

Sistema Sensor de Células Somáticas en Leche de Cabra

Álvaro J. Conde ^a, Rossana E. Madrid ^{a,b} y Mónica Tirado ^c

^a Departamento de Bioingeniería, FACET, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

^c Laboratorio de Propiedades Dieléctricas de la Materia, Dpto. de Física, FACET, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina

Resumen—Se presenta un método para cuantificar el número de células somáticas en leche de cabra basado en cambios de permitividad. Se correlaciona la amplitud de la permitividad de relajación de membrana con la fracción de volumen de las células. El aumento del número de células somáticas por sobre un nivel determinado en general indica la presencia de mastitis sub-clínica. A pesar de que la mastitis sub-clínica se puede detectar en leche vacuna mediante métodos sencillos, éstos no son aplicables en leche caprina debido a su difícil interpretación por la interferencia de partículas citoplasmáticas. La evidencia demuestra que sólo las células vivas influyen en el cambio de amplitud de la permitividad de esta relajación, por lo que sería posible eliminar la interferencia de las partículas citoplasmáticas. Cada grupo de células similares posee un espectro característico a partir del cual se obtienen las frecuencias características a la cuales sucede esta relajación. A fin de desarrollar un sistema sensor para determinar la cantidad de células somáticas en leche de cabra se midieron dichos espectros en el rango de frecuencias de 1000 Hz a 10 MHz usando un Analizador de Impedancia HP 4192A y una celda de espaciado variable con electrodos de platino.

Palabras clave—mastitis sub-clínica, espectroscopia de impedancia, permitividad.

I. INTRODUCCIÓN

La mastitis es un término general que se refiere a la inflamación de la glándula mamaria. Está caracterizada por cambios físicos, químicos y bacteriológicos en la leche y cambios en el aspecto de la ubre. Hay dos etapas claramente diferenciadas en esta enfermedad, mastitis clínica (MC) y sub-clínica (MSC). La MC está caracterizada por anomalías visibles en la ubre y en la leche, siendo ésta difícil y costosa de remediar, representando a veces, riesgos para la salud humana, mientras que la MSC es menos obvia que la anterior, pudiendo ser únicamente detectable por mediciones químicas, físicas o celulares de la leche. Su reconocimiento temprano, es decir en su etapa sub-clínica, es importante para disminuir las pérdidas de producción, daño al tejido del animal y posibles sanciones por controles de instituciones de salud [1].

El método estándar para diagnosticar MSC en caprinos es el análisis microbiológico de muestras de leche. Sin embargo, este tipo de análisis requiere de personal calificado, tiempo y dinero. El Recuento de Células Somáticas (RCS) o, en inglés, Somatic Cell Count (SCC) ha sido aceptado como el mejor índice cuantitativo de la inflamación de la glándula mamaria y para predecir la infección en leche de vaca. En general el aumento del SCC por sobre un nivel determinado, que depende de varios

factores, indica la presencia de la MSC. Sin embargo muchos autores concuerdan en que los umbrales de SCC (para los cuales se puede decir que el animal presenta MSC) para leche de cabra son mayores que para leche de vaca [2].

Esta diferencia en los umbrales se explica mediante los diferentes tipos de secreción que posee cada animal. La leche de cabra se produce por un tipo de secreción denominada apócrina, la cual da origen a partículas citoplasmáticas, que no contienen ADN, pero que están en rango del tamaño de las células somáticas (CS) o, en inglés, somatic cells (SC), las que pueden contarse erróneamente como células cuando se usan métodos de conteo de partículas. Es por lo tanto necesario utilizar métodos de medición que diferencien características particulares de las SC, como ser por ejemplo, la presencia de ADN o propiedades dieléctricas particulares [3].

Una descripción muy completa de los métodos actuales para el SCC se puede encontrar en el trabajo de Baro *et al.*, 2005. [4]. De todos los métodos citados por diferentes autores, las propiedades eléctricas presentan las características más interesantes, ya que los dispositivos basados en ellas son, en general, fáciles de implementar y de bajo costo. Entre ellas se destaca la permitividad eléctrica ya que se relaciona con la capacidad eléctrica de una sustancia y es fácil de medir [5].

Aprovechando la relación que existe entre la variación de permitividad y la concentración de partículas con membrana [5] sería posible estimar el SCC de la leche, puesto que las células somáticas son partículas rodeadas por una membrana aislante. Es importante destacar que los elementos que no pertenecen a la biomasa, como ser burbujas de aire, sólidos suspendidos (incluyendo células muertas) no contribuyen significativamente a los cambios de permitividad [6].

De la revisión bibliográfica realizada, son muy pocos los trabajos que hablan de estudios de espectroscopia dieléctrica en leche [7], [8], [9] y sólo uno de ellos evalúa las propiedades dieléctricas en leche de cabra [10]. En particular, Grillo *et al.*, 2007 [7] hace referencia a la estimación de SC en leche de vaca por medio de mediciones de espectroscopia dieléctrica, pero no existe ningún trabajo que haga referencia a mediciones de este tipo en leche de cabra. En su trabajo realiza mediciones de permitividad relativa (a la frecuencia de 300 kHz) y las relaciona directamente con el SCC de las muestras a distintas temperaturas, obteniendo una buena correlación. Aunque sus mediciones son en leche de vaca, éstas podrían ser extrapolables a leche de cabra.

Se propone la aplicación de mediciones de espectroscopia dieléctrica, particularmente de la dispersión de membrana o también llamada dispersión β , para cuantificar las células somáticas en leche de cabra. Esta hipótesis se fundamenta en que la dispersión β permitiría cuantificar sólo las células somáticas, sin la interferencia de los restos celulares que aparecen en la leche de cabra y que dificultan la aplicación de otros métodos de cuantificación, como los empleados en leche de vaca.

II. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA

La Espectroscopia de Impedancia también conocida como Espectroscopia Dieléctrica consiste en medir las propiedades de un medio en función de la frecuencia. El método se basa en analizar la interacción del campo eléctrico externo aplicado al sistema y ver de qué manera se ponen de manifiesto algunos mecanismos físicos de la muestra dependiendo de la frecuencia del mismo. El comportamiento de los tejidos biológicos revela una alta dependencia de los parámetros dieléctricos con la frecuencia, debido a los diferentes fenómenos de relajación que ocurren cuando una corriente circula a través de la muestra [11].

Cuando la frecuencia del campo eléctrico aplicado aumenta, la conductividad de la mayoría de los tejidos también aumenta debido principalmente a la relajación dipolar de las moléculas de agua [11]. Este aumento en conductividad está asociado con un descenso en permitividad, desde valores muy altos (miles de unidades dieléctricas) a frecuencias bajas (10 Hz - 100 kHz) hasta valores de algunas unidades dieléctricas a frecuencias altas (>1 GHz) [12], [13]. Los espectros de permitividad y de conductividad están caracterizados entonces, por cuatro relajaciones principales, α , β , δ y γ . Cada una de estas relajaciones ocurre a una frecuencia específica y este comportamiento es típico para la mayoría de los sistemas biológicos, aunque las magnitudes y frecuencias de las dispersiones puedan variar. Valores tabulados de permitividad y conductividad se pueden consultar en Foster y Schwan, 1989 [14], Schwan, 1957 [5] y Schanne y Ruiz-Ceretti, 1978 [15]. La relajación que nos importa en este trabajo es la relajación β , la cual está relacionada con el proceso de carga de las membranas presentes en el sistema y es la que nos permite relacionar el SCC con la permitividad. Existen sólo dos modelos que relacionan la fracción de volumen con la dispersión β [5], [12]. En nuestro caso aplicamos el modelo de Schwan por simplicidad. Considerando una baja conductancia de membrana ($G_m \approx 0$) y una baja concentración de células, se puede expresar la amplitud de la permitividad dieléctrica como:

$$\Delta\epsilon = \frac{9}{4} \frac{pRC_m}{\epsilon_0} \quad (1)$$

Donde

$\Delta\epsilon$	amplitud de la dispersión β
R :	radio de la célula
C_m :	capacidad de la membrana celular
ϵ_0 :	permitividad del vacío
p :	fracción en volumen de las células

Para partículas no esféricas, el término $9/4$ es diferente. De esta manera el cambio de permitividad $\Delta\epsilon$ es proporcional a la fracción en volumen de las células presentes en la suspensión ya que la capacidad de membrana se presupone constante en el orden de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [16]. Esta técnica también se emplea para la cuantificación de biomasa en un fermentador [6].

III. MATERIALES

Las mediciones dieléctricas en baja frecuencia se realizan generalmente colocando la muestra en una celda de medición (capacitor de placas paralelas) conectada a un analizador de impedancia. El instrumento genera un voltaje alterno a frecuencias discretas y se mide el módulo de la impedancia y el ángulo de fase. Las propiedades dieléctricas de la muestra se calculan a partir de estos datos. Las mediciones se realizaron utilizando una celda de espaciado variable, ya que este método permite eliminar el error introducido por la polarización de los electrodos, al ser la impedancia de los mismos, independiente de la distancia de separación entre ellos [17].

La celda de acrílico, Fig. 1, tiene un recinto cilíndrico con pequeños orificios centrales superior e inferior para su llenado y eliminación de burbujas. Por los extremos del cilindro se insertan los tornillos de acrílico con los electrodos en sus extremos. El paso de los tornillos está calibrado a 1mm por vuelta completa, lo que es muy importante ya que es necesario conocer con precisión la separación Δl entre los electrodos para cada medición [18].

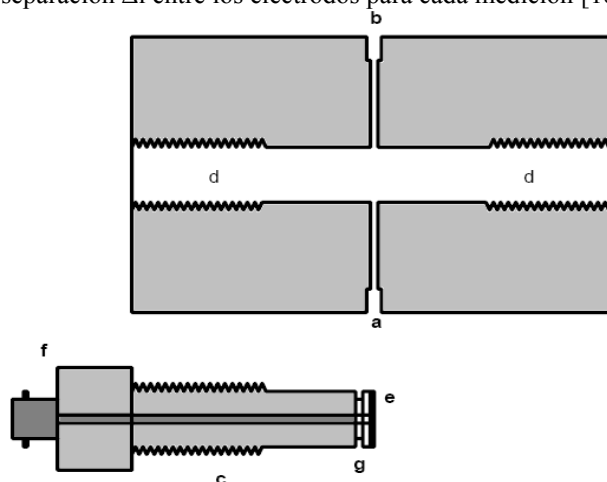


Fig 1. Representación esquemática de la celda de medición: a) Conducto de llenado; b) conducto de salida del exceso de la muestra y purgado; c) tornillo de acrílico con el electrodo en la punta; d) roscas hembra para los tornillos de acrílico; e) electrodos de platino; f) conector BNC; g) ranura para colocar el o-ring. Las mediciones se realizan colocando los tornillos de acrílico con los electrodos en cada uno de los orificios laterales y llenando con la muestra el espacio comprendido entre ambos o-ring.

Los electrodos de platino de alta pureza son planos, tienen 15 mm de diámetro y están recubiertos con negro de platino, a efectos de disminuir la impedancia de polarización de las interfaces electrodo-muestra [19].

Las mediciones se realizaron en el rango de frecuencias de 100 Hz a 10 MHz utilizando un Analizador de Impedancia HP 4192 A. La celda se conectó al instrumento mediante la configuración 5T [20] y se aplicó una excitación de 400 mV.

Se termostatiza el laboratorio a 25 °C y las muestras de leche son calentadas en baño controlado a esa misma

temperatura para asegurar una buena repetibilidad de las mediciones.

Para la calibración del instrumento se usó el método tetrapolar [21] el que, además de las calibraciones de cortocircuito y de circuito abierto, incluye una calibración suplementaria usando como patrón la celda llena con una solución conocida de NaCl de conductividad muy próxima a la conductividad de la muestra. Considerando los valores típicos de conductividad de las muestras de leche, los valores de la permitividad y conductividad de la suspensión electrolítica (0.255 g de NaCl en 100 ml de agua destilada), resultaron [22]:

$$\varepsilon(\omega) \cong 78.48 \text{ y } \sigma(\omega) \cong 0,5 \text{ [S/m]} \quad (2)$$

Las muestras de leche fueron facilitadas por un convenio de colaboración con el Laboratorio de Investigación en Producción Animal del INTA Leales, Tucumán. Este laboratorio posee un control regular de la salud de los animales por lo que fue posible obtener muestras de leche con un rango de SCC más o menos definido (alto, medio y bajo). Las muestras provienen de dos razas de cabras: Criolla y Sanen en diferentes etapas de lactación.

Para el Conteo de Células Somáticas se utilizó el método establecido como Gold Standard: el Conteo Directo por Microscopio Óptico basado en el Form FDA 2400d [23]. Para la coloración se utilizó Verde-Y-Metil-Pironina (Sigma-Aldrich) y el protocolo descrito en el trabajo de Zeng *et al.*, 1999 [24].

IV. RESULTADOS

En los espectros obtenidos para todas las muestras de leches se observó un cambio en los valores de permitividad. Para asegurar que los cambios en permitividad observados corresponden a una relajación, y no a efectos de polarización de electrodos, se calcula la derivada de la permitividad (calculada a partir de datos correspondientes a una separación fija de electrodos, omitiendo cualquier corrección por polarización de los mismos) con respecto al logaritmo de la frecuencia [25]. Una gráfica de este tipo se muestra en la Fig. 2.

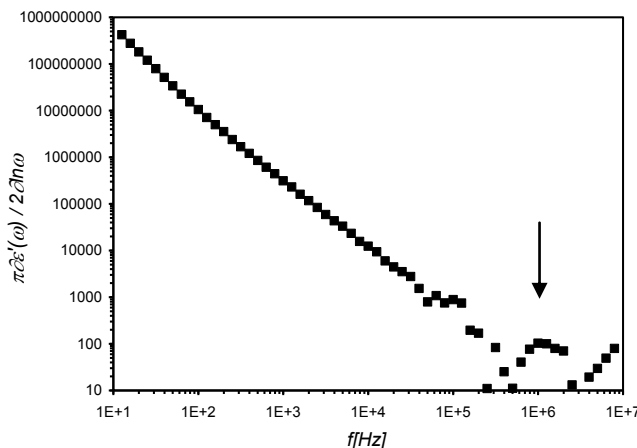


Fig.2. Derivada de la permitividad relativa (calculada a una separación fija entre los electrodos) con respecto al logaritmo de la frecuencia para una muestra de leche de cabra.

La línea recta a baja frecuencia corresponde a la impedancia de polarización de los electrodos, mientras que el máximo (flecha), a frecuencias altas, muestra la presencia de una dispersión dieléctrica. Se puede visualizar claramente una región de dispersión alrededor de 1 MHz.

En la figura no puede apreciarse la dispersión α , o de baja frecuencia, ya que a frecuencias del orden de 1 KHz y menores, la contribución de la reactancia del electrodo a la reactancia total de la celda es mayor que la contribución de la muestra y por lo tanto solo medimos electrodos y no la permitividad de la leche de cabra [26].

En el análisis de los datos es fundamental determinar claramente cuál relajación se está midiendo. La dispersión β está relacionada con la carga ubicada en la interfase de las membranas celulares, y generalmente se da a frecuencias cercanas a la relajación δ o de Maxwell-Wagner (relajación de pequeña amplitud cuya frecuencia característica depende sobre todo de la conductividad de la solución). Como esta relajación no está relacionada con las células era necesario saber si esta última interfería o no en las mediciones realizadas. Utilizando los valores de ε y σ obtenidos en la ecuación (2), el tiempo de relajación de Maxwell-Wagner se calcula como:

$$\tau_{MW} = \frac{\varepsilon}{\sigma} = \frac{78}{0,5} = 156.8,85.10^{-12} [s]$$

por lo tanto la frecuencia de relajación de Maxwell-Wagner para las muestras de leche de cabra resulta:

$$\tau = \frac{1}{2\pi f}$$

$$f_{MW} = \frac{1}{2\pi\tau_{MW}} \cong 100 [MHz]$$

Esta frecuencia está muy por encima de la relajación medida experimentalmente (Fig. 2), por lo que se puede asegurar que a $f \cong 1$ MHz, la relajación que se observa se debe únicamente a la dispersión β . Para estos sistemas, la frecuencia f_{MW} está fuera del alcance de medición del impedancímetro HP 4192 A.

En la Fig. 3 se grafica la variación de permitividad entre 1 MHz y 10 MHz ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{1MHz} - \varepsilon_{10MHz}$) en función del SCC.

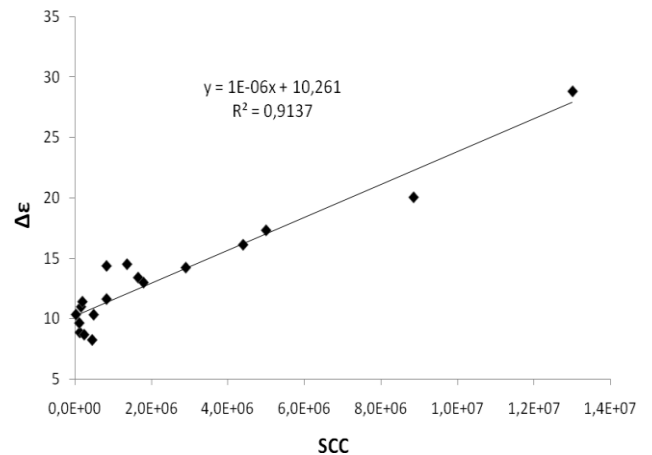


Fig.3 Variación de la amplitud de relajación de membrana $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{1MHz} - \varepsilon_{10MHz}$ en función del número de células somáticas.

Al evaluar la dispersión β de los datos medidos y relacionarlos con el SCC, se obtuvo la recta de la Fig. 3 con un $r^2=0.9137$. Estos resultados confirman la hipótesis planteada inicialmente para este trabajo, ya que la amplitud de la permitividad aumenta al aumentar el número de SC presentes en la muestra.

Para el cálculo de la amplitud $\Delta\varepsilon$ de la Fig. 3 se emplea la ecuación (1) de Schwan para bajas fracciones de volumen. Esta ecuación no posee ordenada al origen, es decir la

diferencia de permitividad relativa es igual a cero cuando la concentración es cero. En el caso presentado, existe una ordenada al origen, que se podría atribuir a la presencia de los glóbulos de grasa. Es decir, la recta estaría “montada” sobre un valor de continua, común a todos los puntos, que al estar en un porcentaje similar, entre 4 y 6% para todas las muestras, modificarían el valor que sí cambia en todas ellas, que es el SCC. El porcentaje de grasa presente en las muestras de leche podría afectar las mediciones de $\Delta\epsilon$, pudiendo ser otro factor a tener en cuenta a la hora de realizar la recta de calibración. Es importante destacar al respecto, que todas las muestras empleadas provienen de un laboratorio de investigación animal, por lo que su estado de salud y alimentación son factores muy controlados. Por lo tanto, el porcentaje de grasas en las muestras es similar, cosa que no ocurre en muestras normales de tambos en general.

La dispersión de los valores de $\Delta\epsilon$ en la recta de calibración podría deberse además a la presencia de microburbujas que también influyen en la permitividad. Esto es más evidente en puntos de baja SCC, donde el $\Delta\epsilon$ es menor y más susceptible a errores experimentales.

V. CONCLUSIONES

Se observa que las mediciones de impedancia realizadas en muestras de leche de cabra en el rango de frecuencias de 1 a 10 MHz permiten medir la relajación β . Cuando las muestras de leche provienen de animales que tienen mastitis sub-clínica o clínica, la amplitud de la permitividad medida entre estas dos frecuencias aumenta conforme aumenta el número de células somáticas presentes en la muestra.

Los resultados encontrados son novedosos, no existe en la bibliografía un reporte donde se correlacione el $\Delta\epsilon$ de muestras de leche de cabra con el SCC. A futuro se puede mejorar el método haciéndolo más *rápido*, por ejemplo, empleando sólo dos frecuencias; *económico*, utilizando electrodos de acero recubiertos con óxido de iridio; *práctico*, por ejemplo, termostalizando automáticamente las muestras en la celda y *sencillo* integrando todos los pasos en un solo aparato.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Investigación en Producción Animal del INTA Leales, Tucumán por el suministro de las muestras de leche de cabra. También se agradece al Laboratorio de Propiedades Dieléctricas de la Materia del Departamento de Física, UNT por el uso del equipo HP 4192A. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos CIUNT E347 y CIUNT 26/E419.

REFERENCIAS

- [1] Shearer J. K., Harris B. Jr., 1992. Mastitis in Dairy Goats. DS 85, Animal Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- [2] Poutrel B., Lerondelle C., 1983. Cell content of goat milk: California mastitis test, Coulter Counter, Fossomatic for predicting half infection. *Journal of Dairy Science* 66, pp. 2575-2579.
- [3] Haenlein George F.W., 2002. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Ruminant Research* 45, pp. 163-178.
- [4] Baro J.A., Pérez M.A., Grillo G.J., 2005. Method Comparison for Diagnose of Subclinical Mastitis and Milk Quality Determination in Raw Milk. IMTC (Instrumentation and Measurement Technology Conference) Ottawa, Canada. IEEE.
- [5] Schwan H.P., 1957. Electrical Properties of tissue and cell suspensions. In: Lawrence, J. H. and Tobias, C. A., Eds., *Advances in Biological and Medical Physics*, Vol. 5., N. Y.: Academic Press, pp. 147-209.
- [6] Harris, C.M, Todd, R.W., Bungard, S.J., Lovitt, R.W., Morris, G., Kell, D.B, 1987. Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: A novel method for the real time estimation of microbial biomass, *Enzyme Microbiol. Tech.*, 9, pp. 181-186.
- [7] Grillo G.J., Pérez M.A., Antón J.C., Ferrero F.J., 2002. Direct-evaluation of the Fresh-Milk Somatic Cell Concentration (SCC) trough Electrical Permittivity Measurements. *IEEE ITMC*. Anchorage, AK, USA. Vol. 1, pp. 153- 157.
- [8] Nunes A.C., Bohigas X., Tejada J., 2006. Dielectric study of milk for frequencies between 1 and 20 GHz. *Journal of Food Engineering* 76, pp. 250-255.
- [9] Kumar P., Coronel P., Simunovic J., Truong V.D., Sandeep K.P., 2007. Measurement of Dielectric Properties of Pumpable Food Materials under Static and Continuous Flow Conditions. *Journal of Food Science* 72, pp. 177-183.
- [10] Laogun A. A., 1986. Dielectric properties of mammalian breast milk at radiofrequencies. *Phys. Med. Biol.*, Vol. 31, No 5, pp. 555-561.
- [11] Schwan, H.P., 1988. Biological effects of non-ionizing radiation: Cellular properties and interactions. *Ann. Biomed. Eng.*, 16, pp. 245-263.
- [12] Grosse, C., 2002. ‘Relaxation Mechanisms of Homogeneous Particles and Cells Suspended in Aqueous Electrolyte Solutions,’ in *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*, Angel Delgado (Ed.), *Surfactant Science Series*. Vol. 106: Cap. 11, 277-327, Marcel Dekker, Inc. New York. ISBN: 0-8247-0603-X.
- [13] Grosse, C., Tirado, M., Pieper, W., Pottel, R., 1998. Broad Frequency Range Study of the Dielectric Properties of Suspensions of Colloidal Polystyrene Particles in Aqueous Electrolyte Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 205, pp. 26-41.
- [14] Foster, KR and HP Schwan, 1989. Dielectric properties of tissues and biological materials: a Critical Review. *Critical Reviews in Bioengineering*, 17, pp. 25-104.
- [15] Schanne, O.F., Ruiz Ceretti E. P., 1978. Impedance measurements in biological cells. Wiley Interscience Publication, pp. 430.
- [16] Schwan, HP. 1983. Electrical properties of blood and its constituents: alternating Current spectroscopy. *Blut*, 46, pp. 185-197.
- [17] Tirado M.C., 2002. Comportamiento Dieléctrico de Suspensiones Electrolíticas. Tesis Doctoral. Departamento de Física. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Universidad Nacional de Tucumán.
- [18] Tirado, M.C., Arroyo, F.J., Delgado, A.V., Grosse, C., 2000. Measurement of the Low-Frequency Dielectric Properties of Colloidal Suspensions: Comparison Between Different Methods. *Journal of Colloid and Interface Science*, 227, pp. 141-146.
- [19] Tirado, M., Grosse, C., 2003. Conductivity dependence of the polarization impedance spectra of platinum black electrodes in contact with aqueous NaCl solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 222 (1-3), pp. 293-299.
- [20] Honda, M., 1989. "The Impedance Measurement Handbook. A guide to Measurement Technology and Techniques". Hewlett Packard, Yokogawa, Japan.
- [21] Grosse, C., Tirado, M., 2001. Improved calibration of impedance analyzers for measurements on highly conductive liquids. *IEEE Trans. Inst. Meas.* 50, pp. 1329-1333.
- [22] Stogryn A., 1971. Equations for calculating the dielectric constant of saline water. *IEEE Trans. Microwave Theory and Tech.*, 19, pp. 733-736.
- [23] DIRECT MICROSCOPIC SOMATIC CELL COUNT - <http://www.fda.gov/opacom/morechoices/fdaforms/FDA-2400d.pdf>
- [24] Zeng S.S., Escobar E.N., Hart S.P., Hinckley L., Baulthaus M., Robinson G.T., Jahnke G., 1999. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Ruminant Research* 31, pp. 103-107.
- [25] Wübbenhorst M., van Turnhout J., 2000. Conduction-Free dielectric loss: a Powerful Tool for the Analysis of Strong (Ion) Conducting Materials. *Dielectric Newsletter* 1-3.
- [26] Grosse C., Tirado M., 1996. Measurement of the dielectric properties of polystyrene particles in electrolyte solution, *Mater. Res. Soc. Proc.* 430, pp. 287-293.