

TCVN 6686 -1 : 2000

~~ISO 13366 - 1 : 1997~~

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

Milk – Enumeration of somatic cells

Part 1 : Microscopic method

HÀ NỘI – 2000

Lời nói đầu

TCVN 6686 - 1 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 13366 - 1 : 1997
TCVN 6686 - 1 : 2000 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 Sữa
và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất
lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Sữa – Định lượng tế bào xôma

Phần 1 – Phương pháp dùng kính hiển vi

Milk – Enumeration of somatic cells

Part 1 – Microscopic method

Cảnh báo – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các chất 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 các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp đếm tế bào xôma trong sữa nguyên liệu và sữa được bảo quản bằng hoá chất. Phương pháp này thích hợp cho việc chuẩn bị các mẫu thử chuẩn và để hiệu chuẩn qui trình đếm tế bào tự động và cơ học.

2 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau đây :

2.1 Tế bào xôma : Tế bào có nhân, đó là tất cả các tế bào bạch cầu và biểu mô.

3 Nguyên tắc

Dàn đều phần mẫu sữa cần kiểm tra trên khắp phiến kính để tạo một lớp màng phim. Làm khô và nhuộm màu lớp màng này và đếm các tế bào đã được nhuộm qua kính hiển vi. 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 miliilit.

4 Thuốc thử

Cảnh báo - Tetracloetan là chất độc. Ethidi bromua cũng là độc tố. Việc chuẩn bị và sử dụng dung dịch nhuộm màu phải được thực hiện trong tủ hút. Phải đeo găng tay bảo vệ.

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

4.1.1 Thành phần

Etanol 95% (V/V)	54,0 ml
Tetracloetan	40,0 ml
Xanh metylen	0,6 g
Axit axetic, băng	6,0 ml

Chú thích - Bằng cách khác, có thể thay tetracloetan bằng một lượng tricloetan tương tự. Có thể dùng ethidi bromua thay cho xanh metylen [Xem TCVN 6686 - 3 : 2000 (ISO 13366-3)].

4.1.2 Chuẩn bị

Trộn etanol và tetracloetan trong lọ. Làm nóng trong nồi cách thủy (5.1) ở 65°C. Thêm xanh metylen vào và trộn kỹ. Làm lạnh trong tủ lạnh đến 4°C và sau đó cho thêm axit axetic băng. Rót dung dịch này vào một lọ kín qua phễu lọc thích hợp (5.3) và bảo quản trong lọ nút kín này. Nếu cần, trước khi sử dụng lọc lại dung dịch.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị phòng thí nghiệm thông thường và đặc biệt như sau:

5.1 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở 65°C ± 5°C.

5.2 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở 35°C ± 5°C.

5.3 Phễu lọc, bền với các dung môi sử dụng, có kích thước lỗ từ 10 μm đến 12 μm hoặc nhỏ hơn.

5.4 Kính hiển vi, có độ khuếch đại từ 500 đến 1 000 lần.

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

5.5 Microxilanh, dung tích 0,01 ml, có dung sai tối đa là 2%.

5.6 Phiến kính, được đánh dấu bằng đường viền theo hình màng phim có kích thước 20 mm x 5 mm, hoặc một phiến kính chuẩn và một bản mẫu có kích thước 20 mm x 5 mm.

5.7 Bếp điện, có thể duy trì ở $40^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.

5.8 Quạt gió, loại máy sấy tóc.

6 Lấy mẫu

6.1 Điều quan trọng là phòng thí nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc không bị 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 : 1998 (ISO 707).

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

6.3 Trước khi thử nghiệm hoặc lưu giữ, phải bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 2°C đến 6°C .

6.4 Nếu các mẫu không được thử ngay trong vòng 6 h kể từ khi lấy mẫu, thì bảo quản bằng cách bổ sung axit boric. Nồng độ cuối cùng của axit này có trong mẫu thử không được lớn hơn 0,6 g trong 100 ml mẫu. Bảo quản các mẫu đó ở nhiệt độ từ 2°C đến 6°C không quá 24 h.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Làm nóng mẫu thử trong nồi cách thủy (5.2) ở nhiệt độ 35°C . Trộn kỹ mẫu thử và làm nguội đến nhiệt độ của microxilanh đã được hiệu chuẩn, thí dụ ở 20°C .

8 Cách tiến hành

Chuẩn bị và đếm từ mỗi mẫu ít nhất hai màng phim. Làm sạch các phiến kính (5.6), thí dụ như rửa bằng etanol. Dùng giấy sạch thấm khô phiến kính, hơ trên lửa và để nguội.

8.1 Phần mẫu thử và chuẩn bị lớp màng phim

Dùng microxilanh (5.5) lấy 0,01 ml mẫu thử đã chuẩn bị (điều 7). Khi microxilanh đã tiếp xúc với mẫu thì cẩn thận làm sạch mặt ngoài của xilanh. Cho phần mẫu thử lên một phiến kính sạch có đường viền 20 mm x 5 mm (5.6). Sau đó dàn càng đều mẫu càng tốt. Hơ khô màng này trên bếp điện (5.7) cho đến khô hoàn toàn. Có thể thu được kết quả tốt hơn, nếu để chúng khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.

Nhung màng phim đã khô trên phiến kính vào dung dịch nhuộm màu (4.1) trong 10 phút. Nếu cần, dùng quạt gió (5.8) để làm khô. Sau đó nhúng màng vào nước cho đến khi thôi hết thuốc nhuộm sót lại. Hơ khô lại và bảo quản tránh bụi.

8.2 Tiến hành xác định

Đếm các tế bào có nhân (ít nhất 400) trên màng phim qua kính hiển vi (5.4)). Các tế bào này có thể được quan sát rõ và ít nhất phải thấy được một nửa trong hiển vi trường. Đếm các nhân có trong các dải thẳng đứng ở phần thứ ba nằm giữa màng. Tránh đếm nhầm các dải tập trung ở khu vực ngoại biên của màng.

Mỗi tháng kiểm tra ít nhất một lần việc chuẩn bị các màng phim, từ đó kiểm tra độ tin cậy của kết quả bằng cách đếm trên các phần khác nhau của màng.

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Chiều dài của mỗi dải được đếm là 5 mm. Chiều rộng của dải tương ứng với đường kính của hiển vi trường. Với phần mẫu thử 0,01 ml, tính hệ số làm việc, w_f , theo công thức sau :

$$w_f = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

trong đó

d là đường kính của hiển vi trường, tính bằng milimet;

b là số dải đếm được.

9.2 Số lượng tế bào xoma nhân với hệ số làm việc, w_f , để có được số lượng tế bào trong một mililit mẫu.

10 Độ chính xác

10.1 Độ lặp lại và độ tái lập

Phụ lục B của TCVN 6686-3 : 2000 (ISO 13366-3) đưa ra các khuyến cáo về qui trình kiểm tra chất lượng và thử nghiệm của liên phòng thí nghiệm.

10.2 Số lượng tế bào tối thiểu cần đếm

Có thể sử dụng việc đếm tế bào soma bằng kính hiển vi để hiệu chuẩn qui trình đếm cơ học hoặc đếm tự động. Do đó, hệ số biến thiên của các số đếm trên các mẫu giống hệt nhau sẽ không được cao hơn khi đếm bằng dụng cụ điện tử. Hệ số biến thiên của mẫu sữa chứa từ 400 000 tế bào đến 600 000 tế bào trong 1 ml với khoảng 80% neutrophil, sẽ không vượt quá 5%.

Để thỏa mãn yêu cầu này, số lượng tế bào xoma cần đếm trong từng mẫu ít nhất phải là 400. Phân bố Poisson giả định là

$$M = V = s_d^2$$

trong đó

M là giá trị trung bình;

V là độ biến thiên;

s_d là độ lệch chuẩn.

Hệ số biến thiên (CV) là

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

$$CV = \frac{100}{s_d} \% \text{ hoặc}$$

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

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

11 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ rõ :

- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp sử dụng;
- hệ số làm việc của kính hiển vi;
- kết quả thử nghiệm thu được, và
- nếu kiểm tra độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Cũng phải đề cập đến tất cả các 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.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm tất cả các thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

Phụ lục A
(tham khảo)

Tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 : 1998 (ISO 707 : 1997) Sữa và sản phẩm sữa – Các phương pháp lấy mẫu.
- [2] TCVN 6686 - 2 : 2000 (ISO 13366-2) Sữa – Định lượng tế bào xoma. Phần 2 -- Phương pháp đếm hạt điện tử.
- [3] TCVN 6686 - 3 : 2000 (ISO 13366-3) Sữa – Định lượng tế bào xoma. Phần 3 -- Phương pháp huỳnh quang điện tử.
-