Приготування мазку та його фарбування | 24 |
| 2.8 Порядок проведення підрахунку соматичних клітин в мазку..... | 26 |
| 2.9 Послідовність огляду полів зору при підрахунку соматичних клітин | 29 |
| 2.10 Підрахунок соматичних клітин у прямокутних формах мазку на вертикальних смугах..... | 32 |

| | | |
|------|---|----|
| 2.11 | Обчислення і вираження результатів..... | 35 |
| 2.12 | Вираження результатів досліджень | 38 |
| 2.13 | Точність методу..... | 38 |
| 2.14 | Збіжність | 38 |
| 2.15 | Відтворюваність..... | 39 |
| | Протокол досліджень..... | 39 |
| 3. | Визначення кількості соматичних клітин із використанням флуорооптоелектронного лічильника (експрес-метод) (ISO 13366-2-2014)..... | 40 |
| 3.1 | Суть методу..... | 40 |
| 3.2 | Відбір зразків молока для дослідження..... | 41 |
| 3.3 | Зразки збірного молока | 42 |
| 3.4 | Зразки молока від конкретних тварин | 42 |
| 3.5 | Консервація..... | 42 |
| 3.6 | Зберігання і транспортування зразків..... | 44 |
| 3.7 | Якість зразків для аналізу..... | 44 |
| 3.8 | Реактиви, які використовуються..... | 46 |
| 3.9 | Перевірка стану приладу. Загальні пункти уваги..... | 46 |
| 3.10 | Пункти уваги при використанні дискових цитометричних лічильників..... | 46 |
| 3.11 | Використання проточних цитометричних лічильників..... | 46 |
| 3.12 | Робочий коефіцієнт..... | 47 |
| 3.13 | Аналізовані об'єми..... | 47 |
| 3.14 | Калібрування | 47 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.14.1 | Калібрування приладів з використанням референтних матеріалів | 47 |
| 3.14.2 | Підготовка внутрішніх референтних матеріалів (IRM) | 48 |
| | а) додаванням суспензії лейкоцитів бика..... | 48 |
| | б) мікрофільтрація..... | 48 |
| | с) центрифугування..... | 48 |
| 3.15 | Присвоєння референтних значень..... | 49 |
| 3.16 | Умови зберігання та термін придатності за періоду зберігання..... | 50 |
| 3.17 | Процедура калібрування..... | 50 |
| 3.18 | Перевірка лінійності..... | 51 |
| 3.19 | Визначення..... | 53 |
| 3.20 | Перевірка режиму працездатності за звичайної роботи..... | 53 |
| 3.20.1 | Контроль холостих зразків..... | 53 |
| 3.20.2 | Ефект залишкового впливу | 54 |
| 3.20.3 | Співвідношення об'єму реактиву і об'єму дослідного зразка..... | 55 |
| 3.21 | Контрольні виміри | 55 |
| 3.21.1 | Контрольний зразок молока..... | 55 |
| 3.21.2 | Встановлення значень контрольних зразків молока..... | 56 |
| 3.21.3 | Використання контрольних зразків молока..... | 56 |
| 3.22 | Додатковий контроль за допомогою приладу..... | 56 |
| 3.23 | Схожість (однаковість)..... | 57 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.24 | Внутрішньолабораторна відтворюваність..... | 57 |
| 3.25 | Міжлабораторні порівняння..... | 58 |
| 3.26 | Особливі умови при використанні молока різних видів сільськогосподарських тварин..... | 58 |
| | а) Коров'яче молоко..... | 59 |
| | б) Козине молоко..... | 59 |
| | с) Овече молоко..... | 59 |
| | д) Буйволине молоко | 60 |
| 3.27 | Прецизійність..... | 60 |
| 3.27.1 | Схожість (подібність) | 60 |
| 3.27.2 | Внутрішньолабораторна відтворюваність | 60 |
| 3.27.3 | Відтворюваність..... | 61 |
| 3.28 | Протокол випробування | 62 |
| 4. | Контроль вмісту соматичних клітин | 63 |
| 4.1 | Загальні дані про соматичні клітини молока | 63 |
| 4.2 | Негативний вплив зростання кількості соматичних клітин..... | 67 |
| 4.3 | Методи визначення кількості соматичних клітин в умовах господарства | 69 |
| 4.4 | Алгоритм дій при збільшенні вмісту соматичних клітин в збірному молоці | 76 |
| 4.5 | Програма контролю маститів | 86 |
| 5. | Визначення змінної середньої геометричної величини для кількості соматичних клітин..... | 90 |

| | |
|---|-----|
| ДОДАТОК 1 Фарбування мазків молока кіз..... | 92 |
| ДОДАТОК 2 Розподіл Пуассона..... | 94 |
| ДОДАТОК 3 Характеристика сучасних методів досліджень, що базуються на визначенні кількості соматичних клітин..... | 95 |
| ДОДАТОК 4 Інформативність методів досліджень..... | 98 |
| ДОДАТОК 5 Проблема: збільшення захворюваності маститом..... | 100 |
| ДОДАТОК 6 Проблема: збільшення кількості соматичних клітин в молоці | 103 |
| ДОДАТОК 7 БІБЛІОГРАФІЯ..... | 106 |

ВСТУП

Імплементация Угоди про асоціацію між Україною та Європейським Союзом передбачає наближення національного законодавства, зокрема в частині санітарних та фітосанітарних заходів, до спеціальних гігієнічних правил для харчових продуктів тваринного походження, які встановлені Регламентом Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 853/2004 від 29 квітня 2004 року.

Так, 12 липня 2019 р. набрав чинності наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України «Про затвердження Вимог до безпечності та якості молока і молочних продуктів» № 118 від 12 березня 2019 року, що зареєстрований в Міністерстві юстиції України 07 червня 2019 р. за № 593/33564 (далі – Наказ №118/2019), яким встановлюються спеціальні гігієнічні вимоги для операторів ринку молока та молочних продуктів, що еквівалентні вимогам Європейського Союзу (ЄС), а саме Розділу IX, Додатку III, Регламенту Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 853/2004 від 29 квітня 2004 року.

Дотримання вимог до безпечності та якості молока і молочних продуктів, що затверджені Наказом № 118/2019, перевіряється відповідно до Закону України «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин» (далі – ЗУ 2042-19), а саме – згідно зі статтею 40 про державний контроль сирого молока та молозива.

Господарства, де утримуються тварини, що

використовуються для виробництва сирого молока та/або молозива, підлягають державному контролю з метою перевірки стану здоров'я тварин, використання ветеринарних препаратів, а також дотримання операторами ринку гігієнічних вимог: загальних гігієнічних вимог до операторів ринку, які здійснюють первинне виробництво та ведення записів щодо забезпечення безпечності харчових продуктів (відповідно до Закону України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів») та спеціальних гігієнічних вимог, що встановлені Наказом №118/2019.

Також статтею 40 ЗУ 2042-19 передбачено контроль стану впровадження оператором ринку процедури періодичної перевірки сирого молока для визначення рівня загального бактеріологічного забруднення та кількості соматичних клітин. Якщо за результатами такої перевірки виявляється невідповідність, оператор ринку має негайно повідомити про це компетентний орган. Якщо протягом трьох місяців з дати такого повідомлення зазначену невідповідність не усунуто, відправлення сирого молока з відповідного господарства забороняється. Така заборона застосовується до моменту надання оператором ринку компетентному органу підтвердження усунення невідповідності.

Наказ № 118/2019 встановлює критерії вмісту мікроорганізмів та кількості соматичних клітин, які обумовлюють придатність сирого молока для введення в обіг. Такі критерії не є максимальними (граничними) значеннями, у разі перевищення яких сире молоко не може вводиться в обіг, а обраховуються як змінна середня геометрична величина.

Так, з урахуванням перехідних періодів, що були встановлені з 1 січня 2020 року, оператори ринку забезпечують відповідність сирого молока від корів таким критеріям:

- кількість мікроорганізмів за $30^{\circ}\text{C} \leq 100\ 000$ колонієутворюючих одиниць/мл (далі – КУО/мл) (за змінною середньою геометричною величиною за двомісячний період за зразками, які відбирають з частотою щонайменше двічі на місяць);

- кількість соматичних клітин $\leq 400\ 000$ клітин/мл (за змінною середньою геометричною величиною за тримісячний період з частотою щонайменше за одним зразком на місяць, крім випадків, коли компетентним органом буде визначено іншу методологію з метою врахування сезонних коливань рівнів виробництва).

Дотримання цих вимог підлягає перевірці репрезентативною кількістю зразків молока, відібраних рандомізованим методом у місці первинного виробництва та/або зберігання молока.

Європейський підхід до контролю сирого молока є гнучким, тому такі перевірки можуть провадитися безпосередньо чи від імені:

- оператора ринку, який здійснює первинне виробництво молока;

- оператора ринку, який здійснює збір чи переробку молока;

- групи операторів ринку;

- у контексті національної чи регіональної програми контролю, в тому числі державної.

Відносно сирого молока і молозива компетентні органи в ЄС повинні здійснювати моніторинг перевірок, що проводяться відповідно до Частини III Глави I, Розділу IX Додатка III до Регламенту (ЄС) № 853/2004. При проведенні досліджень компетентні органи повинні використовувати аналітичні методи, викладені в Додатку III до Виконавчого Регламенту Комісії (ЄС) 2019/627, для перевірки відповідності граничним значенням, встановленим для сирого молока і молозива в Частини III Глави I, Розділ IX Додатка III до Правил (ЄС) № 853/2004, а саме для кількості соматичних клітин референс-метод – EN ISO 13366-1. Прийнятним є використання альтернативних аналітичних методів для підрахунку кількості соматичних клітин, якщо такі методи валідовані відповідно до референс-методу, згідно з протоколом, встановленим в стандарті ISO 8196-3, і функціонують відповідно до стандарту EN ISO 13366-2 чи подібного, прийнятого на міжнародному рівні протоколу.

Так і в контексті національних вимог застосування кількісних методів дослідження є ключовою вимогою з точки зору законодавства про харчові продукти, як для підрахунку змінної середньої геометричної величини, при перевищенні якої встановлених критерії має відбутися негайна нотифікація компетентного органу, так і для аналізу тенденції результатів задля своєчасного впровадження оператором ринку коригувальних дій.

В зарубіжних країнах найбільш визнаним методом для досліджень соматичних клітин є застосування електронних приладів марки Fossomatic. Калібрування цих приладів здійснюється за допомоги стандартного мікроскопічного методу

підрахунку соматичних клітин (DMSCC).

Метод DMSCC вважається стандартним, арбітражним методом, згідно з яким повіряються всі інші методи підрахунку соматичних клітин.

Наразі в країнах ЄС та СOT підрахунок соматичних клітин вважається одним із дієвих засобів для фермера, щоб перевіряти корів на субклінічний мастит, досліджувати безпечність сирого молока та управляти молочним стадом. Підрахунок соматичних клітин дає змогу оцінити збитки від зниження молочної продуктивності корів та розробити засоби для підвищення ефективності виробництва молока.

В європейських країнах та країнах СOT метод підрахунку соматичних клітин використовується для виконання двох основних завдань: управління конкретним молочним стадом і в державній програмі з боротьби з маститом корів та забезпечення виробництва високоякісного молока.

Отже, підрахунок соматичних клітин – це сучасний ефективний та інформативний метод обов'язкового застосування при виробництві сирого молока корів, а метод прямого підрахунку в мазках молока вважається основним арбітражним методом.

В даних методичних вказівках наводиться метод підрахунку соматичних клітин в мазку за допомогою мікроскопа відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO 13366-1:2008 «**Milk – Enumeration of somatic cells – Part 1: Microscopic method (Reference method)**» (Молоко. Підрахування соматичних клітин. Частина 1. Мікроскопічний контрольний метод), з урахуванням поправок до нього від 2009 р.

Крім того, в даних методичних вказівках наведено розділи, в яких зазначаються можливості використання методу підрахунку соматичних клітин як для індивідуальних корів, так і для цілого молочного стада.

**Скорочення, що використовуються в тексті даних
методичних вказівок**

BTSCC – Підрахунок СК в збірному молоці (Bulk Tank Somatic Count)

BTMC – Визначення культур мікроорганізмів в збірному молоці (Bulk Tank Milk Cultures)

DMSCC – Прямий мікроскопічний метод підрахунку соматичних клітин (Direct Microscopic Somatic Cell Count)

КСК – кількість соматичних клітин

СМТ – Каліфорнійський маститний тест (California Mastitis Test) (В Україні **Cow-SCC** – Програма підрахунку СК в корів (Individual Cow Somatic Cell Counting Program))

СК – соматичні клітини

DHI – Програма покращення молочного стада з використанням підрахунку соматичних клітин (Dairy Herd Improvement SCC program)

SCC – Підрахунок соматичних клітин (Somatic Cell Count)

SPC – Стандартний підрахунок посівів на чашках (Standard Plate Count)

SCS – СКОР соматичних клітин (Somatic Cell Score)

Терміни та визначення

Соматичні клітини (*somatic cells*) – усі ті клітини з ядрами, що є лейкоцитами, лімфоцитами, моноцитами та епітеліальними клітинами.

Безпечний харчовий продукт – харчовий продукт, який не чинить шкідливого впливу на здоров'я людини та є придатним для споживання (ЗУ 771/97-ВР).

Державний контроль – діяльність компетентного органу, його територіальних органів, державних інспекторів, державних ветеринарних інспекторів, помічників державного ветеринарного інспектора та уповноважених осіб, що здійснюється з метою перевірки відповідності діяльності операторів ринку вимогам законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, ветеринарну медицину та благополуччя тварин, а також усунення наслідків невідповідності та притягнення до відповідальності за порушення відповідних вимог (ЗУ 2042-VIII).

Державний моніторинг – здійснення в межах заходів державного контролю послідовних спостережень та/або вимірювань відповідно до плану державного моніторингу з наступним їхнім аналізом та узагальненням з метою отримання загального уявлення про стан справ щодо дотримання законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, ветеринарну медицину та благополуччя тварин (ЗУ 2042-VIII).

Молозиво – продукт нормальної секреції молочних залоз самиць ссавців перших 3-5 днів після отелу (окоту) з високим

вмістом антитіл і мінералів, що передує секретії молока (наказ МінАПК №118).

Молоко сире – продукт нормальної секретії молочних залоз однієї або декількох здорових корів, овець, кіз, буйволиць, кобил, температура якого не перевищує 40° С і який не зазнавав будь-якої обробки (ЗУ 1870-IV).

Належна гігієнічна практика виробництва – всі умови та заходи, необхідні для забезпечення безпеки та придатності харчових продуктів на всіх етапах харчового ланцюга (Recommended international code of practice general principles of food hygiene CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-200).

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

1.1. Ці методичні вказівки визначають процедуру встановлення відповідності якості сирого молока щодо кількості соматичних клітин шляхом визначення їхньої середньої геометричної величини, яка може застосовуватись суб'єктами підприємницької діяльності в сфері виробництва харчових продуктів.

1.2. Ці методичні вказівки поширюються на суб'єкти підприємницької діяльності всіх форм власності, які займаються виробництвом, переробкою, реалізацією молока.

2. МЕТОД ПІДРАХУНКУ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ МІКРОСКОПА (РЕФЕРЕНТНИЙ МЕТОД) ВІДПОВІДНО ДО ISO 13366-1:2008 (ДСТУ ISO 13366-1/IDF 148-1:2014)

2.1. Суть методу

Метод застосовується для дослідження сирого та консервованого хімічним способом молока. Метод полягає в тому, що на предметному склі роблять мазок з дослідного зразка молока. Мазок висушують на повітрі, після чого фарбують та підраховують соматичні клітини під мікроскопом. Кількість клітин, підрахованих у визначеній площі, множать на робочий коефіцієнт, щоб одержати кількість клітин в 1 см³.

2.2. Відбір зразків

Зразки відбирають згідно з ДСТУ ISO 707:2002. Необхідно ретельно перемішувати сире молоко, що відбирається, оскільки соматичні клітини концентруються у верхньому та нижньому шарах. При відборі зразків молока у окремих тварин слід

враховувати те, що виділення соматичних клітин у молоці під час доїння відбувається нерівномірно. Коли метою є отримання репрезентативного результату підрахунку, важливо отримати репрезентативний зразок, відібраний від молока, отриманого при окремому надої.

2.2.2. Обладнання для відбирання зразків має бути виготовлене із нержавіючої сталі або іншого матеріалу відповідної міцності та якості, який не викликатиме змін у зразку. Його поверхня має бути гладенькою, вільною від тріщин, усі кути – заокруглені.

Перед використанням обладнання має бути сухим і попередньо простерилізованим. Якщо використовується пластикове обладнання, то воно має бути стерильним.

2.2.3. Відбір зразків здійснюють в асептичних умовах. Мінімальний обсяг зразка має становити 100 см³.

2.2.4. Зберігати та транспортувати зразки слід у такому стані, щоб вони не зазнавали впливу негативних факторів (сторонніх запахів, високих температур, прямого сонячного світла тощо). Після відбирання зразків їх якнайшвидше доводять до температури зберігання. Час і температуру слід розглядати у взаємозв'язку. Температура до і під час транспортування зразків має бути у межах від 0°C до 6°C. Час доставки до лабораторії має бути якомога коротшим та не перевищувати 24 год з моменту відбору зразків. Кількість соматичних клітин має бути підрахована протягом 96 годин з моменту відбору зразків за умови правильного зберігання.

Слід уникати заморожування зразків. Зберігання зразків за більш високих температур та/або понад 96 годин може

призвести до нерепрезентативного підрахунку – зниження кількості соматичних клітин від 10% до 20%, оскільки розпад соматичних клітин (лізис) призведе до збільшення менших фрагментів клітин. За використання фтор-оптико-електронних лічильників спостерігається менша інтенсивність флуоресценції, після фарбування цих частинок викликає зсув розподілу висоти імпульсу вліво. Це заважатиме правильній диференціації від шумових імпульсів і, отже, призводить до підрахунку меншої кількості соматичних клітин.

Тому, за неможливості зберігання зразків за температурного режиму $0^{\circ}\text{C} - +6^{\circ}\text{C}$ або неможливості доставки до лабораторії протягом 24 год з моменту відбору, проте за належного температурного режиму зберігання ($0^{\circ}\text{C} - +6^{\circ}\text{C}$), одразу після відбору зразків слід використовувати наступні засоби для хімічного консервування:

- борна кислота: її кінцева концентрація у досліджуваному зразку не має перевищувати $0,6 \text{ г}/100 \text{ см}^3$. Зразки із таким консервантом можуть зберігатися за температури від 6°C до 12°C протягом 24 годин¹;

- бронопол (2-бром-2-нітро-1,3-пропандіол): його кінцева концентрація у досліджуваному зразку не має перевищувати $0,05 \text{ г}/100 \text{ см}^3$. Такі зразки можуть зберігатися за температури від 2°C до 12°C протягом 6 днів¹;

- дихромат калію: його кінцева концентрація у досліджуваному зразку не має перевищувати $0,1 \text{ г}/100 \text{ см}^3$ (при дослідженні зразків мікроскопічним методом) або $0,2 \text{ г}/100 \text{ см}^3$

¹ Цей консервант може використовуватися для зразків, які будуть досліджуватися як мікроскопічним, так і автоматизованим методом. Тестові зразки, консервовані таким чином, можна зберігати за температури $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ до 6 днів.

(при дослідженні зразків автоматизованим методом). Такі зразки можуть зберігатися за температури від 2°C до 12°C 6 днів¹;

- азид натрію: його кінцева концентрація у досліджуваному зразку не має перевищувати 0,024 г/100 см³. Такі зразки можуть зберігатися за температури від 2°C до 10°C протягом 72 годин².

Також дозволяється використовувати такі кольорові індикатори², як:

- патент Blue V з кінцевою концентрацією в досліджуваному зразку до 0,15 мг/100 см³;
- жовтий апельсин S (E110) з кінцевою концентрацією у досліджуваному зразку до 1 мг/100 см³;
- суміш патенту Blue V та еозину В з кінцевою концентрацією у досліджуваному зразку до 0,03 мг та 0,45 мг/100 см³ відповідно.

За використання інших консервантів та індикаторів слід довести відсутність їхнього впливу на результат підрахунку кількості соматичних клітин.

2.3. Реактиви, що застосовуються для виконання даного методу. Використовують реактиви тільки визнаного аналітичного класу, якщо інше не зазначено, а також дистильовану або деіонізовану воду чи воду еквівалентної чистоти.

2.3.1. Розчини барвників. Модифікований барвник Ньюмана-Ламперта (модифікація Левовітца-Вебера)

² Цей консервант/індикатор може використовуватися для зразків, які будуть досліджуватися автоматизованим методом.

| | |
|--|----------------------|
| Етанол, 95% (за об'ємом) | 54,0 см ³ |
| Тетрахлоретан ¹ | 40,0 см ³ |
| Метиленовий синій | 0,6 г |
| Кислота оцтова, кристалізована | 6,0 см ³ |
| ¹ Замість тетрахлоретану можна використати ксилол у такому самому об'ємі. | |

а) ПОПЕРЕДЖЕННЯ. Тетрахлоретан отруйний. У разі проливання слід вжити відповідних заходів з дезактивації. Приготування та застосування розчину барвника необхідно здійснювати у витяжній шафі, використовуючи засоби захисту.

Етанол і тетрахлоретан змішують та закривають пляшку корком. Нагрівають суміш на водяній бані, налаштованій на 65°C. Під витяжною шафою додають метиленовий синій і ретельно змішують. Охолоджують суміш в холодильнику до 4°C.

Потім додають кристалізовану оцтову кислоту і ретельно змішують знову. Отриманий розчин фільтрують крізь відповідний фільтр і зберігають у такому вигляді в герметичному посуді.

Перед застосуванням розчин барвника Ньюмана-Ламперта фільтрують знову.

б) Маточний розчин барвника етидіуму броміду

Склад:

| | |
|-----------------------|---------------------|
| Етидіум бромід | 0,25 г |
| Вода демінералізована | 100 см ³ |

ПОПЕРЕДЖЕННЯ! Етидіум бромід є мутагеном. У разі проливання слід вжити відповідних заходів з

дезактивації. Приготування та застосування розчину необхідно здійснювати у витяжній шафі, використовуючи засоби захисту.

Приготування: Розчиняють етидіум бромід у демінералізованій воді, підігрітій до 40°C. Охолоджують розчин до кімнатної температури. Доводять до 100 см³ демінералізованою водою.

Маточний розчин барвника етидіуму броміду може зберігатися не довше ніж два місяці за температури 2°C ± 2°C в темряві.

с) Буферний розчин

Склад:

| | |
|-----------------------|---------------------|
| Калію гідрофталат | 0,51 г |
| Калію гідроокис | 0,162 г |
| Вода демінералізована | 100 см ³ |

Приготування: Окремо розчиняють гідрофталат калію та гідроокис калію в демінералізованій воді.

Буферний розчин може зберігатися не довше ніж два місяці за температури 2°C ± 2°C в темряві.

d) Робочий розчин барвника етидіуму броміду

| | |
|---|---------------------|
| Розчин барвника етидіуму броміду ¹ | 2 см ³ |
| Буферний розчин | 8 см ³ |
| Тритон X-100 | 0,1 см ³ |
| Вода демінералізована | 90 см ³ |

¹ Висока температура може знижувати фарбувальні властивості етидіуму броміду.

Приготування: Послідовно додають маточний розчин

барвника етидіуму броміду, буферний розчин і Тритон X-100 до демінералізованої води і ретельно перемішують.

Робочий розчин барвника етидіуму броміду готують безпосередньо перед використанням.

е) Фосфатний буферний розчин (PBS)

Склад:

| | |
|---|-----------------------|
| NaCl | 8 г |
| KCl | 0,2 г |
| Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O | 1,15 г |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 г |
| Вода демінералізована | 1 000 см ³ |

Приготування: Розчинюють солі в демінералізованій воді. Використовують решту демінералізованої води, щоб довести до 1000 см³. Доводять до рН 7,2 ± 0,1.

Примітка. Можна також використовувати фосфатний буферний розчин з рН = 7,2, що є в продажу.

2.4. Апаратура, що використовується:

Водяна баня, придатна для підтримання температури 40°C±2°C, 50°C±2°C і 65°C±2°C.

Фільтри, стійкі до розчинів, які використовуються, з розміром пор від 10 мкм до 12 мкм.

Мікроскоп, із збільшенням від 500× до 1000×. Можна використовувати масляні імерсійні об'єктиви. У разі використання етидіуму броміду мікроскоп повинен мати флуоресцентне устаткування.

Мікрошприц для внесення визначеного об'єму 0,01 см³ молока, з максимально допустимим відхиленням 2%.

Мікрометр має бути сертифікований

Предметні скельця, на кожному з яких заздалегідь виділено зону певної форми (прямокутної або круглої) площею $1 \text{ см}^2 \pm 5\%$ (від 95 мм^2 до 105 мм^2), або стандартне скельце з шаблоном необхідної площі для нанесення мазку розміром $20 \times 5 \text{ мм}$ або діаметром $11,28 \text{ мм}$.

Для фарбування молока кіз використовують барвники, зазначені в додатку 1.

2.5. Приготування предметних скелець

Предметні скельця мають бути чистими та добре знежиреними. Бажано виділити зону певної форми на предметному склі для нанесення мазку, або можна застосовуватися шаблон – рис 1. У випадку застосування шаблону можна уникнути обчислення робочого коефіцієнту при кожному підрахунку клітин. Шаблон можна приготувати на міліметровому папері (рис. 1).

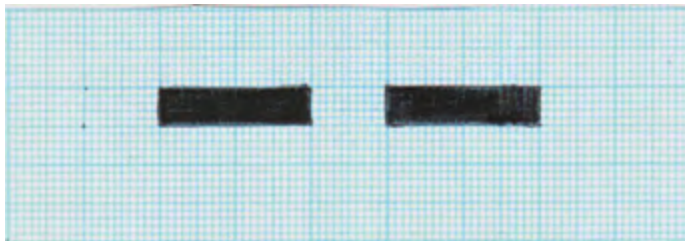


Рис.1. Шаблон для окреслення форми мазку для підрахунку соматичних клітин.

Шаблон поміщається під предметне скло, на предметне скло в місця, окреслені на шаблоні, наноситься крапля досліджуваного молока/розчину молока та рівномірно розподіляється по окресленій прямокутній площі розміром $20 \times 5 \text{ мм}$

5 мм. При цьому скельце необхідно притримувати лівою рукою так, щоб воно не з'їжджало з шаблону. Аналогічно можна використовувати шаблон округлої форми відповідної площі.

2.6. Форми мазку

Мазок має наноситись на чітко визначене місце на предметному склі. Для прямокутної форми мазку середня довжина кожної зі сторін площі мазку, а саме: верхня та нижня, ліва та права сторони (протилежні сторони) мазку – не повинні відрізнятись більше, ніж на 0,2 мм.

Для круглої форми вертикальні та горизонтальні внутрішні діаметри не повинні відрізнятись більше, ніж на 0,2 мм.

2.7. Приготування дослідного зразка

2.7.1. Зберігання зразків перед дослідженням

До дослідження зразки зберігають за температури $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Зразки досліджують не пізніше 6 годин після їхнього відбирання. За необхідності більш тривалого зберігання додають такі хімічні консерванти, як борна кислота, бронопол або дихромат калію. Кінцева концентрація борної кислоти не має перевищувати 0,6 г на 100 см^3 дослідного зразка. Кінцева концентрація бронополу не має перевищувати 0,05 г на 100 см^3 дослідного зразка. Кінцева концентрація дихромату калію не має перевищувати 0,1 г на 100 см^3 дослідного зразка. Зберігають консервовані у зазначений спосіб зразки за температури $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ не більше, ніж 6 днів.

З екологічних причин рекомендується обмежити використання дихромату калію для зразків, які необхідно довго зберігати.

2.7.2. Приготування зразків до дослідження

Нагрівають дослідний зразок на водяній бані за температури 40°C. Після чого ретельно перемішують. Охолоджують зразок до температури, за якої було відкалібровано мікрошприц, наприклад 20°C.

Якщо для дослідного зразка визначено, що кількість соматичних клітин у ньому є вищою за 1 000 000 клітин/см³, зразок необхідно розбавити фосфатним буферним розчином, щоб довести кількість соматичних клітин до вмісту близько 500 000 клітин/см³ в кожному розбавленому зразку. Вираховують коефіцієнт розбавлення за формулою:

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

де

d – коефіцієнт розбавлення, для отримання у дослідному зразку відповідної кількості соматичних клітин, яка становить близько 500 000 клітин/см³;

V_s – об'єм, у см³, дослідного зразка;

V_b – об'єм, у см³, буферного розчину, що використовується для розбавлення дослідного зразка.

Занотовують необхідний коефіцієнт розбавлення d, об'єм дослідного зразка V_s, і об'єм буферного розчину V_b, які використовуються, щоб отримати необхідне розбавлення.

2.7.3. Проведення дослідження

Готують для кожного дослідного зразка щонайменше по два мазки і проводять підрахунок в кращому з них (вибирають мазок, що не пошкоджений під час фарбування). Занурюють предметні скельця в етанол (з об'ємною часткою спирту 95%).

2.7.4. Приготування мазку та його фарбування

а) Приготування мазку та забарвлення розчином барвника Ньюмана-Ламперта

Використовуючи мікрошприц, беруть 0,01 см³ досліджуваного зразка (попередньо розбавленого). Ополіскують мікрошприц в дослідному зразку. За потреби, акуратно витирають мікрошприц зовні.

Переносять суміш на чисте предметне скельце в зону, де відмічена площа завбільшки 1 см². Використовуючи препарувальну голку, рівномірно розподіляють дослідний зразок на означеній площі. Висушують мазок за кімнатної температури до повного його висихання.

Занурюють предметне скельце з висušеним мазком до розчину модифікованого барвника Ньюмана-Ламперта щонайменше на 15 хв. Висушують мазок за кімнатної температури до повного висихання.

Висušений мазок акуратно ополіскують у проточній воді до повного змивання надлишку барвника. Мазок знову висušують та зберігають, захищаючи від пилу.

б) Приготування суміші барвника етидіуму броміду з досліджуваним зразком для підготовки мазку

Змішують в пробірці 1 см³ підготовленого дослідного зразка та 1 см³ робочого розчину барвника етидіуму броміду. Суміш зберігають, захищаючи від світла. Нагрівають пробірку на водяній бані за температури 50°C та охолоджують до кімнатної температури.

Використовуючи мікрошприц, набирають 0,01 см³ суміші, при цьому попередньо ополіскують мікрошприц цією сумішшю.

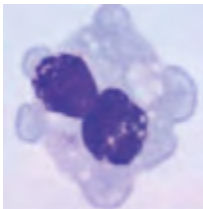
За необхідності ретельно та обережно витирають зовнішню поверхню мікрошприца.

Розміщують суміш на чистому предметному скельці у виділеній зоні площею 1 см². За допомогою голки рівномірно розподіляють суміш по всій виділеній зоні, намагаючись рівномірно покрити всю окреслену зону та особливо місця, наближені до її периметру. Мазок висушують за кімнатної температури до повного висихання.

2.8. Порядок проведення підрахунку соматичних клітин в мазку

Використовуючи мікроскоп, підраховують ядра клітини в одержаному мазку, причому площа, на якій проводиться підрахунок клітин, має бути повністю покрита досліджуваним зразком молока. Вибирають найприйнятніше збільшення (в діапазоні від 500× до 1 000×), для того щоб в кожному полі зору мікроскопа було в середньому близько 20 клітин.

Клітини в основному мають величину 8 мкм або більшу та пофарбоване ядро. Не підраховують клітини, які менші за 4 мкм (див. рис. 2).



Макрофаг

Розмір 8-30 мкм

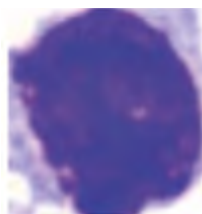
Співвідношення цитоплазми до ядра у макрофага велике. Макрофаги беруть участь у фагоцитозі, представленні антигену, секреції хемоатрактантів



Сегментоядерний (поліморфно ядерний) нейтрофіл (PMN)

Розмір 10-14 мкм

Співвідношення цитоплазми до ядра в PMN невелике. PMN беруть участь у фагоцитозі. PMN – це перша лінія захисту проти маститу
90% PMN в мазку свідчить про гострий мастит;
60% PMN – хронічний мастит



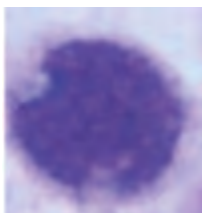
Лімфоцит

Розмір 5-10 мкм

Співвідношення цитоплазми до ядра невелике. Ядро інтенсивно забарвлюється.

Лімфоцити поділяються на:

Т-хелпери, Т-супресори, В-клітини

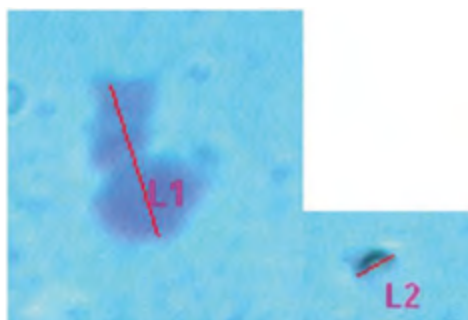


Епітеліальна клітина

Розмір 10-14 мкм

Ядро округле. Цитоплазма слабо забарвлюється

Рис. 2. Зразки клітин (з ISO 13366-1:2008)



Довжина клітин: L1 = 9,79 мкм та L2 = 2,77 мкм

(збільшення $\times 1000$)

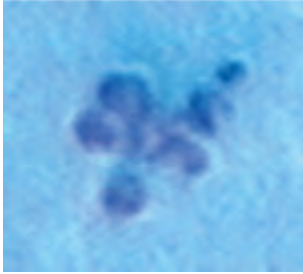
Рис. 3. Приклади соматичних клітин в зразках збірного молока корів (з ISO 13366-1:2008)

Примітка. Фарбування мазків молока кіз описано у додатку 1.

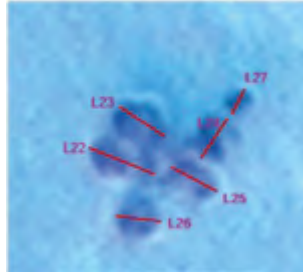
Фрагменти підраховують, тільки коли видно понад 50% площі їхнього ядра. Якщо виявляють не окремі клітини, а їхнє скупчення, то таке скупчення клітин обліковується як одна

клітина. Рахуйте клітинне скупчення як одну, якщо є чітке розділення ядерної одиниці (див. рис. 3 і 4).

Приклад скупчення соматичних клітин показано на рис. 4.



(збільшення $\times 1000$)



(збільшення $\times 500$)

Довжина клітин: L22=9,08 мкм; L23=8,27 мкм; L24=4,95 мкм;
L25=7,38 мкм; L26=6,37 мкм; L27=3,58 мкм.

Рис. 4. Приклади скупчення (кластерів) соматичних клітин зі збірного молока (з ISO 13366-1:2008)

У наведеному на рис. 4 випадку слід враховувати тільки п'ять соматичних клітин із шести в даному кластері, тому що шосту клітину з діаметром L27 не враховують, оскільки її діаметр складає менш ніж 4 мкм.

Примітка. Професійна підготовка та навички лаборанта – головний критичний чинник успіху для належного використання даного методу. Для підтримання належної точності підрахунку суттєвим є часте використання методу і участь в міжлабораторних випробуваннях.

Зазвичай соматичні клітини в молоці розподіляються згідно з розподілом Пуасона (див. додаток 2). Мінімальне число

(N) соматичних клітин, які підлягають підрахунку, має бути вибрано залежно від їхньої загальної кількості в молоці з таким розрахунком, щоб досягнути зазначеного коефіцієнта варіації, що наведено у табл. 1.

Для належного використання методу важливо, щоб було підраховано зазначене мінімальне число клітин. Поля зору та вертикальні смуги, в яких проводять підрахунок, мають підбиратись таким чином, щоб отримати репрезентативну кількість клітин для всього мазку.

Таблиця 1

Мінімальне число (N) клітин

| Концентрація (× 1000 клітин/см ³) | Коефіцієнт варіації (CV,%) | Клітин (N) |
|--|-------------------------------|------------|
| < 150 | 10 | 100 |
| 150 до 250 | 7 | 200 |
| 250 до 400 | 6 | 300 |
| Понад 400 | 5 | 400 |

2.9. Послідовність огляду полів зору при підрахунку соматичних клітин

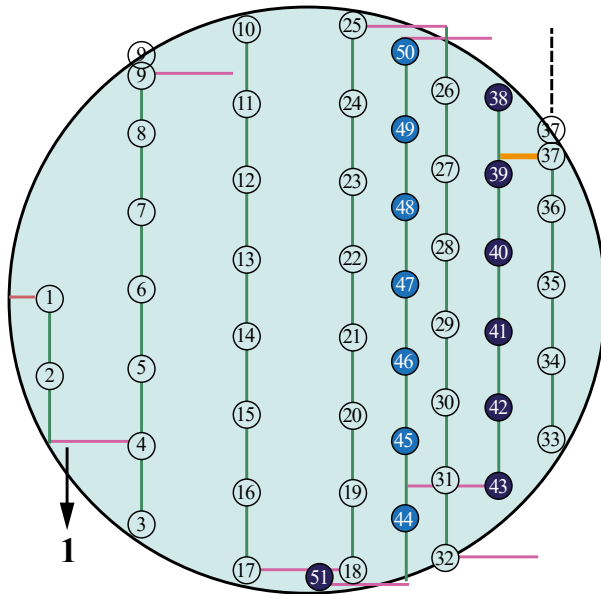
Послідовно підраховують ядра соматичних клітин у відповідних полях зору. Поля зору мають вибиратись як вертикальні ряди (смуги), що розташовані на однаковій відстані одна від одної по всій площі мазку (див. рис. 5 і табл. 1).

а) Починають підрахунок у вертикальному ряду, що знаходиться приблизно на відстані d_L від лівої сторони площі мазку. Для круглої форми мазку починають облік клітин у вертикальному ряду з лівої сторони на відстані d_L

горизонтального діаметру мазку з таким розрахунком, щоб була можливість підрахувати щонайменше 5 полів від верхнього краю вертикального ряду. Відстань $d_L = 0,5$ мм є оптимальною як для прямокутної, так і для круглої форми мазку (рис. 5).

б) Встановлюють верхню чи нижню межу окружності окуляра відповідно на внутрішню, верхню чи нижню поверхню мазку (краї мазку не мають бути в полі зору). Якщо біля країв площі мазку є не покрита мазком поверхня, тоді поле зору встановлюють відносно межі мазку.

- $d_w = 1,5$ мм
- $d_H = 1$ мм
- $d_L = 0,5$ мм
- $d = 0,5$ мм
- $d_{w12} = 0,75$ мм



Варіант 1

Рис. 5. Вертикальні смуги рівномірно розташованих полів зору для круглої форми мазку (з ISO 13366-1:2008)

с) Після підрахунку першого поля зору переміщують окуляр на фіксовану відстань d_H в напрямку до нижнього чи верхнього краю наступної вертикальної лінії і проводять підрахунок в нових полях зору. Значенням фіксованої відстані d_H є відстань 1 мм, яка вважається в даному разі найбільш прийнятною.

д) Особливості підрахунку в останньому полі зору кожного вертикального ряду. Дотримуючись методології (зазначеної в пп. с)), при досягненні протилежного (нижнього чи верхнього) краю вертикального ряду в останньому полі зору підрахунок соматичних клітин проводиться відповідно до одного з двох нижчезазначених варіантів.

– Варіант 1: Останнє поле зору не підраховують.

– Варіант 2: Якщо нижня або верхня межа мазку є в полі зору мікроскопа і мазок заповнює менш ніж половину поля зору мікроскопа, підрахунок виконують тільки після поступового просування об'єктиву доти, доки ця межа не зникне з поля зору повністю і в полі зору буде тільки мазок.

е) Після підрахунку соматичних клітин в останньому полі зору у вертикальному ряду переміщують об'єктив вправо на відстань d_w

(наприклад, $d_w = 1,5$ мм або $d_w = 2$ мм залежно від числа необхідних полів зору, взятих для обліку) і починають облік клітин, розташованих в полях зору на новому вертикальному ряду, просуваючи об'єктив мікроскопа в протилежному напрямі (догори або донизу) відносно попереднього напрямку його руху.

ф) Повторюють дії, що зазначені в пп. б) та е), доки не буде досягнуто правої сторони шаблона.

g) У разі, якщо підрахунок було здійснено в недостатній кількості полів зору (див. таблицю 1), можна брати додаткові поля зору для підрахунку. Для цього фокусують об'єктив мікроскопа на інших місцях мазку (наприклад, починаючи з іншого місця та/або змінюючи крок переміщення), щоб охопити таку кількість полів зору, що є репрезентативною для всього мазку.

h) Обчислюють результат окремо для прямокутної або для округлої форми згідно з нижченаведеними формулами.

Примітка. У разі з мазками прямокутної форми для підрахунку 50 полів зору необхідно у вертикальному ряду підраховувати 5 полів зору на площі 1 мм або 10 полів зору на площі 2 мм. Приблизно таку саму кількість полів зору необхідно підраховувати у округлій формі мазку за умови використання вищезазначених відстаней.

Відстані переміщень (інтервали) об'єктиву мікроскопа визначають з урахуванням вищезазначених обчислень полів зору (корегування по верхньому або нижньому краю), щоб вони вміщувались на площі мазку.

2.10. Підрахунок соматичних клітин у прямокутних формах мазку на вертикальних смугах

Підраховують ядра клітин на розташованих на однаковій відстані одна від одної вертикальних смугах (див. рис. 6 і таблицю 1):

а) Починають на відстані, d_L , від лівої сторони. Відстань, d_L , з 0,5 мм є прийнятною.

б) Починають підрахунок від верхнього або нижнього краю вертикальної смуги на прямокутній площі мазку.

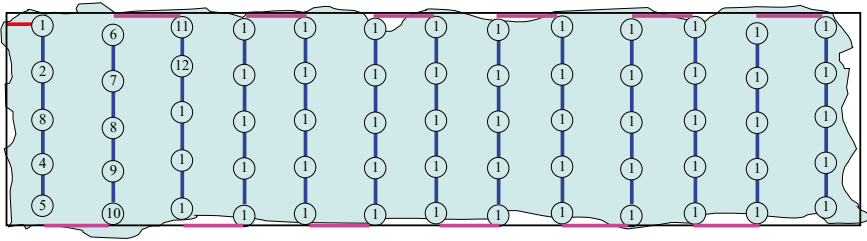
Розташовують поле зору мікроскопа таким чином, щоб край площі мазку був посередині поля зору мікроскопа. Після підрахунку всіх клітин на даному полі зору переміщують об'єктив у напрямку, протилежному до краю, де був початок обліку. Рахують всі клітини, які з'являються у цій вертикальній смузі, до досягнення протилежного краю. Записують кількість підрахованих соматичних клітин.

с) Після виконання підрахунку за пп б переміщують об'єктив праворуч на відстань d_w і починають підрахунок на новій вертикальній смузі (наприклад, d_w = від 3 мм до 4 мм, залежно від кількості смуг, яка необхідна, щоб представляти весь мазок при підрахунку).

Повторюють дії згідно з переліками б) і с) до досягнення правого краю площі мазку.

У разі, якщо підрахунок було здійснено в недостатній кількості полів зору (див. табл. 1), можна брати додаткові поля зору для підрахунку. Для цього фокусують об'єктив мікроскопа на інших місцях мазку (наприклад, починаючи з іншого місця та/або змінюючи крок переміщення), щоб охопити таку кількість полів зору, що відображає весь мазок.

У разі, якщо підрахунок було здійснено в недостатній кількості смуг (див. табл. 1), можна брати додаткові смуги для підрахунку (рис. 7).



Варіант 2

Рис. 6. Вертикальні смуги рівномірно розташованих полів зору для прямокутної форми (з ISO 13366-1:2008)

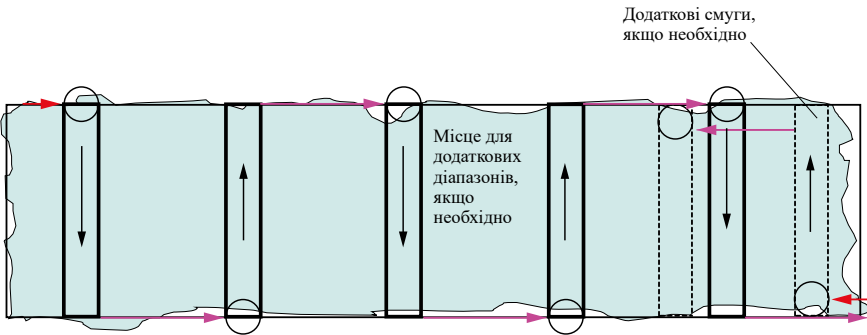


Рис. 7. Рівномірно розташовані вертикальні смуги та можливі варіанти додаткових вертикальних смуг, що зображені пунктиром (з ISO 13366-1:2008)

Показано рівномірне розташування вертикальних смуг на площі мазку та напрямок здійснення руху об'єктиву мікроскопа по зазначених вертикальних смугах, що розташовані на округлій формі площі мазку (варіант 1, рис. 5) та на прямокутній площі мазку (варіант 2, рис. 6). Рух об'єктиву мікроскопа на рис. 5 та рис. 6 показано зверху до досягнення нижнього краю площі мазку.

Розміщують край площі мазку посередині поля зору мікроскопа. У цьому випадку фокусують об'єктив мікроскопа на інших місцях (наприклад, починаючи з іншого місця та/або змінюючи d_w), щоб охопити таку кількість смуг, що відображає весь мазок.

2.11. Обчислення і вираження результатів

а) Підрахунок для округлої форми мазку у послідовних полях зору

Перевіряють, щоб за допомогою шкали та верньєра мікроскопа було встановлено задані значення 20,0 мм та 5,0 мм відповідно до довжини, L_s , та ширини, W_s мазку.

Підраховують загальну концентрацію c , клітин, використовуючи наступну формулу:

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

або

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

або з постійним робочим коефіцієнтом, f_w

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

де

c – загальна концентрація кількості клітин на см^3 ;

W_s – горизонтальний діаметр мазку, мм;

L_s – вертикальний діаметр мазку, мм;

N_t – загальна кількість підрахованих клітин;

D_f – діаметр поля зору мікроскопа, мм;

N_f – число всіх полів зору, в яких були підраховані клітини;

V_m – об'єм дослідного зразка в мазку [у разі використання для фарбування робочого розчину барвника Ньюмана-Ламперта, $V_m = 0,01 \text{ см}^3$. Якщо для фарбування використовували барвник етидіум бромід,

$V_m = 0,005 \text{ см}^3$;

d – коефіцієнт розбавлення зразка (якщо розбавлення не проводилось, то

$d = 1$; при розбавленні 1:1 $d = 0,5$ або згідно з п.2.7.2).

в) Підрахунок соматичних клітин для прямокутної форми мазку у послідовних полях зору на паралельних вертикальних смугах

Проведіть підрахунок на всій довжині мазку – 20,0 мм (L_s), відповідно до окуляра та об'єктива мікроскопа, що використовується.

Підраховують загальну концентрацію c , клітин, використовуючи наступну формулу:

$$c = \frac{L_s \times N_t}{D_f \times N_b \times V_m} \times \frac{1}{d}$$

або

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

з постійним робочим коефіцієнтом, f_w

$$f_w = \frac{W_s}{D_f \times V_m}$$

де N_b – кількість всіх підрахованих смуг

с) Підрахунок соматичних клітин для округлої форми мазку у послідовних полях зору на вертикальних паралельних смугах

Проведіть підрахунок по всій довжині мазку – 20,0 мм, відповідно до окуляра та об'єктива мікроскопа, що використовується.

Перевіряють, щоб за допомогою шкали та верньєра мікроскопа було встановлено значення діаметра мазку 11,28 мм.

Підраховують загальну концентрацію c , клітин, використовуючи наступну формулу:

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

або

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

з постійним робочим коефіцієнтом, f_w

$$f_w = \frac{D_c^2}{D_f \times V_m}$$

де D_c – кількість всіх підрахованих смуг

2.12. Вираження результатів досліджень

Виражають отримані результати в цілих числах тисяч (наприклад, результат 401 586 клітин/см³ виражають як 402 000 клітин/см³).

2.13. Точність методу

Значення збіжності та відтворюваності даних, що отримані за результатами міжлабораторного випробування, проводяться згідно з ISO 5725-1 та ISO 5725-2. Подробиці цього міжлабораторного випробування підсумовано в додатку А.

Дані, отримані під час цього випробування, не можуть бути застосовані при використанні інших концентрацій та об'єктів.

2.14. Збіжність

Абсолютна різниця між двома незалежними результатами окремих випробувань, одержаними тим самим методом на ідентичному матеріалі, в одній лабораторії, тим самим лаборантом, на тому самому устаткуванні протягом короткого часу, не має перевищувати значення, наведені у табл. 2, більше ніж у 5% випадків.

Таблиця 2

Значення збіжності

| Концентрація (× 1 000 клітин/см ³) | Стандартне відхилення збіжності – S_r (× 1 000 клітин/см ³) | Границя збіжності R – (×1 000 клітин/см ³) |
|--|--|--|
| 245 | 38 | 107 |
| 455 | 43 | 121 |
| 679 | 69 | 192 |
| 791 | 110 | 308 |

2.15. Відтворюваність

Абсолютна різниця між двома результатами окремих випробувань, одержаними тим самим методом, на ідентичному матеріалі, у різних лабораторіях, різними лаборантами, на різному устаткуванні, не має перевищувати значення, наведені у таблиці 3, більше ніж у 5% випадків.

Таблиця 3

Значення відтворюваності методу

| Концентрація ($\times 1\,000$ клітин/см ³) | Стандартне відхилення збіжності – S_r ($\times 1\,000$ клітин/см ³) | Границя збіжності R – ($\times 1\,000$ клітин/см ³) |
|---|---|--|
| 245 | 41 | 114 |
| 455 | 62 | 174 |
| 679 | 78 | 218 |
| 791 | 110 | 308 |

Протокол досліджень

В протоколі досліджень необхідно зазначати:

- а) всю інформацію, необхідну для повної ідентифікації зразка;
- б) використаний метод відбору зразків, якщо він відомий;
- с) метод випробування, що був використаний, з посиланням на цю методику;
- д) всі робочі подробиці, не визначені в цих методичних рекомендаціях, або визначені як додаткові, разом з подробицями будь-яких інцидентів, які могли вплинути на результат(-ти) випробування;

е) результат(-ти), що отримано під час випробування, або, якщо перевіряли збіжність, остаточний підтверджений результат.

Допускається використання альтернативних аналітичних методів у разі проведення їхньої валідації у порівнянні з референтним методом (EN ISO 13366-1 (ДСТУ ISO 13366-1)) відповідно до протоколу, викладеного в ISO 8196-3, що виконуються у відповідності до стандарту EN ISO 13366-2, ДСТУ 7672.

3. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ФЛУОРООПТОЕЛЕКТРОННОГО ЛІЧИЛЬНИКА (ЕКСПРЕС-МЕТОД) (ISO 13366-2-2014)

3.1. Суть методу. Флуорооптоелектронні лічильники містять функції для поглинання реагентів і досліджуваного зразка, секцію змішування та секцію підрахунку. У секції змішування досліджуваний зразок змішують з буфером та розчином фарби. Частина отриманої суміші переноситься в лічильну секцію і наноситься на предметну площину. Кожна зафарбована частинка, яка виявлена за допомогою флуоресцентного мікроскопа, випускає електричний імпульс, який фільтрується, посилюється та реєструється. Отриманий розподіл висоти імпульсу обробляється електронним способом, завдяки чому здійснюється розрізнення між шумовими сигналами та імпульсами, які випускаються пофарбованим соматичним клітинам. Рівень амплітудного селектора імпульсів може бути фіксованим або динамічним.

У секції змішування дозують і змішують строго

контрольовані обсяги зразка для аналізу і буферного/фарбувальних розчинів. Змішування можна здійснювати в чашці, в змішувальній камері, в центрифугі, в петлі для зразків або в трубці, що веде до проточної кювети.

У секції підрахунку можна використовувати дискову або проточну цитометрію. У разі застосування дискової цитометрії тонку плівку суміші наносять через насадку на верхню частину вертикально обертаючого диску. Ця обертаюча поверхня слугує рухомою предметною площиною флуоресцентного мікроскопа. За використання проточної цитометрії частину суміші поміщають в високошвидкісний потік рідини, що оточує корпус в капілярній проточній кюветі. У результаті прискорення суміш утворює тонкий струмінь, в який динамічно фокусуються і вирівнюються в лінію соматичні клітини. Цей струмінь проходить перед об'єктивом флуоресцентного мікроскопа.

У деяких приладах в секції підрахунку міститься два канали. Виходячи із забезпечення аналітичної якості, така ситуація вважається еквівалентною роботі з двома окремими модулями. Таким чином, робочі характеристики оцінюються окремо для кожного каналу.

При використанні цих приладів слід дотримуватись настанов виробника щодо цього. Достовірність отриманих результатів залежить від правильності співвідношення між об'ємом розчину буфера/барвника та обсягу досліджуваного зразка.

3.2. Відбір зразків молока для дослідження

Ємності для відбору зразків мають бути придатні для перенесення зразків з місця відбору зразків в лабораторію без

забруднення або зміни складу. Ємності для відбору зразків мають бути герметичними і після заповнення мати достатньо вільного об'єму. Занадто великий вільний об'єм може стати причиною спінювання, занадто малий вільний об'єм утруднить змішування. Устаткування для відбору зразків (тобто колби для зразків, лабораторні стакани і пробовідбірники) має бути чистим і сухим. Автоматичні пробовідбірники при використанні повинні відповідати встановленим вимогам.

Рекомендується негайно охолодити зразки для аналізу після відбору до температури 0°C–6°C і зберігати за цієї температури до підрахунку (див. 3.6), щоб уникнути необхідності консервації. Слід уникати заморожування. За необхідності консервації відповідні способи хімічного консервування зразків для аналізу встановлено в пункті 3.5.

3.3. Зразки збірного молока

Перед відбором зразків необхідно ретельно перемішати сире збірне молоко. При недостатньому перемішуванні соматичні клітини будуть концентруватися в верхніх і нижніх шарах.

3.4. Зразки молока від конкретних тварин

Виділення соматичних клітин в молоко під час доїння відбувається нерівномірно. Для отримання репрезентативного результату підрахунку для всього процесу доїння необхідно отримати репрезентативні зразки для всього процесу доїння. Для діагностичних цілей достатня вибірка частини надосного молока.

3.5. Консервація

За необхідності хімічної консервації зразок для аналізу

має бути законсервований якомога швидше, але не більше ніж через 24 годин після відбору. Зразок для аналізу має зберігатися охолодженим (за температури 0°C – 6°C) до внесення консерванту.

Для консервації використовують такі консерванти:

а) Борна кислота: концентрація в зразку для аналізу не має перевищувати $0,6\text{г}/100\text{мл}$. Законсервовані таким чином зразки зберігають за температури 6°C – 12°C не більше 24 год.

б) Азид натрію: концентрація в зразку для аналізу не має перевищувати $0,024\text{ г}/100\text{ мл}$. Законсервовані таким чином зразки зберігають за температури 2°C – 10°C не більше 72 год.

с) Бронопол (2-бромо-2-нітро-1,3-пропандіол): концентрація в зразку для аналізу не має перевищувати $0,05\text{ г}/100\text{ мл}$. Законсервовані таким чином зразки зберігають за температури від 2°C до 12°C не більше 6 діб.

д) Біхромат калію: концентрація в зразку для аналізу не має перевищувати $0,2\text{ г}/100\text{ мл}$. Законсервовані таким чином зразки зберігають за температури 2°C – 12°C протягом наступних 6 діб.

Рекомендуються наступні колірні індикатори:

- патентований синій V з концентрацією в зразку для аналізу до $0,15\text{ мг}/100\text{ мл}$;

- жовтий оранжевий S (E110) з концентрацією в зразку для аналізу до $1\text{ мг}/100\text{ мл}$;

- суміш з патентованого синього V і еозину У з концентрацією в зразку для аналізу до $0,03\text{ мг}/100\text{ мл}$ і $0,45\text{ мг}/100\text{ мл}$ відповідно.

Можливе використання інших консервантів і колірних індикаторів за умови, що їхня ефективність і умови використання

дозволені відповідно до встановленого порядку.

Необхідно перевірити відсутність впливу вищевказаних речовин на підрахунок для відповідного обладнання.

За використання флуорооптоелектронних лічильників клітин, що входять до складу аналізаторів молока, що вимірюють в тому числі і інші компоненти в зразках для аналізу, необхідно вжити заходів, що виключають вплив використовуваних консервантів і колірних індикаторів на результати підрахунку.

3.6. Зберігання і транспортування зразків

Підрахунок в незаконсервованих зразках, що зберігається за температури 0°C–6°C, необхідно провести протягом 96 годин з моменту відбору зразків.

Слід уникати заморожування зразків для аналізу. Зберігання за підвищеної температури і/або більше встановленого часу може призвести до зниження значень результатів аналізу. При вимірюванні зразків після заморожування і відтавання значення результатів аналізу можуть бути занижені на 10%–20%. Час зберігання зразків при заморожуванні і спосіб відтавання можуть вплинути на результат підрахунку.

Час дослідження зразків, які зазнали консервування, залежить від консерванту, що зазначено у підрозділі 3.5.

3.7. Якість зразків для аналізу

Рекомендується перевірити відсутність суттєвого впливу підвищених концентрацій жиру та білка у молоці шляхом додаванням вершків та ультрафільтраційного ретентату. Якщо спостерігається значний вплив, слід виконати регулювання приладу та/або процедури підрахунку відповідно до рекомендацій виробника приладу.

За розпаду соматичних клітин (лізис) спостерігається збільшення більш дрібних фрагментів клітин. Після фарбування цих частинок більш низька інтенсивність флуоресценції викликає зрушення вліво в розподілі амплітуди імпульсів. Це призводить до утруднення правильної диференціації від шумових імпульсів і до заниження значення вмісту клітин.

Примітка. У деяких типах приладів є функції визначення положення і форми розподілу амплітуди імпульсів. Ця інформація наводиться у відповідних інструкціях і керівництві виробника приладу.

Можливі необхідні адаптації:

- попереднє розведення досліджуваного зразка;
- використання більш концентрованої фарби;
- регулювання кількості буферного розчину/розчину фарби;
- зміна температури досліджуваного зразка;
- подовження часу проходження через проточну комірку;
- коригування математичної обробки отриманого розподілу висоти імпульсу.

Після аналізу проблемних зразків слід перевірити і за можливості очистити систему потоку зразків. Необхідно протестувати прилад перед його подальшим використанням. Можливими проблематичними зразками для аналізу є:

- a) зразки молока з інфікованого вимені, тобто зі згустками крові;
- b) зразки молока із забрудненнями;
- c) зразки молока з високим вмістом еритроцитів;
- d) молозиво;

е) молоко пізньої лактації;

ф) молоко, що скисло.

Не рекомендується проводити контроль проблемних зразків.

3.8. Реактиви, які використовуються

Усі реактиви, які будуть використовуватися в роботі, повинні мати визнану аналітичну та бактеріологічну якість. Вода, яка використовується, має бути демінералізованою (залишкова провідність <math><10 \text{ мкСм/см}</math>) або принаймні еквівалентної чистоти.

Дотримуйтесь інструкцій виробника для приготування робочих розчинів, максимального часу їхнього зберігання та вимог до зберігання.

3.9. Перевірка стану приладу. Загальні пункти уваги

- функціонування змішувального пристрою та мішалки;
- можливі порушення при прийманні зразків та в проточній системі через блокування домішками, згустками або забрудненнями в установках змішування та інкубації;
- стантафункціонуванняджереласвітлатамультиплікатора, налаштування коефіцієнта підсилення та якості сигналу.

3.10. Пункти уваги при використанні дискових цитометричних лічильників:

- місцезнаходження плівки на обертовому диску;
- чистота предметної площини та функціонування чистячої губки, своєчасна заміна губки;
- належне спорожнення ємності для збору рідини для промивання.

3.11. При використанні проточних цитометричних лічильників необхідно звернути увагу на зміну поведінки

струменя зразка в проточній кюветі та потоку захисної рідини. Деякі виробники приладів пропонують спеціальне програмне забезпечення для їхньої перевірки, що вказує на можливі рішення у разі відхилень.

3.12. Робочий коефіцієнт – це число, на яке помножується фактична кількість соматичних клітин, підрахованих приладом, щоб отримати заключну суму соматичних клітин досліджуваного зразка.

3.13. Аналізовані об'єми

Точне співвідношення між об'ємом буферного/ фарбувального розчину і об'ємом зразка для аналізу дуже важливе для точного підрахунку.

3.14. Калібрування

3.14.1. Для калібрування приладів використовують референтні матеріали, якими можуть бути:

- сертифіковані стандартні зразки (CRMs), що виготовлені організацією, яка є компетентною у даній сфері діяльності;
- вторинні референтні матеріали (SRMs), підготовлені зовнішнім постачальником;
- внутрішні референтні матеріали (IRMs), підготовлені самою лабораторією.

Референтні матеріали мають виготовлятися в умовах, що суворо контролюються, тобто в межах роботи з системою забезпечення якості та виконання вимог, перелічених у Керівництві ISO 34.

Достовірність результатів забезпечується за допомогою CRMs, SRMs або міжлабораторних порівняльних випробувань.

Примітка. CRMs для підрахунку соматичних клітин

бувають недоступні, тому наводимо приклади відповідних процедур для підготовки IRMs. Найкращими IRMs за складом є ті, які максимально наближені до натурального молока.

3.14.2 Підготовка внутрішніх референтних матеріалів (IRM):

а) шляхом додаванням суспензії лейкоцитів бика:

змішують 1000 см³ стерилізованого або ультрапастеризованого молока, що містить низький рівень соматичних клітин, з 1 см³ поліпропілену 2000 та 0,4 г бронополу. Також додають необхідну кількість відповідної суспензії лейкоцитів до різних порцій суміші, щоб отримати відповідний діапазон кількості клітин;

б) шляхом мікрофільтрації:

до свіжого молока слід додати бронопол до кінцевої масової частки 0,02%. Після чого провести знежирення молока в сепараторі відокремлення вершків до масової частки жиру нижче 0,1%. Знежирене молоко концентрують у 20 разів, застосовуючи тангенціальну мікрофільтрацію через мембрану з розміром пор 0,8 мкм, в результаті чого отримують порцію з високим вмістом соматичних клітин (HCM) та порцію з низьким вмістом соматичних клітин (LCM). Ці порції HCM та LCM змішують у необхідних кількостях, щоб отримати 5–8 порцій молока з масовою часткою жиру 3,5% та різними рівнями клітин, що охоплюють діапазон щодо кількості соматичних клітин, який може бути визначений;

с) приготування центрифугуванням:

до свіжого молока слід додати бронопол до кінцевої

масової частки 0,02%. Після чого фільтрують через металевий фільтр з розміром пор 0,5 мм. Знежирюють відфільтроване молоко центрифугуванням при радіальному прискоренні 40 г протягом 10 хв, щоб отримати вершки, знежирене молоко та осад. Змішують знежирене молоко та осад в необхідних кількостях, щоб отримати від 5 до 8 порцій молока з різним рівнем кількості клітин, що охоплюють діапазон щодо кількості соматичних клітин, який може бути визначений. Якщо потрібно, додають вершки, щоб отримати порції з масовою часткою жиру $3,3\% \pm 0,3\%$. Отримані зразки розділяють на окремі проби і нагрівають їх до 120°C і 10^5 Па протягом 3 хв.

Умови зберігання та час зберігання підготовлених еталонних матеріалів мають бути належним чином перевірені. Термін придатності – один місяць.

3.15. Присвоєння референтних значень

Референтні значення слід визначати шляхом проведення повторного аналізу за допомогою еталонного методу, описаного в ISO 13366-1/IDF 148-1, принаймні в двох різних лабораторіях.

З метою усунення випадкових відхилень за проведення підрахунку рівня вмістимих клітин з часом передбачається проводити паралельний повторний підрахунок калібрувальних зразків за інструментальною методологією точно відкаліброваного набору калібрувальних зразків, що може зіграти цінну допоміжну роль у зменшенні коливань рівнів підрахунку з часом.

Зазвичай слід знаходити звукову конгруентність, тобто максимальна різниця між результатами еталонного методу та інструментальними підрахунками для окремих калібрувальних

зразків має складати менше 10%. У таких випадках отримані значення еталонного методу та інструментальний підрахунок можуть поєднуватися, в результаті чого результат еталонного методу має бути включений з ваговим коефіцієнтом щонайменше 0,5 до призначеного еталонного значення.

У випадках, коли результати підрахунку в тестових зразках мають використовуватися для перевірки на відповідність офіційним обмеженням, слід отримати дозвіл компетентних органів щодо процедури присвоєння контрольних значень.

3.16. Умови зберігання та термін придатності за періоду зберігання

Умови зберігання та термін придатності стандартних зразків повинні пройти відповідне підтвердження. Як правило, мінімальний термін придатності – один місяць. Хімічну консервацію проводять у відповідності з типом і процесом консервації застосованого консерванту для зразків.

3.17. Процедура калібрування

Перед калібруванням слід переконатись, що прилад працює належним чином і відповідає вимогам щодо контролю холостих зразків (3.20.1), ефекту залишкового впливу (3.20.2), співвідношення обсягу реактиву і обсягу аналізованого зразка (3.20.3) та схожість (однаковість) (3.23).

Передбачається, що для калібрування можна застосовувати лінійну регресію. Застосовується процедура калібрування відповідно до ISO 8196-2/IDF 128-2, використовуючи не менше п'яти зразків для калібрувальних, які охоплюють відповідний діапазон кількості соматичних клітин.

Орієнтовні значення для відповідних діапазонів кількості

соматичних клітин калібрувальних зразків наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Орієнтовні значення для відповідних діапазонів калібрування

| Вид молока | Діапазон клітин/см³ |
|--|---------------------------------------|
| Коров'яче молоко (велика частина стада) | Від 100 000 до 1 000 000 |
| Коров'яче молоко (окремі тварини) | 100 000 - 2 000 000 |
| Козяче молоко | 200 000 - 2 000 000 |
| Овече молоко | 100 000 - 2 000 000 |
| Буйволове молоко | 100 000 - 2 000 000 |

Калібрування слід проводити принаймні раз на місяць.

3.18. Перевірка лінійності

Зв'язок між показаннями приладу та еталонними значеннями має бути лінійним у межах відповідного діапазону кількості соматичних клітин. Відхилення від лінійності можуть бути наслідком неспецифічних сигналів та ефектів збігу.

Спочатку виконують перевірку лінійності візуально. Кожного разу, коли відхилення від лінійності виявляються очевидними, використовують кількісний параметр як тест, щоб визначити, чи тенденція є прийнятною або ні.

Для цього може бути використано молоко з високим вмістом соматичних клітин, розведене порціями молока із низьким вмістом соматичних клітин, з метою отримання набору не менше ніж із п'яти зразків, що охоплюють діапазон концентрації.

Вимірюють молоко з високим та низьким вмістом соматичних клітин відповідно до пункту 3.20 не менше чотирьох разів та обчислюють середній результат для кожного зразка. Розраховують значення для проміжних зразків, виходячи із застосованого відношення концентрацій компонентів суміші в середньому на зразок, отримуючи в результаті очікуване значення для кожного зразка. Потім вимірюють всі зразки відповідно до розділу 3.20 не менше чотирьох разів і розраховують середнє арифметичне результатів вимірювань кожного зразка, яке еквівалентно середньому арифметичному результатів вимірювань зразків.

Наносять лінійну регресію з очікуваними значеннями у середньому на зразок на осі X та виміряними значеннями на зразок на осі Y . Обчислюють заключні значення $ei = pi - (bxi + a)$ із регресії. На графік наносять заключні значення ei (вісь Y) проти очікуваних значень (вісь X). Візуальний огляд точок даних зазвичай дає результат достатньої інформації про лінійність сигналу. Будь-який випадючий залишок має призвести до видалення відповідного результату та поновлення процесу розрахунку перед продовженням контролю.

При спостереженні крива може бути виражена відношенням rC за допомогою наступного рівняння:

$$rC = \frac{e_{\max} - e_{\min}}{M_{\max} - M_{\min}} \times 100$$

де

e_{\max} – числове значення максимального залишку від регресії;

e_{\min} – числове значення мінімального залишку від регресії;
 M_{\max} – числове значення верхнього вимірюючого значення
для набору відповідних зразків;

M_{\min} – числове значення нижнього вимірюючого значення
для набору відповідних зразків.

rC має бути менше 2%.

Примітка. Зазвичай можна поєднати необхідну перевірку лінійності з калібруванням.

3.19. Визначення

До проведення випробування зразок (див. 3.3 або 3.4) необхідно поступово нагріти до $(40 \pm 3)^\circ\text{C}$ і перемішати, перевертаючи. Зразок допустимо зберігати за кімнатної температури до випробування за умови його проведення протягом 30 хв після досягнення температури $(40 \pm 3)^\circ\text{C}$. Безпосередньо перед проведенням випробування зразок необхідно додатково ретельно перемішати.

Слід користуватися інструкціями виробника приладу для вимірювання зразків для аналізу.

Примітка. Збільшення тривалості підрахунку, яке пропонується в якості варіанту з деякими приладами, фактично збігається зі зниженням робочого коефіцієнта (див. 3.12). Це може поліпшити повторюваність і точність вимірювань.

3.20. Перевірка режиму працездатності за звичайної роботи

3.20.1. Контроль холостих зразків

Під контролем холостих зразків передбачається перевірка шляхом руху потоку через прилад для визначення забруднення домішками. Контроль холостих зразків слід провести

щонайменше п'ять разів. Середнє значення не має перевищувати 3000 клітин/см, а конкретні значення не мають перевищувати 8000 клітин/см. При стандартному випробуванні контроль холостого зразка необхідно виконувати максимум після 100 зразків, але не рідше ніж через 2 год.

3.20.2. Ефект залишкового впливу

Робоча частина від одного аналізованого зразка може вплинути на результат наступного зразка. Цей залишковий вплив необхідно перевіряти щомісяця за допомогою вимірювання щонайменше п'яти серій зразків для аналізу з кількістю соматичних клітин не менше 750000 в см³, після чого слід провести контроль двох холостих зразків. Обчислюють значення залишкового впливу ОВ, виражене у відсотках, за формулою:

$$OB = \frac{(\sum B_1 - \sum B_2)}{(\sum M - \sum B_2)} \times 100$$

де B_1 – числове значення показника для першого холостого зразка;

B_2 – числове значення показника для другого холостого зразка;

M – чисельне значення показання для аналізованого зразка.

Результуючий залишковий вплив має бути менше 2%.

Зазвичай розрахований залишковий вплив може бути автоматично компенсовано при стандартному випробуванні зразків.

Примітка. У деяких приладах залишковий вплив може спостерігатися також між непослідовними зразками, наприклад, при використанні циклу з інкубаційними ємностями.

3.20.3. Співвідношення об'єму реактиву і об'єму

досліджуваного зразка

Відповідне співвідношення обсягів буферного/фарбувального розчину і дослідного зразка молока дуже важливо для правильного підрахунку. Для цитометрів з обертовими дисками воно має контролюватися регулярно. Для цього можна використовувати змішування дозованих обсягів буферного/фарбувального розчину і дослідного зразка в попередньо зважених колбах або пробірках. Після зважування можливо розрахувати відношення. Розраховане відношення не має відрізнятися від заданого більш ніж на 5%.

3.21. Контрольні виміри

3.21.1. Контрольний зразок молока

Вимірювання контрольних зразків із заданими значеннями для контрольного молока призначене для перевірки короткочасної стабільності приладу. Використовують контрольне молоко із середнім, а також переважно високим (більше двох середніх значень) числом соматичних клітин у відповідному діапазоні підрахунку.

Для отримання відповідної проби контрольного молока можна скористатися методикою приготування референтних матеріалів (див. 3.14.2). Альтернативою є вибір відповідних проб для аналізу зі звичайних аналізованих партій і подальше приготування комбінованого молока з додаванням відповідних консервантів (див. 3.5). Ці проби до використання зберігають за температури 0°C–6°C. Слід уникати заморожування проб контрольного молока. Необхідно врахувати, що термін використання незаконсервованих проб в основному обмежений одним або двома днями після приготування.

3.21.2. Встановлення значень контрольних зразків молока

Проводять аналіз щонайменше 10 контрольних проб (по два паралельних вимірювання для кожної проби) на каліброваному приладі. З результатів обчислюють межу збіжності r відповідно до ISO 8196-2. За умови, що розраховане значення менше, ніж встановлене значення збіжності, вказане в 3.27.1, обчислюють середньоарифметичне значення отриманих результатів і визначають цей результат як значення контрольної проби молока.

3.21.3. Використання контрольних зразків молока

Контрольні перевірки мають проводитися на початку робочого дня і постійно (щонайменше три рази на годину) при стандартному аналізі проб. Контрольні проби молока не повинні бути репрезентативними для аналізованого молока і підлягати тій же процедурі попередньої обробки проб і аналізу, що і проби для аналізу.

Для правильного моніторингу стабільності приладу можна використовувати контрольну схему відповідно до ISO 8196-2. Тому встановлене значення контрольної проби молока слугує еталонним значенням. Необхідно вжити відповідних заходів, якщо одне або більше з отриманих значень виходить за рамки меж для окремого результату або середнього арифметичного значення.

3.22. Додатковий контроль за допомогою приладу

Деякі виробники приладів пропонують зразки зі штучними частинками для використання в щоденному контролі за допомогою приладу.

3.23. Схожість (однаковість)

Перевірку збіжності здійснюють кожен робочий день при запуску приладу відповідно до інструкції виробника. Можна використовувати контрольні зразки молока. За проведення стандартного випробування великої кількості зразків на обладнанні високої продуктивності рекомендується під час запуску проводити 10 дублюючих визначень в контрольному зразку. Крім того, рекомендується перевірити двічі 20 різних окремих зразків для аналізу при послідовному виконанні через регулярні інтервали, тобто приблизно один раз на тиждень. Відносне стандартне відхилення збіжності розраховують відповідно до ISO 8196-2. При отриманні значень, що перевищують встановлені в пункті 3.27.1, необхідно вжити відповідних заходів.

3.24. Внутрішньолабораторна відтворюваність

Для приладів, що мають ідентичну систему калібрування, слід перевіряти внутрішньолабораторну відтворюваність (див. 3.27.2), зазвичай в межах однієї лабораторії з декількома приладами. Термін «внутрішньолабораторна відтворюваність» поширюється на аналізи, виконані в одній і тій же лабораторії, з використанням одного і того ж методу, на ідентичному матеріалі для аналізу, за можливості різними операторами, що використовують різні прилади, в різний час (протягом декількох годин). Отримані під час перевірки збіжності (див. 3.23), окремі результати для контрольних зразків молока можуть бути використані також для перевірки внутрішньолабораторної відтворюваності. За отримання значень, що перевищують встановлені в 3.27.1, необхідно вжити відповідних заходів.

3.25. Міжлабораторні звірення

Участь в міжлабораторних звірваннях на якість проведення випробувань відповідно до ISO/IEC17043, як мінімум, два рази на рік, є необхідною частиною схеми забезпечення якості флуорооптоелектронного підрахунку соматичних клітин. Кількість учасників має бути не менше 10. Відносний діапазон підрахунку повинен охоплювати щонайменше 10 вибірок, які повинні бути запропоновані для подвоєного аналізу, причому з кожної посудини для відбору зразків відбирають два зразки.

3.26. Особливі умови при використанні молока різних видів сільськогосподарських тварин

Рекомендується перевіряти відсутність значного впливу підвищеної концентрації жиру і білка, додаючи, наприклад, вершки і ультраконцентрат. За виявлення значного впливу необхідно провести регулювання приладу і/або методики підрахунку відповідно до рекомендацій виробника приладу.

За необхідності використовують такі підгонки:

- a) попереднє розведення дослідного зразка;
- b) використання більш концентрованого фарбувального розчину;
- c) регулювання кількості буферного/фарбувального розчину;
- d) зміна температури дослідного зразка;
- e) збільшення часу проходження через проточну кювету;
- f) регулювання математичної обробки отриманого розподілу амплітуди імпульсу.

а) Коров'яче молоко

Для коров'ячого молока з високим вмістом жиру і білка необхідно проводити перевірки на можливий їхній вплив за підрахунку соматичних клітин.

б) Козине молоко

Соматичні клітини козиного молока значно менші за соматичні клітини коров'ячого молока. Додатковий клітинний матеріал, такий як цитоплазматичні частки, може створювати додаткові перешкоди. Для отримання належної вибірковості необхідно враховувати цей фактор. Однак козине молоко можна аналізувати за калібрування флуорооптоелектронних лічильників на коров'яче молоко за умови, що калібрувальний набір охоплює відповідний діапазон чисел соматичних клітин і загальний вміст сухих речовин молока не дуже високий. Уміст соматичних клітин в козиному молоці і його діапазон, наприклад, в залежності від періоду лактації, зазвичай вище вмісту соматичних клітин в коров'ячому молоці, і на нього меншою мірою впливає здоров'я вимені.

с) Овече молоко

При флуорооптоелектронному підрахунку соматичні клітини в овечому молоці мають такий же вигляд, що і в коров'ячому молоці. Однак овече молоко можна аналізувати за калібрування флуорооптоелектронних лічильників на коров'яче молоко за умови, що калібрувальний набір охоплює відповідний діапазон чисел соматичних клітин і загальний вміст сухих речовин молока не дуже високий. Уміст соматичних

клітин в овечому молоці відповідає вмісту соматичних клітин в коров'ячому молоці або може бути вищим.

d) Буйволине молоко

При флуорооптоелектронному підрахунку соматичні клітини в буйволиному молоці мають такий же вид, що і в коров'ячому молоці. Уміст жиру і білка може бути значно вищий, що вимагає проведення коригування результатів перевірки за можливого впливу цього фактору на результати аналізу.

3.27. Прецизійність

Примітка. Попередні оцінки прецизійності, наведені нижче, були отримані за перевірки якості проведення аналізу коров'ячого молока. Значення для молока інших видів можуть бути менш інформативними.

3.27.1. Схожість (подібність)

Абсолютна різниця між двома незалежними окремими результатами аналізів r , отриманими з використанням одного і того ж методу на ідентичному уже згадуваному матеріалі, в тій же лабораторії, одним і тим же оператором, що використав те ж саме обладнання в короткий проміжок часу, не має більш ніж в 5% випадків перевищувати значення, наведені в таблиці 5.

3.27.2. Внутрішньолабораторна відтворюваність

Абсолютна різниця між двома незалежними окремими результатами аналізів R_{intra} , отриманими з використанням одного і того ж методу, на ідентичному уже згадуваному матеріалі в тій же лабораторії, за можливості різними операторами, які використовували різні прилади в різний час (протягом декількох годин), не має більш ніж в 5% випадків перевищувати значення, наведені в таблиці 6.

Таблиця 5

Схожість (подібність) значень

| Рівень числа клітин, клітина/см | $Sr, \%$ | r , клітина/см |
|---------------------------------|----------|------------------|
| 150000 | 6 | 25000 |
| 300000 | 5 | 42000 |
| 450000 | 4 | 50000 |
| 750000 | 3 | 63000 |
| 1500000 | 3 | 126000 |

Таблиця 6

Значення внутрішньолабораторної відтворюваності

| Рівень числа клітин, клітина/см | $Sr, \%$ | r , клітина/см |
|---------------------------------|----------|------------------|
| 150000 | 7 | 29000 |
| 300000 | 6 | 50000 |
| 450000 | 5 | 63000 |
| 750000 | 4 | 84000 |
| 1500000 | 4 | 168000 |

3.27.3. Відтворюваність

Абсолютна різниця між двома незалежними окремими результатами аналізів R, отриманими з використанням одного і того ж методу, на ідентичному уже згадуваному матеріалі, в різних лабораторіях, протягом короткого проміжку часу, не має більш ніж в 5% випадків перевищувати значення, наведені в таблиці 7.

Значення відтворюваності

| Рівень числа клітин, клітина/см | $Sr, \%$ | r , клітина/см |
|---------------------------------|----------|------------------|
| 150000 | 9 | 38000 |
| 300000 | 8 | 67000 |
| 450000 | 7 | 88000 |
| 750000 | 6 | 126000 |
| 1500000 | 6 | 252000 |

3.28. Протокол випробування

У протоколі випробування повинні бути вказані:

- a) вся інформація, необхідна для повної ідентифікації зразків;
- b) метод відбору зразків, якщо відомий;
- c) дата відбору зразків;
- d) вид зразка; зазначено консервант у разі його використання;
- e) використаний метод випробування;
- f) всі робочі подробиці, що відрізняються від основних положень цього стандарту, які могли мати вплив на результати випробування/нь;
- d) результат/и випробування, в тисячах клітин на см³, або якщо проводилася перевірка збіжності, то остаточний отриманий наведений результат випробування.

4. КОНТРОЛЬ ВМІСТУ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН

4.1. Загальні дані про соматичні клітини молока

Соматичні клітини – клітини тіла тварини, що знаходяться в молоці: злушені клітини епітелію молочної залози, лейкоцити та макрофаги.

В процесі еволюції було сформовано багаторівневу систему захисту молочної залози від мікроорганізмів та інших хвороботворних впливів. Умовно її можна розділити на три групи факторів: механічні (сфінктер дійки, цистернальна розетка, складки епітелію, злущування верхніх шарів епітеліальних клітин); біохімічні (вміст в молоці речовин з бактеріостатичними властивостями – ненасичені жирні кислоти, лізоцим, система лактопероксидаза-тіоціанат-пероксид водню, лактоферин та ін.) та клітинні (білі кров'яні тільця – лімфоцити, моноцити, нейтрофільні лейкоцити).

Суть клітинного захисту полягає в фагоцитозі – поглинанні чужорідних клітин гістіоцитами, а також індукції специфічної імунної відповіді. Після проникнення мікроорганізмів в молочну залозу білі кров'яні тільця виходять з кров'яного русла для знищення чужорідного агента.

У здорової корови вміст соматичних клітин не перевищує 100 тис./мл та представлений здебільшого макрофагами (лімфоцити, моноцити) – 66-88%, вміст нейтрофільних лейкоцитів не перевищує 11%.

Якщо системи локального захисту не здатні відновити гомеостаз організму, розвивається запальний процес, відбувається активна міграція лейкоцитів з крові в ділянку запалення, як наслідок – їхня частка в структурі соматичних

клітин зростає до >90%, а загальна кількість клітин в молоці перевищує 200 тис./мл.

Результатами лабораторних досліджень було доведено, що у 75% тварин збільшення КСК було зумовлено інфікуванням, щонайменше, однієї чверті вимені.

Побутує думка, що окрім маститу на КСК мають вплив вік тварини, стадія лактації, продуктивність, кратність та рівномірність інтервалів між доїннями, стрес, повноцінність і збалансованість годівлі, сезон року та багато інших чинників.

Вік тварин. В стадах, вільних від інфекційних збудників маститу, вік тварин не має вірогідного впливу на КСК. У здорових корів-первісток реєструють показники в межах 50-100 тис./мл, корів другої та більше лактацій – 50-200 тис./мл. В неблагополучних стадах з віком тварини збільшується ризик та частота захворювання субклінічним маститом, і, як наслідок, у таких тварин збільшується КСК.

Стадія лактації. В молозивний період КСК є фізіологічно вищою, проте зменшується до 3-10 доби після отелення. На швидкість зменшення вмісту соматичних клітин значний вплив має продуктивність тварин – чим швидше зростає продуктивність, тим швидше зменшується КСК.

За дотримання правил доїння, утримання та годівлі з тривалістю лактації вміст соматичних клітин в молоці збільшується незначно та не перевищує верхню межу норми. Однак із збільшенням ризику та частоти захворювання маститом впродовж лактації КСК може зростати лінійно.

У тварин з подовженим лактаційним періодом рівень СК

може бути вищим через ефект концентрації – зменшується продуктивність тварини.

Продуктивність. Існують наукові твердження про те, що чим вища продуктивність, тим менший вміст соматичних клітин в молоці. Однак інші дослідники доводять, що в здорових тварин вміст СК не залежить від рівня продуктивності, а нижчий вміст КСК в молоці з високопродуктивних стад зумовлений кращим рівнем менеджменту ферми.

Кратність доїння. Збільшення кратності доїння супроводжується зниженням КСК. Такий ефект зумовлений тим, що під час доїння ми виводимо з молочної залози не лише молоко, а й бактерії, які потрапили в дійковий канал. Чим частіше відбувається доїння, тим менше бактерій в молочної залозі, а відповідно – зменшується міграція білих кров'яних тілець. Особливо вагомим є вплив кратності доїння в стадах із значним поширенням субклінічного маститу.

Інтервал між доїннями. В господарствах з нерівномірними інтервалами між доїннями КСК має тенденцію до збільшення в молоці вечірнього надою порівняно з ранковим. Інтервал між вечірнім і ранковим доїнням більший на 4 год, відповідно, кількість молока теж більша, а КСК менша. Це необхідно враховувати при відборі індивідуальних проб молока для дослідження. Для коректної інтерпретації результатів відбір проб потрібно виконувати в один і той же час.

Стрес. Немає жодних підтверджень прямого впливу стресу (теплого, технологічного тощо) на рівень соматичних клітин в молоці. Однак за тривалої дії стрес-факторів може

знижуватися резистентність організму та підвищуватися ризик інфікування молочної залози і, як наслідок, захворюваності маститом, що буде призводити до зростання КСК в молоці.

Повноцінність і збалансованість годівлі має опосередкований, але дуже значний вплив через стійкість організму тварини до мікроорганізмів.

Фактор годівлі найбільше проявляється в сухостійний період і на початку лактації. В цей час споживання корму падає, потреба в поживних речовинах росте, і корова мусить адаптуватись до змін у годівлі. Неправильна годівля може призвести до таких захворювань, як кетоз і ацидоз, і, відповідно, до пригнічення імунної системи. Забруднення кормів мікотоксинами, а також дефіцит вітамінів і мінералів також можуть позначитись на імунній функції. Наприклад, для скорочення м'язу сфінктера дійки важливий кальцій. Саме його не вистачає в організмі при гіпокальціємії, тому бактерії безперешкодно можуть проникати у вим'я.

Сезон року. Сезонність у КСК виражена лише у господарствах з низьким рівнем управління фермою і зумовлена погіршенням умов утримання, годівлі тварин та іншими чинниками в осінньо-зимовий і весняний періоди, які негативно впливають на загальну резистентність організму і локальну стійкість молочної залози.

Варто зауважити, що вміст соматичних клітин в збірному молоці може відрізнятись день від дня в межах до 30% через вплив сукупності вищеперахованих факторів.

4.2. Негативний вплив зростання КСК

Збільшення кількості соматичних клітин в молоці має негативний вплив на якість молока та економічну ефективність функціонування ферми.

Соматичні клітини спричиняють низку змін у властивостях молока, які прискорюють його псування, харчових властивостях та якості, важливих для виробництва молочних продуктів, зокрема сиру. В молоці з високим вмістом соматичних клітин рівень казеїну може зменшуватися з 2,6% до 2,1%, що вимагає збільшення кількості молока сировини на 6% для виробництва однакової кількості кінцевого продукту. В такому молоці рівень кальцію нижчий на 1/3, що призводить до уповільнення формування сирного згустку, втрат жиру, збільшення вологості. Внаслідок цього сир, вироблений із молока з підвищеною кількістю соматичних клітин, не може набути очікуваного смаку, запаху та текстури. Дослідження, проведені на молоці корів голштинської породи, здосьому в періоди до та після випадку маститу, показали, що хоча зразки й були пастеризовані та зберігались в однакових умовах, їхні біохімічні показники значно відрізнялися. Наприклад, гідролітичний розпад казеїну в молоці з вищою кількістю соматичних клітин відбувався у 2–3 рази швидше, ніж у молоці з низькою кількістю соматичних клітин. Тобто самі ензими, що потрапляють до молока під час маститу, можуть викликати зміни смаку, запаху, зовнішнього вигляду та тривалості зберігання продуктів.

Не слід забувати й про те, що молоко, контаміноване патогенами чи токсинами, може бути небезпечним для здоров'я

споживачів, а хронічні субклінічні мастити – стати причиною виникнення в бактерій гену резистентності.

Високий уміст соматичних клітин пов'язаний зі зменшенням надою. Зниження молочної продуктивності спостерігають щонайменше за тиждень до того, як буде виявлено клінічний мастит. Його наслідки особливо тяжкі, коли інфекція виникає в ранній період лактації та до досягнення піку молочної продуктивності. Більше того, ці корови вироблятимуть менше молока протягом другої половини лактації порівняно зі здоровими. Тварини, які хоча б раз хворіли на мастит, не повертаються до попереднього рівня молочної продуктивності.

За даними голландських дослідників, подвоєння КСК від 50 тис. кл./мл призводить до втрати добової продуктивності на 0,7 кг за добу. Таким чином, навіть в господарстві, що виробляє молоко екстра ґатунку з вмістом КСК близько 400 тис. кл./мл, щоденно втрати надою від кожної тварини складають 2 кг (табл. 8).

Окрім зменшення молочної продуктивності, висока КСК в молоці призводить до зменшення ґатунковості, а відповідно, й ціни молока.

На фермах з високим рівнем СК в молоці ризик виникнення клінічного маститу значно вищий, а відповідно, збільшується використання антибіотиків для лікування хворих тварин, що призводить до підвищення витрат на препарати, управління хворими тваринами, зменшення товарності молока та зростання ймовірності потрапляння антибіотиків у збірне молоко.

Втрати молочної продуктивності залежно від КСК в молоці

| КСК/мл | Втрата молока кг/ корова/день | Втрата молока кг/ 100 корів/ день | Втрата молока кг 100 корів/ рік |
|---------------|--|--|--|
| 50 000 | 0 | 0 | 0 |
| 100 000 | 0,7 | 70 | 21,350 |
| 200 000 | 1,4 | 140 | 42,700 |
| 400 000 | 2,1 | 210 | 64,050 |
| 800 000 | 2,8 | Etc. | |

4.3. Методи визначення КСК в умовах господарства

Для визначення КСК в умовах господарства існує значний арсенал методів, приладів та діагностикумів. Усі вони базуються на безпосередньому підрахунку кількості клітин або визначенні змін у властивостях молока, пов'язаних із субклінічним маститом.

В сучасному доїльному обладнанні часто є опції автоматичного аналізу змін кольору та електропровідності молока з визначенням КСК під час кожного доїння. Однак численні результати досліджень свідчать про недостатню їхню точність. Тому для аналізу ситуації в стаді необхідно регулярно відбирати індивідуальні зразки молока та проводити дослідження в сертифікованих лабораторіях або безпосередньо на фермі. Кратність досліджень встановлюється власником ферми та залежить від поширеності маститів, рівня СК в збірному молоці, але має бути не меншою за один раз на місяць.

Найбільш розповсюдженим методом для визначення КСК в окремих чвертях вимені корів є швидкі маститні тести: димастинова проба (за Мутовіним В.І.), мастидинова проба (за Оксамитним Н.К.), проба Уатсайда, Каліфорнійський тест, проба з мастопримом, з кено-тестом, з маститодіагностом та ін. Основою цих реактивів є поверхнево-активні речовини (ПАР), здатні взаємодіяти з ядрами соматичних клітин з утворенням пластівців або желеподібного згустку. Чим більше соматичних клітин в секреті вим'я корови, тим більше буде пластівців або густішою буде слизиста консистенція в даній реакції.

Проба з димастином (за В.І. Мутовіним). Димастин – це порошок, до складу якого входять поверхнево-активна речовина (сульфонат), індикатор (фенолрот), гіпосульфит і глауберова сіль. В сухому місці активність димастину зберігається протягом кількох років. Застосовується він у вигляді 5%-го розчину в дистильованій воді. Дослідження проводять на молочно-контрольних пластинках біля корів. Для цього з кожної частки вим'я видоюють по 1 мл молока і додають 1 мл розчину димастину з пляшки піпеткою-автоматом. Суміш перемішують дерев'яною, скляною або пластмасовою паличкою протягом 30 с. Реакцію оцінюють за утворенням згустку і забарвленням суміші.

Утворення желеподібного згустку пов'язане з вмістом у молоці великої кількості лейкоцитів. Його консистенцію позначають хрестами (від одного до чотирьох): один хрест (+) – дуже слабкий згусток, суміш молока з реактивом тягнеться за паличкою у вигляді нитки; два хрести (++) – слабкий згусток; три хрести (+++) – желе має консистенцію сирого курячого яйця,

яке важко викинути паличкою із заглибини пластинки; чотири хрести (++++) – дуже щільний згусток, який легко викидається паличкою із заглибини пластинки.

Реакція, позначена трьома хрестами, вважається сумнівною, чотирма – позитивною.

За допомогою димастину визначають також зміну реакції молока. Оранжеве його забарвлення свідчить про слабокислу реакцію (молоко від здорових корів), червонувате (червоне, малинове, яскраво-червоне) – лужну і жовте – про кислу реакцію (молоко від хворих на мастит корів).

Проба з мастидином (за М.К. Оксамитним). До складу мастидину входять поверхнево-активна речовина (сульфонол) та індикатор (бромкрезолпурпур). Застосовується у 2%-й концентрації в дистильованій воді. Дослідження проводять також на молочно-контрольних пластинках безпосередньо біля тварин. Для цього в кожну заглибину пластинки до контрольної лінії з відповідної частки вим'я надаюють по 1 мл молока і додають 1 мл розчину мастидину з пляшки піпеткою-автоматом. Молоко з реактивом перемішують дерев'яною, скляною або пластмасовою паличкою протягом 15-20 с. Під час обліку реакції враховують забарвлення суміші та утворення желеподібного згустку.

Колір молока здорових корів з мастидином світло-бузковий (димчастий), при лужній реакції – фіолетовий і при кислій – майже білий (молоко від хворих на мастит корів).

Колір суміші має лише орієнтовне, допоміжне значення, а утворення згустку – основне діагностичне значення для оцінки результатів дослідження. Утворення желеподібного згустку

молока з мастидином визначають так само, як і з димастином.

Проба з маститодіагностом (за Й.С. Загаєвським).

Для приготування маститодіагносту в 1 л дистильованої води, підігрітої до 70-75°C, розчиняють 50 г триполіфосфату натрію і 300 г порошку сульфонулу. Коли суміш розчиниться, її фільтрують крізь марлевий фільтр і після охолодження до 20-25°C додають до неї 0,2 г водорозчинного бромтимолблау і 5 мл 1%-го спирто-водного розчину розолової кислоти. Після 3-5 хв збовтування препарат готовий до застосування. За температури від 1 до 5°C активність маститодіагносту не знижується протягом 3 років.

У разі запального процесу в молочній залозі суміш з 1 мл молока і 1 мл маститодіагносту у пробірці при перемішуванні протягом 1-2 хв набуває слизистої тягучої консистенції, що стікає з стінок пробірки у вигляді суцільного желеподібного згустку або слизових смужок чи тяжів. Якщо гомогенна суміш не змінюється, це свідчить, що запалення немає.

Проба з Profilac Reagent. У луночку молочно-контрольних пластин (МКП-1 або МКП-2) надоюють $1 \pm 0,5$ см³ секрету і додають таку ж кількість реактиву. Секрет і реактив перемішують склянкою або дерев'яною паличкою протягом 15 с. Оцінюють реакцію за консистенцією і кольором суміші.

Негативна реакція (до 300 тис. соматичних клітин в 1 мл) – суміш однорідна, без згустків і слизових включень, від апельсинового до жовтого кольору.

Сумнівна реакція (від 300 до 500 тис. соматичних клітин в 1 мл) – суміш інтенсивно-жовтого кольору та спостерігаються сліди утворення желе по краю пластини.

Позитивна реакція (більше 500 тис. клітин в 1 мл) – утворюється желеподібний згусток, який фіксується до дна пластини. Чим більша кількість соматичних клітин у зразку, тим щільніший згусток утворюється. Колір суміші змінюється на червоний і червоний з синюватим відтінком

Проба з «Альфа-тестом» від DeLaval.

В лунки молочно-контрольної пластинки надоюють по 1 мл молока, додають реактив в такій самій кількості, ретельно перемішують. Оцінку реакції проводять за схемою, наведеною в таблиці 9.

Таблиця 9

Оцінка реакції при дослідженні молока з «Альфа-тестом»

| № п/п | Консистенція суміші | КСК, тис. шт/см ³ |
|-------|---|------------------------------|
| 1 | Молоко не змінює консистенцію | 0-200 |
| 2 | Формується невеликий згусток, який впродовж 30 с зникає | 201-500 |
| 3 | Невеликий згусток, який не зникає впродовж 30 с | 501-1500 |
| 4 | Щільний згусток | ≥1500 |

Проба з EIMU-тестом. Проводиться аналогічно до попередніх. За негативної реакції (до 500 тис. с.к./мл) суміш однорідна, без згустків і слизових включень або спостерігаються сліди утворення желе по краю пластини. За позитивної реакції (понад 500 тис. кл./мл) утворюється желеподібний згусток, який фіксується до дна пластини.

Контроль змін електропровідності молока лежить в основі

біофізичних методів визначення кількості КСК приладами Mas-D-Тес, «Електронним визначником маститу у корів Draminski» та ін.

Використання приладу Mas-D-Тес (Рис. 8)

Зразок молока, після попередньої підготовки вимені, здоюють на бокову поверхню приладу, запобігаючи утворенню пухирців повітря, поки молоко не буде вилитись із зливного отвору. Через 5 с світловий індикатор видає результат тесту. Оцінювання проводиться за шкалою від 0 до 9. Ціна поділки відповідає 100 тис. соматичних клітин. Окрім цього, звертають увагу на колір індикатора. За вмісту КСК до 400 тис. він світиться білим кольором, за більшого – червоним.



Рисунок 8. Прилад Mas-D-Тес для визначення КСК

Для діагностики субклінічного маститу «Електронним визначником маститу у корів» до мітки у чашці приладу послідовно з кожної чверті вим'я здоюють секрет і визначають електричний опір в умовних одиницях за стійкими показниками

на табло. Отриманий результат оцінюють за числовою величиною та різницею між найбільшим і найменшим показниками електричного опору молока з різних чвертей вим'я. До здорових зараховують корів з показниками числової величини електричного опору молока 340 у.о. і більше та різницею між показниками чвертей вим'я 50 у.о. й менше. Хворими вважають тварин з показниками електричного опору секрету молочної залози 260 у.о. і менше та з різницею між найбільшим та найменшим показниками окремих чвертей 100 у.о. і більше. Сумнівним є діагноз на субклінічний мастит за показників електричного опору молока в межах 270–330 у.о. та різниці між показниками чвертей 60–90 у.о.

Для діагностики субклінічного маститу *приладом експрес-діагностики маститу (ПЕДМ)* у луночки послідовно з кожної чверті вим'я здоюють секрет, позитивно вважають реакцію після загорання контрольної лампочки біля однієї з лунок.

Біохімічні методи дослідження включають визначення змін рН секрету вим'я (проби з бромтімолблау, фенолротом, бромкрезолпурпуром та ін.), виявлення у секреті кров'янистих пігментів і хлоридів (проба на хлориди, бензидинова та піримідинова проби), визначення вмісту ферментів (каталази, редуктази, фосфатази і пероксидази), лактоальбуміну, лактози та лізоциму.

Визначення вмісту КСК тест-смужками LDH-Milk

Суть методу полягає у визначенні в молоці вмісту лактатдегідрогенази (LDH) та кореляції її з вмістом соматичних клітин.

Тест-смужку опускають в молоко на 2 с, очікують 2 хв та

порівнюють при хорошому освітленні з кольоровою шкалою (Рис. 9).

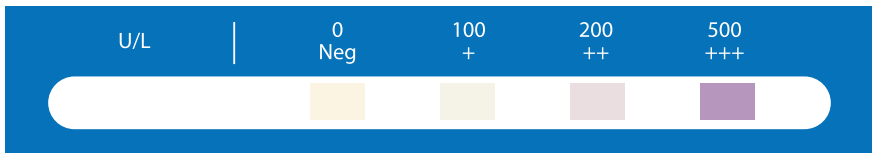


Рисунок 9. Шкала оцінки тесту LDH-Milk

Чим темніший колір, тим вища концентрація LDH у молоці, що вказує на більший вміст КСК.

Результат (+) вказує на необхідність майбутнього моніторингу, щоб забезпечити зменшення статусу інфекції. Можливо, вам потрібно буде знову взяти зразок через тиждень.

Результат (++) вказує на вміст соматичних клітин понад 200 тис/мл, (+++) – понад 500 тис/мл.

Слід пам'ятати, що ШМТ можуть мати похибки в точності визначення КСК до 30%. Для отримання більш об'єктивних результатів застосовують інструментальні методи визначення КСК (Fossomatic, Ecomilk, DCC Delaval) та як контрольний – прямий підрахунок клітин під мікроскопом.

4.4. Алгоритм дій при збільшенні вмісту соматичних клітин в збірному молоці

Основною причиною збільшення КСК в збірному молоці є потрапляння молока від тварин, хворих на субклінічний та клінічний мастит.

Доїти тварин, хворих на клінічний мастит, в збірне молоко заборонено, тому багато європейських рекомендацій не вважають збільшення захворюваності на клінічний мастит причиною

збільшення кількості соматичних клітин. Проте, в умовах ферм, оператори машинного доїння інколи не дотримуються протоколу доїння та не приділяють належної уваги здоюванню та контролю перших цівок молока. Найпростішим способом контролю, чи дояться хворі на клінічний мастит тварини в загальну систему, є контроль чистоти молочних фільтрів (Рис. 10).



Рисунок 10. Екран контролю чистоти молочних фільтрів

Для визначення безпосередніх та сприяючих факторів збільшенню захворюваності маститом зручно користуватися протоколами вирішення проблем, розробленими в межах проекту Міжнародної фінансової корпорації (IFC) Ukraine Dairy Supply Chain Development Project (додаток 5 та 6).

Для швидкого зменшення КСК в збірному молоці існує просте вирішення – провести позачергову діагностику субклінічного та клінічного маститу, відділити хворих тварин (рис. 11). Такий крок дає можливість швидко покращити гатунковість молока, але призводить до зменшення товарності й жодним чином не вирішує проблему.



Рисунок 11. Алгоритм дій для зменшення кількості КСК в молоці

Для визначення безпосередніх причин зростання КСК слід відібрати зразки секрету молочної залози від хворих тварин, що не лікувалися антибіотиками, для бактеріологічного дослідження в сертифікованих, акредитованих лабораторіях або безпосередньо на фермі з використанням спеціальних середовищ та наборів.

При відборі зразків слід дотримуватися правил асептики та антисептики, щоб запобігти контамінації. Варто пам'ятати,

що якщо в зразку виявлено три та більше збудники, це свідчить про недотримання правил відбору чи транспортування зразків. Відповідно, результати дослідження не можуть бути інформативними для об'єктивної інтерпретації причин маститу.

За властивостями найбільш поширені збудники маститу поділяють на дві групи: контагіозні (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Trueperella pyogenes*, *Mycoplasma spp.*) та екологічні чи збудники з навколишнього середовища (*Streptococcus uberis*, *Enterococcus*, *Echerichia coli*, *Clebsiela spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas spp*). Вони мають значні відмінності, від яких залежать методи контролю. Резервуаром контагіозних бактерій є хворі тварини. Вони передаються від корови до корови під час доїння, через доїльне обладнання, руки оператора.

Збудники з навколишнього середовища потрапляють до вимені тварини, переважно, в проміжках між доїннями. Ризик захворюваності збільшується при порушенні умов утримання: перенасиченні секцій, недостатній кількості підстилки, брудних перегонних алейх тощо.

При виявленні контагіозних збудників першочергово потрібно звернути увагу на групування та черговість доїння тварин, дотримання протоколу доїння, якість роботи доїльного обладнання (Рис. 12, 13).

Для запобігання перезараженню всі інфіковані тварини (клінічно та субклінічно хворі) мають бути позначені прийнятим у господарстві способом, відділені в окремі групи та доїтися після здорових. Між доїннями окремих тварин слід проводити дезінфекцію доїльної гуми спеціалізованими

засобами (надоцтова кислота). Для підготовки вимені до доїння використовувати одноразові рушники.



Рисунок 12. Послідовність доїння корів на промисловій фермі

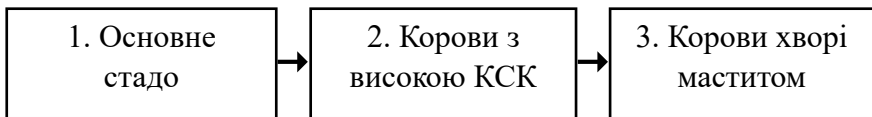


Рисунок 13. Послідовність доїння корів на малих фермах

При використанні багаторазових серветок потрібно контролювати якість прання та використовувати дезінфікуючі засоби. Коефіцієнт контагіозності (здатності до зараження)

золотистого стафілокока сягає 8 – тобто після доїння хворої тварини, без належної обробки дійкової гуми, через апарат можна заразити до 8 здорових тварин.

Важливим є дотримання протоколу доїння. Особливо використання одноразових рукавичок. Науковими дослідженнями доведено, що збудники маститу можуть персистувати на шкірі рук доярів. Відповідно, вони можуть бути фактором передачі.

Слід звертати увагу на дотримання регламенту технічного обслуговування доїльного обладнання. Тривале використання дійкової гуми призводить до утворення мікротріщин на ній, що може бути причиною подразнення шкіри вимені та погіршувати якість мийки та дезінфекції. Щонайменше двічі на рік слід відбирати змиви з дійкової гуми після миття та дезінфекції для оцінки її якості. Якщо виявляються патогенні бактерії, потрібно проводити ремонт та обслуговування обладнання. Причиною може бути недостатня кількість або недостатня температура гарячої води для мийки, неправильно підібрана кількість дезінфікуючого засобу, використання несертифікованих мийних та дезінфікуючих засобів, контамінація води, що використовується.

В разі якщо виявляються збудники з навколишнього середовища, перш за все слід контролювати чистоту тварин. Дослідження проводять один раз на тиждень під час доїння або годівлі тварин. Чистота вимені та бокових поверхонь стегон показує якість підстилки та лежаків. Чим чистіші тварини, тим менший ризик інфікування екологічними збудниками. Допустимою вважається кількість корів із балами 3,4 до

<20% для прив'язного утримання та <10% для безприв'язного утримання (Рис. 14, 15). Якщо кількість брудних тварин більша, потрібно покращити управління лежакми, збільшити кількість та якість підстилкового матеріалу.



Рисунок 14. Брудне вим'я корів (бал чистоти 3,4)



Рисунок 15. Вигляд збоку стегон тварин з балом чистоти 3,4

Стан кінцівок залежить від чистоти проходів, швидкості руху тварин та довжини стійл на прив'язі. Брудні кінцівки сприяють потраплянню збудників на шкіру молочної залози та, відповідно, збільшують ризик виникнення запалення молочної залози.

Вважається допустимим забруднення кінцівок бали у 3-4 <15% для прив'язного утримання, <50% для безприв'язного утримання (Рис. 16). Якщо стандарти не досягнуті, перевірте: чистоту проходів та зовнішніх зон, поводження з тваринами, чистоту в накопичувачі, розміри стійл, консистенцію калових мас.



Рисунок 16. Боковий вигляд кінцівок корів з балами оцінки чистоти 3,4

Певні екологічні збудники визначаються за особливих умов. Так, *Klebsiella spp.* частіше діагностується за використання, в якості підстилки, тирси хвойних порід дерев; *Streptococcus uberis* – соломи.

Значний вплив на чистоту тварин мають кліматичні умови. За підвищеної вологості, недостатнього повітрообміну підтримувати лежаки чистими та сухими значно важче.

На стійкість тварин до екологічних збудників має вплив стан обміну речовин. За гіпокальціємії зменшується тонус сфінктерів сосків, що призводить до збільшення інфікування молочної залози. За високого вмісту кетонових тіл погіршується резистентність організму тварин. Саме тому мастит, викликаний екологічними збудниками, частіше реєструється в післяродовому періоді.

План дій з інфікованими тваринами розробляють залежно від виявлених збудників, продуктивності тварини та фізіологічного стану.

Для низькопродуктивних корів з високою КСК в молоці тільних більше 6 міс. варто використовувати сухостійну терапію. Лікування таких тварин низькоефективне та недоцільне з економічної точки зору.

Хронічно хворих тварин краще вибракувати незалежно від продуктивності, так як вони потенційно є носіями збудників маститу, не чутливих до препаратів, що використовуються для лікування в господарстві.

Для інших тварин слід підбирати схеми лікування, базуючись на результатах бактеріологічного дослідження та визначення чутливості до антибіотиків (Рис. 17, 18).

Всі дані про застосування препаратів потрібно зберігати в журналі реєстрації хворих тварин або/та програмі управління стадом. Не рідше одного разу на місяць варто оцінювати ефективність протоколів лікування тварин та коригувати їх за потреби.



День 1

Легка та помірна форма

Почніть з пеніциліну VM чи ВЦВ

Гостра форма, корова хвора

Почніть з НПЗП та рідин хінолони ВВ +/-

День 2



Бактерії, чутливі до пеніциліну

Продовжуйте застосовувати пеніцилін

Грамнегативна бактерія

Продовжуйте

Стійкий до пеніциліну стафілокок

Клоксацилін, лінкоміцин чи відсутність лікування

Рисунок 17. Приклад протоколу лікування корів, хворих на мастит, якщо на фермі визначається збудник

Клінічні ознаки + оцінка тяжкості + послідуючі заходи



Почніть з пеніциліну
чи двокомпонентного
антибіотику

НПЗП +
рідини +
хінолони



Продовжуйте
наступного дня

Ніякого клінічного
одужання – змініть
лікування лише
один раз!
Не більше 2 активних
речовин для ВЦВ

Рисунок 18. Приклад протоколу лікування хворих на мастит корів, якщо бактеріологічне дослідження на фермі не проводиться

4.5. Програма контролю маститів

Всесвітня організація контролю маститів і якості молока пропонує для загального користування міжнародну версію рекомендованої програми контролю маститів, яка складається з 10 розділів із відповідними пунктами в кожному. Розглянемо концепцію програми контролю маститів на її основі.

1. Встановлення цілей, необхідних для досягнення здоров'я вимені. Проаналізувавши показники ферми за певний період (наприклад, останній рік), встановіть реалістичні цілі щодо зниження кількості соматичних клітин у збірному молоці або кількості випадків маститів. Скористайтеся порадами від вашого ветеринарного лікаря, персоналу, що працює з тваринами, дорадчих органів, компанії-переробника молока тощо.

Багато виробників в Україні досягають рівня соматичних клітин в збірному молоці 150-200 тис. Тому варто ставити амбітну ціль та досягати її. Варто пам'ятати, що кожне подвоєння КСК понад 50 тис. призводить до втрати 0,7 л молока за добу та чим вища кількість соматичних клітин – тим більша кількість інфікованих тварин знаходиться в стаді.

2. Підтримання чистого, сухого, комфортного середовища.

Упевніться в тому, що стадо утримується в комфортних умовах, розмір стійл та приміщення загалом відповідає кількості та розміру тварин, що тваринам чисто, сухо та комфортно, підтримується відповідний мікроклімат. На ділянках для випасу (якщо вони є) передбачені чисті та сухі місця для відпочинку. Упевніться, що тварини залишаються в стоячому положенні ще певний час після доїння (корми та вода у вільному доступі).

3. Належні процедури доїння.

До роботи з тваринами варто допускати доярок лише після навчання протоколу доїння. Причому оператор має не лише знати послідовність виконання маніпуляцій, а й розуміти, навіщо вони виконуються та яка їхня важливість в підтриманні здоров'я вимені та виробництві високоякісного, безпечного

молока. Бажано розміщувати протокол доїння в місцях відпочинку операторів машинного доїння та в доїльній залі. Проводьте огляд перед процедурою доїння, належно ставтесь до переддоїльної обробки вимені, доїння, післядоїльної обробки дійок.

4. Належне обслуговування та використання доїльного обладнання. Дотримуйтесь процедур регулярного обслуговування та оцінювання стану доїльного обладнання, вчасно проводьте заміну гумових або пошкоджених деталей. Відповідально ставтесь до процедур миття обладнання.

5. Належне ставлення до ведення документації. Ставтесь відповідально до документування всіх випадків клінічного маститу в стаді, обов'язково вказуючи всю інформацію з діагностики та лікування, а також ведіть записи (у письмовій чи електронній формі) індивідуального моніторингу кількості соматичних клітин та частоти виникнення субклінічних маститів.

6. Належний менеджмент клінічного маститу в період лактації. Вдаючись до допомоги з боку відповідних служб, розробіть та чітко дотримуйтеся протоколу лікування клінічного маститу. Лікування має бути проведено на основі діагностування причини (виявленні збудника) та з використанням відповідного терапевтичного протоколу. Дотримуйтеся періодів каренції ветеринарних препаратів та маркуйте тварин, які знаходяться на лікуванні, та обов'язково фіксуйте період очікування для молока та м'яса. За необхідності додатково перевіряйте молоко на наявність інгібіторів.

7. Ефективне управління у період сухостою.

Коригуйте раціони у період пізньої лактації для зменшення виробництва молока. Користуйтеся порадами ветеринарного лікаря чи інших дорадчих організацій в управлінні сухостійними тваринами. В стадах із значним поширенням контагіозних збудників маститу та недостатнім рівнем комфорту тварин під час сухостійного періоду доцільно використовувати коврову консервацію молочної залози.

На фермах з низьким рівнем захворюваності маститом та КСК в збірному молоці недоцільно використовувати сухостійну терапію антибіотиками для всіх тварин. Корів із низьким вмістом КСК в молоці запускають з використанням герметиків без антибіотиків. Для корів, що хворіли впродовж лактації або вміст СК перед запуском перевищує 200 тис., проводять консервацію.

8. Підтримання біобезпеки щодо контагіозних патогенів та продаж тварин із хронічним маститом. Проводьте періодичну процедуру дослідження індивідуальної кількості соматичних клітин. До отримання результатів досліджень утримувати та доїти нещодавно придбаних корів варто окремо. Корів, які не реагують на лікування, слід реалізовувати на забій або пожиттєво утримувати окремо. Обов'язково беріть до уваги стан здоров'я вимені телиць першого отелу, оскільки це може значно впливати на біобезпеку стада.

9. Регулярний моніторинг статусу здоров'я вимені. Проводьте регулярні моніторинги статусу захворюваності на клінічний мастит, враховуйте бактеріологію та повторні інфікування. Особливу увагу варто звертати на рівень контамінації серед корів-первісток. Аналізуйте тенденції та оновлюйте протоколи лікування відповідно.

10. Періодичний перегляд програми контролю маститів. Дослухайтеся до порад та кращих практик. Покроково переглядайте ваш підхід до досягнення мети та оновлюйте його. Запам'ятайте, що частота та тяжкість перебігу маститу на фермі та будь-які програми його контролю безпосередньо пов'язані з впровадженням кращих практик управління фермою. Вони мають регулярно вдосконалюватися та оновлюватися й відповідати сучасним тенденціям розвитку науки та технологій, адже кожне ваше рішення впливає на отримані прибутки або збитки.

5. Визначення змінної середньої геометричної величини для кількості соматичних клітин

Наказом №118/2019 встановлені порогові значення критеріїв, що мають індикативні показники кількості соматичних клітин і не встановлюють максимальних значень, при перевищенні яких сире молоко не може вводитися в обіг. З цією метою визначається змінна середня геометрична величина, для обрахунку якої беруться усі результати досліджень кількості соматичних клітин за останній тримісячний період, за формулою:

$$G = \sqrt[n]{x_1 * x_2 * \dots * x_n}$$

де n – кількість зразків за певний період, а x – результати досліджень за цей період.

В таблицях Excel формула для розрахунку виглядає наступним чином: = GEOMEAN(A1:A3), де A1 і A3 – це початкові та кінцеві мітки колонки зі значеннями.

В таблиці 11 нижче наведено приклад, як результати досліджень з січня по квітень використовуються для розрахунку

змінної середньої геометричної величини кількості соматичних клітин в березні та квітні кожного року.

ІТ-платформа Держпродспоживслужби «Молочний модуль» має функцію регулярного і автоматичного розрахунку середньої геометричної величини на основі результатів досліджень, збережених в Національній базі даних результатів лабораторних досліджень зразків, відібраних за Програмою контролю сирого молока. Молочний модуль дозволяє користувачам проводити статистичний аналіз результатів досліджень та відображає їх у вигляді графіків, таблиць та списку.

Таблиця 11

Приклад розрахунку змінної середньої геометричної величини для кількості соматичних клітин в березні і квітні кожного року

| Місяць | Кількість соматичних клітин (КСК) | |
|-----------------|--|---|
| | Результати досліджень | Розрахунок змінної середньої геометричної величини |
| Січень | КСК Результат #1 | *) |
| Лютий | КСК Результат #2 | *) |
| Березень | КСК Результат #3 | КСК Результат #1 КСК Результат #2 КСК Результат #3 |
| Квітень | КСК Результат #4 | КСК Результат #2 КСК Результат #3 КСК Результат #4 |

*) Розраховано з використанням результатів попередніх місяців, тому тут не відображається.

ДОДАТОК 1

(довідковий)

Фарбування мазків молока кіз

В.1 Розчини барвників для молока кіз [8]

В.1.1 Фіксатор Карнуа

В.1.1.1 Компоненти

Хлороформ 60 см³

Кислота оцтова кристалізована 20 см³

100% Етиловий спирт 120 см³

В.1.1.2 Приготування

По черзі додають хлороформ і кристалізовану оцтову кислоту в етиловий спирт і ретельно перемішують.

В.1.2

В.1.2.1 Розчин фарби пиронін Y-метилового зеленого

Пиронін Y 1,0 г

Метилловий зелений 0,56 г

Вода дистильована 196 см³

В.1.2.2 Приготування

По черзі додають пиронін Y і метилловий зелений до пляшки з демінералізованою водою і ретельно перемішують. Фільтрують через відповідний фільтр (5.2) і зберігають в коричневій скляній пляшці. Перед використанням знову фільтрують через відповідний фільтр (5.2)

В.2 Приготування мазку

Виконують фарбування предметного скельця за такою схемою:

1. Фіксатор Карнуа (В.1.1) протягом 5 хв;
 2. 50% етанол протягом 1 хв;
 3. 30% етанол протягом 1 хв;
 4. Вода протягом 1хв;
 5. Розчин барвника піронін Y – метиловий зелений (В.1.2) протягом 6 хв;
6. Швидко промивають у *n*-бутиловому спирті, а потім у ксилолі;
7. Зберігають предметні скельця, захищаючи їх від пилу.

ДОДАТОК 2

(довідковий)

Розподіл Пуассона

Загалом, клітини в молоці розподіляються згідно з розподілом Пуассона. Розподіл Пуассона має передумовою, що:

$$M=V=s^2$$

де

M – середнє значення

V – варіація

s – стандартне відхилення

Коефіцієнт варіації CV розраховується за наступними формулами:

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

або

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

або

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

де M – середнє значення, яке, у разі підрахунку числа соматичних клітин, є кількістю підрахованих частинок (клітин).

ДОДАТОК 3

(довідковий)

Характеристика сучасних методів досліджень, що базуються на визначенні кількості соматичних клітин

| Таблиця «Оцінка ефективності методів діагностики маститу корів» | | | |
|---|--------------------------------------|---|--|
| Назва методу | Міжнародна аббревіатура назви методу | Сутність дослідження | Хто проводить дослідження |
| Підрахунок соматичних клітин (Somatic Cell Count) | SCC | Білі клітини крові та епітеліальні клітини молочної залози в зразках молока | Уповноважені особи, молочні кооперативи (пункти збору молока), молокопереробні підприємства, ДНІ, ветеринарна служба, незалежні експерти/ університети |
| Програма підрахунку СК в корів (Individual Cow Somatic Cell Counting Program) | Cow-SCC | Щомісячний підрахунок кількості СК в окремих корів | ДНІ*, ветеринарна служба, незалежні експерти/ університети |
| Підрахунок СК в збірному молоці (Bulk Tank Somatic Count) | BTSCC | Підрахунок СК в збірному молоці | Уповноважені особи, молочні кооперативи (пункти збору молока), молокопереробні підприємства, ДНІ, ветеринарна служба, незалежні експерти/ університети |

| Назва методу | Міжнародна аббревіатура назви методу | Сутність дослідження | Хто проводить дослідження |
|---|--------------------------------------|--|---|
| Прямий підрахунок СК шляхом мікроскопії мазків (Direct Microscopic Somatic Cell Count) | DMSCC | Стандартний метод підрахунку соматичних клітин в зразку молока | Уповноважені особи, молочні кооперативи (пункти збору молока), молокопереробні підприємства, ДНІ*, ветеринарна служба, незалежні експерти/ університети |
| Каліфорнійський маститний тест (California Mastitis Test) (В Україні застосовуються – мастидин, 4% розчин гідроксиду натру) | CMT | Непрямий метод визначення СК в молоці | Ветеринарна служба, виробники сирого молока |
| Стандартний підрахунок посівів на чашках (Standard Plate Count) | SPC | Загальна кількість мікроорганізмів в зразку молока | Уповноважені особи, молочні кооперативи (пункти збору молока), молокопереробні підприємства, ДНІ*, ветеринарна служба, незалежні експерти/ університети |

| Назва методу | Міжнародна аббревіатура назви методу | Сутність дослідження | Хто проводить дослідження |
|--|--------------------------------------|---|---|
| Попередня інкубація зразків молока (PI – Preliminary Incubation) | PI | Кількість психротрофних мікроорганізмів в зразку молока | Молочні кооперативи (пункти збору молока), молокопереробні підприємства, незалежні експерти/ університети |
| Визначення культур мікроорганізмів в збірному молоці (Bulk Tank Milk Cultures) | BTMC | Оцінка загальної кількості та виду мікроорганізмів в зразку молока | Молочні кооперативи (пункти збору молока), молокопереробні підприємства, ветеринарна служба, незалежні експерти/ університети |
| Визначення культур мікроорганізмів молоці з вим'я/ окремих чвертей вим'я корів (Cow/Quarter Cultures) | -- | Визначення наявності/ відсутності інфекції у вимені або в чверті вим'я корови та встановлення виду збудника маститу | Молочні кооперативи (пункти збору молока), молокопереробні підприємства ветеринарна служба, незалежні експерти/ університети |

*DHI – Dairy Herd Improvement SCC program – програма покращення молочного стада з використанням підрахунку соматичних клітин, яка запроваджена в країнах ЄС, США.

ДОДАТОК 4

(довідковий)

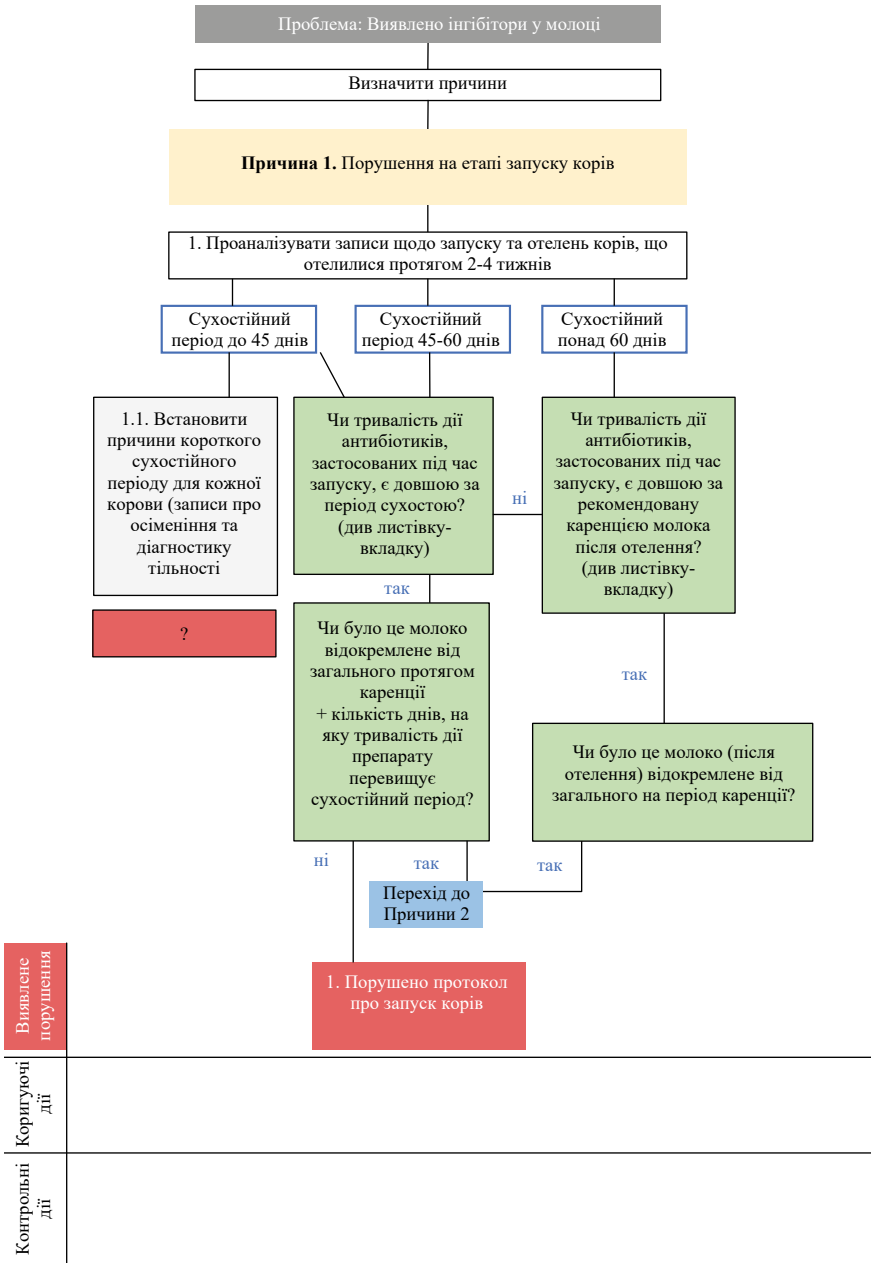
ІНФОРМАТИВНІСТЬ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

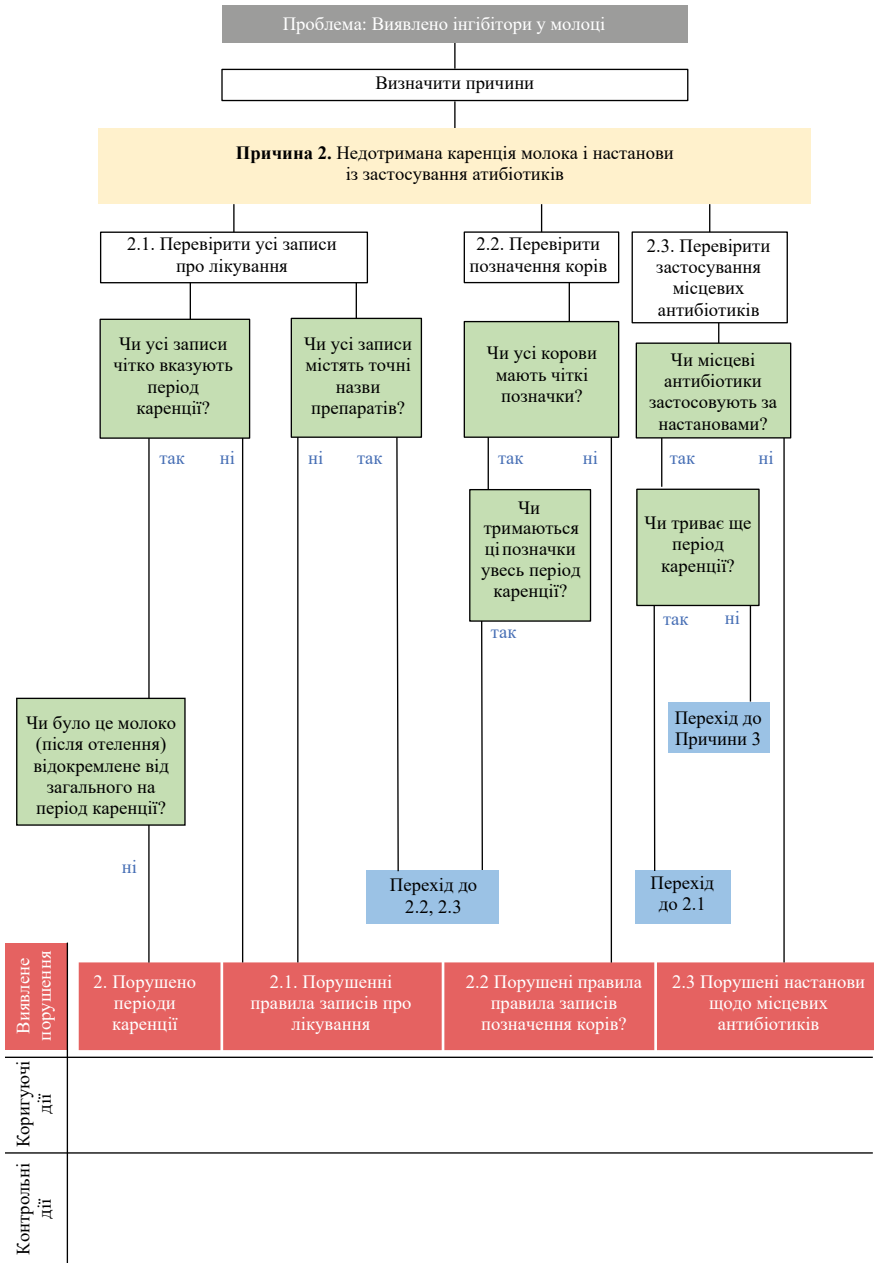
Інформація, яку можна отримати за результатами досліджень
на мастит та показників якості та безпечності молока

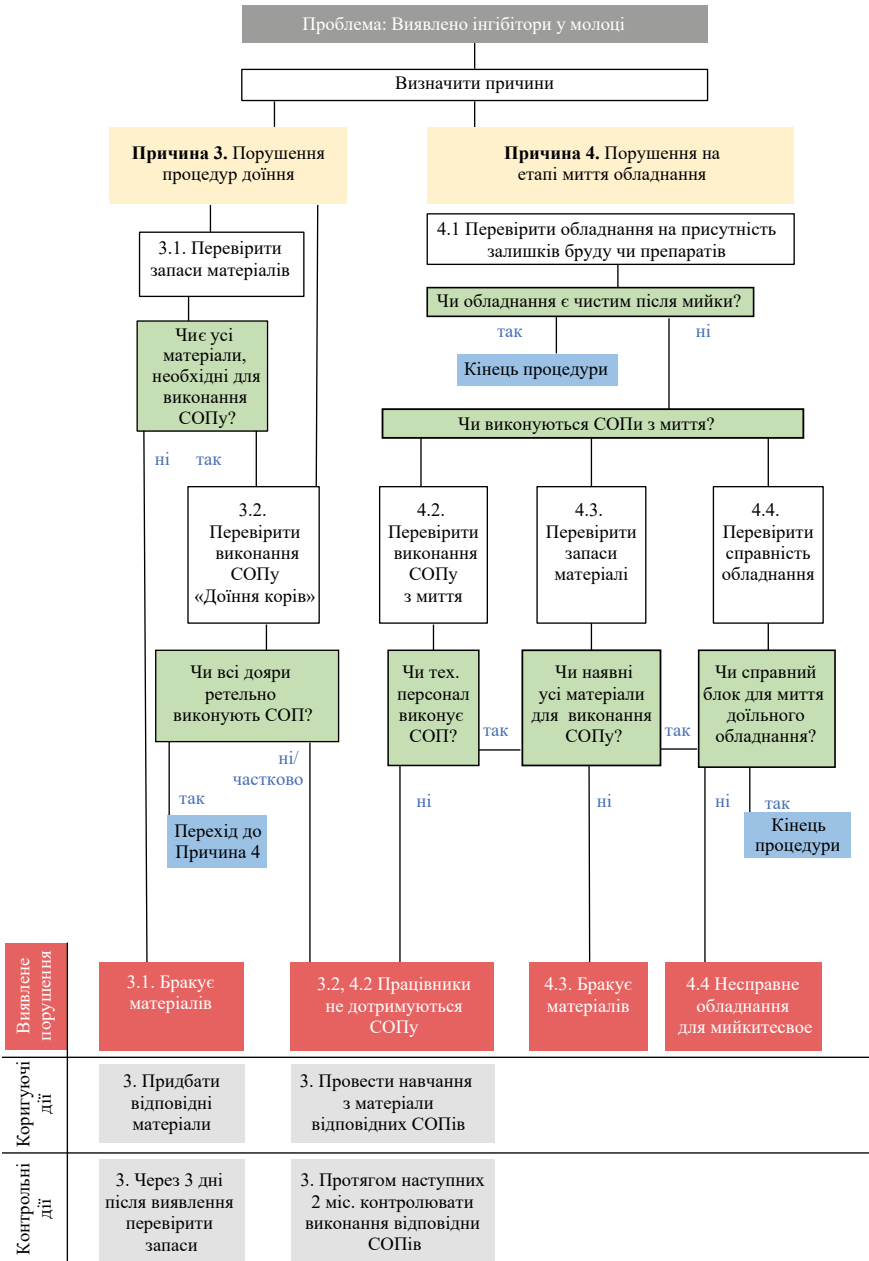
| Метод | Інформативність методу | Недоліки методу досліджень |
|--------------|---|--|
| BTSCC | Індикатор розповсюдження маститу в стаді | 1. Не надає інформації щодо ураження маститом окремих корів/чвертей вим'я 2. Не надає інформації щодо наявності мікроорганізмів і в т.ч. збудників маститу 3. Недостатнє обстеження причин виникнення маститів |
| SPC | Обстеження стану санітарії доїльного обладнання та молочного устаткування, гігієни на фермі та ефективності охолодження молока | 1. Не надає інформації щодо виду збудника маститу 2. Не надає інформації щодо специфічного джерела зараження маститом |
| PI | 1. Індикатор мікробної контамінації молока з довкілля 2. Має значення при визначенні рівня оплати за поставлене молоко за показником загального мікробного забруднення | 1. Не надає інформації щодо джерел мікробної контамінації молока 2. Не надає інформації щодо конкретних видів мікроорганізмів |

| | | |
|---|--|--|
| Визначення кількості СК в окремих корів (Individual Cow SCC) | 1. Дослідження на субклінічний мастит в корови 2. Може використовуватись для визначення субклінічних маститів в стаді 3. Надає інформацію щодо управлінських рішень 4. Дає змогу оцінити збитки, що спричиняє субклінічний мастит | 1. Не надає інформації щодо виду збудника маститу 2. Недостатнє обстеження причин виникнення маститів |
| CMT | Недорогий та швидкий метод визначення субклінічного маститу в окремій чверті вим'я корови, що базується на непрямому визначенню соматичних клітин в секреті молочної залози корови | 1. Не дає змоги визначити збудників маститу 2. Не дає змоги визначити причину виникнення маститу |
| BTMC | 1. Оцінка SPC 2. Визначає присутність специфічного збудника маститу 3. Встановлює первинну мікробну контамінацію молока 4. Може використовуватись для оцінки гігієни доїння | 1. Складна методика індикації та ідентифікації збудників маститу 2. Визначаються, в основному, джерела патогенних мікроорганізмів |
| Cow/ Quarter Cultures | 1. Метод, що виявляє збудника в чверті/вимені корови 2. Ідентифікує специфічні причини клінічного та субклінічного маститу | 1. Економічно витратний 2. Вимагає спеціальної кваліфікації персоналу для відбору та дослідження зразків молока |

ДОДАТОК 5

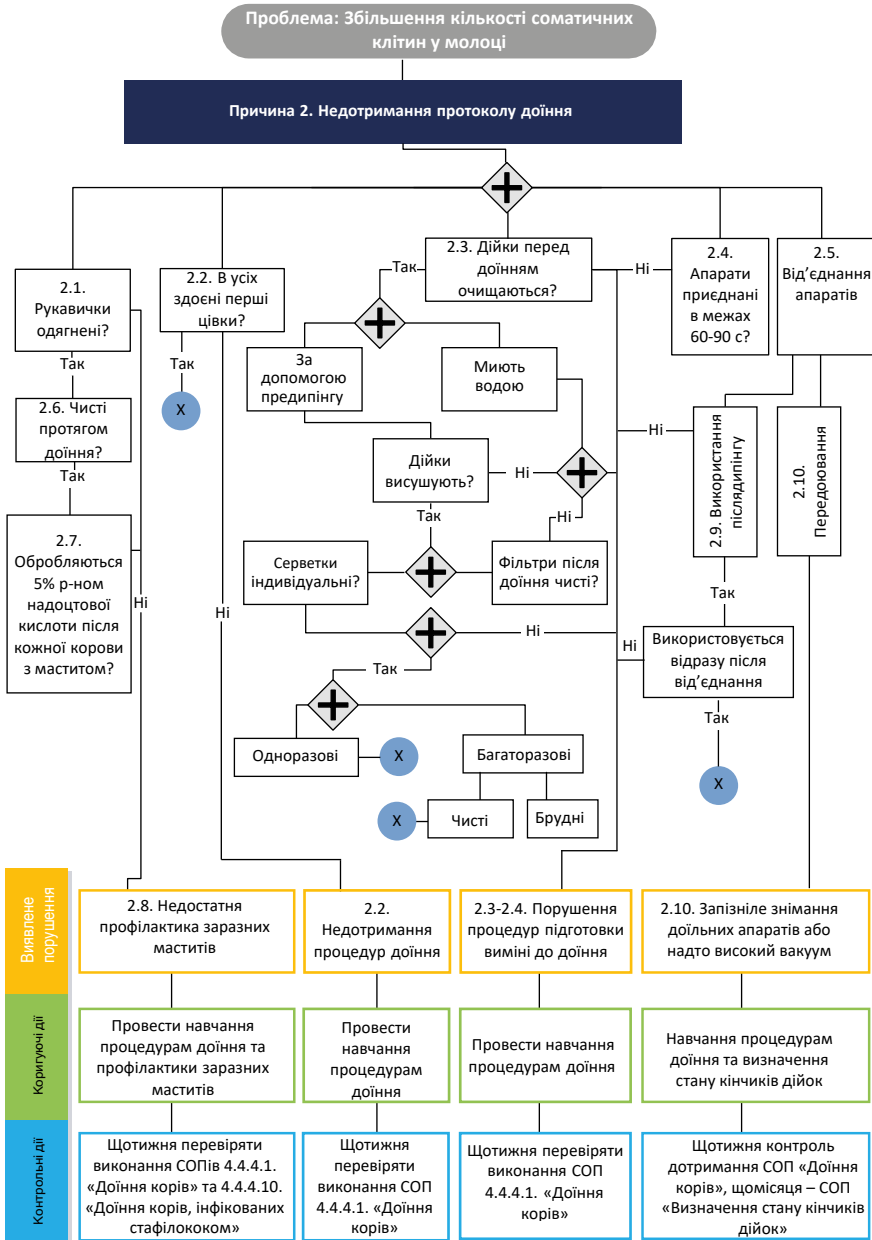


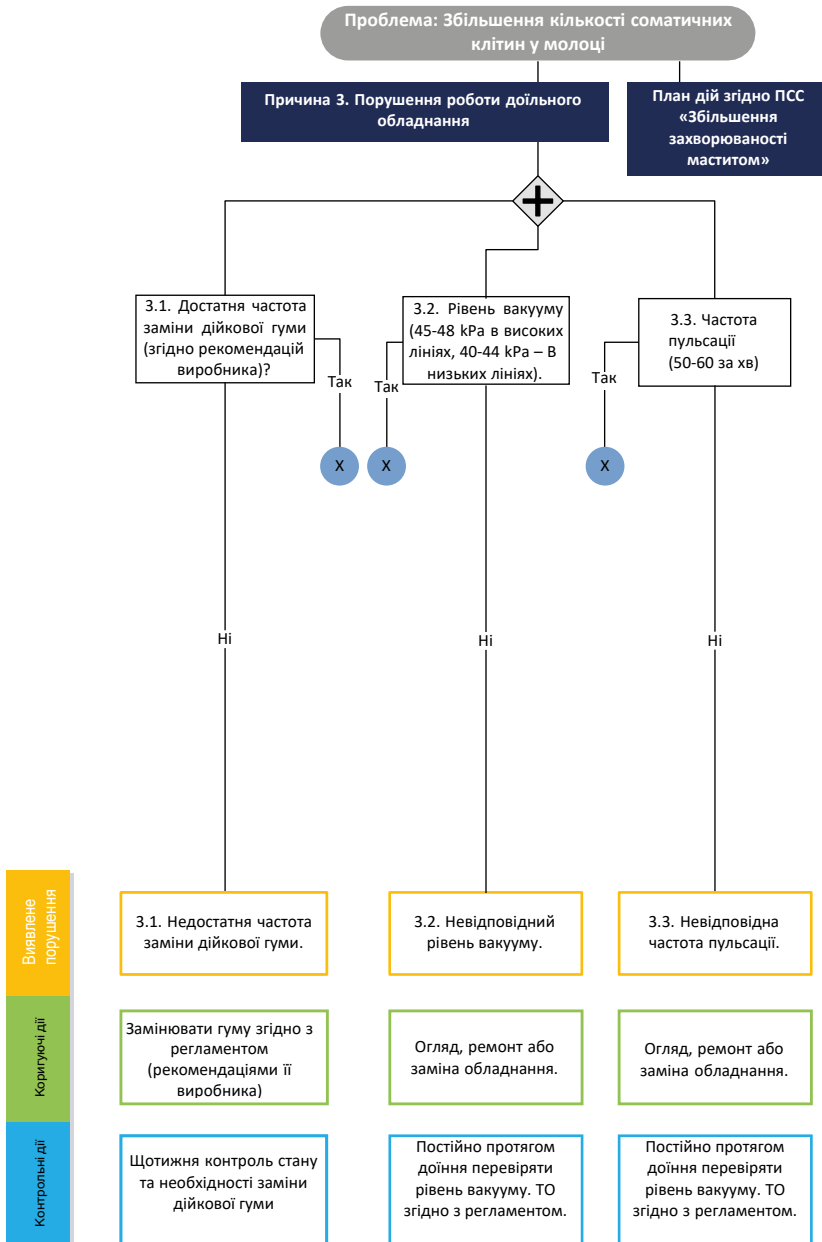




ДОДАТОК 6







ДОДАТОК 7

БІБЛІОГРАФІЯ

Barkema, H.W., J.D. Van Der Ploeg, Y.H.Schukken, T.J.G.M. Lam, G. Benedictus, A.Brand. Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis. // J. Dairy Sci. 1999. – V.82. – P.1655–1663.

Department of Health and Human Services. Public Health Services. Food and Drug Administration. Milk laboratory evaluation form. Direct microscopic somatic cell count, FDA/2400d, check list

DULIN et al.1982, Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. J.Food Prot. 45, pp. 435–439.

ISO 707|IDF 50, Milk and milk products – Guidance on sampling

ISO 5725–1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions

ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

ISO 13366-1/IDF 148-1:2008 specifies a microscopic method (reference method) for the counting of somatic cells in both raw and chemically preserved milk

ISO 13366–2/IDF 148–2, Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters

Jayarao B.M, Pillai S.R, Sawant A.A, Wolfgang D.R, Hegde N.V, –Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. //J. Dairy Sci. – 2004. –V/ 87. –P.3561–73.

PACKARD, V.S. et al. 1992. Direct microscopic methods for bacterial or somatic cells. In Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. Washington, DC, pp. 309–325.

Recommended international code of practice general principles of food hygiene CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-200

QUERVEL, X. & TROSSAT, Ph. 2005, Study report – Enumeration of somatic cells in goat milk. Cecalait (France)

Sampimon O., J. Sol, and P. Kock. Changes in bulk milk somatic cell count and in mastitis pathogens over the past 50 years in The Netherlands.// Int. Dairy Fed. Int. Mast. Conf. –2005. –P. – 963 4th H. – Wageningen, the Netherlands.

Sargeant, J. M., Y. H. Schukken, and K. E. Leslie. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: Progress and outlook. //J. Dairy Sci. 1998. –V.81. –P.1545–1554.

Wilson, D. J., H. H. Has, R. N. Gonzalez, and P. M. Sears. Association between management practices, dairy herd characteristics, and somatic cell count of bulk tank milk.// J. Am. Vet. Med. Assoc. – 1997. –V. 210. – P.1499–1502.

Weis D., Weifurtner M., Bruckmaier R. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows //J. Dairy Sci. – 2004. –vol.87. –p. –3280–3289.

ГАРКАВЕНКО Тетяна Олександрівна

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, перший заступник директора з наукового забезпечення керівництва випробувальним центром ДНДІЛДВСЕ

ЛОТОЦЬКИЙ Валерій Володимирович

кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри репродукції тварин НАУ, директор розвитку Консультаційного центру Асоціації виробників молока

БЕРГІЛЕВИЧ Олександра Миколаївна

доктор ветеринарних наук, професор кафедри громадського здоров'я Сумського державного університету Міністерства освіти і науки України

КОСЯНЧУК Вікторія Вікторівна

доктор ветеринарних наук, професор кафедри громадського здоров'я Сумського державного університету Міністерства освіти і науки України

КОЗИЦЬКА Тамара Григорівна

завідувач науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

ДЯЧЕНКО Тетяна Олексіївна

провідний лікар ветеринарної медицини лабораторії мікробіологічних досліджень харчових продуктів та кормів науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

**ПІДРАХУНОК СОМАТИЧНИХ КЛІТИН В СЕКРЕТІ ВИМ'Я
ОКРЕМИХ КОРІВ ТА В ЗБІРНОМУ СИРОМУ МОЛОЦІ КОРІВ
МІКРОСКОПІЧНИМ МЕТОДОМ, ВИЗНАЧЕННЯ СЕРЕДНЬОЇ
ГЕОМЕТРИЧНОЇ ВЕЛИЧИНИ**

В авторській редакції
Підписано до друку 25.05.2022 р. Формат 60x90 1/16
Папір офсетний. Ум. друк. арк. 6.75
Тираж 200 прим.
Замовлення № 21



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Швейцарська Конфедерація

Цю публікацію було створено за підтримки Швейцарії в рамках швейцарсько-української програми «Розвиток торгівлі з вищою доданою вартістю в органічному та молочному секторах України», що впроваджується Дослідним інститутом органічного сільського господарства (FiBL, Швейцарія) у партнерстві із SAFOSO AG (Швейцарія). Відповідальність за зміст цієї публікації несе виключно автор(и). Точка зору автора(ів) не обов'язково відображає точку зору SECO, FiBL, SAFOSO AG, www.qftp.org.