

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6686-1:2009**

**ISO 13366-1:2008**

Xuất bản lần 2

**SỮA – ĐỊNH LƯỢNG TẾ BÀO XÔMA –  
PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP DÙNG KÍNH HIỂN VI  
(PHƯƠNG PHÁP CHUẨN)**

*Milk – Enumeration of somatic cells –  
Part 1: Microscopic method (Reference method)*

HÀ NỘI - 2009

## Lời nói đầu

TCVN 6686-1:2009 thay thế TCVN 6686-1:2000;

TCVN 6686-1:2009 hoàn toàn tương đương với ISO 13366-1:2008;

TCVN 6686-1:2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 6686 (ISO 13366) *Sữa – Định lượng tế bào xôma* gồm có các phần sau:

- TCVN 6686-1:2009 (ISO 13366-1:2008), *Phần 1: Phương pháp dùng kính hiển vi (Phương pháp chuẩn)*;
- TCVN 6686-2:2007 (ISO 13366-2:2006), *Phần 2: Hướng dẫn vận hành máy đếm huỳnh quang điện tử*.

## Sữa – Định lượng tế bào xôma –

### Phần 1: Phương pháp dùng kính hiển vi (Phương pháp chuẩn)

*Milk – Enumeration of somatic cells –*

*Part 1: Microscopic method (Reference method)*

#### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp dùng kính hiển vi (phương pháp chuẩn) để đếm tế bào xôma trong sữa nguyên liệu và sữa được bảo quản bằng hoá chất.

Phương pháp này có thể dùng để đếm các tế bào xôma trong sữa bò, khi đáp ứng được các điều kiện tiên quyết đã đề cập.

Phương pháp này thích hợp cho việc chuẩn bị các mẫu thử chuẩn và để xác định các giá trị của phương pháp chuẩn cần thiết cho việc hiệu chuẩn các phương pháp đếm tế bào tự động và cơ học.

**CẢNH BÁO** – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

#### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

##### 2.1

**Tế bào xôma** (somatic cells)

Tế bào có nhân, là tất cả các tế bào bạch cầu và biểu mô, xác định được bằng quy trình mô tả trong tiêu chuẩn này.

### 3 Nguyên tắc

Dàn đều phần mẫu sữa cần kiểm tra trên khắp phiến kính để tạo một lớp màng mỏng. Làm khô lớp màng. Trong quá trình này các tế bào được nhuộm màu. Dùng kính hiển vi đếm các tế bào đã nhuộm. Nhân số lượng tế bào đếm được trong một diện tích xác định với hệ số làm việc để có số lượng tế bào trong một mililit.

### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác, và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã loại ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

#### 4.1 Dung dịch nhuộm màu

**CẢNH BÁO** – Tetracloetan là chất độc. Ethidi bromua cũng có tính độc. Khi bị đổ tràn, cần làm mất tác dụng của chúng đúng cách. Việc chuẩn bị và sử dụng dung dịch nhuộm màu phải được thực hiện trong tủ hút, sử dụng dụng cụ bảo vệ.

##### 4.1.1 Dung dịch thuốc nhuộm Newman-Lampert cải biến (cải biến của Levowitz-Weber)

###### 4.1.1.1 Thành phần

|   |         |
|---|---------|
| Etanol, 95 % (phần thể tích)  | 54,0 ml |
| Tetracloetan <sup>a</sup>   | 40,0 ml |
| Xanh metylen  | 0,6 g   |
| Axit axetic, băng   | 6,0 ml  |
| <sup>a</sup> Có thể sử dụng xylene để thay thế cho tetracloetan với một thể tích quy định như trên. |         |

###### 4.1.1.2 Chuẩn bị

Trộn etanol và tetracloetan trong lọ có nắp đậy. Làm nóng trong nồi cách thủy (5.1) ở 65 °C. Thêm xanh metylen và trộn kỹ, thực hiện trong tủ hút. Làm lạnh trong tủ lạnh đến 4 °C.

Sau đó cho thêm axit axetic băng và trộn lại. Rót dung dịch thu được qua bộ lọc thích hợp (5.2) vào một lọ kín và bảo quản trong lọ nút kín này.

Lọc lại dung dịch thuốc nhuộm Newman-Lampert này trước khi sử dụng, nếu cần.

#### 4.1.2 Dung dịch thuốc nhuộm ethidi bromua

##### 4.1.2.1 Dung dịch gốc thuốc nhuộm

**4.1.2.1.1 Thành phần**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Ethidi bromua       | 0,25 g |
| Nước đã loại khoáng | 100 ml |

**4.1.2.1.2 Chuẩn bị**

Hoà tan ethidi bromua trong nước đã loại khoáng đã được làm ấm trước đến 40 °C. Làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng. Thêm nước đã loại khoáng đến thể tích 100 ml.

Dung dịch gốc thuốc nhuộm ethidi bromua có thể giữ được tối đa hai tháng khi được bảo quản ở nơi tối ở 2 °C ± 2 °C.

**4.1.2.2 Dung dịch đệm****4.1.2.2.1 Thành phần**

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Kali hydroptalat    | 0,51 g  |
| Kali hydroxit       | 0,162 g |
| Nước đã loại khoáng | 100 ml  |

**4.1.2.2.2 Chuẩn bị**

Hoà tan kali hydroptalat và kali hydroxit riêng rẽ trong nước đã loại khoáng.

Dung dịch đệm có thể giữ được tối đa hai tháng khi được bảo quản ở nơi tối ở 2 °C ± 2 °C.

**4.1.2.3 Dung dịch làm việc thuốc nhuộm ethidi bromua****4.1.2.3.1 Thành phần**

|   |        |
|---|--------|
| Dung dịch gốc thuốc nhuộm ethidi bromua * (4.1.2.1) | 2 ml   |
| Dung dịch đệm (4.1.2.2)                             | 8 ml   |
| Triton X-100  | 0,1 ml |
| Nước đã loại khoáng                                 | 90 ml  |

\* Nhiệt độ cao có thể làm giảm khả năng nhuộm màu của ethidi bromua.

**4.1.2.3.2 Chuẩn bị**

Cho tiếp dung dịch gốc thuốc nhuộm ethidi bromua, dung dịch đệm và Triton X-100 vào nước đã loại khoáng và trộn kỹ.

Chuẩn bị dung dịch làm việc ethidi bromua ngay trước khi sử dụng.

# TCVN 6686-1:2009

## 4.2 Dung dịch đệm phosphat (PBS)

### 4.2.1 Thành phần

|   |          |
|---|----------|
| NaCl  | 8 g      |
| KCl   | 0,2 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 1,15 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,2 g    |
| Nước đã loại khoáng                                 | 1 000 ml |

### 4.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các loại muối nói trên trong nước đã loại khoáng. Thêm nước đã loại khoáng đến 1 000 ml.

Chỉnh pH đến  $7,2 \pm 0,1$ .

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng dung dịch đệm phosphat bán sẵn có pH = 7,2.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

5.1 **Nồi cách thủy**, có thể duy trì ở  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  và  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5.2 **Phễu lọc**, bền với các dung môi sử dụng, có kích thước lỗ từ 10  $\mu\text{m}$  đến 12  $\mu\text{m}$ .

5.3 **Kính hiển vi**, có độ khuếch đại từ 500 đến 1 000 lần. Có thể sử dụng vật kính ngâm dầu.

Khi sử dụng ethidi bromua, thì kính hiển vi phải có dụng cụ phát quang.

5.4 **Microxyranh**, có thể phân phối thể tích cố định 0,01 ml, có dung sai tối đa là 2 %.

5.5 **Dụng cụ đo vi lượng**, cần được chứng nhận.

5.6 **Phiến kính**, được đánh dấu bằng hình vẽ (hình chữ nhật hoặc hình tròn) có diện tích  $1\text{ cm}^2 \pm 5\%$  ( $95\text{ mm}^2$  đến  $105\text{ mm}^2$ ) hoặc phiến kính chuẩn có kích thước 20 mm x 5 mm hoặc có đường kính  $d = 11,28\text{ mm}$ .

### 5.6.1 Lựa chọn phiến kính

Tốt nhất là có một tấm hoặc diện tích đánh dấu cố định trước để tránh đếm lại với mỗi lần đếm.

### 5.6.2 Hình dạng

Đối với dạng hình chữ nhật, các chiều rộng bên trong phía trên và phía dưới và các chiều cao bên trong phía phải và phía trái không được khác nhau quá 0,2 mm.

Đối với dạng hình tròn thì các đường kính trong theo chiều ngang và chiều dọc không được khác nhau quá 0,2 mm.

## 6 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Nếu sử dụng bộ lấy mẫu tự động, thì chúng phải được kiểm tra xác nhận chính xác.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

### 7.1 Bảo quản

Trước khi thử nghiệm hoặc bảo quản, giữ mẫu ở  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Phân tích mẫu thử trong vòng 6 h sau khi lấy mẫu. Khi phải bảo quản lâu hơn thì bổ sung các hoá chất bảo quản như axit boric, bronopol hoặc kali dicromat. Nồng độ cuối cùng của axit boric không được vượt quá 0,6 g/100 ml mẫu thử. Nồng độ cuối cùng của bronopol không được vượt quá 0,05 g/100 ml mẫu thử. Nồng độ cuối cùng của kali dicromat không được vượt quá 0,1 g/100 ml mẫu thử. Bảo quản các mẫu đã bổ sung chất bảo quản ở  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  không quá 6 ngày.

Vi các lý do về môi trường, nên hạn chế sử dụng kali dicromat cho các mẫu có hạn sử dụng dài.

### 7.2 Chuẩn bị

Làm nóng mẫu thử (xem 7.1) trên nồi cách thuỷ (5.1) ở nhiệt độ  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Trộn kỹ mẫu thử. Làm nguội mẫu thử đến nhiệt độ của microoxyranh (5.4) đã được hiệu chuẩn, ví dụ ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pha loãng mẫu có số tế bào xôma dự đoán trên 1 000 000 tế bào/ml với dung dịch đệm phosphat (4.2) để thu được số tế bào xôma khoảng 500 000 tế bào/ml đối với mỗi mẫu thử đã pha loãng.

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

## TCVN 6686-1:2009

trong đó:

$d$  là hệ số pha loãng để thu được số tế bào xôma thích hợp trong mẫu thử có khoảng 500 000 tế bào/ml;

$V_s$  là thể tích mẫu thử, tính bằng mililit;

$V_0$  là thể tích dung dịch đệm dùng để pha loãng mẫu thử, tính bằng mililit.

Ghi lại hệ số pha loãng,  $d$ , thể tích mẫu thử  $V_s$  và thể tích dung dịch đệm  $V_0$  đã sử dụng để thu được dung dịch pha loãng cần thiết.

### 8 Cách tiến hành

Chuẩn bị từ mỗi mẫu thử ít nhất hai màng và đếm tế bào xôma trong màng tốt nhất (ví dụ: màng nhuộm không bị hư hỏng khi nhuộm). Nhúng các phiến kính (5.6) trong etanol (dung dịch 95 %). Hơ trên lửa và để nguội.

#### 8.1 Chuẩn bị màng mỏng và nhuộm màu

Tiến hành theo 8.1.1 hoặc 8.1.2 để chuẩn bị màng mỏng và nhuộm màu.

CHÚ THÍCH Việc nhuộm màu sữa dê được mô tả trong Phụ lục B.

##### 8.1.1 Chuẩn bị màng mỏng và nhuộm bằng dung dịch thuốc nhuộm Newman-Lampert

Dùng microxyranh (5.4) lấy 0,01 ml mẫu thử đã chuẩn bị (cuối cùng đã được pha loãng) (xem 7.2). Tráng microxyranh bằng mẫu thử. Khi microxyranh đã tiếp xúc với mẫu thì cẩn thận làm sạch mặt ngoài của microxyranh, nếu cần.

Cho phần mẫu thử lên một phiến kính sạch có diện tích 1 cm<sup>2</sup> (5.6). Dùng kim cấy dàn đều mẫu trên khắp vi trường xác định, vẫn đảm bảo rằng vi trường gắn với viền bao quanh cũng được phết đều. Để màng khô hẳn ở nhiệt độ phòng.

Nhúng màng mỏng đã khô trên phiến kính vào dung dịch nhuộm màu Newman-Lampert cải biến (4.1.1) ít nhất 15 min. Để màng khô hẳn ở nhiệt độ môi trường.

Sau đó những màng đã khô vào nước cho đến khi hết hẳn thuốc nhuộm sót lại. Làm khô lại và bảo quản tránh bụi.

##### 8.1.2 Nhuộm bằng dung dịch thuốc nhuộm ethidi bromua và chuẩn bị màng mỏng

Trộn 1 ml mẫu thử đã chuẩn bị (xem 7.2) với 1 ml dung dịch làm việc của thuốc thử ethidi bromua (4.1.2.3) trong ống thuốc thử. Giữ hỗn hợp tránh ánh sáng. Làm nóng ống trên nồi cách thủy (5.1) ở 50 °C trong 3 min. Làm nguội đến nhiệt độ phòng.



Dùng microxyranh (5.4) lấy 0,01 ml hỗn hợp. Tráng microxyranh bằng hỗn hợp. Khi microxyranh đã tiếp xúc với mẫu thì cẩn thận làm sạch mặt ngoài của microxyranh, nếu cần.

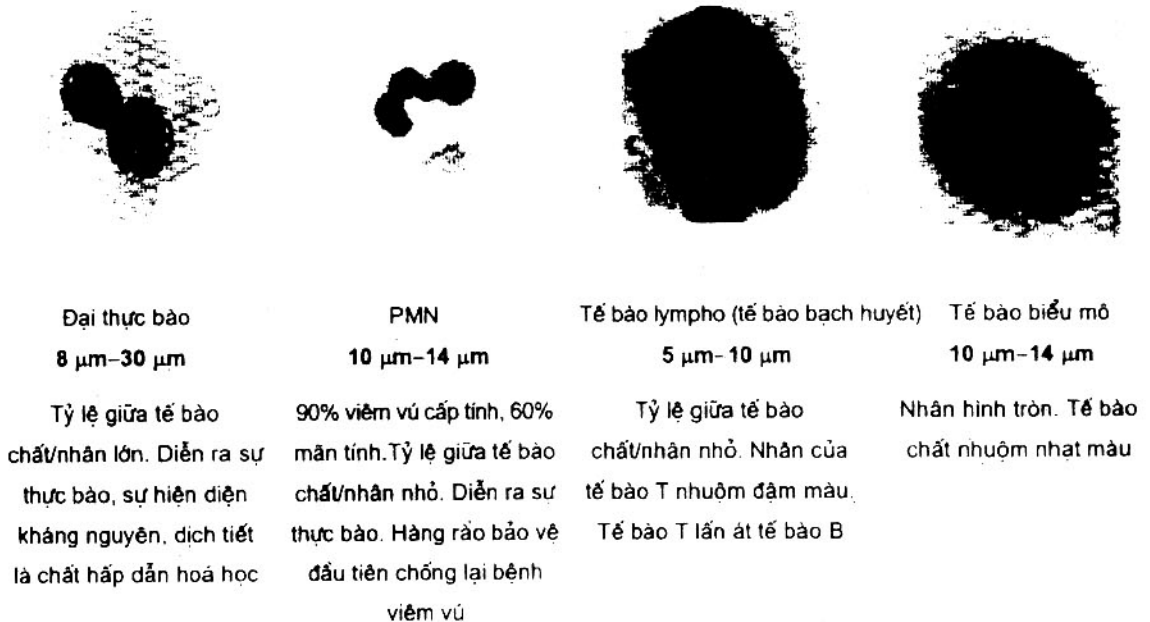
Cho phần mẫu thử lên một phiến kính sạch có diện tích 1 cm<sup>2</sup> (5.6). Dùng kim cấy dàn đều mẫu trên khắp vùng xác định, vẫn đảm bảo rằng vùng này gắn với viên bao quanh cũng được phết đều. Để màng khô hẳn ở nhiệt độ phòng.

## 8.2 Tiến hành xác định

### 8.2.1 Tối ưu hoá việc đọc kết quả

Dùng kính hiển vi (5.3) đếm các nhân tế bào trong màng mỏng thụ được (8.1.1 hoặc 8.1.2) của các vi trường hoàn toàn được phủ đầy màng sữa. Chọn độ phóng đại tốt nhất (từ 500 lần đến 1000 lần) để có được trung bình của số đếm tối đa là 20 tế bào trên mỗi vi trường.

Các tế bào có các nhân đã nhuộm. Các tế bào thường bằng hoặc lớn hơn 8 µm. Không đếm các tế bào nhỏ hơn 4 µm (xem Hình 1). Chỉ đếm các mảnh nếu nhiều hơn 50 % nhân có thể nhìn thấy được. Đếm các cụm tế bào thành một tế bào, trừ khi các nhân của các tế bào đó tách biệt rõ ràng. Xem thêm Hình 2 và Hình 3.

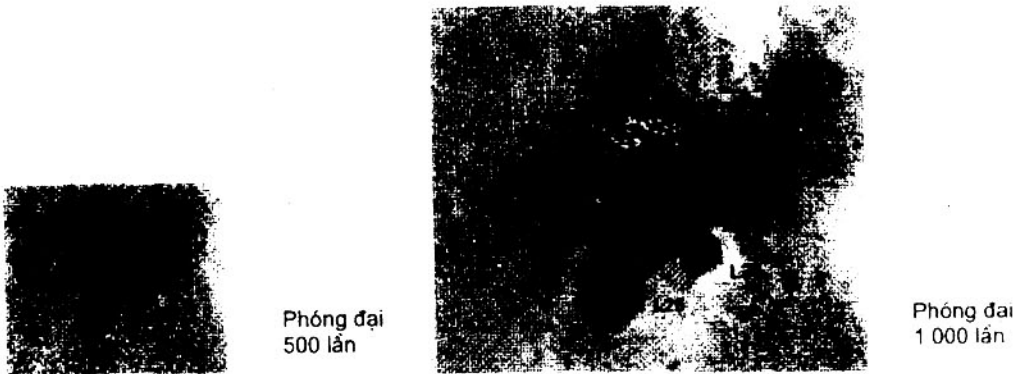


Hình 1 – Các ví dụ về tế bào



Chiều dài của tế bào: L1 = 9,79  $\mu\text{m}$  và L2 = 2,77  $\mu\text{m}$

**Hình 2 – Các ví dụ về tế bào sữa bò thu gom (phóng đại 1 000 lần)**



Chiều dài của tế bào: L22 = 9,08  $\mu\text{m}$ ; L23 = 8,27  $\mu\text{m}$ ; L24 = 4,95  $\mu\text{m}$ ; L25 = 7,39  $\mu\text{m}$ ; L26 = 6,37  $\mu\text{m}$   
và L27 = 3,58  $\mu\text{m}$ .

**Hình 3 – Các ví dụ về tế bào sữa bò**

Trong ví dụ của cụm tế bào trong Hình 3, năm tế bào cần được đếm. L27 được bỏ qua vì đường kính nhỏ hơn 4  $\mu\text{m}$ .

**CHÚ THÍCH** Việc đào tạo và kinh nghiệm của người phân tích là yếu tố quyết định của việc thực hiện đúng phương pháp. Việc thực hiện thường xuyên phương pháp và tham gia vào các thử nghiệm của phòng thử nghiệm là điều cơ bản để đảm bảo việc đếm đúng.

Nhìn chung, các tế bào trong sữa được phân bố theo phân bố Poisson (xem Phụ lục C). Số tế bào tối thiểu ( $N$ ) cần đếm có liên quan tới mức đếm tế bào, để đạt được hệ số biến thiên được nêu trong Bảng 1.

Để thực hiện đúng phương pháp, thì điều cơ bản là số đếm tối thiểu cần được đếm. Các vi trường và các dải cần đếm phải được chọn sao để thu được số đếm đại diện đối với toàn bộ màng mỏng.

**Bảng 1 – Số đếm tối thiểu (N) của tế bào**

| Nồng độ<br>(x 1000 tế bào/ml) | CV<br>% | N<br>tế bào |
|-------------------------------|---------|-------------|
| < 150                         | 10      | 100         |
| từ 150 đến 250                | 7       | 200         |
| từ 250 đến 400                | 6       | 300         |
| ≥ 400                         | 5       | 400         |

**8.2.2 Đếm trong các vi trường kế tiếp**

Đếm nhân tế bào trong các vi trường kế tiếp, trong các dải thẳng đứng của các vi trường cách đều nhau (xem Hình 4 và Bảng 1).

a) Bắt đầu từ khoảng cách,  $d_L$ , so với mép trái. Đối với dạng hình tròn thì bắt đầu từ một khoảng cách đủ  $d_L$ , so với mép trái của đường kính nằm ngang, sao cho có thể đếm được ít nhất 5 vi trường từ đỉnh của dải. Khoảng cách,  $d_L$  là 0,5 mm là thích hợp đối với cả hình dạng tròn và hình chữ nhật.

b) Đặt mép trên của vi trường tiếp tuyến đường với vi trường phía trên hoặc viền dưới phía trong của khuôn mẫu (viền dưới không xuất hiện trong vi trường). Trong trường hợp bề mặt gắn viền trong của khuôn mẫu chưa bao phủ thì điều chỉnh vi trường đếm theo đường viền của màng mỏng.

c) Sau khi đã đếm được vi trường thứ nhất, chuyển vật kính với khoảng cố định,  $d_H$ , xuống dưới hoặc lên trên đến vạch tiếp theo hướng của mép trên hoặc mép dưới và đếm vi trường mới. Khoảng cách  $d_H$  bằng 1 mm là thích hợp.

d) Từ vi trường cuối cùng đếm được, lặp lại thao tác trong c) cho đến khi đạt đến cạnh đối diện của dải đạt được (trên hoặc dưới). Chọn một trong hai cách sau đây:

– Cách 1: Vi trường sau cùng không đếm được.

– Cách 2: Nếu viền trên hoặc viền dưới xuất hiện và được làm đầy ít hơn hoặc bằng một nửa bề mặt vi trường đếm, thì thực hiện đếm sau khi chuyển vật kính lên cho đến khi viền lại biến mất hoàn toàn khỏi vi trường, sau đó chỉ đây màng mỏng.

e) Sau đó chuyển vật kính sang phải một khoảng,  $d_w$  (ví dụ  $d_w = 1,5$  mm hoặc  $d_w = 2$  mm tùy thuộc vào số lượng vi trường đếm cần thiết) và bắt đầu một dải mới theo hướng ngược lại (đỉnh hoặc đáy).

f) Lặp lại b) đến e) cho đến khi đạt được mép phải của khuôn.

## TCVN 6686-1:2009

g) Trong trường hợp không đủ các vi trường đếm (xem Bảng 1), thì có thể đếm các vi trường bổ sung. Để làm được điều này, điều chỉnh tiêu điểm của vật kính trên các vị trí khác (ví dụ bằng cách thay đổi vị trí bắt đầu và/hoặc điều chỉnh các khoảng dịch chuyển cho thích hợp) sao cho thu được số vi trường thích hợp đại diện cho toàn bộ màng mỏng.

h) Tính các kết quả theo 9.1 đối với dạng hình chữ nhật, hoặc theo 9.3 đối với dạng hình tròn.

**CHÚ THÍCH** Với các dạng hình chữ nhật, có thể 5 vi trường cách nhau 1 mm trong các dải thẳng đứng và 10 dải cách nhau 2 mm để có thể đếm được 50 vi trường. Số lượng vi trường đếm tương tự thu được với các dạng hình tròn, sử dụng các khoảng cách tương tự. Các khoảng dịch chuyển (khoảng trống) được đo từ cùng một vị trí trên các vi trường với thước chạy (điều chỉnh trên mép trên hoặc mép dưới) sao cho chúng đã bao trùm được đường kính vi trường.

### 8.2.3 Đếm dạng hình chữ nhật theo các dải

Đếm nhân tế bào trong các dải thẳng đứng cách đều nhau (xem Hình 5 và Bảng 1).

a) Bắt đầu ở khoảng cách  $d_l$ , tính từ bên trái. Khoảng cách  $d_l$  bằng 0,5 mm được coi là thích hợp.

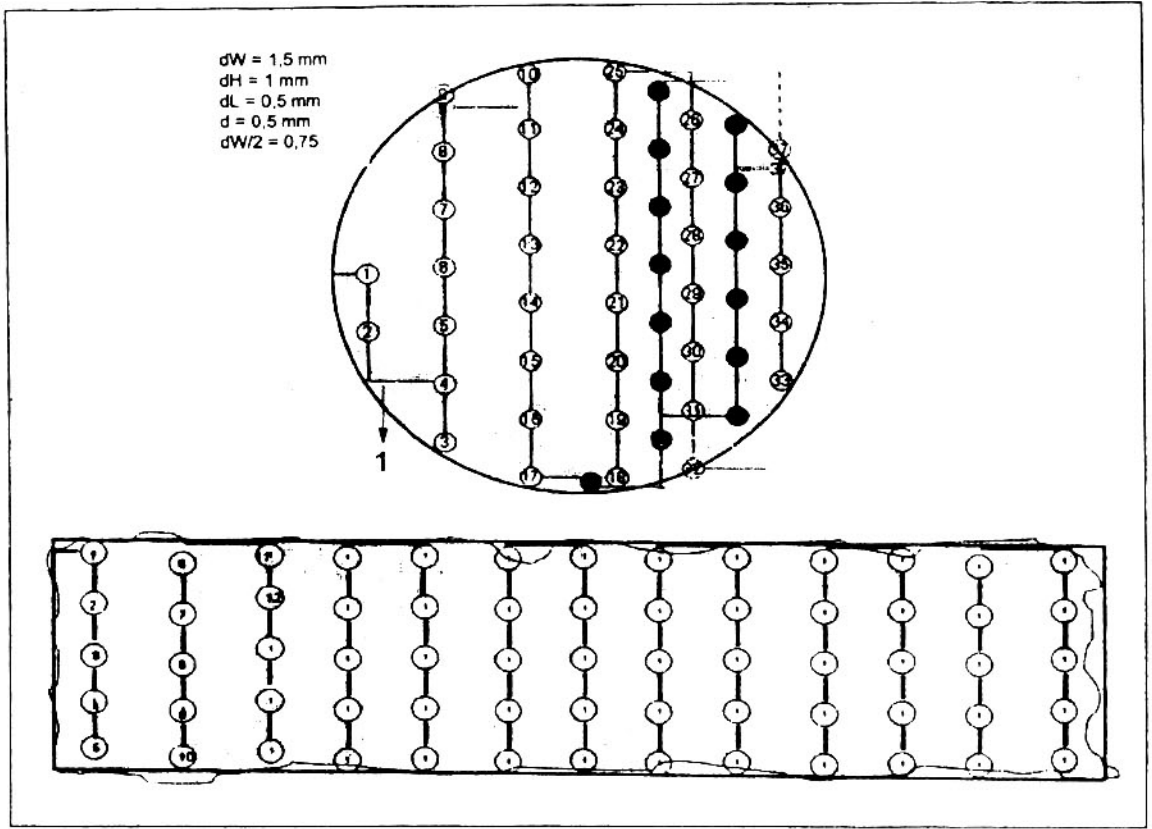
b) Bắt đầu đếm từ đường viền trên hoặc đường viền dưới của hình chữ nhật. Đặt lé của vùng đếm của vùng đếm ở giữa vi trường kính hiển vi. Sau khi tất cả các tế bào đã được đếm, chuyển vật kính theo hướng của viền ngược lại và đếm tất cả các tế bào xuất hiện trong dải này. Ghi lại số tế bào đếm được.

c) Sau đó chuyển vật kính sang phải một khoảng,  $d_w$ , và bắt đầu đếm với dải mới (ví dụ  $d_w = 3$  mm đến 4 mm, tùy thuộc vào số lượng dải cần đại diện cho số đếm của cả màng mỏng).

Lặp lại b) đến c) cho đến khi đạt được mép phải của khuôn.

Trong trường hợp không đủ các dải đếm (xem Bảng 1), thì có thể đếm các dải bổ sung. Để làm được điều này, điều chỉnh tiêu điểm của vật kính trên các vị trí khác (ví dụ bằng cách thay đổi vị trí bắt đầu và/hoặc điều chỉnh  $d_w$ ) sao để thu được các dải đại diện cho cả màng mỏng.

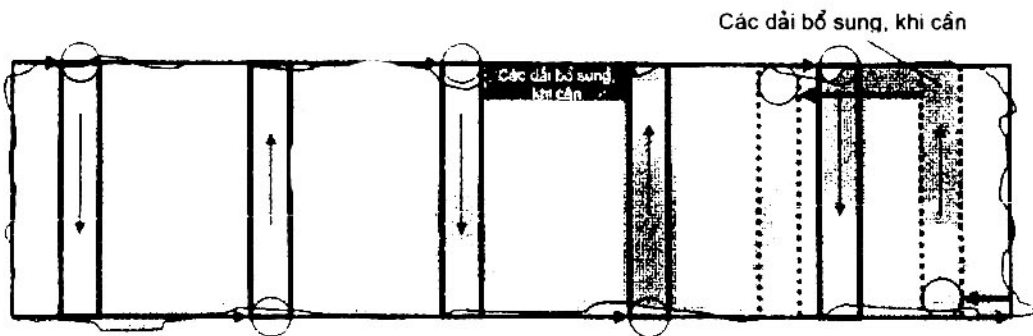
Tính các kết quả theo 9.2.



**CHÚ GIẢI**

- 1 xuống đến mép dưới

**Hình 4 – Các dải thẳng đứng trong các vị trường cách đều nhau đối với dạng hình tròn hoặc hình chữ nhật**



**Hình 5 – Các dải thẳng đứng cách đều nhau**

## 9 Tính toán và biểu thị kết quả

### 9.1 Đếm dạng hình chữ nhật trong các vi trường kế tiếp

Kiểm tra các giá trị đích 20,0 mm và 5,0 mm về chiều dài,  $L_s$  và chiều rộng  $W_s$  của màng mỏng, sử dụng các thang độ và các thước chạy của kính hiển vi.

Tính tổng nồng độ của các tế bào,  $c$ , theo công thức sau:

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

hoặc

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

hoặc với hệ số làm việc không đổi,  $f_w$

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

trong đó:

$c$  là nồng độ tổng số, được biểu thị bằng số lượng tế bào trên mililit;

$W_s$  là chiều rộng của màng mỏng, tính bằng milimet;

$L_s$  là chiều dài của màng mỏng, tính bằng milimet;

$N_f$  là tổng số tế bào đếm được;

$D_f$  là đường kính của vi trường, tính bằng milimet;

$N_f$  là số vi trường đếm được hết;

$V_m$  là thể tích của mẫu thử đã nhuộm, tính bằng mililit (xem 8.1.1 hoặc 8.1.2) [nếu dung dịch làm việc thuốc nhuộm Newman-Lampert cải biến được sử dụng để nhuộm (8.1.1), thì  $V_m = 0,01$  ml. Nếu dung dịch thuốc nhuộm ethidi bromua được sử dụng để nhuộm (8.1.2), thì  $V_m = 0,005$  ml];

$d$  hệ số pha loãng được dùng trong 7.2. (Nếu không phải pha loãng thì  $d = 1$ ; với độ pha loãng 1:1 thì  $d = 0,5$ ).

### 9.2 Đếm dạng hình chữ nhật trong các dải

Kiểm tra các giá trị đích 20,0 mm và 5,0 mm về chiều dài và chiều rộng của màng mỏng, sử dụng các thang độ và các thước chạy của kính hiển vi.

Tính tổng nồng độ của các tế bào,  $c$ , theo công thức sau:

$$c = \frac{W_s \times N_l}{D_l \times N_b \times V_m} \times \frac{1}{d}$$

hoặc

$$c = f_w \times \left( \frac{N_l}{N_b} \times \frac{1}{d} \right)$$

Với hệ số làm việc không đổi,  $f_w$

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

Trong đó  $N_b$  là số dải đếm được hoàn toàn.

Các ký hiệu khác như trong 9.1.

### 9.3 Đếm dạng hình tròn trong các vi trường kế tiếp

Kiểm tra đường kính của màng mỏng là 11,28 mm, sử dụng các thang độ và các thước chạy của kính hiển vi.

Tính nồng độ tổng số,  $c$ , của các tế bào theo công thức sau:

$$c = \frac{D_c^2 \times N_l}{D_l^2 \times N_l \times V_m} \times \frac{1}{d}$$

hoặc

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

với hệ số làm việc không đổi,  $f_w$

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

trong đó  $D_c$  là đường kính của màng mỏng, tính bằng milimet.

Các ký hiệu khác như trong 9.1.

#### 9.4 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến số nguyên của đơn vị hàng nghìn (ví dụ: 401 586 tế bào/ml được biểu thị là 402 000 tế bào/ml).

### 10 Độ chụm

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này được tiến hành theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm này được nêu trong Phụ lục A.

Các giá trị nhận được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

#### 10.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong cùng phòng thử nghiệm, với cùng một người thao tác trong cùng một khoảng thời gian ngắn như nhau, không quá 5 % trường hợp lớn hơn các giá trị được nêu trong Bảng 2.

**Bảng 2 – Các giá trị về độ lặp lại**

| Nồng độ<br>(x 1 000 tế bào/ml) | $s_r$<br>(x 1 000 tế bào/ml) | $r$<br>(x 1 000 tế bào/ml) |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 245                            | 38                           | 107                        |
| 455                            | 43                           | 121                        |
| 679                            | 69                           | 192                        |
| 791                            | 110                          | 308                        |

#### 10.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, ở các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người thao tác khác nhau và trên các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn các giá trị nêu trong Bảng 3.



**Bảng 3 – Các giá trị về độ tái lập**

| <b>Nồng độ</b><br>(x 1 000 tế bào/ml) | $s_R$<br>(x 1 000 tế bào/ml) | $R$<br>(x 1 000 tế bào/ml) |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 245                                   | 41                           | 114                        |
| 455                                   | 62                           | 174                        |
| 679                                   | 78                           | 218                        |
| 791                                   | 110                          | 308                        |

**11 Báo cáo kết quả**

Báo cáo kết quả phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử thu được, hoặc nếu đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**

(tham khảo)

**Nghiên cứu cộng tác****A.1 Yêu cầu chung**

Một nghiên cứu cộng tác quốc tế về sữa bò gồm có mười tám phòng thử nghiệm và mười ba nước tham gia vào tháng mười năm 2005. Phép thử này gồm có 8 mẫu có bốn mức tế bào/ml và được chia thành 16 cặp mẫu không rõ ràng:

Các giá trị trung bình của mỗi mức tương ứng là:

- Mức 1, các mẫu A và mẫu B: 245 000 tế bào/ml;
- Mức 2, các mẫu C và mẫu D: 455 000 tế bào/ml;
- Mức 3, các mẫu E và mẫu F: 679 000 tế bào/ml;
- Mức 4, các mẫu G và mẫu H: 791 000 tế bào/ml.

Phép thử do A.I.A Laboratorio Standard Latte, Maccaresse-Roma (Ý) tổ chức, đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) để thu được dữ liệu về độ chụm nêu trong Bảng A.1.

**Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

|   | Mức |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|
|   | 1   | 2   | 3   | 4   |
| Số lượng còn lại sau khi trừ ngoại lệ                 | 24  | 23  | 24  | 24  |
| Giá trị trung bình (x 1 000 tế bào/ml)                | 245 | 455 | 679 | 791 |
| Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ (x 1 000 tế bào/ml)      | 38  | 43  | 69  | 110 |
| Hệ số biến thiên lặp lại (%)                          | 169 | 9   | 10  | 14  |
| Giới hạn lặp lại $r$ ( $2,8s_r$ ) (x 1 000 tế bào/ml) | 107 | 121 | 192 | 308 |
| Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ (x 1 000 tế bào/ml)      | 41  | 62  | 78  | 110 |
| Hệ số biến thiên tái lập (%)                          | 17  | 14  | 11  | 14  |
| Giới hạn tái lập $R$ ( $2,8s_R$ ) (x 1 000 tế bào/ml) | 114 | 174 | 218 | 308 |

**Phụ lục B**

(tham khảo)

**Nhuộm màu sữa dê****B.1 Dung dịch thuốc nhuộm sữa dê <sup>18)</sup>****B.1.1 Thuốc hãm Carnoy****B.1.1.1 Thành phần**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Cloroform        | 60 ml  |
| Axit axetic băng | 20 ml  |
| Cồn Etyl 100 %   | 120 ml |

**B.1.1.2 Chuẩn bị**

Cho liên tiếp cloroform và axit axetic băng vào cồn etyl và trộn kỹ.

**B.1.2 Dung dịch thuốc nhuộm xanh Pyronin Y-metyl****B.1.2.1 Thành phần**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Pyronin Y           | 1,0 g  |
| Xanh metyl          | 0,56 g |
| Nước đã loại khoáng | 196 ml |

**B.1.2.2 Chuẩn bị**

Cho liên tiếp Pyronin Y và xanh metyl vào chai đựng nước đã loại khoáng và trộn kỹ. Lọc qua bộ lọc (5.2) thích hợp và bảo quản trong chai tối màu. Trước khi sử dụng, lọc lại dung dịch qua bộ lọc thích hợp (5.2).

**B.2 Chuẩn bị màng mỏng**

Cho phiến kính đi qua sơ đồ nhuộm màu sau đây:

1. Thuốc hãm carnoy (B.1.1) trong 5 min;
2. Etanol 50 % trong 1 min;
3. Etanol 30 % trong 1 min;
4. Nước trong 1 min;
5. Dung dịch thuốc nhuộm xanh Pyronin Y-metyl (B.1.2) để nhuộm màu trong 6 min;
6. Tráng nhanh bằng cồn N-butyl và sau đó bằng xylene;
7. Bảo quản các phiến kính tránh bụi.

**Phụ lục C**

(tham khảo)

**Phân bố Poisson**

Nhìn chung, các tế bào sữa được phân bố theo phân bố Poisson. Phân bố Poisson giả định là:

$$M = V = s^2$$

trong đó:

$M$  là giá trị trung bình;

$V$  là độ biến thiên;

$s$  là độ lệch chuẩn.

Hệ số biến thiên, CV, sẽ là:

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

$$CV = \frac{100 \%}{s} \quad \text{hoặc}$$

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

trong đó  $M$  là giá trị trung bình, trong trường hợp số tế bào xoma là số lượng các hạt (tế bào) đếm được.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6400 (ISO 707) Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
  - [2] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.
  - [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
  - [4] TCVN 6686 – 2 (ISO 13366 – 2) Sữa – Định lượng tế bào xôma – Phần 2: Hướng dẫn vận hành máy đếm huỳnh quang điện tử.
  - [5] 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.*
  - [6] PACKARD, V.S. et al. 1992. *Direct microscopic method for bacterial or somatic cells. In standard methods for the examination of dairy products.* American Public Health Association. Washington, DC, pp. 309-325.
  - [7] DULIN et al. 1982, Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food Prot.* **45**, pp. 435-439.
  - [8] QUERVEL, X. & TROSSAT, PH. 2005, Study report – *Enumeration of somatic cells in goat milk.* Cevalait (France)
-