



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
SECCIÓN BIOTECNOLOGÍA
MÉRIDA ESTADO MÉRIDA



DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA DISTINGUIR LAS
DIMENSIONES DE MICROORGANISMOS POR LA TÉCNICA
BIOESPECKLE LÁSER

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Orladis Molina Castillo

CI: V-25.316.328

Tutora:

Prof. Cristina Grassi

Co-tutor:

Prof. Efrén Andrades

Mérida, Marzo de 2020



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
SECCIÓN BIOTECNOLOGÍA
MÉRIDA ESTADO MÉRIDA



**DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA DISTINGUIR LAS
DIMENSIONES DE MICROORGANISMOS POR LA TÉCNICA
BIOESPECKLE LÁSER**

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de
Licenciados en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Orladis Molina Castillo

CI: V-25.316.328

Tutora:

Prof. Cristina Grassi

Co-tutor:

Prof. Efrén Andrades

Mérida, Marzo de 2020

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo el amor y cariño:

*A ti mi Dios, que me diste la oportunidad de vivir y me has acompañado en
cada momento.*

*A mis padres, que me dieron la vida, cultivaron en mí, principios, valores y
han estado apoyándome en cada momento.*

*A mi madre linda María Adelaida Castillo, por tanto amor, por dedicarme su
vida entera, por enseñarme el valor de las cosas, por siempre estar allí
para mí incondicionalmente a pesar de las dificultades,
Gracias por siempre creer en mí y nunca rendirte Mamita.*

*A mi padre, Orlando Molina por ser la persona que más admiro, por ser el
hombre que forjó en mí, carácter, principios y disciplina.*

*Hoy sólo quiero devolverles un pedacito de todo lo que ustedes
me han dado a lo largo de mi vida.
¡LOS AMO!*

*A mis hermanos Orlando José y Oriannys Orlimar, a los que siempre tengo
presentes.*

*A mis sobrinos José Antonio y Hanna Victoria por ser la más linda motivación
que Dios me pudo regalar para culminar esta meta, y para quienes
siempre deseo ser un buen ejemplo.*

Al Ángel que desde el cielo siempre me cuida, Mi Amigo Toñito González.

AGRADECIMIENTOS

Llegado el ansiado momento de concluir mi carrera universitaria, resulta muy gratificante agradecer el apoyo y la colaboración de todos aquellos que de alguna manera han participado de este proyecto.

Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido lograr esta meta tan anhelada.

A la ilustre Universidad de Los Andes. Por ser tan maravillosa y crear excelentes profesionales.

A mis padres, mis hermanos y mi cuñada por creer en mí y apoyarme a lo largo de este camino de lucha y aprendizaje.

A mi Tutora, la Profesora Cristina Grassi, que a pesar de los obstáculos que se han presentado, es un vivo ejemplo de disciplina, constancia y amor.

Y a mi Co-tutor el Profesor Efrén Andrades, grandes amigos y excelentes profesionales. Gracias por creer en mí, por tanta dedicación, paciencia y cariño a lo largo de mi carrera, ya que sin ellos este proyecto no existiría.

Al Profesor José Gregorio Hernández por su dedicación, por brindarme su asesoría metodológica y su amistad a lo largo de la carrera.

A mis tíos, primos, amigos y a todas las personas que están, o han estado presentes en mi vida.

¡GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XI
RESUMEN	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación	6
Objetivos de la Investigación	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances y limitaciones de la investigación	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Antecedentes Históricos	9
Bases Teóricas	13
<i>Aproximación teórica sobre la Reflexión difusa de la luz</i>	13
<i>Aproximación teórica sobre la Trayectoria óptica de las ondas secundarias</i>	14
Definición Operacional de Términos	14
<i>Tendencia temporal y Tendencia espacial</i>	14
<i>Generalidades de Trypanosoma cruzi</i>	15
<i>Generalidades de Escherichia coli K-12</i>	16
<i>Fundamento del Bioespeckle</i>	16
<i>Usos del Bioespeckle</i>	17
<i>Parásito</i>	17
<i>Bacteria</i>	18

<i>Láser</i>	18
<i>Procesamiento de imágenes</i>	19
Operacionalización del Evento de Estudio y el Criterio de Análisis	19
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	22
Tipo de investigación	22
Diseño de la Investigación	22
Población y Muestra	23
Unidad de Investigación	23
Selección del Tamaño de la Muestra	23
Variables estadísticas	23
Metodología de la Investigación	24
<i>Recolección de Datos</i>	24
Videos de parásitos	25
Condiciones en las que se realizó el experimento de parásitos	25
Videos de bacterias	27
Condiciones en las que se realizó el experimento de bacterias	28
<i>Procesamiento de Datos</i>	29
<i>Procedimiento de Tendencia Espacial</i>	30
Procesamiento directo	30
Selección de las semi elipses	30
Cálculo del área de las semi elipses	31
Procesamiento con separación en canales o bandas de colores (sistema RGB)	31
<i>Procedimiento de Tendencia Temporal</i>	31
Diseño de análisis de los datos	32
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Separación en Fotogramas	33
Tendencia Espacial	33
<i>Tendencia Espacial por el Método Directo</i>	33
<i>Resultados de Tendencia Espacial</i>	

<i>(separando en bandas de colores)</i>	38
Tendencia Temporal	44
<i>Descriptores estadísticos en videos con bacterias</i>	50
<i>Tendencia temporal en videos con parásitos</i>	56
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
Conclusiones	59
Recomendaciones	61
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	62

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Gráfico Video Control 01 (sin bacterias)	51
Figura 2. Gráfico Video Control 03 (con bacterias)	51
Figura 3. Gráfico Video CIP 01 (sin bacterias)	53
Figura 4. Gráfico Video CIP 02 (con bacterias)	53
Figura 5. Gráfico Video control 02 (sin bacterias)	54
Figura 6. Gráfico Video control 04 (con bacterias)	54
Figura 7. Gráfico <i>T. cruzi</i> Video 18 (sin parásitos)	56
Figura 8. Gráfico <i>T. cruzi</i> Video 14 (con parásitos)	56
Figura 9. Gráfico <i>T. cruzi</i> Video 24 (sin parásitos)	57
Figura 10. Gráfico <i>T. cruzi</i> Video 20 (con parásitos)	57

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Operacionalización del Evento de Estudio Tendencia Espacial	20
Tabla 2. Operacionalización del Evento de Estudio Tendencia Temporal	20
Tabla 3. Operacionalización del Criterio de Análisis	21
Tabla 4. Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos	24
Tabla 5. Videos de parásitos (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	25
Tabla 6. Videos de bacterias (<i>Escherichia coli</i>)	27
Tabla 7. Separación de videos en fotogramas	29
Tabla 8. Resultados de tendencia espacial por el método directo en parásitos (<i>T. cruzi</i>).	34
Tabla 9. Resultados de tendencia espacial por el método directo en Bacterias (<i>E. coli</i>)	36
Tabla 10. Resultados de tendencia espacial de la banda roja en parásitos (<i>T. cruzi</i>)	39
Tabla 11. Resultados de tendencia espacial de la banda roja en bacterias (<i>E. coli</i>)	41
Tabla 12. Comparación de áreas del semi elipse	43
Tabla 13. Resultados de tendencia temporal en parásitos (<i>T. cruzi</i>)	45
Tabla 14. Resultados de tendencia temporal en bacterias (<i>E. coli</i>)	47

Tabla 15. Descriptores Estadísticos en los videos Control 01- Control 03	51
Tabla 16. Descriptores estadísticos en los videos CIP 01- CIP 02	53
Tabla 17. Descriptores estadísticos en los videos Control 02 - Control 04	54
Tabla 18. Descriptores estadísticos en los Videos 18-14	56
Tabla 19. Descriptores estadísticos en los Videos 24-20	57

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS
LINEA DE INVESTIGACIÓN: Bioespeckle láser



DESARROLLO DE UN ALGORITMO PARA DISTINGUIR LAS
DIMENSIONES DE MICROORGANISMOS POR LA TÉCNICA
BIOESPECKLE LÁSER
Trabajo de Grado

Autor:
Orladis Molina Castillo
CI: V-25.316.328
Tutora:
Prof. Cristina Grassi
Co-tutor:
Prof. Efrén Andrades

RESUMEN

El Bioespeckle se desarrolla a través de un video en el cual se captura la interferencia de un haz de luz láser, al incidir con una superficie rugosa o con movimiento. Este fenómeno permite analizar muestras biológicas. En este trabajo se busca establecer herramientas que permitan distinguir la presencia y ausencia de microorganismos, así como las relaciones en sus dimensiones. El diseño de esta investigación será de laboratorio, retrospectivo, transeccional y multieventual. La “n” muestral, corresponde a diez (10) videos tomados en experiencias previas, los cuales fueron procesados en el laboratorio de la Sección Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Los videos se estudiaron por tendencia espacial y tendencia temporal. En la primera se evaluaron las ecuaciones de las semi elipses y el área de las mismas. En la segunda los videos se analizaron por las ecuaciones de sus semi elipses y por descriptores estadísticos, respectivamente. Se concluyó que la forma de los microorganismos puede distinguirse por el área de las semi elipses en la tendencia espacial, siendo el coeficiente de variación mayor para parásitos que para bacterias y por el movimiento en la tendencia temporal, siendo la relación del coeficiente de variación mayor para bacterias que para parásitos debido al mayor movimiento de las primeras frente a los segundos.

Palabras Clave: láser, Speckle, bioespeckelometría, bacterias, parásitos, tendencia espacial, tendencia temporal, *Escherichia coli*, *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUCCIÓN

La capacidad del laboratorio para realizar el diagnóstico y el control de las enfermedades causadas por parásitos y bacterias se encuentra limitada por factores como la calidad de la muestra recogida en el paciente, el medio de transporte de la muestra al laboratorio y las técnicas utilizadas para demostrar la presencia del microorganismo. Los parásitos son los microorganismos con mayor grado de complejidad. La mayoría de las pruebas diagnósticas se basan en la capacidad de evolución del microorganismo y las condiciones del transporte han de asegurar su viabilidad e integridad (Murray, 2009).

Por otro lado, la identificación bacteriana y las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos son un paso necesario antes del tratamiento clínico de las infecciones bacterianas, una preocupación importante es el tiempo requerido para obtener un resultado rápido y confiable (Grassi et al, 2019).

En la sección Biotecnología se ha evaluado la posibilidad de usar el Bioespeckle como sistema para realizar antibiogramas, por ello se está evaluando toda la metodología concerniente con Bioespeckle para establecer un sistema de antibiograma rápido que le facilite al Bioanalista asistir al médico y obtener un resultado en menor tiempo.

Las muestras fueron recolectadas de videos capturados en experiencias previas, los cuales fueron procesados en el laboratorio de la Sección Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Se estudiaron por tendencia espacial y tendencia temporal. En la primera se evaluaron las ecuaciones de las semi elipses y el área de las mismas. En la segunda los videos se analizaron por las ecuaciones de sus semi elipses y por descriptores estadísticos, respectivamente.

Este trabajo de investigación está estructurado en cinco capítulos. El primero titulado El Problema, está subtulado de la siguiente manera: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos,

Alcances y Limitaciones. El segundo capítulo, titulado Marco Teórico, estará conformado por los Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización del Evento de Estudio y el Criterio de Análisis. El tercero, titulado Marco Metodológico está ordenado con los siguientes subtítulos, Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Variables estadísticas, Metodología de la Investigación y Diseño de análisis de los datos. El cuarto capítulo consta de los Resultados y Discusiones. Y el quinto capítulo hace referencia a las Conclusiones y Recomendaciones.

Finalmente, El objetivo de esta investigación es, analizar imágenes de videos de Bioespeckle contentivos de muestras de cultivo controlado de *Trypanosoma cruzi* y *Escherichia coli* para distinguir tanto la presencia y ausencia como las dimensiones de los dos microorganismos, en la Sección Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde noviembre de 2019 hasta marzo de 2020.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Según la OMS la enfermedad de Chagas, causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, constituye una amenaza permanente para casi la cuarta parte de la población de América Latina. Inicialmente la enfermedad de Chagas estaba confinada a esta región, pero en la actualidad se ha propagado a otros continentes. cerca de 100 millones de personas están en riesgo de infectarse, unos 8 millones están infectadas, con 56.000 nuevos casos anuales por todas las formas de transmisión que provocan 12.000 muertes anuales. La enfermedad persistirá mientras exista la vivienda inadecuada, la migración frecuente de las personas y la rápida urbanización. Hasta que no cambien esas condiciones deberá continuarse la lucha contra la infección (Martínez, 2016).

Uno de los problemas diagnósticos en la enfermedad de Chagas es la visualización del parásito etiológico, ya que, si bien se trata de un organismo visible al microscopio y muy móvil, se presenta en concentraciones muy bajas (100 parásitos/ ml o menos). Lo cual impide la detección por microscopía óptica, por ello se procura obtener un método de detección en profundidad de campo, lo cual no es posible lograr con microscopio (Lanis et al,1991).

Escherichia coli se ha asociado a infecciones gastrointestinales, infecciones del tracto urinario, infecciones en piel, bacteriemias, entre otros. La alta morbilidad, así como la variedad en síndromes y cuadros clínicos

asociados a las infecciones por *E. coli*, hacen de esta bacteria uno de patógenos más versátiles y de gran relevancia para el ser humano. Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos son un paso necesario antes del tratamiento clínico de las infecciones, una preocupación importante es el tiempo requerido para obtener un resultado rápido y confiable (Farfán et al, 2016).

En la última década, se ha desarrollado una técnica óptica que permite relacionar la actividad que se presenta sobre la superficie de una muestra, con las variaciones en la intensidad de la luz que refleja. Esto sucede cuando es iluminada con luz coherente (Láser). El fundamento de esta técnica, considera que cuando la micro-geometría de la superficie de la muestra presenta rugosidades del orden de la longitud de onda de la luz incidente, se produce reflexión difusa. En consecuencia, se generan ondas secundarias que interfieren para conformar un patrón de manchas oscuras y brillantes que parecen cubrir el objeto y que se denomina Speckle.

Patiño, Vencue y Vargas (2016) afirman:

Si existe algún tipo de actividad sobre la superficie, las trayectorias ópticas de las ondas secundarias se alteran, lo que origina fluctuaciones, tanto espaciales como temporales, en el Speckle observado. A este fenómeno se le denomina Speckle dinámico o Bioespeckle (si se realiza a una muestra biológica). La capacidad de esta técnica de realizar medidas sin contacto directo, de forma rápida y a bajo costo, la han convertido en un método promisorio para el desarrollo de sistemas de medida de propiedades biológicas (p.86).

Las teorías y aproximaciones teóricas que sustentan esta investigación están relacionadas con la reflexión difusa de la luz y la trayectoria óptica de las ondas secundarias. Al respecto, la reflexión difusa se refiere a la energía que es reflejada por cualquier superficie irregular (Marcelo y Finn, 1998). Y la trayectoria óptica de las ondas secundarias se refiere a que estas son

desviadas por una superficie o un medio generando fenómenos virtuales como es el caso del Speckle (Rodríguez & Virgos, 1999).

La situación actual del problema de estudio ha sido divulgada por varios autores, en los últimos 5 años. Al respecto, Grassi et al, 2019. Diseñaron un ensayo de Bioespeckle láser para la evaluación de susceptibilidad a la Ciprofloxacina de una cepa de *E. coli* K-12. El procesamiento digital de imágenes se realizó mediante tres métodos que fueron comparables a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana clásicas en términos estadísticos. En este sentido, concluyeron que el método Bioespeckle láser permite analizar fluidos corporales, así como otras muestras, y abre un camino posible para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos de forma rápida.

Contreras, 2016 Determinó la actividad del *Trypanosoma cruzi* en presencia de fármacos usando la técnica de Bioespeckle con dos modalidades de procesamiento de imágenes. Refirió, que es más efectivo el método indirecto o método de imagen de diferencias acumuladas de base variable (IDABV).

Moreno (2015) Publicó que el Bioespeckle es una técnica no invasiva que permite realizar análisis en tiempo real, y con tiempos de captura y procesamiento de imágenes reducidos (minutos). También, refirió que esta técnica puede ser usada en laboratorios clínicos con una reducción del tiempo de obtención de resultados. En cuanto a la utilidad del Bioespeckle ha sido divulgado que, permite detectar actividad bacteriana y presencia de parásitos en medios de cultivo (Moreno, 2015; Griffin, 2015).

La investigación ha revelado que con la técnica de Bioespeckle es importante considerar algunas variables que pueden influir sobre el sistema. En tal sentido, se han identificado variables tales como cámara, resolución, aumento, etapas del crecimiento, presencia de antibiótico en el caso del estudio de actividad bacteriana (Moreno, 2015).

Griffin, 2015 Refirió que la bioespequelometría es una técnica que puede sustituir ensayos *in vitro* con *Trypanosoma cruzi*, ya que es más rápida y evita la contaminación del medio.

Después de describir la situación actual del problema, los autores de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación de correspondencia entre las dimensiones de *Escherichia coli* y *Trypanosoma cruzi* con la bioespequeleometría, en videos de cultivos controlados, en la Sección Biotecnología, del Instituto de Investigaciones, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, desde noviembre de 2019 hasta marzo de 2020?

Justificación

La justificación de la investigación alude a las razones que llevaron al investigador a seleccionar el tema en cuestión. Partiendo de, potencialidades, necesidades, oportunidades y tendencias del tema de estudio; las cuales, sirven como fundamento para realizar dicha investigación (Hurtado, 2010).

Los autores de esta investigación identificaron razones de oportunidad, necesidad y potencialidad en el estudio de *Trypanosoma cruzi*, causante de la Enfermedad de Chagas, la cual se presenta principalmente en América Latina tanto en la población de zonas urbanas como rurales. Por otro lado, *Escherichia coli*, por ser uno de los principales agentes causales de infecciones del tracto urinario, enfermedad diarreica aguda, e infecciones sanguíneas y del sistema nervioso (Farfán et al, 2016), ha sido motivo de interés en la realización de esta investigación, considerando que la rápida identificación de estos microorganismos le permitirá al médico aplicar un tratamiento oportuno, que pueda conducir al bienestar del paciente.

En la sección Biotecnología se ha considerado la posibilidad de usar el Bioespeckle como sistema para realizar antibiogramas, por ello se está evaluando toda la metodología concerniente con Bioespeckle para establecer un sistema de antibiograma rápido que le facilite al Bioanalista asistir al Médico y obtener un resultado en menor tiempo. Sin embargo, hasta este momento tiene la característica que detecta muy bien la presencia y ausencia de

microorganismos en muestras clínicas y de control (en estado líquido), pero no se ha puesto a punto una metodología que permita detectar cual es el patógeno infectante.

En este trabajo se está en la búsqueda de posibles soluciones para distinguir entre dos tipos de microorganismos. Por lo tanto, esta investigación puede servir como base para ensayar con otros microorganismos.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Analizar imágenes de videos de Bioespeckle contentivos de muestras de cultivo controlado de *Trypanosoma cruzi* y *Escherichia coli* para distinguir tanto la presencia y ausencia como las dimensiones de los dos microorganismos, en la Sección Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde noviembre de 2019 hasta marzo de 2020.

Objetivos Específicos

- Caracterizar la tendencia espacial del Bioespeckle de *Escherichia coli* en correspondencia con el Bioespeckle de *Trypanosoma cruzi*.
- Caracterizar la tendencia temporal del Bioespeckle de *Escherichia coli* en correspondencia con el Bioespeckle de *Trypanosoma cruzi*.

Alcances y limitaciones de la investigación

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos (Hernández, Fernández y Baptista,

2010). En este sentido, el alcance de esta investigación, será Analizar imágenes de videos de Biospeckle contentivos de muestras de cultivo controlado de *Trypanosoma cruzi* y *Escherichia coli* para distinguir los dos microorganismos. Usando como criterio de análisis la bioespequelometría.

Durante el desarrollo de esta investigación, se presentaron limitaciones relacionadas con la muestra, debido a que los videos fueron grabados anteriormente en condiciones preestablecidas por lo que no se pudo cambiar las condiciones de ensayo. Además, en la obtención de los videos influye la estabilidad del láser y del flujo eléctrico, las vibraciones, el estado y la concentración de los microorganismos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes Históricos

La primera teoría sobre el Speckle se desarrolló en los años 60. En los años 70, se comenzó a investigar sobre la variación temporal del Speckle causada por el movimiento. Concretamente la conexión entre las fluctuaciones del patrón de Speckle y el movimiento de los centros de dispersión en los organismos vivos. La manera en que se manifestaban las fluctuaciones en el Speckle es la reducción del contraste del patrón. En los 80, este efecto fue usado para estudiar el flujo sanguíneo en la retina (Fercher, 1981). Aunque la técnica funcionaba, la necesidad de procesar las fotografías antes de poder acceder a la información fue un problema y el interés en la técnica se desvaneció. Ya en los años 90, los nuevos métodos digitales, permitieron el desarrollo de una versión en tiempo real del método mucho más útil.

En la Sección Biotecnología, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Los Andes, se empezó a estudiar la técnica de Bioespeckle desde el 2011.

García, (2011) estandarizó el uso del Speckle dinámico para detectar la presencia de parásitos, para ello realizó el ensayo en una placa de V.D.R.L. y efectuó grabaciones de cada pozo realizando videos de 60 segundos. Esos videos se procesaron con un programa diseñado, elaborado y ejecutado por Andrades, (2011), usando el método de las Diferencias Temporales. Los resultados indican que los parásitos en presencia de los diversos fármacos

ensayados alcanzan un valor de media arrojado por el programa de Andrades, (2011), mayor que en ausencia de fármacos, estimulándose el patrón de Speckle bajo estas condiciones, así mismo, ésta relación es dependiente de la concentración del fármaco. Finalmente, demostró que esta técnica puede sustituir los ensayos *in vitro*, ya que es más rápida y se evita la contaminación del medio.

Belandría, (2011) diseñó experiencias de Bioespeckle tomando en cuenta los resultados de otros investigadores, García, (2011) y Lobo, (2011), pero aplicadas a *Escherichia coli*. El diseño consistió en evaluar tanto el efecto de la concentración de antibiótico sobre la bacteria, como el tiempo de acción del mismo, tratando de encontrar tanto la concentración óptima como el tiempo mínimo para la detección por Bioespeckle. Para ello desarrolló el Bioespeckle con medio de cultivo, medio más bacterias, medio más bacterias más antibiótico y medio más antibiótico, inicialmente se observó que la presencia de bacterias aumenta el patrón de Speckle, además se decidió esperar un tiempo prudencial de 15 minutos, y así evitar los efectos por movimiento, mezcla y difusión.

Los resultados demuestran que el Bioespeckle es más eficiente con respecto a tiempo que técnicas tradicionales como macrodilución y difusión en agar, por tanto, representa un método que tiene un valor predictivo para obtener concentración mínima inhibitoria de un antibiótico.

En esos tres trabajos, los videos se procesaron por el Programa de Andrades (2011), el cual fue diseñado por el método de las diferencias temporales tomadas de Pomarico y DiRocco, (2004). Este programa hace la resta de las matrices de fotogramas consecutivos, y luego calcula la media de cada matriz de diferencia y la media de las medias de diferencia, obteniendo un solo valor de intensidad media final. Este método tiene la particularidad de “normalizar” y disminuir las diferencias.

En los trabajos sucesivos se ha cambiado el análisis hacia un sistema de autocorrelación comparando cada matriz con una matriz constante y tomando

el cambio que ocurre en función del tiempo o pendiente, lo que ha mejorado las diferencias entre videos. Este método ha sido denominado comparación de base constante.

En un estudio similar, realizado por Díaz y Gallego, (2013) se utilizó Bioespeckle para medir el efecto de Ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*, los resultados permiten inferir que se puede distinguir materia viva de materia muerta, además se encontró una posible correlación entre la pendiente de la tendencia lineal, la concentración bacteriana y la concentración del antibiótico, tendiendo a ser mayor la pendiente cuando aumenta la concentración de bacterias, mientras que disminuye cuando aumenta el antibiótico. En este trabajo los videos también se procesaron manualmente por el método de comparación con base constante.

Los trabajos de Méndez, (2015) y Abche, (2015) han conducido al avance en el procesamiento de imágenes. Méndez, (2015) examinó las ecuaciones y los algoritmos utilizados en el procesamiento y propuso un nuevo método, basado en los conceptos de flujo óptico, que denominamos método óptico Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable (IDABV). Abche, (2015) tomó esa propuesta y reprocesó los videos obtenidos por Belandría, (2011) y tomando en consideración el modo de acción de los antibióticos utilizados, contribuyó a constatar que ese nuevo procesamiento es más adecuado.

Todos los trabajos anteriores se llevaron a cabo con un ensamble manual de láser, cámara y porta muestras, que se armaba en un cuarto oscuro. A partir del año 2012, se comenzó a elaborar un prototipo de Bioespeckle en el contexto del Proyecto de Innovación del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, intitulado: “Producto y proceso para medir el efecto de antibióticos sobre microorganismos en un tiempo corto y utilizando Bioespeckle” Proyecto N°. 2012001862.

Moreno, (2015) reunió las experiencias anteriores para mejorar los datos de Bioespeckle. Para ello evaluó el efecto del antibiótico Ampicilina–Sulbactam sobre *Escherichia coli*, por Bioespeckle, usando láser verde en el prototipo

construido y se evaluaron variables que inciden sobre este sistema, tales como cámara, resolución, aumento, etapa del crecimiento, presencia de antibiótico, etc. El procesamiento de videos se ha realizado por el método de comparación con base constante y por el método óptico IDABV. En ese contexto se ha logrado poner a punto una metodología de “Antibiograma por Bioespeckle” y se ha evaluado la presencia de sistemas particulados para aumentar las diferencias entre muestras vivas y aquellas afectadas por el antibiótico.

Todo este sistema de detección de microorganismos por Bioespeckle se aplicó a muestras de orina de pacientes que clínicamente tenían infección urinaria y sus muestras se analizaron por VITEK y por Bioespeckle, Muñoz (2015). Los resultados obtenidos en la comparación de coincidencia paciente por paciente, Vitek-Bioespeckle, es de 75%, concluyendo que el Bioespeckle es capaz de detectar actividad biológica en muestras de orina y que pudiera llegar a ser una prueba complementaria al análisis microbiológico tradicional, tal como cultivo, antibiograma y VITEK, ya que, en un tiempo muy corto, podría dar una indicación al médico para iniciar el tratamiento, que luego se confirmaría por los métodos tradicionales.

Arrieche, (2016) aplicó dos métodos (Método Directo y Método Indirecto o Mejorado) para el procesamiento de imágenes de Bioespeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi* en viales de cultivo profundo. Esta autora concluye que el método directo no arroja resultados coherentes mientras que la aplicación del método IDABV con las herramientas adicionales de análisis de Bioespeckle permitió obtener buenos resultados, en igualdad de condiciones de las muestras y poder hacer el seguimiento a parásitos en cultivo.

Igualmente, Contreras, (2016) encontró que la aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Bioespeckle, permite hacer la comparación del efecto de fármacos sobre *Trypanosoma cruzi*.

Grassi et al, (2016) reunieron la información de Bioespeckle de *T. cruzi* y compararon tres métodos de procesamiento de imágenes, logrando un

sistema adecuado para estudiar el efecto de Benzinidazol sobre este parásito, pudiendo describir un efecto inmediato y otro tardío.

Rodríguez, (2018) y Molina, (2018) utilizaron el Bioespequelómetro y analizando las imágenes por Diferencias Generalizadas (Método Indirecto) aplicaron esta tecnología a extractos de algas, detectando Fotosensibilidad/Fotoactivación de los extractos.

Contreras, (2018) y Sánchez, (2018) retomaron los resultados de Belandria, (2011) y aplicaron la metodología diseñada por Grassi et al, (2019) en la que aplicaron los métodos de Selección ROI, Diferencias Generalizadas, Análisis Exploratorio de Datos (Regresión lineal, Normalidad, Homocedasticidad, Independencia) y ARIMA. Lady García aplicó este mismo diseño experimental a las muestras de orina de pacientes, del trabajo de Muñoz, (2015).

Grassi et al (2019) aplicaron técnicas de análisis digital de imágenes a videos obtenidos por Bioespequelometría de muestras control de laboratorio, con el objetivo de demostrar el efecto de Ciprofloxacina sobre de *Escherichia coli* K-12. Esto permitió proponer la posibilidad de hacer un antibiograma rápido.

Bases Teóricas

Aproximación teórica sobre la Reflexión difusa de la luz

Cuando el láser impacta con un material, la energía fotónica puede tomar varias vías. Una es absorción, que se refiere a que tan lejos es absorbido o transferido el rayo dentro del material. Si el material absorbe la energía láser, la energía radiante es convertida en energía térmica. Y la otra puede ser la reflexión difusa que se refiere a la energía que es reflejada por cualquier superficie irregular o con movimiento. Cuando ésta es irradiada por un haz de luz (Marcelo y Finn, 1998).

Aproximación teórica sobre la Trayectoria óptica de las ondas secundarias

Una onda secundaria aparece cuando hay una interacción de una onda primaria con un medio u objeto, que desvía su trayectoria o cambia alguna de sus propiedades. La trayectoria óptica de las ondas secundarias se refiere, a que éstas son desviadas por una superficie o un medio y se interfieren con trayectoria aleatoria en todas las direcciones, generando fenómenos virtuales como es el caso del Speckle (Rodríguez y Virgos, 1999).

Definición Operacional de Términos

Tendencia temporal y Tendencia espacial

Una serie temporal o cronológica es una sucesión de datos medidos en determinados momentos y ordenados cronológicamente. Los datos pueden estar espaciados a intervalos iguales (como la temperatura en un observatorio meteorológico en días sucesivos al mediodía) o desiguales (como el peso de una persona en sucesivas mediciones en el consultorio médico).

Para el análisis de las series temporales se usan métodos que ayudan a interpretarlas y que permiten extraer información representativa sobre las relaciones subyacentes entre los datos de la serie o de diversas series y que permiten en diferente medida y con distinta confianza extrapolar o interpolar los datos y así predecir el comportamiento de la serie en momentos no observados (Chander, R. y Scott, M., 2011). El análisis de tendencias cuantifica y explica los patrones en un conjunto de datos. En este caso, esos datos pertenecen a un espacio determinado (tendencia espacial) o a un tiempo determinado (tendencia temporal).

Generalidades de Trypanosoma cruzi

T. cruzi es un protozoo unicelular polimórfico que pertenece al subfilo Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, que se caracteriza por la presencia de un organelo llamado kinetoplasto que se encuentra en la mitocondria y tiene una ubicación subterminal en el extremo posterior.

Estos parásitos circulan entre huéspedes vertebrados como armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos, primates, ser humano, perros, gatos; y en vectores intradomiciliarios, como el “chipo”, el cual es un artrópodo hematófago proveniente de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, Estos insectos habitan en las grietas y huecos de edificaciones mal construidas tanto en zonas rurales como urbanas, se alimentan de la sangre de personas mientras duermen. Los mamíferos salvajes y domésticos que son picados e infectados actúan como reservorios del parásito.

La forma parasitaria flagelada del *T. cruzi* se encuentra en el sistema circulatorio del huésped y es conocida como el tripomastigote, este tiene aspecto fusiforme y alargado de aproximadamente 12-30 μm de longitud; posee un núcleo grande en su parte central, un flagelo y una membrana ondulante que rodea todo el cuerpo. Dentro de las células hospederas, el tripomastigote se convierte en amastigote, un estado vegetativo que se caracteriza por su forma redondeada y no poseer flagelo, su tamaño aproximado de 1,5 a 4 μm y suele aglomerarse formando nidos tisulares o también llamados pseudoquistes. Dentro del ciclo del parásito existe una forma morfológica intermedia llamada epimastigote, su tamaño es un poco menor que el del tripomastigote, tiene de aspecto fusiforme, membrana ondulante pequeña y no posee flagelo (Palmezano, et al, 2015).

Generalidades de *Escherichia coli* K-12

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativa, de acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos de la familia Enterobacteriaceae, con un tamaño promedio de 1,1-1,5 μm de ancho y 2,0-6,0 μm de largo, consta de un cuerpo con forma elipsoidal, que se propulsa gracias a la rotación de un flagelo de unos 250 nm de espesor y que se extiende por aproximadamente 15 μm . Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y tener otros nichos, produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea, infecciones del tracto urinario, bacteriemias, etc. (Souza et al, 2001).

Fundamento del Bioespeckle

Cuando un haz de luz coherente (láser) ilumina una muestra irregular o con movimiento, se produce un efecto de interferencia aleatoria con forma granular que se denomina Speckle. Es un patrón de interferencia producido por la luz reflejada o dispersada desde diferentes partes de la superficie de la muestra iluminada. Si la superficie es rugosa (variaciones de altura mayores a la longitud de onda del láser usado), la luz de diferentes partes de la superficie atraviesa caminos ópticos con diferentes longitudes antes de alcanzar el plano imagen. La imagen resultante en un punto, es determinada por la superposición de todas las ondas que llegan a ese punto. Si la amplitud resultante es cero, porque todas las ondas se cancelan, en dicho punto se verá una mota oscura mientras que, si todas las ondas que llegan a ese punto lo hacen en fase, se observará una intensidad máxima.

El Speckle dinámico es el resultado de la evolución temporal de un patrón Speckle, donde las variaciones en los elementos de dispersión responsables de la formación del patrón de interferencia en la situación estática producen

los cambios que se observan en el patrón Speckle, donde sus granos cambian su intensidad (nivel de gris), así como su forma a lo largo del tiempo. El patrón dinámico muestra los cambios que, si se analizan a lo largo del tiempo, representan la actividad del material iluminado. El efecto visual es el de un líquido hirviendo o la imagen en un televisor lejos del ajuste (Ruiz, 2015).

Usos del Bioespeckle

El Bioespeckle es la designación de Speckle dinámico cuando la aplicación se basa en material biológico. El tejido biológico es uno de los más complejos que se puede encontrar en la naturaleza. Además, se dificulta su análisis por la variabilidad intrínseca presente entre una muestra y otra. Estos hechos dificultan aún más la comparación de resultados entre muestras diferentes incluso en presencia del mismo estímulo. En este contexto, se han aplicado patrones de moteado para estudiar bacterias, parásitos, semillas y plantas (Ramírez, 2011).

Parásito

Los parásitos son los microorganismos con mayor grado de complejidad, aunque todos los parásitos se clasifican como eucariotas, algunos son unicelulares y otros pluricelulares. su tamaño oscila desde protozoos diminutos de tan solo 1-2 μm de diámetro (el tamaño de muchas bacterias) a helmintos que pueden medir hasta 10 metros de longitud y artrópodos (pulgas). Son organismos que sólo pueden vivir a expensas de otros más desarrollados, pueden afectar a individuos del reino animal y vegetal. pudiendo llegar a ejercer acciones muy perjudiciales en estos individuos, provocando incluso su muerte (Murray, 2009).

Bacteria

Las bacterias son microorganismos unicelulares sencillos que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas, por lo que, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y esta se compone de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (Murray, 2009).

Láser

La palabra láser es un acrónimo de las palabras inglesas: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, es decir, amplificación de luz mediante emisión estimulada de radiación. Realmente representa el nombre de un dispositivo cuántico, que sirve para generar ondas electromagnéticas de la gama óptica. El láser proporciona una forma de emisión de radiación luminosa de características especiales. La radiación láser es monocromática (una sola longitud de onda), posee una gran direccionalidad (escasa divergencia) y puede concentrar un elevado número de fotones en fase, en áreas muy pequeñas.

Para la emisión de luz visible a partir de un foco, debe comunicarse a éste una energía (térmica, eléctrica, química, etc.) que excite sus átomos. Generalmente se producirá una desexcitación inmediata con emisión continua de radiaciones que, son heterocromáticas (de distinta longitud de onda), no son coherentes (no se encuentran en fase), y se propagan en todas las direcciones del espacio.

La radiación láser posee todas las propiedades de la luz; sin embargo, se caracteriza por ser: monocromática (todos sus fotones tienen igual longitud de onda), coherente (todos los fotones se encuentran en fase temporal y espacial) y direccional (el haz de radiación presenta escasa divergencia, fruto de las dos características anteriores). La principal utilidad práctica de la radiación láser reside en que concentra un gran número de fotones por unidad de superficie. Estas características han permitido una gran diversidad de aplicaciones en el campo de la tecnología actual y, en concreto, en las ciencias de la salud (Canales, 2007).

Procesamiento de imágenes

Es una técnica de compresión con pérdida, que consiste en comprimir un rango de valores a un único valor. Cuando el número de símbolos discretos en un flujo dado se reduce, el flujo se vuelve más comprensible.

El ojo humano es bastante bueno percibiendo las pequeñas diferencias en el brillo sobre un área relativamente extensa, pero no es tan bueno distinguiendo la misma intensidad de variación de brillo de alta frecuencia. Este hecho permite reducir la cantidad de información requerida ignorando los componentes de alta frecuencia (Mitchell y Pennebaker, 1997).

Operacionalización del Evento de Estudio y el Criterio de Análisis

Para operacionalizar el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de los mismos (Hurtado, 2010). En tal sentido, se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia.

Tabla 1. Operacionalización del Evento de Estudio Tendencia Espacial

Evento de Estudio	Definición Conceptual	Definición Operacional
Tendencia espacial	Es una ecuación que describe la forma que el microorganismo presenta en el espacio evaluado por Bioespeckle.	Se mide a través de la forma ecuacional que presenta el mejor ajuste a los cambios espaciales de intensidad.
Dimensiones		Indicador
Valor de intensidad media, expresado en unidades arbitrarias.		Variables y coeficientes de la ecuación de tendencia.

(Molina O., 2020).

Tabla 2. Operacionalización del Evento de Estudio Tendencia Temporal

Evento de Estudio	Definición Conceptual	Definición Operacional
Tendencia temporal	Es una ecuación que describe la forma que el microorganismo presenta a lo largo del tiempo evaluado por Bioespeckle.	Se mide a través de la forma ecuacional que presenta el mejor ajuste a los cambios temporales de intensidad.
Dimensiones		Indicador
Valor de intensidad media en unidades arbitrarias.		Variables y coeficientes de la ecuación de tendencia.

(Molina O., 2020).

Tabla 3. Operacionalización del Criterio de Análisis

Evento de Estudio	Definición Conceptual	Definición Operacional
Bioespeckle	<p>Es un fenómeno óptico que permite relacionar la actividad que se presenta sobre la superficie de una muestra con las variaciones en la intensidad de la luz que refleja, cuando es iluminada con luz coherente (Láser)</p> <p>(Patiño, Vencue y Vargas, 2016).</p>	<p>Cuando la micro-geometría de la superficie de la muestra presenta rugosidades del orden de la longitud de onda de la luz incidente, se produce reflexión difusa, lo que genera ondas secundarias que interfieren para conformar un patrón de manchas oscuras y brillantes que parecen cubrir el objeto.</p>
Dimensiones		Indicador
<p>Valor de intensidad media, calculada por el método de diferencias generalizadas y el método de diferencias temporales.</p> <p>(García ,2011).</p>		<p>Valor de intensidad media disminuido o aumentado en comparación con el patrón.</p>

(Molina O., 2020).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Los tipos de investigación que propuso Hurtado (2010), en el libro titulado “Proyecto de investigación”, se definen a través de la pregunta y el objetivo general. De manera que este trabajo corresponde a una investigación Analítica. Este tipo de investigación, trata de entender las situaciones en términos de las relaciones de sus componentes. Intenta descubrir los elementos que componen cada totalidad y las interconexiones que dan cuenta de su integración. La investigación analítica implica el estudio del evento de estudio en función de un criterio de análisis. Intenta identificar las sinergias menos evidentes de los eventos analizados. La presente investigación, pretende entender la correspondencia de la forma y tamaño de *Escherichia coli* y *Trypanosoma cruzi* con la Bioespequelometría.

Diseño de la Investigación

Hurtado (2010), nos indica que el diseño de la investigación se define a través del procedimiento para recolectar la información, esto se refiere a dónde y cuándo se recopila la información, con el fin de dar respuesta a la pregunta de investigación. Al respecto, la muestra se recolectó en un ambiente creado, en el laboratorio de la Sección Biotecnología, del Instituto de Investigaciones, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes. La temporalidad corresponde a un período retrospectivo y en un sólo momento. A su vez, la amplitud de la información es multieventual, los datos se tomaron de videos elaborados en trabajos anteriores de Bioespequelometría de *T. cruzi*

y *E. coli*. Por lo tanto, el diseño de esta investigación es de laboratorio, retrospectivo, transeccional y multieventual.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Se define la población como el conjunto de elementos con características comunes que son objeto de análisis y para los cuales serán válidas las conclusiones de la investigación (Arias, 2006). En este caso, la unidad de estudio está representada por videos de parásitos (*Trypanosoma cruzi*), bacterias (*Escherichia coli*) y sus respectivos controles, obtenidos en experiencias previas utilizando como criterio de análisis la Bioespequelometría.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral, corresponde a cuatro (04) videos de parásitos (*Trypanosoma cruzi*) obtenidos en experiencias previamente realizadas por, Grassi et al (2016). Y seis (06) videos de bacterias (*Escherichia coli*) obtenidos en experiencias previamente realizadas por, Grassi et al (2019).

Variables estadísticas

Las variables estadísticas de esta investigación están clasificadas desde su naturaleza y escala de medida. El fin es identificar el indicador estadístico pertinente (Tabla 4). Dichas variables, tiempo, espacio, intensidad. Por ser una investigación analítica, la cual, tiene como criterio de análisis la técnica Bioespequelometría.

Tabla 4. Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos

Variables	Tipo de variable			Escala de medida				Indicador estadístico
	Cualitativa	Cuantitativa		Nominal	Ordinal	Intervalo	Razón	
		Discreta	continua					
Tiempo			X	X				Coeficiente de determinación que indica el ajuste a una tendencia
Espacio			X	X				Coeficiente de determinación que indica el ajuste a una tendencia
Intensidad		X		X				Coeficiente de determinación que indica el ajuste a una tendencia

(Molina O., 2020).

Metodología de la Investigación

Recolección de Datos

Se identificaron y organizaron los videos obtenidos por Bioespequeletría en experiencias previas, de muestras de laboratorio de *E. coli* y *T. cruzi*, para ello, se realizaron las Tablas 5 y 6, donde se organizó la información. Los videos están ubicados en pares tal como debe ser la comparación con y sin microorganismos, a un mismo tiempo.

Videos de parásitos

Se contó con cuatro (04) videos de parásitos obtenidos en experiencias previamente realizadas por, Grassi et al (2016). Los cuatro (04) videos corresponden a dos tiempos en minutos (t0 y t15). Cada uno corresponde con un pozo de la placa de VDRL que contiene lo que se explica en la Tabla 5.

Tabla 5. Videos de parásitos (*Trypanosoma cruzi*)

MO. de estudio y condición	Ident. del experimento	Medio de cultivo	Medio + MO.	Conc. de parásitos	Número de video	Tiempo (min.)
<i>T. cruzi</i> (con parásitos)	Spck 9	--	100	4E05 par/ml	14	T0
<i>T. cruzi</i> (sin parásitos)	Spck 9	100	--	--	18	T0
<i>T. cruzi</i> (con parásitos)	Spck 9	--	100	4E05 par/ml	20	T15
<i>T. cruzi</i> (sin parásitos)	Spck 9	100	--	--	24	T15

Nota. MO.: microorganismo, Ident.: identificación, Conc.: concentración, par.: parásitos, Min.: minutos.

Condiciones en las que se realizó el experimento de parásitos

El sistema de imagen láser Bioespeckle consistió en un láser He-Ne de 1 mW (no polarizado) que funciona a 632.8 nm que está acoplado a un lente convexo divergente para formar un punto de aproximadamente 10 mm en pozos individuales en la placa VDRL.

El láser se encontraba a una distancia de 50 cm y el haz tuvo un ángulo de incidencia de 72°. Ya que los pozos tenían un diámetro interno de 12.7 +/- 0.1 mm y el rayo láser crea un punto que tiene un diámetro máximo de 10 mm, el haz ilumina el centro del pozo evitando así efectos de borde. La placa VDRL se colocó encima de un cartón negro opaco fijado en una mesa con sistema antivibraciones. El sistema contó con una cámara CCD (Thorlabs USB.2, 30

fps, 6.45 μm Square Pixels) que se encontraba a 30 cm de la muestra, conectada a una PC que graba videos de 0.5–1 min.

La resolución de la cámara fue de 1280 \times 1024 píxeles, y su sistema óptico consta de distancias focales fijas de 3.5–75 mm con apertura máxima de hasta $f / 0.95$, así como una lente con zoom de 18–108 mm $f / 2.5$. de altura. Las lentes de aumento están formadas por un sistema modular que presenta un aumento de 0.07 a 28.

Los datos de video con motas se enviaron a la computadora para el procesamiento de video e imagen. Con esta configuración, la región iluminada ocupa completamente la imagen de forma homogénea, de manera que toda la imagen esté sujeta a análisis y procesamiento (Grassi et al, 2016).

www.bdigital.ula.ve

Videos de bacterias

Se contó con seis (06) videos de bacterias obtenidos en experiencias previas realizadas por, Grassi et al (2019). Los seis (06) videos corresponden a tiempo 15min. Cada uno corresponde con un pozo de la placa de VDRL que contiene lo que se explica en la Tabla 6.

Tabla 6. Videos de bacterias (*Escherichia coli*)

MO de estudio y condición	Medio de cultivo	Medio + MO	Atb.	Conc. Antb.	NaCl (ug)	Conc. de MO.	Número de video	Tiempo video (min)
<i>E. coli</i> (sin bacterias)	95	--	5	7,63E-04 ug/ml	--	---	Cipro 1	T15
<i>E. coli</i> (con bacterias)	--	95	5	7,63E-04 ug/ml	--	1,5E08 bact/ml	Cipro 2	T15
Control 1 Cipro (sin bacterias)	100	--	--	--	--	---	Control 1	T15
Control 3 Cipro (con bacterias)	--	100	--	--	--	1,5E08 bact/ml	Control 3	T15
Control 2 Cipro (sin bacterias)	95	--	--	--	5	---	Control 2	T15
Control 4 Cipro (con bacterias)	--	95	--	--	5	1,5E08 bact/ml	Control 4	T15

Nota. MO.: microorganismo, Ident.: identificación, Atb.: antibiótico, Conc.: concentración, min.: minutos, bact.: bacterias.

Condiciones en las que se realizó el experimento de bacterias

El sistema de imagen láser Bioespeckle contó con un láser no polarizado He – Ne de 1 mW que funciona a 632.8 nm.

El láser se encontraba a una distancia de 50 cm, acoplado a una lente divergente convexa y el haz forma un punto de 10 mm en los pocillos individuales de la placa VDRL, con un ángulo de incidencia de 72 °. Dado que los pozos tienen un diámetro interno de 12.7 ± 0.1 mm, el haz ilumina el centro del pozo de la placa VDRL que descansa sobre un cartón negro opaco, evitando destellos y efectos de borde, que a su vez descansan sobre una mesa antivibraciones. Una cámara CCD (Thorlabs USB.2, 30 fps) se encuentra a 30 cm de la muestra y es conectado a una PC que graba videos de 0.5–1min.

La resolución de la cámara es 320×240 , tamaño de píxel $6.45 \mu\text{m}$, moteado tamaño aprox. $21,6 \mu\text{m}$. Los datos de video Speckle se envían a una computadora para procesamiento de video e imagen. Para visualizar una cantidad significativa de bacterias por píxel, una cantidad relativamente baja, se eligió la resolución para la cámara (Grassi et al, 2019).

Procesamiento de Datos

Estos videos fueron fragmentados en fotogramas, usando el programa DVDVideoSoft Studio. En la Tabla 7, se muestra el número total de fotogramas de cada video, el tiempo de duración y el valor de Fotogramas/segundo (fps)

Tabla 7. Separación de videos en fotogramas

Experimento	Video	Fotogramas totales	Duración (Segundos)	Foto/segundo (Fps)
Control	1	773	31	24,93
	2	771	31	24,87
	3	783	31	25,25
	4	775	31	25,00
Control T. cruzi	18	1.512	60	25,20
	24	2.375	95	25,00
Speckle Olga Cipro	1	762	30	25,40
	2	763	30	25,43
	3	763	30	25,43
	4	770	31	24,83
T. cruzi	14	1.522	61	24,95
Speckle 9	20	1.512	60	25,20

Procedimiento de Tendencia Espacial

Procesamiento directo

Utilizando el programa ImageJ, se seleccionó un video y se procedió de la siguiente manera: File>Open>Seleccionar Fotograma (#100)>Edit>Selección>Specify>Ancho:320>Alto:1 Pixel> X:1>Y:200>OK>Image>Crop>Analyze>Plot Profile>List>Edit>Copy>Abrir Excel>Pegar en Excel. De esta manera se obtuvieron los valores de intensidad para una línea de píxeles X: 320, cuya resolución es de 320x240 píxeles.

Selección de las semi elipses

Luego usando Excel, esa línea de píxeles se graficó completa colocando número de píxel (variable independiente) vs intensidad (variable dependiente). Luego se seleccionaron regiones que correspondieran a picos que tuvieran un buen ajuste a una tendencia polinomial. En todos los casos se ajustó a una ecuación polinómica de segundo grado y se obtuvo el coeficiente de determinación (R^2). Para la selección de las regiones se tomaron en cuenta los siguientes criterios: semi elipses que formaran picos simétricos, con más de tres (03) puntos y cuyas ecuaciones tuvieran un R^2 de 0,9 o superior.

Se seleccionaron regiones similares (mismo rango de píxeles) para el par de videos con y sin microorganismos. De cada ecuación se tomó en cuenta el coeficiente de x^2 , y se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en cada caso. Se llevaron a una tabla y se compararon por pares con la misma condición, pero con y sin microorganismos.

Cálculo del área de las semi elipses

Se realizó el cálculo del área de las semi elipses de acuerdo con la ecuación: $A = ab\pi/2$. Donde A es área, y a y b son los radios de la elipse.

Procesamiento con separación en canales o bandas de colores (sistema RGB)

Utilizando el programa ImageJ, se seleccionó un video y se procedió de la siguiente manera: File> Open> Seleccionar Fotograma (#100) > Image> Color> Split Channel > Red> Edit > Selección> Specificity> Ancho:320> Alto: 1 Pixel> X:1> Y:200> OK> Image>Crop> Anallize> Plop Profile> List> Edit> Copy> Abrir Excel> Pegar en Excel. De allí en adelante, se siguió la misma metodología descrita para la selección de las semi elipses.

Procedimiento de Tendencia Temporal

Para la tendencia temporal se utilizó el programa SAGA GIS para obtener las medidas repetidas en el tiempo de un pixel previamente seleccionado, X: 303 y Y:120, para el cual se obtuvieron 250 valores a partir del fotograma número 100. Estas medidas repetidas en el tiempo se procesaron de dos maneras.

Primero, se extrajeron sectores para obtener la tendencia polinómica de segundo orden, siguiendo la misma metodología descrita para la selección de las semi elipses en la tendencia espacial, obteniendo también, el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para el coeficiente del término x^2 . Sin embargo, se consideró que es un método subjetivo, por lo que se buscó una manera más objetiva y cuantitativa de hacerlo. Para ello se utilizó el

segundo método en el cual se calculó el promedio de intensidad de un pixel en el tiempo (coordenadas, X: 303, Y:120), desviación estándar y coeficiente de variación de los datos de cada video en pares de comparación como se venía realizando anteriormente.

Diseño de análisis de los datos

Los resultados de esta investigación fueron analizados a través del enfoque cuantitativo. Tal como lo propusieron Palella y Martins (2010), se recolectaron los datos relacionados con el problema de investigación, se analizaron matemáticamente, en Microsoft Excel 2017. Se hicieron comparaciones de los términos variables y de gráficos que representan cada uno de los fenómenos. El análisis descriptivo de los resultados se llevó a cabo a través de comparaciones de los términos variables en tablas y gráficos que representan cada uno de los fenómenos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación en Fotogramas

Todos los videos presentan alrededor de 25 fps, por lo que la velocidad de toma del video es constante y no parece ser una variable interviniente.

Tendencia Espacial

Tendencia Espacial por el Método Directo

(sin separar en bandas de colores)

Para la extracción de datos se usaron los programas, DVD video Soft Free Studio, el cual permite separar videos en fotogramas, y el programa ImageJ, para obtener de cada fotograma, una línea de píxeles con valores de intensidad para cada uno. Usando las coordenadas X=1, Y: 220 (ancho de la línea: 320 pixeles, alto de la línea: 1 pixel), de cada línea completa, se obtuvo el valor de intensidad para cada pixel. Estos valores se graficaron en Excel y se seleccionaron regiones con buen ajuste a una ecuación polinómica de segundo orden y cuidando que las regiones tomadas en cada caso, fueran similares para la condición con microorganismos y sin microorganismos.

A continuación, en la Tabla 8, se muestran los resultados obtenidos para los videos de pozos que contienen parásitos y sus controles sin parásitos.

Tabla 8. Resultados de tendencia espacial por el método directo en parásitos (*T. cruzi*).

VIDEO	ESCALA	ECUACIÓN	R ²
VIDEO 18 (sin parásitos)	197-202	$y = -40.179x^2 + 2E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9482
	224-227	$y = -86.666x^2 + 4E+07x - 4E+09$	R ² = 0,982
	228-231	$y = -111.667x^2 + 5E+07x - 6E+09$	R ² = 1
	268-271	$y = -70.000x^2 + 4E+07x - 5E+09$	R ² = 0,9841
Promedio: 77.128		DE: 30.000	CV: 39
VIDEO 14 (con parásitos)	150-156	$y = -46.349x^2 + 1E+07x - 1E+09$	R ² = 0,9898
	176-179	$y = -16.0834x^2 + 6E+07x - 5E+09$	R ² = 0,9392
	278-282	$y = -53.571x^2 + 3E+07x - 4E+09$	R ² = 0,9867
	288-291	$y = -57.500x^2 + 3E+07x - 5E+09$	R ² = 0,9969
Promedio: 79.564		DE: 54.377	CV: 68
Relación con y sin microorganismo: 1,75			
VIDEO 24 (sin parásitos)	106-109	$y = -110.000x^2 + 2E+07x - 1E+09$	R ² = 0,9996
	122-125	$y = -83.333x^2 + 2E+07x - 1E+09$	R ² = 0,9092
	183-186	$y = -95.833x^2 + 4E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9755
	296-299	$y = -85.833x^2 + 5E+07x - 8E+09$	R ² = 0,9958
Promedio: 93.750		DE: 12.105	CV: 13
VIDEO 20 (con parásitos)	130-134	$y = -86.905x^2 + 2E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9703
	146-149	$y = -80.834x^2 + 2E+07x - 2E+09$	R ² = 1
	196-200	$y = -84.286x^2 + 3E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9668
	230-236	$y = -33.532x^2 + 2E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9144
Promedio: 71.389		DE: 25.360	CV 36

Relación con y sin microorganismo: 2,75

Nota: DE: Desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

En la tabla 8, se comparó el video 18 (sin parásitos) con el video 14 (con parásitos) observamos que el promedio del coeficiente del primer término de la ecuación del primer video es menor, siendo 77.128 para el primer video y 79.564 para el segundo video, a su vez presenta mayor variabilidad en los datos el video que contiene parásitos, con respecto al que no los contiene, presentándose una relación de variación de 1,75 entre los coeficientes.

Como se puede observar, el coeficiente de variación sí expresa la relación esperada ya que éste es mayor para el video que contiene parásitos. Este coeficiente ha sido utilizado por otros autores como descriptor de moteado de Speckle y ha sido denominado Contraste Temporal ya que es aplicado a medidas repetidas en el tiempo (Sendra, 2010). En este caso, hemos aplicado el Contraste Temporal a una secuencia espacial obteniendo el resultado esperado.

Este descriptor que relaciona la desviación estándar con el promedio de la intensidad, es una medida de la variabilidad con menor énfasis en los valores absolutos de intensidad. Esto es interesante debido a que en estos ensayos la intensidad del láser puede no ser constante debido a variaciones en la corriente eléctrica o al tiempo de uso del láser. Sin embargo, este descriptor puede descubrir una diferencia entre videos, aunque sea pequeña.

En la comparación del video 24 (sin parásitos) con el video 20 (con parásitos), se observó que el promedio del coeficiente del primer término de la ecuación del primer video es mayor, siendo 93.760 para el primer video y 71.389 para el segundo video, sin embargo, presenta mayor variabilidad en los datos el video que contiene parásitos, con respecto al que no los contiene. Nuevamente el coeficiente de variación expresa la relación esperada, siendo

mayor para el video 20 que contiene parásitos y arrojando una relación de 2,75.

De esta manera, el coeficiente de variación puede ser el descriptor que mejor exprese la relación buscada, siendo éste 1,75 y 2,75 respectivamente para la presencia de parásitos en comparación con el video que no los contiene.

A continuación, en la tabla 9, se muestran los resultados obtenidos para los videos de pozos que contienen bacterias y sus controles, sin bacterias.

Tabla 9. Resultados de tendencia espacial por el método directo en Bacterias (*E. coli*)

VIDEO	ESCALA	ECUACIÓN	R ²
VIDEO	188-192	$y = -125.714x^2 + 5E+07x - 5E+09$	R ² = 0,9378
	192-197	$y = -93.214x^2 + 4E+07x - 4E+09$	R ² = 0,9303
CIP 1	230-235	$y = -65.893x^2 + 3E+07x - 4E+09$	R ² = 0,9544
(sin bacterias)	272-275	$y = -120.000x^2 + 7E+07x - 9E+09$	R ² = 0,9741
	Promedio: 101.205	DE: 27,54	CV: 27
VIDEO	109-112	$y = -182.500x^2 + 4E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9695
	219-222	$y = -135.000x^2 + 6E+07x - 7E+09$	R ² = 0,9496
CIP 2	249-252	$y = -70.000x^2 + 4E+07x - 4E+09$	R ² = 0,954
(con bacterias)	264-267	$y = -50.000x^2 + 3E+07x - 4E+09$	R ² = 0,9936
	Promedio: 109.375	DE: 60.772	CV: 56
Relación con y sin microorganismo: 2,06			
VIDEO	147-150	$y = -152.500x^2 + 5E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9866
CONTROL 1	157-160	$y = -147.500x^2 + 5E+07x - 4E+09$	R ² = 0,9972
	168-171	$y = -145.000x^2 + 5E+07x - 4E+09$	R ² = 0,9052

(sin bacterias)	207-210	$y = -95.000x^2 + 4E+07x - 4E+09$	$R^2 = 0,9957$
	Promedio: 135.000	DE: 26.848	CV: 20
	141-144	$y = -62.500x^2 + 2E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9499$
VIDEO	145-148	$y = -117.500x^2 + 3E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,9928$
CONTROL 3	148-153	$y = -67.500x^2 + 2E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,9216$
	209-213	$y = -52.143x^2 + 2E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,9512$
(con bacterias)	Promedio: 74.911	DE: 29.104	CV: 39
Relación con y sin microorganismo: 1,95			
	184-188	$y = -75.000x^2 + 3E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,942$
VIDEO	212-216	$y = -55.000x^2 + 2E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,9897$
CONTROL 2	217-220	$y = -52.500x^2 + 2E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,9813$
(sin bacterias)	223-227	$y = -100.000x^2 + 4E+07x - 5E+09$	$R^2 = 0,996$
	Promedio: 70.625	DE: 22.020	CV: 31
	149-152	$y = -117.500x^2 + 4E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,9428$
VIDEO	168-174	$y = -67.381x^2 + 2E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,9671$
CONTROL 4	222-226	$y = -83.571x^2 + 4E+07x - 4E+09$	$R^2 = 0,948$
	255-261	$y = -17.143x^2 + 9E+06x - 1E+09$	$R^2 = 0,9246$
(con bacterias)	Promedio: 71.399	DE: 41.766	CV: 58
Relación con y sin microorganismo: 1,87			

Nota: DE: Desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

En la tabla 9, se comparó el video CIP 1 (sin bacterias) con el video CIP 2 (con bacterias), el video control 1 (sin bacterias) con el video control 3 (con bacterias), el video control 2 (sin bacterias) con el video control 4 (con bacterias), observándose que para todos los casos la desviación estándar y el coeficiente de variación es mayor para el video que contiene bacterias, lo que

indica que los datos de estos videos presentan más variabilidad, mientras que los datos de los videos que no contienen bacterias son más homogéneos con respecto a la media.

Es de notar que en todos los casos en que se comparan videos con y sin bacterias, el coeficiente de variación ha resultado ser el mejor descriptor para detectar la presencia de bacterias y esto coincide también con los videos en presencia y ausencia de parásitos. Aunque este descriptor es la misma expresión que el contraste temporal, lo seguimos denominando coeficiente de variación debido a que en este caso se aplica a una relación espacial y no temporal.

En los tres pares de ensayos con bacterias, en la relación con/sin bacterias, las relaciones de los coeficientes de variación son 2,06; 1,95 y 1,87 respectivamente. Mientras que, para parásitos estas relaciones son 1,75 y 2,75; indicando que este descriptor, si bien puede distinguir la presencia y ausencia de microorganismos, no es indicativo de las dimensiones de los mismos.

Resultados de Tendencia Espacial (separando en bandas de colores)

RGB es el acrónimo inglés de rojo, verde y azul. Es un modelo de color en el cual es posible representar un color, mediante la mezcla por adición de los tres colores primarios.

La separación en bandas o canales RGB es el tratamiento de la señal de vídeo que trata por separado las señales de los tres colores rojo, verde y azul. Al usarlo independientemente, proporciona mayor calidad y reproducción más fiel del color. De esta forma no hay pérdidas en el tratamiento de la imagen puesto que los colores primarios siguen existiendo como tal en su transmisión. Por el contrario, mediante este sistema hay mucha información redundante,

con el consiguiente aumento del ancho de banda necesario respecto a otros métodos de transmisión. Por ejemplo, cada color lleva el valor de brillo de toda la imagen, de forma que esta información está por triplicado (Gonzales y Woods, 1996).

A continuación, en la tabla 10, se muestran los resultados de tendencia espacial obtenidos para la banda o canal rojo, luego de separar en bandas de colores, para los videos de pozos que contienen parásitos y sus controles, que no los contienen.

Tabla 10. Resultados de tendencia espacial de la banda roja en parásitos (*T. cruzi*)

VIDEO	RANGO	ECUACIÓN, M	R ²
VIDEO 18	197-202	$y = -4,2857x^2 + 1711,7x - 170754$	R ² = 0,9658
	212-218	$y = -3,0833x^2 + 1325,9x - 142391$	R ² = 0,904
Split channels	224-227	$y = -8,5x^2 + 3833,7x - 432128$	R ² = 0,9938
(sin parásitos)	252-255	$y = -10,25x^2 + 5197,5x - 658752$	R ² = 0,9999
	Promedio: 6,53	DE: 3,40	CV: 52,04
VIDEO 14	150-156	$y = -4,8214x^2 + 1475,2x - 112679$	R ² = 0,9889
	180-184	$y = -7,9286x^2 + 2881,7x - 261685$	R ² = 0,9567
Split channels	261-264	$y = -10,75x^2 + 5644,1x - 740713$	R ² = 0,9999
(con parásitos)	278-282	$y = -5,3571x^2 + 2998,5x - 419511$	R ² = 0,9867
	Promedio: 7,21	DE: 2,72	CV: 37,70
		Relación 0,72	
VIDEO 24	108-111	$y = -11x^2 + 2407,4x - 131563$	R ² = 0,9996
	127-130	$y = -4,25x^2 + 1092,1x - 70043$	R ² = 0,9938
Split channels	253-256	$y = -4,75x^2 + 2417x - 307386$	R ² = 0,9581

(sin parásitos)	278-281	$y = -6,5x^2 + 3632,9x - 507536$	$R^2 = 0,9596$
	Promedio: 6,88	DE: 2,90	CV: 42,25
VIDEO 20	115-118	$y = -7x^2 + 1630,4x - 94791$	$R^2 = 0,9243$
	131-135	$y = -8,8571x^2 + 2356,8x - 156604$	$R^2 = 0,9766$
Split channels	197-201	$y = -8,5714x^2 + 3409x - 338805$	$R^2 = 0,9639$
	(con parásitos)	231-237	$y = -3,3452x^2 + 1565x - 182898$
	Promedio: 6,94	DE: 2,53	CV: 36,49
Relación 0,86			

Nota: Split channels: separado en bandas de colores, DE: Desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

En la tabla 10, se muestra la comparación de videos, previamente separados en bandas de colores (color seleccionado: rojo). Se comparó el video 18 (sin parásitos) con el video 14 (con parásitos), y el video 24 (sin parásitos) con el video 20 (con parásitos). Se observó que los promedios de los coeficientes del primer término de la ecuación, son mayores para los videos que contienen parásitos, mientras que, la variabilidad en los datos es mayor para los videos que no contienen parásitos, comportamiento contrario al esperado.

Para poder comparar los videos que contienen parásitos con los que contienen bacterias, se procesaron estos últimos de la misma manera en que se procesaron los de parásitos, es decir, separando en bandas de colores. A continuación, en la tabla 11, se muestran los resultados de tendencia espacial obtenidos separando en bandas de colores, para los videos de pozos que contienen bacterias y sus controles que no las contienen.

Tabla 11. Resultados de tendencia espacial de la banda roja en bacterias (*E. coli*)

VIDEO	RANGO	ECUACIÓN	R ²
VIDEO CIP 1 Split channels (sin bacterias)	110-113	$y = -25,25x^2 + 5634,7x - 314179$	R ² = 0,966
	188-192	$y = -12,571x^2 + 4774,3x - 453204$	R ² = 0,9378
	192-197	$y = -9,3214x^2 + 3625,7x - 352468$	R ² = 0,9303
	230-235	$y = -6,5893x^2 + 3065,8x - 356540$	R ² = 0,9544
	Promedio: 13,43	DE: 8,25	CV: 61,41
VIDEO CIP 2 Split channels (con bacterias)	105-108	$y = -18,25x^2 + 3886,5x - 206784$	R ² = 0,9695
	201-205	$y = -8x^2 + 3247,2x - 329425$	R ² = 0,933
	215-218	$y = -13,5x^2 + 5844,1x - 632386$	R ² = 0,9496
	245-248	$y = -7x^2 + 3449,8x - 425004$	R ² = 0,954
	Promedio: 11,66	DE: 5,21	CV: 44,71
		Relación 0,72	
VIDEO CONTROL 1 Split channels (sin bacterias)	155-158	$y = -14,75x^2 + 4616,8x - 361133$	R ² = 0,9972
	176-179	$y = -22,25x^2 + 7892,1x - 699712$	R ² = 0,9901
	205-208	$y = -9,5x^2 + 3920,3x - 404378$	R ² = 0,9957
	242-246	$y = -8x^2 + 3905,6x - 476626$	R ² = 0,9011
	Promedio: 13,63	DE: 6,44	CV: 47,25
VIDEO CONTROL 3 Split channels	125-129	$y = -7,2143x^2 + 1830,1x - 115919$	R ² = 0,943
	149-154	$y = -6,75x^2 + 2043,2x - 154485$	R ² = 0,9216

(con bacterias)	183-188	$y = -4,4821x^2 + 1661,6x - 153879$	$R^2 = 0,9647$
	210-214	$y = -5,2143x^2 + 2210,4x - 234157$	$R^2 = 0,9512$
Promedio: 5,92		DE: 1,28	CV: 21,67
Relación 0,46			
VIDEO control 2 Split channels	137-140	$y = -18,5x^2 + 5128,3x - 355245$	$R^2 = 0,957$
	186-190	$y = -7,5x^2 + 2822,1x - 265366$	$R^2 = 0,942$
	214-218	$y = -5,5x^2 + 2375,7x - 256470$	$R^2 = 0,9897$
(sin bacterias)	233-238	$y = -5,3214x^2 + 2502,5x - 294161$	$R^2 = 0,9556$
Promedio: 9,21		DE: 6,27	CV: 68,16
VIDEO control 4 Split channels	132-135	$y = -18,25x^2 + 4874,1x - 325295$	$R^2 = 0,9178$
	149-152	$y = -11,75x^2 + 3533,6x - 265556$	$R^2 = 0,9428$
	163-166	$y = -12x^2 + 3950,6x - 325065$	$R^2 = 0,9225$
(con bacterias)	222-226	$y = -8,3571x^2 + 3740,9x - 418536$	$R^2 = 0,948$
Promedio: 12,59		DE: 4,12	CV: 32,75
Relación 0,48			

Nota: Split channels: separado en bandas de colores, DE: Desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

En la tabla 11, se comparó el video CIP 1 (sin bacterias) con el video CIP 2 (con bacterias), el video control 1 (sin bacterias) con el video control 3 (con bacterias), el video control 2 (sin bacterias) con el video control 4 (con bacterias), observándose que la desviación estándar y el coeficiente de variación del video con bacterias, es menor en todos los casos, comportamiento contrario al esperado.

El hecho de que en este caso no se cumpla la relación esperada del coeficiente de variación podría explicarse porque, es posible que la separación en bandas conduzca a la pérdida de información o visto desde otro punto de vista, que sea necesaria la información redundante como ocurre en el procesamiento directo con las tres bandas de colores, para detectar un fenómeno de tan baja intensidad como es el Bioespeckle.

Finalmente, para concluir el análisis espacial, se calculó el área de la semi elipse dibujada por los picos y de acuerdo con la fórmula:

$$A = ab\pi/2$$

Donde a y b son los dos radios de la elipse. Se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Comparación de áreas del semi elipse

VIDEO	ÁREA DEL SEMI ELIPSE (SIN SPLIT CHANNEL)	ÁREA DEL SEMI ELIPSE (CON SPLIT CHANNEL)
Cip 1	2.243.137,50	249,43
Cip 2	855.650,00	112,84
Relación:	0,38	0,45
Control 1	1.044.050,00	132,08
Control 3	1.171.612,50	156,80
Relación:	1,12	1,19
Control 2	765.375,00	154,84
Control 4	1.795.687,50	129,53
Relación:	2,35	0,84
Video 18	792.848,82	109,51

Video 14	1.308.987,30	143,46
Relación:	1,65	1,31
Video 24	785.000,00	48,67
Video 20	1.354.974,96	136,20
Relación:	1,73	2,80

Considerando el área de las semi elipses, se encuentra una buena relación, en general mayor que 1,00 para la comparación con microorganismos/sin microorganismos. Adicionalmente, si no se toman en cuenta los valores extremos (>2 y <1), se encuentra que la relación de áreas de las semi elipses con y sin bacterias dan valores de 1,12 y 1,19, mientras que la relación de áreas de las semi elipses con y sin parásitos, dan valores de 1,65; 1,73 y 1,31. Éste constituye un descriptor que pudiera estar estableciendo, no solamente la presencia de microorganismos, sino también la diferencia en dimensiones entre bacterias y parásitos.

Tendencia Temporal

En la tendencia espacial, debido a que se considera un fotograma que es una foto en un tiempo determinado, se toma en cuenta el Bioespeckle producido por diferentes unidades de microorganismos en espacios diferentes. Es por ello que el valor de los coeficientes arrojados en este análisis, debe mostrar gran variabilidad. Por otra parte, en la tendencia temporal, el Bioespeckle producido podría pertenecer a una misma unidad de microorganismo que se mueve en el tiempo, siendo esta tendencia representativa del movimiento del microorganismo. Es de esperar que los microorganismos más pequeños se muevan más que los microorganismos

más grandes por lo que se espera que los más pequeños (bacterias) presenten mayor variabilidad que los más grandes (parásitos).

En las Tablas 13 y 14, se muestra la tendencia polinómica de segundo orden de los picos en una serie temporal en videos de parásitos y bacterias.

Tabla 13. Resultados de tendencia temporal en parásitos (*T. cruzi*)

VIDEO	RANGO	ECUACIÓN	R ²
	106-109	$y = -151.237x^2 + 3E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9748
	111-114	$y = -198.797x^2 + 4E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9479
<i>T. cruzi</i>	180-183	$y = -122.119x^2 + 4E+07x - 4E+09$	R ² = 1
VIDEO 18	239-242	$y = -116.688x^2 + 6E+07x - 7E+09$	R ² = 0,9827
(sin	253-256	$y = -236.007x^2 + 1E+08x - 2E+10$	R ² = 0,9448
parásitos)	287-291	$y = -80.546x^2 + 5E+07x - 7E+09$	R ² = 0,9529
	Promedio:	DE: 57.421	CV: 38
	150.899		
	145-149	$y = -106.663x^2 + 3E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9879
	200-203	$y = -91.678x^2 + 4E+07x - 4E+09$	R ² = 0,998
<i>T. cruzi</i>	222-225	$y = -155.435x^2 + 7E+07x - 8E+09$	R ² = 0,9999
VIDEO 14	269-272	$y = -148.456x^2 + 8E+07x - 1E+10$	R ² = 0,9957
(con	272-275	$y = -94.706x^2 + 5E+07x - 7E+09$	R ² = 0,9857
parásitos)	282-285	$y = -174.845x^2 + 1E+08x - 1E+10$	R ² = 0,985
	Promedio:	DE: 35.344,71	CV:- 27
	128.631		
	Relación con/sin parásitos: 0,72		

	121-125	$y = -111.093x^2 + 3E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,9483$
	179-182	$y = -66.676x^2 + 2E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,9813$
T. Cruzi VIDEO 24 (sin parásitos)	184-188	$y = -39.198x^2 + 1E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9683$
	218-221	$y = -123.554x^2 + 5E+07x - 6E+09$	$R^2 = 0,9991$
	236-239	$y = -124.405x^2 + 6E+07x - 7E+09$	$R^2 = 0,9369$
	304-307	$y = -137.071x^2 + 8E+07x - 1E+10$	$R^2 = 0,9702$
	Promedio: 100.333	DE: 38.612	CV: 38
	112-118	$y = -62.275x^2 + 1E+07x - 8E+08$	$R^2 = 0,9712$
	123-127	$y = -200.453x^2 + 5E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,9029$
T. Cruzi VIDEO 20 (con parásitos)	218-221	$y = -254.018x^2 + 1E+08x - 1E+10$	$R^2 = 0,905$
	267-270	$y = -228.981x^2 + 1E+08x - 2E+10$	$R^2 = 0,9999$
	279-284	$y = -134.544x^2 + 8E+07x - 1E+10$	$R^2 = 0,9483$
	297-301	$y = -149.724x^2 + 9E+07x - 1E+10$	$R^2 = 0,9677$
	Promedio: 171.666	DE: 70.316	CV: 41
Relación con/sin parásitos: 1,08			

En la tabla 13, se comparó el video 18 (sin parásitos) con el video 14 (con parásitos) observamos que el promedio del coeficiente del primer término de la ecuación, la desviación estándar y el coeficiente de variación es mayor para el video que no contiene parásitos, comportamiento contrario al esperado.

En la comparación del video 24 (sin parásitos) con el video 20 (con parásitos), se observó que el promedio, la desviación estándar y el coeficiente

de variación es mayor para el video que contiene parásitos, lo que indica que los datos de este video presentan más variabilidad, mientras que los datos del video que no contiene parásitos son más homogéneos con respecto a la media.

Tabla 14. Resultados de tendencia temporal en bacterias (*E. coli*)

VIDEO	RANGO	ECUACIÓN	R ²
VIDEO CIP 01 (sin bacterias)	105-108	$y = -39.750x^2 + 8E+06x - 5E+08$	R ² = 0,9979
	140-143	$y = -28.784x^2 + 8E+06x - 6E+08$	R ² = 0,9999
	219-222	$y = -67.164x^2 + 3E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9918
	241-244	$y = -59.853x^2 + 3E+07x - 4E+09$	R ² = 0,9994
	282-285	$y = -30.612x^2 + 2E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9836
	304-307	$y = -28.784x^2 + 2E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9999
	Promedio: 42.491	DE: 16.939	CV: 40
VIDEO CIP 02 (con bacterias)	102-105	$y = -121.077x^2 + 3E+07x - 1E+09$	R ² = 0,9988
	146-149	$y = -22.845x^2 + 7E+06x - 5E+08$	R ² = 1
	161-164	$y = -72.646x^2 + 2E+07x - 2E+09$	R ² = 0,9994
	194-197	$y = -79.043x^2 + 3E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9999
	224-227	$y = -55.741x^2 + 3E+07x - 3E+09$	R ² = 0,9917
	294-297	$y = -32.911x^2 + 2E+07x - 3E+09$	R ² = 0,993
	Promedio: 64.044	DE: 35.4611	CV: 55

Relación CV con/sin microorganismos: 1,38			
CONTROL 01 (sin bacterias)	100-103	$y = -24.672x^2 + 5E+06x - 3E+08$	$R^2 = 0,9881$
	110-113	$y = -31.069x^2 + 7E+06x - 4E+08$	$R^2 = 0,9998$
	202-205	$y = -21.474x^2 + 9E+06x - 9E+08$	$R^2 = 0,9932$
	217-220	$y = -30.155x^2 + 1E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9998$
	286-290	$y = -14.621x^2 + 8E+06x - 1E+09$	$R^2 = 0,917$
	316-320	$y = -28.066x^2 + 2E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,9573$
Promedio: 25.010		DE: 6.214	CV: 25
CONTROL 03 (con bacterias)	117-120	$y = -97.319x^2 + 2E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9937$
	129-132	$y = -43.862x^2 + 1E+07x - 7E+08$	$R^2 = 0,9889$
	134-137	$y = -28.784x^2 + 8E+06x - 5E+08$	$R^2 = 0,9999$
	181-184	$y = -32.440x^2 + 1E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9969$
	227-230	$y = -53.457x^2 + 2E+07x - 3E+09$	$R^2 = 0,9848$
	262-265	$y = -25.586x^2 + 1E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,999$
Promedio: 46.908		DE: 26.780	CV: 57
Relación CV con/sin microorganismos: 2,30			
CONTROL 02 (sin bacterias)	136-139	$y = -46.146x^2 + 1E+07x - 9E+08$	$R^2 = 0,9891$
	178-182	$y = -44.906x^2 + 2E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,905$
	196-199	$y = -54.827x^2 + 2E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,9995$

	234-237	$y = -26.500x^2 + 1E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9991$
	266-269	$y = -34.267x^2 + 2E+07x - 2E+09$	$R^2 = 0,9972$
	301-304	$y = -30.612x^2 + 2E+07x - 3E+09$	$R^2 = 1$
	Promedio:	DE: 10.804	CV: 27
	39.543		
	134-138	$y = -14.098x^2 + 4E+06x - 3E+08$	$R^2 = 0,9691$
	182-187	$y = -17.329x^2 + 6E+06x - 6E+08$	$R^2 = 0,978$
CONTROL 4 (con bacterias)	196-199	$y = -23.302x^2 + 9E+06x - 9E+08$	$R^2 = 0,9632$
	210-213	$y = -24.672x^2 + 1E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9697$
	264-267	$y = -18.276x^2 + 1E+07x - 1E+09$	$R^2 = 0,9988$
	295-298	$y = -51.629x^2 + 3E+07x - 5E+09$	$R^2 = 0,9047$
	Promedio:	DE: 13.674	CV: 55
	24.884		
Relación CV con/sin microorganismos: 2,04			

En la tabla 14, se comparó el video CIP 1 (sin bacterias) con el video CIP 2 (con bacterias), el video control 1 (sin bacterias) con el video control 3 (con bacterias), el video control 2 (sin bacterias) con el video control 4 (con bacterias), observándose que la desviación estándar y el coeficiente de variación del video con bacterias, es mayor en todos los casos lo que indica que los datos de este video presentan más variabilidad, mientras que los datos del video que no contiene bacterias son más homogéneos con respecto a la media.

Se observa que la tendencia temporal puede ser un buen descriptor para detectar la presencia de microorganismos. Adicionalmente, se puede observar que la relación del coeficiente de variación es mayor para los videos que contienen bacterias en comparación con los que contienen parásitos.

Si se toma en cuenta que la tendencia temporal está evaluando principalmente el movimiento de los microorganismos, es de esperar que la relación del coeficiente de variación sea mayor para bacterias que para parásitos, como se obtiene en este resultado. Esto es de esperar porque las bacterias tienen un movimiento más rápido que los parásitos y una combinación de movimiento bacteriano y movimiento browniano, por lo que este resultado es el esperado.

Descriptores estadísticos en videos con bacterias

A continuación, se presentan los gráficos completos de las medidas repetidas en el tiempo o serie temporal para cada video, se colocó como variable independiente el número de fotogramas, que a su vez es una representación del tiempo transcurrido ya que se tomará un fotograma cada 0,04 segundos. La variable dependiente es la intensidad en unidades arbitrarias (u.a.). Se calcularon algunos descriptores estadísticos como promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y las relaciones entre ellos.

Figura 1. Gráfico Video Control 01 (sin bacterias)

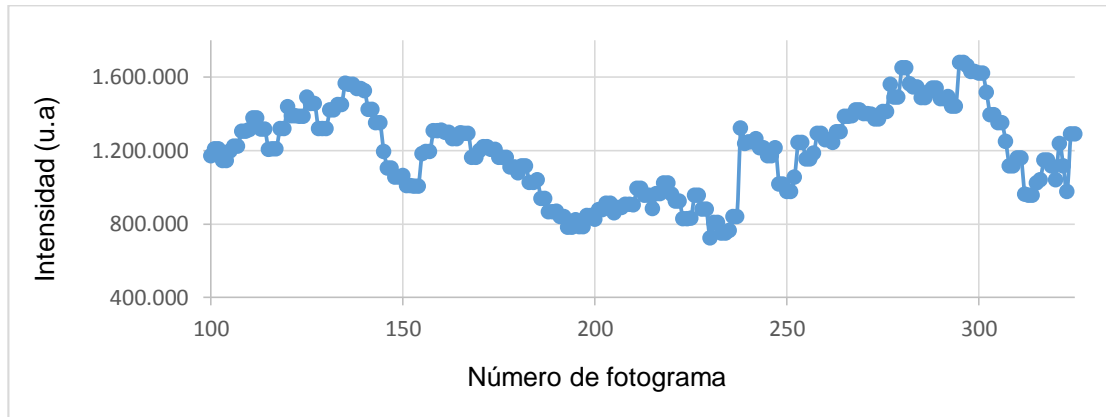


Figura 2. Gráfico Video Control 03 (con bacterias)

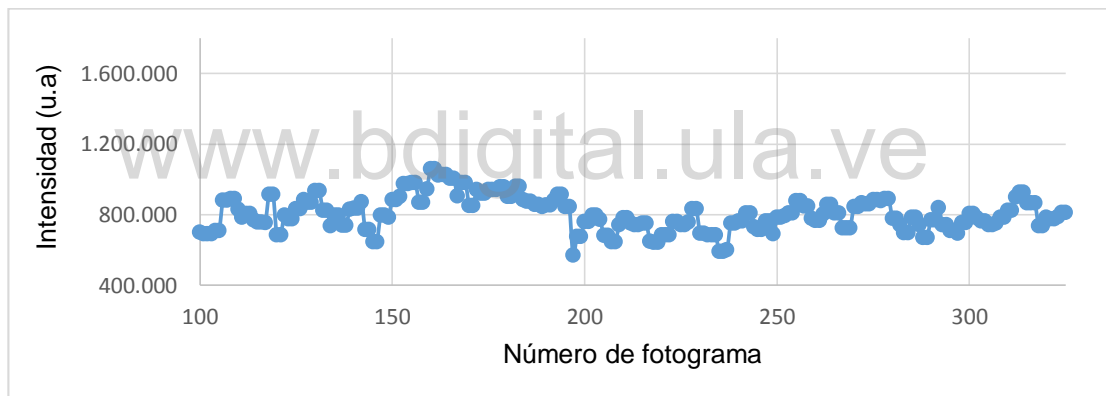


Tabla 15. Descriptores Estadísticos en los videos Control 01- Control 03

VIDEO	VIDEO CONTROL 01 (sin bacterias)	VIDEO CONTROL 03 (con bacterias)
PROMEDIO	1.197.123	806.756
DE	235.864	95.230
CV	20	12
CV C 03+/C 01-		0,60
X C 03+/C 01-		0,67

En la tabla 15, se comparó el video control 1 (sin bacterias) con el video control 3 (con bacterias), observándose que el promedio del video sin bacterias es mayor que el video con bacterias, igualmente, la desviación estándar y el coeficiente de variación es mayor para el video que no contiene bacterias, lo que indica que los datos del video que no contiene bacterias presenta más variabilidad, mientras que los datos del video que contiene bacterias son más homogéneos con respecto a la media.

Éste es un comportamiento contrario al esperado. Debido a que en otras evaluaciones se observó este mismo comportamiento y debido a que en el gráfico de medidas repetidas en el tiempo se observa de manera evidente la alta variabilidad en el video sin bacterias y la baja variabilidad en el video con bacterias, pensamos que éste puede ser un error en la preparación o colocación de la muestra.

www.bdigital.ula.ve

Figura 3. Gráfico Video CIP 01 (sin bacterias)

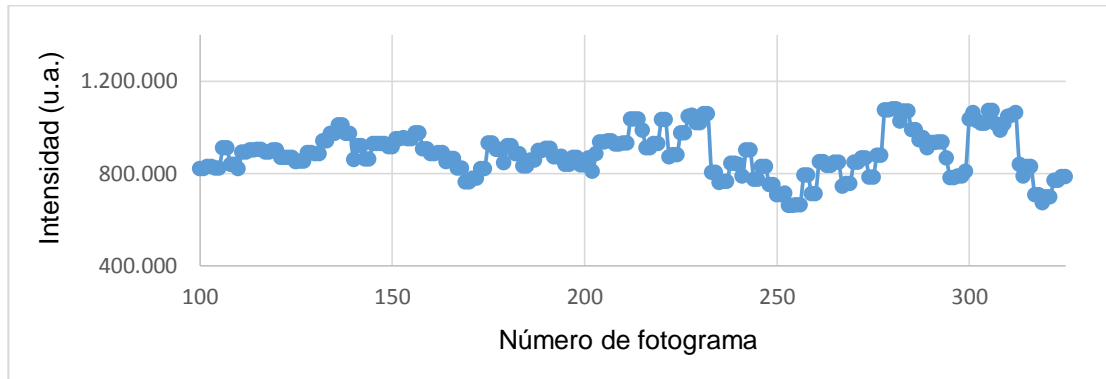


Figura 4. Gráfico Video CIP 02 (con bacterias)

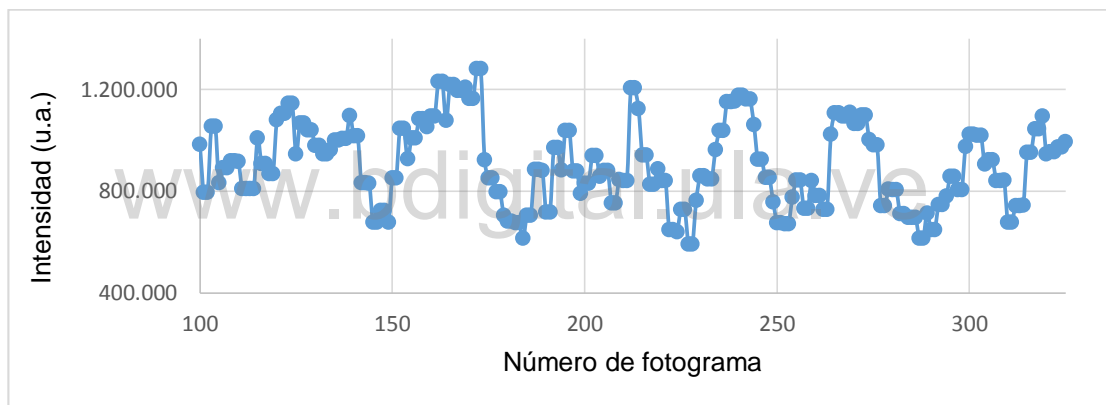


Tabla 16. Descriptores estadísticos en los videos CIP 01- CIP 02

VIDEO	VIDEO CIP 01 (sin bacterias)	VIDEO CIP 02 (con bacterias)
PROMEDIO	886.054	906.352
DE	95.220	162.359
CV	11	18
CV CIP2+/CIP1-		1,63
X CIP2+/CIP1-		1,02

Figura 5. Gráfico Video control 02 (sin bacterias)

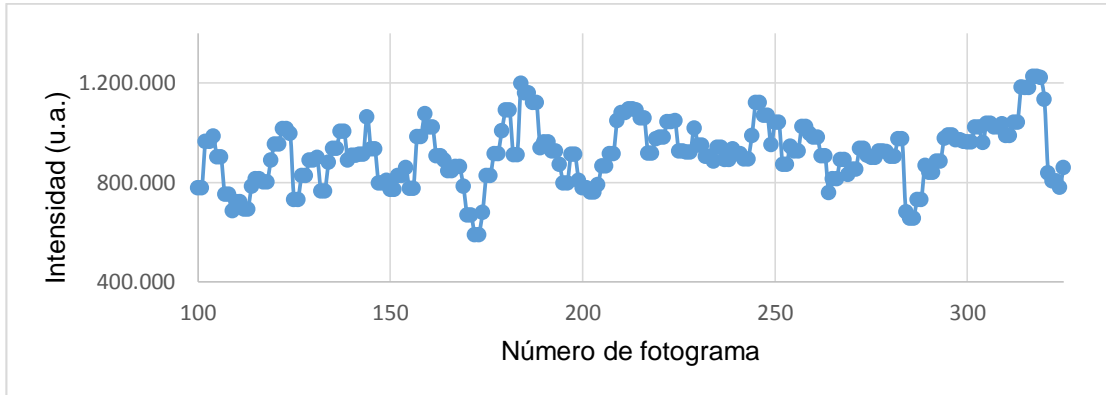


Figura 6. Gráfico Video control 04 (con bacterias)

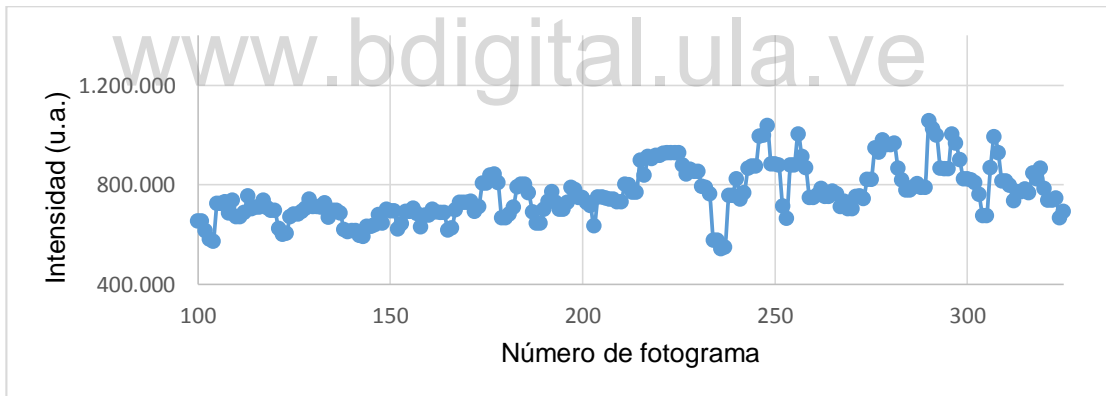


Tabla 17. Descriptores estadísticos en los videos Control 02 - Control 04

VIDEO	VIDEO CONTROL 02 (sin bacterias)	VIDEO CONTROL 04 (con bacterias)
PROMEDIO	917.931	763.169
DE	121.933	104.702
CV	13	14
CV C 04+/C 02-		1,06
X C 04+/C 02-		0,83

En las tablas 16 y 17, se comparó el video CIP 1 (sin bacterias) con el video CIP 2 (con bacterias), y el video control 2 (sin bacterias) con el video control 4 (con bacterias), respectivamente. Observándose que el coeficiente de variación es mayor para el video que contiene bacterias.

El coeficiente de variación ha sido ya utilizado por otros autores como descriptor de moteado de Speckle, denominado Contraste Temporal y es aplicado generalmente a medidas repetidas en el tiempo. (Sendra et al, 2010).

Este descriptor que relaciona la desviación estándar con el promedio de la intensidad, es una medida de la variabilidad con menor énfasis en los valores absolutos de intensidad. Esto es interesante debido a que en estos ensayos la intensidad del láser puede no ser constante debido a variaciones en la corriente eléctrica o al tiempo de uso del láser. Sin embargo, este descriptor puede descubrir una diferencia entre videos, aunque sea pequeña.

www.bdigital.ula.ve

Tendencia temporal en videos con parásitos

Figura 7. Gráfico *T. cruzi* Video 18 (sin parásitos)

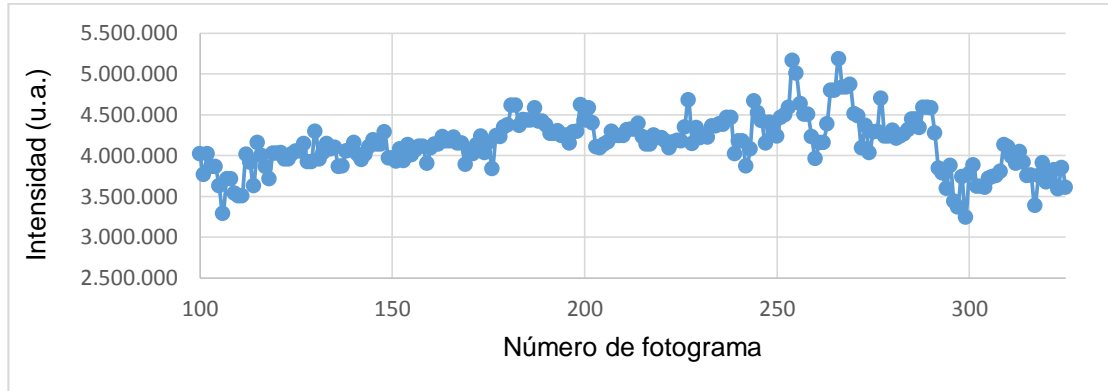


Figura 8. Gráfico *T. cruzi* Video 14 (con parásitos)

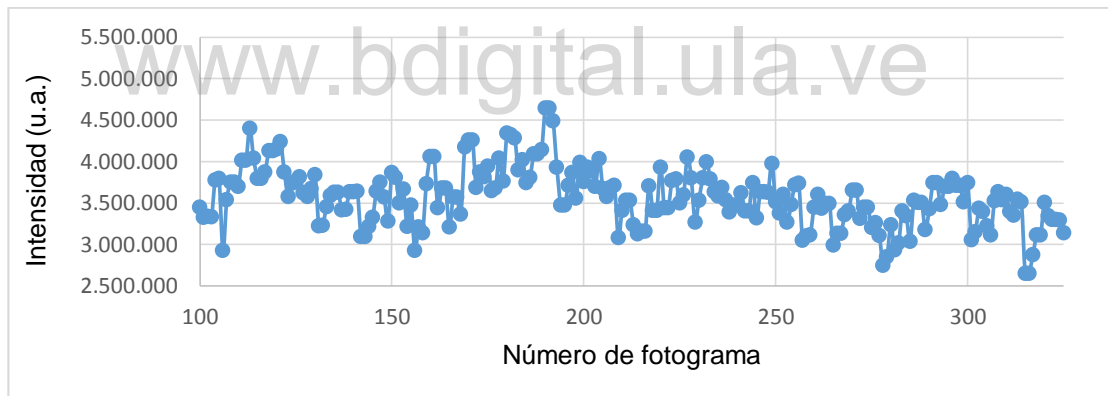


Tabla 18. Descriptores estadísticos en los Videos 18-14

VIDEO	<i>T. cruzi.</i> VIDEO 18 (sin parásitos)	<i>T. cruzi.</i> VIDEO 14 (con parásitos)
PROMEDIO	4.150.020	3.573.890
DE	318.106	347.397
CV	8	10
CV VID 14+/V 18-		1,22
X VID 14+/V 18-		0,86

Figura 9. Gráfico *T. cruzi* Video 24 (sin parásitos)

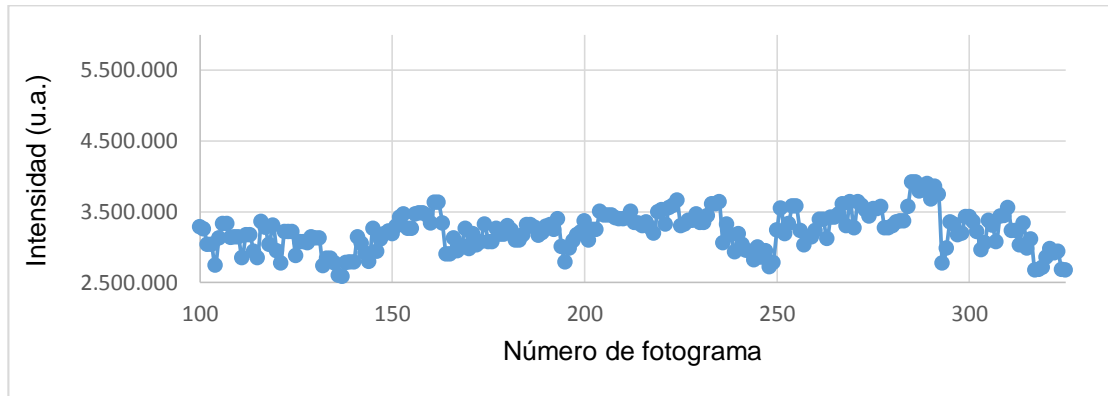


Figura 10. Gráfico *T. cruzi* Video 20 (con parásitos)

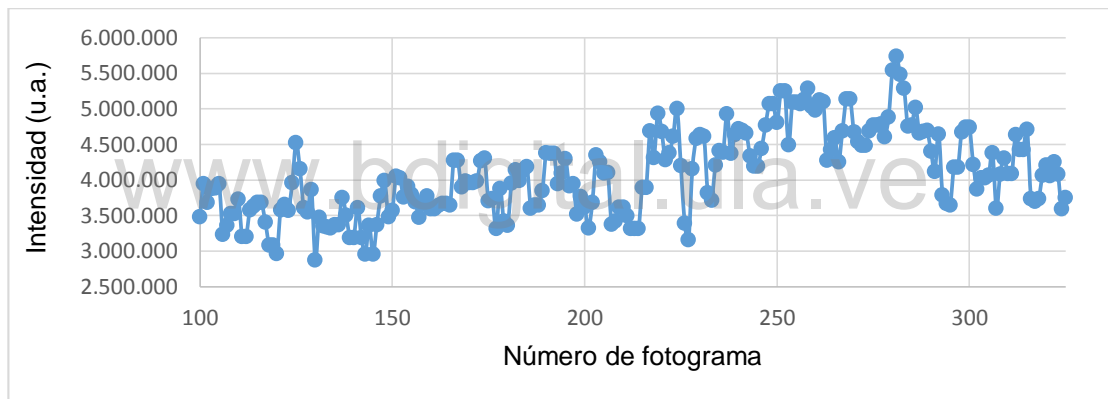


Tabla 19. Descriptores estadísticos en los Videos 24-20

VIDEO	<i>T. cruzi</i> . VIDEO 24 (sin parásitos)	<i>T. cruzi</i> . VIDEO 20 (con parásitos)
PROMEDIO	3.229.160	4.084.527
DE	266.722	587.250
CV	8	14
CV VID 20+/V 24-		1,80
X VID 20+/V 24-		1,26

En la Tabla 18 y la Tabla 19, se comparó el video 18 (sin parásitos) con el video 14 (con parásitos) y el video 24 (sin parásitos) con el video 20 (con parásitos), respectivamente. Observándose que para ambos casos la

desviación estándar y el coeficiente de variación es mayor para los videos que contienen parásitos, lo que indica que los datos de estos videos presentan más variabilidad, mientras que los datos de los videos que no contienen parásitos son más homogéneos con respecto a la media.

Por este método se obtienen relaciones de coeficiente de variación de video con y sin microorganismos que son variables (altos y bajos) que no permiten concluir sobre el tamaño de los microorganismos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La tendencia espacial se obtiene a partir de un fotograma que es una toma instantánea de un espacio. Esto indica que los picos deben ser el reflejo del Bioespeckle de diferentes microorganismos. Debido a esto, esta tendencia debería reflejar la forma y tamaño del microorganismo mientras que la tendencia temporal debería reflejar mejor el movimiento que a su vez puede representar indirectamente el tamaño del microorganismo ya que los microorganismos más pequeños se tienden a mover más que los más grandes.
- El análisis de tendencia espacial por ajuste de regiones a una tendencia polinómica de segundo orden, sin separar en bandas de colores conduce a obtener los resultados esperados a través del coeficiente de variación y de la relación de éste en presencia y ausencia de microorganismos. Este descriptor, si bien puede distinguir la presencia y ausencia de microorganismos, no es indicativo de las dimensiones ni tamaño de los mismos.
- En la evaluación de tendencia espacial por el cálculo del área de la semi elipse, si no se toman en cuenta los valores extremos (>2 y <1), se encuentra que la relación de áreas de las semi elipses con y sin bacterias dan valores de 1,12 y 1,19, mientras que la relación de áreas de las semi elipses con y sin parásitos, dan valores de 1,65; 1,73 y 1,31. Éste constituye un descriptor que pudiera estar estableciendo, no solamente la presencia de microorganismos, sino también la diferencia en dimensiones entre bacterias y parásitos, ya que los parásitos tendrían una relación de coeficiente de variación superior a las

bacterias. Adicionalmente, es posible que este descriptor pudiera distinguir la presencia de parásitos y bacterias en una misma muestra.

- El análisis espacial separando en bandas de colores, no conduce al resultado esperado. El hecho de que en este caso no se cumpla la relación esperada del coeficiente de variación podría explicarse porque es posible que la separación en bandas conduzca a la pérdida de información o visto desde otro punto de vista, que sea necesaria la información redundante como ocurre en el procesamiento directo con las tres bandas de colores, para detectar un fenómeno de tan baja intensidad como es el Bioespeckle. Esto sería debido a que en este caso habría una sumatoria de eventos que podrían revelar mejor las diferencias.
- Se observa que la tendencia temporal por vía de solo promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, puede ser un buen descriptor para detectar la presencia de microorganismos, tanto bacterias como parásitos, pero no se logra tener una cuantificación del tamaño del microorganismo.
- La tendencia temporal en términos de ajuste de picos a una regresión polinómica de segundo orden, permite obtener relaciones de coeficiente de variación de videos con y sin microorganismos que son altos para bacterias y un poco más bajos para parásitos. Se estima que éste podría ser un buen descriptor para distinguir entre parásitos y bacterias ya que el comportamiento temporal evalúa principalmente el movimiento el cual es mayor en bacterias que en parásitos ya que las primeras tienen un movimiento más rápido que los parásitos.
- En síntesis, la forma de los microorganismos puede distinguirse por el área de las semi elipses en la tendencia espacial, siendo la relación de áreas mayor para parásitos que para bacterias por el mayor tamaño de los primeros frente a las segundas. Y por el movimiento en la tendencia temporal, siendo la

relación del coeficiente de variación mayor para bacterias que para parásitos debido al mayor movimiento de las primeras frente a los segundos.

- A través de la tendencia espacial y la tendencia temporal, se puede distinguir el tamaño de los dos microorganismos estudiados, cumpliendo así con el objetivo de este trabajo.

Recomendaciones

- Establecer el significado estadístico de las diferencias encontradas en el área de las semi elipses, en el método de la tendencia espacial.
- Establecer si en el método de la tendencia temporal, las diferencias encontradas son estadísticamente significativas.
- Hacer el cálculo del semi elipse sobre las medidas repetidas en el tiempo.
- También se recomienda aumentar la concentración de microorganismos para que el efecto sea más notorio.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Abche, S. (2015). Utilización del sistema mejorado de procesamiento de imágenes de Bioespeckle en ensayos con bacterias y diferentes antibióticos (Tesis de Maestría para obtener el título de Magister Scientae en Química de Medicamentos). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Andrades, F. (2011). Diseño, Elaboración y Ejecución para el procesamiento de Imágenes de Bioespeckle por el Método Matemático de las Diferencias Temporales. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Resultados no publicados.
- Arias, G. (2006). El proyecto de investigación. 5ta ed. Caracas: Editorial Episteme.
- Arrieché, A. (2016). Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Bioespeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi* en viales de cultivo profundo. (Tesis de Pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Belandría, O. (2011). Evaluación comparativa de la quimiotaxis y el antibiograma con el método "Bioespeckle" sobre bacterias (Tesis de maestría para obtener el título de Magister Scientatae en Química de Medicamentos). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Canales, M. (2007). El láser de media potencia y sus aplicaciones en medicina. Medigraphic, 6, (1), pp. 1-2. Recuperado de:
http://www.medigraphic.com/pdfs/plasticidad/prn-2007/prn071_2g.pdf
- Chander, R. y Scott, M. (2011). Métodos estadísticos para la detección y análisis de tendencias en las estadísticas de ciencias ambientales. [libro en línea]. Editoria John Wiley & Sons. Recuperado de:

https://books.google.co.ve/books?id=zLh3OkKWJ7QC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- Contreras, A. (2018). Evaluación del Efecto de Ampicilina sobre *Escherichia coli* K-12 HfrH por Bioespequeleometría Láser, usando Programas de Edición de videos y Series de Tiempo. (Trabajo de Grado para optar al grado de Magister Scientiae en Química de Medicamentos). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Contreras, R. (2016). Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Bioespeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi*: prueba preliminar de fármacos (Trabajo especial de grado para optar por el título de licenciado en Bioanálisis). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Díaz, K. y Gallego, K. (2013). Utilización del sistema dinámico “Bioespeckle” para medir el efecto de Ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* cepa 322 K-12 (Tesis de pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela
- Farfán, A., García, S., Ariza F., Vargas A. y Vargas, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Revista Chilena Infectol. 33 (4): pp. 438-450.
- García, L. (2011). Evaluación comparativa del ensayo de fármacos desenergizantes sobre *Trypanosoma cruzi* usando “Bioespeckle” y otras técnicas de bioensayo (Tesis de Maestría para obtener el título de *Magister Scientae* en Química de Medicamentos). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Gonzales, R. y Woods, R. (1996). Tratamiento digital de imágenes. 1ª Edición. USA. Editorial: Scott E Umbaugh. ISBN: 0-201-62576-8
- Grassi, H., García L., Lobo, M., Velásquez A, Andrades, F., Cabrera, H., Andrades, J., Andrades, E. (2016). Quantitative Laser Bioespeckle Method for the

- Evaluation of the Activity of *Trypanosoma cruzi* Using VDRL Plates and Digital Analysis. PLoS Negl Trop Dis 10 (12) doi:10.1371/journal.pntd.0005169
- Grassi, H., Velásquez, A., Belandria, O., Lobo, M., Andrades, J., Cabrera, H. y Andrades, E. (2019). Bioespeckle laser digital image processing for quantitative and statistical evaluation of the activity of ciprofloxacin on *Escherichia coli* K-12. Laser Phys. p.29. Recuperado de: <https://doi.org/10.1088/1555-6611/ab21d8>
- Griffin, K. (2015). Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Bioespeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi* bajo diferentes condiciones: Método de imagen de diferencias acumuladas de base variable (Trabajo especial de grado para optar por el título de licenciado en Bioanálisis). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). Metodología de la investigación. 5ta ed. México. Mac Graw Hill.
- Hurtado, J. (2010). Comprensión holística de la Metodología de la Investigación. 6ta. ed. Caracas, Bogotá: Ediciones Quirón.
- Lobo, L. (2011). Estrategias para evaluar la actividad biológica de fármacos comerciales sobre *Trypanosoma cruzi* (Tesis de Maestría para obtener el título de Magister Scientae en Química de Medicamentos). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Marcelo, A. y Finn E. (1998). Física 2. Madrid, España. ISBN 9789684442245.
- Martínez, A. (2016). "De la amibiasis al zika" 1ra. Edición. México. Editorial: El Colegio Nacional. Sección 9. Disponible en: https://books.google.co.ve/books?id=JgFRDwAAQBAJ&pg=PT102&dq=mal+de+chagas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjN24T18__nAhUBKawKHTsSDxgQ6AEIOzAC#v=onepage&q=mal%20de%20chagas&f=false
- Mitchell, J., y Pennebaker, W. (1997). Compresión de video MPEG. Standard, Chapman y Hall.

- Molina, J. (2018). Bioespequelometría Láser: Fotosensibilidad / Fotoactivación y Evaluación de las Actividades Hemoaglutinante y anticoagulante a partir de un Extracto Acuoso del Alga Marina Verde *Ulva fasciata* (Tesis de Pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis), Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Moreno, N., (2015). Variables que inciden en la detección de la actividad de bacterias por Bioespeckle (Tesis de Maestría para obtener el título de *Magister Scientae* en Química de Medicamentos). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Muñoz, O. (2015). Uso del prototipo de Bioespeckle Para evaluar la actividad bacteriana en muestras De orina de pacientes con infección del tracto urinario En el área de emergencia adultos del IAHULA en el periodo comprendido entre mayo/junio 2015 (Tesis de Maestría para obtener el título de Magister Scientae en el Postgrado de Medicina Interna). Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Murray, P. (2009). Microbiología Médica. 6ta edición. España. Editorial: ELSEVIER. Página 4
- Parella, S. y Martins, F. (2004). Metodología de la Investigación Cuantitativa. Caracas: Fedupel.
- Palmezano J., Plazas L., Rivera K., y Rueda V. (2015). Enfermedad de Chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. MÉD.UIS. 28(1):81-90.
Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a08.pdf>
- Patiño, M., Pencue, E., y Vargas, C. (2016) Determinación del contenido de humedad en granos de café pergamino seco utilizando Speckle dinámico. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 14, (2). pp.84-91.
- Pomarico, J. y DiRocco, H. (2004). Compact device for assessment of Microorganism Motility. Review of Scientific Instruments. 75, (11). Pp. 4727-4731.

- Ramírez, E. (2011). Caracterización de la actividad de *Escherichia coli* utilizando una técnica de Speckle dinámica por láser. *Revista Cubana de Física*, 28, (1), 13-17.
- Rodríguez, D. (2018). Bioespequelometría Láser, Fotosensibilidad, Fotoactivación y Evaluación de Actividades Biológicas de Extractos de Algas Marinas (Tesis de Pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis), Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Rodríguez, J., y Virgos, J. (1999). Fundamentos de óptica ondulatoria. (p.69-81). Oviedo.
- Ruiz, A. (2015). Determinación de concentraciones por medida de contraste de Speckle (Trabajo Final de Grado para acceder al Grado en Física). Facultad de Ciencias. Universidad de Cantabria. España.
- Sánchez, K. (2018). Evaluación del Efecto de Gentamicina sobre *Escherichia coli* por Bioespequelometría Láser, usando Programas de Edición de videos y Series de Tiempo (Trabajo de Grado para optar al grado de Magister Scientiae en Química de Medicamentos). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Sendra, H., Dai Pra, A., Passoni, L., Arizaga, R., Rabal, H. y Trivi, M. (2010). Bioespeckle descriptors: a performance comparison. *Proc. of SPIE Vol. 7387*, doi: 10.1117/12.870682).
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., y Eguiarte, L. (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia*, 26(10), 513-517. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442001001000016&lng=es&tlng=es.