

УДК 619:618.19-002-085:636.2

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В МОЛОКЕ

Мирончик С.В., Бабаянц Н.В.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье отражены результаты совершенствования флуоресцентного метода подсчета соматических клеток в молоке.

The article reflects the results of improving fluorescent method of somatic cell count in milk.

Ключевые слова: соматические клетки, флуоресцентный метод, молоко, корова, мастит.
Keywords: somatic cells, fluorescent method, milk, cow, mastitis.

Введение. Проблема маститов, как в Республике Беларусь, так и во всем мире, находится на одном из первых мест. Данное заболевание является решающим аргументом в эффективном ведении молочного животноводства. Состояние молочной железы определяет безопасность и санитарно-гигиенические показатели молока. Только здоровое животное способно дать качественную продукцию. Что обуславливает необходимость регулярного контроля получаемой продукции от молочного стада простыми и точными методами диагностики.

Достижения последних лет сформировали достаточно устойчивое понятие взаимосвязи качества молока и количества соматических клеток в нем [7]. Увеличение концентрации этих клеток в молоке при развитии воспалительных процессов в молочной железе закономерно ввиду того, что к соматическим относят клетки крови, в частности, лейкоциты и нейтрофильные гранулоциты, выполняющие защитную функцию. Действие этих клеток направлено на борьбу с патогенными микроорганизмами, вызывающими развитие мастита. Однако следует знать, что к соматическим относятся не только клетки крови, но и любые клетки организма, тем более молочной железы. Так эпителиальные клетки вымени попадают в секрет молочной железы естественным путем, в результате их старения и обновления слизистой, выстилающей молочные ходы и протоки. То есть, эпителиальные клетки являются составной частью молока, и их концентрация может достигать 70% от общего количества соматических клеток [1], не оказывая существенного влияния на качество и безопасность молока.

Соответственно, суммарная величина соматических клеток в молоке будет зависеть как от наличия воспалительного процесса в вымени, так и от месяца лактации, способа доения, возраста и индивидуальных особенностей организма животного. Чтобы разобраться в причине снижения качества молока и разработать лечебные и профилактические мероприятия с продуктивными животными, на производстве желательно провести дифференциальную диагностику соматических клеток. Общепринятые методики и способы подсчета соматических клеток подразделяются на прямые и косвенные [6], которые не позволяют судить о процентном соотношении клеток молока. Косвенные методы основаны на учете изменения pH и формирования желеобразного сгустка при добавлении реагентов в исследуемое молоко, что не позволяет делать заключение о точном количестве соматических клеток. Прямые методы, позволяющие проводить точный подсчет соматических клеток, более трудоемкие и дорогостоящие, практически не применяются в условиях животноводческих и перерабатывающих предприятий [4]. Найти «золотую середину» достаточно сложно.

В настоящее время широкое применение нашли приборы, измеряющие количество соматических клеток по изменению вязкости молока – вискозиметры [5]. Однако, этот метод не позволяет проводить дифференциацию клеток. Следует также учесть, что на значения, получаемые на вискозиметре, большое влияние оказывает фальсификация молока химическими и физическими факторами. Известно, что снижается количество соматических клеток в пробе при добавлении в секрет молочной железы таких химических веществ, как перекись водорода, соды, мочевины, а также при термической обработке молока перед исследованием.

В последнее время на молочных хозяйствах в странах Европы широко используется метод флуоресценции [1]. У нас в республике метод флуоресцентной микроскопии пока не применяют. Поэтому разработка и совершенствование методов контроля качества молока, основанных на принципах флуоресцентной микроскопии, в условиях отечественных лабораторий актуальна.

Методы флуоресцентной микроскопии широко применяются в лабораторных исследованиях, так как являются высокочувствительными. Этот метод позволяет получать информацию о структуре и динамических свойствах молекулярных систем [2]. Поэтому применение метода флуоресценции со временем позволит не только определять суммарное количество соматических клеток в молоке, но и проводить их дифференциальную диагностику. Кроме того, компьютерная система обработки полученной информации значительно упростит процесс интерпретации результатов [3]. На получаемые результаты исследований молока не оказывает влияние фальсификация проб химическими веществами, что характеризует метод флуоресценции как более надежный, чем вискозиметрический.

Работы, проводимые в направлении флуоресцентной микроскопии при оценке качества молока,

актуальны в настоящее время, востребованы производством, интересны с точки зрения фундаментальных исследований.

Целью настоящего эксперимента явилось усовершенствование метода флуоресцентной микроскопии определения соматических клеток в молоке. Основной задачей на данном этапе исследований был подбор буферного раствора с целью подготовки проб молока к флуоресцентной микроскопии.

Материал и методы исследований. Для проведения флуоресцентной микроскопии необходима тщательная подготовка к исследованию, которая включает приготовление буферного раствора, окрашивающего раствора, анализируемой пробы.

Сущность избранного метода заключается в том, что цитоплазматическая мембрана соматических клеток разрушается под действием лизогенного буфера, после чего ядра клеток становятся доступными для действия флуоресцентного красителя, который связывается с двухспиральной ДНК соматических клеток, и образуется флуоресцентное вещество, идентифицирующее клетки.

Пробы молока брали от 18 коров на 3-м месяце лактации, подобранных по принципу парных аналогов. Животные были разделены на 3 группы (по 6 голов в каждой):

1 – клинически здоровые животные (без патологических изменений в молочной железе),

2 – с субклиническим маститом (диагноз подтверждался косвенным методом с реактивом «Керба-тест» и прибором «Мастит-тест», принцип действия которого основан на измерении электропроводности молока),

3 – с клиническим острым катаральным маститом цистерн.

Интерпретация результатов при постановке пробы с реактивом «Керба-тест» проводилась согласно инструкции по ниже описанным критериям:

« – » или «отрицательная реакция» – если смесь молока и реагента оставалась жидкой, слизь отсутствовала, что соответствует количеству соматических клеток до 200 тыс. клеток / см³.

« ± » или «сомнительная реакция» – если в смеси молока и реагента при медленном наклоне молочноконтрольной пластины в сторону наблюдались легкие тяжи слизи, что соответствует количеству соматических клеток от 200 до 500 тыс. клеток / см³.

« + » или «положительная реакция» – если в смеси молока и реагента наблюдались четко выраженные тяжи слизи, смесь становилась желеобразной, что соответствует количеству соматических клеток от 500 до 1000 тыс. клеток / см³. При клиническом мастите у коров в смеси наблюдалось чрезвычайно активное образование слизи, смесь становилась густой и желеобразной, что соответствует количеству соматических клеток более 1000 тыс. клеток / см³.

Расшифровка данных прибора «Мастит-тест» проводилась по следующим критериям:

- электропроводность молока 450 и ниже – образец молока высокого качества, вероятность субклинического мастита очень низка:

- электропроводность молока между 450 и 600 единицами – вероятность субклинического мастита увеличивается;

- электропроводность молока выше 600 единиц указывает на субклиническое воспаление с большой вероятностью перехода в клиническую стадию.

Для проведения определения соматических клеток методом флуоресцентной микроскопии, анализируемые пробы хранили при температуре (4±2°С). Определение проводили в течение 6 часов после отбора проб.

В качестве лизирующего буфера были испытаны несколько вариантов (таблица 1).

Таблица 1 – Буферные растворы, применяемые в флуоресцентной микроскопии

№ п/п	Компоненты буфера	Количественный состав буфера
1	Калия гидрофталат, г Калия гидроксид, г Вода дистиллированная, см ³	0,51 0,162 100
2	NaCl, г KCl, г Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, г KH ₂ PO ₄ , г Вода дистиллированная, см ³	8 0,2 1,15 0,2 1000
3	KH ₂ PO ₄ , г KCl, г Вода дистиллированная, см ³ KOH, г	1,36 3,9 500 для приготовления концентрированного раствора

Анализируемую пробу молока нагревали на водяной бане, при температуре 40°С, постоянно перемешивая. Охлаждали пробу до температуры 20°С. Разбавляли анализируемую пробу буферным раствором. В качестве окрашивающего раствора в ходе эксперимента использовали бромистый этидий, приготовленный по прописи: 0,25 г бромистого этидия и дистиллированной воды до 100 см³. Бромистый этидий растворяли в дистиллированной воде, предварительно нагретой до 40°С. Раствор охлаждали до комнатной температуры. Доводили объем до 100 см³ дистиллированной водой.

Контрольным методом подсчета соматических клеток в исследуемых пробах молока был прямой метод по Прэскотту-Бриду.

Результаты исследований. Результаты, полученные в ходе собственных исследований, отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты, полученные при лабораторном исследовании молока прямыми и косвенными методами

Группа подопытных животных	Лабораторные методы исследования молока		
	флуоресцентной микроскопии, тыс. клеток / см ³	электропроводности, единиц	с реактивом «Керба-тест»
1 группа – клинически здоровые животные (без патологических изменений в молочной железе)	207,2 ± 11,69	442,4 ± 17,84	« – »
2 группа – с субклиническим маститом	702,8 ± 40,43	681,3 ± 25,79	« ± » и « + »
3 группа – с клиническим острым катаральным маститом цистерн	1317,5 ± 25,70	1124,8 ± 33,86	« + »

Анализируя таблицу 2, просматривается закономерная динамика полученных результатов, что выражается в увеличенном количестве соматических клеток в пробах молока подопытных животных с диагнозом – субклинический мастит. Среднее количество соматических клеток составило 702,8 ± 40,43 тыс. клеток / см³ по группе, что превышает предельно допустимые показатели в 500 тыс. клеток / см³. У коров с клиническим маститом данный параметр превысил допустимые показатели в 2,6 раза.

Подтверждались полученные результаты измерением электропроводности молока и постановкой косвенного метода с реагентом «Керба-тест». Как видно из таблицы 2, средняя величина электропроводности у животных первой группы (клинически здоровых коров) соответствовала показателю для молока высшего сорта. А у животных второй и третьей групп электропроводность превышала верхнюю границу допустимых значений в 1,5 и 2,5 раза соответственно.

Предлагаемый метод флуоресцентной микроскопии дает более конкретные результаты исследований. В ходе исследований в качестве оптимального буферного раствора был определен фосфатный буфер (таблица 1, №3). Выбранный буферный раствор ранее не применялся для подготовки проб молока к флуоресцентной микроскопии. По результатам собственных исследований, можно сделать заключение о том, что предлагаемый буфер не уступает по качеству установленным ГОСТами растворам. Следовательно, его можно рекомендовать для подготовки проб молока при флуоресцентной микроскопии. Пропись предлагаемого раствора проста в приготовлении, включает меньшее количество недорогих компонентов.

Результаты, полученные при флуоресцентной микроскопии проб молока от здоровых животных и больных клиническим маститом, имели существенные отличия. В поле зрения микроскопа при исследовании молока от клинически здоровых животных отмечались единичные свечения соматических клеток. При клиническом мастите у коров в исследуемых микропрепаратах проб отмечалось множество четко просматриваемых светящихся клеток, что свидетельствовало о качественной подготовке проб молока фосфатным буфером для подсчета.

Полученные результаты исследований с применением флуоресцентной микроскопии, по электропроводности и с «Керба-тестом» были подтверждены контрольным прямым методом подсчета соматических клеток по Прескотту-Бриду.

Заключение. На данном этапе исследований нами была проведена модификация метода в целях его упрощения, в частности подбор буферного раствора. При проведении флуоресцентной микроскопии подготовку проб молока рекомендуем проводить фосфатным буфером, который готовится из навесок KН₂ РO₄ (1,36 г) и КСl (3,9 г) на 500 см³ дистиллированной воды, до необходимого рН 7,5 доводят с помощью концентрированного раствора КОН. В качестве окрашивающего раствора желателен использовать бромистый этидий.

Оценка флуоресцентной микроскопии позволила сделать вывод о сложности применения данного метода в условиях производственных лабораторий для контроля молока-сырья, так как он трудоемкий и длительный, но и наиболее точный, чем косвенные методы. Этот способ позволяет увидеть, идентифицировать и сосчитать соматические клетки в молоке. Разработанный вариант метода прямого микроскопирования молока для определения количества соматических клеток планируется усовершенствовать и далее – подсчет и идентификацию клеток в молоке осуществлять с помощью компьютерной системы, чтобы максимально снизить воздействие субъективных факторов, связанных в частности с квалификацией исполнителя исследований, и тем самым облегчить процесс подсчета соматических клеток.

Литература. 1. Свириденко, Г.М. Стандарты определения соматических клеток молока / Г.М. Свириденко // *Переработка молока*. – 2014. – № 3 (173). – С.23-26. 2. Лукашенко, Е.И. Применение флуоресцентного метода для контроля качества молока / Е.И. Лукашенко // *Молочнохозяйственный вестник*. – 2013. – № 1 (13). – С. 65-69. 3. Горелик, В.С. Программный пакет для анализа и математической обработки флуоресцентных спектров биоактивных препаратов / В.С. Горелик, М.Ф. Умаров, Е.И. Лукашенко // *Материалы седьмой Международной научно-технической конференции ИНФОС-2013*. – Вологда: ВоГТУ, 2013. – С. 49-54. 4. ГОСТ Р ИСО 13366-1-2010 «Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (Контрольный метод)» 5. ГОСТ Р 54077-2010 «Молоко. Методы определения количества соматических клеток по изменению вязкости». 6. Гаврилов, Г.Б. Анализ методов определения соматических клеток / Г.Б. Гаврилов, А.А. Макарушин // *Молочная промышленность*. – 2006. – №7. – С.40-42. 7. Шабшаевич М.Л. Определение содержания соматических клеток в молоке-сырье / М.Л. Шабшаевич, В.П. Шидловская // *Молочная промышленность*. – 2007. – №2. – С.30-31.

Статья передана в печать 08.04.2015 г.