

Project 101.6040

Niveaucontrole op het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk; ten behoeve van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne

Projectleider: ing. A.E.M. Vermunt

Rapport 90.09

maart 1990

Verdeling naar grootte van de cellen in rauwe melk en de invloed van bewaartijd, fixatie en soort melk op de grootte van de cellen.

N.J.G. Broex, G.J.M. Loeffen en
M. van Smaalen

Afdeling Microbiologie

Goedgekeurd: drs J.M.P. den Hartog

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST:

INTERN:

directeur
sectorhoofden
produktcoördinator dierlijke produkten
afdeling microbiologie (6x)
programmabeheer en informatieverzorging
circulatie
bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Veehouderij en Zuivel (ir J.J. Bakker)
Centraal Orgaan voor Melkhygiëne (ing. W.H.J. Bakker)
Commissie van advies van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne
(dr ir J.J. Stadhouders)
Melkcontrolestation Noord Nederland
Melkcontrolestation Oost Nederland
Melkcontrolestation West Nederland
Coöperatieve Vereniging voor Melkonderzoek Zuid Nederland
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Noord
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Zuid
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne West
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Oost
Coulter Electronics (dhr C. Smit)

INHOUD

SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MATERIALEN	5
2.1 Coulter Counter Z.M.	5
2.2 Channelyser 256 met printer x,y	5
2.3 Latex ijsuspensie	5
2.4 Referentiemateriaal Coulter	5
2.5 Individuele koemelk	6
2.6 Tankmelk	6
3 METHODEN	6
3.1 Telling conform voorschrift	6
3.2 Telling met gemodificeerde methoden	6
3.2.1 Zonder voorbehandeling	6
3.2.2 Bewaartijd voor fixatie	6
3.2.3 Fixatieprocedure	6
3.2.4 Boldiameter van 4,7 of 5,0 μm	7
3.3 Frequentieverdeling	7
3.3.1 Individuele koemelk	7
3.3.2 Tankmelk	7
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	7
4.1 Telling met gemodificeerde methoden	7
4.1.1 Zonder voorbehandeling	7
4.1.2 Bewaartijd voor fixatie	7
4.1.3 Fixatieprocedure	8
4.1.4 Boldiameter van 4,7 of 5,0 μm	8
4.2 Frequentieverdeling	8
4.2.1 Individuele koemelk	8
4.2.2 Tankmelk	8
5 CONCLUSIES	9
REFERENTIES	9
BIJLAGEN 1 T/M 19	

SAMENVATTING

In dit rapport zijn de resultaten verwerkt van een onderzoek naar de invloed van voorbehandelen, bewaartijd, fixatie en soort melk (individuele koemelk en tankmelk) op de telling van het aantal cellen. Uit dit onderzoek blijkt dat voorbehandelen bij tankmelk nodig is (15 minuten bij 55°C) vóór fixatie, in verband met luchtinslag. Tellen van het aantal cellen kan het beste verricht worden bij 4,7 μm . De bewaarperiode van de monsters is van invloed op de frequentieverdeling. Voor de dagelijkse controle van de apparatuur is individuele koemelk het meest geschikt omdat deze een goede frequentieverdeling heeft.

1 INLEIDING

Uit eerder onderzoek (RIKILT rapport 85.28) bleek dat voor het vaststellen van het aantal cellen, het beste kan worden uitgegaan van een boldiameter van $4,7 \mu\text{m}$ in plaats van $5,0 \mu\text{m}$. Ter bevestiging hiervan is dit onderzoek uitgevoerd. Tevens is voor de noodzakelijke standaardisatie onderzoek verricht naar de invloed van voorbehandeling van de monsters, de fixatie van de cellen, soort melk (koe- en/of tankmelk) en de ouderdom van de melk in relatie tot de grootte-verdeling van cellen. Het onderzoek werd uitgevoerd met een Coulter Counter Z.M. (deeltjesteller) met daaraan gekoppeld de Channelyser 256 (frequentieverdeler) met x,y printer. De monsters die onderzocht zijn, zijn individuele koemelk van koeien met een celgetal van 200 tot 2000×10^3 per ml. en tankmelk van at random genomen monsters van de rijdende melkontvangst (ROM). De ouderdom van de monsters varieerde van 0 tot 5 dagen.

2 MATERIALEN

2.1 Coulter Counter Z.M.

De telling van de cellen vond plaats na ijking met latex-ijksuspensie M-10 (2.3) volgens het Landelijk Voorschrift (6.4). Voor specificatie apparaat zie bijlage 15 en 17.

2.2 Channelyser 256 met printer x,y

Voor het maken van een frequentieverdeling van de cellen. Voor specificatie van het apparaat zie bijlage 16 en 17.

2.3 Latex ijksuspensie

Batch M-10 Material P.D.V.B. Latex (Bijlage 18)

2.4 Referentiemateriaal Coulter (somacount nr. 236H en 36L) (Bijlage 19)

2.5 Individuele koemelk

De koemelk werd betrokken van proefboerderij "de Ossekampen" te Wageningen. 50 monsters werden 0 tot 5 dagen voor fixatie bewaard in een koelkast van ca. 2°C.

2.6 Tankmelk

60 monsters werden at random genomen uit de rijdende melkontvangst. Op de dag van ontvangst (2 tot 3 dagen oud) werden ze gefixeerd en onderzocht.

3 METHODEN

3.1 Telling conform voorschrift

In het algemeen werden de methoden van onderzoek toegepast zoals voorgeschreven in de "Reglementen bundel" van de Stichting Centraal Orgaan voor Melkhygiëne, tenzij hieronder anders vermeld is.

3.2 Tellingen met gemodificeerde methoden

3.2.1 Zonder voorbehandeling

Er is een vergelijking gemaakt tussen een voorbehandeling van 15 minuten bij 55°C en geen voorbehandeling van de melk.

3.2.2 Bewaartijd vóór fixatie

Er is een vergelijking gemaakt tussen fixatie van de individuele koemelk monsters direct na monsternamen en na 5 dagen bewaren bij 2°C.

3.2.3 Fixatieprocedure

De invloed van de fixatieprocedure (temperatuurbehandeling) is onderzocht. Zowel individuele koemelk als tankmelk is gefixeerd door zowel (16-18 uur) te incuberen bij 30°C als 50 minuten bij 55°C en vervolgens te tellen bij een boldiameter van 4,7 en 5,0 µm.

3.2.4 Boldiameter van 4,7 of 5,0 μm

Er is een vergelijking gemaakt tussen een afstelling van 4,7 en 5,0 μm voor zowel de individuele koemelk als de at random genomen tankmelkmonsters .

3.3 Frequentieverdeling

3.3.1 Individuele koemelk

Onderzoek is verricht naar de frequentieverdeling van individuele koemelk.

3.3.2 Tankmelk

Onderzoek is verricht naar de frequentieverdeling van at random gekozen tankmelkmonsters.

4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 Tellingen met gemodificeerde methoden

4.1.1 Zonder voorbehandeling

Bij individuele koemelkmonsters wordt er een verschil gemeten van gemiddeld 1,0% tussen met en zonder voorbehandeling (Bijlage 1). Bij tankmelkmonsters is dit verschil gemiddeld 8,7% (Bijlage 1). Door verwarming treedt er een vervlakking op tussen top en dal van het aantal cellen, tevens wordt de luchtinslag (in de melkleidingen) verwijderd. Het celgetal wordt daardoor lager.

4.1.2 Bewaartijd voor fixatie

In bijlage 2* is een gemiddelde frequentieverdeling ($n=8$) van individuele koemelk met een gemiddeld celgetal van 500×10^3 per ml te zien bij een bewaartijd van 0 en 5 dagen. Hieruit blijkt dat er na 5 dagen een verlaging van de top plaatsvindt. De cel-grootte is bij directe fixatie 6,0 à 6,1 μm en na 5 dagen 5,8 à 5,9 μm . De boldiameter wordt dus iets kleiner en er vindt tevens een verschuiving plaats in het dal van 5,0 naar 4,9 μm . Bij 5 dagen oude monsters neemt de cel-grootte af en de ruis (verhoging van het dal) toe.

* Het percentage op de y-as moet gezien worden als een verhoudingsgetal zodat, voor iedere grafiek de 100%-waarde overeenkomt met een andere absolute celwaarde.

4.1.3 Fixatieprocedure

Tellingen van individuele koemelk en tankmelk bij een cel-grootte van 4,7 μm en 5,0 μm leverden bij de twee fixatie-procedures (30° en 55°C) geen significante verschillen op (Bijlage 3a en 3b).

4.1.4 Boldiameter van 4,7 of 5,0 μm

Het verschil tussen telling bij 4,7 en 5,0 μm is bij individuele koemelk 5,2% en bij tankmelk 13,4% (Bijlage 4). Dit verschil wordt veroorzaakt door de frequentieverdeling van beide soorten. Het dal van de frequentieverdeling ligt bij individuele koemelk bij 5,0 μm terwijl dit bij tankmelk bij 4,7 μm is (Bijlage 5 t/m 14). De beste afstelling voor de Coulter Counter is voor beide melksoorten 4,7 μm , omdat bij 4,7 μm het dal van de frequentieverdeling ligt.

4.2 Frequentieverdeling

4.2.1 Individuele koemelk

50 monsters werden onderzocht met een celgetal variërend van 100 tot 1600 $\times 10^3$ cellen per ml. In bijlage 5 t/m 9 is van 5 representatieve monsters de frequentieverdeling weergegeven. Over de resultaten zijn onderstaande opmerkingen te plaatsen:

- De cel-grootte is $5,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$. (top van de frequentieverdeling (modus))
- Het cel-dal is $4,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$. (minimum van de frequentieverdeling)
- Het verschil tussen dal en top is $80 \pm 15\%$.

Hieruit blijkt dat individuele koemelk geschikt is als referentiemateriaal. Vooral van belang daarvoor is de cel-grootte van 5,9 μm en het verschil tussen top en dal van 80%. Het aantal weefselcellen is waarschijnlijk laag en zijn er nauwelijks beschadigde cellen.

4.2.2 Tankmelk

Onderzocht zijn 60 at random genomen monsters met een celgetal variërend van 100 t/m 1200 $\times 10^3$ cellen per ml. In bijlage 10 t/m 14 is van 5 representatieve monsters de frequentieverdeling weergegeven. Over de resultaten zijn onderstaande opmerkingen te plaatsen:

- De cel-grootte is $5,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$. (top van de frequentieverdeling)
- Het cel-dal is $4,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$. (minimum van de frequentieverdeling)
- Het verschil tussen dal en top is $20 \pm 20\%$

Hieruit blijkt dat tankmelk minder geschikt is als referentiemateriaal voor het standaardiseren van monsters. De cellen van de tankmelk zijn kleiner dan bij individuele koemelk, 5,6 t.o.v. 5,8 μm , en het dal is 0,2 μm lager. Er is niet of nauwelijks sprake van een top, de ruisfactor is daardoor erg hoog. Een mogelijke oorzaak hiervoor kan gezocht worden in de beschadiging van de cellen bij het transport van de melk naar de tankopslag en het transport van de tank naar de R.M.O.. Een andere oorzaak kan zijn dat tankmelk meer weefselcellen bevat dan individuele koemelk.

5 CONCLUSIES

Voorbehandeling van de monsters door 15 minuten incuberen bij 55°C voor fixatie is noodzakelijk om de onvermijdelijke luchtbelletjes te verwijderen.

De ouderdom van de monsters heeft invloed op de frequentieverdeling. Naar mate de monsters ouder zijn treedt er nivellering op tussen top en dal, de cellen worden kleiner.

In dit onderzoek is geen verschil aangetoond tussen fixatie bij een temperatuur van 30°C en 55°C

Celgetalbepalingen kunnen bij de Coulter Counter het best plaatsvinden bij een boldiameter met afstelling van $\geq 4,7 \mu\text{m}$ (zie rapport 85.28). Voor het afstellen en de dagelijkse controle van Coulter Counters en Fossomatics is koemelk aan te bevelen boven tankmelk omdat de frequentieverdeling van koemelk t.o.v. tankmelk beter is o.a. door minder storing van weefselcellen en beschadigde cellen.

REFERENTIES

- 1) IJking van en meting met Coulter Counter apparatuur voor de bepaling van het celgetal in boerderijmelk. (RIKILT-rapport 85.28)
- 2) Manual Coulter Counter ZM
- 3) Manual Channelyser 256
- 4) S.V.M. bundel reglementen, regulatieven voor de melkcontrolestations van Stichting voor Melkhygiene (S.V.M.).

BIJLAGE 1

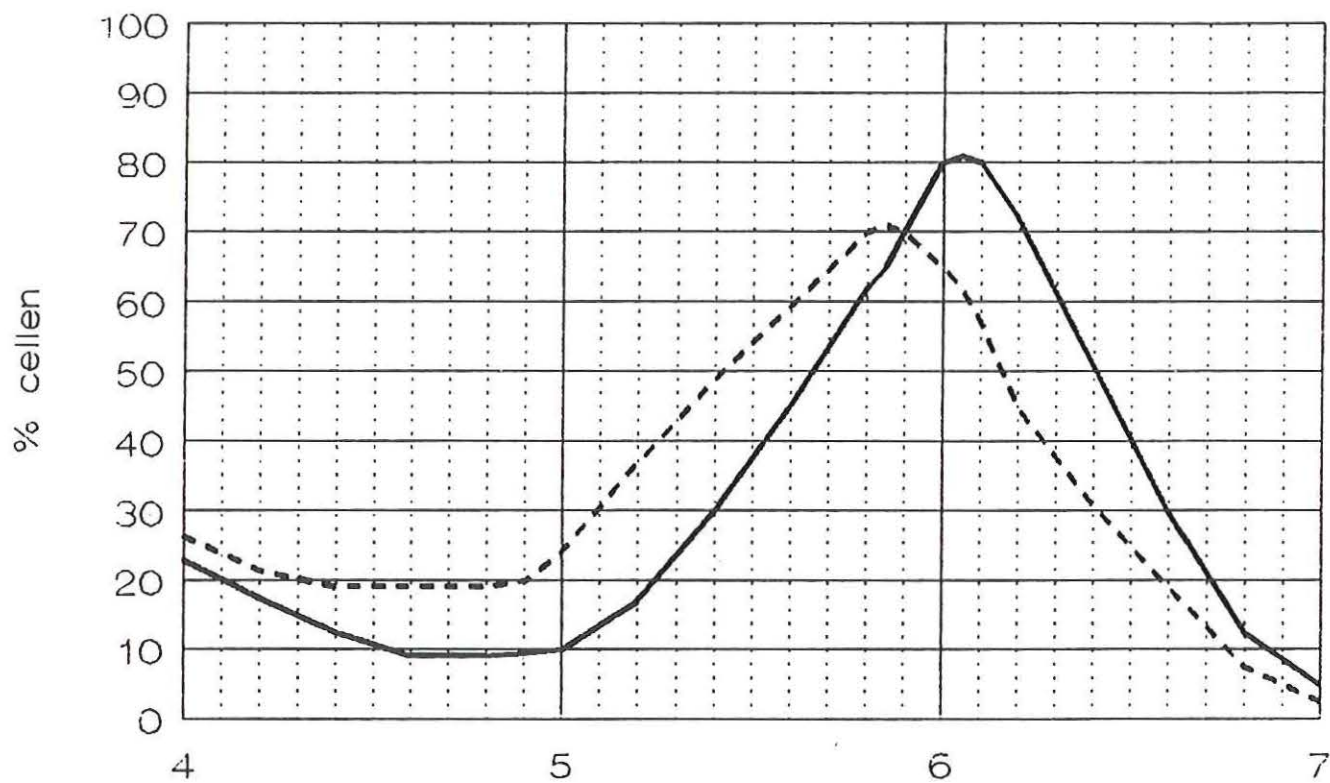
Tabel 1

Invloed op het celgetal van voorbehandeling van de monsters door 15 min. incuberen bij 55°C voor fixatie van de cellen.
(Celgetal = weergegeven waarde x 10³ cellen/ml).

nr	Individuele koemelk			Tankmelk		
	zonder voorbehandeling	met verschil (%)		zonder voorbehandeling	met verschil(%)	
1	1455	1399	-3.8	401	349	-13.0
2	1390	1376	-1.0	409	408	-0.2
3	964	1009	4.7	639	548	-14.2
4	926	966	4.2	386	331	-14.2
5	777	775	-0.3	158	131	-17.1
6	656	642	-2.2	192	184	-4.2
7	582	574	-1.4	222	154	-30.6
8	566	549	-3.0	315	307	-2.5
9	444	438	-1.4	386	305	-21.0
10	382	369	-3.3	584	572	-2.0
11	375	380	-1.3	296	261	-11.8
12	380	379	-0.3	348	329	-5.5
13	378	379	0.3	262	260	-0.8
14	328	324	-1.2	543	535	-1.5
15	356	351	-1.4	517	509	-1.5
16	421	411	-2.4	777	741	-4.6
17	281	281	0	689	629	-8.7
18	266	263	-1.1	1134	1049	-7.5
19	290	281	-3.1	1003	921	-8.2
20	345	341	-1.1	937	886	-5.4
21	450	446	-0.9	866	732	-15.5
22	556	549	-1.3	727	645	-11.3
23	568	570	0.4	521	488	-6.3
24	541	530	-2.0	446	416	-6.7
25	180	174	-3.4	196	169	-13.8
26	203	205	1.0	227	202	-11.0
27	333	338	1.0	338	314	-7.1
28	313	307	-1.9	447	408	-8.7
29	337	328	-2.7	538	501	-6.9
30	188	188	0	337	336	-0.3
gem ± s			-1.0 ± 2.0			-8.7 ± 6.8

Bijlage 2 Invloed van de bewaartijd voor fixatie op de frequentieverdeling

directe
fixatie
 na 5 dagen
fixatie



boldiameter (um)

Individuele koemelk met een celgetal van 500×10^3 per ml

BIJLAGE 3a

Tabel 2

Invloed van twee fixatietemperaturen (30°C en 55°C) en telling bij een instelling van 4,7 µm en 5,0µm.

Individuele koemelkmonsters met een celgetal van
x10³ per ml

nr	4,7 µm			5,0 µm		
	30°C	55°C	verschil (%)	30°C	55°C	verschil(%)
1	1366	1351	-1.1	1276	1278	-0.2
2	1009	960	-4.9	966	923	-4.5
3	775	796	2.7	739	799	8.1
4	686	677	-1.3	648	638	-1.5
5	538	546	1.5	521	519	-0.4
6	544	529	-2.8	518	521	0.6
7	381	379	-0.5	363	366	0.8
8	378	376	-0.5	363	366	0.8
9	298	296	-0.7	281	277	-1.4
10	211	208	-1.4	198	199	0.5
11	250	248	-0.8	237	235	-0.8
12	346	349	0.9	336	333	-0.9
13	288	286	-0.7	261	265	1.5
14	448	459	2.5	423	418	-1.2
15	500	489	-2.2	477	479	0.4
16	463	463	0	429	434	1.2
17	318	321	0.9	300	298	-0.7
18	296	301	1.7	287	286	-0.3
19	299	301	0.7	276	280	1.4
20	368	364	-1.1	357	350	-2.0
gem ± s			-0.4 ± 1.8	0.1 ± 2.4		

BIJLAGE 3b

Tabel 3

Invloed van twee fixatietemperaturen (30°C en 55°C) en telling bij een instelling van 4,7 µm en 5,0 µm.

Tankmelkmonsters met een celgetal van

$\times 10^3$ per ml.

nr	4,7 µm			5,0 µm		
	30°C	55°C	verschil (%)	30°C	55°C	verschil(%)
1	430	403	-1.1	401	389	-3.0
2	486	479	-1.4	409	408	-0.2
3	733	728	-0.7	639	629	-1.6
4	425	411	-3.3	331	335	1.2
5	186	179	-3.8	158	159	0.6
6	228	233	2.2	192	195	1.6
7	673	675	0.3	584	580	-0.7
8	386	392	1.6	348	352	1.1
9	283	280	-1.1	262	258	-1.5
10	605	601	-0.7	543	532	-2.0
11	482	481	-0.2	446	448	0.4
12	570	568	-0.4	517	513	-0.8
13	465	458	-1.5	386	390	1.0
14	233	230	-1.3	196	195	-0.5
15	386	385	-0.8	335	349	4.2
16	296	292	-1.4	265	260	-1.9
17	854	841	-1.5	739	748	1.2
18	926	903	-2.5	832	819	-1.6
19	798	781	-2.1	718	720	0.3
20	296	298	0.7	263	258	-1.9
gem $\pm$ s			-1.0 $\pm$ 1.5			-0.2 $\pm$ 1.7

BIJLAGE 4

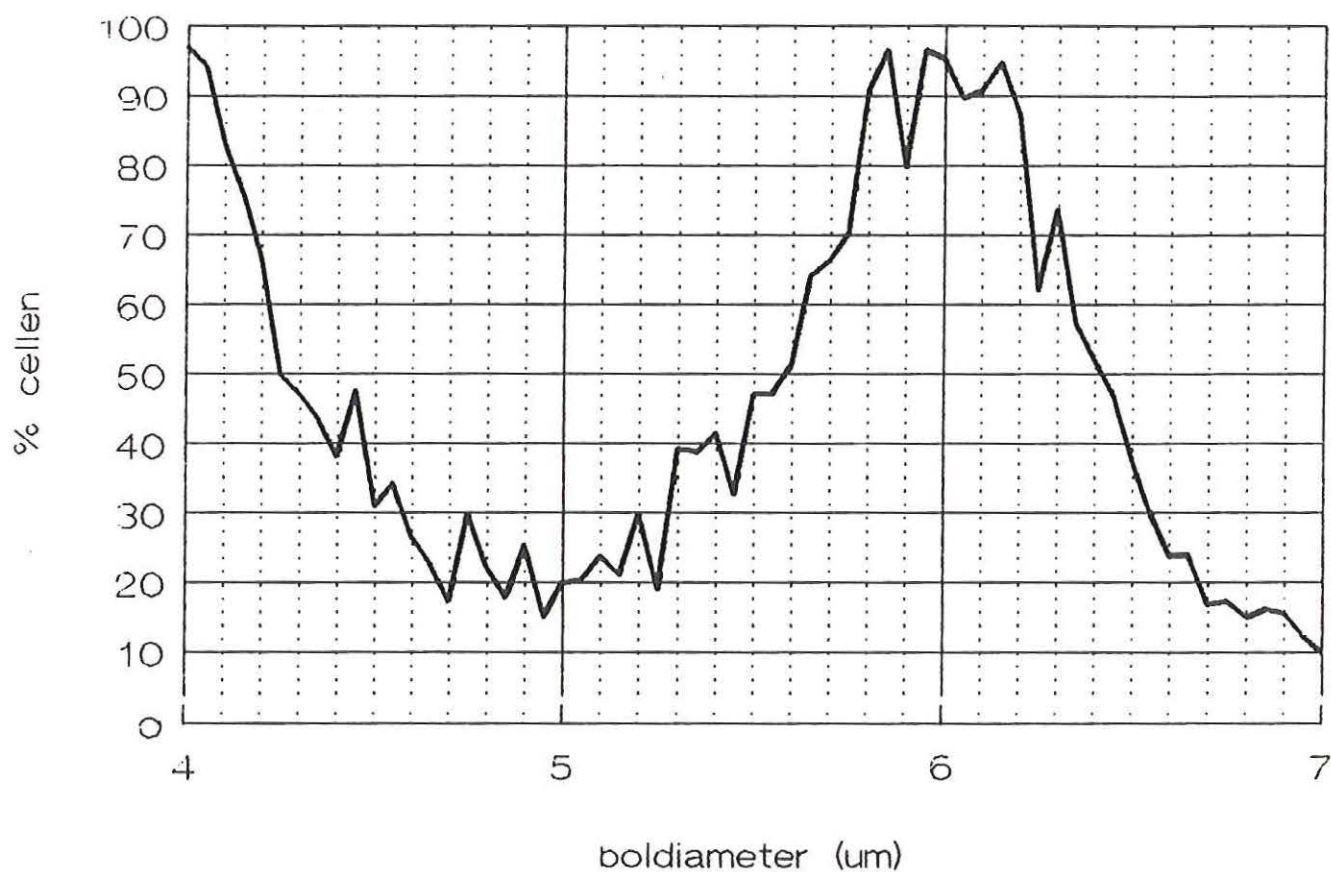
Tabel 4

Invloed van meting bij een boldiameter van 4,7 μm t.o.v. 5,0 μm voor individuele koemelk en at random genomen tankmelk met celgetal van ... $\times 10^3$ per ml.

nr	Individuele koemelk			tankmelk		
	4,7 μm	5,0 μm	verschil (%)	4,7 μm	5,0 μm	verschil(%)
1	1366	1276	-6.6	430	401	-7.2
2	1009	960	-4.9	486	409	-18.8
3	775	739	-4.6	733	639	-14.7
4	686	648	-5.5	425	331	-22.1
5	538	521	-3.2	186	158	-17.7
6	544	518	-4.8	228	192	-18.8
7	381	363	-4.7	673	584	-15.2
8	378	364	-3.7	386	348	-10.9
9	298	281	-5.7	283	262	-8.0
10	211	198	-6.2	605	543	-11.4
11	250	237	-5.2	482	446	-7.5
12	346	336	-2.9	570	517	-10.3
13	288	261	-9.4	465	386	-20.5
14	448	423	-5.6	233	296	-15.9
15	500	477	-4.6	386	335	-13.2
16	463	429	-7.3	296	265	-10.5
17	318	300	-6.0	854	739	-13.5
18	296	287	-3.0	926	832	-10.2
19	299	276	-7.7	798	718	-10.0
20	368	357	-3.0	296	263	-11.1
gem $\pm$ s			-5.2 $\pm$ 1.7	-13.4 $\pm$ 4.4		

Bijlage 5 Frequentiegrafiek van het aantal cellen in ind. koemelk.

— celgetal
320 × 10³ ml



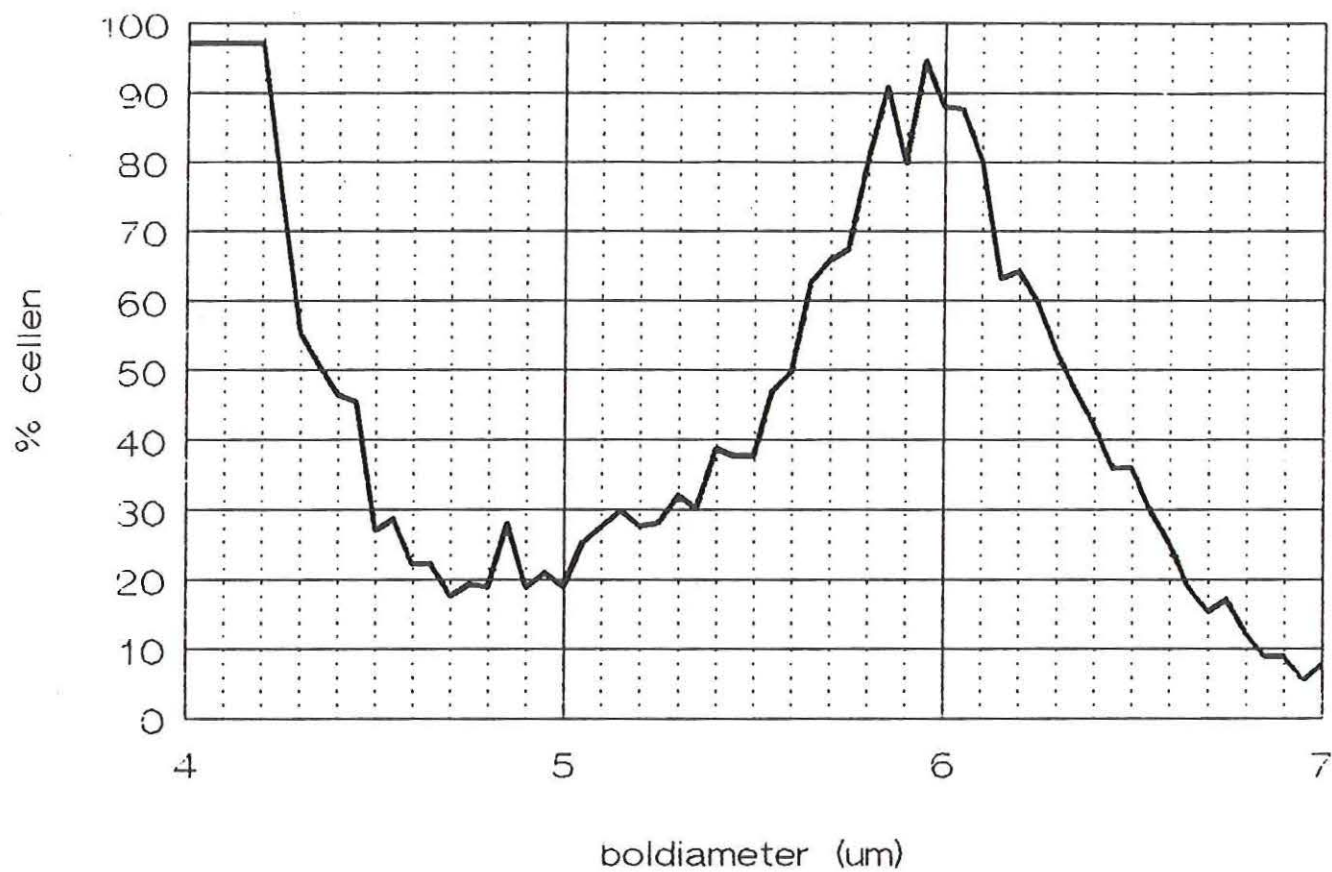
Bijlage 6 Frequentiegrafiek van het aantal cellen in ind. koemelk.

— celgetal
580*10³ /ml



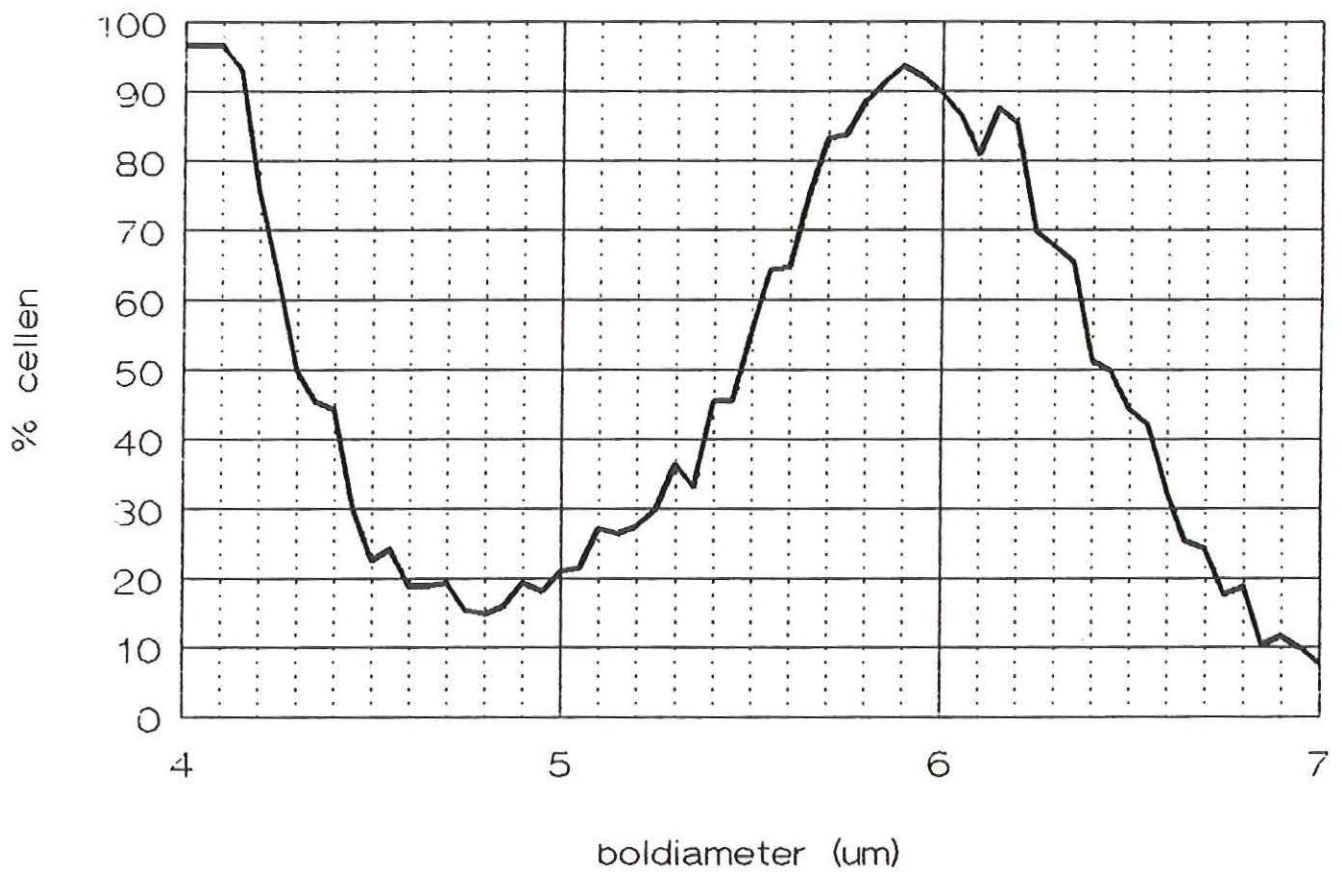
Bijlage 7 Frequentiegrafiek van het aantal cellen in ind. koemelk.

— celgetal
790 × 10³ /ml

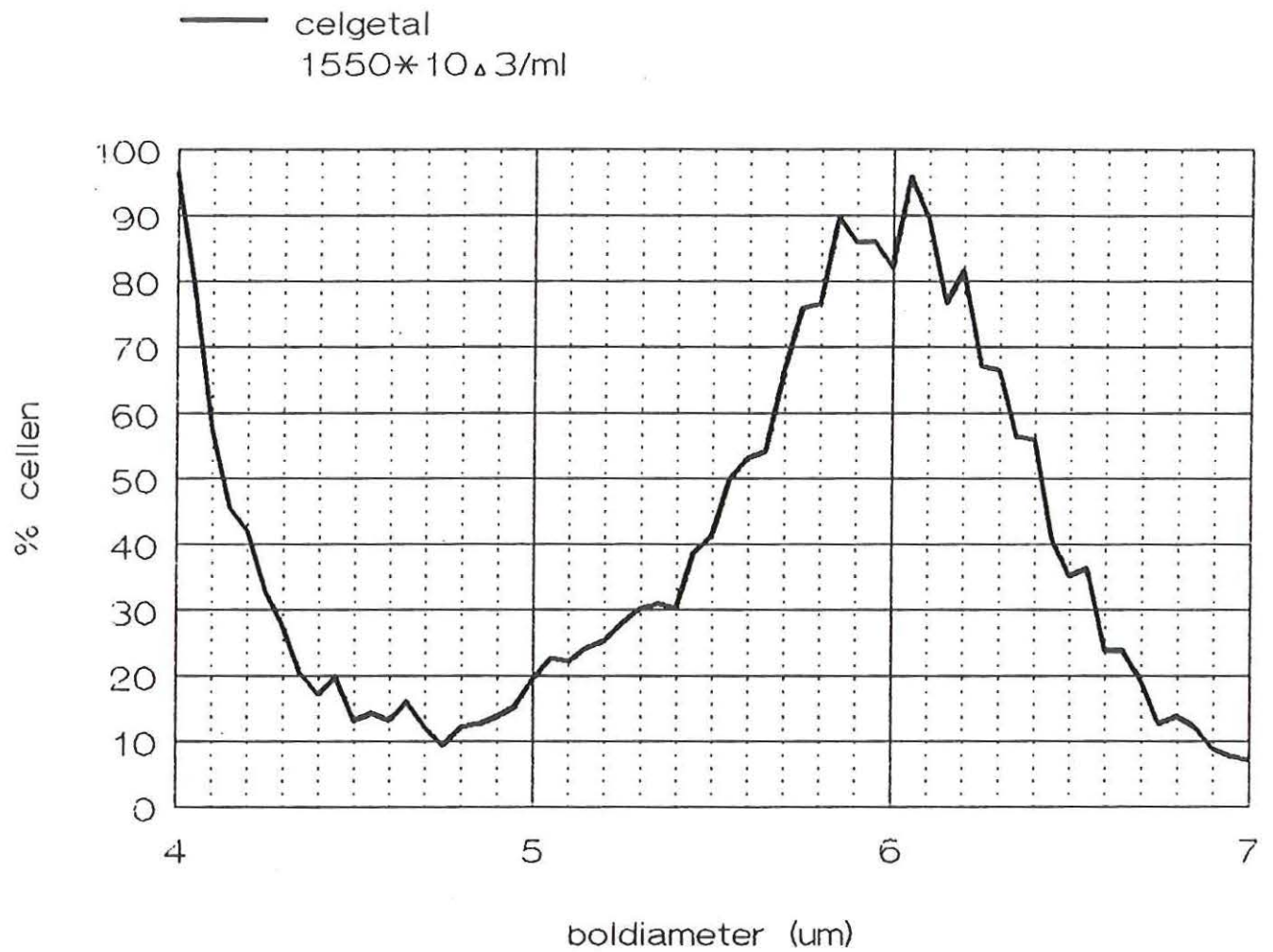


Bijlage 8 Frequentiegrafiek van het aantal cellen in ind. koemelk.

— celgetal
1130 × 10³/ml

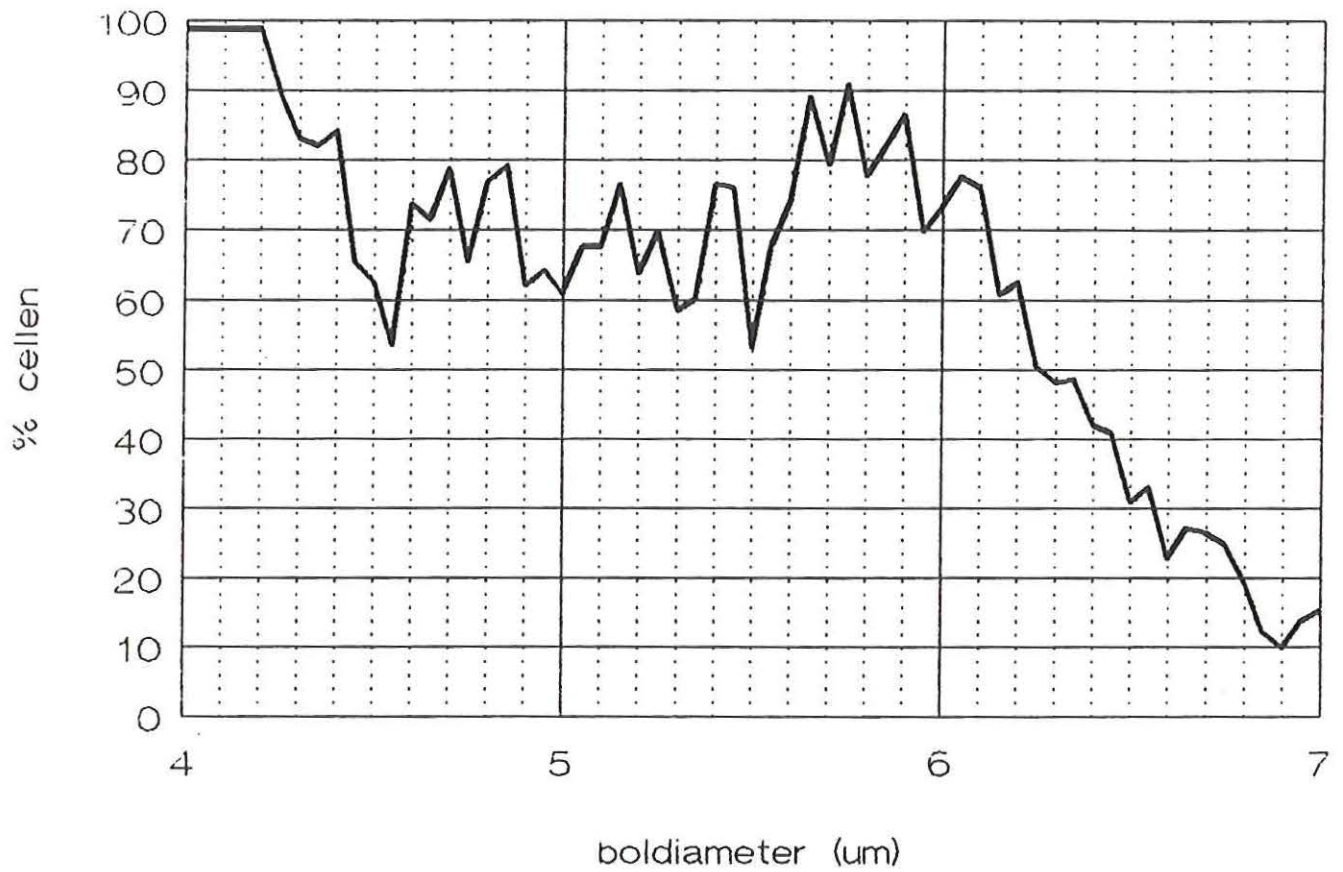


Bijlage 9 Frequentiegrafiek van het aantal cellen in ind. koemelk.



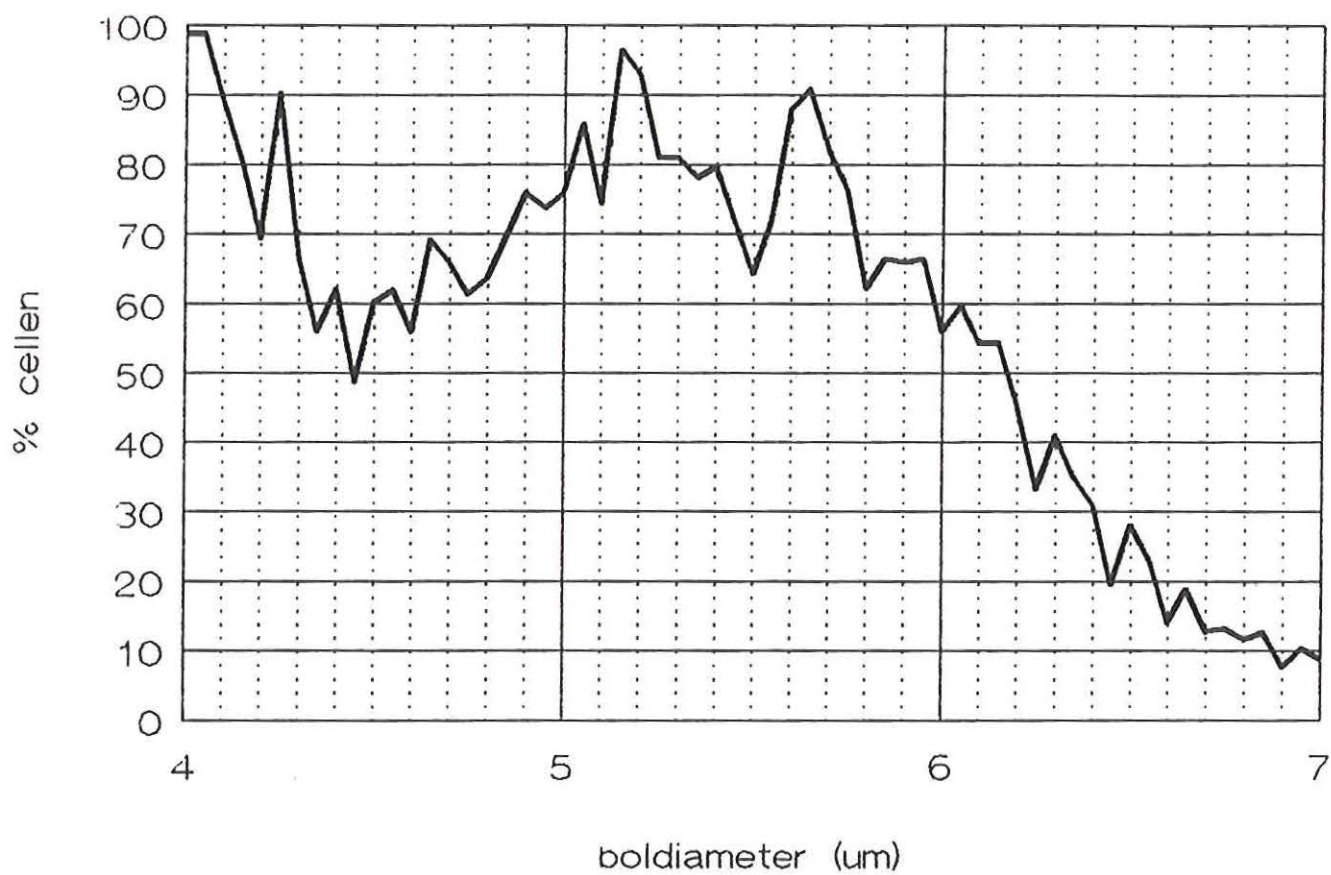
**Bijlage 10 Frequentiegrafiek van het
aantal cellen in tankmelk.**

— celgetal
 190×10^3 /ml



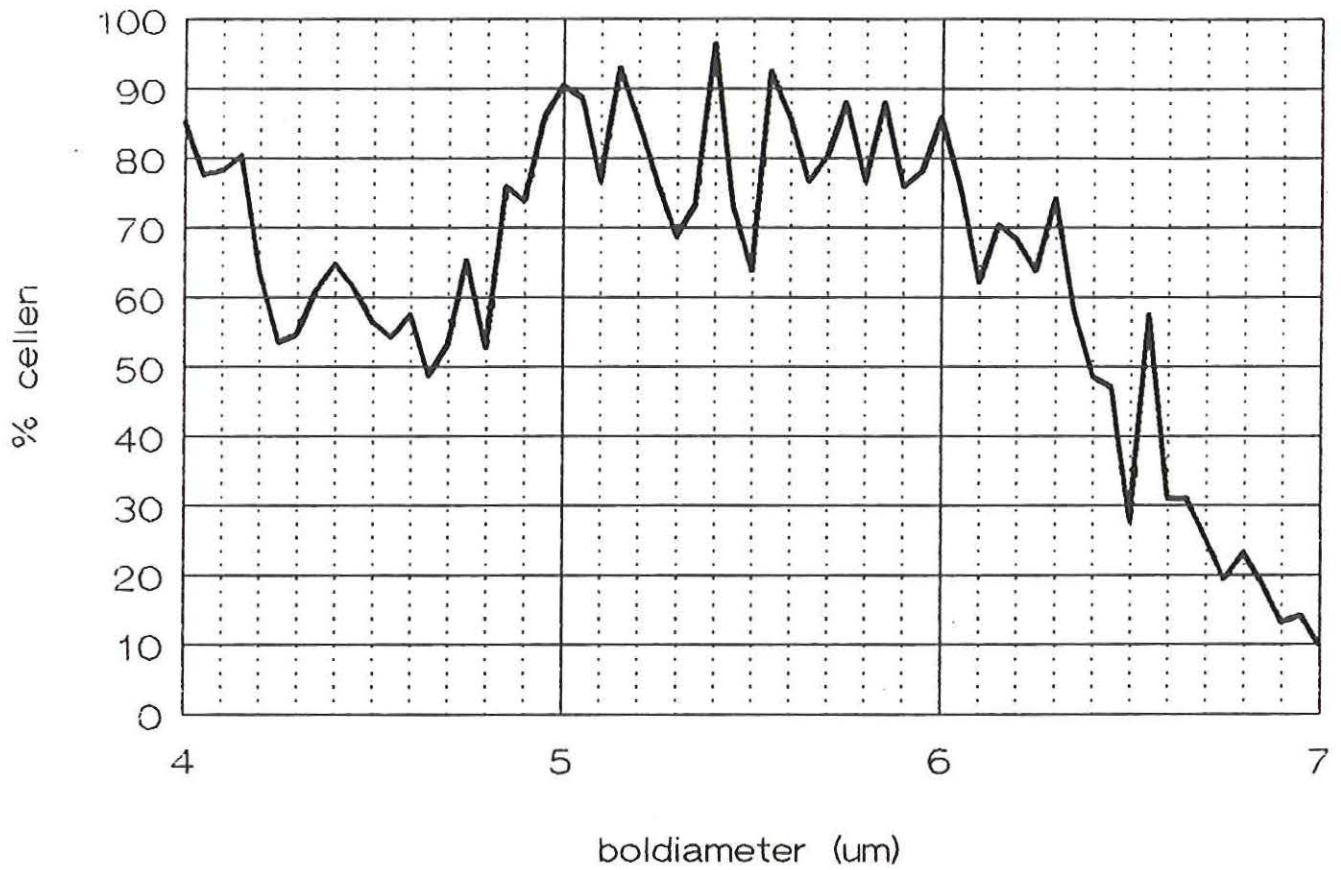
**Bijlage 11 Frequentiegrafiek van het
aantal cellen in tankmelk.**

— celgetal
 340×10^3 /ml



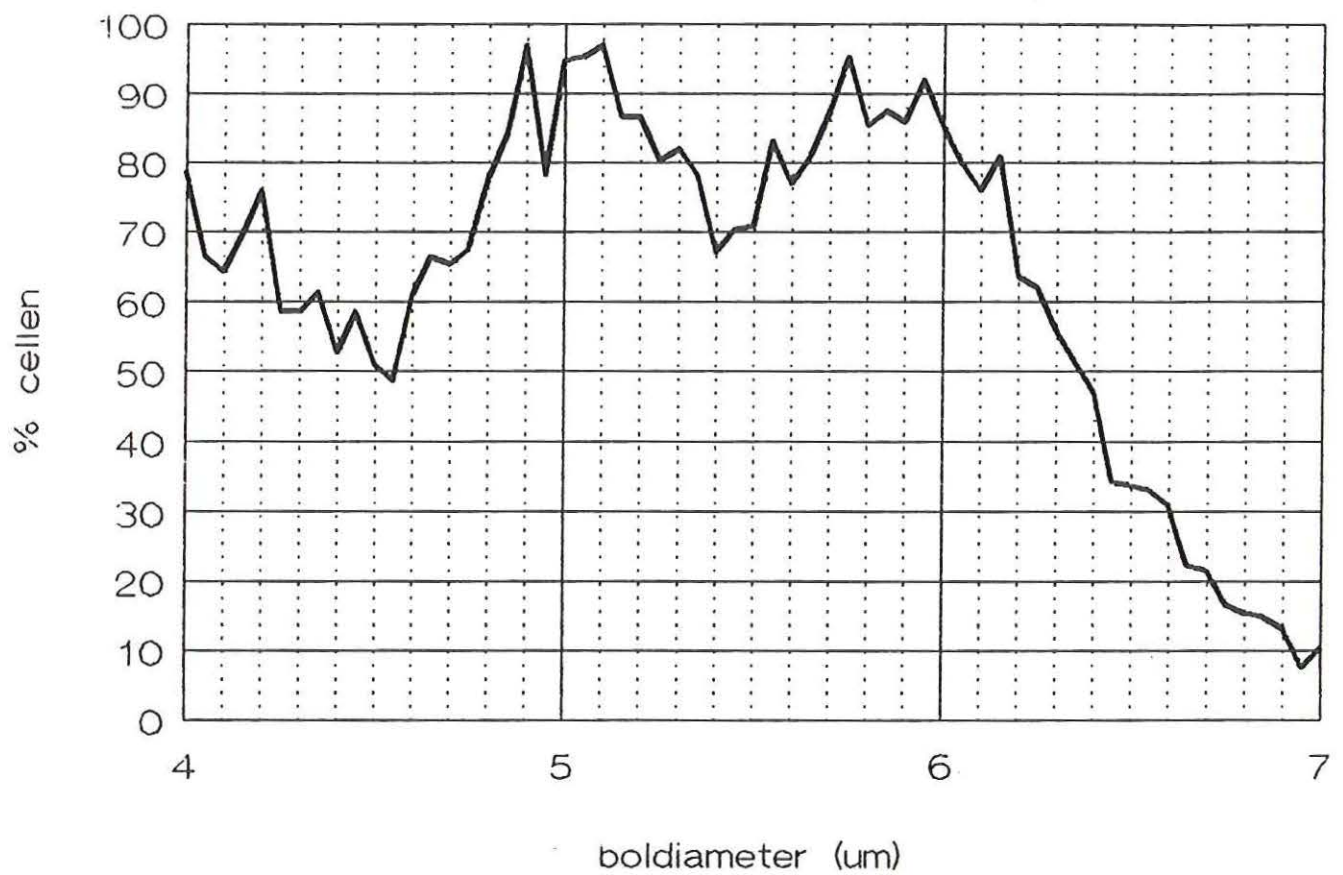
**Bijlage 12 Frequentiegrafiek van het
aantal cellen in tankmelk.**

— celgetal
 540×10^3 /ml



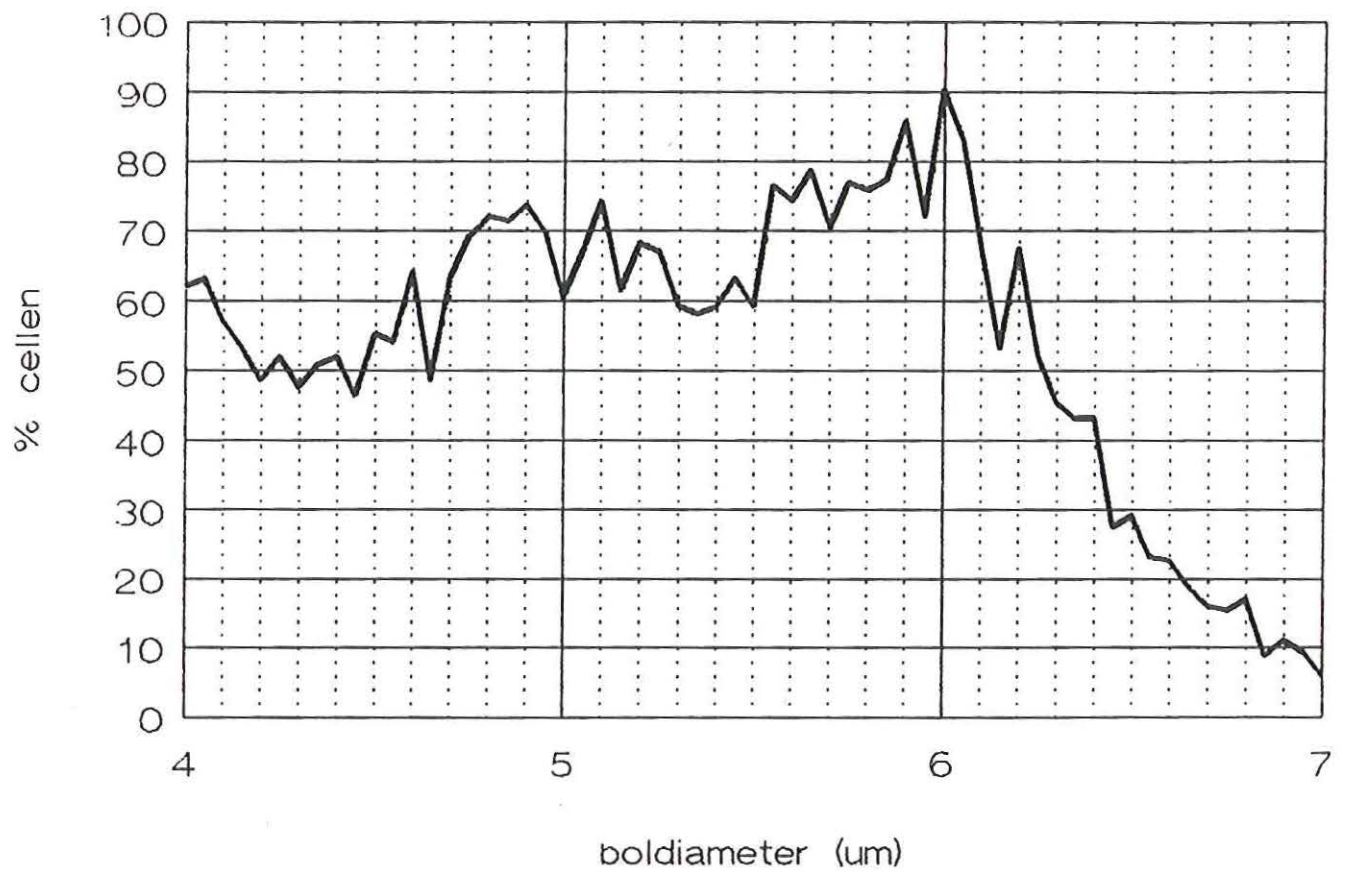
**Bijlage 13 Frequentiegrafiek van het
aantal cellen in tankmelk.**

— celgetal
780 × 10³ /ml



**Bijlage 14 Frequentiegrafiek van het
aantal cellen in tankmelk.**

— celgetal
1100 × 10³/ml



Section 3

3.2.2.3 DATA Display and Mode Keys

The functions of the Mode keys are explained in Table 3-4. When a mode key is pressed its associated lamp lights, the key function can be cancelled only by pressing another mode key. The first four digits of the display, labelled data, are a numerical value, whose power to the base 10 is indicated by the last two digits, labelled EXP. (Exponent).

DATA	EXP.	VALUE
6.160	BLANK	6.160
6.160	03	$6.16 \times 10^3 = 6160$
6.160	06	$6.16 \times 10^6 = 6160000$

If the DATA display gives the indication U1, U2, U5 or U6 this indicates a defect on the Microcomputer board, which cannot be rectified by the operator. Contact the Service Dept. of Coulter Electronics Ltd., or its appropriate authorized Distributor.

TABLE 3-4 DATA DISPLAY AND MODE KEYS

Key	Data Display on ZM	Printer or VDU Format (80 Characters)
DIA (T _U)	The diameter of the sphere representing the volume to which the upper threshold control is set.	The numerical value to which the upper and lower thresholds are set as well as the diameter of the sphere representing the volumes to which the thresholds are set. If the upper threshold is set to 99.9, no upper threshold data is displayed.
VOL (T _U)	The volume to which the upper threshold is set.	The numerical values to which the upper and lower thresholds are set, as well as the volume of the spheres represented by the threshold settings. If the upper threshold is set to 99.9, no upper threshold data is displayed.
DIA (T _L)	The diameter of the sphere representing the volume to which the lower threshold control is set.	The numerical value of the lower threshold and the diameter of the sphere representing the volume to which the lower threshold is set.
VOL (T _L)	The volume to which the lower threshold is set	The numerical value of the lower threshold and the volumes of the spheres represented by the lower threshold setting.
CAL	Enables the function of the calibration keys and allows new calibration data to be keyed in when the appropriate calibration key is pressed. Overrides Error Code 1, permitting adjustment of aperture current and threshold settings during calibration count, to establish the optimum settings.	When MAN Interface and CAL Modes are selected, all the calibration values are displayed as well as the analysis time (set by the operator, or time taken for a count in manometer mode), the CAL lower threshold numerical setting for the calibration, the aperture current used for calibration and the attenuation switch setting. The sample ID can be entered by using the numerical keys when the CAL mode key is pressed without pressing any of the calibration keys.

3.2.2.4 Data Display and Calibration Keys

When the ZM is not in the CAL mode the operator can display the calibration values that have been keyed in by pressing the appropriate calibration key. The data is then displayed for approximately 1.5 seconds before reverting to its previous mode.

The procedure used for changing the value stored in the ZM for each calibration key is the same. The procedure is as follows:-

- (1) Press the CAL mode key.
- (2) Press the appropriate calibration key, the calibration data stored is then displayed on the data display.
- (3) The new value can then be keyed in using the numerical keys below the data display. If a mistake is made, press the CE key which clears the display only and key in the new value.
- (4) To place the new calibration value in the store, press the appropriate calibration key for the second time.
- (5) When changing one or all of the calibration key values is completed, press any of the Mode keys except CAL to complete the procedure.

The function of the calibration keys is given in Table 3-5.

TABLE 3-5 DATA DISPLAY AND CALIBRATION KEYS

CAUTION: All Data associated with the keys listed in TABLE 3-5, with the exception of TIME(S), are retained in the microprocessor memory when the instrument is switched off. The TIME value is reset to zero to enable manometer control at switch on.

Key	Data Display	Function
DIA (μm)	The assay value of the diameter of the calibration material used during calibration.	To enter the calibration material diameter and to display the value stored in the ZM. The diameter is used to calculate calibration constant.
VOL (fl)	The assay value or calculated value of the calibration material volume.	To enter the calibration material volume (if the calibration material volume is given and not the diameter) and to display the value stored in the ZM. When the key is pressed the diameter is automatically calculated and transferred to the diameter store for calculation of the calibration constant.
MAN VOL (μl)	The manometer volume, selected in the Sampling Stand by the operator, in μl .	To display and enter the volume of electrolyte passing through the aperture during a count when the instrument is operating in the Manometer mode. The manometer volume is required for the ZM calculations of coincidence correction to be applied to the count. If the instrument is operating in the Time Mode, then a calculated value of the volume that passes through the aperture for the selected time must be entered.

Cont'd/...

Section 3

Table 3-5 Continued

Key	Data Display	Function
AP DIA (μ m)	The diameter of the orifice tube aperture used on the Sampling Stand.	To display and enter the diameter of the aperture tube being used in the Sampling Stand. The aperture diameter is required for the coincidence correction calculation.
TIME(S)	If zero is displayed this indicates that the instrument is operating in the manometer mode. If any other figures appear in this display this indicates that the ZM is operating in the Time mode, and the function of the Sampling Stand manometer has been inhibited. Note: In Time mode, maximum time which can be keyed in is 655s.	To display and enter the time period of the count. If zero has been entered, or the timer reset by switching the instrument off, it indicates to the operator and to the ZM that the count is related to a volume of electrolyte as selected by the Manometer Volume Switch on the Sampling Stand. If the ZM is in the Manometer mode and the CAL key is not pressed, the count time is accessible by pressing the TIME key. The count time is then displayed for approximately 1.5 seconds. In the Time mode, the function of this key (when CAL key is not pressed) is to initiate the count when pressed. If the key is pressed during a count, the count stops at the instant it is pressed.
Kd	The diameter calibration factor of the instrument.	When pressed, displays the calibration factor for the previous calibration. The operator can also key in a known factor for a given orifice tube. (once Kd factor is known for an orifice tube it does not have to be recalibrated or Kd re-calculated unless the PRESET GAIN switch setting is changed).

3.2.3 INTERNAL SWITCHES

The internal switches shown in Figure 3-3 are accessible only when the side panels are removed and the front panel door opened. The function of the internal switches is as follows:-

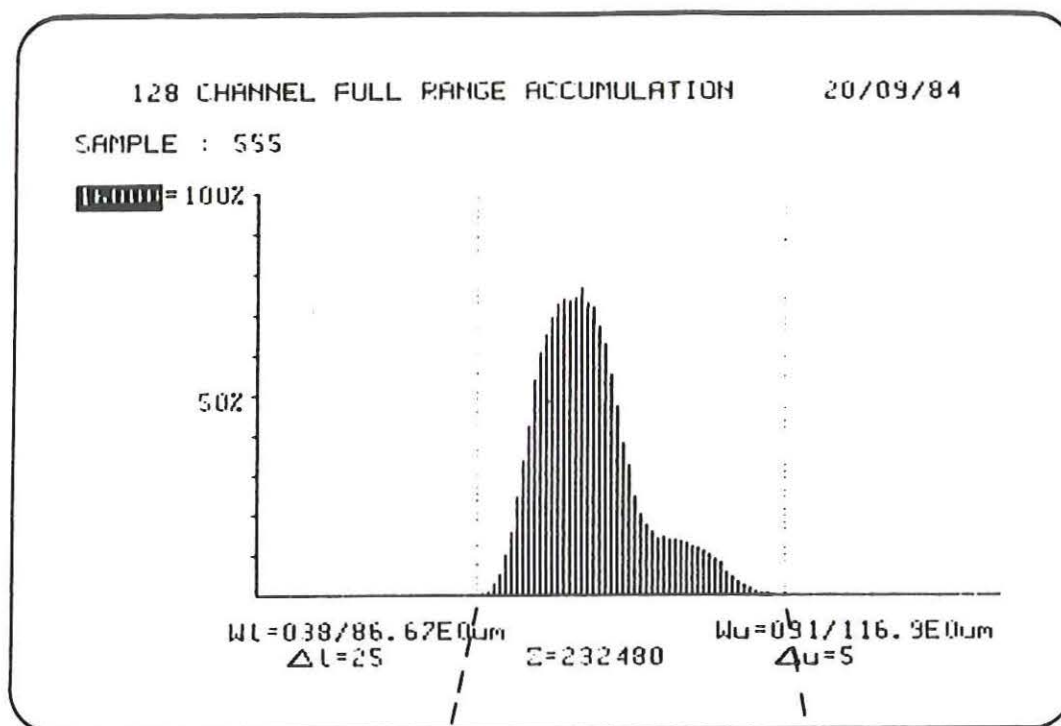
- (1) Security code switch, when set to 'on' inhibits data entry in the CAL mode unless the security code 9876 is first keyed in, then cleared with the CE key.
- (2) The Baud Rate switches are used to make the ZM compatible with a data interface.
- (3) The format switch is used to select either the 80 character format or the 20 character format (See Fig. 2-1 and 2-2).
- (4) The de-limit switches can be used to set any letter in the ASCII code required by the data terminal equipment.

3.2.4 SAMPLING STAND CONTROLS AND INDICATORS (Fig. 3-4)

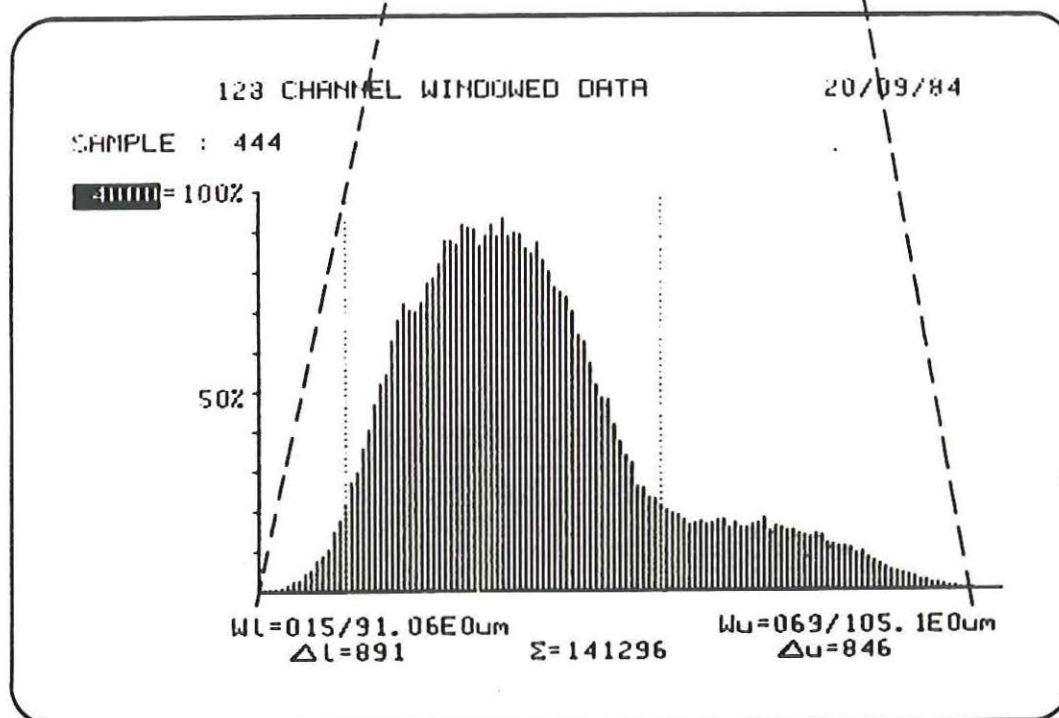
3.2.4.1 Power Switch

Power OFF, lamp extinguished

Power ON, lamp lit.



THE POSITION OF THE CURSORS
ON THE 'FULL' MENU BECOME
THE LIMITS OF THE 'WINDOW'
MENU

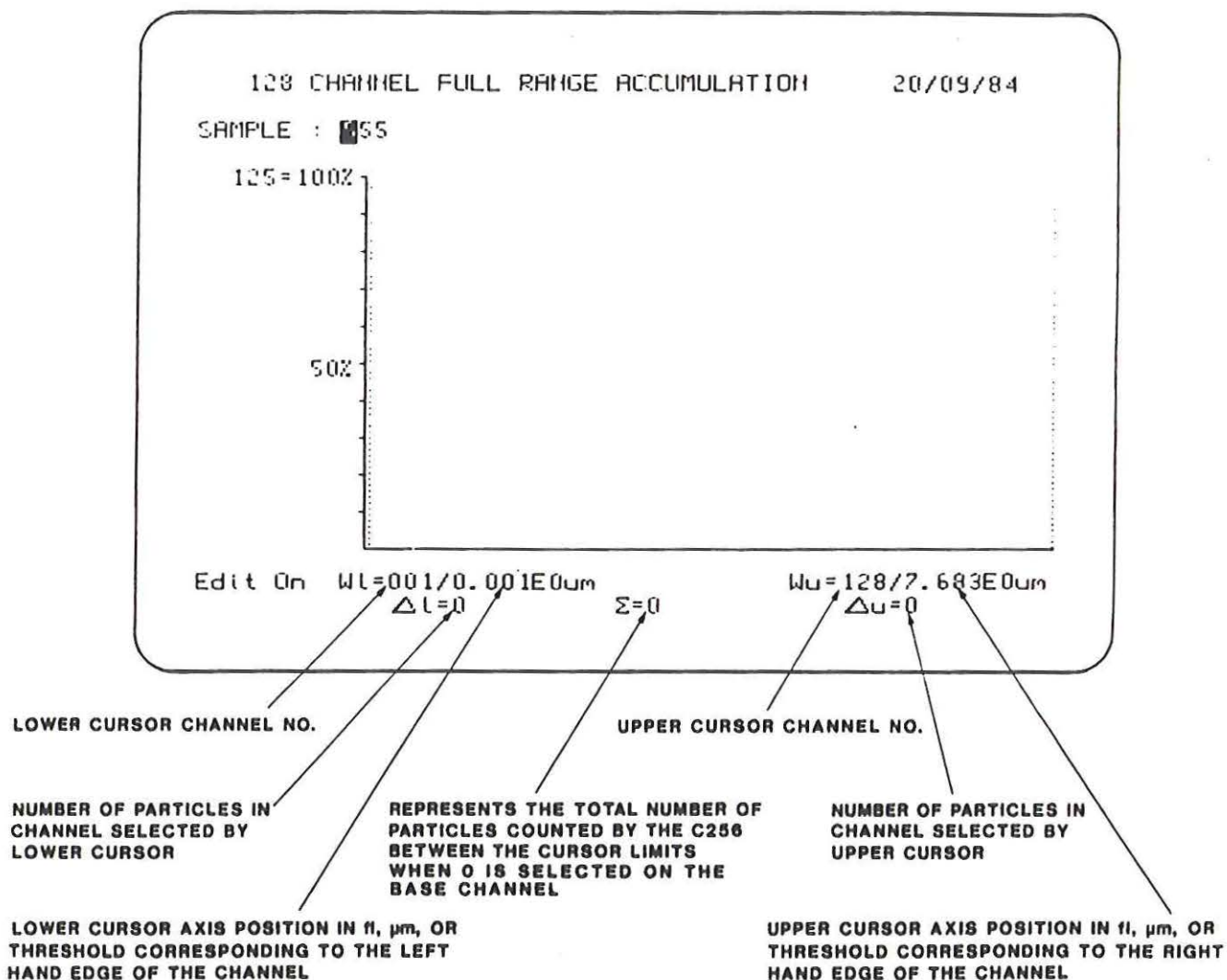


Section 2

2.2 **SAMPLE ANALYSIS**

2.2.1 **FULL RANGE ACCUMULATION**

(1) Press the C256 FULL key the following menu is displayed.



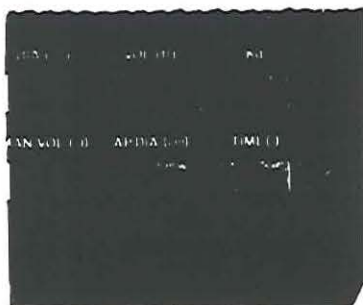
(2) Using the Menu Cursor keys step down the 'Full' menu option and enter the information as follows:

SAMPLE: Enter the Sample Number.

Notes:(1) The previous information is erased directly the first digit is entered.

(2) The flashing cursor remains on each menu in the position it was last placed whilst the instrument is switched on.

= 100%: The number entered here represents the number of particles counted in a channel for 100% display scale. To change the scale press Menu Key $\leftarrow$ to double or $\rightarrow$ to halve. The range available is 125, 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000, 8,000, 16,000, 32,000 and 64,000.



ration data
meter
ibration
r or volume
the
a
with the
l settings
r which
displays the
Kd key is
red in the

ZM's memory and is used to calculate and display the size corresponding to any position of the instrument sensitivity controls. Also incorporated is an analysis time control, values for which are entered in the same way as the calibration data, and which can be used to replace the mercury syphon sampling, for very small or very large apertures. When not in the CAL mode these keys are disabled preventing the accidental entry of erroneous data.

ONS

range.
tions to be
eight)

counts per
on at,
et particle
ent on

ing Range
or more.

Timer Range

10ms - 655 seconds

Operating Temp. Range

10°C - 35°C

Operation Humidity Range

10% - 85% Relative Humidity

Data Outputs

Total number of particles above
preset size.
Total number of particles between
preset sizes.
Time of analysis.
Instrument settings.

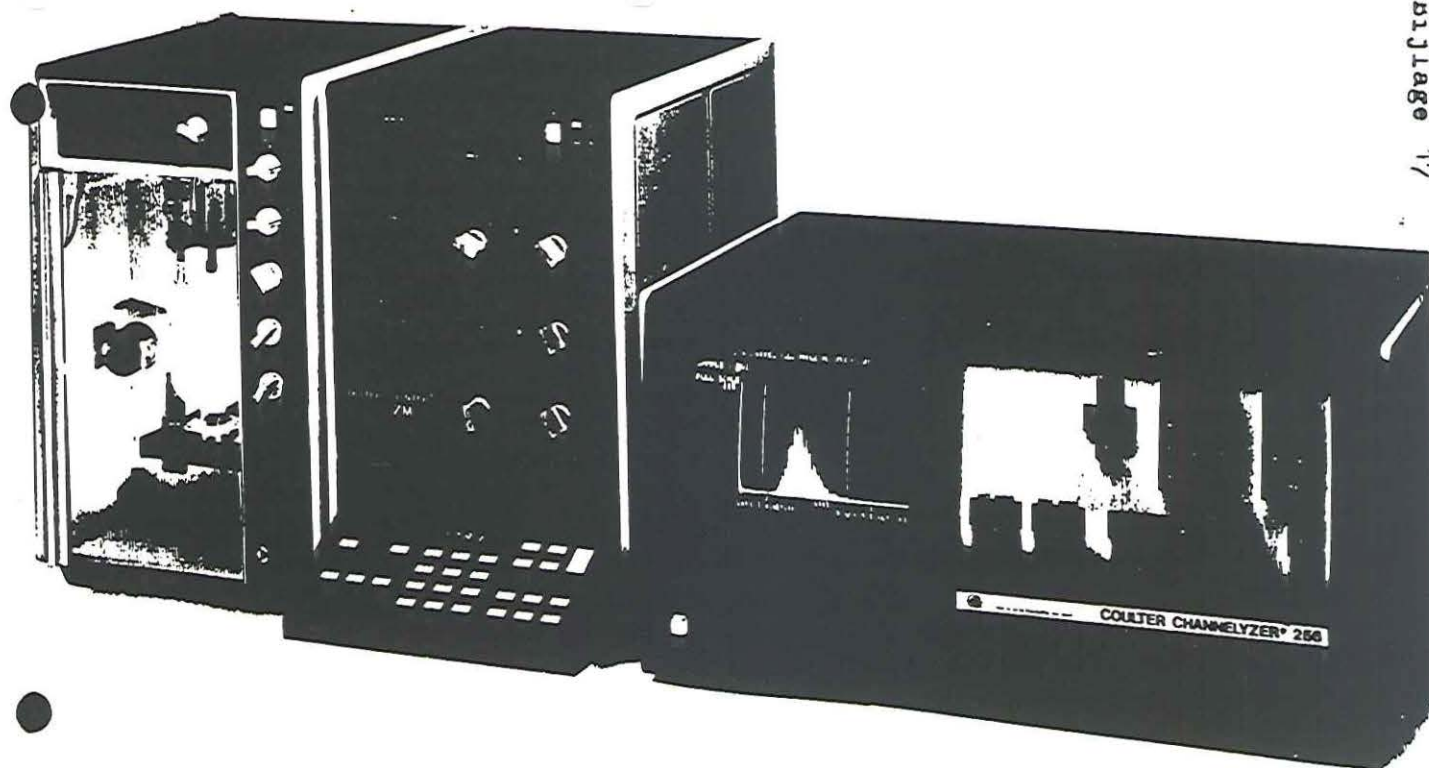
Interface Output

ASCII, RS232, 20mA current loop.
Variable baud rate 110 - 9600.

npling land	Vac/Waste	C256	MCV/HCT
15.0	11.5	29.0	4.5
17.5	27.0	59.0	34.3
16.0	16.0	39.0	42.0
14.5	2.4	15.0	2.3

.) 220 - 240 V.a.c. $\pm$ 10% 50Hz/60Hz
110 - 120 V.a.c. $\pm$ 10% 50Hz/60Hz

V



The Coulter Channelyzer® 256 is a new, high resolution, size distribution accessory, designed specifically for use with the Coulter Counter® Models ZM and TALL. Size distributions of biological cells and other narrow range material may now be obtained in real time with 64, 128 or 256 channel histograms providing the operator with the highest level of sensitivity in sizing resolution. Size differences as small as 0.05fl may be

detected, making the system an invaluable and necessary tool for everyone involved in areas such as yeast cell growth, red and white blood cell studies for human, veterinary and pharmaceutical applications, cancer research, immunology and some areas of microbiology.

Real Time Analysis

Data in the form of analogue pulses

representing particle number and volumetric size from the Coulter Counter®, are accumulated directly in the memory of the C256 in either 64, 128 or 256 channel resolution as selected by the operator.

COULTER CALIBRATION STANDARD

Assay Sheet

E.S.C.C. CALIBRATOR

BATCH M.10

MATERIAL P.D.V.B. LATEX

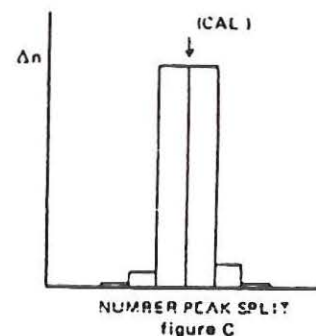
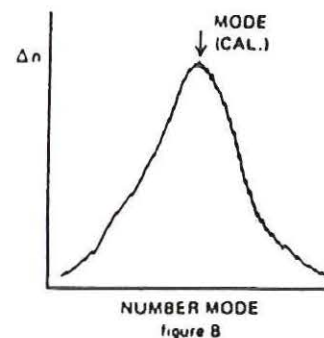
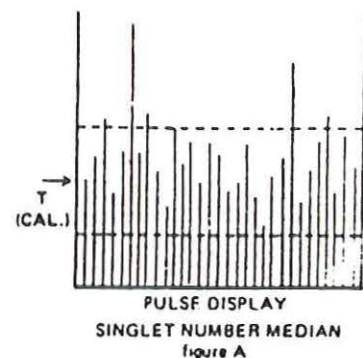
DO NOT USE AFTER MARCH, 1989

FOR USE WITH THE COULTER COUNTER®
MODELS MCC, TAIL/PCA, TA, ZM, ZB, ZBI, ZF,
FN, C.1000, P.64/P.128, D. INDUSTRIAL, B & A.

	100 μ m APERTURE	140 μ m APERTURE (MCC)
SINGLET NUMBER MEDIAN DIAMETER (figure A) (For use with MCC, ZM, ZB, ZBI, ZF, FN, D.Ind., B & A)	5.86 μ m	5.85 μ m

Other parameters:

NUMBER MODE (figure B) (For use with C.1000)	5.75 μ m	5.73 μ m
SIZE DISTRIBUTION (ZM/C. 1000) — see overleaf		
NUMBER PEAK SPLIT (figure C) (For use with TA series)	5.80 μ m	5.83 μ m
RECOMMENDED USAGE RATE 100 μ m Aperture, 3–4 drops per 50ml. 140 μ m (MCC) Aperture, 1 drop per 25ml.		



ASSAY VALUES have been determined in SOMATON® diluent prepared by Coulter Electronics Ltd., using COULTER COUNTER® Models TAIL/PCA, ZM and CHANNELYZER® C.1000 which are calibrated and checked with primary reference particles (1).

All particles have a coefficient of variation from their mean size of less than 13% by diameter.

CALIBRATION PARTICLE SUSPENSION: E.S.C.C. (Electronic Somatic Cell Counter) latex calibrator particles are suspended in an aqueous dispersant plus preservative, such that, at the recommended usage rate shown above, the correct concentration (approx. 5% coincidence) for calibration is obtained for direct application to the aperture. Details of the 'cold' (direct) COULTER COUNTER® model M.C.C. calibration technique can be obtained from Coulter Electronics Ltd or their distributors. There is no evidence of E.S.C.C. calibrator latex instability with time, as packed, but for maximum security it is recommended that the product be discarded after the expiry date given above.

SIZE CALIBRATION: The COULTER COUNTER® can be self-calibrated by measuring a suspension of a narrow size range of the material under investigation at a known concentration. From the immersed relative density (g/ml) of the material and from the total volume measured, the calibration factor can be calculated for the COULTER COUNTER® and sensing aperture in use (2). This procedure will remove any doubt concerning the accurate calibration with very irregular or conducting materials.

In practice it is more convenient to calibrate using narrow range particles which have already been sized by a variety of other techniques.

Extensive electron microscopy showed that an original reference latex produced by the Dow Chemical Co. (Midland, Michigan, U.S.A.) with a stated mean size of 3.49 μ m was in fact 3.40 μ m diameter (3,4). Harfield and Wood (1) confirmed this size with a COULTER COUNTER® MODEL B self-calibrated by the integration of data from a sample of alumina, and verified by reference to N.B.S. Standard Reference Material 1033 glass beads, and also by reference to a packed volume of latex particles.

Using aperture tubes and Coulter Counter® models (ZM, C1000, TAIL/PCA) correctly calibrated as above, the E.S.C.C. calibrator is sized by the relevant technique. The single distribution limits for the singlet number median size quoted above (figure A) are defined as one-half and three-halves of the median particle volume. This method of calibration is most convenient for single and dual threshold COULTER COUNTER® models. See instruction manuals for procedure.

A COULTER CHANNELYZER® may be more conveniently calibrated using the modal size of the particles; the 'number mode' (C1000); (figure B).

When calibrating a COULTER COUNTER® model TA, or TAIL without PCA, use the cal. meter method of splitting the number peak; with PCA split the number peak directly (figure C).

10ml

SOMACOUNT®
PRE-FIXED MILK CELL REFERENCE CONTROL FOR THE COULTER COUNTER®

Assay Sheet

BATCH 36 LOW

SEALED VIALS – DO NOT USE AFTER

31st MARCH, 1987

OPEN VIALS – DO NOT USE AFTER

7 DAYS

FOR USE WITH THE COULTER COUNTER®
MODELS M.C.C., ZM, ZF, ZB, ZBI, FN, F, D, IND, B, TAIL, TA & A.

	COULTER® MILK CELL COUNTER (M.C.C.)			OTHER MODELS		
PARAMETER	MEAN VALUE IN SOMATON® (± 1 S.D.)	EXPECTED RANGE A	EXPECTED RANGE B	MEAN VALUE IN SOMATON® (± 1 S.D.)	EXPECTED RANGE A	EXPECTED RANGE B
SOMATIC CELL COUNT* (x10 ⁶ /ml)	0.204 ± 0.011	0.188–0.220	0.176–0.232	0.226 ± 0.011	0.212–0.240	0.203–0.249
MODAL SIZE (µm)	Nominal 5.5µm – size dependent upon analytical method.					

EXPECTED RANGE A: expected range of values of average of 5 samplings from any one vial. (See notes 1 & 2).

EXPECTED RANGE B: expected range of values for any individual measurement. (See note 3).

SIZE VALUE quoted is after 1:100 dilution in SOMATON® and incubation for 10 minutes at 80°C. Expressed as micro-meters (µm) equivalent spherical diameter.

*SOMATIC CELL COUNT ABOVE 4.5µm DIAMETER. (Typical setting when using SOMATON® and SOMAFIX®). To determine assay values for any other diameter (d), as required by the particular fresh milk fixation process in routine use:

TABLE 2

d (µm)		x10 ⁶ /ml	d (µm)		x10 ⁶ /ml
4.0	ADD	0.013	4.6	SUBTRACT	0.002
4.2	ADD	0.007	4.8	SUBTRACT	0.005
4.4	ADD	0.005	5.0	SUBTRACT	0.008

Somacount® can provide a simple visual check of the size calibration. The modal size on the M.C.C. is directly measured in Somaton® at 80°C. Modal size on other models is measured post-incubation in Somaton® at ambient temperature.

Accurate size calibration of the threshold scale is best achieved via the modal or singlet number median sizes of the Coulter E.S.C.C. calibration latex (part number 9900526) using the recommended instrument calibration procedure.

ASSAY VALUES have been determined using COULTER COUNTER® Models M.C.C., ZM and CHANNELYZER® C.1000 which are calibrated and checked with primary reference particles (1). The electrolyte used is SOMATON®, a milk cell diluent prepared by Coulter Electronics Ltd.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

9942216 3/85

Bijlage 19 b
10ml

SOMACOUNT®

PRE-FIXED MILK CELL REFERENCE CONTROL FOR THE COULTER COUNTER®

Assay Sheet

BATCH 236 HIGH

SEALED VIALS – DO NOT USE AFTER 31st MARCH, 1987

OPEN VIALS – DO NOT USE AFTER 7 DAYS

FOR USE WITH THE COULTER COUNTER®
MODELS M.C.C., ZM, ZF, ZB, ZBI, FN, F, D, IND, B, TAIL, TA & A.

	COULTER® MILK CELL COUNTER (M.C.C.)			OTHER MODELS		
PARAMETER	MEAN VALUE IN SOMATON® (± I.S.D.)	EXPECTED RANGE A	EXPECTED RANGE B	MEAN VALUE IN SOMATON® (± I.S.D.)	EXPECTED RANGE A	EXPECTED RANGE B
SOMATIC CELL COUNT* (x10 ⁶ /ml)	1.375 ± 0.019	1.340-1.410	1.306-1.444	1.499 ± 0.019	1.468-1.530	1.442-1.556
MODAL SIZE (µm)	Nominal 5.5µm - size dependent upon analytical method.					

EXPECTED RANGE A: expected range of values of average of 5 samplings from any one vial. (See notes 1 & 2).

EXPECTED RANGE B: expected range of values for any individual measurement. (See note 3).

SIZE VALUE quoted is after 1:100 dilution in SOMATON® and incubation for 10 minutes at 80°C. Expressed as micro-meters (µm) equivalent spherical diameter.

*SOMATIC CELL COUNT ABOVE 4.5µm DIAMETER. (Typical setting when using SOMATON® and SOMAFIX®). To determine assay values for any other diameter (d), as required by the particular fresh milk fixation process in routine use:

TABLE 2

d (µm)		x10 ⁶ /mL	d (µm)		x10 ⁶ /mL
4.0	ADD	0.008	4.6	SUBTRACT	0.002
4.2	ADD	0.006	4.8	SUBTRACT	0.011
4.4	ADD	0.003	5.0	SUBTRACT	0.021

Somacount® can provide a simple visual check of the size calibration. The modal size on the M.C.C. is directly measured in Somaton® at 80°C. Modal size on other models is measured post-incubation in Somaton® at ambient temperature.

Accurate size calibration of the threshold scale is best achieved via the modal or singlet number median sizes of the Coulter E.S.C.C. calibration latex (part number 9900526) using the recommended instrument calibration procedure.

ASSAY VALUES have been determined using COULTER COUNTER® Models M.C.C., ZM and CHANNELYZER® C.1000 which are calibrated and checked with primary reference particles (1). The electrolyte used is SOMATON®, a milk cell diluent prepared by Coulter Electronics Ltd.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

9942216 3/85