**Determinación de microorganismos por método de conteo de Breed**

1. Determina el área de tu campo de observación:

 Se determina el diámetro del campo mediante el ocular micrométrico

d

 Nota: El diámetro es específico para el microscopio y el aumento del lente específico que se esta utilizando

1. Determina el área del campo de observación suponiendo un círculo perfecto

A= πr2 , donde, r= d/2

Ejemplo: Si el diámetro es de 45 líneas del ocular micrométrico y cada línea tiene una longitud de 0.001 cm o 0.01 mm, es decir 10 µm. La longitud del diámetro es de 450 µm (45X10=450 µm), es decir 0.045 cm, entonces

r = 450/2 µm, es decir, 225 µm= 0.0225cm y por tanto,

A= π(0.0225)2=1.59X10-3 cm2

1. Determinas el área de inoculación (trazada en el portaobjetos) sabiendo exactamente la forma geométrica que utilizaste en las mismas unidades que las del área de tu campo de observación, ejemplo:

 Figura geométrica trazada: cuadrado, lado = 1cm

A= bh= (2)(1)= 2 cm2

1. Ahora determinas aproximadamente cuantos campos de observación existen en toda el área de inoculación dividiendo el área de inoculación entre el área del campo de observación (fíjate que las unidades deben ser congruentes). Ejemplo:

 $N° de campos=\frac{Área de inoculación}{Área de campo}=\frac{2 cm^{2}}{0.00159 cm^{2}}=1257.8\~1257.8 campos de observación$

1. Realizas el conteo de microorganismos en por lo menos 12 campos o 10 % de la superficie de muestreo (ni modo, por el tiempo 5). Previamente inoculaste un volumen especifico con asa calibrada (10 µL) , lo fijaste perfectamente y le realizaste una tinción simple o selectiva dependiendo del microorganismo a identificar.

Ejemplo:

 Cuentas en un campo los microorganismos a identificar, ejemplo: 5 microorganismos por campo.

Conteo de microorganismos en cada campo (cada celda representa un campo)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 5 | 8 | 6 | 8 | 7 |
| 8 | 7 | 6 | 7 | 8 |
| 9 | 7 | 7 | 7 | 8 |
| 7 | 5 | 7 | 8 | 7 |
| 6 | 6 | 5 | 8 | 6 |

Determina los parámetros estadísticos:

|  |  |
| --- | --- |
| Promedio (microorganismos/campo) | 7  |
| Desviación estándar (DE) (microorganismos/campo) | 1 |
| RSD | 15.6% |

Éste método se encuentra sujeto a muchas fuentes de error, sin embargo, un buen resultado presenta valores de RSD≤20%

RSD= %CV= 100\*(desviación estándar/promedio).

1. Relaciona el promedio de microorganismos por campo con el número total de campos de inoculación para determinar los microorganismos que existen en toda el área.

Ejemplo:

Conteo promedio 6.9 (microorganismos/campo) ̴ 7 (microorganismos/campo) , se debe redondear al número entero más próximo, no se contabilizan partes de microorganismos (de igual manera con la DE)

$$total de microorganismos=\left(7\frac{microorganismos}{campo}\right)\left(1257.8 campos\right)=8805 microorganismos$$

Con una DE= (1\*1257.8)=1258 microorganismos

1. Pero no nos interesa la concentración de microorganismos en un área, nos interesa la concentración de microorganismos en el líquido inoculado, por tanto, lo necesitamos en área de volumen expresado en microorganismos/mL

Sabemos que en el área inoculamos 10µL , que expresado en mL son: 0.01 mL

Por tanto dividimos la cantidad de microorganismos contabilizados entre el volumen inoculado en mL y obtendremos el resultado final:

$$\frac{microorganismos}{mL}=\frac{8805 microorganismos}{0.01 mL}=88X10^{4}\frac{microorganismos }{mL}$$

No olvides reportar tu desviación estándar asociada:

$$\frac{microorganismos}{mL}=\frac{1258 microorganismos}{0.01 mL}=13X10^{4}\frac{microorganismos }{mL}$$

Ésta última te indicara con cuantas cifras significativas es posible que reportes tu resultado, en éste ejemplo solo puedes reportar una cifra significativa debido a que el método posee una alta desviación estándar, cuanto mayor sea tu DE, menos cifras significativas podrás reportar

Siguiendo este pensamiento, lo adecuado sería reportar:

$$\left(88\frac{+}{-} 13\right)x10^{4} \frac{microorganismos }{mL}$$

En tu concentración de microorganismos final, ya que esto, aunque es matemáticamente posible, no tiene un sentido físico, por ejemplo:

Si el resultado matemático del cálculo da como resultado 8802.69 microorg./mL, debes redondear la cifra para que tenga un sentido físico adecuado:

Es decir, se debe reportar, 88X104 microorg./mL

1. Tu resultado final lo reportas como concentración de microorganismos/mL en la muestra “nombre, origen” asociándole su DE

Una de las mayores ventajas que tiene este método es que puedes realizar una tinción diferencial y reportan la concentración de un microorganismo característico (morfología, agrupación y propiedades tintoriales) en una muestra muy compleja en poco tiempo a fin de tomar las decisiones eficaces.

Ahora inténtalo suponiendo que hubiéramos utilizado el ocular micrométrico para calibrar el ocular de 100x , en este caso, tendríamos una lectura del diámetro de 15 líneas. ¿Qué área tendría el campo de observación? ¿Cuántos campos tendrías ahora en el área de inoculación? Suponiendo que tu conteo fue de bacterias BAAR, ¿Cuál sería su concentración?

Ahora Imagínate que estos cálculos provienen de una muestra de esputo de una persona de quien se sospecha tuberculosis y por tanto realizaste una tinción BAAR. El reporte de tus resultados es esencial para determinar el tratamiento del paciente y de eso depende la vida de éste paciente.

Una forma en la que podrías reportar tus resultados es la siguiente:

“Se determinó que en la muestra de esputo del paciente “nombre/clave” presenta una concentración de BAAR de (promedio ± desviación estándar) de BAAR/mL”

Espero que este documento te ayude a comprender el uso y manejo de datos en ésta técnica de cuantificación de microorganismos.

Saludos

DRP

ANEXO

APROXIMACIÓN AL LIMITE DE DETECCION (LD)

Este límite será dependiente del número de campos analizados.

Ejemplo:

Si yo analice 10 campos, el mínimo de microorganismos que puedo observar es un microorganismo en los 10 campos, es decir, en 9 de los campos no ves nada y en 1 de ellos ves únicamente un microorganismo.

Retomemos el valor de los campos observados anteriormente 1258 campos, pero ahora, el promedio de microorganismo observados por campo sería 1/10. Multiplicando el numero de campos por la concentración promedio, tenemos que:

$$total de microorganismos=\left(0.1 \frac{microorganismos}{campo}\right)\left(1257.8 campos\right)=125.8 microorganismos$$

Ahora, consideremos el volumen de inoculación de 10 µL, para determinar la concentración en el volumen de inoculación

$$\frac{microorganismos}{mL}=\frac{125.8 microorganismos}{0.01 mL}=13X10^{3}\frac{microorganismos }{mL}$$

En el caso de que no observaras microorganismos, debes suponer que la concentración mínima que puedes tener en ese caso es menor al límite de detección, pero no será 0:

Es decir, la concentración de microorganismos/mL es: <LD o <13X103 microorganismos/mL.