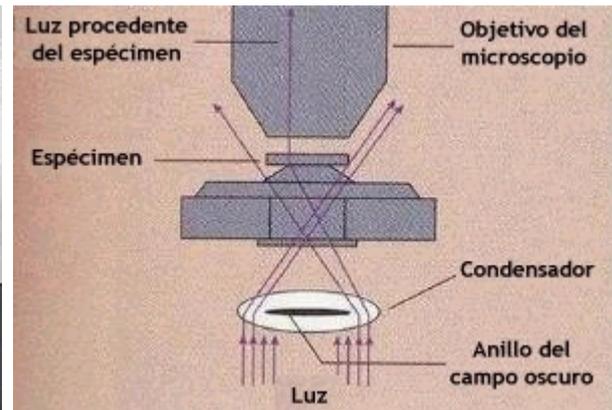


Microscopio de campo oscuro.

El microscopio de campo oscuro se encuentra catalogado entre los microscopios ópticos.

Desde muchos años atrás el microscopio óptico posibilitó el descubrimiento de las células y la elaboración de la teoría de que todos los seres vivos están constituidos por células (1).

El microscopio óptico se compone de dos partes principalmente:



1. Parte Mecánica: Sirve de soporte.

2. Parte Óptica: constituida por tres sistemas de lentes.

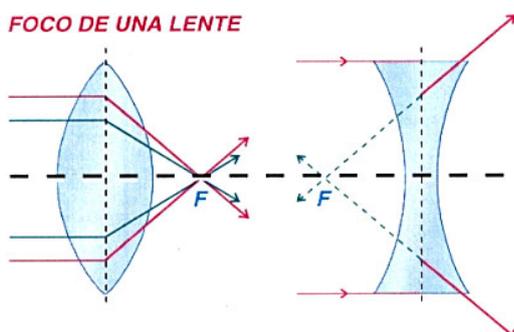
* Condensador.

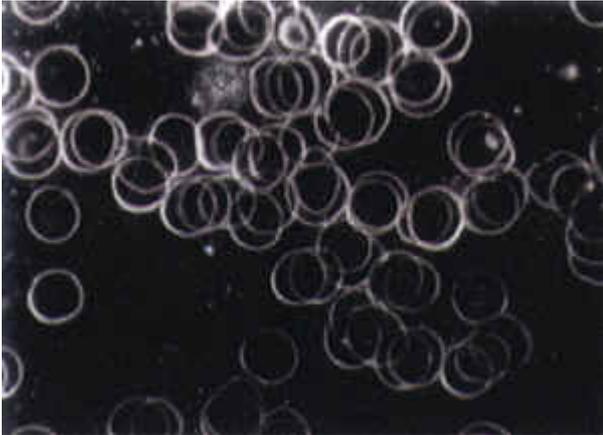
* Objetivo

* Ocular

El condensador del microscopio óptico convencional tiene como finalidad proyectar un cono de luz sobre los elementos que están siendo analizados en el microscopio. Después de atravesar el elemento, ese haz luminoso en forma de cono penetra en el objetivo, proyectando una imagen aumentada en el plano focal del ocular, que nuevamente la amplia y es recibida por la retina como una imagen situada a 25 cm de la lente ocular (1).

El microscopio de campo oscuro está constituido por un microscopio óptico al cual se le acondiciona un condensador especial, este tiene como fin producir una dispersión de los rayos luminosos enviándolos lateralmente sobre el objeto en forma de un cono luminoso, y de esta forma tampoco penetran directamente al objetivo (2).





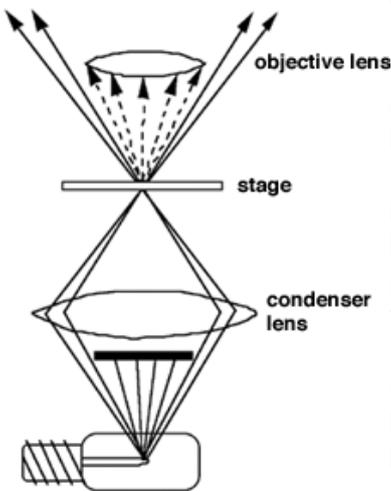
Existen dos clases de condensador de campo oscuro:

- * Cardiode
- * Paraboloides.

Ambos son utilizados con el mismo fin, pero el cardiode tiene mayor aplicabilidad en la investigación con Treponemas (2).

Para que el efecto de campo oscuro se logre, la apertura numérica del condensador debe ser mayor que la de el objetivo, lo cual ocurre con los objetivos de pequeño y gran aumento no así con los de inmersión los cuales deberán adicionarse de un diagrama de suspensión para la reducir la apertura numérica (2).

RESOLUCIÓN DE MICROSCOPIA EN CAMPO OSCURO



Se llama poder de resolución de un sistema óptico a la capacidad de separar detalles y es expresado por el limite de resolución que es la menor distancia que existe entre dos puntos para que estos aparezcan individualizados.

Lo que determina la riqueza del detalle de la imagen provista por un sistema óptico es su limite de resolución y no su poder de aumentar el tamaño de los objetos (1).

El limite de resolución depende de la apertura numérica (AN) del objetivo y de la longitud de onda de la luz utilizada (1).

En la microscopia de campo oscuro la AN no debe ser superior a 1.0 ya que el condensador debe tener siempre una apertura numérica superior a este valor. El limite de resolución del objetivo esta dado por la siguiente formula: (1)

$$LR = k \times \text{Long. onda}$$

$$AN * k = \text{Constante (0.61)}$$

* Log. onda = 0.55 Se toma la longitud de onda de la franja verde – amarilla

por ser el ojo humano mas sensible a estos colores que a otros.

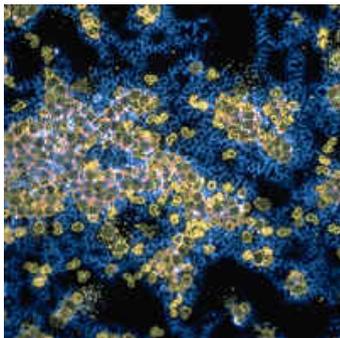
* AN = Apertura numérica no superior a 1.0

MÉTODOS PARA OBSERVACIÓN EN FONDO OSCURO

Existen diferentes métodos para observar un objeto sobre un fondo oscuro es decir, utilizando únicamente la luz difractada por él.

OBSERVACIÓN INCIDENTE O POR REFLEXIÓN

La observación por reflexión con iluminación oblicua o anular es la mas frecuentemente utilizada con los microscopios estereoscopios o lupas binoculares. Generalmente no nos damos cuenta de que observamos en fondo oscuro cuando el material ocupa todo el campo visual (3).



OBSERVACIÓN POR TRANSMISIÓN (Fondo Negro Central)

La observación por transmisión con una pantalla central necesita la utilización de un objetivo con pantalla interna de Spierer; con una pantalla anular , la de Wilska: anoptral, versión original y no la fabricada industrialmente que es un contraste de fase negativa a fuerte absorción (3).

OBSERVACIÓN POR TRANSMISIÓN (Fondo negro Anular)

La observación con iluminación anular de abertura superior a la del objetivo, es la única que, en la practica corriente , se denomina campo oscuro. Debe indicarse que difícilmente puede utilizarse objetivos de gran aumento , de apertura numérica superior a 1.0. dado que el condensador debe presentar una abertura superior a esta. Debe entonces practicarse la inmersión, evitando las burbujas de aire (3).

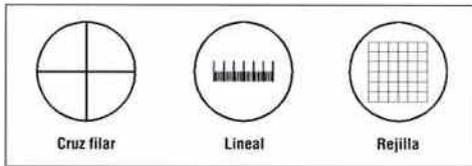
OBSERVACIÓN BIRREFRINGENTE (Polarización)

La observación de un objeto birrefringente entre nicoles cruzados da una imagen sobre fondo negro de naturaleza muy particular (3).

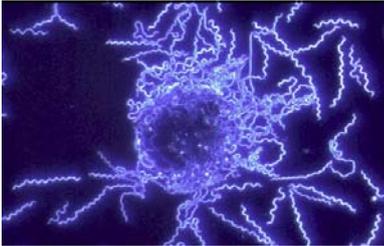
OBSERVACIÓN HAZ PERPENDICULAR (Fondo Negro ultramicroscopico)

La observación con un haz perpendicular a la dirección de la observación según Ziedentopf y Szimondy da informaciones sobre la orientación de las partículas observadas (3).

Accesorios de campo oscuro



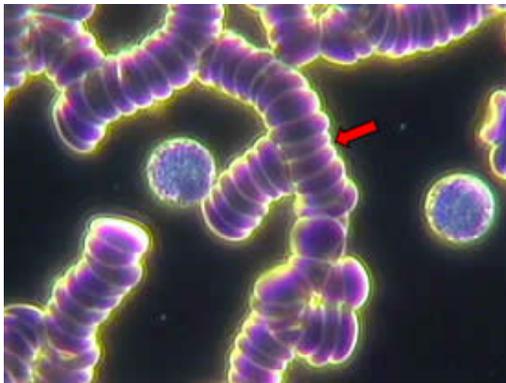
Usados principalmente para especímenes no coloreados que son semitransparentes o transparentes.



NATURALEZA Y ESTRUCTURA DE LA IMAGEN EN FONDO OSCURO

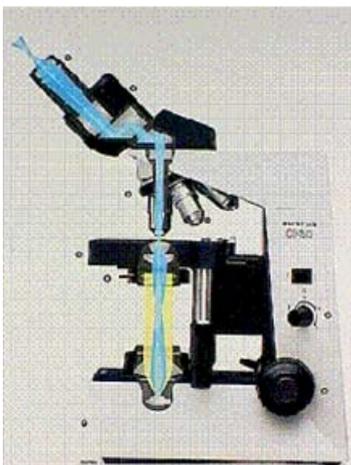
Las imágenes en autentico fondo negro son remarcables por un efecto de borde ,con numerosas franjas de difracción muy brillantes si le objeto es refringente. Los planos ,en el centro de una estructura parecen ópticamente vacíos . es por ello que deben adoptarsen grandes precauciones en el momento de interpretar las imágenes . Dado que la imagen solo se forma con las luz difractada, siempre más débil que la luz directa deben formarsen fuentes lumìnicas muy intensas, lo que no siempre es fácil sobre todo cuando los objetos son vivos y, por consiguiente, sensibles a fuertes iluminaciones (3).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y PROCEDIMIENTO DE LECTURA.



El material a estudio se emulsiona sobre un porta-objetos sobre el cual se coloca una gota de solución salina, se cubre con una laminilla y se monta sobre la platina , se baja el condensador de campo oscuro y se corre con el carro de la platina la preparación de forma tal que al subir completamente el condensador la cara superior de su lente quede cubierta por su preparación solamente en su mitad posterior.(2)

Sobre la parte descubierta del lente se coloca aceite de inmersión en cantidad adecuada; este por capilaridad se extiende entre la cara inferior del portaobjetos y la superior del lente del condensador. Se centra la preparación y se observa con objetivo de pequeño aumento colocando el foco luminoso en la mitad del campo mediante los tornillos de centrado del condensador, luego se observa el campo microscópico con el objetivo de gran aumento, esto permite conocer el estado del microscopio al observar los treponemas bucales (2).



VENTAJAS

- Permite ver partículas dispersas en un medio homogéneo.
* Hace posible la observación del movimiento Browniano de las partículas.

- - * Se puede utilizar para la observación de preparaciones sin colorear.
 - * Visualiza los bordes destacados de las muestras.
 - * Técnica valiosa para observar microorganismos de tipo *Treponema pallidum*, espiroquetas con diámetros superior a 0.2 μm .

DESVENTAJAS

- Inadecuada preparación de la muestra.
- - * Difícil acceso al microscopio que posea el condensador especial por su alto costo.
- - * No deja visualizar estructuras celulares específicas, solo bordes de células o partículas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Karp Gerard. *Biología Celular y Molecular*, 2 edición McGraw Hill. México 1991. Pag 864-867, 870-871.
2. Guzman U. Miguel A. *Sífilis Diagnóstico y Manejo Serológico*. 2 Edición Instituto Nacional de salud. Santafè de Bogotá 1979. Pag 83-86.
3. Kupper Terranc. *Instrumentos y Técnicas Instrumentales*. Barcelona-España. 1984. Pag. 34-35.

Tomado de:

<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/>