

Prueba de Software de Conteo Celular

Act. Guadalupe Siordia Montero
Universidad Autónoma de Yucatán

25 de Octubre del 2006

Índice

1. Antecedentes	2
2. Planteamiento del problema	4
2.1. Objetivo del trabajo	4
2.1.1. Objetivos específicos	4
2.2. Preguntas de Investigación	4
2.3. Datos: fuente y unidades de medida	4
2.4. Tamaño muestral	5
2.5. Aleatorización	5
2.6. Modelo	5
2.7. Supuestos del modelo	5
2.8. Hipótesis	5
3. Ejecución	7
3.1. Recursos Humanos	7
3.2. Recursos Materiales	8
4. Análisis	9
4.1. Datos Observados	9
4.2. Estimadores Puntuales y de Intervalo	9
4.3. Análisis de Varianza	9
4.4. Interpretación	9
4.5. Verificación gráfica de supuestos	10
4.6. Verificación de igualdad de varianzas	11
4.7. Pruebas de Independencia	12
5. Conclusiones	13
6. Sugerencias	13
7. Bibliografía	13

1. Antecedentes

Uno de los métodos para determinar la densidad celular empleado en muchos laboratorios es con un Hematocitometro o cámara Neubauer (Fig. 1) y un microscopio. Una cámara de conteo celular es un dispositivo en el que se coloca una muestra de la suspensión a medir, el cual presenta señales que determinan un volumen conocido, por lo que al contar bajo el microscopio el número de partículas presentes en ese volumen se puede determinar la densidad de partículas en la suspensión de origen. La cámara de Neubauer es un portaobjetos de conteo para su uso en el microscopio óptico, con una depresión en el centro en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una retícula micrométrica como la que se observa en la Fig. 2. Es un cuadrado de 3 mm x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre por el area una de las areas sombreadas de la retícula y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 μ litro.

Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos de conteo, que requieren de un tiempo considerable, además de resultar muy cansados visualmente hablando. El Tecnológico de Mérida realizó un proyecto titulado “Desarrollo de un Sistema para el Análisis de Imágenes Microscópicas” que trata de un instrumento que a partir de imágenes digitales tomadas por un una cámara adaptada al microscopio, realiza el conteo de partículas en forma automática en un tiempo significativamente menor que el que toma a un ser humano en un laboratorio actualmente.

Figura 1: Cámara de Neubauer

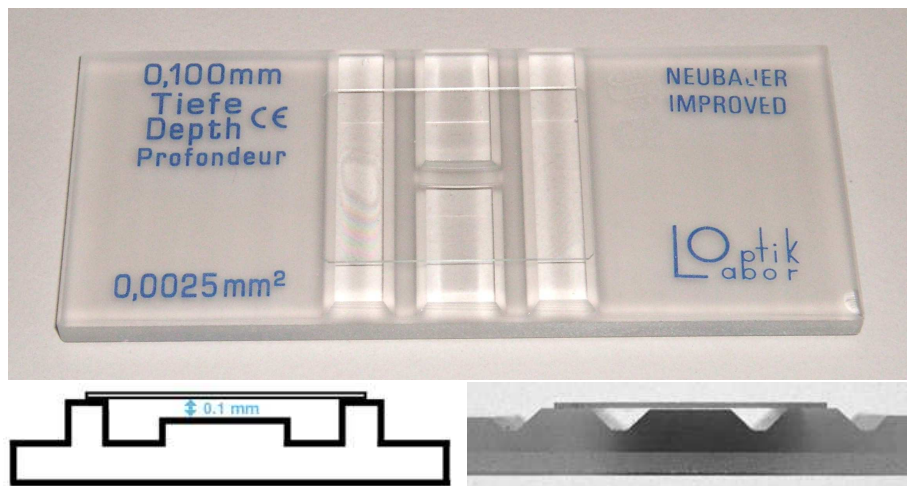
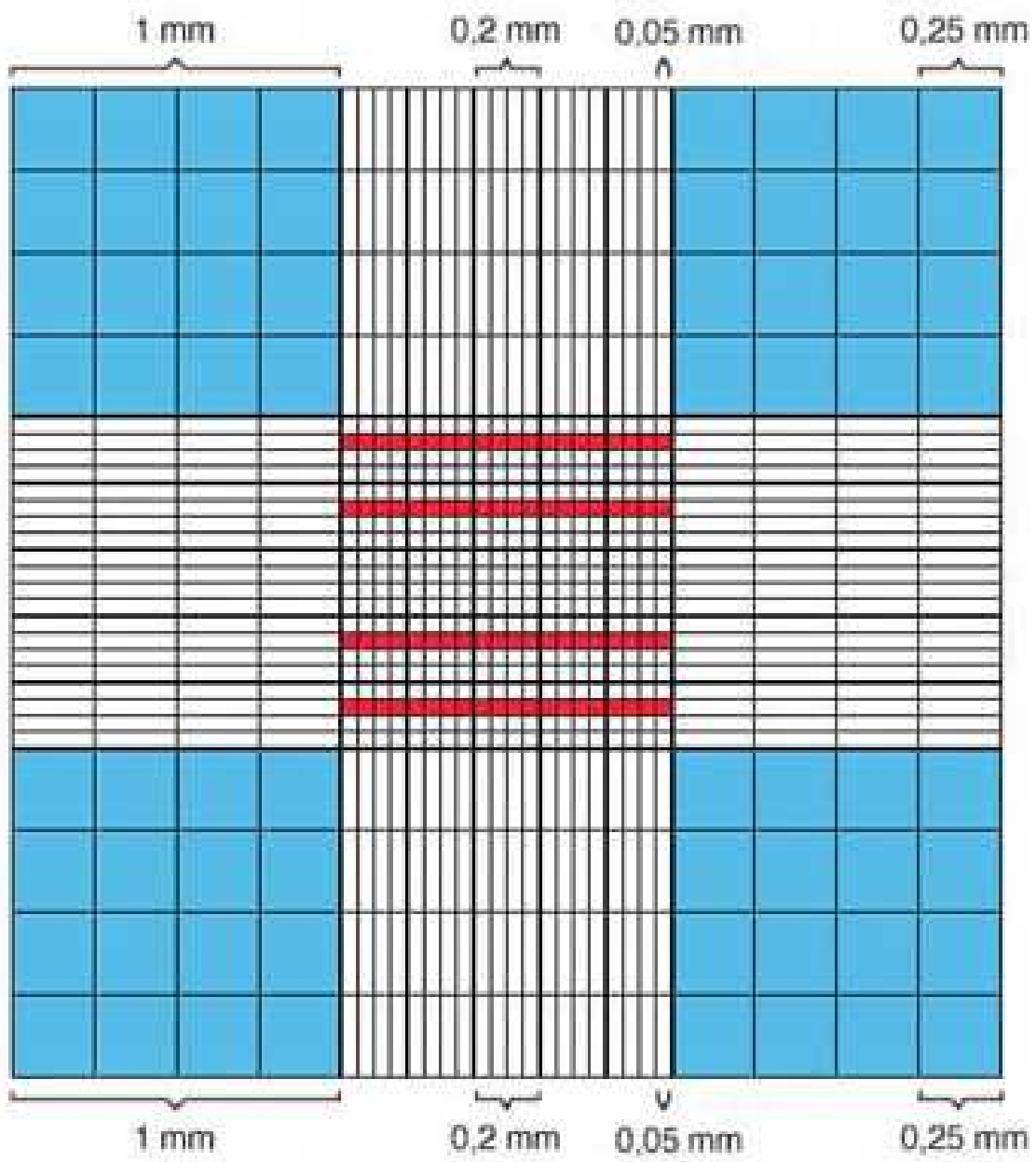


Figura 2: Distribución de la reticula en la cámara Neubauer



2. Planteamiento del problema

Debido a que el tiempo para determinar la densidad celular de la suspensión a medir es relativamente largo, y que resulta muy cansado para el laboratorista efectuar múltiples conteos en el laboratorio, se desarrolló el software para análisis de imágenes microscópicas, el cual a partir de una fotografía, que es tomada a la muestra fluido contenida en la cámara de Neubauerpor, por una cámara digital adaptada al microscopio, realiza el conteo y determina la densidad celular en un tiempo mucho menor que el que lleva cualquiera de los métodos visuales tradicionales. Para la validación de este proyecto es necesario reportar la confiabilidad de la precisión y exactitud de dicho software. La precisión es la variación que presentan los resultados al medir varias veces una misma magnitud con el mismo equipo. En otras palabras, la precisión es la habilidad de un instrumento de medición para repetir (repetibilidad) y reproducir (reproducibilidad) su propia medición, con independencia de si dicha medición es correcta o incorrecta. La exactitud o sesgo se refiere al desfase o desplazamiento que tienen las mediciones en relación al estándar o verdadero valor que se supone conocido. La exactitud se estima mediante la diferencia entra la media observada y el verdadero valor mensurando. Lo más deseable es que el proceso de medición sea preciso y exacto, es decir que cuando mida el mismo objeto arroje resultados similares (poca dispersion) y que el promedio de dichos resultados sea la magnitud verdadera(cero desfase).

2.1. Objetivo del trabajo

Reportar la confiabilidad del software de “Análisis de imágenes microscópicas”.

2.1.1. Objetivos específicos

Estimar la exactitud y precisión del software de “Análisis de imágenes microscópicas”.

2.2. Preguntas de Investigación

1. ¿Arroja el software de análisis de imágenes microscópicas los mismos resultados que un laboratorista utilizando su técnica tradicional?
2. ¿Los resultados del software de análisis de imágenes microscópicas son los mismos, cuando se repite varias veces la medición para la misma imagen?

2.3. Datos: fuente y unidades de medida

1. Las muestras fueron tomadas de una solución con esporas de *aspergillus niger*.
2. Cantidad observada: 1 mm³.
3. Unidades reportadas: Número de células por millón.

2.4. Tamaño muestral

Se seleccionó un tamaño de la muestra de cinco conteos, ya que el tiempo que se tarda un laboratorista en hacer el conteo más el tiempo que se lleva lavar las cámaras de Neubauer es largo y la muestra sólo conserva sus propiedades durante 24 horas.

Nota: No se pudo determinar n porque no se contaba con una estimación de σ^2

2.5. Aleatorización

Las muestras fueron extraídas con una pipeta de un tubo de ensayo provisto de tapón el cual contenía el fluido con las células a contar, después de ser agitada por 30 segundos en el homogeneizador. Cinco cámaras Neubauer fueron seleccionadas en forma aleatoria, utilizando papeles numerados del uno al cinco, para colocar cada una de las muestras. De igual manera se selecciono de forma aleatoria el microscopio para cada uno de los dos laboratoristas.

2.6. Modelo

El modelo utilizado en el experimento es el de efectos fijos de clasificación en un sentido con cuatro niveles de factor y 10 repeticiones. Para efectos de aplicación se consideraron dos laboratoristas y el software (en adelante se tratará como laboratorista 3 y 4) como los tratamientos, por lo que en total se consideran cuatro niveles de factor. Como los laboratoristas no fueron seleccionados en forma aleatoria se considera un modelo de efectos fijos, el cual es:

$$Y_{i,j} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \mid i = \{1, 2, 3, 3\}, j = \{1, 2, \dots, 10\} \quad (1)$$

Donde $Y_{i,j}$ es el número de células reportadas por el laboratorista i en la muestra j , μ es el promedio global de células, τ_i el error del laboratorista i en la muestra j .

2.7. Supuestos del modelo

El objetivo es probar las hipótesis apropiadas con respecto a los efectos de los tratamientos y hacer una estimación de ellos. Para probar las hipótesis, se supone que los errores del modelo son variables aleatorias independientes con distribución normal, media cero y varianza σ^2 . Se supone que esta última es constante para todos los niveles del factor. Además se requiere que el experimento se realice en orden aleatorio. En este modelo los efectos de tratamiento τ_i se definen como desviaciones con respecto a la media general debido a que:

$$\sum_{i=1}^4 \tau_i = 0 \quad (2)$$

2.8. Hipótesis

Como lo que se desea probar es que la medición que arroja el software es igual a las mediciones dadas por los laboratoristas, la hipótesis a probar es:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \text{ vs } H_a : \mu_i \neq \mu_j \quad (3)$$

Para al menos un par ij , donde μ_i representa el número promedio de células reportadas por el laboratorista i . pero como $\mu_i = \mu + \tau_i$ para $i = \{1, 2, 3, 4\}$, es decir es igual a la media general mas el efecto del i -ésimo tratamiento, entonces si H_0 es verdadera, todos los tratamientos tienen la media común μ , y por lo tanto una forma equivalente de expresar la hipótesis es en términos de los efectos de los tratamientos, Para al menos una i es:

$$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 \text{ vs } H_a : \tau_i \neq 0 \quad (4)$$

3. Ejecución

Se preparo la dilución apropiada para el tipo de células a contar, (este diluyente permite identificar claramente las células destruyendo otros elementos celulares) y se introdujo en el tubo de ensayo con el suspensión de las células a contar, que en este caso fueron esporas de *aspergillus niger*, (El fluido conserva sus propiedades hasta 24 horas). Los pasos fueron los siguientes.

1. Se seleccionaron al azar 2 cámaras de neubauer.
2. Se homogenizó la muestra contenida en el tubo de ensayo y con una pipeta se extrajo 0.1 mm^3 del fluido y se colocó en la cámara de neubauer, se procedió de la misma forma con la otra cámara.
3. Se colocó aleatoriamente cada cámara de neubauer en cada uno de los dos microscopios disponibles.
4. Se seleccionó en forma aleatoria uno de los microscopios y se capturó la fotografía para la medición del software, inmediatamente después se tomó la fotografía en el otro microscopio.
5. Se asignó en forma aleatoria a los laboratoristas a cada uno de los microscopios, los cuales comenzaron a realizar su conteo de acuerdo al procedimiento establecido (apéndice 1). Al terminar registraron su conteo en un formato especial que les fue asignado con ese propósito (se les informó que no debían decirlo sólo escribirlo, con el fin de que el otro laboratorista y el encargado de hacer el conteo en el software no supieran los resultados).
6. La persona encargada del manejo de software, (misma que toma las fotos), también registró el conteo arrojado por el software, para las dos cámaras de neubauer, dicha medición fue registrada como si se tratase de los resultados de otros dos laboratoristas.
7. Se lavaron las cámaras de neubauer con el procedimiento establecido.
8. Se repitió del punto 1 al 6 para cada una de las diez réplicas.

Ver apéndice 1 para detalles sobre la preparación.

3.1. Recursos Humanos

1. Encargado del experimento.
2. Un laboratorista encargado de preparar la muestra, llenar y colocar las cámaras de neubauer en los microscopios y de limpiar las cámaras después de cada conteo.
3. Dos laboratoristas encargados del conteo.
4. Encargado de tomar la fotografías a las cámara de Neubauer en el microscopio y de efectuar el conteo con el software.

3.2. Recursos Materiales

1. Pipetas de 1 ml y 10 ml.
2. Tubos de ensayo.
3. Vaso de precipitados.
4. Matraz aforado de 100 ml.
5. Agitador vortex.
6. Agitador magnético.
7. Cinco cámaras de Neubauer.
8. Dos microscopios.
9. Cámara fotográfica digital de 1.3 Mega píxeles.
10. Software de conteo.

4. Análisis

4.1. Datos Observados

Cuadro 1: Datos registrados

Observación	Operador	Conteo	Observación	Operador	Conteo
1	1	5950	11	3	9043
2	1	5100	12	3	4139
3	1	4375	13	3	4123
4	1	4800	14	3	4733
5	1	3925	15	3	3721
6	2	5850	16	4	5605
7	2	4700	17	4	8476
8	2	6050	18	4	6085
9	2	5450	19	4	5030
10	2	4875	20	4	4309

4.2. Estimadores Puntuales y de Intervalo

Cuadro 2: Estimadores Puntuales y de Intervalo

Laboratorista	Frecuencia	Media	Error Estándar	Intervalo de Confianza 95 %	
				Límite Inf.	Límite Sup.
1	5	4830.0	293.357	4200.81	5459.19
2	5	5385.0	293.357	4755.81	6014.19
3	4	4179.25	327.983	3475.8	4882.7
4	4	5257.25	327.983	4553.8	5960.7
Media global	18	4912.88			

Nota: Estos son los resultados obtenidos después de eliminar dos observaciones. Más información en la verificación de supuestos del modelo.

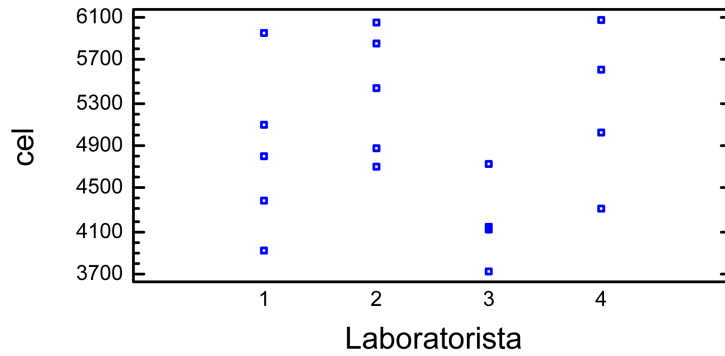
4.3. Análisis de Varianza

Nota: Esta tabla corresponde a los resultados obtenidos después de eliminar dos observaciones. La explicación se da en la verificación de supuestos del modelo.

4.4. Interpretación

De las gráficas podemos observar la similitud que hay entre el laboratorista 1 con los resultados que el software dio (laboratorista 3) y el laboratorista 2 con los resultados del software (laboratorista 4), para la misma muestra respectivamente.

Figura 3: Representación por Código de Nivel



Cuadro 3: Análisis de Varianza

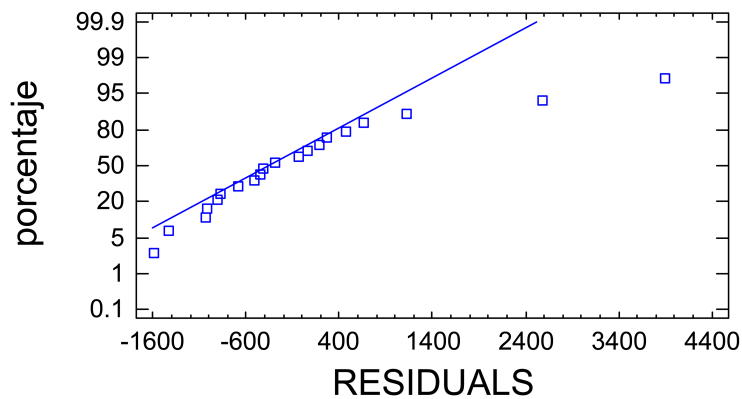
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valo
Laboratorista	3.76763×10^6	3	1.25588×10^6	2.92	0.0710
Residuos	6.02407×10^6	14	0.43029×10^6		
Total Corregido	9.79171×10^6	17			

Como podemos observar en la tabla de análisis de varianza no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula y por lo tanto concluimos que no hay diferencia en el conteo que efectúan los laboratoristas con respecto al conteo que realiza el software, con un 95% de confianza.

4.5. Verificación gráfica de supuestos

Para probar si los datos se distribuyen en forma normal, se procedió a obtener la gráfica de normalidad, que se presenta a continuación.

Figura 4: Probabilidad Normal



En la gráfica se observa que el punto 11 y 17 se encuentran alejados de la recta. Estos dos puntos pertenecen a observaciones efectuadas por el software. Después de investigar con la persona que realizó este conteo se averiguó que en esas dos mediciones, se habían tenido problemas porque las imágenes contenían un cabello en una y polvo en otra, ocasionando con esto que el software contará erróneamente. Por lo tanto se procedió a sacar estos dos puntos y se volvió a obtener la gráfica.

Figura 5: Probabilidad Normal

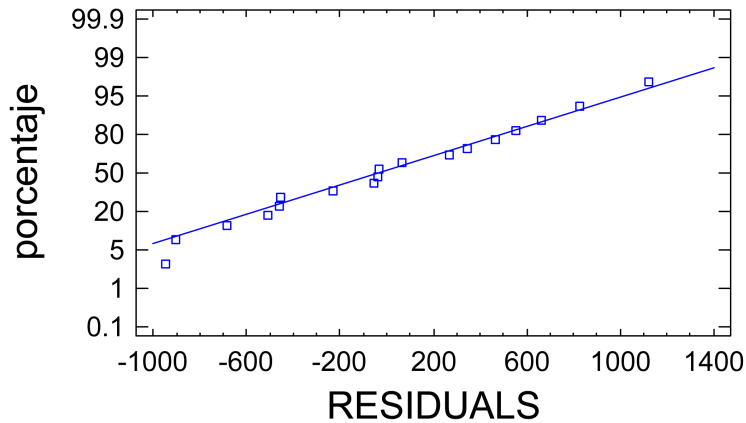
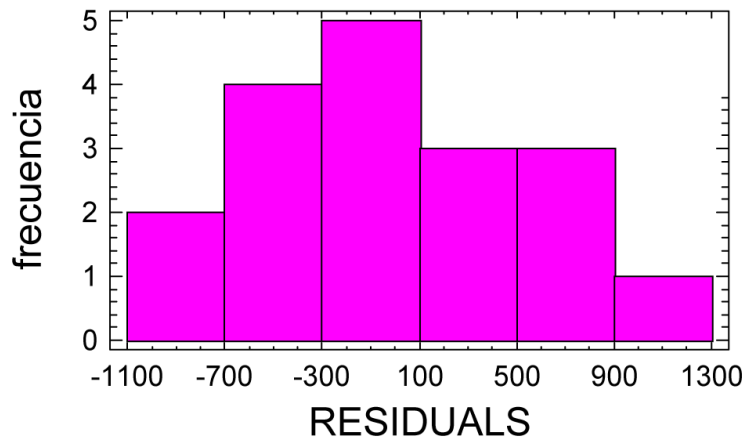


Figura 6: Probabilidad Normal



Como se observa en ambas gráficas parece no haber problemas con la normalidad.

4.6. Verificación de igualdad de varianzas

Tampoco se observa problema con la igualdad de varianzas. El rango es similar en los cuatro casos.

4.7. Pruebas de Independencia

No se observan patrones, por lo que tampoco no hay problemas de dependencia.

5. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que no existe diferencia significativa entre el resultado que se obtiene por el método tradicional que ocupan los laboratoristas para contar este tipo de células (esporas de *aspergillus niger*), y los obtenidos por el software de “Análisis de imágenes microscópicas” con una confianza del 95 %. Por lo tanto podemos concluir que el software es exacto con un 95 % de confianza. Y debido a que se probó que al repetir el conteo sobre una misma imagen se obtienen resultados exactamente iguales se concluye que el software es preciso.

6. Sugerencias

Durante el desarrollo del experimento se notó que no se tiene claro la manera de proceder con el software, me refiero específicamente a que no se tenía pensando cuántas imágenes debían obtener por muestra y de que parte del cuadrante. Se sugiere que se haga un procedimiento por escrito de la forma de utilización del software. Por otro lado surgieron problemas como el cabello y el polvo que fue contabilizado por el software como si se tratase de células, por lo que se considera conveniente una revisión considerando todos estos aspectos. Por último es importante que se repita el experimento para otros tipos de células para poder hacer extensivos estos resultados.

7. Bibliografía

1. Diseño y análisis de experimentos, Douglas C. Montgomery. Grupo Editorial Iberoamérica.
2. Control Estadístico de Calidad y seis sigma, Humberto Gutiérrez Pulido, Román de la Vara Salazar. Mc. Graw Hill.
3. http://www.aum.iawf.unibe.ch/HemoSurf/Demo_E/Lab/count_manual.htm