

EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN DEL CAMPO VISUAL DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO

Luis C. Martorelli, Javier R. Bergamini, Alejandro Paola

Laboratorio de Óptica, Calibraciones y Ensayos- Facultad de Ciencias Astronómicas y Geofísicas
Universidad Nacional de La Plata. Argentina, TE 0054-221-4274914 jrbergamini@yahoo.com

Resumen: El presente trabajo es el resultado de la experiencia adquirida por el Laboratorio de Óptica, en el ensayo de microscopios ópticos compuestos, siguiendo los procedimientos realizados, en acuerdo con los requerimientos establecidos por la Norma ISO 17025. Nosotros proponemos un criterio para la determinación del diámetro del campo visual y la evaluación de la incertidumbre de medida asociada a dicha determinación, de manera que podamos obtener el valor más exacto posible del área del campo visual. Dicho valor estimado es utilizado para la realización de conteos directos en microscopios.

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las estructuras del ser vivo está basado casi totalmente en el estudio con el microscopio. El microscopio óptico es un instrumento que permite la observación de objetos y detalles de estructuras tan pequeñas que no podrían ser observadas a simple vista. Con él, nuestro grado de visibilidad se amplía en cientos o miles de veces, gracias a un conjunto de lentes, dispuestos convenientemente. Las principales dificultades en la observación y estudio de estructuras biológicas son su reducido tamaño y su transparencia a la luz visible. Dado que el microscopio permite superar estas dos dificultades, su uso y el conocimiento de los principios y técnicas en microscopía, resultan fundamentales para el desarrollo de la investigación en ciencias biológicas.

El microscopio permite realizar un análisis cualitativo de las estructuras pero también es muy útil para realizar estudios cuantitativos de las mismas. Es muy usual en el campo de la microbiología, la química, etc. utilizar el microscopio para realizar mediciones sobre las estructuras de microorganismos, o estudiar la densidad de los mismos que se encuentran presentes en una muestra, tarea esta que se la ha denominado micrometría.

Varias técnicas se han desarrollado actualmente para poder realizar mediciones con los microscopios. La utilización de reglillas micrométricas, oculares con retículos graduados, o la comparación directa de las dimensiones de la muestra a una escala del micrómetro en el plano x-y del microscopio, son algunas de ellas.

El Recuento Total de Microorganismos por el Método de Breed y Prescott [1], es un método de recuento realizado a través de la observación directa en microscopios, actualmente utilizado como método de referencia [2]. Este método fue creado para realizar la determinación del número de células cuerpo en leche [3], [4]. El método por conteo directo en microscopios, es también utilizado para realizar conteos de leucocitos en orina [5], como así también en análisis extendidos de sangre [6]

Uno de los parámetros más importantes para poder realizar estas mediciones es conocer con mucha exactitud el área del campo visual que observamos, para distintos aumentos del objetivo y el ocular. Dado que en muchos casos, dependiendo de la calidad de sus componentes ópticos, este puede presentar algunas deficiencias, generalmente hacia los bordes, como aberraciones cromáticas, deformaciones de la imagen, falta de planicidad, en particular cuando utilizamos las magnificaciones más bajas, es importante determinar el diámetro efectivo del campo dentro del cual estas deficiencias no se manifiestan.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método de medición directa del campo visual, a partir de la determinación de su diámetro con una reglilla micrométrica graduada y evaluar las componentes de incertidumbre que se encuentran presentes en dicha determinación.

En el proceso de ensayo de un microscopio óptico compuesto, realizado en el Laboratorio de Óptica, la medida del diámetro del campo visual, acompañado con el valor de la incertidumbre que caracteriza dicha medida, es una de las magnitudes que el informe de dicho ensayo provee al cliente para su correcta utilización.

2. DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO DEL CAMPO VISUAL Y SU INCERTIDUMBRE

La determinación del valor del diámetro del campo, al cual definimos como el mensurando, se realiza colocando una reglilla micrométrica graduada sobre la platina del microscopio (fig. 1), la cual se ajusta hacia los bordes haciendo que estos se observen bien definidos.



Fig. 1

La fig. (2) muestra la imagen que observamos al medir el campo visual con una reglilla

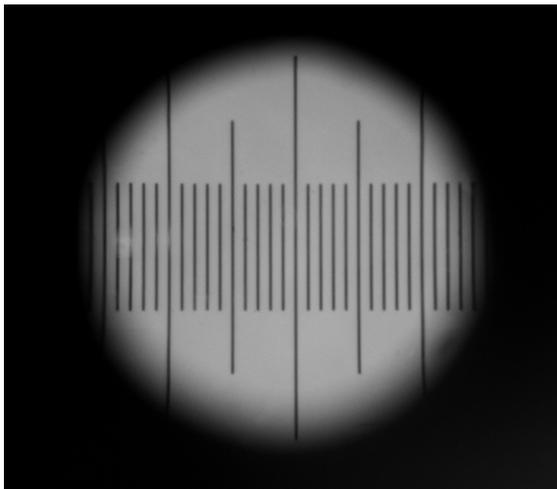


Fig. 2

La correcta ubicación de esta reglilla es uno de los pasos que requieren mayor cuidado en el proceso de medición. Dada la falta de referencia del centro del campo es altamente probable que la lectura que obtengamos del diámetro del campo este influenciada por una inadecuada ubicación de la

misma. En la fig. (3) se observa la reglilla descentrada, desplazada levemente hacia abajo, de un hipotético centro.

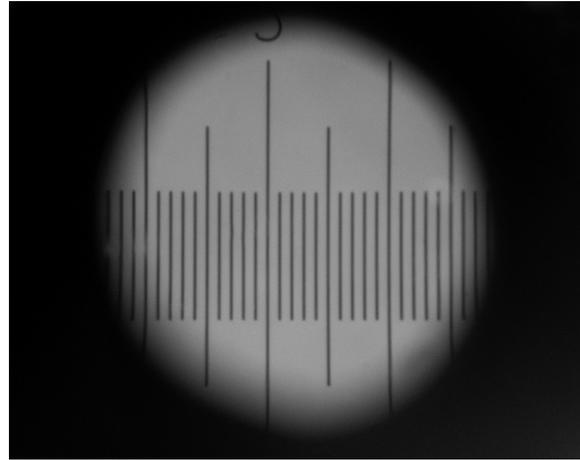


Fig. 3

En la fig. (4) esquematizamos la situación descrita. Supongamos que trazamos una línea imaginaria por el centro de la reglilla y que ella determinará la medida realizada del campo. Podemos fácilmente visualizar que la incorrecta ubicación de la reglilla nos llevaría a cometer un error en la lectura del campo.

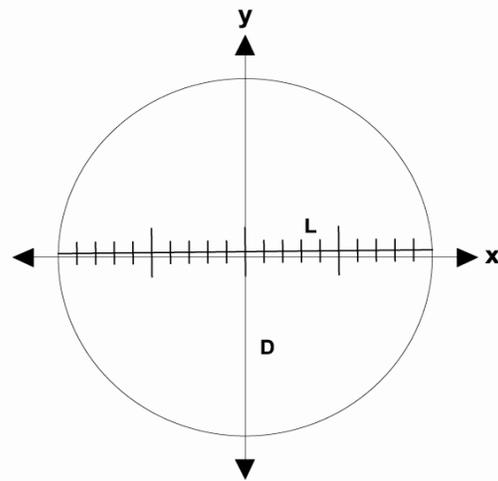


Fig. 4

Debemos observar que cualquier medición que realicemos de un círculo, al no pasar por un diámetro del mismo, la medida obtenida será siempre menor que este.

A fin de facilitar la comprensión del problema hemos incorporado un sistema coordinado coincidente con el centro del campo visual.

Podemos suponer entonces que todas las medidas que realicemos del campo, serán iguales o menores al valor del mensurando D. Asumimos desde la experiencia que las mismas estarán concentradas en una franja simétrica respecto del eje x. La menor medida que podemos obtener será aquella que este paralela al diámetro y desplazada hacia arriba o hacia abajo. La fig. (5) caracteriza esta situación donde se representan varias medidas obtenidas del campo visual, a las que denominamos L_k y la menor medida L_{inf}

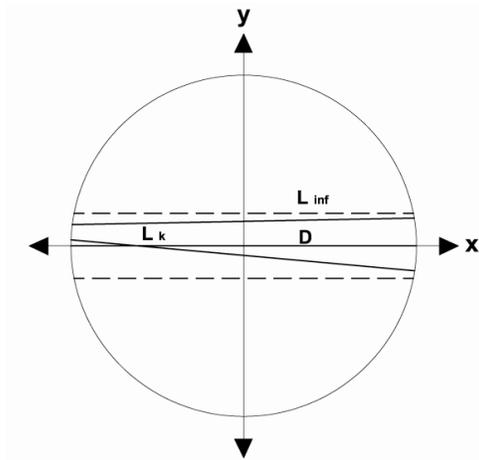


Fig. 5

Cualquier medida que realizamos, la podemos expresar en función del valor del diámetro D del campo y los ángulos α y β tal cual muestra la fig. (6). La expresión obtenida para L será.

$$L^2 = (D^2/2) \times (1 + \cos(\alpha + \beta)) \tag{1}$$

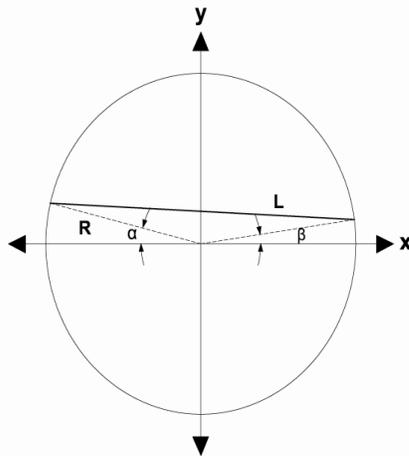


Fig. 6

Mediante una rotación podemos expresar a L en términos de D y el ángulo θ , como muestra la fig. (7).

$$L^2 = (D^2/2) \times (1 + \cos(2\theta)) \tag{2}$$

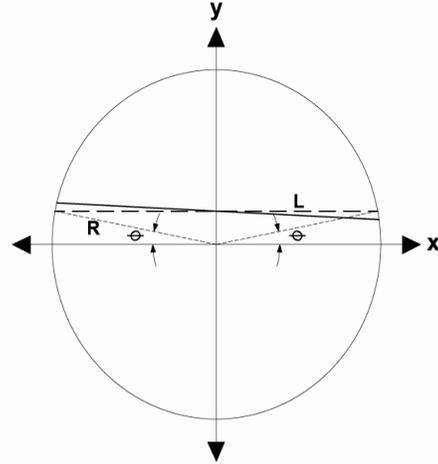


Fig. 7

De manera que la expresión obtenida para el diámetro del campo, suponiendo a este una circunferencia es:

$$D = L/\cos(\theta) \tag{3}$$

En la práctica el ángulo θ es muy pequeño entonces podemos realizar el siguiente cambio de variable, $\cos(\theta) \approx 1 - \delta$, con $\delta \ll 1$. El valor de δ será siempre positivo, aun cuando θ puede tomar valores positivos o negativos. De manera que D se expresa como:

$$D = L_m \times (1 + \delta) \tag{4}$$

Donde L_m es la mejor estimación de L y es igual a la media aritmética debida a n mediciones independientes L_k , de L. Denominamos L_k , a la lectura obtenida al medir el diámetro del campo con la reglilla micrométrica. El valor obtenido para δ es discutido en la siguiente sección.

El valor así obtenido para D será entonces el resultado de la medición, la cual es solo una aproximación o estimación del valor del mensurando. Esta medida solo estará completa cuando esté acompañado por la estimación de la incertidumbre [7].

La evaluación de la incertidumbre del resultado de la medida refleja la falta de conocimiento exacto del valor del mensurando y se realiza siguiendo la Guía para la Expresión de Incertidumbre en las Mediciones publicada por ISO (Edición 1993).

2.1 Incertidumbre en la medida del campo visual

La expresión para la incertidumbre estándar combinada de D, $U_c(D)$, para magnitudes de entradas no correlacionadas, en acuerdo con la Guía ISO [8], viene dada por la raíz cuadrada positiva de la varianza combinada $U^2_c(D)$.

$$U^2_c(D) = (\partial D/\partial L)^2 \times U^2(L_m) + (\partial D/\partial \delta)^2 \times U^2(\delta) \quad (5)$$

Donde $D = f(L_m, \delta)$, con lo cual derivando D en la ec. (4) obtendremos:

$$U^2_c(D) = (1+\delta)^2 \times U^2(L_m) + L^2_m \times U^2(\delta) \quad (6)$$

La raíz cuadrada positiva de $U^2(L_m)$, caracteriza la incertidumbre asociada a la medida de L y la raíz cuadrada positiva de $U^2(\delta)$ caracteriza la incertidumbre para la componente δ .

2.2 Componentes que contribuyen en la determinación de la incertidumbre de δ

La Estimación del valor de δ y su incertidumbre asociada se encuentra desarrollada en la Guía para la Expresión de Incertidumbre en las Mediciones [9]. De allí obtenemos que el valor esperado para δ será:

$$E(\delta) = \sigma^2/2 \quad (7)$$

Donde σ^2 , es la varianza que caracteriza la distribución normal de valores que toma θ , alrededor de su valor esperado cero.

La incertidumbre asociada a δ , $U(\delta)$ queda determinada por el desvío estándar de δ y será igual a la raíz cuadrada de la varianza de δ .

$$U^2(\delta) = \sigma^4/2 \quad (8)$$

El valor de σ caracteriza la incertidumbre estándar atribuida a θ , cuyo valor se obtiene de una distribución evaluada a partir de la información disponible basada en la experiencia del Laboratorio.

2.3 Componentes que contribuyen en la determinación de la incertidumbre de L

a) Repetibilidad de las Mediciones: Tomamos como mejor estimador de la esperanza de la magnitud L, de la cual se han obtenido n mediciones independientes bajo las mismas condiciones, a la media aritmética o promedio de las n observaciones:

$$L_m = 1/n \sum_{i=1}^n L_i \quad (9)$$

Dado que la estimación de L se realiza a partir de n observaciones independientes repetidas L_i , la incertidumbre estándar $u(L_i)$ de su estimación L_m es $u(L_i) = S(L_m)$ donde $S(L_m)$ es el desvío estándar experimental de la media y es igual a la raíz cuadrada de la varianza experimental de la media $S^2(L_m)$, donde:

$$S^2(L_m) = 1/n(n-1) \sum_{i=1}^n (L_i - L_m)^2 \quad (10)$$

La varianza experimental de la media y su raíz cuadrada positiva, el desvío estándar experimental, caracterizan la dispersión de los valores obtenidos L_i alrededor del valor medio L_m . Denominamos a esta componente de incertidumbre de repetibilidad, tal que:

$$u^2(rep) = S^2(L_m) = 1/n(n-1) \sum_{i=1}^n (L_i - L_m)^2 \quad (11)$$

b) Resolución de la Regla Micrométrica: Al obtener una medida del campo es muy probable que se deba realizar una estimación de una fracción del valor de L, dentro del menor intervalo de resolución de la regla graduada. Esta estimación lleva asociada una componente de incertidumbre debido a que en realidad existe una distribución de valores probables alrededor del valor que asumimos como el mejor estimador.

Supongamos que sea h la menor división de la reglilla, los valores que podríamos obtener para una medida de L será un número entero de h más una fracción de la misma, la cual es estimada por el observador a partir de su práctica y experiencia en el laboratorio, en nuestro caso se estiman fracciones de h/4; h/2 y 3h/4.

Asumimos que este valor estimado es el más probable de un conjunto posibles de valores que se distribuyen alrededor de él y que suponemos siguen una distribución trapezoidal simétrica con igual pendiente a ambos lados. El trapecioide es isósceles con base inferior igual a h/2 y base superior igual a h/2 donde $0 \leq z \leq 1$. Cuando $z \rightarrow 1$ la distribución se aproxima a una rectangular. Cuando $z \rightarrow 0$ tendremos una distribución triangular.

Para esta distribución la varianza asociada, en cualquiera de los puntos tomados como mejor estimador será:

$$u^2(res) = (h/4)^2 \times (1+z^2)/6 \quad (12)$$

La raíz cuadrada positiva de la varianza será la incertidumbre estándar debido a la apreciación de la medida, realizada por el observador $u(res)$.

c) Incertidumbre del instrumento de Medición:

La reglilla micrométrica graduada incorpora una fuente de incertidumbre en la medida del campo y su contribución viene dada por el certificado de calibración de la misma. A esta componente la denominamos incertidumbre estándar del instrumento, $u(inst)$

3. RESULTADOS y CONCLUSIONES

Hemos comprobado que cualquier medición realizada del campo visual, supuesto este una circunferencia, que se encuentre desplazada del diámetro, puede ser representada en términos del mensurando D y el ángulo θ que caracteriza dicha desviación ec. (2) y (3).

Mediante un cambio de variable hemos reemplazando θ por δ . Al asignar a δ el valor de su esperanza tal cual la ec. (7), el valor obtenido para el diámetro del campo visual en la ec. (4) queda expresado como:

$$D = L_m \times (1 + \sigma^2/2) \quad (13)$$

Donde recordemos que L_m es la mejor estimación de L y es igual a la media aritmética debida a n mediciones independientes L_i , de L .

En tanto σ^2 es la varianza que caracteriza la distribución normal de valores que toma θ , alrededor de su valor esperado cero. Este valor de σ será intrínseco de cada laboratorio y afectará al valor obtenido del diámetro del campo visual del microscopio. De esta manera el valor del mensurando D , quedará afectado por la incertidumbre de una magnitud de entrada ya que $\sigma^2 = u^2(\theta)$ o bien, $\sigma = u(\theta)$

La expresión de la incertidumbre estándar combinada para D , $U^2c(D)$ determinada en la ec (6) quedará entonces:

$$U^2c(D) = (1 + \sigma^2/2)^2 \times U^2(L_m) + L_m^2 \times U^2(\delta) \quad (14)$$

Donde:

$$U^2(\delta) = \sigma^4/2$$

$$U^2(L_m) = u^2(rep) + u^2(res) + u^2(inst) \quad (15)$$

Para la componente de la incertidumbre estándar debido a la resolución, $u(res)$, hemos considerado que la misma se obtiene de suponer que los posibles valores que se distribuyen alrededor del mejor valor estimado, siguen una distribución trapezoidal. En la práctica, para valores de baja magnificación, en general el que se obtiene con objetivos de 4x, dada que la apreciación por el observador es más dificultosa es recomendable utilizar una distribución rectangular, en tanto que para las magnificaciones mayores, dado que se facilita la estimación para las fracciones de la menor división de la reglilla, la distribución podría tender a la triangular, quedando a criterio del Laboratorio en función de su experiencia y práctica.

En el presente trabajo no se han tenido en cuenta posibles contribuciones a la incertidumbre debidas a la variación de las condiciones ambientales, ya que se desconoce en nuestro laboratorio el comportamiento del instrumento de medida ante dichas variaciones. A fin de minimizar dicha contribución, el ensayo de medición del campo visual del microscopio, se realiza en las condiciones más próximas posibles en las cuales ha sido calibrada la reglilla y que se encuentran expresadas en su certificado de calibración.

En el apéndice presentamos un ejemplo de aplicación realizado en el Laboratorio. Es interesante observar los órdenes de magnitud de las contribuciones de cada una de las fuentes de incertidumbre. En tal sentido podemos decir que la contribución dominante es la debida a la resolución de la reglilla. Por su parte la incertidumbre debida a la incorrecta alineación de la reglilla con el diámetro del campo, está aproximadamente dos órdenes de magnitud por debajo de la primera y es del mismo orden que la incertidumbre debido al instrumento.

Si bien el trabajo se ha realizado tomando la experiencia de trabajo sobre microscopios ópticos compuestos, el método se puede utilizar para lupas ópticas.

REFERENCIAS

- [1] The Determination of the Number of Body Cells in Milk by e Direct Method. S.C. Prescott y R.S. Breed. El diario de enfermedades infecciosas, vol. 7, N° 5 (25 de Octubre de 1910), pp 632-640. Publicado por: University of Chicago Press.
URL: <http://www.jstor.org/stable/30071855>

- [2] Leche cruda - Determinación de células somáticas -Método microscópico directo de Prescott y Breed, declarada Norma Chilena Oficial de la República por decreto No. 295, de fecha 8 de octubre de 1979, del Ministerio de Agricultura, publicado en el Diario Oficial No. 30.496 del 23 de octubre de 1979.
- [3] Recuento electrónico de células somáticas en leche fresca y determinación del comportamiento celular en vacas de primer, segundo y tercer parto durante la primera mitad de la lactancia. Pedro j. Saelzer, M.V. ; Víctor B. González, M.V. ; Jaime A. Lutecke, M.V. Archivos de Medicina Veterinaria Suplemento 1: 57-64 1979. Publicación de la Universidad Austral de Chile.
- [4] Métodos de Ensayos Rápidos de Detección de Microorganismos en la Leche. Nuria Dávila Fernández y Juan Emilio Hernández García. Instituto de Investigaciones en Normalización, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Sede Universitaria de S. Spíritus. Maestría en Higiene Veterinaria de los Alimentos Universidad Agraria de la Habana, Cuba. Revista Electrónica de Veterinaria, REDVET. ISSN 1695-7504. Vol VII, N°7, Julio 2006
- [5] Comparación del citómetro UF-100i con el sistema Kova y el método convencional para el conteo de leucocitos y eritrocitos en orina. Verónica Gomez – Gaviño y otros. Revista Bioquímica Vol. 33 N° 2, Abril–Junio 2008, p. 51-58.
- [6] Comparación entre tres métodos manuales empleados en la cuenta diferencial de leucocitos respecto a un equipo automatizado. Eduardo Brambila, Rosalba Castillo – Guerra y Patricia Lozano-Zarain. Bioquímica, Vol. 28 N° 3, Septiembre 2003, p. 4-12
- [7] Punto 3.1.2, Guide to the expression of uncertainty in measurements, (edition 1993) ISO/ IRAM 35050.
- [8] Punto 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3, Guide to the expression of uncertainty in measurements (edition 1993) ISO/ IRAM 35050
- [9] Apéndice F.2.4.4 Guide to the expression of uncertainty in measurements (edition 1993) ISO/ IRAM 35050.

APENDICE

Ejemplo de aplicación

Presentamos a continuación un ejemplo de la determinación del campo visual de un microscopio y la incertidumbre asociada a la misma.

A tal fin realizamos 10 determinaciones del diámetro del campo visual de un Microscopio Óptico Olympus modelo CX21, con ocular de 10X y objetivo de 10X. Las mediciones son realizadas con una reglilla para microscopio cuya escala es de 10 mm de largo y mínima división de 0.1 mm

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos expresados en mm.

Nº	1	2	3	4	5
Li(mm)	1.8	1.8	1.8	1.775	1.8

Nº	6	7	8	9	10
Li(mm)	1.8	1.8	1.775	1.8	1.8

1) El valor Obtenido para el Diámetro es:

$$D = L_m \times (1 + \delta)$$

Donde: $E(\delta) = \sigma^2/2$ y $L_m = 1 / 10 \sum_{i=1}^{10} L_i$

$$L_m = 1.795 \text{ mm}$$

Para los aumentos de ocular y objetivo considerados, el valor obtenido en el Laboratorio para σ^2 , la varianza que caracteriza la distribución normal de valores que toma θ , alrededor de su valor esperado cero es:

$$\sigma^2 = 1,258 \times 10^{-2}$$

Con lo cual el valor del Diámetro D es:

$$D = L_m \times (1 + \sigma^2/2)$$

$$D = 1,796 \text{ mm}$$

2) La incertidumbre combinada será

$$U^2_{c(D)} = (1 + \sigma^2/2)^2 \times U^2(L_m) + L_m^2 \times U^2(\delta)$$

Donde:

$$U^2(L_m) = u^2(rep) + u^2(res) + u^2(inst)$$

$$a) u^2(rep) = S^2(L_m) = 1/n(n-1) \sum_{i=1}^n (L_i - L_m)^2$$

$$u^2(rep) = 1.1 \times 10^{-5}$$

$$b) u^2(res) = (h/4)^2 \times (1+z^2)/6$$

Para un aumento de objetivo de 10x consideramos una distribución trapezoidal con lo cual: $Z = 0.5$ y h la menor división de la reglilla es: $h = 0.1 \text{ mm}$

$$u^2(res) = 1.302 \times 10^{-4}$$

c) $u^2(inst)$ se obtiene del certificado de calibración

La incertidumbre expandida dada en el certificado es $U = \pm 0.001 \text{ mm}$ para un $K = 2$. De manera que obtenemos:

$$u^2(inst) = 2.5 \times 10^{-7}$$

La incertidumbre estándar $U^2(L_m)$ toma entonces el valor:

$$U^2(L_m) = 0.00014153$$

La varianza asociada a δ es:

$$U^2(\delta) = \sigma^4/2$$

$$U^2(\delta) = 7,91 \times 10^{-7}$$

El valor obtenido para la incertidumbre estándar combinada es entonces:

$$U_{c(D)} = 1,20 \times 10^{-2} \text{ mm}$$

A continuación presentamos en la tabla los valores de las componentes de incertidumbre estándar y la incertidumbre combinada.

$u(rep)$	$u(res)$	$u(inst)$	$U(\delta)$	$U_{c(D)}$
0,00331	0,0114	0,0005	0,000889	0,012