

УДК 637.12:636.39:  
543.683(477.5)  
© 2014

*С. О. Шаповалов,*  
доктор біологічних наук

*Н. П. Русько*

*Інститут*  
*тваринництва НААН*

*Л. М. Ладика*

*Т. І. Фотіна,*  
доктор ветеринарних наук

*О. Б. Кисельов,*  
кандидат сільсько-  
господарських наук

*Сумський національний*  
*аграрний університет*

*Т. М. Ришкова,*  
кандидат  
технічних наук

*Харківська Державна*  
*зооветеринарна академія*

## **АНАЛІЗ ДОСЛІДЖЕННЯ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН МОЛОКА КІЗ І МОНІТОРИНГОВІ ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ РІВНЯ В СТАДАХ СХІДНОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ**

**Мета.** Проаналізувати вміст соматичних клітин (СК) у молоці кіз сходу України. **Методи.** Зразки молока нагрівали до 40 С, гомогенізували і проводили вимірювання на приладі Sotacount 150 за принципом лазерно-протокової цитометрії флюороптікоелектронного методу. **Результати.** Установлено найбільший сумарний вміст СК у молоці кіз у весняний та осінній сезони. Під час застосування методу лазерно-протокової цитометрії з фарбуванням ДНК кожної СК вміст СК у молоці становив від 11 тис. до 2 млн/см<sup>3</sup>. **Висновки.** Рівень СК у молоці кіз становить 400–600 тис./см<sup>3</sup>. За підвищення СК понад 2 · 10<sup>6</sup> тис./см<sup>3</sup> рівень нейтрофілів і лімфоцитів вірогідно не змінюється, а макрофагів і еозинофілів підвищується до 4-х разів. Вміст СК у молоці кіз слід враховувати під час визначення його гатунковості та як один із чинників ціноутворення.

**Ключові слова:** допустимі рівні, молоко кіз, моніторинг, ранжування, сезон, соматичні клітини.

Нині наріжним каменем залишається питання встановлення референтних рівнів соматичних клітин (СК) у молоці кіз, а також оцінка верхньої межі їх концентрації як одного із критеріїв ціноутворення та встановлення гатунковості молока. Відомо, що кількість СК у пробі молока корів є індикатором здоров'я їх вим'я, захворюваності на клінічний та субклінічний мастит.

Запальний процес у молочній залозі кіз (як наслідок впливу патогенних мікроорганізмів, токсинів або пошкодження тканини) призводить до змін секреції молока, його кількості, складу і властивостей, збільшення вмісту альбуміну в молочній сироватці, зниження секреції компонентів молока (казеїну, жиру, лактози), зменшення термостійкості молока, підвищення часу коагуляції і скорочення термінів його збереження [5, 11, 12, 16]. Отже, підвищення рівня СК у молоці кіз впливає на його придатність для використання як сировини для молокопереробної промисловості [3].

Порівняно з коров'ячим, козяче молоко в середньому має вищий рівень СК — часто кілька мільйонів в 1 см<sup>3</sup> [13]. Якщо корелятивну залежність між рівнем СК і здоров'ям вим'я

чітко визначено у корів, то питання діагностики маститу за рівнем СК у молоці кіз є неоднозначним. Так, якщо у США допустимий рівень СК для корів — 750 тис./см<sup>3</sup>, то для кіз і овець — 1000 і рівень оплати за цим показником є відповідним.

У ЄС (Директива 92/46 ЕСС, 1992) встановлено допустимий рівень СК у коров'ячому молоці — 400 тис./см<sup>3</sup>, у молоці кіз і овець його законодавчо не визначено. Нині процедуру для контролю якості молока регулюють міжнародні стандарти про гігієнічні правила для харчових продуктів тваринного походження), де також не встановлено допустимий рівень СК у козячому молоці [7]. Проте вказано стандартні показники вмісту СК для сирого козячого молока за температури 30°C 1500 тис./см<sup>3</sup> (якщо воно призначене для виробництва термічно оброблених продуктів) і 500 тис./см<sup>3</sup> (якщо воно призначене для виготовлення продуктів без термообробки) та запропоновано наводити рівень СК у вигляді середнього геометричного значення, отриманого за його оцінки впродовж 2-х місяців. Однак останні дослідження норвезьких вчених на IGA Конференції, 2013 «Якість козя-

чого молока» в Тромсі свідчать, що концентрація СК у молоці здорових кіз має становити 500 тис./см<sup>3</sup> [14], а для отримання якісного сиру — до 100 тис./см<sup>3</sup> [15]. У ряді моніторингових досліджень у деяких стадах кіз Норвегії рівень СК у молоці становив 549 тис./см<sup>3</sup>, а наприкінці лактації — 415 тис./см<sup>3</sup>, в інших господарствах максимальний рівень СК в 2009 р. — 943 тис./см<sup>3</sup>, в 2010 р. — 839, в 2011 р. — 842, в 2012 р. — 824 [14]. Середні значення рівня СК у молоці кіз стад Бразилії в 2010 р. (штат Сан-Паулу) залежно від стадії лактації становили: 159, 508 і 277 тис./см<sup>3</sup> [4, 10]. Розбіжності в отриманих величинах пов'язані, насамперед, з методикою визначення рівня СК: використанням прямих мікроскопічних методик обчислення або методик з фарбування ДНК СК і оцінки їх кількості методом лазерної протокової цитометрії, з одного боку, а також з особливостями секретії козячого молока, з другого. Як відомо, у процесі секретії у кіз і овець у молоко виділяються цитоплазматичні, апокринні частинки, які мають подібний діаметр і морфологію лейкоцитів (основної популяції СК), однак вони містять більше білка і РНК, але не ДНК [6, 9]. Під час мікроскопічного обчислення ці частинки помилково вважають СК козячого молока. Суперечливість даних пояснюються тим, що ряд робіт виконано в той період, коли ще не було застосовано методу лазерно-протокової цитометрії під час фарбування ДНК етидіумбромідом і подальшої мультиплікаційної детекції. Слід також зазначити, що в проекті стандарту Євразійської ради з стандартизації метрології та сертифікації (Молоко незбиране питне козяче. Технічні умови, Мінськ, 2013) уміст СК в молоці кіз має бути не більше ніж 750 тис./см<sup>3</sup>, а для продуктів, призначених для дошкільного та шкільного харчування, — не більше ніж 500 тис./см<sup>3</sup>. В Україні результати багаторічних досліджень Т. М. Рижкової з вивчення якості козячого молока (2000–2014) лягли в основу розробленого і введеного в дію з 01.01.2010 р. національного стандарту України «Молоко козяче, сировина» [2], де зазначено, що для молока кіз I сорту уміст СК має бути не більше ніж 500 тис./см<sup>3</sup>, для II — 600, для III — 800 тис./см<sup>3</sup> відповідно.

**Мета досліджень** — проаналізувати уміст СК в молоці кіз сходу України (Сумська, Харківська, Донецька обл.), запропонувати оптимальні методи відбору проб молока, визначити рівень транслокації СК у процесі доїння та швидкість евакуації СК у секрет, провести моніто-

ринг і ранжування за рівнем СК молока кіз стад Східного регіону протягом 2013 р. посезонно.

**Матеріали і методи.** Клінічно здорових кіз, які лактували в 2013 р., досліджено відповідно до загальноприйнятої методики. Рівень СК у їхньому молоці вивчено на великій кількості тварин у різних зонах сходу України. Відбір проб молока проводили у кілька етапів: перші 2 етапи — з 13 по 20.04 та з 12 по 19.06.2013 р. — у Сумській області, решта — протягом року з 14 до 17 числа (у лютому, квітні, липні, жовтні) — у Сумській обл. (Сумський, Лебединський, Краснопільський, Недригайлівський р-ни) та у Харківській і Донецькій обл. (Старобешівський р-н). Облік молочної продуктивності піддослідних кіз проводили за добовими надоями. Для визначення СК (відібрані пропорційно добовому надою за 2 суміжних дні) зразки молока від кожної з піддослідних кіз на фермі фільтрували і охолоджували до температури (6 ± 2) С. Визначали СК у випробувальному центрі Інституту тваринництва НААН, акредитованому за вимогами ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 (ISO/IEC 17025:2005) [1], атестат акредитації № 2Т621 в Національному агентстві акредитації України. У лабораторії зразки молока нагрівали до 40 С, гомогенізували і проводили вимірювання на приладі Somacount 150 (США), використовуючи принцип лазерно-протокової цитометрії флюороптикаелектронного методу відповідно до ISO 13366-2:2007 (IDF 148-2:2006). Для визначення вмісту конкретних субпопуляцій СК у козячому молоці (еозинофілів, нейтрофілів, моноцитів, лімфоцитів) використано потокову цитометрію з методом імунофенотипування, за використання видоспецифічних моноклональних антитіл CD 45, мічених флуоресцентним барвником.

**Результати роботи.** Під час ранжування результатів моніторингу якості молока кіз у Східному регіоні України в 2013 р. найбільший сумарний уміст СК у молоці кіз установлено навесні та восени (табл. 1). У 87–91% всіх досліджених тварин уміст СК становив 400–600 тис./см<sup>3</sup>, що значно нижче, ніж показники, одержані в дослідженнях інших авторів. Уміст СК понад 1 млн/см<sup>3</sup> протягом року становив 0,5–2%, причому у зимовий час відсоток був мінімальним. Ці дослідження можуть стати передумовою встановлення гатунковості козячого молока в Східному регіоні України.

Під час визначення вмісту конкретних субпопуляцій СК у козячому молоці (епітеліальних клітин, еозинофілів, нейтрофілів, макрофагів,

**1. Ранжування вмісту СК у молоці кіз за сезонами 2013 р., проведене в результаті моніторингу якості молока кіз в Східному регіоні України**

Рівень ранжування	Весна		Літо		Осінь		Зима	
	n	М.ч. від вибірки, %	n	М.ч. від вибірки, %	n	М.ч. від вибірки, %	n	М.ч. від вибірки, %
A: SSC $10^3$	75	4	66	10	88	3	77	60
B: $10^3$ SSC $40 \cdot 10^3$	121	60	60	75	86	55	75	74
C: $40 \cdot 10^3$ SSC $60 \cdot 10^3$	89	88	58	90	87	87	74	91
D: $60 \cdot 10^3$ SSC $80 \cdot 10^3$	77	90	64	94	54	91	69	92
E: $80 \cdot 10^3$ SSC $10^6$	76	7	62	4	71	6	67	2
I: SSC $2 \cdot 10^6$	89	2	75	1	60	2	80	0,5

лімфоцитів) виявлено, що рівень епітеліальних клітин становив 2,1–3,7 % і не мав достовірних відмінностей у молоці з різним рівнем сумарного вмісту СК. Обчислення інших клітин було прийнято за 100% і визначено їхню масову частку з використанням методу протокової цитометрії (табл. 2).

Показано, що рівень лімфоцитів у молоці кіз залишався порівняно постійним і не мав вірогідних відмінностей навіть у разі підвищення СК молока кіз більше ніж  $1 \text{ млн}/\text{см}^3$ . Однак виявлено значне підвищення рівня еозинофілів (у 4 рази) і макрофагів (у 1,5 рази). Рівень нейтрофілів за загального підвищення СК не знижувався, можливо, через підвищення інших субпопуляцій лімфоцитів.

Установлено, що у весняний період дослідження в стаді кіз фермерського господарства в Сумській обл. загальний вміст СК у молоці вечірнього надю був на рівні  $500,5 \text{ тис.}/\text{см}^3$ , ранкового —  $325,3 \text{ тис.}/\text{см}^3$ , що на 34,5% менше (табл. 3).

Аналогічні дослідження зроблено F. Cedden et/al. у Туреччині: в літній період під час визначення рівня СК закономірність встановлено

практично на рівні тенденції, проте після перерахунку на сумарний надій (вечірній та ранковий) контамінація СК вірогідно була більшою у вечірньому молоці [8]. Виявлено, що за застоювання методу лазерно-протокової цитометрії з фарбуванням ДНК кожної СК вміст СК у молоці кіз коливався від 11 тис. до  $2 \text{ млн}/\text{см}^3$ . Різниця вмісту СК у молоці ранкового і вечірнього надю в індивідуальних зразках становила 1000–770 тис., а в ранковому молоці — 35–150 тис. Можливо, що на добу контамінацію молока кіз СК впливає комплекс різних факторів: зміна фотоперіодизму, більша активність у проміжках світлового дня, а значить і швидкість метаболізму, проміжок часу між доїннями. Наведені дані свідчать, що показник концентрації СК у молоці кіз дуже варіабельний навіть в одній тварині за доїння в різний час доби.

На наступному етапі було досліджено рівень СК у процесі молоковидення (табл. 4).

Відомо, що перші струмені молока від наступних різняться хімічним складом: вони бідніші на жир, ніж останні. Це пояснюється складними механізмами й узгодженими рефлексними реакціями міоепітелію та гладкої мус-

**2. Ранжування вмісту субпопуляцій СК у молоці кіз (2013 р.)**

Рівень ранжування	n	Масова частка від вибірки, %			
		Нейтрофіли	Макрофаги	Лімфоцити	Еозинофіли
A: SSC $10^3$	30	87,80±4,8	8,1±3,1	2,10±0,2	2,0±0,7
B: $10^3$ SSC $40 \cdot 10^3$	12	84,50±6,2	11,1±5,6	2,00±0,1	2,4±0,5
C: $40 \cdot 10^3$ SSC $60 \cdot 10^3$	14	82,90±5,3	11,8±3,4	2,40±0,4	2,9±0,1
D: $60 \cdot 10^3$ SSC $80 \cdot 10^3$	14	81,10±2,5	12,0±2,1	2,40±0,7	4,5±0,1
E: $80 \cdot 10^3$ SSC $10^6$	15	77,40±9,7	14,2±3,1	2,40±0,7	6,0±0,1
I: SSC $2 \cdot 10^6$	17	73,40±5,4	15,8±2,7	2,70±0,5	8,1±0,2

**3. Уміст СК у молоці кіз у ранковому і вечірньому надоях фермерського господарства в Сумській обл. (2013 р.)**

Кличка дослідної тварини	Весна				Літо			
	14.04	15.04	вечір/ранок	вечір/ранок, %	13.06	14.06	вечір/ранок	вечір/ранок, %
	вечір	ранок			вечір	ранок		
	тис./см <sup>3</sup>				тис./см <sup>3</sup>			
Білка	442	198	244	55,2	703	282	421	59,9
Квітка	1824	1053	771	42,3	716	297	419	58,5
Роза	255	141	114	44,7	721	731	-10	-1,4
Чорнушка	2070	1458	612	29,6	1416	1488	-72	-5,1
Діна	571	268	303	53,1	504	444	60	11,9
Анфіса	619	465	154	24,9	494	614	-120	-24,3
Люта	63	37	26	41,3	567	633	-66	-11,6
Аза	53	34	19	35,8	598	621	-23	-3,8
Марта	190	64	126	66,3	71	90	-19	-26,8
Берізка	170	71	99	58,2	62	80	-18	-29,0
Роза	175	116	59	33,7	52	47	5	9,6
Марта	177	115	62	35,0	45	27	18	40,0
Білка	526	471	55	10,5	839	744	95	11,3
Квітка	362	376	-14	-3,9	1131	536	595	52,6
Ромашка	11	12	-1	-9,1	1441	2177	-736	-51,1
Середнє значення	500,53	325,27	175,27	34,5	624,0	587,4	36,6	6,0

кулатури вим'я, стінок і сфінктера соска. У цистернальному молоці кількість СК значно нижча, ніж в альвеолярному (27–94 %). Проте в одному випадку (дослідження молока кози Регіни) такої закономірності не виявлено. Так само не визначено залежності вмісту СК в альвеолярному молоці від початкового рівня СК у цистернальному молоці. Можливо, стимуляція

молоковіддачі одночасно зумовлює інтенсивне виведення СК альвеолярним епітелієм, що призводить до швидкого і значного їх підвищення в наступних порціях надою. Численними дослідженнями також установлено, що альвеолярна порція відносно стійка, тоді як цистернальна частина надою значно варіює. Співвідношення СК у цих фракціях змінюється за-

**4. Концентрація СК (тис./см<sup>3</sup>) у молоці кіз у процесі їх видоювання**

Кличка дослідної тварини	Порція молока			Співвідношення накопичення СК, %		
	1*	2**	3***	2/1	2/3	3/1
Сабіна	27	27	449	0,00	93,99	93,99
Люта	77	85	225	9,41	62,22	65,78
Регіна	106	98	103	-8,16	4,85	-2,91
Марта	205	300	335	31,67	10,45	38,81
Діна	450	550	620	18,18	11,29	27,42
Квітка	700	1252	1658	44,09	24,49	57,78

\* Цистернальне. \*\* Транзиторно-альвеолярне. \*\*\* Альвеолярне.

лежно від індивідуальних відмінностей тварин і стадій лактації, віку кіз, інтервалу розташуван-

ня і стереотипу дійок, ємності вимені, цистернального тиску та ін.

### Висновки

Установлено, що рівень СК у молоці кіз Східного регіону України становить 400–600 тис./см<sup>3</sup> у 88–91 % досліджених проб молока, визначених методом лазерно-протокової цитометрії, з урахуванням тільки клітин, які мають у своєму ядрі ДНК.

Під час ранжування в молоці кіз у 2013 р. СК за вмістом їх субпопуляцій виявлено, що за підвищення СК понад 2·10<sup>6</sup> тис./см<sup>3</sup> рівень нейтрофілів і лімфоцитів вірогідно не

змінюється, а макрофагів і еозинофілів вірогідно ( $P < 0,05$ ) підвищується у 1,5–4 рази, відповідно. У вечірньому молоці рівень СК вищий, ніж у ранковому. Під час визначення концентрації СК у молоці потрібно відбирати проби молока в 2 суміжних дні, пропорційно до добового надою. Вміст СК у молоці кіз слід враховувати під час визначення його гатунковості та як один із чинників ціноутворення.

### Бібліографія

1. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (ДСТУ ISO/IEC 17025:2006). — [Чинний від 27.12.2006]. — К.: Держспоживстандарт України, 2006. — (Національні стандарти України).
2. Молоко козяче, сировина. Технічні умови (ДСТУ 7006 : 2010) — [Чинний від 01.01.2010]. — К.: Держспоживстандарт України, 2010. — 9 с. — (Національні стандарти України).
3. Auldust M. J. Effect of mastitis on raw milk and dairy products/M. J. Auldust, I. B. Hubble//Australian Journal of Dairy Technology. — 1998. — 53. — P. 28–36.
4. Analise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de celulas somaticas no leite de cabras higidas Pesquisa/K. M. Madureira, V. Gomes, R. Soares de Castro, S. S. Kitamura, W. Pereira de Araujo/Veterinaria Brasileira Print version. ISSN 0100-736X. Pesq. Vet. Bras. — V. 30, № 4. — Rio de Janeiro Apr. 2010. — <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000400005>.
5. Bernacka H. Cytological quality of goat milk on the basis of the somatic cell count/H. Bernacka//Journal of Central European Agriculture, 2006. — 7, № 4. — P. 773–778.
6. Contagem de celulas somaticas em leite de cabra [Enumeration of somatic cells in goat milk]/P. V. D. Andrade, M. R. Souza, I. Borges, C. F. A. M. Penna//Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. — V. 53, № 3. — Belo Horizonte, June 2001 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000300021>.
7. Commission Regulation (EC) № 1662/2006 of 6<sup>th</sup> November 2006 amending Regulation (EC) № 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin, 2006: Uř Vest., L 320.
8. Cedden F. Somatic cell, udder and milk yield in goat Revue/F. Cedden, S.O. Kaya, I. Daskiran//Med. Vet. — 2008. — 159, № 4. — P. 237–242.
9. Dulin A. M. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk/A. M. Dulin, M. J. Paape, W. P. Wergin//J. Food Protec. — 1982. — V. 45. — P. 435–439.
10. Effect of the stage of lactation on somatic cell count in healthy goats (*Caprae hircus*) breed in Brazil/V. Gomes, A. M. M. P. Della-Libera, M. Paiva, K. M. Madureira, W. P. Araujo//Small Ruminant Res. — 2006. — 64. — P. 30–34.
11. Heeschen W. H. Mastitis: The disease under aspects of milk quality and hygiene/W. H. Heeschen//Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. — 1995. — 47, № 3, P. 221–237.
12. Haenlein G. F. W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity/G. F. W. Haenlein//Small Ruminant Research, 2002. — 45. — P. 163–178.
13. Jakosc cytologiczna mleka koziego/R. Dan-kow, D. Cais-Sokolinska, J. Pikul, J. Wojtowski//Med. Wet. — 2003. — 59. — № 1.– P. 77–80.
14. Solverod L. Udder health in Norwegian goat dairy herds TINE Mastitis Laboratory, Molde, Norway Goat Milk Quality Regional IGA Conference 2013 in Tromso, Norway.
15. Siv Skeie. Milk quality aspects important for cheese/Siv Skeie//Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, As, Norway Goat Milk Quality Regional IGA Conference 2013 in Tromso, Norway.
16. Uticaj mastitisa na kvalitet mleka/V. Katic, T. E.L. Huda, L. J. Babic, J. Popovic//Veterinarski glasnik, 1994. — 16. — P. 271–276.

Надійшла 06.05.2014.