

УДК 637.112“32”639

ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН КОЗИНОГО МОЛОКА**ЗАЖАРСЬКА Н. М.**, к. вет. н.
ЖАРКО Л. І. студентДніпропетровський державний аграрно-
економічний університет, м. Дніпро
zazharskayan@gmail.com

Порівняно ефективність визначення кількості соматичних клітин у козиному молоці різними методами. Досліджували соматичні клітини в індивідуальних пробах молока від 28 кіз на приладах “Соматос”, “SomaCount Flow Cytometer” та методом підрахунку в мазках, пофарбованих за Романовським-Гімза, Майн-Грюнвальдом і піроніном Y. При підрахунку клітин у мазках, пофарбованих будь-яким методом, не виявлено зразків з кількістю соматичних клітин до 100 тис/мл. При прямому підрахунку соматичних клітин у мазках козиного молока, пофарбованих будь-яким методом, виявляється більша кількість клітин, ніж за допомогою приладів. Розподіл діапазонів соматичних клітин схожий між різними методами фарбування мазків, що ще раз доводить точність методу прямого підрахунку клітин у мазках молока, хоч це більш трудомісткі методи, ніж апаратні. Для підрахунку соматичних клітин у козиному молоці за методом Прескота-Бріда пропонується фарбувати мазки методом Майн-Грюнвальда, тому що чітко зафарбовується цитоплазма та ядра соматичних клітин, а вартість барвників набагато менша ніж у методі з піроніном Y. Зі збільшенням кількості соматичних клітин підвищувалися показники жиру, але статистичної різниці не визначено. Також виявлено, що при зниженні вмісту білка в молоці температура замерзання підвищувалась.

Ключові слова: козине молоко, кількість соматичних клітин, мазки молока, жир, білок, температура замерзання, лактоза

Постановка проблеми. В останні роки такі фактори, як соціологічні та економічні, набули суттєвого впливу на харчову промисловість і, в результаті цього, з'явилися нові продукти з характеристиками за вимогами маркетингу. Слід мати на увазі, що козине молоко має значні переваги над коров'ячим, є цінним молочним продуктом і невід'ємною частиною здорового харчування, застосовується в якості поживного джерела для немовлят і дітей, а також як функціональне харчування [1, 2].

При дослідженні складових молока альпійських кіз угорськими вченими виявлено, що з підвищенням кількості соматичних клітин істотно підвищується вміст білку, рН, Na, але знижується вміст лактози і температура замерзання. Істотної різниці не було знайдено між кількістю соматичних клітин і вмістом Са у козиному молоці [3].

При дослідженні козиного стада протягом 11 років найбільший вміст лактози був визначений в молоці кіз первісток, які народили одне козеня; одночасно, в них спостерігався найнижчий надій молока. Статистичної різниці між показниками лактози кіз різних порід не

виявлено. Наймолодші кози мали найнижчу кількість соматичних клітин і цей показник систематично зростав із числом лактацій [4].

Ізраїльські вчені стверджують, що бактеріальні інфекції і стадії лактації є двома найбільш важливими факторами, які впливають на якість молока кіз. Позитивна залежність між казеїном, лактозою і сиропридатністю, і негативний зв'язок між останнім показником і кількістю соматичних клітин пов'язані з бактеріальною інфекцією, і з молоком пізньої лактації [5].

Підвищення кількості соматичних клітин у збірному молоці кіз є проблемою у виробництві молочних продуктів з козиного молока. У Норвегії кількість соматичних клітин в збірному молоці останні десятиліття реєструється на рівні більше 1 млн / мл, а у здорових кіз повинно бути нижче 500 тис / мл [6].

На думку Looper M. існують два способи зниження кількості соматичних клітин у молоці тварин. Перший метод – вибракування корів, це процес, який може швидко зменшити кількість соматичних клітин у збірному молоці. Другий метод – управління маститом, що

включає дослідження зразків молока від кожної корови щомісяця, профілактику за допомогою годівлі, санітарні заходи під час доїння корів, сухостою, першої лактації. Недавні дослідження показують, що введення в раціон селену і вітаміну Е покращує стан тканини в молочній залозі [7].

Кози виявилися найбільш толерантним видом жуйних щодо фізіологічних маніпуляцій (низька частота доїння), внутрішньовим'яної інфекції і зовнішніх або емоційних стресів, які знижують секрецію молока. Ці переваги пояснюються їх унікальними морфологічними і фізіологічними особливостями. У молочних корів, число соматичних клітин широко використовується для оцінки якості молока і встановлення ціни. Це відбувається тому, що підвищення кількості соматичних клітин є наслідком запального процесу через присутність внутрішньовим'яної інфекції; також цей показник вважається чутливим маркером стану здоров'я вимені у кіз [8,9]. Нормальний рівень соматичних клітин у неінфікованому вимені кіз (~ 300 тис / мл), і овець (~ 200 тис / мл) істотно вище, ніж у молочних корів (~ 70 тис / мл), отже, цей показник в інфікованому вимені кіз і овець, як правило, значно вище, ніж у корів. Це означає, що схеми градації молока засновані на кількості соматичних клітин у кіз і овець, повинні бути спеціально пристосовані до цих двох видів, і не можуть бути просто повторені з тих, які встановлені у корів. Багато неінфекційних факторів також можуть викликати значні відмінності в кількості соматичних клітин в козиному молоці. Одна з проблем, унікальних для кіз, є помітне підвищення цього показнику в молоці зі здорового вим'я ближче до кінця лактації [9, 10].

Ґрунтуючись на поширеності бактеріальних інфекцій і ряду досліджень як на рівні стада, так і на рівні інфікування молочної залози в окремих тваринах *Leitner* та ін. запропонували схему класифікації молока кіз і овець. Згідно з цією пропозицією, молоко з кількістю соматичних клітин > 3,5 млн / мл не повинно прийматися на молокопереробні підприємства [2].

Таким чином, для сортування якості козиного молока для виробничих цілей, потрібні інші критерії, ніж кількість соматичних клітин [11].

Метою дослідження було порівняти різні

методи визначення кількості соматичних клітин у козиному молоці.

Матеріал і методи досліджень. Досліджували індивідуальні проби молока від 28 кіз німецької білої, англо-нубійської, альпійської та місцевої порід приватного підприємства “Укрсілгоспром”, яке розташоване у м. Підгороднє Дніпропетровського району Дніпропетровської області у травні 2016 року.

Визначення соматичних клітин проводилося на приладі “SomaCount Flow Cytometer” (метод проточної цитометрії) в умовах лабораторії ТОВ “Дейрі Менеджмент Систем” Дніпропетровської обласної громадської організації “Сільськогосподарська консультаційна служба” та за допомогою віскозиметричного аналізатора “Соматос” на кафедрі паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. Виготовляли мазки молока, застосовували фіксатор Карнуа, фарбували піроніном Y і метиловим зеленим [12], за Романовським-Гімза, за Майн-Грюнвальдом, підраховували соматичні клітини за методом Прескота-Бріда під мікроскопом (об'єктив 100) за допомогою імерсійної олії [13].

Фізико-хімічний склад козиного молока визначали за допомогою ультразвукового аналізатора молока “Ekomilk тип MILKANA KAM 98-2a”

Результати та їх обговорення.

Намагалися визначити кількість соматичних клітин молока в камері Горяєва за методами Хількевича та Архангельського, але результати незадовільні, оскільки краплі жиру козиного молока не дають повноцінно дослідити і підрахувати кількість клітин.

При дослідженні мазків молока за методом Майн-Грюнвальда отримали найкращі результати у порівнянні з іншими методами фарбування мазків. Виявили соматичні клітини з чітко окресленою цитоплазмою та ядрами. При фарбуванні мазків піроніном Y результат також задовільний, але через високу вартість матеріалів цей метод використовувати недоцільно (рис. 1).

Деякі вчені відмічають, що в молоці більшості видів тварин соматичні клітини у неінфікованій залозі представлені лейкоцитами, що складаються з лімфоцитів, поліморфно-ядерних нейтрофілів і макрофагів, які служать

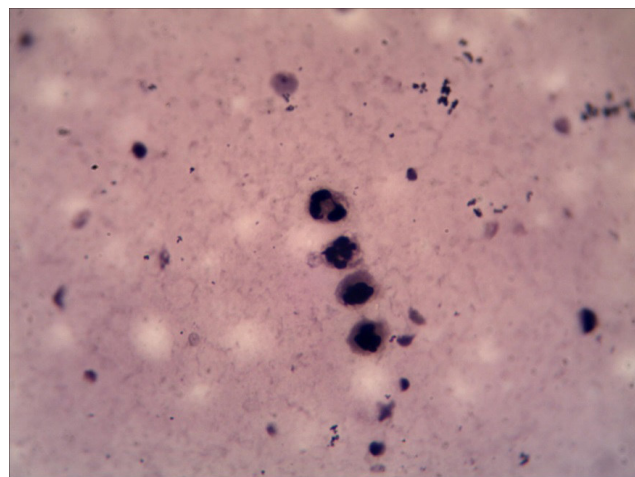
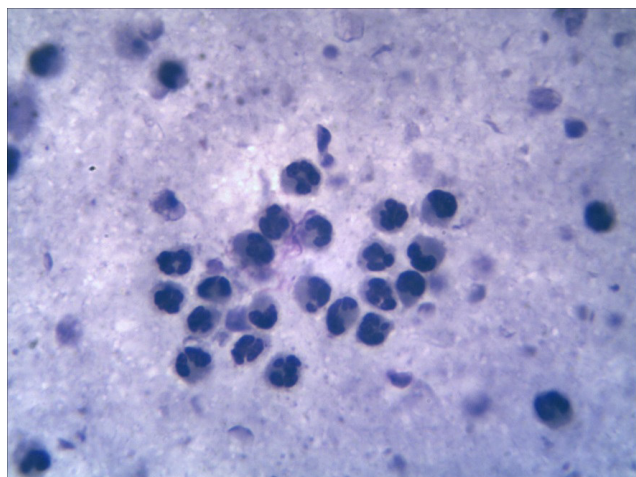


Рис. 1. Соматичні клітини у мазках козиного молока.
Фарбування за Майн-Грюнвальдом. $\times 1000$

в якості важливих компонентів захисту молочної залози проти потенційних патогенів, головним чином бактерій. Молоко також містить злушені епітеліальні клітини. У неінфікованій залозі корів соматичні клітини складаються з епітеліальних клітин на 40%, а у кіз – на 27% [2, 14].

Арбітражним методом вважають підрахунок соматичних клітин молока за методом Прескота-Бріда, також мазки козиного молока рекомендують фарбувати піроніном, але барвники для проведення дослідження мають високу вартість, тому ми порівнювали рекомендований метод з більш доступними. Для полег-

шення обробки результати дослідження молока кіз розподілили на 5 діапазонів за кількістю соматичних клітин. З таблиці 1 ми бачимо, що найменша кількість соматичних клітин на останньому рівні (>3 млн/мл) відмічена при підрахунку за допомогою приладу “Соматос”. При підрахунку клітин у мазках, пофарбованих будь-яким методом не виявлено зразків з кількістю соматичних клітин до 100 тис/мл.

За результатами досліджень на приладах “Соматос” та “SomaCount Flow Cytometer” найбільша частина мазків відносилася до рівня – 101 – 500 тис/мл – 35,7 і 50% мазків молока відповідно. Найбільша частина мазків щодо

Таблиця 1. Визначення кількості соматичних клітин в козиному молоці різними методами

Рівень соматичних клітин у молоці, тис/мл	Кількість соматичних клітин, визначених різними методами, тис/мл				
	на приладах		підрахунок у мазках молока, пофарбованих		
	“Соматос”	“SomaCount Flow Cytometer”	за Романовським-Гімза	піроніном Y і метиловим зеленим	за Майн-Грюнвальдом
до 100	72 \pm 6	66 \pm 20			
101-500	254 \pm 38	302 \pm 35	425 \pm 12	392 \pm 47	354 \pm 136
501-1000	766 \pm 141	741 \pm 71	851 \pm 62	811 \pm 357	734 \pm 57
1001-3000	1768 \pm 342	1518 \pm 205	2293 \pm 163	1790 \pm 205	1706 \pm 164
>3000	5500 \pm 501	8865 \pm 3374	9869 \pm 3730	10903 \pm 3520	7677 \pm 3326

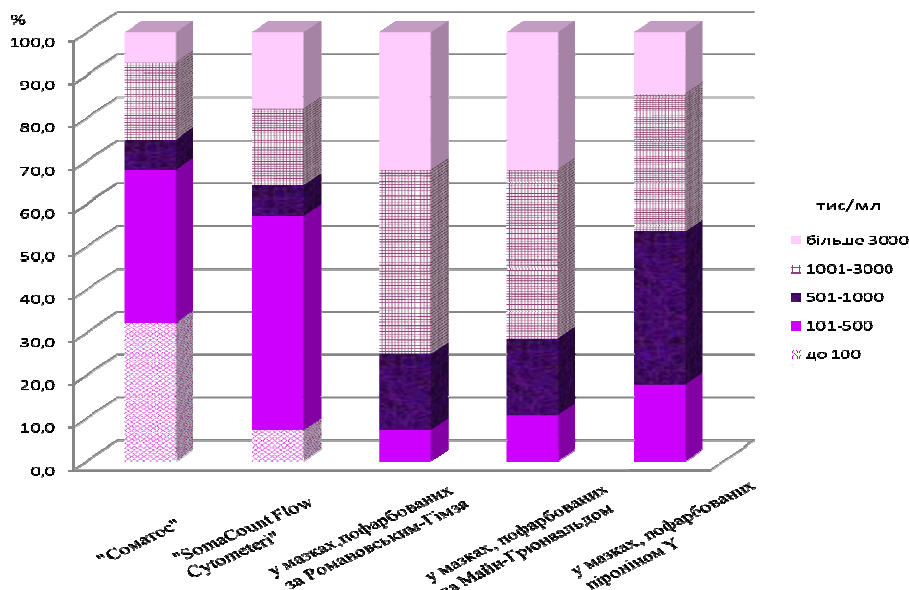


Рис. 2. Розподіл мазків за різними методами підрахунку соматичних клітин у молоці

методів фарбування – за Романовським-Гімза – 42,9% та за Майн-Грюнвальдом – 39,3% відноситься до діапазону 1001–3000 тис/мл, тоді як мазки, пофарбовані піроніном Y і метиловим зеленим – 35,7% – до діапазону 501–1000 тис/мл. Це доводить, що при прямому підрахунку соматичних клітин у мазках козиного молока, зафарбованих будь-яким методом, виявляється більша кількість клітин, ніж за допомогою приладів. Розподіл діапазонів соматичних клітин схожий між різними методами фарбування мазків, що ще раз доводить точність методу прямого підрахунку клітин у мазках молока, хоч це більш трудомісткі методи, ніж апаратні (рис. 2).

Зі збільшенням кількості соматичних клітин поступово підвищувалися показники жиру

(табл. 2). Також спостерігалася позитивна кореляція між кількістю соматичних клітин і вмістом білку і лактози, однак в останній групі (більше 3 млн/мл.) відбулося різке зниження показників. Протилежна тенденція спостерігалася відносно температури замерзання молока. Таким чином, після аналізу отриманих результатів виявлено, що при зниженні вмісту білку температура замерзання підвищувалась. Така тенденція спостерігалася і в інших дослідженнях, описаних в попередніх власних публікаціях [15, 16].

Дослідження угорських вчених також виявили позитивну кореляцію ($P < 0,01$) між кількістю соматичних клітин і вмістом білка ($r = 0,67$; $p < 0,001$) і негативну кореляцію між кількістю соматичних клітин і вмістом лактози (r

Таблиця 2. Показники молока залежно від рівня соматичних клітин

Показник, од. вимір.	Рівень соматичних клітин у молоці, тис/мл			
	101-500, $n=5$	501-1000, $n=10$	1001-3000, $n=9$	>3000, $n=4$
Кількість соматичних клітин у молоці (метод з піроніном), тис/мл	392±47	812±357	1790±205	10903±3520
Жир, %	2,62±0,37	2,74±0,32	3,05±0,37	4,37±0,84
Білок, %	3,13±0,12	3,16±0,04	3,33±0,07	2,82±0,52
Лактоза, %	4,72±0,17	4,77±0,06	5,01±0,10	4,18±0,81
Температура замерзання, °C	-0,558±0,021	-0,565±0,007	-0,592±0,011	-0,515±0,078
Електропровідність, мС/м	5,338±0,179	5,286±0,092	5,378±0,161	5,740±0,358

= -0.41, $p < 0,001$) і температурою замерзання ($r = -0,33$) [3].

За результатами Bagnicka E. et al. не виявлено кореляційного зв'язку між кількістю соматичних клітин і вмістом білка, жиру і лактози у козиному молоці [17]. Польські вчені вказують на наявність впливу кількості соматичних клітин на вміст лактози у козиному молоці [18].

За власними дослідженнями зі збільшенням кількості соматичних клітин майже поступово підвищуються показники електропровідності. Підвищення електропровідності молока зазвичай пов'язують з виникненням субклінічного маститу у корів, тобто зі збільшенням кількості соматичних клітин.

Кількість соматичних клітин, найбільш інформативний для діагностики стану здоров'я вимені у корів, може бути не надійним параметром для визначення субклінічного маститу у кіз. Цей показник дуже змінюється (наприклад, в період лактації кіз) і часто значення більше 1 млн/мл визначають без появи субклінічного маститу. Кількість соматичних клітин може збільшитися тільки за рахунок фізіологічних чинників (наприклад, породи, кількості окотів, стадії лактації, еструсу), гігієнічних параметрів і доїльного обладнання. Золотий стандарт для виявлення маститу це визначення бактеріологічного статусу, але аналіз забирає багато часу і коштів і не використовується часто. Пропонується використовувати в якості альтернативи такі параметри субклінічного маститу у кіз, як число соматичних клітин, Каліфорнійський маститний тест, електропровідність, склад молока (жир, білок, лактоза), N-ацетил- β -D-глюкозамінази (NAGase), лактоферин, β -глюкуронідази та лактатдегідрогенази [19].

Висновки. 1. Для підрахунку соматичних клітин у козиному молоці за методом Прескота-Бріда пропонується фарбувати мазки методом Майн-Грюнвальда, тому що чітко зафарбовується цитоплазма та ядра соматичних клітин, а вартість барвників набагато менша ніж метода з піроніномУ.

2. При підрахунку клітин у мазках, пофарбованих будь-яким методом, не виявлено зразків з кількістю соматичних клітин до 100 тис/мл

3. За результатами досліджень на приладах "Соматос" та "SomaCount Flow Cytometer" найбільша частина мазків відносилася до рівня – 101 – 500 тис/мл – 35,7 і 50% мазків молока відповідно. Найбільша частина мазків щодо методів фарбування – за Романовським-Гімза – 42,9% та за Майн-Грюнвальдом – 39,3% відносилася до діапазону 1001–3000 тис/мл, тоді як мазки, пофарбовані піроніном У і метиловим зеленим – 35,7% – до діапазону 501–1000 тис/мл.

4. При прямому підрахунку соматичних клітин у мазках козиного молока, зафарбованих будь-яким методом, виявляється більша кількість клітин, ніж за допомогою приладів. Розподіл діапазонів соматичних клітин схожий між різними методами фарбування мазків, що ще раз доводить точність методу прямого підрахунку клітин у мазках молока, хоч це більш трудомісткі методи, ніж апаратні.

5. Зі збільшенням кількості соматичних клітин підвищувалися показники жиру, але статистичної різниці не визначено. Також виявлено, що при зниженні вмісту білку температура замерзання підвищувалась.

Перспективи подальших розробок. У подальшому планується встановлення параметрів субклінічного маститу у кіз.

ЛІТЕРАТУРА

1. Yangilar F. Potentially Functional Food: Goats' Milk and Products / F. Yangilar // Journal of Food and Nutrition Research. – 2013. – 4. – P. 68–81.
2. Silanikovea N. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects / N. Silanikovea, G. Leitner, U. Merin, C. Prosser // Small Ruminant Research. – 2010. – 89. – P. 110–124.
3. Pajor F. Effect of somatic cell count on some chemical, physical and bacterial properties of milk in a Hungarian Alpine goat farm / F. Pajor, A. Sramek, G. Toth, P. Poti // Goat Milk Quality Regional IGA Conference, Norway. Abstracts. – 2013. – P. 38.
4. Bagnicka E. Environmental and genetic parameters of somatic cells and lactose contents in goat milk / E. Bagnicka, M. Lukaszewicz,

- T. Adnoy // Goat Milk Quality Regional IGA Conference Norway. Abstracts. – 2013.– P. 2.
5. Silanikove N. On effects of stage of lactation and subclinical mastitis on milk quality in goats / N. Silanikove, U. Merin, G. Leitner // Goat Milk Quality Regional IGA Conference, Norway. Abstracts. – 2013.– P. 44.
6. Solverod L. Udder health in Norwegian goat dairy herds / L. Solverod // Goat Milk Quality Regional IGA Conference, Norway. Abstracts. – 2013.– P. 49.
7. Looper M. Reducing Somatic Cell Count in Dairy Cattle / M. Looper // Agriculture and Natural Resources. – 2013. <https://www.uaex.edu/publications/PDF/FSA-4002.pdf>
8. Ljutovac R. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products / R. Ljutovac, P. Gaborit, A. Lauret // Small Ruminant Research. – 2005. – 60. – P. 167–177.
9. Ljutovac R. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects / R. Ljutovac, A. Pirisi, R. DeCremoux, C. Gonzalo // Small Ruminant Research.– 2007. – 68. – P. 126–144.
10. Зажарська Н.М. Бактеріальне забруднення молока за різних температур і термінів зберігання / Н.М. Зажарська // Науковий вісник Львів. нац. університету вет. медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2016. – 18. – С. 108–111.
11. Leitner G. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count / G. Leitner, N. Silanikove, U. Merin // Small Ruminant Research. – 2008. – 74. – P.221–225.
12. Методичні рекомендації щодо підрахунку соматичних клітин в секреті вимені окремих корів та в збірному сирому молоці корів мікроскопічним методом визначення середньої геометричної величини / [Касянчук В.В., Скляр О.І., Гаркавенко Т.О. та ін]. – Київ, 2011. – 40 с.
13. Induction of mastitis in rabbit mammary glands with bovine mastitis bacterial strains / G. Kavitha, S. Isloor, D. Rathnamma [et al.] // International Journal of Pharma and Bio Sciences. – 2011. – 2 (3). – P. 266–276.
14. Boutinard M. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production / M. Boutinard, J. Guinard-Flament, H. Jammes // Reproduction Nutrition Développement – 2002.– 44. – P. 499–508.
15. Фотіна Т.І. Застосування наночастинок срібла козам для обробки вимені / Т.І. Фотіна, Н.М. Зажарська, О.О. Зубков // Науково-технічний бюлетень Держ. науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. – 2016. – 17 (2). – С. 166–174.
16. Зажарська Н.М. Порівняльна характеристика показників якості молока кіз німецької білої, альпійської та англонубійської порід / Н.М. Зажарська, В.О. Грамма // Вісник Житомирського нац. агроєкологічного університету. – 2016. – № 1 (53), т. 1. – С.214–220.
17. Bagnicka E. Genetic parameters of somatic cell score and lactose content in goat's milk / E. Bagnicka, M. Lukaszewicz, T. Adnoy // Journal of Animal and Feed Sciences. – 2016. – 25. – P. 210–215.
18. Factors influencing technological properties of goat milk / [M. Czopowicz, N. Strzalkowska, M. Rzewuska, et al.] // Goat Milk Quality Regional IGA Conference, Norway. Abstracts. – 2013.– P. 14.
19. Stuhr T. Intramammary infections in dairy goats: recent knowledge and indicators for detection of subclinical mastitis / T. Stuhr, K. Aulrich // Landbauforschung Applied Agriculture and Forestry Research. –2010. – 4 (60). – P. 267–280.

ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН КОЗИНОГО МОЛОКА

Зажарская Н. Н., Жарко Л. И.

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепр

Сравнено эффективность определения количества соматических клеток в козьем молоке различными методами. Исследовали соматические клетки в индивидуальных пробах молока от 28 коз на приборах “Соматос”, “Soma Count Flow Cytometer” и методом подсчета в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза, Майн-Грюнвальду и пиронином Y. При подсчете клеток в мазках, окрашенных любым методом, не обнаружено образцов с количеством соматических клеток до 100 тыс / мл. При прямом подсчете соматических клеток в мазках козьего молока, окрашенных любым методом, оказывается большее количество клеток, чем с помощью приборов. Распределение диапазонов соматических клеток похоже между различными методами окрашивания мазков, что еще раз доказывает точность метода прямого подсчета клеток в мазках молока, хотя это более трудоемкие методы, чем аппаратные. Для подсчета соматических клеток в козьем молоке методом Прескота-Брида предлагается красить мазки методом Майн-Грюнвальда, потому что четко окрашивается цитоплазма и ядра соматических клеток, а стоимость красителей гораздо меньше, чем в методе с пиронином Y. С увеличением количества соматических клеток повышались показатели жира, но статистической разницы не определено. Также выявлено, что при снижении содержания белка в молоке температура замерзания повышалась.

Ключевые слова: козье молоко, количество соматических клеток, мазки молока, жир, белок, температура замерзания, лактоза

COMPARISON OF METHODS EFFICIENCY FOR DETERMINATION OF SOMATIC CELLS COUNT IN GOAT MILK

N. Zazharska, L. Zharko

Dnipropetrovs'k State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

The efficiency of determination of somatic cells count in goat milk by different methods was compared. Somatic cells in individual milk samples from 28 goats were analyzed by means of analyzer “Somatos”, “Soma Count Flow Cytometer” and the by counting of cells in milk films stained with pironin Y, at Romanovsky-Giemsa and May-Grunwald methods.

When counting cells in milk films stained by any method there were not found the samples with somatic cells count to 100×10^3 cells / ml. According to the research by means of “Somatos” and “SomaCountFlowCytometer” most of milk films related to the level of $101-500 \times 10^3$ cells / ml – 35.7 and 50% respectively. The largest part of stained milk films – by Romanovsky-Giemsa staining – 42.9% and by May-Grunwald staining – 39.3% belonged to the range of $1001-3000 \times 10^3$ cells / ml, whereas films, stained with pironin Y and methyl green – 35.7% – to a range of $501-1000 \times 10^3$ cells / ml.

The greater number of cells in direct counting of somatic cells in goat milk films, stained by any method was determined than using appliances. The distribution ranges of somatic cells is similar between different methods of film staining, which once again proves the accuracy of the method of direct cell counting in milk films, though it is more labor-intensive methods than hardware.

May-Grunwald staining is proposed for counting of somatic cells in goat milk films by Prescott and Breed method, because cytoplasm and nuclei of somatic cells are well stained, and cost much less than staining with pironin Y.

While increasing of somatic cells count fat content was gradually raised, but significant difference was not found. Also there was a positive correlation between the somatic cells count and protein and lactose, but in the last group (somatic cell count of more than 3 million / ml), there was a sharp decrease. The opposite trend was observed regarding the freezing point of milk. It was found that while reducing of protein in goat milk, freezing temperature increased.

Keywords: goat milk, somatic cells count, milk films, fat, protein, freezing temperature, lactose