

Разделителна способност на оптична система за броене на соматични клетки

Ангел Манев, Диньо Динев, Веселин Ташев

In the proposed study to analyze the resolution of real working system for counting of somatic cells in milk samples. Below are the methods of study of contrast-frequency response and resolution of the system. Defined optimal design parameters of the experimental chamber in which is facilitated its subsequent production.

Key word: somatic, milk, optical, system

Млякото остава една от основните храни на човека без която той не може да живее нормално. На различните етапи на обработка на млякото се създават възможности за поява в млечната среда на нежелани компоненти, които трябва да се контролират своевременно. В процеса на преработка на прясното мляко на различните етапи се контролират различни химически и биологични показатели за годността на млякото за консумация. Особено внимание се отделя на входящия контрол в млекопреработвателната промишленост. Анализиращата техника в тази област се разделя на два типа – системи, които се използват за оперативен постоянен контрол на млякото и такива, които работят на лабораторен принцип и осъществяват инцидентен контрол. Все повече в промишлеността се разширява спектъра на аналитична техника за бърз оперативен контрол на основни млечни компоненти. Разширява се набора от анализатори на наличието на соматични клетки. Наличието на соматични клетки над определени предели в млякото го правят негодно за преработка и консумация.

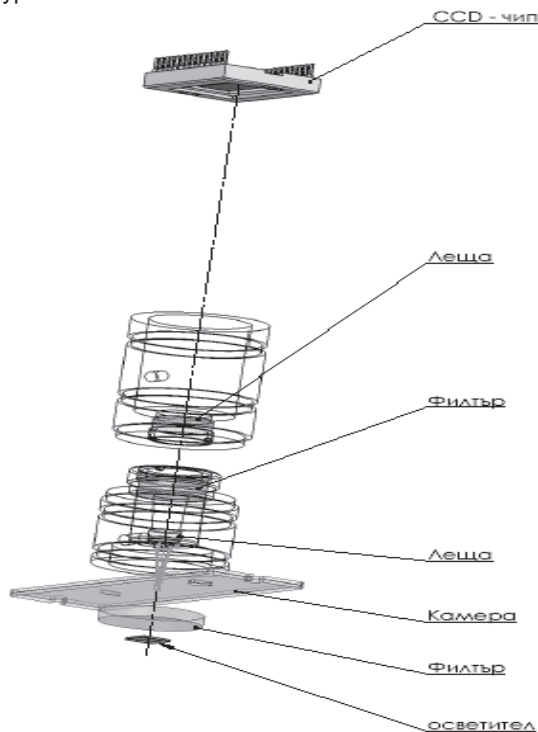
Соматичните клетки, чиито брой трябва да се изследва, имат определени оптични и геометрични характеристики. По литературни данни и според наши изследвания размерът на такава клетка е от порядъка на 9-10 мкм. Плътноста на клетките в пробата от мляко е такава, че минималното разстояние между две клетки на едно и също разстояние от измервателната система много рядко е по-малко от 20 мкм. При тези характеристики е ясно, че изискванията към оптиката ще бъдат не да се анализира морфология на пробата а да се регистрират светещи обекти с определени размери. Това поставя специфични изисквания към особеностите на оптичния тракт – в някои отношения опростяване на изображението а в други засилване на разделителната способност и енергетиката на анализа.

В литературата и на пазара има описани системи за броене на соматични клетки, конструирани на базата на оптични елементи, които формират мащабирано изображение посредством комбинация от оптични лещи [1], [2]. Конструкциите в общи линии са изградени на следния принцип: Първо в млечната проба се добавя оцветител, който се свързва само от соматичните клетки. След това пробата се „напомпва“ с лъчение с дължина на вълната около 365 мкм при което започва излъчване на оцветителя в област около 470 мкм. Изображението на светещите соматични клетки се увеличава и предава на детектиращия елемент, който в случая е CCD матрица. Следва прилагане на специфични алгоритми за преброяване на светещите обекти.

В предишни наши публикации [4] са описани оптичните характеристики на портативен анализатор на соматични клетки в полеви условия. Общият вид на оптичния тракт на системата за изброяване на соматични клетки е показан на Фигура 1. Оптичният тракт, след като е оптимизиран, задава само коефициент на трансформиране на енергията за доуточняване на характеристиките на осветителя и CCD матрицата. При моделирането на оптичната система се използваха методите на 3D симулации за пресмятане на оптичните и конструктивни параметри на

анализираната система. Основно се работеше с програмния пакет ZEMAX 9.0 12.10.2009 [3]. Съпоставки се правеха и с аналогичните пакети ОПАЛ и ОСЛО.

Общият вид на оптичния тракт на системата за изброяване на соматични клетки е показан на Фигура 1.



Фиг.1

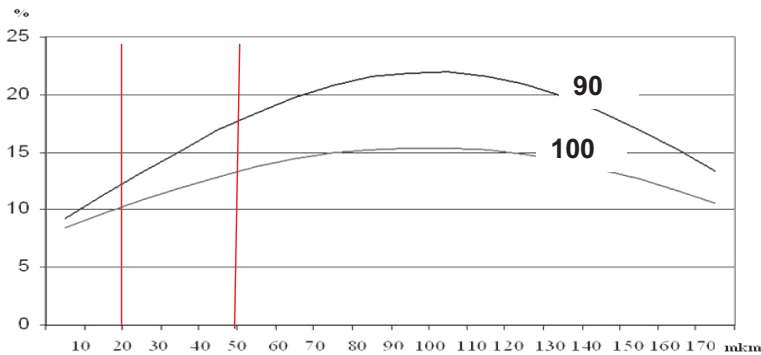
Основните характеристики на оптичния тракт са следните :

1. Изобразяване на пространство с размери 1X1 мм върху CCD детектор с размери 6.9X4.8 мм.
2. Геометрично увеличение на системата – 4X
3. Разделителна способност в пространството на обекта – 20 мкм
4. Дълбочина на изобразяваното пространство – до 100 мкм.
5. Спектрална област на трансформацията – 460 нм
6. Конструктивно геометрични ограничения за дължина на системата не по-голяма от 190 мм и разстояние между пробата и първия оптичен елемент от 15мм.

В се дискутират aberационните характеристики на оптичната система. Там остана открит въпросът с границите на реалната пространствена разделителна способност на системата. Основен конструктивен елемент в реалната система се явява и дебелината на измервателната микрофлуидна камера, респективно дълбочината на изследвания млечен слой.

На фигура 2 е показано изменението на контрастно-честотната характеристика на оптичната система в равнината на изображението. На абцисата е нанесена различната дълбочина на камерата. Графиките са за разделителна способност съответно 90 линии на милиметър и 100 линии на милиметър. При по-голяма

разделителна способност е естествено честотно-контрастната характеристика да се влошава в пространството на изображението. В оптиката се приема, че приемливата граница на контраст е около 15%. Или контрастът е недостатъчен за регистриращата система ако е по-нисък от 15%. По-чувствителните CCD детектори допускат и по-нисък контраст на анализираният обект. Така, че границата от 15% може да се снижи до към 11-12 % и пак ще се регистрира контрастност.



Фигура 2

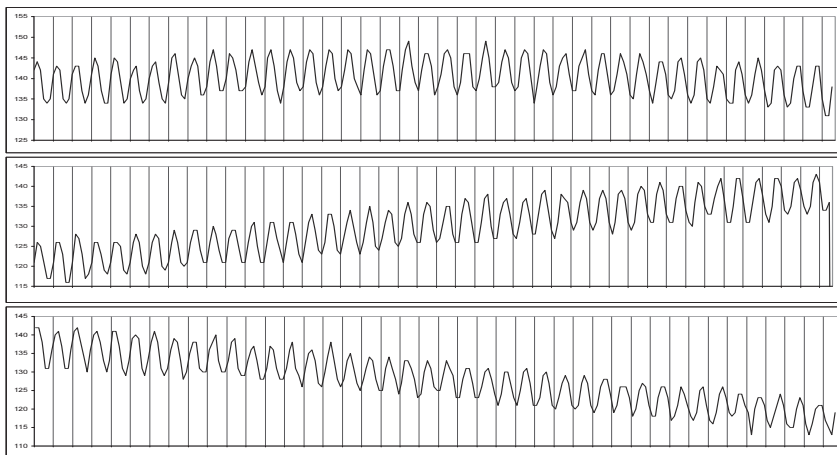
От фигура 2 се вижда, че с намаляването размера на камерата спада и контрастът на изображението при желаната разделителна способност от 100 линии на милиметър в пространството на изображението. Пространството между двете криви е пространство на системи с разделителна способност между 90 и 100 линии на милиметър. Отстъплението от 100 линии на милиметър в практиката означава, че от разделянето на два обекта от 10 μkm ще спадне на 11.1 μkm. В нашия случай големината на един пиксел на регистриращата матрица е 9 μkm. В пространството на обекта това е преминаване от 2.5 μkm към разрешение от 2.77 μkm, което не е фатално за разделянето на соматични клетки с минимален размер от 4 μkm. В целият диапазон от 20 до 180 μkm всички разстояния между двете стени на микрофлуидната камера са допустими от оптична гледна точка.

В процеса на изследване се оказа, че ако дълбочината на камерата с мляко е от порядъка на 100 μkm, се получават нежелани оптически ефекти дължащи се на разсейването на излъчената светлина от светеща клетка, която се намира „на дъното“ на микрофлуидната камера. Ефектите се проявяват като неконтролируемо увеличаване на видимия светъл образ на точката. Размерът на това „размазване“ се проявява видимо като присъствие на други формирания в състава на млякото. Тези ефекти не могат да се отчитат точно защото различните проби мляко имат различна оптическа плътност и съответно разсейването в обема на млякото е различно. Решението на проблема е в намаляването на изследвания обем мляко в дълбочина. Колкото е по-малко разстоянието между двете стени на микрофлуидната камера, толкова по-малко клетки ще има „в дълбочина“.

Намирането на оптимални размери на микрофлуидната камера е чисто практическа задача, свързана и с енергочувствителността на конкретния датчик на изображение. В случая се предвижда да се използва KAF 402 с достатъчно добра контрастна чувствителност за да допусне разделяне на два обекта дори с 10 процентова разлика в интензивността им. От анализа на характера на изменение на контрастно-честотната характеристика на фигура и изискването за минималност на анализирания слой мляко става ясно, че разстояния по-големи от 20 μkm в рамките на до 50 μkm са напълно приемливи за да може надеждно да се разделят обектите на наблюдение.

Според заложената оптимизационна функция при конструирането и оптимизацията на оптичната система увеличението и трябва да бъде 4X. За уточняването на увеличението на системата бе използвана мика с разстояние между групата шрих-пауза равно на 10 μm . Регистрацията на изображението е направена със ССD камера с детектиращ елемент с размери 6.9 X 4.8 мм. Можаха да се изброят 175 групи шрих-пауза. Цялото изобразявано пространство е с размер $p = 175 \times 0.010 = 1.75 \text{ mm}$. Следователно реалното увеличение на системата е равно на $6.9\text{mm} / 1.75 \text{ mm}$. Или реалното увеличение е равно на 3.942 пъти!

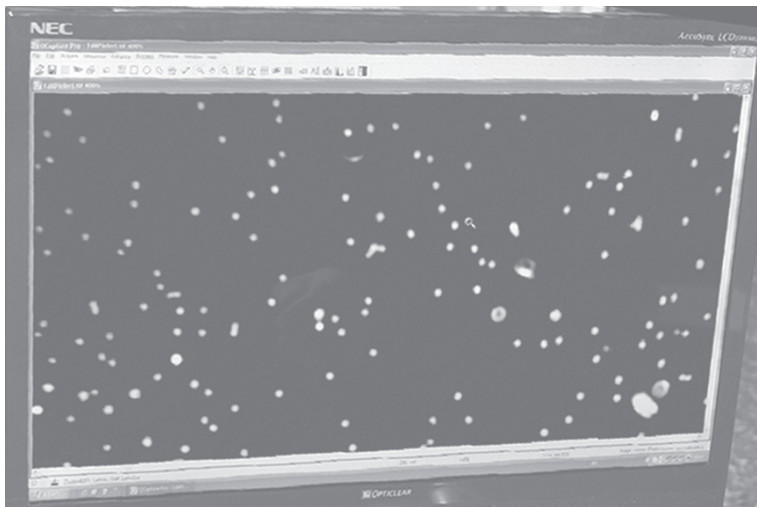
Сумарното влияние на геометричните aberации може да се изследва по следния начин. Прави се една снимка на мика с размер на групата шрих-пауза 7 μm . След това изображението се цифрова чрез функция на пакета MatKat. Отцифровката е направена чрез закръгляне на интензивността на пиксела до цяло число. С цел изследване на изкривяванията когато формиращите лъчи са встрани от оптичната ос се вземат три линии – в горния и долния край и в средата. Редът се състои от 768 пикселни стойности. Поради невъзможността на Excel да работи с повече от 250 точки един цял ред е показан на три части – по средата, в левия и десния край на реда. Първо се вижда повишаването на стойностите от ляво надясно. Този ефект се дължи на нехомогенното разпределение на интензивната на лъчението на осветителния диод от долу. Тази особеност на системата може да се избегне чрез поставяне на разсейващ мътен екран преди лъчението от диода да достигне до микрофлуидната камера с млякото. Другата характеристика, която може да се изведе от фигурите е нивото на изкривяванията, които водят до „размазването“ на светещите шрихи на мирата. Вертикалните линии на фигурите са на равно разстояние за да може чрез тях да се регистрират измененията на линейните размери вследствие изкривяванията на системата. Вертикални линии са наложени върху регистрираното изображение на разстояние от 7 пикселни стойности – 1-ви пиксел, 7-ми пиксел, 14-ти пиксел...и т.н.т . Може категорично да се заяви, че ако разстоянието например на два съседни максимума в единия край на линията остава постоянно като се мине през центъра и се стигне до другия край на картината , това е гаранция, че груби изкривявания от вида кома, астигматизъм или дисторсия липсват.



Фигура 3

На Фигура 4 е показана снимка на екрана на компютъра на която е възстановено ползването на оптичната система когато се наблюдава реална

млечна среда. Виждат се добре оформените бели кръгли обекти-изображения на светещите соматични клетки. Не кръглите и по-големи петна на изображението са други включения или конгломерати от мъртви клетки. Добре оформените изображения са доказателство за реалните възможности на оптичната система. Става ясно, че софтуерното разпознаване на соматичните клетки преди тяхното изброяване не е трудна и невъзможна задача.



Фигура 4

В направеното изследване се демонстрират качествата на реално работещ оптичен тракт и са дискутирани важни параметри при практическата реализация на подобна оптична система. Показана е възможността да се конструират подобни системи при занижени изисквания към честотно-контрастната характеристика на системата. Коментираните начини за изследване на разделителната способност на системата гарантират надеждността и при последвало промишлено производство. Указаните оптимални конструктивни параметри на експерименталната камера я правят удобна за серийно производство.

ЛИТЕРАТУРА

[1] <http://www.chemometec.com/en-GB/global/p87.aspx>

[2] <http://www.delaval.com/>

[3] <http://www.radiantzemax.com/en/design/>

[4] Манев А., Динев Д., Ташев В., Конструирание и пресмятане на оптична система за броене на соматични клетки в млечни проби, Сборник научни трудове от юбилейна научна конференция по повод 10 години от създаването на НВУ „Васил Левски”, 14-15 юни 2012, том 2, стр. 95-104

За контакти:

Гл.ас. Ангел Манев, Институт за космически изследвания и технологии БАН,
тел. : 088 505 1357, e-mail: amanev@abv.bg

Докладът е рецензиран.