

基于微流控芯片的牛乳体细胞均匀分布与计数方法研究

周 围¹, 王明慧¹, 安广鑫¹, 郑泓帆¹, 李星宇¹, 孟庆宜^{2*}

(1. 河北工业大学 机械工程学院, 天津 300401;

2. 天津中德应用技术大学 能源工程学院, 天津 300350)

摘 要: 生鲜牛乳中的体细胞数量是判断奶牛是否患有乳房炎的重要依据。针对牛乳在取样过程中细胞贴壁沉降等原因造成体细胞分布不均匀, 从而导致体细胞计数不具有代表性的问题, 文中提出了一种基于九宫格型微流控芯片使体细胞分布均匀并提升计数准确率的方法。首先在 Comsol 仿真的基础上制备了九宫格型微流控芯片, 提高了细胞分布的均匀度。其次研制了集染色、搅拌于一体的负压进样系统, 保证在进样过程中持续保持体细胞分布的均匀度和不受空气的污染。并配合芯片研制了微型显微成像系统, 对芯片的九个观测腔拍摄图像。最后通过图像处理的方法对体细胞进行计数, 并判断奶牛乳房的健康状况。实验结果表明, 每组九张图像体细胞数量的标准差系数均小于等于 1.61%, 系统计数准确率可达到 99.23%。该研究方法为奶牛乳房炎的检测与预防奠定了基础。

关键词: 奶牛乳房炎; 微流控芯片; 微型显微镜系统; 图像处理; 细胞计数; 标准差系数

中图分类号: TH89 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA20230265

0 引 言

生鲜牛乳的体细胞数量 (Somatic Cell Count, SCC) 是指每毫升牛乳中所有细胞的总和^[1]。当奶牛的泌乳系统被细菌感染时, 乳腺就会分泌大量的白细胞以对抗细菌的入侵, 此时牛乳中的体细胞数量就会显著增加, 因此, 体细胞数量可以作为判断奶牛是否患有乳房炎的依据。通过检测生鲜牛乳中体细胞的数量找出患有乳房炎的奶牛, 尽早地进行隔离治疗, 可以有效避免细菌在牛群中的传播, 减少因此而带来的经济损失。

目前, 许多学者在牛乳体细胞计数领域开展了研究并且开发出不同的计数方法。Swinkels 等人^[2] 基于加州乳腺炎测试法检测体细胞数量, 使用两个不同的阈值来确定奶牛乳房炎可能的感染状态。Farschtschi 等^[3] 使用流式细胞仪在血液和牛乳中建立高分辨率差异细胞计数, 在三个主要的免疫细胞群中检测到十个亚群, 并确定它们的生存能力。Chengolova 等^[4] 使用荧光自动细胞计数器 Lactoscan SCC 进行牛乳体细

胞计数和中性粒细胞检测, 与流式细胞仪计数结果之间的相关性为 0.98。Kasai 等^[5] 提出使用扫描电学显微镜体细胞计数作为校准曲线, 通过奶牛呼吸活动估计了牛乳中体细胞的数量。Gao 等^[6] 基于视觉测量算法, 开发了体细胞计数仪器, 通过与丹麦 FossMatic 5000 的计数结果比较, 验证了仪器的适用性。Kasai 等^[7] 应用模糊聚类方法和图像处理技术, 提出了一种水牛乳体细胞自动计数方法, 与常规计数方法所得结果具有一致性。Düven 等^[8] 基于微流体平台对荧光标记后的生鲜牛乳进行体细胞计数, 计数准确率可以达到 80% 以上。

上述计数方法取得了相当大的进展, 但是相较而言存在以下问题: 一些直接对体细胞数量进行检测的方法, 比如流式细胞检测法等。这些方法成本高, 检测时间长, 不能保证牛乳的鲜活性, 而且抗干扰性差, 只能在实验室环境下应用, 不能进行现场检测。一些通过取出少量样品, 以样品中体细胞数量间接计算出整体体细胞数量的检测方法, 比如荧光显微计数法,

收稿日期: 2023-05-04; 修订日期: 2023-06-12

基金项目: 河北省自然科学基金面上项目 (B2021202038)

作者简介: 周围, 男, 副教授, 博士, 主要从事微纳技术及仪器仪表方面的研究。

通讯作者: 孟庆宜, 女, 副教授, 硕士, 主要从事自动化控制方面的研究。

图像检测法等。这些方法往往忽视了取出的样品因为细胞粘附性、重力等原因造成的细胞沉降、贴壁等问题,从而使体细胞在样品溶液分布不均匀,导致取出的样品不具有代表性。因此,通过这种方法计算出整体的体细胞数量与其真实值之间较大的误差,导致对奶牛乳房的健康状况做出错误的判断。为了解决牛乳体细胞计数领域的上述问题,文中提出了一种基于微流控芯片与显微成像系统获取牛乳体细胞均匀分布的方法。

1 原理

1.1 细胞分布均匀度仿真

为了使取出的样品更具代表性,体细胞应均匀分布于观察腔内。文中利用微流控芯片代替传统的载玻片作为观察牛乳体细胞的平台。体细胞由于传统载玻片的边缘效应会聚集在载玻片中央,导致细胞粘附。使用载玻片对操作人员的要求很高,当覆盖层被盖玻片覆盖时,由于处理不当可能会引入气泡。微流控芯片则可以利用压力泵将溶液直接注入芯片内部,并在芯片内部产生层流,没有边缘效应也不会产生气泡。此外,注射操作简单无需培训即可完成。

为提高计数精度,取九张图片计数结果的平均值作为最终的体细胞数量。为保证在一个观测腔内拍摄九张不同区域的图像,观测腔面积必须较大。根据 PDMS 的特性,如果观测腔面积过大,则会导致观测腔中心塌陷,所以观测腔面积过大无法保证体细胞分布的均匀性。因此,提出了九宫格型的微流控芯片结构^[9]。在每个观测腔上方直接拍摄一张图像,以确保体细胞的均匀分布,同时确保拍摄区域不重复。

通过仿真粒子在观测腔内的分布状况来验证牛乳体细胞在微流控芯片观测腔内的分布状况。为了使粒子在微流控芯片的九个观测腔内分布最为均匀,使用 Comsol 仿真观测腔直径与流道宽度在不同比例下粒子的分布情况,仿真过程中使观测腔的半径固定,变化流道宽度,选用流体流动颗粒跟踪物理场和层流物理场进行耦合。层流场的流体材料选择和生鲜牛乳具有同种密度和动力粘度的材料替代。密度取 1039 kg/m^3 ,动力粘度取 $0.0017 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ 。流体进入芯片入口的速度为 0.02 m/s ,以此模拟生鲜牛乳的进样速度。因为牛乳体细胞中白细胞占比为 98%,因此释放

的粒子选择和白细胞具有同直径的粒子替代,直径取 $14 \mu\text{m}$,每 0.05 s 释放一次粒子,共释放 1 s 的时间,粒子的初始速度取决于流体的速度场。粒子的运动行为遵循牛顿第二定律。

观测腔半径与流道宽度在不同比例下的粒子分布,如图 1(a) 所示。通过图 1(a) 发现,若流道宽度过窄会使粒子集中在观测腔的中间位置,不会均匀地充满整个观测腔;若流道宽度过宽又会使粒子大量堆积在观测腔内,造成多个粒子重叠的现象。综合流体压力、流体速度等对通道的影响,最终确定观测腔的半径与流体通道的宽度比例为 25:7,粒子刚好可以均匀地充满整个观测腔。通过 Comsol 计算得出的九宫格型微流控芯片的粒子分布仿真图如图 1(b) 所示。通过仿真图可以直观地看出,粒子在微流控芯片的九个观测腔内分布比较均匀,因此,九宫格型微流控芯片可以满足体细胞分布均匀性的要求。

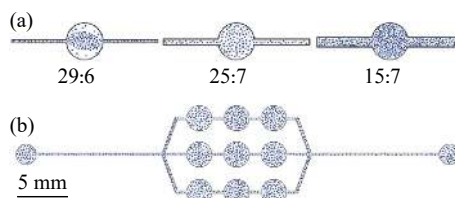


图 1 细胞分布模拟。(a) 观测腔半径与流道宽度在不同比例下的粒子分布;(b) 九宫格型通道粒子分布

Fig.1 Simulation of cell distribution. (a) Particle distribution of observation cavity radius and flow channel width at different ratios; (b) Particle distribution of nine-cell channel

1.2 微流控芯片制备

芯片的制备过程可简单描述为:首先,采用光刻技术^[10]制造出九单元微通道凸突的阳模,如图 2(a) 所示。光刻步骤如图 2(b) 所示。其次,在阳模上浇铸聚二甲基硅氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS), PDMS 在一定温度下固化后便可从阳模上剥离,制成带有微通道的芯片基片。最后,用玻璃盖片封接后制成高分子聚合物微流控芯片。其过程如图 2(c) 所示。在九宫格微流体网络上设置一组用于装载被测样本的微流体微腔,微流体流路的一端连接到入口,另一端通过出口与废液腔连接。在设计中,微流体通路上平均分布着三个观测腔,整个微流控芯片共有三个通路,九个观测腔,观测腔半径为 $500 \mu\text{m}$ 。显微成像系统采集观测腔处的细胞图像信息。为了减少细胞在观测微

腔中的聚集以及在进样通道中的贴壁情况,使细胞顺利地进样通道流动,设计微流体的通道高度为

40 μm,通道宽度为 140 μm。九宫格微流控芯片示意图如图 2(d) 所示。

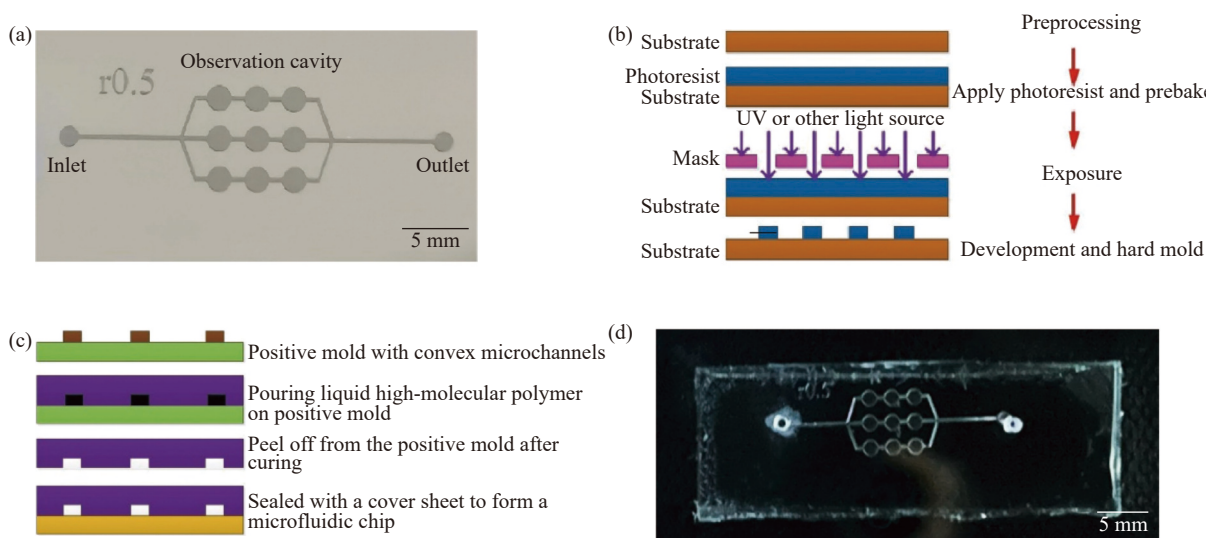


图 2 微流控芯片制备。(a) 微流控芯片通道阳模;(b) 光刻技术;(c) 微流控芯片制备过程;(d) 九宫格微流控芯片

Fig.2 Microfluidic chip preparation. (a) Anode mode of microfluidic chip channel; (b) Photolithography step; (c) Microfluidic chip preparation process; (d) Nine-cell grid microfluidic chip

1.3 基于图像处理的体细胞计数方法

细胞的计数算法分为图像处理和细胞计数两个部分,图像处理的目的是为了改善图像的识别效果,突出目标信息,降低背景信息对目标信息的影响,使处理后的图像更利于细胞计数。图像处理的过程分为图像灰度化、图像滤波、图像增强、Canny 边缘算子检测和形态学开运算。细胞计数是将经过图像处理后的图像通过连通域计数得到体细胞数量。

牛乳体细胞通过瑞氏染色法^[11]染色后,细胞核显示蓝紫色颗粒状,其他区域呈浅粉色。原始图像如图 3(a) 所示(为更清楚地说明图像处理细节,以拍摄图像的 1/9 为例)。通过显微成像系统拍摄出来的原始照片为彩色图像,也即 RGB 图像。灰度图像占用的计算机内存小,运算速度快,便于后续处理,因此,先进行图像的灰度化处理。

选用加权值法^[12]来进行图片的灰度处理,如公式 (1) 所示:

$$Gray = 0.114Blue + 0.587Green + 0.299Red \quad (1)$$

式中: Red 的权重取 0.299; Green 的权重取 0.587; Blue 的权重取 0.114,通过加权值法转换出的灰度图像,既可以将背景与目标很好地区分出来,又可以提升图片

的亮度,同时又不会增加图片的噪声。灰度处理后的图像如图 3(b) 所示。

在拍摄、存储、传输照片的过程中,由于成像系统或者是传输介质等原因,不可避免地使图像受到噪声的污染。因此,有必要滤除这些杂质以提高图像质量。图像通常含有脉冲噪声或高斯噪声。利用中值滤波^[13]可以抑制脉冲噪声,中值滤波如公式 (2) 所示:

$$g(i, j) = Med_A\{f(i, j)\} \quad (2)$$

式中: $g(i, j)$ 为中值滤波的输出结果; Med 表示取中值操作; $f(i, j)$ 为输入序列; A 为邻域窗口,窗口尺寸取奇数,文中选用 3×3。高斯滤波可以很好地滤除掉图像中的随机高斯噪声。但是高斯滤波在滤波的过程中只关注了位置信息,会过滤掉图片的边缘和纹理信息,所以在进行高斯滤波后,图像会变得模糊。而双边滤波在高斯滤波的基础上增加了像素值权重项,即在考虑距离因素影响的同时也要同时考虑由于像素值差异所带来的影响,像素值越近,权重越大。使用双边滤波^[14]可以在保证图像边缘和纹理信息不被破坏的情况下滤除高斯噪声,双边滤波如公式 (3) 所示:

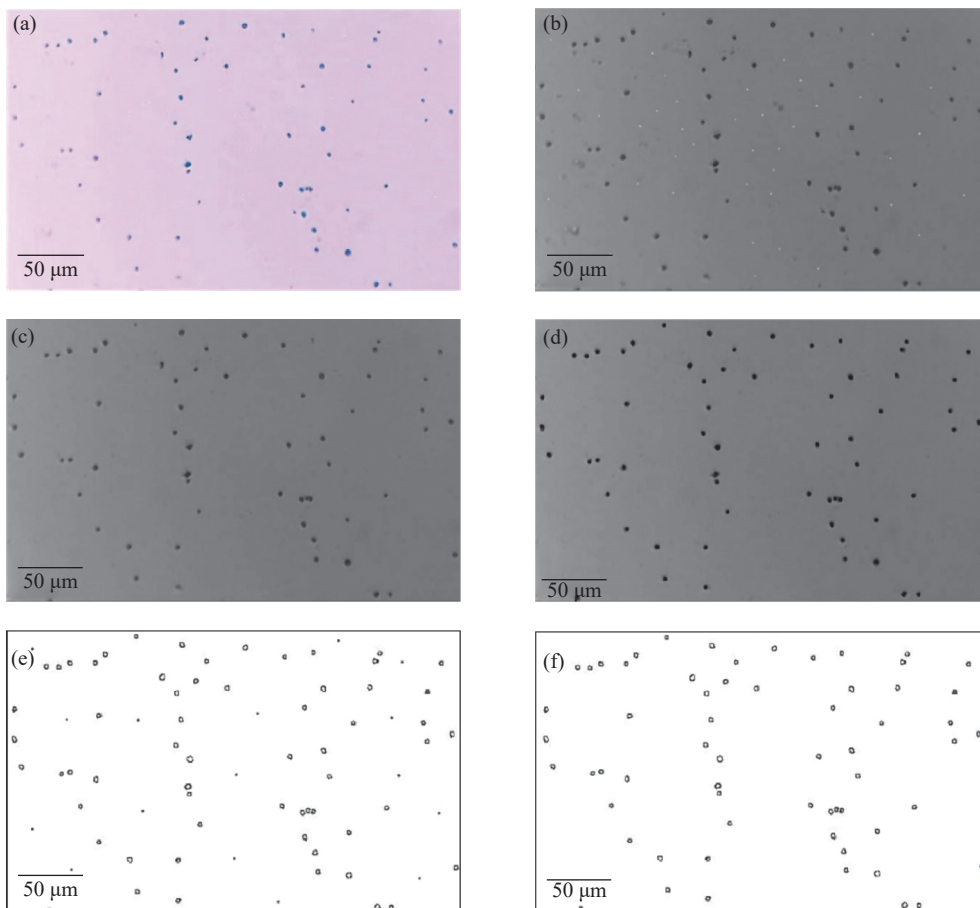


图 3 图像处理过程。(a) 原始图像; (b) 灰度图像; (c) 滤波后的图像; (d) 增强后的图像; (e) Canny 边缘算子检测后输出的图像; (f) 形态学开运算后输出的图像

Fig.3 Image processing process. (a) Original image; (b) Grayscale image; (c) Filtered image; (d) Enhanced image; (e) Output image after the Canny edge detection; (f) The final output image after morphological opening operation

$$\text{Filter} = \frac{1}{W_q} \sum_{p \in S} G_s(p) G_r(p) I_p = \frac{1}{W_q} \sum_{p \in S} e^{-\frac{\|p-q\|^2}{2\sigma_s^2}} \cdot e^{-\frac{\|I_p - I_q\|^2}{2\sigma_r^2}} \cdot I_p \quad (3)$$

式中: G_r 为像素值的权重; G_s 为空间距离的权重; I_q 为中心点像素的值; I_p 为周围点像素的值; q 为图像区域 s 的中心; p 为其周围的点; σ_s 为空间域标准差; σ_r 为灰度域标准差; W_q 为滤波窗口内每个像素值的权重和, 可用于权重的归一化, 如公式 (4) 所示:

$$W_q = \sum_{p \in S} G_s(p) G_r(p) \quad (4)$$

滤波后的图像如图 3(c) 所示, 整体图像变得非常平滑。

对灰度图像进行滤波时, 在过滤掉噪声的同时会造成轻微的图像模糊。为去除图像模糊, 首先通过矩

阵的掩膜操作^[15], 增加了图像的对对比度, 使图像变得更清晰。然后通过对比度受限制自适应直方图均衡法 (CLAHE)^[16], 进一步提高图片的亮度和对对比度。CLAHE 通过限制局部直方图的高度来限制噪声放大和局部对比度增强。CLAHE 会选取一个滑动的模板, 模板的映射函数 $n(i)$ 如公式 (5) 所示:

$$n(i) = \frac{255 \times C_{DF}(i)}{N \times N} \quad (5)$$

式中: $N \times N$ 为滑动模板的大小; $C_{DF}(i)$ 为原始图像的累积直方图。模板划到的区域内直方图的累计分布函数如公式 (6) 所示:

$$S = \frac{d(n(i))}{di} = H_{ist}(i) \times \frac{255}{N \times N} \quad (6)$$

从上式可以看出, 通过控制灰度直方图的高度可以控制映射函数的斜率, 以此来限制对比度的强度。直方图的最大高度 H_{max} 如公式 (7) 所示:

$$H_{\max} = k_{\max} \times \frac{255}{N \times N} \quad (7)$$

式中: k_{\max} 为斜率的最大值, 对于高度大于直方图最大高度 H_{\max} 的直方图, 应当截去多余的部分。在 CLAHE 的实际应用中, 可以设定一个截断阈值, 截断阈值可以不等于灰度直方图的最大高度, 使截断的部分在整体的灰度范围内分布均匀, 可以在直方图总面积不变的前提下提升直方图的高度。增强后的图像如图 3(d) 所示。

在对牛乳体细胞进行计数时, 不关心体细胞内的具体信息, 只需要提取体细胞外部轮廓即可。文中采用 Canny 边缘检测算法^[17] 对经过图像增强后的牛乳体细胞进行边缘提取, 其算法流程图如图 4 所示。经过 Canny 边缘算子检测后输出的图像为边缘的二值

图像, 如图 3(e) 所示。灰度图像中残余的一些噪声点也会显露出来, 此时可通过形态学操作中的开运算^[18] 将这些微小的噪声点去除。开运算是先对图像先腐蚀后膨胀的操作, 用来去除小物体、平滑大物体边界且不明显改变原来区域的面积。通常在需要去除小颗粒噪点以及分离纤细点处目标之间的粘连时使用。与腐蚀操作相比, 其优势在于能基本保持目标原有的大小不变。最终输出图像如图 3(f) 所示。其定义如公式 (8) 所示:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (8)$$

图像的连通域^[19] 是指图像中具有相同像素值并且由位置相邻的像素组成的区域。图像中每个细胞的边缘组成了一个连通域, 通过计算图像中连通域的个数, 就可以得到图像中的体细胞个数。

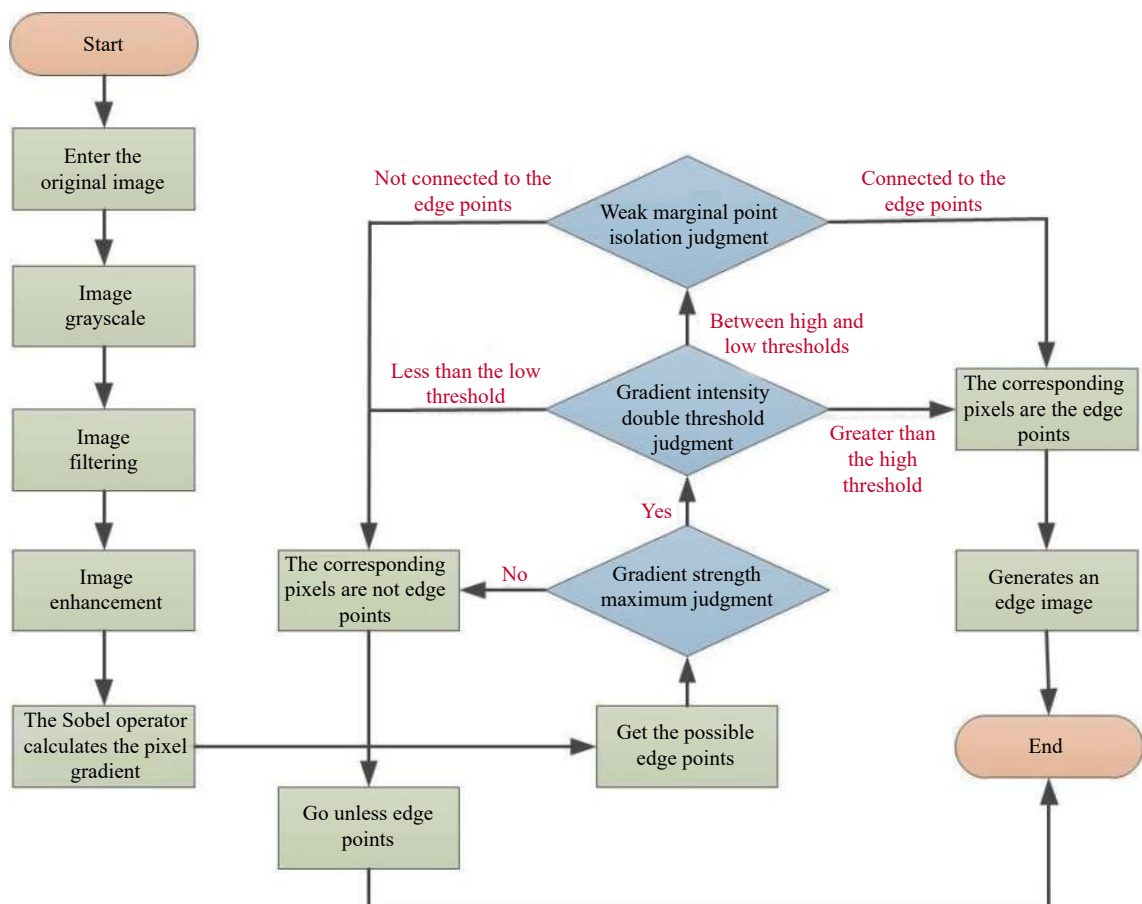


图 4 Canny 边缘检测流程图

Fig.4 Flowchart of Canny edge detection

2 系统设计

该系统主要由进样系统、显微镜成像系统、细胞

计数软件组成。进样系统将被测量的样品注射到微流控芯片中, 显微镜成像系统可以对牛乳中的体细胞进行拍照, 细胞计数软件对得到的体细胞数量信息进

行存储。

2.1 进样系统

进样系统主要分为三个部分,分别是染色、搅拌、进样。进样系统的每个部分均采用负压驱动,以此来增加系统的抗干扰性,避免在进样过程中受到空气的污染,造成计数结果的不准确。系统以单片机(STMicroelectronics:STM32F103)为控制中心,通过继电器实现电压转换。染色过程就是使用瑞氏染色法对生鲜牛乳进行染色,使体细胞在图像中更好地凸显出来。将装有染色剂和生鲜牛乳试剂瓶的电磁阀

(JSY: JS0520L)同时打开,两种溶液会同时流入被动式混合器中进行充分混合。然后,步进电机(MOONS?: 14H030H-0304)驱动搅拌头搅拌混合溶液,使细胞在微流控观测腔内分布均匀,防止因细胞重力而引起细胞沉降和贴壁问题,使取出的溶液具有代表性。搅拌混合溶液也可以使牛乳和染色剂充分混合,使体细胞在图像中更明显。然后通过微注射泵(FLUIGENT: MFCS™EZ)^[20]将溶液精确地注入到微流控芯片中。进样系统如图5所示。

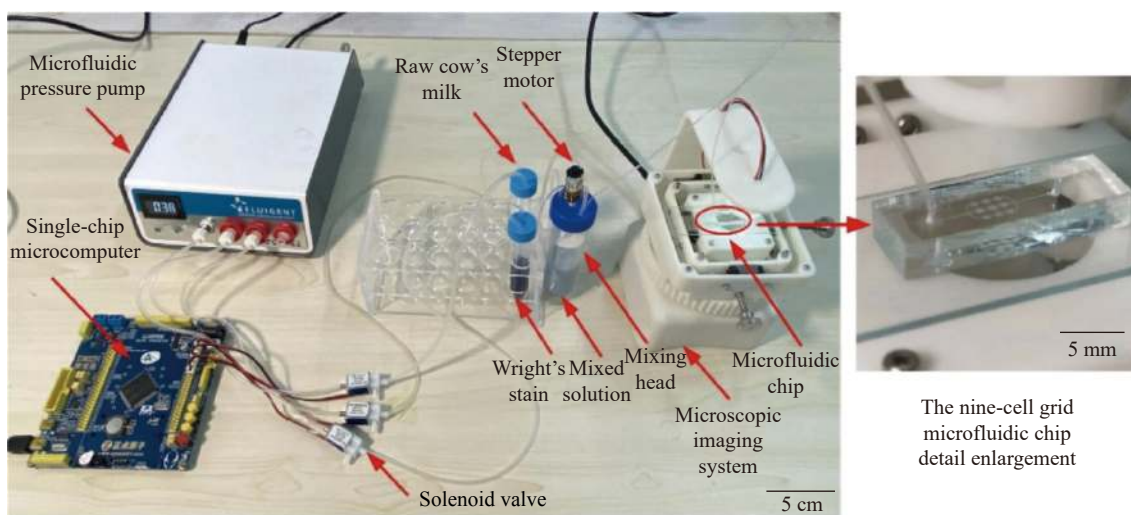


图 5 进样系统

Fig.5 Injection system

2.2 显微成像系统

文中所使用的显微成像是开发的第二版。第二个版本采用 3D 打印技术打印全身,使显微成像系统各部分结构融为一体。与第一个版本相比,第二个版本更紧凑、更小、更便携。第二个版本的显微成像是透明的,减少了光的干扰,使光只能产生漫反射而不是镜面反射,提高了成像质量。

显微成像系统搭载了具有 400 万像素的 CCD 相机,并具有放大 200 倍、400 倍和 600 倍三个倍率的物镜,内置可编程的控制器,WIFI 模块和二自由度位移平台,显微成像系统如图 6(a)所示。CCD 相机采用 Baumer 堡盟的 HXC40 C 型号,WIFI 模块将采集到的图片信息上传至计算机以备分析。二自由度位移平台^[21]主要由基座、X 方向位移平台、Y 方向位移平台、观测窗、微型步进电机、八根圆形导轨和其它

相关零部件组成,二自由度位移平台如图 6(b)所示。

将提供 Y 方向动力的微型步进电机设为电机 Y,提供 X 方向动力的微型步进电机设为电机 X,经计算可得电机 Y 驱动的部件质量约为 19.39 g,电机 X 驱动的部件质量约为 23.76 g。移动平台之间的摩擦因数为 0.26,移动平台与各个圆形导轨的摩擦因数为 0.28,在这里均取为 0.28 以简化计算流程。通过对 Y 步进电机和 X 步进电机等效转动惯量和等效负载的计算,最终选取丝杠螺距为 0.5 mm,转动惯量为 $10^{-9} \text{ kg} \cdot \text{m}^2$ 的微型步进电机,二自由度位移系统的步进速度为 1 mm/s,转速为 240 r/min。

二自由度位移平台以稳定性和运动精度为基础,运动平稳可靠,适配九宫格式微流控芯片,使之提供可靠的数据以及图像信息。步进电机直接驱动滑块移动,在结构紧凑设计的同时又保证了整体的美观

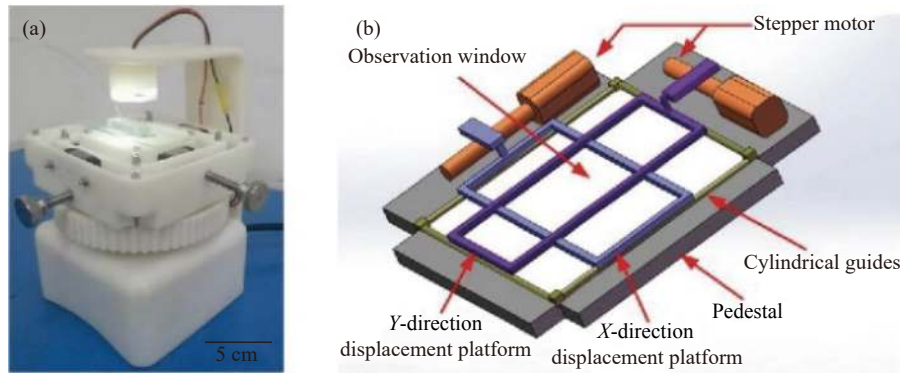


图 6 (a) 显微成像系统; (b) 二自由度位移平台示意图

Fig.6 (a) Microscopic imaging systems; (b) Schematic diagram of the two-degree-of-freedom displacement platform

性,大大减少了体积和开发成本,方便在整体硬件平台上进行集成。选用单片机进行位移平台控制,使其沿 X-Y 行程均为 47 mm,与显微摄像镜头装配合理,减少了外界因素对整个装置定位精度的影响。

2.3 细胞计数软件

对于牛乳体细胞计数软件采用 MATLAB 编写人机界面。图像处理程序基于 OpenCV 在 Visual Studio 中编写,直接在 MATLAB 中生成。软件分为手动计数、自动计数、导入数据库三部分。在手动计数界面,用鼠标点击细胞,每点击一次,图片上被点击的细胞就会留下一个色彩标记,同时细胞的个数就递增 1。根据上述图像处理和细胞计数算法,对图像中的牛乳体细胞进行自动计数。自动计数结束后,软件对计数结果进行自动处理,确定奶牛乳房的健康状况和疾病程度。最后,软件计算出待测奶牛的挤奶顺序和处理顺序。在导入数据库部分,软件将计数过程中的一系列数据上传至 SQL 数据库。在 SQL 数据库^[22]中创建奶牛的健康状况文件用于长期监控。

3 实验结果分析

在当地的牧场随机选取了 20 头奶牛通过上文所述的牛乳体细胞计数系统对其分泌的牛乳在现场进行体细胞个数的检测实验,以验证体细胞分布的均匀性和检测乳房的健康状况。每头奶牛均是在挤奶完成后的 1 h 内完成对体细胞的计数,以保证牛乳的鲜性。

3.1 细胞分布均匀性

为了使取出样品中的体细胞能够反应奶牛的乳房健康状态,体细胞应均匀分布于观察腔内。为此随

机抽取一头奶牛将其牛乳泵入九宫格型微流控芯片,使用显微成像系统对其微腔进行拍摄,基于九宫格型微流控芯片拍摄出的牛乳体细胞图像如图 7(a)所示。使用相同的牛乳通过载玻片制作牛乳体细胞切片,使用显微成像系统对其进行拍摄,基于载玻片拍摄的牛乳体细胞图像如图 7(b)所示。通过图 7 可以直观地看出,若使用载玻片则无法保证牛乳体细胞分布的均匀性,牛乳体细胞大量聚集在载玻片的中心位置,造成大量细胞黏连,形成细胞团,体细胞分布不均匀,通过这种方法计算出整体的体细胞数量与其真实值之间有一定的误差,导致对奶牛乳房的健康状况做出错误的判断。而基于九宫格型微流控芯片拍摄出的体细胞分布均匀,与仿真结果一致。

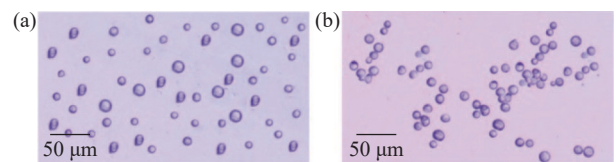


图 7 体细胞图像。(a) 基于九宫格型微流控芯片的拍摄; (b) 基于载玻片的拍摄

Fig.7 Somatic cell images. (a) Taken on nine-grid microfluidic chip; (b) Taken on slides

对基于九宫格型微流控芯片细胞分布均匀性做进一步分析,将 20 头奶牛分别赋予 1~20 的编号,对每号奶牛牛乳拍摄 9 张图像,为表述清楚,将第 1 号奶牛牛乳的 9 张图像命名为第 1 组图像,第 2 号奶牛牛乳的 9 张图像命名为第 2 组图像,依次类推。每张图像牛乳体细胞数量如表 1 所示,以一组图像为例,图像的实拍图如图 8 所示。计算各组图像体细胞标

表 1 各组每幅图像的体细胞数量及标准差系数

Tab.1 Number of somatic cells per image in each group and the standard deviation coefficient

Group number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Standard deviation coefficient	Standard deviation coefficient(1/9)
1	179	180	177	181	182	178	177	182	180	1.08%	4.31%
2	152	151	153	149	150	149	151	152	148	1.11%	4.37%
3	286	290	291	287	287	288	290	287	288	0.60%	2.06%
4	171	169	167	172	173	168	170	172	169	1.19%	3.81%
5	347	350	351	350	349	347	348	347	350	0.45%	1.67%
6	121	118	119	120	117	119	118	121	120	1.17%	5.85%
7	773	770	768	769	771	770	772	768	770	0.22%	1.75%
8	528	525	526	523	525	524	529	526	527	0.36%	1.21%
9	153	152	149	148	151	152	149	150	148	1.24%	4.36%
10	407	403	405	404	406	402	403	407	405	0.45%	1.55%
11	1094	1092	1095	1088	1089	1090	1092	1091	1093	0.21%	1.53%
12	163	167	165	164	163	164	166	165	164	0.81%	3.92%
13	903	905	899	902	907	900	902	905	901	0.29%	1.37%
14	309	312	310	307	308	306	311	312	310	0.69%	2.05%
15	455	456	451	456	457	453	452	451	454	0.50%	2.13%
16	789	783	786	784	782	785	783	780	781	0.35%	1.46%
17	471	470	469	470	468	472	466	471	467	0.43%	1.34%
18	216	214	216	213	215	214	212	216	215	0.66%	3.09%
19	614	613	615	610	616	612	613	611	616	0.35%	1.03%
20	107	109	111	112	109	111	108	110	112	1.61%	5.81%

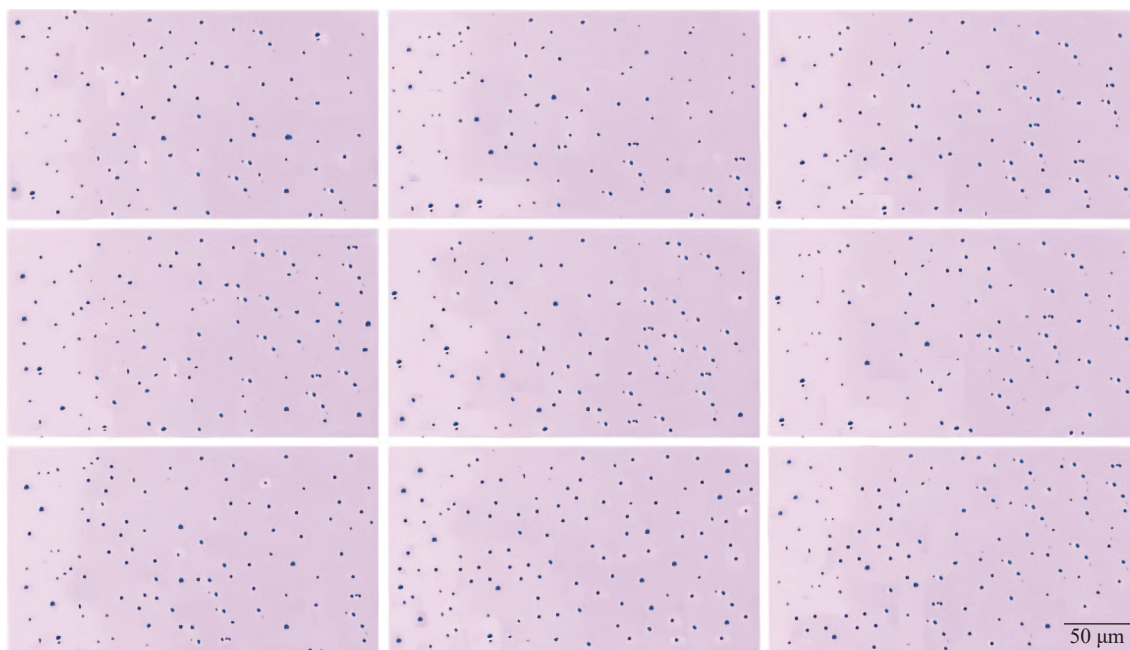


图 8 某号奶牛牛乳的 9 张图像

Fig.8 9 images of milk from a certain cow

准差系数,如表 1 倒数第 2 列所示。由于每组图像体细胞数量的平均值不同,对于不同水平的总体不宜直接用标准差指标进行对比,因此使用标准差系数来衡

量每一组图像中体细胞个数的离散程度,即离散程度越小,体细胞分布也越均匀。由表 1 数据可知,每组图像标准差系数的最大值为 1.61%,最小值为 0.21%,

平均值为 0.69%，认为芯片 9 个观测腔内的体细胞数量波动在可允许范围内，证明体细胞在微流控芯片的 9 个观测腔内分布均匀。

通过显微成像系统拍摄的每张图像平均分割为 9 张，此时每组图像的数量为 81 张，分割后每组 81 张图像体细胞数量的标准差系数见表 1 最后一列。通过对 1/9 图像进行体细胞计数来验证微流控芯片每个观测腔内细胞分布的均匀性。从表 1 最后一列数据可以看出，分割后每组 81 张图像体细胞数量的标准差系数最大值为 5.85%，最小值为 1.03%，平均值为 2.73%，认为分割后每组的 81 张图像的体细胞数量波动在可允许范围内，证明体细胞在微流控芯片的每个观测腔内分布均匀。

综上，相较于载玻片，基于九宫格型微流控芯片极大地提高了牛乳体细胞分布的均匀性，避免了样品因为细胞粘附性、重力等原因造成的细胞沉降、贴壁等问题，从而使体细胞在样品溶液分布均匀，保证了取出的样品具有代表性，提高了奶牛乳房健康状态的判断准确率。

3.2 系统计数准确率和奶牛乳房健康状态

取每组 9 张原始照片自动计数的平均值作为自动测量值，将每组 9 张原始图像中手动计数的平均值作为手动测量值。根据图像参数，图像长度 5802 μm，宽度为 4050 μm，通道高度为 40 μm，视场内溶液体积如公式 (9) 所示：

$$V = 5\,802 \times 4\,050 \times 40 = 9.399\,24 \times 10^8 \mu\text{m}^3 = 0.94 \text{ mm}^3 = 0.94 \mu\text{L} \quad (9)$$

由公式 (9) 可得视野范围内牛乳的体积为 0.94 μL。每毫升牛乳中体细胞数可以从每组图像体细胞数的平均值得到。BD FACSAria™ 流式细胞仪计数作为真值，计算手动计数和自动计数的准确性。每毫升牛乳体细胞数的手动测量值、自动测量值和真实值的比较如图 9(a) 所示。可以看出，手动测量值和自动测量值都很接近真值。测量值与真实值之间的误差分布如图 9(b) 所示。

从图 9(b) 可以看出，自动计数的相对误差绝对值的最大值为 2.93%，最小值为 0.53%，平均值为 1.72%，得出自动计数的最大计数误差为 ±2.93%。手动计数相对误差绝对值的最大值为 1.18%，最小值为 0.24%，平均值为 0.63%，手动计数的最大计数误差为 ±1.18%。

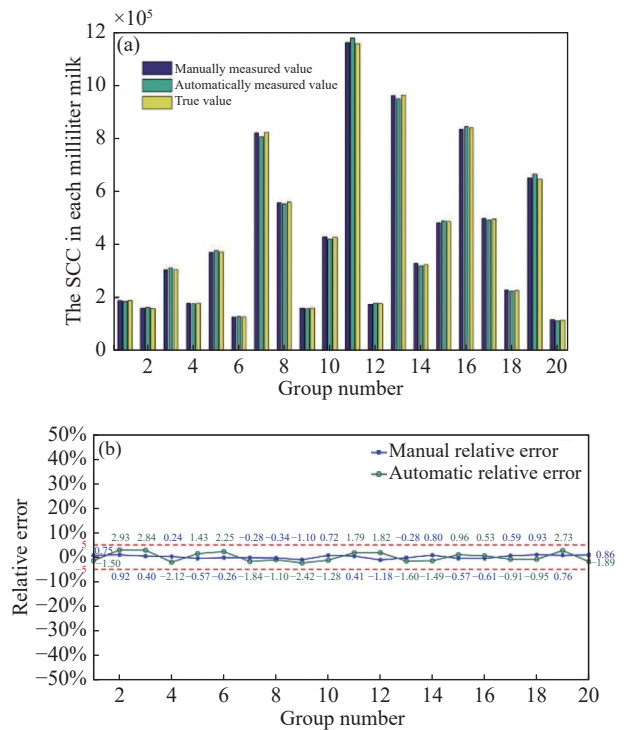


图 9 (a) 真实值与测量值相比较的条形图; (b) 测量值与真实值之间的误差分布

Fig.9 (a) Bar graph of measured values compared to true values; (b) Error distribution between the measured and true values

可以认为，自动计数相对误差和手动计数相对误差较小，均在允许范围内。自动计数的准确率在 97.07%~99.47% 之间，手动计数的准确率在 98.82%~99.76% 之间。

该系统自动计数的准确率比手动计数的准确率略低，主要原因是牛乳体细胞中包含多种不同的细胞，其中淋巴细胞的直径在 5~12 μm 之间，中性粒细胞的直径在 9~12 μm 之间，乳腺上皮细胞的直径在 12~18 μm 之间，巨噬细胞的直径在 15~25 μm 之间，四种体细胞如图 10 所示。当两个较小体细胞距离较近或发生重叠时，系统自动识别能力较差，不能分辨出是两个不同的小体细胞还是一个较大的体细胞，因此导致体细胞计数产生误差。由于基于九宫格型微流控芯片使体细胞分布的均匀性高，很少出现上述情况，所以自动计数和手动计数都有很高的准确率。自动计数相较于手动计数更加便捷、省时。自动计数无需人员操作由系统自动完成，缩短了检测时间使整个检测过程可控制在 1 min 内；手动计需要操作人员进行操作，检测时间依赖于操作人员的熟练程度，没有

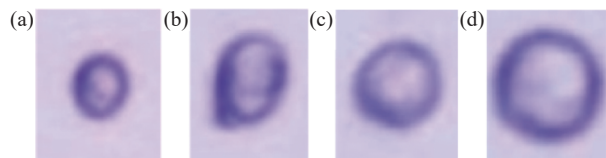


图 10 (a) 中性粒细胞; (b) 淋巴细胞; (c) 乳腺上皮细胞; (d) 巨噬细胞
Fig.10 (a) Neutrophil; (b) Lymphocyte; (c) Mammary epithelium;
(d) Macrophage

自动计数便捷。

在不同的研究中, 奶牛牛乳中体细胞数对奶牛乳房健康的判断标准不尽相同^[23-27]。结合多种因素, 文中推导出判断奶牛乳房健康状况和疾病程度的标准, 如表 2 所示。测量值和真实值的判断结果如表 3 所示。

表 3 中的数据显示了自动、手动和真值测定奶牛乳房健康状态结果的一致性。验证了该计数系统的

表 2 奶牛乳房的健康状况和患病程度判断标准

Tab.2 Criteria for judging the cow's udder health status and degree of illness

SCC/mL	Cow's udder health status	Degree of illness
SCC < 200 000	Healthy	-
200 000 < SCC < 300 000	Subclinical suspicion	Slight
300 000 < SCC < 400 000	Subclinical suspicion	Moderate
400 000 < SCC < 500 000	Subclinical suspicion	Severe
500 000 < SCC < 600 000	Subclinical mastitis	Slight
600 000 < SCC < 800 000	Subclinical mastitis	Moderate
800 000 < SCC < 1 000 000	Subclinical mastitis	Severe
1 000 000 < SCC < 1 200 000	Clinical mastitis	Slight
1 200 000 < SCC < 1 500 000	Clinical mastitis	Moderate
SCC > 1 500 000	Severe clinical mastitis	Severe

表 3 判断奶牛乳房健康状况和患病程度

Tab.3 Judging the cow's udder health status and degree of illness

Group number	Manually measured value/mL	Automatically measured value/mL	True value/mL	Manual relative error	Automatic relative error	Cow's udder status	Degree of illness	Determine whether the results are consistent
1	190426	186170	189031	0.75%	-1.50%	Healthy	-	Yes
2	159574	162766	158126	0.92%	2.93%	Healthy	-	Yes
3	306383	313830	305152	0.40%	2.84%	Subclinical suspicion	Moderate	Yes
4	180851	176596	180413	0.24%	-2.12%	Healthy	-	Yes
5	370213	377660	372329	-0.57%	1.43%	Subclinical suspicion	Moderate	Yes
6	126596	129787	126931	-0.26%	2.25%	Healthy	-	Yes
7	819149	806383	821459	-0.28%	-1.84%	Subclinical	Severe	Yes
8	558511	554255	560396	-0.34%	-1.10%	Subclinical	Slight	Yes
9	159574	157447	161345	-1.10%	-2.42%	Healthy	-	Yes
10	429787	421277	426732	0.72%	-1.28%	Subclinical suspicion	Severe	Yes
11	1161702	1177660	1156930	0.41%	1.79%	Clinical	Slight	Yes
12	175532	180851	177624	-1.18%	1.82%	Healthy	-	Yes
13	960638	947872	963326	-0.28%	-1.60%	Subclinical	Severe	Yes
14	328723	321277	326129	0.80%	-1.49%	Subclinical suspicion	Moderate	Yes
15	482979	490426	485745	-0.57%	0.96%	Subclinical suspicion	Severe	Yes
16	834043	843617	839188	-0.61%	0.53%	Subclinical	Severe	Yes
17	498936	491489	496021	0.59%	-0.91%	Subclinical suspicion	Severe	Yes
18	228723	224468	226619	0.93%	-0.95%	Subclinical suspicion	Slight	Yes
19	652128	664894	647174	0.76%	2.73%	Subclinical	Moderate	Yes
20	117021	113830	116018	0.86%	-1.89%	Healthy	-	Yes

实测值是有效的,判断结果是准确的。

当挤牛乳时,怀疑患有亚临床乳腺炎的奶牛应该在牛群的最后挤奶。如果条件允许,可以为它们配备单独的挤奶器,这样就不会干扰其他健康的奶牛。已经患有亚临床乳腺炎的奶牛必须被隔离和治疗,以避免牧场的进一步损失。

综上所述,建议的挤奶顺序为 20 号、6 号、9 号、2 号、12 号、4 号、1 号、18 号、3 号、14 号、5 号、10 号、15 号、17 号。建议的治疗顺序为 11 号、13 号、16 号、7 号、19 号、8 号。

4 结 论

文中提出了一种基于微流控芯片与显微成像系统获取牛乳体细胞均匀分布的方法。解决了牛乳在取样过程中细胞贴壁沉降等原因造成体细胞分布不均匀,以及没有匹配的成像系统导致体细胞计数不具有代表性的问题,文中的主要工作内容如下:

(1) 制备了九宫格型微流控芯片,保证芯片内体细胞分布的均匀度,并取九个观测腔体细胞数量的平均值作为最终的检测结果,使最终得出的体细胞数量具有代表性。随着体细胞均匀分布,图像处理算法和细胞计数算法将变得更容易。

(2) 将微流控技术与图像处理算法相结合应用于牛乳体细胞计数领域,研制了搭载微型显微摄像镜头的二自由度位移平台,可自动对芯片的九个观测腔拍摄图像,使图像获取更加便捷。

(3) 开发了一种低成本、便捷的体细胞计数系统,自动计数精度可达 99.23%,可脱离实验室环境进行牛乳现场检测。该系统集染色、搅拌、送样、显微成像、自动拍照、细胞计数等功能于一体。从染色开始到计数结束,整个检测过程可控制在 1 min 内,满足对牛乳新鲜度的要求。随着计数准确率的提升,对奶牛乳房健康的判断也更加准确,并依次对奶牛挤奶顺序和治疗顺序提出建议,尽量减少牧场因此而带来的经济损失。

在以后的研究中可通过图像中每个连通域面积的大小判断出体细胞的种类,进而可对体细胞进行分类计数,研究单种细胞的数量对奶牛乳房炎的影响。文中生鲜牛乳体细胞计数系统研发成本小,应用前景广泛,为奶牛乳房炎的检测与预防提供了便利,也为

其他种类的细胞计数系统设计提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Troendle J A, Tauer L W, Grohn Y T. Optimally achieving milk bulk tank somatic cell count thresholds [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(1): 731-738.
- [2] Swinkels J M, Leach K A, Breen J E, et al. Randomized controlled field trial comparing quarter and cow level selective dry cow treatment using the California Mastitis Test [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(8): 9063-9081.
- [3] Farschtschi S, Mattes M, Hildebrandt A, et al. Development of an advanced flow cytometry based high-resolution immunophenotyping method to benchmark early immune response in dairy cows [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 22896.
- [4] Chengolova Z, Ivanov Y, Grigorova G. The relationship of bovine milk somatic cell count to neutrophil level in samples of cow's milk assessed by an automatic cell counter [J]. *J Dairy Res*, 2021, 88(3): 330-333.
- [5] Kasai S, Prasad A, Kumagai R, et al. Scanning electrochemical microscopy-somatic cell count as a method for diagnosis of bovine mastitis [J]. *Biology*, 2022, 11(4): 594.
- [6] Gao F, Wang J, Ge Y, et al. A vision-based instrument for measuring milk somatic cell count [J]. *Meas Sci Technol*, 2020, 31(12): 125904.
- [7] Kasai S, Prasad A, Kumagai R, et al. Somatic cell count in buffalo milk using fuzzy clustering and image processing techniques [J]. *J Dairy Res*, 2021, 88(1): 69-72.
- [8] Düven G, Çetin B, Kurtuldu H, et al. A portable microfluidic platform for rapid determination of microbial load and somatic cell count in milk [J]. *Biomed Microdevices*, 2019, 21: 49.
- [9] Pødenphant M, Marie R, Olesen T, et al. Injection molded pinched flow fractionation device for enrichment of somatic cells in cow milk [J]. *Microelectron Eng*, 2014, 124(25): 53-57.
- [10] Culbertson C T, Sibbitts J, Sellens K, et al. Fabrication of glass microfluidic devices [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1906: 1-12.
- [11] Li R, Huang J, Li Y, et al. Determination of chromium in beer yeast by color-fading spectrophotometry with wrights stain [J]. *Phys Test Chem Anal Part B Chem Anal*, 2018, 54: 322-325.
- [12] Wu T R, Toet A. Color-to-grayscale conversion through weighted multiresolution channel fusion [J]. *J Electron Imaging*, 2014, 23(4): 043004.
- [13] Li P, Qian L. A kind of method of image synthetical median filter [J]. *Microcomput Inf*, 2010, 26: 131.
- [14] Mozerov M G, Van de Weijer J. Global color sparseness and a

- local statistics prior for fast bilateral filtering [J]. *IEEE Trans Image Process*, 2015, 24(12): 5842-5853.
- [15] Yin C, Zhou Y, Agaian S, et al. Parametric rational unsharp masking for image enhancement [C]//Proc of SPIE, 2014, 9019: 90190W.
- [16] Chang Y, Jung C, Ke P, et al. Automatic contrast-limited adaptive histogram equalization with dual gamma correction [J]. *IEEE Access*, 2018, 6: 11782-11792.
- [17] Wang Z, He S. An adaptive edge-detection method based on canny algorithm [J]. *J Image Graph*, 2004, 9: 957-962.
- [18] Li C F, Pan T T. Object detection method based on morphological opening-and-closing operation and gradient optimization [J]. *Appl Res Comput*, 2009, 26: 1593.
- [19] Xu G, Zhao T, Jiang S. Extraction method of structural surface cracks based on multiple connected domain features [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Nat Sci*, 2019, 47(10): 52-55, 68. (in Chinese)
- [20] Bavit A K, Coltisor V, Estlack Z, et al. A pneumatically controlled microfluidic rectifier enabling zero backflow under pulsatile flow regime [J]. *J Micromech Microeng*, 2021, 31(9): 095009.
- [21] Yu C, Li S, Wei C, et al. A cost-effective nucleic acid detection system using a portable microscopic device [J]. *Micromachines*, 2022, 13(6): 869.
- [22] Xi M J, Yong F, Wu S H, et al. Research on Delphi + SQL server 2000 database apply system [J]. *Computer Engineering and Design*, 2009, 30(5): 1245-1248. (in Chinese)
- [23] Yang Y, Wang J, Bu D, et al. Comparative proteomic analysis of the changes of milk protein associated with somatic cell counts [J]. *Sci Agric Sin*, 2011, 44(12): 2545-2552.
- [24] Gan Z H, Yang Z P, Li Y L, et al. Relationship of bacterial infection with somatic cell count and milk composition in dairy cows with mastitis [J]. *Acta Vet Zootech Sin*, 2013, 44: 972-979.
- [25] Græsboell K, Kirkeby C, Nielsen S S, et al. Models to estimate lactation curves of milk yield and somatic cell count in dairy cows at the herd level for the use in simulations and predictive models [J]. *Front Vet Sci*, 2016, 3: 115.
- [26] Makovický P, Makovický P, Nagy M, et al. Genetic parameters for somatic cell count, logsec and somatic cell score of breeds: improved valachian, tsigai, lacaune and their crosses [J]. *Acta Vet-Beogr*, 2014, 64: 386-396.
- [27] Volpe R J, Park T A, Dong F, et al. Somatic cell counts in dairy marketing: Quantile regression for count data [J]. *Eur Rev Agric Econ*, 2016, 43(2): 331-358.

A study on the uniform distribution and counting method of raw cow's milk somatic cells based on microfluidic chip

Zhou Wei¹, Wang Minghui¹, An Guangxin¹, Zheng Hongbiao¹, Li Xingyu¹, Meng Qingyi^{2*}

(1. School of Mechanical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China;

2. School of Energy Engineering, Tianjin Sino-German University of Applied Sciences, Tianjin 300350, China)

Abstract:

Objective The somatic cell count (SCC) in raw milk is an important basis for determining whether a cow is suffering from mastitis. Identifying cows with mastitis by testing the SCC, then isolating and treating them as early as possible, can effectively prevent the spread of bacteria in the herd to reduce consequential economic losses. However, traditional methods may lead to uneven distribution of somatic cells during milk sampling, such as cell adhesion settlement, and unrepresentative somatic cell count due to lack of matching imaging system. In this paper, a method is proposed which is based on the nine-cell grid microfluidic chip to make somatic cell evenly distributed and develop a two degree of freedom displacement platform equipped with a micro lens to improve the counting accuracy .

Methods Firstly, a simulation was performed to verify the uniformity of the somatic cell distribution within the chip observation cavities (Fig.1). And based on the simulation results, a nine palace grid microfluidic chip was prepared (Fig.2). Secondly, a two-degree-of-freedom displacement platform (Fig.6) equipped with a micro-

camera lens is developed, which can automatically take images of the nine observation cavities of the chip, making image acquisition more convenient. Finally, somatic cells were counted by image processing (Fig.3), so as to verify the uniformity of somatic cell distribution, obtain the counting accuracy, and judge the health status of cow udder.

Results and Discussions 20 cows were randomly selected from local pastures to verify the performance of the proposed method. From the data in Tab.1, it can be seen that the standard deviation coefficient of the SCC in each group of nine images is less than or equal to 1.61%, which verifies the uniformity of the distribution of somatic cells in the nine observation cavities of the microfluidic chip. The system ensures the uniform distribution of somatic cells and renders the taken samples more representative. As can be seen from Fig.9(b), the maximum absolute value of the relative error of the system of automatic counting is 2.93%, the minimum value is 0.53%, and the average value is 1.72%. The maximum relative count error of the automatic counting is obtained as $\pm 2.93\%$. The system has a very high accuracy for automatic counting.

Conclusions The experimental results show that the somatic cell counting system developed in this paper can make the somatic cell distribution in fresh milk more uniform and count more accurately. The standard deviation coefficient of the number of somatic cells in each group of nine images was less than or equal to 1.61%, and the smaller the standard deviation coefficient is, the more uniform the distribution of somatic cells is. The accuracy of the automatic system counts ranged between 97.07% and 99.47%. This research method lays the foundation for the detection and prevention of mastitis in cows.

Key words: dairy mastitis; microfluidic chip; micro microscope system; image processing; cell counting; standard deviation coefficient

Funding projects: Hebei Natural Science Foundation General Project (B2021202038)