

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 11841:2017**

Xuất bản lần 1

**QUY TRÌNH KHẢO NGHIỆM, KIỂM ĐỊNH MÔI TRƯỜNG  
PHA LOÃNG VÀ BẢO TỒN TINH DỊCH LỢN**

*Procedures for testing, appraisal extender for boar semen preservation*

**HÀ NỘI - 2017**

## Lời nói đầu

TCVN 11841:2017 do Cục Chăn nuôi biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Quy trình khảo nghiệm, kiểm định môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn

*Procedures for testing, appraisal, extender for boar semen preservation*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình khảo nghiệm, kiểm định môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 2.1

**Môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn** (*Extender for boar semen preservation*)

Hợp chất hòa tan trong nước làm dung dịch để pha loãng tinh nguyên của lợn và duy trì sức sống của tinh trùng lợn trong một thời gian nhất định.

#### 2.2

**Khảo nghiệm môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn** (*Testing extender for boar semen preservation*)

Đánh giá lần đầu các chỉ tiêu kỹ thuật của môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn trong thời gian nhất định để làm cơ sở đưa vào sản xuất.

#### 2.3

**Kiểm định môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn** (*Appraisal extender for boar semen preservation*)

Việc kiểm tra, đánh giá lại các chỉ tiêu hoặc một số chỉ tiêu kỹ thuật của môi trường pha loãng, bảo tồn tinh dịch lợn.

### **3 Quy trình khảo nghiệm môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn**

#### **3.1 Quy định chung**

Thực hiện khảo nghiệm môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn tại các cơ sở đã đăng ký hoạt động khảo nghiệm, kiểm định và đã được cơ quan có thẩm quyền đồng ý bằng văn bản.

#### **3.2 Nguyên vật liệu khảo nghiệm**

##### **3.2.1 Môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn**

Sản phẩm còn nguyên bao gói hoặc nguyên tem niêm phong, chưa mở nắp, trong thời hạn sử dụng và được bảo quản trong điều kiện theo công bố của nhà sản xuất.

##### **3.2.2 Tinh dịch lợn**

Tinh nguyên để pha loãng đối với từng giống lợn được quy định trong các tiêu chuẩn cụ thể, gồm các chỉ tiêu sau đây.

- Hoạt lực (A), %: không nhỏ hơn
- Nồng độ tinh trùng (C), triệu/ml: không nhỏ hơn
- Tỷ lệ kỳ hình (K), %: không lớn hơn
- Tổng số tinh trùng tiến thẳng trong tinh dịch (VAC), tỷ: không nhỏ hơn

##### **3.2.3 Lợn nái**

Tình trạng sức khỏe tốt, có lứa đẻ từ lứa 2 đến lứa 5.

### **3.3 Khảo nghiệm môi trường pha loãng, bảo tồn tinh dịch lợn tại phòng thí nghiệm**

#### **3.3.1 Số lượng mẫu**

Không ít hơn 5 sản phẩm môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn trong mỗi khung thời gian 30 ngày tính từ ngày sản xuất; tổng số mẫu không ít hơn 30 sản phẩm;

#### **3.3.2 Đánh giá chỉ tiêu lý hóa của môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn**

Các chỉ tiêu đối với môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn được nêu trong Bảng 1.

**Bảng 1 - Các chỉ tiêu của môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn**

Các chỉ tiêu	Kết quả đánh giá
1. Màu sắc	
2. Trạng thái	
3. Độ hoà tan	
4. Độ pH	
5. Áp suất thẩm thấu	

### 3.3.3 Đánh giá chất lượng tinh pha trong thời gian bảo tồn

#### 3.3.3.1 Pha loãng tinh để bảo tồn

Pha tinh nguyên với môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### 3.3.3.2 Đánh giá chất lượng tinh pha trong thời gian bảo tồn

Thời điểm đánh giá: định kỳ 24 h một lần tinh từ thời điểm pha loãng đến hết thời gian công bố đảm bảo hiệu quả sử dụng của nhà sản xuất (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h,...).

Số lượng mẫu đánh giá: mỗi thời điểm đánh giá không ít hơn 20 mẫu.

Các chỉ tiêu đánh giá của tinh pha trong thời gian bảo tồn nêu trong Bảng 2.

**Bảng 2 - Các chỉ tiêu tinh pha trong thời gian bảo tồn**

Các chỉ tiêu	Kết quả đánh giá
1. Hoạt lực (A), %, không nhỏ hơn	
2. Tỷ lệ kỳ hình (K), %, không lớn hơn	

### 3.3.4 Phương pháp kiểm tra, đánh giá

#### 3.3.4.1 Thiết bị, dụng cụ

##### 3.3.4.1.1 Cốc thủy tinh

##### 3.3.4.1.2 Lọ Thủy tinh

##### 3.3.4.1.3 Máy đo độ pH

##### 3.3.4.1.4 Máy đo áp suất thẩm thấu

##### 3.3.4.1.5 Đũa thủy tinh

**3.3.4.1.6 Phiến kính**

**3.3.4.1.7 Lamén**

**3.3.4.1.8 Kính hiển vi**

**3.3.4.1.9 Ống hút bạch cầu**

**3.3.4.1.10 Buồng đếm (hồng cầu, bạch cầu)**

**3.3.4.1.11 Đèn cồn**

**3.3.4.1.12 Thuốc nhuộm chuyên dụng**

**3.3.4.1.13 Ống đong**

**3.3.4.2 Phương pháp kiểm tra, đánh giá**

**3.3.4.2.1 Đối với môi trường**

**a) Kiểm tra màu sắc và trạng thái**

Kiểm tra màu sắc và trạng thái của môi trường pha loãng, bảo tồn tinh dịch lợn bằng mắt thường.

**b) Đánh giá độ hòa tan**

Sử dụng mẫu đã được kiểm tra màu sắc và trạng thái hòa với nước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cho môi trường đã pha vào trong cốc thủy tinh (3.3.4.1.1) hoặc lọ thủy tinh (3.3.4.1.2) trong suốt, để ở trạng thái tĩnh từ 30 min trở lên. Quan sát đáy ống đựng môi trường, môi trường tan hoàn toàn khi dung dịch đáy cốc đựng môi trường không bị mờ hoặc lắng cặn.

**c) Đánh giá pH và áp suất thẩm thấu của môi trường**

Sử dụng mẫu đã được kiểm tra độ hòa tan để ổn định từ 10 min đến 30 min sau đó đánh giá pH bằng máy đo độ pH (3.3.4.1.3) và đánh giá áp suất thẩm thấu bằng máy đo áp suất thẩm thấu (3.3.4.1.4).

**3.3.4.2.2 Đối với tinh nguyên**

**a) Xác định hoạt lực tinh trùng**

Dùng đĩa thủy tinh sạch (3.3.4.1.5), lấy một giọt tinh dịch nhỏ lên phiến kính khô, sạch, ấm (3.3.4.1.6) (ở nhiệt độ từ 35 °C đến 37 °C) đặt lamén (3.3.4.1.7) lên trên và đưa lên soi trên kính hiển vi (3.3.4.1.8) có độ phóng đại 200 đến 600 lần và có hệ thống sưởi ấm và xác định.

**CHÚ THÍCH:** Để đánh giá đầy đủ hoạt lực của tinh trùng, cần kết hợp 2 yếu tố: Tỷ lệ % tinh trùng tiến thẳng là số tinh trùng có chuyển động tiến thẳng được quan sát trong vi trường và lực chuyển động của tinh trùng.

VÍ DỤ: Số lượng tinh trùng trong toàn vi trường được xem như là 100, cách phân loại hoạt lực như sau:

+++ Hoạt động mãnh liệt: có chuyển động mạnh nhất; trong một số trường hợp, sự chuyển động trông giống xoáy nước hoặc dòng nước.

++ Hoạt động tiến thẳng mạnh

+ Hoạt động yếu

Không hoạt động, hoặc cụ thể như sau:

"80+++" nghĩa là 80 % tinh trùng trong vi trường có sức sống và có hoạt động mãnh liệt

"50+++", "20++" có nghĩa là 70 % tinh trùng trong vi trường có sức sống. Trong đó 50 % tinh trùng có hoạt động mãnh liệt và 20 % tinh trùng có hoạt động mạnh.

## b) Xác định nồng độ tinh trùng

Dùng ống hút bạch cầu khô, sạch (3.3.4.1.9) hút tinh dịch đến vạch 0,5 sau đó hút tiếp dung dịch pha loãng NaCl 3 % đến vạch 11, bịt hai đầu ống pha loãng đảo nhẹ nhàng ống hút, khi đó tinh dịch được pha loãng 20 lần (khi hút không để hiện tượng sủi bọt). Loại bỏ 3 đến 4 giọt đầu tiên và dùng lamên khô sạch (3.3.4.1.7) đập lên mặt buồng đếm (3.3.4.1.10) , đặt miệng ống hút bạch cầu vào mép của lá kính ở khu vực buồng đếm để đưa tinh dịch vào buồng đếm. Sau đó đưa buồng đếm lên kính hiển vi (3.3.4.1.8) với độ phóng đại 200 đến 400 lần, tiến hành đếm tinh trùng trong 5 ô nằm ở 4 góc và 1 ô nằm giữa đường chéo. Mỗi ô lớn gồm 16 ô nhỏ, mỗi ô nhỏ có thể tích (mm<sup>3</sup>): (1/20)x(1/20)x(1/10).

Nồng độ tinh trùng là số lượng tinh trùng có trong 1 ml tinh dịch.

$$C = n \times 10^6$$

Trong đó:

C là nồng độ tinh trùng trong tinh dịch (triệu/ml);

n là số tinh trùng đếm được ở 5 ô lớn;

10<sup>6</sup> là chỉ số quy đổi nồng độ tinh trùng về 1 ml tinh nguyên.

## c) Xác định tổng số tinh trùng tiến thẳng trong một lần xuất tinh

Tổng số tinh trùng tiến thẳng trong 1 lần xuất tinh (VAC, tỷ tinh trùng) được tính bằng cách nhân lượng xuất tinh (V) với hoạt lực tinh trùng (A) và nồng độ tinh trùng (C).

## TCVN 11841:2017

Lượng xuất tinh (V) được xác định như sau: Dùng ống đong (3.3.4.1.13) có chia vạch đến mililit để đo lượng tinh xuất ra sau khi đã lọc bỏ chất keo nhầy. Đặt ống đong trên mặt bàn phẳng, ngang tầm mắt, đọc kết quả ở mặt cong dưới của tinh dịch.

### d) Xác định tỷ lệ tinh trùng kỳ hình

Nhỏ 1 giọt tinh dịch lên phiến kính sạch, nhãn, ám (3.3.4.1.6) ; dùng lamén sạch, nhãn (3.3.4.1.7) dàn đều tinh dịch trên phiến kính (nếu đặc pha bằng vài ba giọt nước sinh lý hoặc Natricitrat 2,9%); để tự khô trong không khí sau đó hơ qua phiến kính trên ngọn lửa đèn cồn (3.3.4.1.11) .

Nhuộm màu tinh trùng bằng cách nhỏ đều dung dịch xanh metylen, đỏ fucsin, eosin-nigrosin (3.3.4.1.12) lên mặt lớp tinh dịch đã khô và đợi trong 5 min đến 7 min. Sau đó, rửa nhẹ bằng cách nhỏ từng giọt nước cất tại một đầu phiến kính có tiêu bản, để cho nước cất tự loang ra và trôi dần thuốc nhuộm đến mức độ tiêu bản vẫn giữ màu nhạt của thuốc nhuộm.

Đợi tiêu bản khô, đặt tiêu bản lên kính hiển vi độ phóng đại 400 đến 600 lần (3.3.4.1.8). Đếm tổng số 300 đến 500 tinh trùng bất kỳ (đếm cả tinh trùng bình thường và tinh trùng kỳ hình; không đếm lặp).

Công thức tính:

$$K (\%) = \frac{n}{N} \times 100$$

Trong đó:

K (%) là tỷ lệ tinh trùng kỳ hình

n là số tinh trùng kỳ hình

N là tổng số tinh trùng đếm được (N trong khoảng từ 300 đến 500).

### 3.3.4.2.3 Đối với tinh pha

#### a) Xác định hoạt lực tinh trùng

Thực hiện theo a) trong 3.3.4.2.2

#### b) Xác định tỷ lệ tinh trùng kỳ hình

Thực hiện theo d) trong 3.3.4.2.2

## 3.4 Khảo nghiệm môi trường pha loãng, bảo tồn tinh dịch lợn trên vật nuôi

Đánh giá chất lượng tinh pha thông qua kết quả thụ thai của lợn nái. Số lượng lợn nái không ít hơn 30 con.

Sử dụng tinh pha trong mỗi khung thời gian 24 h bảo quản để phối giống cho lợn nái; theo dõi, đánh giá kết quả thụ thai sau 25 ngày kể từ ngày phối giống và tính tỷ lệ thụ thai.

Sử dụng máy siêu âm thai để đánh giá lợn nái đã thụ thai.

$$\text{Tỷ lệ thụ thai (\%)} = \frac{\text{Tổng số lợn nái phối có chửa lần 1}}{\text{Tổng số lợn nái được phối}} \times 100$$

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng phương pháp cổ điển: quan sát lợn nái và kết hợp với sử dụng lợn đực giống, có kết quả thụ thai khi không phát hiện có biểu hiện động dục trở lại.

#### **4 Quy trình kiểm định môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn trong phòng thí nghiệm và trên động vật**

Kiểm tra tất cả các chỉ tiêu để xác nhận phù hợp tiêu chuẩn công bố theo quy định trong Điều 3.

Kiểm tra một số hoặc tất cả các chỉ tiêu khi có yêu cầu theo quy định trong Điều 3.

#### **5 Báo cáo kết quả khảo nghiệm, kiểm định**

Sau khi kết thúc khảo nghiệm/kiểm định môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn, đơn vị khảo nghiệm/kiểm định phải lập báo cáo kết quả.

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Văn bản hợp nhất số 19/VBHN-BNNPTNT ngày 20/7/2015 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành quy định về quản lý và sử dụng lợn đực giống.
  - [2] TCVN 9111:2011, Lợn giống ngoại - Yêu cầu kỹ thuật.
  - [3] TCVN 9713: 2013, Lợn giống nội - Yêu cầu kỹ thuật.
  - [4] TCVN 9370:2012, Trâu giống - Yêu cầu kỹ thuật.
  - [5] Báo cáo kết quả khảo nghiệm môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn ký hiệu HI-POREX wsp và HI-POWEX sol của Trung tâm nghiên cứu lợn Thụy Phương, năm 2012.
  - [6] Báo cáo kết quả khảo nghiệm môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn ký hiệu TS2 và TS3 của Trung tâm nghiên cứu và huấn luyện chăn nuôi Bình Thắng, năm 2013.
  - [7] Báo cáo kết quả khảo nghiệm môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn ký hiệu Androstar® Plus của Trung tâm nghiên cứu và huấn luyện chăn nuôi Bình Thắng, năm 2016.
-