

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens



Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

Francisco José Torreglosa Anaya

Ingeniero de Diseño
DENKEN SAS
fjtorreglosaa@gmail.com

Cristina Margarita Ruiz Correa

crcorales@sena.edu.co

Luis Ernesto Barrera

lebarrera@sena.edu.co

Ricardo Javier Del Valle Moreno

rjvalle@sena.edu.co

Ginette Isabel Chavarro Tulcán

isabelchavarro1989@gmail.com

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

RESUMEN

El presente documento tiene como propósito exponer el diseño de un prototipo de un microscopio de fluorescencia para detección de mastitis bovina. Inicialmente se hace una explicación de los fundamentos físicos de la microscopía de fluorescencia, luego se muestra la composición del prototipo diseñado. Para el estudio del caso, se hace una comparación entre el método cualitativo para la detección de la mastitis (California Mastitis Test) y el método cuantitativo propuesto (Conteo de Células Somáticas). Al final se hacen recomendaciones y conclusiones del caso de estudio basadas en los resultados obtenidos por medio de la técnica cualitativa y cuantitativa.

Palabra clave: Conteo de células somáticas, Mastitis Bovina, Microscopía de Fluorescencia.

ABSTRACT

The purpose of this paper is to present the design of a prototype of a fluorescence microscope for the detection of bovine mastitis. Initially, an explanation of the physical fundamentals of fluorescence microscopy is given, then the composition of the designed prototype is shown. For the case study, a comparison is made between the qualitative method for mastitis detection (California Mastitis Test) and the proposed quantitative method (Somatic Cell Count). At the end, recommendations and conclusions of the case study are made based on the results obtained through the qualitative and quantitative technique.

Keywords: Somatic Cell Count, Bovine Mastitis, Fluorescence Microscopy.

Introducción

El conteo de células somáticas en la leche es un indicador de medida para estimar el grado de mastitis de un ejemplar bovino, así como la calidad de la misma. Las células somáticas son mayormente células blancas que invaden las glándulas mamarias en respuesta a infecciones. Cuando están presentes en la leche sirven como un indicativo de condición inflamatoria. Un número elevado de las células somáticas puede ser la respuesta ante una infección ocasionada por bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, las cuales generan pérdidas en la producción de leche, así como disminución en su calidad. Por lo expuesto previamente, se debe monitorear de manera individual la mastitis en cada ejemplar de las granjas lecheras.

Existen varios métodos de detección de mastitis dentro de los cuales se destacan los

Introduction

The somatic cell count in milk is a measurement indicator for estimating the degree of mastitis in cattle, as well as the quality of the milk. Somatic cells are mostly white cells that invade the mammary glands in response to infections. When present in milk, they serve as an indication of an inflammatory condition. An elevated number of somatic cells may be the response to an infection caused by bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, which generate losses in milk production, as well as a decrease in milk quality. Therefore, mastitis should be monitored individually in each individual dairy farm.

There are several methods to detect mastitis, among which physical, chemical and biological methods stand out. Some of these methods are qualitative and others quantitative; those based on qualitative criteria have been

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

métodos físicos, químicos y los biológicos. Algunos de estos métodos son cualitativos y otros cuantitativos, se han descartado aquellos que se basan en criterios cualitativos ya que dependen de la experiencia de personal especializado, y no son fácilmente trazables en términos de información documental. Por otro lado, existen métodos cuantitativos que, si permiten tener un seguimiento a cada ejemplar, tales como los de citometría de flujo (método de laboratorio para determinar el número de células, el porcentaje de células vivas y ciertas características de las células, como el tamaño y la forma en una muestra de sangre, médula ósea u otro tejido) ya que ofrecen una enumeración rápida y precisa de las células somáticas.

Existen dos métodos eficaces para el conteo de células somáticas basados en la citometría de flujo. El primer método se enfoca en la fluorescencia (en este enfoque, las células somáticas se tiñen con un tinte fluorescente y luego se enumeran a medida que pasan a través de un rayo láser y se detectan sus señales de fluorescencia). El segundo método es el del principio de Coulter (en este enfoque se mide el número de células somáticas detectando cambios en la resistencia eléctrica de partículas suspendidas en un líquido conductor y que se hacen pasar a través de una pequeña abertura). Aunque ambas técnicas ofrecían resultados trazables y fiables, la alternativa que, en términos de portabilidad, costo, rapidez en la toma de la muestra, disponibilidad de componentes de repuesto, usabilidad, confiabilidad, trazabilidad y pruebas en sitio se ajustaba mejor a la necesidad de los productores de leche y personal especializado fue la del enfoque de fluorescencia.

1. Fundamento teórico

1.1. ¿Qué es la radiación electromagnética y como se propaga?

Para comprender conceptualmente que

discarded since they depend on the experience of specialized personnel and are not easily traceable in terms of documentary information. On the other hand, there are quantitative methods that do allow tracking of each specimen, such as flow cytometry (a laboratory method for determining the number of cells, the percentage of live cells and certain cell characteristics, such as size and shape in a sample of blood, bone marrow or other tissue), since they offer a rapid and accurate enumeration of somatic cells.

There are two effective methods for somatic cell counting based on flow cytometry. The first method focuses on fluorescence (in this approach, somatic cells are stained with a fluorescent dye and then enumerated as they pass through a laser beam and their fluorescence signals are detected). The second method is that of the Coulter principle (in this approach the number of somatic cells is measured by detecting changes in the electrical resistance of particles suspended in a conductive liquid and passed through a small opening). Although both techniques offered traceable and reliable results, the alternative that, in terms of portability, cost, speed of sampling, availability of spare components, usability, reliability, traceability and on-site testing best suited the need of dairy producers and specialized personnel was the fluorescence approach.

1. Fundamentals

1.1. What is electromagnetic radiation and how does it propagate?

To understand conceptually what electromagnetic radiation means, it is necessary to understand that radiation is nothing more than wave or particle energy propagating through space. In the same way, electromagnetism is the

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

significa la radiación electromagnética, es necesario entender que la radiación no es otra cosa que energía ondulatoria o en forma de partícula que se propaga a través del espacio. De la misma forma, el electromagnetismo es el estudio de los fenómenos eléctricos dentro de una sola teoría, siendo los campos electromagnéticos una descripción matemática de la influencia magnética de las corrientes eléctricas en los materiales magnéticos. De lo anterior, se puede decir que la radiación electromagnética es, la forma en como se propaga la energía a través de un campo electromagnético.

1.2. ¿Qué es la luz?

Para entender el concepto de luz, es necesario explicar primero ¿Qué es el espectro electromagnético? Siendo éste la distribución energética de todas las ondas electromagnéticas de acuerdo a su frecuencia (ondas de radio, infrarrojo, ultravioleta, rayos gamma, rayos x, microondas, la luz visible, entre otros). Dentro del espectro electromagnético hay una región comprendida entre los 380 y 780 nm, denominado espectro visible, la cual es la que el ojo humano es capaz de percibir. De esta forma se puede denominar luz, a la radiación electromagnética que puede ser percibida por los humanos.

1.3. ¿Qué es la emisión y la absorción de luz?

La emisión es un fenómeno que se produce en los átomos y ocurre cuando un electrón pasa de un estado basal a un estado excitado, al ser un nivel de energía inestable, éste retorna a su nivel mas bajo liberando un fotón, hay emisión de luz por calor (incandescencia) y por condiciones ambientales (luminiscencia o luz fría).

La absorción de luz, ocurre cuando la luz blanca incide sobre un cuerpo parcial o totalmente y una parte de espectro se transmite o refleja. El color de las sustancias, se debe a la longitud de

study of electrical phenomena within a single theory, being electromagnetic fields a mathematical description of the magnetic influence of electric currents on magnetic materials. From the above, it can be said that electromagnetic radiation is the way in which energy propagates through an electromagnetic field.

1.2. What is light?

To understand the concept of light, it is necessary to explain first what the electromagnetic spectrum is. This is the energy distribution of all electromagnetic waves according to their frequency (radio waves, infrared, ultraviolet, gamma rays, x-rays, microwaves, visible light, among others). Within the electromagnetic spectrum there is a region between 380 and 780 nm, called the visible spectrum, which is the one that the human eye is able to perceive. Thus, electromagnetic radiation that can be perceived by humans can be called light.

1.3. What is light emission and absorption?

Emission is a phenomenon that occurs in atoms and occurs when an electron passes from a basal state to an excited state, being an unstable energy level, it returns to its lowest level releasing a photon, there is emission of light by heat (incandescence) and by environmental conditions (luminescence or cold light).

Light absorption occurs when white light strikes a body partially or totally and a part of the spectrum is transmitted or reflected. The color of substances is due to the wavelength that could not be absorbed by the substance. Black bodies absorb all the light, while white bodies reflect all of it (although in practice no body is totally white).

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

onda que no pudo ser absorbida por la sustancia. Los cuerpos negros absorben toda la luz, mientras que los blancos reflejan todo (aunque en la práctica ningún cuerpo es totalmente blanco).

1.4. ¿Qué es la fluorescencia?

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia, en este proceso de emisión, las moléculas se excitan por absorber radiación electromagnética. Se ocasiona debido a la excitación de los átomos en un determinado material. La excitación inicial se genera por la absorción de energía desde una fuente de radiación incidente. Debido a que la reemisión se produce tan rápidamente, la fluorescencia cesa tan pronto como se retira la fuente de excitación, a diferencia de la fosforescencia, que persiste como un resplandor posterior.

1.5. ¿Qué es un microscopio de fluorescencia?

Un microscopio de fluorescencia es un aparato óptico convencional al que se le adapta un accesorio complementario de iluminación (adaptador de fluorescencia). El adaptador de fluorescencia permite realizar la observación óptica de la muestra de forma convencional, así como con contraste con fluorescencia. A diferencia de los microscopios convencionales que utilizan luz visible entre 400 y 700 nanómetros para iluminar y magnificar la imagen de una muestra, en el microscopio de fluorescencia, se usa una intensidad de luz mucho mayor y de menor energía, con una longitud de onda magnificada en lugar de la fuente de luz original.

2. Materiales y métodos

2.1. Componentes básicos del microscopio de fluorescencia (detección)

Los microscopios de fluorescencia utilizados en investigación utilizan un conjunto de

1.4. What is fluorescence?

Fluorescence is a type of luminescence, in this emission process, molecules are excited by absorbing electromagnetic radiation. It is caused by the excitation of atoms in a given material. The initial excitation is generated by the absorption of energy from a source of incident radiation. Because re-emission occurs so rapidly, fluorescence ceases as soon as the excitation source is removed, unlike phosphorescence, which persists as an afterglow.

1.5. What is a fluorescence microscope?

A fluorescence microscope is a conventional optical device to which a complementary illumination accessory (fluorescence adapter) is attached. The fluorescence adapter allows optical observation of the specimen in the conventional way as well as with fluorescence contrast. In contrast to conventional microscopes that use visible light between 400 and 700 nanometers to illuminate and magnify the image of a sample, the fluorescence microscope uses a much higher light intensity and lower energy, with a magnified wavelength instead of the original light source.

2. Materials and methods

2.1. Basic components of the fluorescence microscope (detection)

Fluorescence microscopes used in research use a set of optical filters: an excitation filter, which is tasked with transmitting only those wavelengths of illumination light that effectively excite a specific dye; an emission filter which is tasked with attenuating all of the light transmitted by the excitation filter and very effectively transmitting any fluorescence emitted

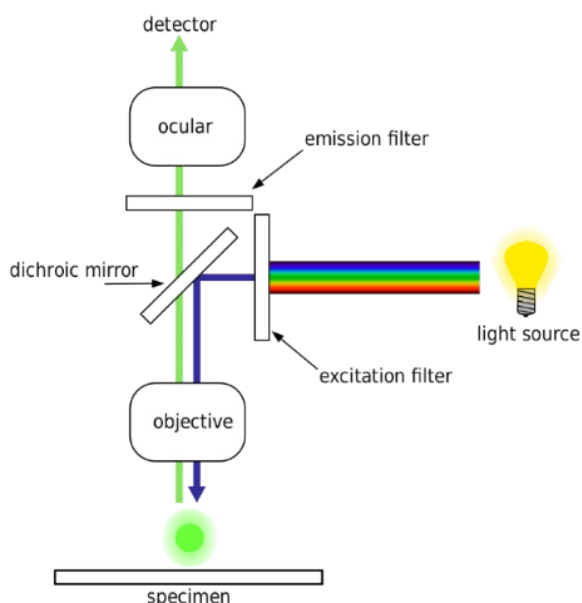
Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

filtros ópticos: un filtro de excitación, el cual se encarga transmitir sólo aquellas longitudes de onda de la luz de iluminación que excitan eficazmente un colorante específico; un filtro de emisión el cual tiene la tarea de atenuar toda de la luz transmitida por el filtro de excitación y transmitir muy eficazmente cualquier fluorescencia emitida por la muestra; y, por último, un divisor de haz dicróico el cual es una fina pieza de vidrio recubierto colocada en un ángulo de 45 grados con respecto a la trayectoria óptica del microscopio. Este revestimiento tiene la capacidad única de reflejar un color, la luz de excitación, pero transmitir otro color, la fluorescencia emitida. Estos filtros están ensamblados entre sí por medio de un cubo de filtros.

Figura 1

Composición de un microscopio de fluorescencia

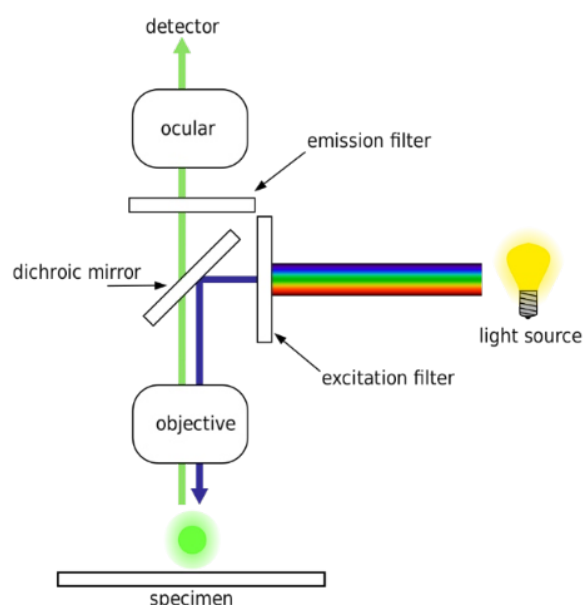


Otro componente es el lente objetivo cuya función es captar la luz procedente de la muestra y darle un aumento a la imagen capturada. La luz se emite mediante una fuente, la cual puede ser un arreglo de leds con potenciómetro, y la cual se condensa mediante un lente condensador. La imagen final de la muestra se captura mediante una cámara para microscopio o por medio de un ocular.

by the sample; and finally, a dichroic beam splitter which is a thin piece of coated glass placed at a 45 degree angle to the optical path of the microscope. This coating has the unique ability to reflect one color, the excitation light, but transmit another color, the emitted fluorescence. These filters are assembled together by means of a filter cube.

Figure 1

Composition of a fluorescence microscope



Another component is the objective lens whose function is to capture the light coming from the sample and magnify the captured image. The light is emitted by a source, which can be an array of LEDs with a potentiometer, and condensed by a condenser lens. The final image of the sample is captured by a microscope camera or through an eyepiece.

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

Figura 2

Prototipo diseñado



Figure 2

Prototype



2.2. Componentes básicos de la muestra (detección)

La muestra debe ubicarse dentro de una cámara de conteo y se debe preparar con partículas fluorescentes y con un kit de trazador celular de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), ya que dicho colorante fluorescente CFDA permite un transporte pasivo a través de las membranas celulares y su fluorescencia es mayor dentro del citoplasma. Por otro lado, la muestra debe tener una preparación biológica previa con antibióticos para eliminar aquel cualquier agente distinto a las células somáticas.

2.3. Componentes básicos de captura, procesamiento y transmisión de datos (computo)

El microscopio diseñado tiene dos componentes de hardware importantes, el primero de ellos es una tarjeta Raspberry Pi 4 Modelo B. Esta microcomputadora tiene instalado Raspbian como sistema operativo, así mismo cuenta con la librería OpenCV para todo el tratamiento de imágenes. El segundo componente es una pantalla HMI táctil con teclado inalámbrico para visualizar

2.2 Basic sample (detection) components

The sample must be placed inside a counting chamber and prepared with fluorescent particles and a carboxyfluorescein diacetate (CFDA) cell tracer kit, since this fluorescent CFDA dye allows a passive transport through cell membranes and its fluorescence is higher inside the cytoplasm. On the other hand, the sample must have a previous biological preparation with antibiotics to eliminate any agent other than somatic cells.

2.3. Basic components of data capture, processing and transmission (computation)

The designed microscope has two important hardware components, the first one is a Raspberry Pi 4 Model B board. This microcomputer has Raspbian installed as the operating system, as well as the OpenCV library for all image processing. The second component is an HMI touch screen with wireless keyboard to visualize the images captured by an 18 MP USB 3.0 live video microscope digital camera located inside the microscope itself.

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

las imágenes captadas por una cámara digital de microscopio de vídeo en vivo USB 3.0 de 18 MP ubicada dentro del microscopio en sí.

De la misma forma, se tienen dos componentes de software importantes. Como las imágenes son capturadas por la cámara, estas deben ser analizadas mediante un software desarrollado con Python y la librería de visión artificial OpenCV. La información capturada es guardada localmente (en el disco duro de la Raspberry Pi), y luego pueden ser exportadas a una base de datos de Microsoft SQL Server alojada en Azure. La información puede ser administrada posteriormente mediante una aplicación web desarrollada en .NET Core C#. De esta forma, el usuario puede ver la información de la cada uno de sus ejemplares sin necesidad de esperar por los resultados tomados en campo.

2.4. Captura de la imagen

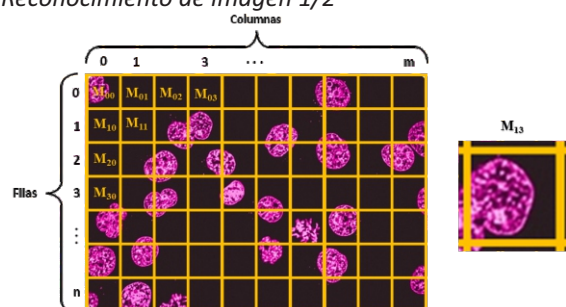
Las imágenes capturadas por la cámara son convertidas en matrices, donde el número de columnas y filas corresponden a la resolución de la cámara o a la que se le indique mediante el algoritmo de Python. La forma de la matriz sería de la forma:

$$M = \begin{bmatrix} M_{00} & \cdots & M_{0m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ M_{n0} & \cdots & M_{nm} \end{bmatrix}$$

Una vez se tiene la matriz, cada pixel o cuadrícula de la imagen, corresponde a un elemento de la matriz de n por m elementos, tal como se muestra en la imagen.

Figura 3

Reconocimiento de imagen 1/2



Likewise, there are two important software components. As the images are captured by the camera, they must be analyzed using software developed with Python and the OpenCV machine vision library. The captured information is stored locally (on the Raspberry Pi's hard drive), and then they can be exported to a Microsoft SQL Server database hosted in Azure. The information can then be further managed through a web application developed in .NET Core C#. In this way, the user can view the information of each of its specimens without having to wait for the results taken in the field.

2.4. Image capture

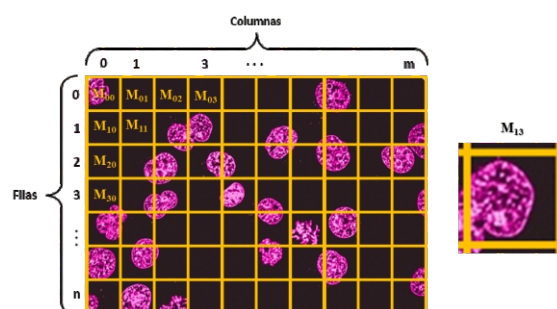
The images captured by the camera are converted into matrices, where the number of columns and rows correspond to the resolution of the camera or as specified by the Python algorithm. The form of the matrix would be of the form:

$$M = \begin{bmatrix} M_{00} & \cdots & M_{0m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ M_{n0} & \cdots & M_{nm} \end{bmatrix}$$

Once you have the matrix, each pixel or grid of the image corresponds to an element of the matrix of n by m elements, as shown in the image.

Figure 3

Image recognition 1/2



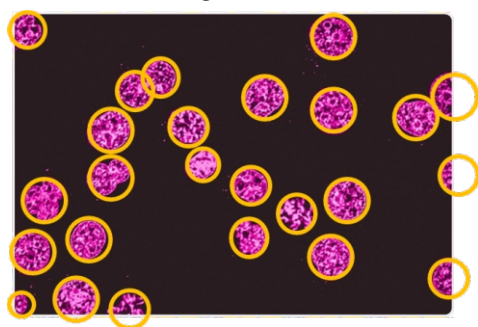
Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

Luego de hacer la división en cuadrículas de la imagen, se pueden agrupar los elementos que compartan características similares. Para el caso de la muestra analizada, se agruparán aquellos elementos que se exciten al pasar la luz procedente del cubo de filtros. De lo anterior se obtendrá un estimativo del total de células somáticas en la muestra (cantidad elementos agrupados). Al conocerse el área en milímetros cuadrados de la cámara de conteo (0.00025mm^2) se puede determinar la concentración de células en la muestra, tal como se muestra en la imagen.

Figura 4

Reconocimiento de imagen 2/2

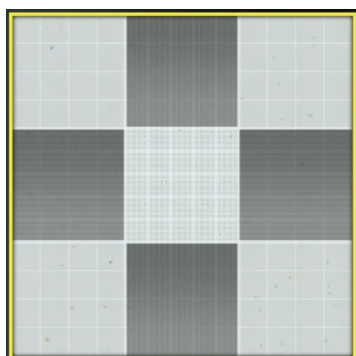


2.5. Recuento de células

Para el conteo, se debe tener en cuenta desplazar la muestra tal como se hace en las cámaras de conteo utilizados en los Hemocitómetros ($9 \text{ recuadros} \times 10^{-4} \text{ mL}$ en suspensión). Para ello se cuentan las células en los recuadros de las esquinas y en el del centro.

Figura 5

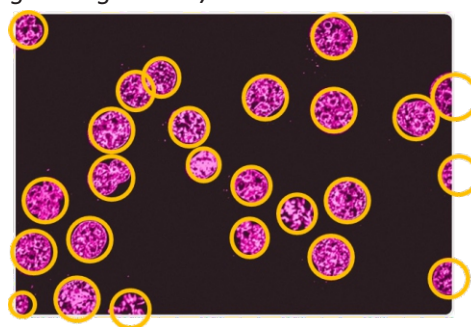
Cuadrículas de cámara de conteo



After dividing the image into grids, the elements that share similar characteristics can be grouped. In the case of the analyzed sample, those elements that are excited by the light coming from the filter cube will be grouped. From this, an estimate of the total number of somatic cells in the sample (number of grouped elements) will be obtained. Knowing the area in square millimeters of the counting chamber (0.00025 mm^2), the concentration of cells in the sample can be determined, as shown in the image below.

Figure 4

Image recognition 2/2

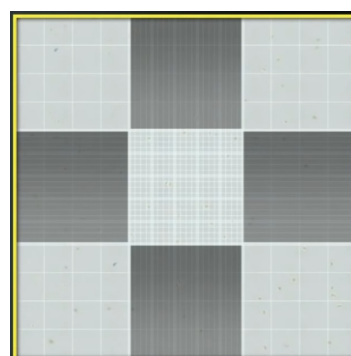


2.5. Cell counting

For counting, the sample should be displaced as in the counting chambers used in hemocytometers ($9 \text{ cells} \times 10^{-4} \text{ mL}$ in suspension). For this purpose, the cells are counted in the corner boxes and in the center box.

Figure 5

Counting chamber grids



Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

2.6. Relación entre el conteo de células somáticas y el CMT

La Figura 5 muestra la relación que hay entre el Test de California para Mastitis (CMT) y el conteo de células somáticas. Cuando la concentración es inferior a 200.000 células somáticas por mililitro, no se presentarán grumos en la paleta de muestreo que evidencien que el espécimen tiene mastitis.

Figura 6
Relación entre CMT y SCC

CMT	CCS/ml
-	0-200.000
Trazas	150.000-500.000
1	400.000-1.500.000
2	800.000-5.000.000
3	mayor que 5.000.000

2.7. Transmisión de los datos

Se desarrolló una aplicación web utilizando el Framework Django, el propósito es enviar los datos capturados por la cámara, transformarlos en objetos Json y guardarlos localmente en la Raspberry Pi. Luego cuando el usuario tenga acceso a internet, los objetos Json se convierten en consultas SQL y se insertan en la base de datos de Microsoft SQL Server. La explicación del detalle, arquitectura y patrones de diseño utilizados en el desarrollo de esta aplicación están por fuera del alcance de este documento, ya que el objetivo es analizar los resultados arrojados por el microscopio en sí, así como las correspondientes validaciones de los mismos.

2.8. Administración de los datos

Como se expuso previamente los datos son administrados mediante una aplicación web desarrollada con .Net Core. Se tiene una base de datos relacional de Microsoft SQL Server. El diseño

2.6. Relationship between somatic cell count and CMT

Figure 6 shows the relationship between the California Mastitis Test (CMT) and the somatic cell count. When the concentration is less than 200,000 somatic cells per milliliter, there will be no lumps on the sampling paddle to indicate that the specimen has mastitis.

Figure 6
Relation between CMT y SCC

CMT	CCS/ml
-	0-200.000
Trazas	150.000-500.000
1	400.000-1.500.000
2	800.000-5.000.000
3	mayor que 5.000.000

2.7. Data transmission

A web application was developed using the Django Framework. The purpose is to send the data captured by the camera, transform them into Json objects and store them locally on the Raspberry Pi. Then when the user has access to the internet, the Json objects are converted into SQL queries and inserted into the Microsoft SQL Server database. The explanation of the detail, architecture and design patterns used in the development of this application are beyond the scope of this document, since the objective is to analyze the results yielded by the microscope itself, as well as the corresponding validations of the results.

2.8. Data management

As previously mentioned, the data are managed by means of a web application developed with .Net Core. A Microsoft SQL Server relational database is used. The application was designed using MCV, Repository

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

de la aplicación se realizó utilizando los patrones de diseño MCV, Repositorio y Multicapa. Lo anterior se hizo de esa forma para poder tener la lógica de negocios, la aplicación (web Api) y la capa de persistencia independientes. El Frontend se desarrolló utilizando React-Hooks, y algunas validaciones utilizando Json Web Token. La explicación del software de administración está fuera del alcance del presente documento ya que, como se expuso previamente, el objetivo es analizar los resultados arrojados por el microscopio en sí, así como las correspondientes validaciones de los mismos.

2.9.Pruebas

Las pruebas se realizaron en el Centro Agropecuario y de Biotecnología el Porvenir – SENA Regional Córdoba. Se hicieron pruebas mediante el Test California y se tomaron muestras para realizar pruebas con el prototipo.

Figura 7
Prueba en campo de CMT



3.Resultados

3.1.Pruebas por métodos convencionales

De los especímenes analizados se detectaron grumos en solo una de las muestras analizadas, la muestra fue extraída del espécimen

and Multilayer design patterns. This was done in order to have the business logic, the application (web Api) and the persistence layer independent. The Frontend was developed using React-Hooks, and some validations using Json Web Token. The explanation of the administration software is out of the scope of this document since, as previously exposed, the objective is to analyze the results yielded by the microscope itself, as well as the corresponding validations of the same.

2.9. Tests

The tests were carried out at the Centro Agropecuario y de Biotecnología el Porvenir - SENA Regional Córdoba. Tests were carried out using the California Test and samples were taken to test the prototype.

Figure 7
CMT field test



3. Results

3.1. Tests by conventional methods

Of the specimens analyzed, lumps were detected in only one of the samples analyzed, the sample was extracted from the specimen with code 410, sodium lauryl sulfate and bromocresol purpura were used as reagent. The method used was the California Mastitis Test

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

con el código 410 se utilizó Lauril sulfato de sodio y púrpura de bromocresol como reactivo. El método utilizado fue el California Mastitis Test (CMT). Para ellos se utilizó una paleta donde se depositaba la muestra de cada uno de los pezones del espécimen, luego se le agregó el reactivo a cada contenedor, se hicieron movimientos giratorios con la paleta, en ninguno de los casos se formó gel, aunque hubo una ligera precipitación en dos contenedores. No obstante, desaparecieron al agitar la paleta por lo que puede cualitativamente decirse que el espécimen no presentaba mastitis en ningún grado. En estos casos, se suele comparar ese valor con el del otro pezón. Y las células pueden ser inferiores a 750.000 ya que se puede considerar que la mama está infectada.

Figura 8

Adición de reactivo CMT



Es importante destacar, que, aunque no haya infección siempre habrá presencia de células somáticas en la leche, lo que determina el nivel de mastitis se relaciona con la cantidad de células presentes en la muestra.

Durante el test realizado la conclusión general fue que el espécimen no presentaba mastitis, aunque tenía un poco afectada una de sus mamas.

(CMT). A paddle was used to deposit the sample from each teat of the specimen, then the reagent was added to each container, rotating movements were made with the paddle, in none of the cases gel was formed, although there was a slight precipitation in two containers. However, they disappeared when the paddle was shaken, so that qualitatively it can be said that the specimen did not present mastitis to any degree. In such cases, that value is usually compared with that of the other teat. And the cells may be less than 750,000 as the breast may be considered to be infected.

Figure 8

Addition of CMT reagent



It is important to point out that, even if there is no infection, there will always be somatic cells in the milk, and what determines the level of mastitis is related to the number of cells present in the sample.

During the test performed, the general conclusion was that the specimen did not present mastitis, although one of its breasts was slightly affected.

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

Figura 9

Resultado del CMT



Figure 9

CMT result

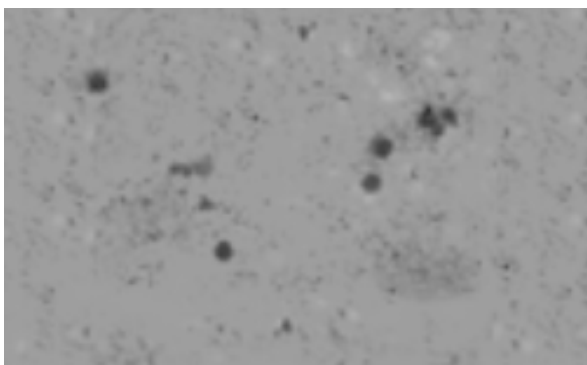


3.2. Pruebas con prototipo

La imagen básica capturada con el prototipo muestra las células somáticas resaltadas en la leche luego de ser tratadas por el software para transformar la imagen en escala de grises.

Figura 10

Imagen capturada por prototipo

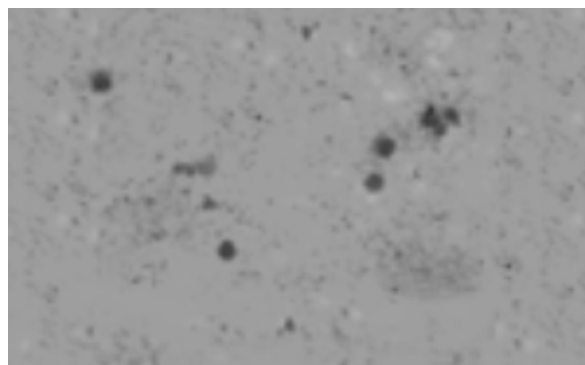


3.2. Prototype testing

The basic image captured with the prototype shows the somatic cells highlighted in the milk after being treated by the software to transform the image into grayscale.

Figure 10

Image captured by prototype



A la imagen luego se le aplica una mascara para que las células, impurezas, entre otros se conviertan en áreas blancas dentro de la imagen transformada.

Figura 11

Imagen transformada por el prototipo

The image is then masked so that cells, impurities, etc. become white areas within the transformed image.

Figure 11

Image transformed by the prototype

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens



Una vez se le ha aplicado la mascara a la imagen, se realiza un agrupamiento de acuerdo al área en pixeles cuadrados para cada objeto detectado en la imagen. Aquellas regiones cuya área sea igual o superior al valor del área en pixeles establecido en el algoritmo base, se contabiliza como una célula somática.

Once the mask has been applied to the image, a grouping is performed according to the area in square pixels for each object detected in the image. Those regions whose area is equal to or greater than the pixel area value established in the base algorithm are counted as a somatic cell.

Inicialmente se cuentan todas las células viables, las cuales se muestran en verde.

Initially all viable cells are counted, which are shown in green.

Figura 12
Reconocimiento de células viables

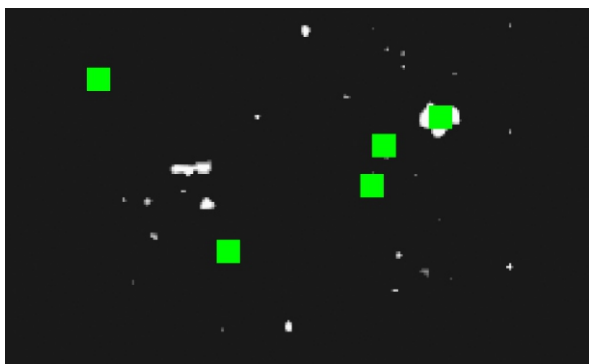
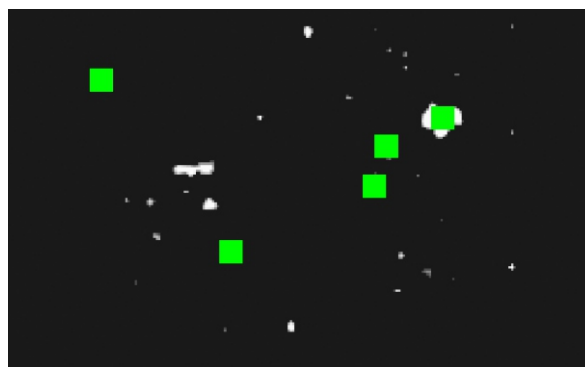


Figure 12
Viable cell recognition



Luego se cuentan las células inviables (aquellas que no pasaron los criterios establecidos previamente). Éstas se resaltan en rojo.

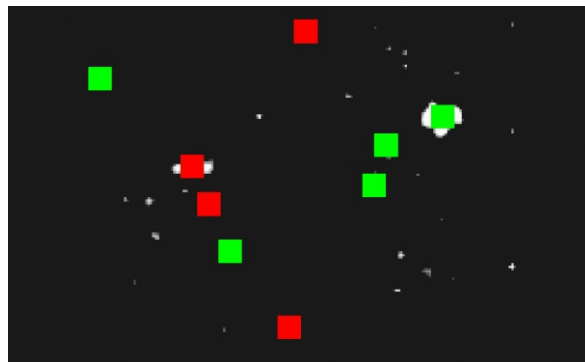
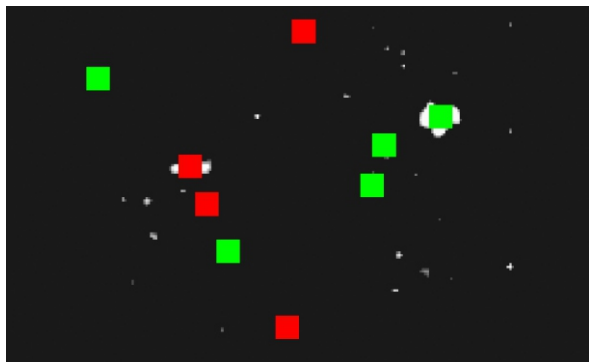
The nonviable cells (those that did not pass the previously established criteria) are then counted. These are highlighted in red.

Figure 13
Non-viable cell recognition

Figura 13
Reconocimiento de células no viables

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens



Una vez se determinó la cantidad de células somáticas y no viables se calculan los valores de porcentaje de células viables, promedio de células por recuadro, factor de dilución y concentración de células somáticas en la leche.

Para lo anterior es necesario calcular el número total de células viables y no viables en los recuadros de las esquinas y en el del centro (el software se encarga de hacer el conteo como se expuso previamente).

Total, de células viables: 32

Total, de células no viables: 19

3.2.1. Porcentaje de células viables

El porcentaje de células viables se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viables} = \frac{100 * \#c. \text{ viables}}{\#c. \text{ viables} + \#c. \text{ no viables}}$$

$$\% \text{ Viables} = 100 * \frac{32}{51} = 62.7\%$$

3.2.2. Promedio de células viables por recuadro

El porcentaje de células viables por recuadro se calcula dividiendo el total de células viables sobre el número de recuadros que de acuerdo al método son 5.

Once the number of somatic and non-viable cells has been determined, the values of percentage of viable cells, average number of cells per box, dilution factor and concentration of somatic cells in the milk are calculated.

For the above it is necessary to calculate the total number of viable and non-viable cells in the corner boxes and in the center box (the software takes care of the counting as previously explained).

Total, viable cells: 32

Total, non-viable cells: 19

3.2.1. Percentage of viable cells

The percentage of viable cells was calculated as follows:

$$\% \text{ Viable} = \frac{100 * \# \text{viable cells}}{\# \text{viable cells} + \# \text{non viable cells}}$$

$$\% \text{ Viable} = 100 * \frac{32}{51} = 62.7\%$$

3.2.2. Average number of viable cells per box

The percentage of viable cells per box is calculated by dividing the total number of viable cells by the number of boxes, which according to the method is 5.

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

$$\text{Promedio c. viables} = \frac{\#c. viables}{5}$$

$$\text{Promedio c. viables} = \frac{32}{5} = 6.4$$

$$\text{Average viable cells} = \frac{\#viable cells}{5}$$

$$\text{Average viables cells} = \frac{32}{5} = 6.4$$

3.2.3. Factor de dilución

El factor de dilución se determina con el volumen final de la muestra y el volumen de la muestra original, como se agregaron 100 µL de de Trypan Blue a la muestra original de 100 µL el volumen final es de 200 µL. De esta forma el factor de dilución se obtiene dividiendo el volumen final sobre el volumen de las células. Siendo este 2.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{200 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} = 2$$

3.2.4. Concentración

La concentración se obtiene multiplicando el promedio de células viables por recuadro por el factor de dilución por 10^4 .

$$\text{Concentración} = 2 * 10000 * 6.4 = 128.000$$

Lo anterior da como resultado 128.000 células somáticas por mililitro de leche, lo cual indica que el espécimen no presenta mastitis en ningún grado.

4. Discusión

Los resultados obtenidos por la prueba cualitativa y cuantitativa arrojaron el mismo resultado. No obstante, durante el ejercicio realizado se evidenció que una de las mamas del espécimen del cual se tomaron las muestras estaba un poco afectada (ya que había tenido crías recientemente). Se esperaba un resultado inferior a 50.000 cs/mL, y se obtuvo uno superior tal vez relacionado con la afectación de uno de los pezones del espécimen.

3.2.3. Dilution Factor

The dilution factor is determined by the final volume of the sample and the volume of the original sample, as 100 µL of Trypan Blue was added to the original sample of 100 µL, the final volume is 200 µL. Thus, the dilution factor is obtained by dividing the final volume by the volume of cells. This is 2.

$$\text{Dilution Factor} = \frac{200 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} = 2$$

3.2.4. Concentration

The concentration is obtained by multiplying the average number of viable cells per box by the dilution factor per 10^4 .

$$\text{Concentration} = 2 * 10000 * 6.4 = 128.000$$

This results in 128,000 somatic cells per milliliter of milk, which indicates that the specimen does not present mastitis to any degree.

4. Discussion

The results obtained by the qualitative and quantitative test yielded the same result. However, during the exercise it became evident that one of the breasts of the specimen from which the samples were taken was slightly affected (since it had recently had offspring). A result lower than 50,000 cs/mL was expected, and a higher result was obtained, perhaps related to the involvement of one of the specimen's teats.

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

Por otro lado, el porcentaje de células no viables es muy alto (37.3%), lo cual deriva en un nivel de imprecisión relativamente elevado. Una explicación puede ser que, durante la manipulación de la muestra, esta no se hizo como se hubiera realizado en un laboratorio con todos los implementos necesarios para la microscopía. De la misma forma, el algoritmo desarrollado no usó una función de reconocimiento de contornos como Canny, en este sentido, no se podía asegurar que una determinada célula descartada era una célula o una impureza, así como tampoco podía saberse si había dos o tres células juntas, ya que se tomaba como un solo elemento.

Aunque se obtuvo una medida de concentración 128.000 cs/mL, la medida no da el nivel de precisión deseado (nivel alto de células descartadas). La resolución del prototipo es fija, por lo cual debe moverse manualmente la cámara de conteo para posicionar la imagen capturada por el detector en otro recuadro de la cámara de conteo. Lo anterior puede derivar en lecturas no fiables si no se hace correctamente.

5.Conclusiones

Aunque se obtuvo una medida de concentración de células somáticas por mL, el porcentaje de células viables es relativamente bajo 62.7%, lo cual da un nivel de precisión igualmente bajo. Lo anterior puede explicarse por: la manipulación no adecuada y el tiempo en que las muestras estuvieron expuestas a la temperatura ambiente de Montería (30 °C), y también por el algoritmo de reconocimiento de patrones utilizado por la unidad de cómputo, el cual no dispone de una función de reconocimiento de contornos, de esta forma una impureza puede con una célula no viable, o dejar de contar celular que comparten un mismo espacio.

On the other hand, the percentage of non-viable cells is very high (37.3%), which results in a relatively high level of imprecision. One explanation may be that, during sample manipulation, the sample was not handled as it would have been in a laboratory with all the necessary microscopy equipment. In the same way, the algorithm developed did not use a contour recognition function like Canny; in this sense, it could not be assured that a particular cell discarded was a cell or an impurity, nor could it be known if there were two or three cells together, since it was taken as a single element.

Although a concentration measurement of 128,000 cs/mL was obtained, the measurement does not give the desired level of precision (high level of discarded cells). The resolution of the prototype is fixed, so the counting chamber must be moved manually to position the image captured by the detector in another frame of the counting chamber. This can result in unreliable readings if not done correctly.

5.Conclusions

Although a measure of somatic cell concentration per mL was obtained, the percentage of viable cells is relatively low 62.7%, which gives an equally low level of precision. This can be explained by: inadequate handling and the time the samples were exposed to the ambient temperature of Montería (30 °C), and also by the pattern recognition algorithm used by the computer unit, which does not have a contour recognition function, so that an impurity can be a non-viable cell, or fail to count cells that share the same space.

It is recommended to have an alignment and calibration mechanism, such as a rack and pinion, since in the current prototype the alignment of lenses and filters is done manually,

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

Se recomienda disponer de un mecanismo de alineación y calibración, como puede ser una cremallera con un piñón, ya que en el prototipo actual el alineamiento de los lentes y filtros se hace de forma manual, así como la calibración. De igual forma, la resolución de la imagen es algo a mejorar también, ya hubo que mover manualmente la cámara de conteo para capturar las muestras en todos los recuadros.

Se puede apreciar que la imagen es fija, y se aumenta por medio de la unidad de cómputo, es un futuro rediseño se recomienda utilizar mas de un lente objetivo ya que de esta forma se puede alejar o acercar la muestra y por tanto contar mas eficientemente las células somáticas, inclusive hacer el conteo con una imagen única.

Si bien el resultado obtenido, puede tomarse como una buena estimación inicial para detectar si un espécimen tiene mastitis subclínica o no, es necesario disminuir el numero de células no viables, así como encontrar un mecanismo que permita alejar o acercar el objetivo a las muestras, así como mover las muestras sobre el plano donde se están viendo. Para hacer lo anterior, tal vez sea necesario replantear la ubicación de los filtros, incluso evitar usar un cubo de filtros, así como un espejo dicróico, e iluminar la muestra con luz led.

6. Referencias bibliográficas

Kim, B., Lee, Y. J., Park, J. G., Yoo, D., Hahn, Y. K., & Choi, S. (2017). A portable somatic cell counter based on a multi-functional counting chamber and a miniaturized fluorescence microscope. *Talanta*, 170, 238-243.

García, G. B., Suarez, O. D., Aranda, J. L. E., Tercero, J. S., Gracia, I. S., & Enano, N. V. (2015). *Learning image processing with OpenCV*. Birmingham: Packt Publishing.

as well as the calibration. Likewise, the image resolution is something to improve as well, since the counting camera had to be moved manually to capture the samples in all the frames.

The image is fixed and magnified by means of the computer unit. In a future redesign, it is recommended to use more than one objective lens, since in this way the sample can be zoomed in or out and therefore count the somatic cells more efficiently, and even count with a single image.

Although the result obtained can be taken as a good initial estimate to detect whether a specimen has subclinical mastitis or not, it is necessary to reduce the number of non-viable cells, as well as to find a mechanism that allows moving the objective lens closer or further away from the samples, as well as moving the samples on the plane where they are being viewed. To do the above, it may be necessary to rethink the location of the filters, including avoiding using a filter cube, as well as a dichroic mirror, and illuminating the sample with LED light.

6. References

Kim, B., Lee, Y. J., Park, J. G., Yoo, D., Hahn, Y. K., & Choi, S. (2017). A portable somatic cell counter based on a multi-functional counting chamber and a miniaturized fluorescence microscope. *Talanta*, 170, 238-243.

García, G. B., Suarez, O. D., Aranda, J. L. E., Tercero, J. S., Gracia, I. S., & Enano, N. V. (2015). *Learning image processing with OpenCV*. Birmingham: Packt Publishing.

Joshi, P., Escrivá, D. M., & Godoy, V. (2016). *OpenCV By Example*. Packt Publishing Ltd.

Diseño de un microscopio de fluorescencia para conteo de células somáticas en ejemplares bovinos

Design of a fluorescence microscope for somatic cell counting in bovine specimens

Joshi, P., Escrivá, D. M., & Godoy, V. (2016). OpenCV By Example. Packt Publishing Ltd.

7.Agradecimientos

Agradecemos al Centro Agropecuario Y Biotecnología El Porvenir SENA Regional Córdoba por facilitar las muestras necesarias para probar el prototipo diseñado, así como por prestar las instalaciones y los ejemplares necesarios para las mismas. De igual forma, expresamos nuestro agradecimiento a Colombia Productiva por permitir el desarrollo de este estudio y liberar los recursos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

7.Acknowledgments

We thank the Centro Agropecuario Y Biotecnología El Porvenir SENA Regional Córdoba for providing the samples necessary to test the prototype designed, as well as for lending the facilities and the specimens necessary for the same. Likewise, we express our gratitude to Colombia Productiva for allowing the development of this study and releasing the