

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6686 - 3 : 2000

ISO 13366 - 3 : 1997

SỮA – ĐỊNH LƯỢNG TẾ BÀO XÔMA  
PHẦN 3 : PHƯƠNG PHÁP HUỖNH QUANG ĐIỆN TỬ

*Milk – Enumeration of somatic cells*  
*Part 3 : Fluoro-opto-electronic method*

HÀ NỘI – 2000

## Lời nói đầu

TCVN 6686 - 3 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 13366 - 3 : 1997

TCVN 6686 - 3 : 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 3 : Phương pháp huỳnh quang điện tử

*Milk – Enumeration of xomatic cells*

*Part 3 : Fluoro-opto-electronic 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.

#### Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp đếm tế bào xôma có trong sữa nguyên liệu và sữa được bảo quản bằng hoá chất, sử dụng thiết bị đếm bằng huỳnh quang điện tử<sup>1)</sup>.

Chú thích - Các mẫu chưa bảo quản trong vòng 24 h sau khi lấy mẫu, có thể cho số đếm tế bào kết quả không chính xác nếu dùng thiết bị đời cũ (thí dụ, Fossamtic 90 và 215).

## 2 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau đây :

<sup>1)</sup> Dụng cụ đếm Fosxomatic (250, 300 hoặc 360) do hãng Foss Electric, Hillerod, Đan mạch cung cấp, là một thí dụ thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không được tổ chức tiêu chuẩn hoá Quốc tế xác nhận.

2.1 Tế bào xoma : Tế bào có độ phát huỳnh quang nhỏ nhất do nhuộm màu DNA trong nhân của chúng.

### 3 Nguyên tắc

Trộn mẫu sữa cần kiểm tra với dung dịch đệm và dung dịch nhuộm màu. Chuyển hỗn hợp này ở dạng màng phim sang một đĩa quay, làm chức năng vật kính phẳng đối với kính hiển vi. Mỗi tế bào đã nhuộm màu tạo một xung điện được quan sát qua kính hiển vi, các xung điện đó được khuếch đại và ghi lại. Đọc trực tiếp số lượng hàng ngàn tế bào xoma trong 1 mililit.

### 4 Thuốc thử

Cảnh báo - Ethidi bromua là chất độc. Việc chuẩn bị và sử dụng các dung dịch cơ bản và dung dịch làm việc phải thực hiện trong tủ hút. Sử dụng 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 Các dung dịch cơ bản

##### 4.1.1 Dung dịch đệm nhuộm màu

###### 4.1.1.1 Thành phần

Ethidi bromua	2,5 g
Trikali xitrat	400 g
Axit xitric	14,5 g
Nước đã loại ion	5 l
Poly(etylen glycol) mono-p- (1,1,3,3-tetrametylbutyl) phenyl ete *)	50 ml
*) Thí dụ, Triton X-100 đậm đặc.	

###### 4.1.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan ethidi bromua trong 1 lit nước đựng trong bình dung tích 5 lít. Khuấy nhẹ cho đến khi hoà tan hết ethidi bromua. Có thể làm tan nhanh bằng cách đun đến nhiệt độ từ 40°C đến 60°C. Cho trikali xitrat và axit xitric vào dung dịch ethidi bromua. Cho thêm 4 lít nước. Khuấy nhẹ cho đến tan hết các chất rắn. Vừa thêm vừa khuấy poly(etylen glycol) ete đậm đặc. Không để dung dịch quá 90 ngày, ngay cả khi được bảo quản trong các điều kiện tránh ánh sáng, kín và mát.

## 4.1.2 Dung dịch poly (etylen glycol) mono-p - (1,1,3,3-tetrametylbutyl) phenyl ete

## 4.1.2.1 Thành phần

Poly(etylen glycol) mono-p- (1,1,3,3-tetrametylbutyl) phenyl ete *)	10 ml
Nước	1 l
*) Thí dụ, Triton X-100 đậm đặc.	

## 4.1.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan poly(etylen glycol) ete trong 1 lít nước đã được làm nóng đến 60°C. Không để dung dịch quá 25 ngày, ngay cả khi được bảo quản trong các điều kiện tránh ánh sáng, kín và mát.

## 4.2 Dung dịch làm việc

## 4.2.1 Dung dịch làm việc đậm - nhuộm màu

Trộn một phần dung dịch cơ bản đậm - nhuộm màu (4.1.1) với 9 phần nước. (Dung dịch này cần đủ dùng cho 2 700 mẫu). Không sử dụng dung dịch làm việc quá 7 ngày.

## 4.2.2 Dung dịch rửa

## 4.2.2.1 Thành phần

Poly(etylen glycol) mono-p- (1,1,3,3-tetrametylbutyl) phenyl ete *)	10 ml
Dung dịch amoniac, 25% (V/V)	25 ml
Nước	10 l
*) Thí dụ, Triton X-100 đậm đặc.	

## 4.2.2.2 Chuẩn bị

Cho poly(etylen glycol) ete và dung dịch anoniac vào nước.

Thành phần của các thuốc thử có thể thay đổi tùy thuộc vào hệ thống đếm được sử dụng. Do đó cần phải tuân thủ một cách chính xác hướng dẫn của nhà sản xuất.

## 4.3 Chất bảo quản

Có thể sử dụng axit boric, kali dicromat, natri azit hoặc bronopol.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Thiết bị đếm, vận hành theo nguyên tắc phát huỳnh quang (thí dụ Fosxômatic). Hiệu chuẩn thiết bị theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Để hiệu chuẩn, cần phải sử dụng các mẫu sữa đã được đếm tế bào theo phương pháp dùng kính hiển vi (về chi tiết xem TCVN 6686 - 1 : 2000 (ISO 13366 -1)).

Chú thích — Các đếm chuẩn tế bào do nhà sản xuất cung cấp

5.2 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

5.7 Ống mẫu, được hàn kín, không rò rỉ.

## 6 Lấy mẫu

6.1 Điều quan trọng là phòng thí nghiệm nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển và 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, cần bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ  $2^{\circ}\text{C}$  đến  $6^{\circ}\text{C}$ .

6.4 Nếu cần phải lưu giữ, ngay sau khi lấy mẫu cho thêm các chất bảo quản sau đây vào mẫu càng sớm càng tốt, nhưng bất kỳ trường hợp nào cũng phải được thực hiện trong vòng 24 h.

a) Axit boric ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) : cho axit boric vào mẫu thử. Nồng độ cuối cùng của chất bảo quản này có trong mẫu không được vượt quá 0,6 g trong 100 ml. Mẫu bảo quản này có thể giữ đến 24 h nữa ở nhiệt độ từ  $6^{\circ}\text{C}$  đến  $12^{\circ}\text{C}$ .

b) Kali dicromat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) : cho Kali dicromat vào mẫu thử. Nồng độ cuối cùng của chất bảo quản này có trong mẫu không được vượt quá 0,2 g trong 100 ml. Mẫu đã bảo quản này có thể giữ đến 72 h nữa ở nhiệt độ từ  $6^{\circ}\text{C}$  đến  $12^{\circ}\text{C}$ . Các mẫu được bảo quản bằng kali dicromat sẽ quan sát thấy sự phóng điện nhánh cục bộ.

c) Natri azit : Ngay sau khi lấy mẫu xong cho thêm natri azit vào mẫu thử. Nồng độ cuối cùng của chất bảo quản này có trong mẫu không được vượt quá 0,024 g trong 100 ml. Mẫu thử này có thể bảo quản ở nhiệt độ từ  $2^{\circ}\text{C}$  đến  $6^{\circ}\text{C}$ . Cần tiến hành thử trong vòng 48 h sau khi lấy mẫu.

d) Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol): Ngay sau khi lấy mẫu xong cho bronopol vào mẫu thử. Nồng độ cuối cùng của chất bảo quản này có trong mẫu không được vượt quá 0,05 g trong 100 ml (tốt

nhất là 0,02 g trong 100ml). Mẫu thử này có thể bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 6°C. Cần tiến hành thử trong vòng 72 h sau khi lấy mẫu.

### Chú thích

- 1) Mẫu thử đã được bảo quản bằng axit boric, có thể bảo quản tiếp bằng kali dicromat đến 48 h.
- 2) Thời gian bảo quản các mẫu thử đã bổ sung bronopol có thể kéo dài đến 5 ngày, trong điều kiện tốt và dùng dụng cụ đếm hiện đại để kiểm tra chất lượng tế bào. Tuy nhiên, cũng cần phải bổ sung ngay chất bảo quản vào mẫu và giữ mẫu ở nơi lạnh cho đến khi thử nghiệm.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

7.1 Giữ mẫu chưa được xử lý ít nhất 24 h sau khi lấy sữa, ở nhiệt độ từ 2°C đến 6°C. Nếu mẫu chưa xử lý được kiểm tra trong vòng 24 h sau khi lấy sữa, thì xử lý sơ bộ mẫu thử bằng cách thêm kali dicromat (6.4) và để yên ít nhất 3 h.

7.2 Làm nóng mẫu có chất bảo quản cũng như mẫu không có chất bảo quản trong nồi cách thủy (5.2) ở 40°C và giữ chúng ở nhiệt độ phòng không quá 30 phút.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Phần mẫu thử

Pha loãng tiếp mẫu thử và phần mẫu thử được chuẩn bị tự động trong thiết bị (5.1).

### 8.2 Tiến hành xác định

Đảm bảo việc đếm tế bào được tiến hành trong vòng 30 phút sau khi làm nóng (7.2) và trước khi nhiệt độ hạ xuống dưới 30°C. Đảm bảo khuấy đúng để thu được sự phân bố đồng đều các tế bào. Nếu không có bộ khuấy thì phải trộn thật kỹ phần mẫu thử ngay trước khi đếm.

## 9 Biểu thị kết quả

Biểu thị tế bào xoma bằng đơn vị hàng nghìn trên 1 mililit sữa.

Chú thích - Xem phụ lục C về việc thoả thuận cách sử dụng các mẫu chuẩn đếm tế bào.

## 10 Độ chính xác

Các chi tiết thử liên phòng thí nghiệm về độ chính xác của phương pháp được tóm tắt trong phụ lục A. Các giá trị thu được từ thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các khoảng nồng độ và chất nền khác với các con số đã cho.

## 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;
- 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)

Các kết quả thử của liên phòng thí nghiệm

Một thử nghiệm liên phòng thí nghiệm (gồm 37 phòng thí nghiệm) cho các kết quả về  $r$  (giới hạn độ lặp lại) và  $R$  (giới hạn độ tái lập), tính theo đơn vị hàng nghìn tế bào trên mililit như trong bảng A.1.

Bảng A.1

Mẫu sữa	Số lượng trung bình các tế bào trên mililit	$s_r$	$r$	$s_R$	$R$
2	210	13,7	38,9	36,7	103,7
4	438	21,2	59,9	51,3	145,0
6	609	32,6	92,3	89,4	253,0

Nên chú ý rằng trong các điều kiện thực tế sử dụng trung bình nhân của một vài lần xác định (thí dụ 3 lần).

Chú thích - Về độ chính xác xem phụ lục B.

## Phụ lục B

(tham khảo)

## Kiểm soát chất lượng trong phòng thí nghiệm

## B.1 Mục đích

Mục đích của các qui trình kiểm soát chất lượng là để đảm bảo số đếm tế bào bằng phương pháp thông thường gắn sát với số "thực có" có trong các mẫu thử. Sự kém phù hợp có thể do các sai số ngẫu nhiên ở các lần thử riêng biệt (thí dụ có thể do việc trộn chưa đủ độ hoặc dùng pipet hút không chính xác) hoặc có thể do các sai số hệ thống hoặc các sai lệch (thí dụ : do hiệu chuẩn thiết bị chưa đúng). Độ lớn của cả hai loại sai số có thể thay đổi cùng với số đếm tế bào thực có trong mẫu. Hình B.1 minh họa ảnh hưởng của cả hai loại sai số ngẫu nhiên và sai số hệ thống lên mối quan hệ giữa số đếm đúng và số đếm tế bào quan sát được.

Độ lặp lại là số đo độ sai lệch giữa các lần xác định lặp lại trong một phòng thí nghiệm sử dụng cùng một mẫu thử. Độ tái lập là số đo độ sai lệch giữa các phép xác định được thực hiện trong các phòng thí nghiệm khác nhau trên cùng một mẫu thử. Không phải độ lặp lại, cũng không phải độ tái lập theo định nghĩa trong ISO 5725-1 [2] dùng để kiểm tra độ lệch trong các phép đo liên quan đến các giá trị "thực có". Các qui trình nêu trong phụ lục này nhằm mục đích kết hợp việc kiểm tra thông thường trong các phòng thí nghiệm với các phép thử liên phòng định kỳ để đánh giá hiệu năng tương đối của các phòng thí nghiệm khác nhau.

## B.2 Kiểm tra thông thường trong các phòng thí nghiệm

## B.2.1 Độ lặp lại

Để kiểm tra thông thường độ lặp lại của các phép đếm, bất kỳ mẫu nào có khoảng 500 000 tế bào trên một mililit cần đếm ở các khoảng đều đặn trong ngày làm việc (thí dụ : cứ sau mẫu thứ 20 hoặc thứ 50). Đến cuối ngày nên tính hệ số biến thiên. Nếu hệ số này vượt quá 5% thì kiểm tra lại qui trình thử, đặc biệt xem đã thực hiện đúng quá trình trộn và lấy mẫu bằng pipet chưa.

## B.2.2 Độ lệch

Để đánh giá độ lệch của việc đếm trong một phòng thí nghiệm, cần có sẵn các mẫu chuẩn đã biết trước số đếm "thực có". Có thể dùng các mẫu sữa có số tế bào ước tính bằng phép đếm dùng kính hiển vi, nhưng thông thường các mẫu sữa chỉ được giữ trong vài ngày và có thể sẽ tổn kém để thu được số đếm chính xác đối với các mẫu sữa tươi nếu làm thường xuyên. Một cách khác, sử dụng các huyền phù bạch cầu chuẩn hoặc các mẫu sữa được bảo quản bằng phương pháp thích hợp để có thể sử dụng ít nhất là 1 tháng.

Nên chuẩn bị 2 mẫu chuẩn, một mẫu có khoảng 300 000 tế bào trên một mililit và một mẫu có khoảng 600 000 tế bào trên một mililit và xác định số tế bào "thực có" của từng mẫu bằng kính hiển vi hoặc bằng

phương pháp đếm hạt điện tử ít nhất là trong 3 phòng thí nghiệm khác nhau. Các chuẩn nên được đếm 5 lần trong mỗi phòng thí nghiệm khi bắt đầu một loạt phân tích và nếu số đếm trung bình đối với mỗi chuẩn lớn hơn số đếm "thực có" từ 5% đến 10%, thì cần kiểm tra lại việc hiệu chuẩn thiết bị hoặc bất kỳ nguyên nhân nào khác có thể gây lỗi hệ thống.

### B.2.3 Các yêu cầu bổ sung

Ngoài B.2.1 và B.2.2 nên thực hiện các qui trình sau :

- hiệu chuẩn thiết bị theo đường chuẩn;
- kiểm tra các thiết bị bằng mắt thường;
- kiểm tra vị trí zero, và
- xác định hệ số tải.

## B.3 Thử liên phòng

### B.3.1 Mục tiêu

Mục đích của thử liên phòng là để đánh giá về độ lặp lại và độ tái lập của các số đếm đối với các mẫu sữa giống nhau trong các phòng thí nghiệm khác nhau và để đo độ lệch của các số đếm được trong mỗi phòng thí nghiệm so với số đếm "thực có" trong mỗi mẫu. Ngoài ra, các phép đo tuyệt đối về độ tin cậy của các số đếm độc lập, các kết quả thử nghiệm này thông báo cho phòng thí nghiệm chưa có nhiều kinh nghiệm về độ lặp lại và độ lệch của các phòng thí nghiệm nhiều kinh nghiệm.

### B.3.2 Thiết kế mẫu

Phòng thí nghiệm chịu trách nhiệm tổ chức nên chuẩn bị 10 loạt mẫu sữa có số tế bào dàn đều trong khoảng từ 200 000 tế bào / mililit đến 800 000 tế bào / mililit.

Nên chia cho mỗi phòng thí nghiệm tham gia 4 mẫu, mỗi mẫu 15 ml, được mã hoá sao cho chỉ có các thành viên xử lý mới phân biệt được 40 mẫu đó.

Mỗi phòng thí nghiệm đếm mỗi mẫu 4 lần và báo cáo từng số đếm được riêng rẽ cho các cộng tác viên xử lý.

### B.3.3 Phân tích thống kê

B.3.3.1 Trong một mô tả của các phép thử liên phòng không bắt buộc, có sử dụng các giá trị tuyến tính của các số đếm tế bào. Phân tích thống kê cũng có thể thực hiện bằng cách sử dụng các logarit hoặc các giá trị căn bậc hai của chúng. Độ lệch chỉ ra sự sai khác giữa giá trị trung bình quan sát được và giá trị trung bình chuẩn.

B.3.3.2 Tính giá trị trung bình của phòng thí nghiệm và trung bình tổng thể cho từng 10 mẫu sữa một.

B.3.3.3 Đối với mỗi loạt 10 mẫu sữa trong 1 phòng thí nghiệm nên phân tích sự biến thiên sau đây :

Nguồn biến thiên	$\nu$	$M$
Các mẫu của cùng loại sữa	3	$s^2 + 4s_s^2$
Số đếm kép	12	$s^2$

trong đó

$\nu$  là số bậc tự do;

$M$  là giá trị bình phương trung bình;

$s$  là độ lệch chuẩn của các số đếm kép;

$s_s^2$  là độ lệch chuẩn giữa các mẫu của cùng một mẫu sữa.

Từ các giá trị bình phương trung bình quan sát được, tính giới hạn độ lặp lại,  $r$ , như sau:

$$r = 2,8(s^2 + s_s^2)^{1/2}$$

Các phòng thí nghiệm cần được sắp xếp lại theo giá trị  $r$  cực đại cho bất kỳ mẫu nào. Cần chọn riêng số phòng thí nghiệm không vượt quá 15% cho giá trị  $r$  cực đại. Tỷ lệ loại trừ tùy ý 15% đảm bảo được rằng các trung bình tham khảo của các thử nghiệm cỡ nhỏ được dựa trên ít nhất năm phòng thí nghiệm sau khi loại trừ độ lặp lại và độ lệch.

B.3.3.4 Tính độ hồi qui của các trung bình mẫu của từng phòng thí nghiệm trên trung bình tổng thể. Từ đường hồi qui này, tính độ lệch cực đại của từng phòng thí nghiệm trong phạm vi số liệu quan sát được.

Sắp xếp các phòng thí nghiệm theo độ lệch cực đại. Phân biệt các phòng thí nghiệm có các độ lệch cực đại, nhưng không vượt quá 15% tổng số.

B.3.3.5 Tính các trung bình tham khảo cho từng loại sữa không kể các phòng thí nghiệm đã được phân biệt trong B.3.3.3 và B.3.3.4 có độ lặp lại thấp nhất và có độ lệch lớn nhất.

B.3.3.6 Tính độ hồi qui mới của các giá trị trung bình mẫu theo các giá trị trung bình tham khảo cho từng phòng thí nghiệm.

#### B.3.4 Diễn giải

B.3.4.1 Đối với từng loại sữa nên lập bảng về các giá trị trung bình phòng thí nghiệm, và trung bình tổng và trung bình tham khảo đối với từng mẫu sữa thì nên đưa vào dưới bảng.

B.3.4.2 Cần đưa ra độ lệch chuẩn đơn về độ lặp lại trên tất cả các mẫu cho từng phòng thí nghiệm và các phòng thí nghiệm phải được sắp xếp lại dựa vào thông số này.

B.3.4.3 Nên nêu ra phần bị chẵn và độ dốc đường hồi qui của các giá trị trung bình đối với từng phòng thí nghiệm theo trung bình tham khảo. Cũng nên nêu độ lệch cực đại trong giải các giá trị trung bình quan sát được và các phòng thí nghiệm được sắp xếp lại dựa vào thông số này.

B.3.4.4 Dụng đồ thị cho từng phòng thí nghiệm theo các số đếm riêng rẽ của mình, dựa vào giá trị trung bình tham khảo, và dụng đường 45° và đường hồi qui của phòng thí nghiệm đó.

B.3.4.5 Tính giới hạn độ tái lập (R) hoặc tính s nếu cần.

### B.3.5 So sánh giữa các đợt thử nghiệm

Sự phân bố độ lặp lại và độ lệch nên được kiểm tra từ đợt thử này đến đợt thử tiếp sau. Từ các độ lặp lại và độ lệch thu được trong mỗi đợt thử, dụng một sơ đồ và định rõ vị trí của phòng thí nghiệm trong sơ đồ phân bố này. Phân biệt các phòng thí nghiệm cấp Nhà nước sao cho hiệu năng tuyệt đối trên các thử nghiệm liên tiếp của họ và hiệu năng của các phòng thí nghiệm này trong mối tương quan với phòng thí nghiệm khác trong phạm vi một đợt thử có thể thấy rõ.

### B.3.6 Các mục tiêu về độ chuẩn xác

Phân tích của các thử nghiệm so sánh quốc tế và quốc gia cho thấy các con số hợp lý sau đây :

a) Mức đếm từ 400 000 tế bào trên một mililit đến 500 000 tế bào trên một mililit :

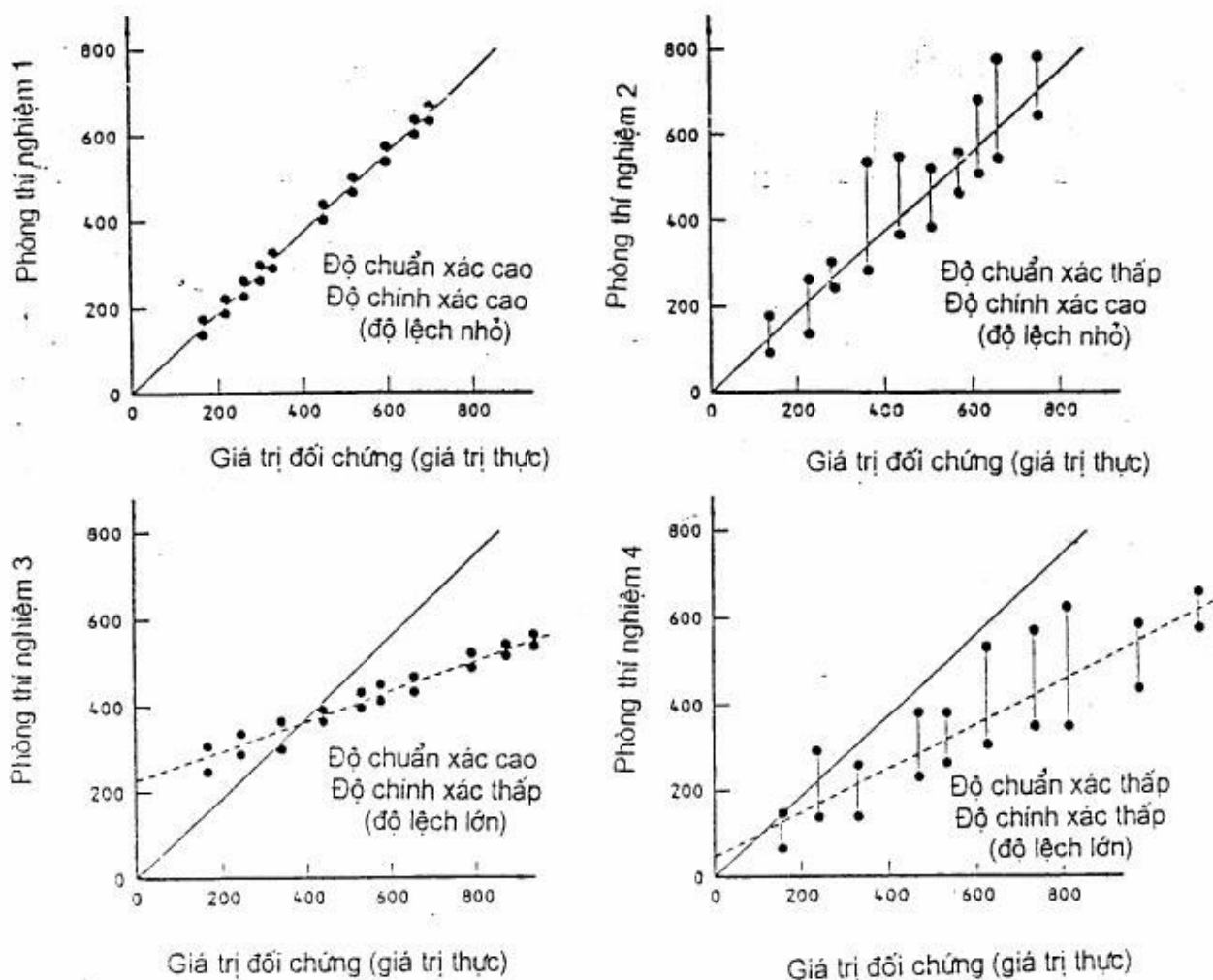
giới hạn độ lặp lại ( $r$ ) =  $2,8 \times 20\ 000 = 56\ 000$  trên một mililit (điều này tương đương với hệ số biến thiên từ 4% đến 5%);

giới hạn độ tái lập ( $R$ ) =  $2,8 \times 50\ 000 = 140\ 000$  trên một mililit (điều này tương đương với hệ số biến thiên từ 10% đến 12%);

b) Mức đếm tế bào từ 100 000 tế bào trên một mililit đến 200 000 tế bào trên một mililit :

giới hạn độ lặp lại ( $r$ ) =  $2,8 \times 10\ 000 = 28\ 000$  trên một mililit (điều này tương đương với hệ số biến thiên từ 5% đến 10%);

giới hạn độ tái lập ( $R$ ) =  $2,8 \times 20\ 000 = 56\ 000$  trên một mililit (điều này tương đương với hệ số biến thiên từ 10% đến 20%);



Chú thích - Các đồ thị cho thấy "độ chuẩn xác" và "độ chính xác trung bình". Các số đếm thu được ở một phòng thí nghiệm có các giá trị tham khảo và giá trị trung bình của một số phòng thí nghiệm so sánh. Mỗi mẫu trong hai mẫu con thực hiện mười số đếm.

Hình B.1 - Độ chuẩn xác và độ chính xác : Các loại sai số

## Phụ lục C

(tham khảo)

## Sử dụng các mẫu chuẩn để đếm tế bào

## C.1 Khái quát

Thiết bị đếm tế bào xòma không những phải đảm bảo tốt các giới hạn về độ lặp lại ( $r$ ) và độ tái lập ( $R$ ) trong các thử nghiệm liên phòng thí nghiệm, mà còn phải đảm bảo được độ chính xác cao của giá trị trung bình, hoặc "độ lệch" càng thấp càng tốt. Theo như định nghĩa về độ lệch là sự chênh lệch giữa giá trị "thực có" và giá trị trung bình của số lần xác định, giá trị "thực có" phải thu được bằng một phương pháp xác định "trực tiếp" là tốt nhất. Để xác định độ chính xác, không được sử dụng các dung dịch có cỡ xác định. Theo qui trình sử dụng, các dụng cụ đếm khác nhau bao gồm cả bước pha loãng, trộn thuốc thử, nhuộm màu, làm nóng...., để chuẩn bị mẫu cho quá trình đếm cuối cùng, các mẫu có các giá trị đúng phải có thành phần thực tế giống thành phần của các mẫu cần đếm.

Trong những năm gần đây đã có những phương pháp khác nhau để chuẩn bị các mẫu như vậy ("các chuẩn") :

- Bằng cách thêm các hạt chất dẻo hoặc bạch cầu vào các mẫu sữa có lượng tế bào xòma rất nhỏ;
- Xử lý các mẫu sữa có số lượng tế bào xòma đã biết (các mẫu sữa "thực") để có thể lưu giữ mẫu này ít nhất là vài tháng.

Các phương pháp khác nhau này thành công ở các cấp độ khác nhau. Ngày nay có thể nói rằng, cách giải quyết bằng việc bổ sung các hạt vào mẫu sữa không phải là phương pháp được chọn. Có thể sử dụng phương pháp bổ sung các bạch cầu tách biệt (PMN, Thymocytes, ...), lưu ý rằng việc tách biệt các tế bào này thường dẫn đến phải lựa chọn các kiểu tế bào nhất định, mà các mẫu như thế lại không chứa các tế bào có phạm vi hoặc phân bố giống trong sữa tự nhiên.

Trong những năm gần đây phương pháp xử lý đặc biệt đã xây dựng cho các mẫu sữa có lượng tế bào thấp, trung bình và cao, theo phương thức này các chuẩn ("các mẫu đối chứng chuẩn") đã được chuẩn bị có thể sử dụng trong vài tháng, ngay cả khi ở nhiệt độ môi trường thông thường.

Các mẫu chuẩn có thể được vận chuyển để sử dụng ở khắp nơi, vì cách xử lý này (kết hợp xử lý nhiệt và bảo quản bằng hoá chất) đảm bảo rằng không có sinh vật gây bệnh nào, kể cả các vi rút có mặt trong mẫu (tuyệt đối vô trùng).

Trong khi chuẩn bị các "chuẩn" trên một nền sữa, cần mô tả qui trình đếm số lượng "thực có" các tế bào trong các mẫu sữa để hiệu chỉnh và kiểm tra độ chính xác của qui trình đếm điện tử (phương pháp điện tử huỳnh quang). Đối với mục đích này, phương pháp dùng kính hiển vi (TCVN 6686 - 1 : 2000 (ISO 13366-1))

là thích hợp. Hơn nữa, cần chứng minh rằng các giá trị đối chứng không bị sai lệch do xử lý (xem thí dụ hình C.1). Về việc bảo quản (thời gian, nhiệt độ) tuân theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Khi sử dụng qui trình này, cần chuẩn bị sẵn các chuẩn có số đếm tế bào đúng hoặc đã được xác định. Các phòng thí nghiệm có lợi thế là luôn có sẵn các mẫu có số đếm tế bào đã được chuẩn bị bằng kính hiển vi và có thể được sử dụng bất kỳ khi nào cần đến mà không phải chờ đợi.

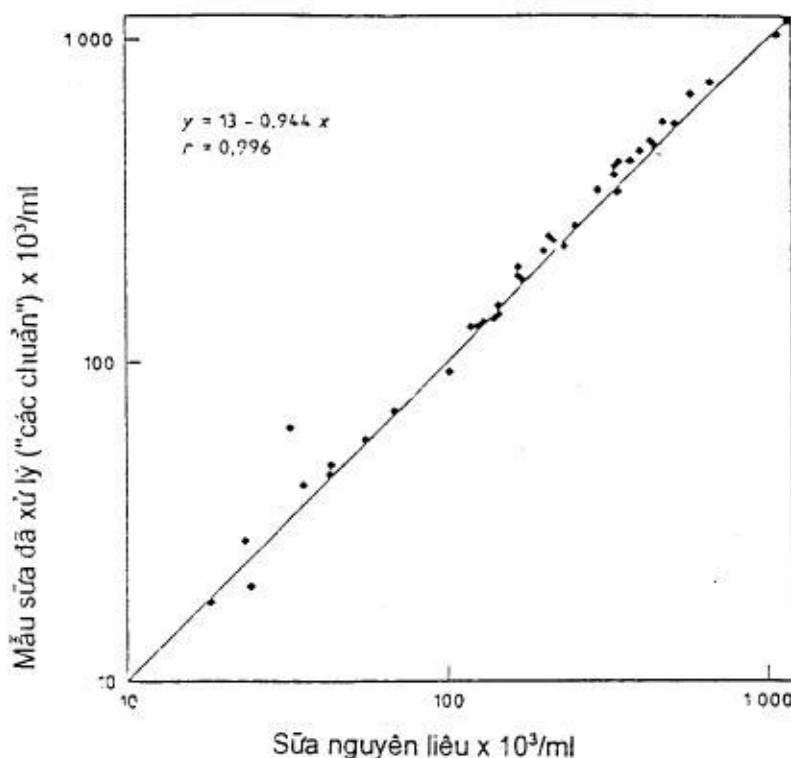
Để đưa các chuẩn tế bào (các chuẩn sữa) vào chương trình kiểm tra chất lượng của một phòng thí nghiệm đếm tế bào, các khuyến cáo được nêu trong C.2 đến C.4.

### C.2 Xác định giới hạn độ lặp lại (r)

Tiến hành các phép xác định lặp lại của các số đếm tế bào trong mẫu sữa (mẫu đã được bảo quản hoặc chưa được bảo quản) có số lượng tế bào từ 400 000 trên một mililit đến 500 000 trên một mililit.

### C.3 Xác định giới hạn độ tái lập (R)

Tham gia vào các thử nghiệm liên phòng thí nghiệm.



Chú thích — Đồ thị này biểu thị đường chất lượng và hệ số hiệu chỉnh. Cho thấy sự so sánh số lượng tế bào xoma đếm được trong các mẫu sữa nguyên liệu có chứa các lượng tế bào thấp, trung bình, cao và số lượng tế bào xoma đếm được trong các mẫu sữa nguyên liệu giống y hệt có lượng tế bào thấp, trung bình và cao đã được xử lý nhiệt kết hợp với bảo quản bằng hoá chất.

Hình C.1 - So sánh các mẫu sữa nguyên liệu đã được bảo quản và các mẫu sữa y hệt đã được xử lý nhiệt kết hợp với bảo quản bằng hoá chất ("các chuẩn")



#### C.4 Xác định độ chính xác ("độ lệch")

Sử dụng các chuẩn có các số đếm đúng, được xác định bằng cách dùng kính hiển vi. Hàng ngày có thể sử dụng vài lần các chuẩn để xác định xem các số đếm được có nằm trong giới hạn nhất định của giá trị đã nêu ra đối với các chuẩn chưa (thí dụ, từ 5% đến 10% có mức đếm tế bào từ 400 000 trên một mililit đến 500 000 trên một mililit).

Ở đây không phải lúc nào cũng có mối quan hệ chặt chẽ giữa các số đếm quá cao với quá thấp của các chuẩn và các độ lệch tương ứng trong các mẫu cần đếm. Phải lưu ý để các mẫu chuẩn được bảo quản tốt và có "chất lượng tốt". Các số sai lệch (quá cao hoặc quá thấp) về các tế bào xoma trong các mẫu thông thường có thể bị ảnh hưởng bởi số vi khuẩn quá cao, thời gian bảo quản quá dài cùng với sử dụng hoá chất bảo quản (thí dụ : natri azit) và các yếu tố khác. Số lượng tế bào xoma trên mẫu sữa thu được trên các chuẩn chỉ có thể đảm bảo được khi toàn bộ hệ thống, kể cả việc chuẩn bị mẫu được thực hiện một cách chính xác. Phòng thí nghiệm đếm tế bào cần chú ý rằng "chất lượng" của các mẫu cần đếm thông thường phụ thuộc vào việc hiệu chuẩn chính xác dụng cụ đếm.

Phụ lục D  
(tham khảo)

Tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 : 1998 (ISO 707 : 1997) Sữa và sản phẩm sữa – Các phương pháp lấy mẫu.
  - [2] ISO 5725 -1 : 1994 Độ chính xác của phương pháp đo và các kết quả — Phần 1 : Các nguyên tắc chung và định nghĩa.
  - [3] TCVN 6686 - 1 : 2000 (ISO 13366-1) Sữa — Định lượng tế bào xôma — Phần 1 : Phương pháp dùng kính hiển vi.
  - [4] TCVN 6686 - 2 : 2000 (ISO 13366-2) Sữa — Định lượng tế bào xôma — Phần 2 : Phương pháp đếm hạt điện tử.
-