

República Bolivariana de Venezuela

Universidad de los Andes

Facultad de Medicina

Post grado de Medicina Interna

Uso del prototipo de biospeckle

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

Autor: Dr. Omar A. Muñoz B.

Tutores: Dr. Ciro Angulo

Cotutor: Msc Lorena Lobo

Asesores estadísticos: Dra. Cristina Grassi

Ing. JesúsAndrades

Mérida, Octubre 2015

Uso del prototipo de biospeckle
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

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR EL MEDICO CIRUJANO

OMAR ALFONSO MUÑOZ BONILLA. CI: V-17068009

ANTE EL CONSEJO DE FACULTAD DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO CREDENCIAL DE MERITO PARA LA
OBTENCION DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

www.bdigital.ula.ve

**Muñoz O.2015. USO DEL PROTOTIPO DE BIOSPECKLE
PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD BACTERIANA EN MUESTRAS
DE ORINA DE PACIENTES CON INFECCION DEL TRACTO URINARIO
EN EL AREA DE EMERGENCIA ADULTOS DEL IAHULA EN EL PERIODO
COMPENDIDO ENTRE MAYO/JUNIO 2015**

Muñoz Bonilla Omar Alfonso 43 paginas.

Tutores: Ciro Angulo. Lorena Lobo

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR EL MEDICO CIRUJANO
OMAR ALFONSO MUÑOZ BONILLA. CI: V-17068009
ANTE EL CONSEJO DE FACULTAD DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO CREDENCIAL DE MERITO PARA LA
OBTENCION DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA - ULA 2015

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Autor:

Omar Alfonso Muñoz Bonilla

Medico Cirujano. Residente de tercer año del postgrado de Medicina Interna de la Facultad de Medicina Universidad de los Andes. Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes.

Tutor:

Angulo La Cruz Ciro

Medico Cirujano. Especialista en Medicina Interna y Terapia Intensiva. Profesor Universidad de los Andes. Medico Adjunto Emergencia Adultos Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes.

Cotutor:

María Lobo Sulbaran.

Farmacéutico. Magister science en Química de Medicamentos. Farmacéutico en Departamento de Farmacia Asistencial Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes.

Asesores Estadísticos:

Hilda Cristina GrassiKersman de Andrades

Licenciada en Biología Sección Biotecnología. Profesora Titular Facultad de Farmacia Universidad de los Andes.

Jesús Enrique AndradesGrassi

Ingeniero Forestal. Magister science en Manejo de Cuencas. Candidato a PhD. Estadística Espacial, Estadística Temporal, Estadística Espacio Temporal. Profesor Agregado Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales Universidad de los Andes.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado en su totalidad por los autores.

www.bdigital.ula.ve

Dedicado a:

Malelly Bonilla

v

Agradecimientos

Al Dr. Ciro Angulo, Profesora Cristina Grassi, y Msc Lorena Lobo Tutores y colaboradores del presente estudio, ejemplo de excelencia y dedicación, sin su aporte no fuese sido posible este trabajo.

Al servicio de Medicina Interna cuyos adjuntos me han enseñado la atención al enfermo con una visión global, integral y humanitaria.

A los pacientes quienes me inspiran para continuar aprendiendo y estudiando e intentando entender los fenómenos clínicos observados.

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenido	vii
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	1
Resumen	2
Summary	3
I. Introducción	4
• Justificación	4
• Antecedentes	5
• Marco Teórico	8
• Objetivos	13
II. Marco Metodológico	14
• Modelo de la investigación	14
• Población y muestra	14
• Diseño de la investigación	14
• Procesamiento de los datos	17
III. Resultados	18
IV. Discusión	25
IV. Conclusiones	27
V. Recomendaciones	28
VI. Referencias bibliográficas	29
VII. Definición de términos	30
VIII. Anexos	33

Lista de Tablas

Tabla 1.	Antibióticos y concentraciones inhibitorias usadas con biospeckle	Pág. 17
Tabla 2.	Análisis de ocurrencia examen clínico y sedimento urinario.	Pág. 20
Tabla 3.	Análisis de ocurrencia de vitek.	Pág. 21
Tabla 4.	Análisis de ocurrencia de Biospeckle.	Pág. 21
Tabla 5.	Función de probabilidad para examen clínico y sedimento urinario, Vitek y biospeckle.	Pág. 21
Tabla 6.	Tabla de frecuencias positivas y negativas frente al examen clínico y sedimento urinario, vitek y biospeckle.	Pág. 24
Tabla 7.	Resultado prueba de correspondencia Chi-Cuadrado, Test de Fisher para examen clínico y sedimento urinario, vitek, biospeckle.	Pág. 24
Tabla 8.	Contraste Post-Hoc para variables cualitativas Examen clínico y sedimento urinario-Vitek, Examen clínico y sedimento urinario-Biospeckle.	Pág. 25
Tabla 9.	Comparación de coincidencia Vitek - Biospeckle paciente por paciente.	Pág. 25
Tabla 10.	Comparación coincidencia paciente por paciente antibióticos	Pág. 26

Lista de Figuras

Figura 1.	Objeto iluminado por biospeckle y su respectiva distribución en mota en pantalla.	Pág. 12
Figura 2.	Patrón de speckle o de motas	Pag. 12
Figura 3.	Diseño de la investigación.	Pág. 18
Figura 4.	Grafica de función de distribución de frecuencias acumuladas para examen clínico y sedimento urinario, vitek y biospeckle.	Pág. 23

www.bdigital.ula.ve

DEFINICION DE ABREVIATURAS

E. Coli: EscherichiaColi

IAHULA: Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes

IDBV: Imagen de diferencias acumuladas de base variables

ITU:Infección tracto urinario

mg/ml: Microgramo sobre microlitro

MIC: Concentración inhibitoria mínima

T Cruzi:Trypanosomacruzi

ul: Microlitro

ug/ml: Microgramo sobre microlitro

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Objetivo: Determinar si el biospeckle dinámico, puede evaluar el grado de actividad bacteriana y susceptibilidad antibiótica, en muestras de orina de pacientes con infección del tracto urinario.

Materiales y métodos: Se analizaron 31 muestras de orina, obtenidas de pacientes con fiebre, disuria, y análisis sedimento urinario patológico, sin previo uso de antibióticos, ingresados en la emergencia adultos del Instituto Hospital Universitario de los Andes en el periodo comprendido Mayo/Junio 2015 y sometidas al análisis con biospeckle y equipo identificación bacteriana vitek.

Resultados: Se obtuvo positividad de infección del tracto urinario con examen físico y análisis de sedimento urinario de 86%, equipo identificación bacteriana vitek 31% y biospeckle 48%. De igual manera una coincidencia de susceptibilidad antimicrobiana vitek-biospeckle de 91%

Discusión: Tomando en cuenta el examen clínico y análisis de sedimento urinario como testigo estadístico, se puede afirmar que el biospeckle es capaz de detectar actividad bacteriana en muestras de orina. Sin embargo las pruebas estadísticas de chi-cuadrado y test de Fisher parecieran indicar lo contrario. Pero al examinar la correspondencia de resultados paciente por paciente encontramos un 75% de coincidencias. Contradicción que pudiera ser explicada en el hecho del bajo número de muestras para el análisis estadístico. En relación al uso del biospeckle para medir susceptibilidad bacteriana la coincidencia de equipo de identificación bacteriana vitek/biospeckle es factible decir, que el biospeckle es capaz de detectar susceptibilidad antimicrobiana. Antes de recomendar el biospeckle para aportar datos al clínico relacionadas con la terapéutica antibiótica, en el tratamiento de infecciones urinarias, consideramos fundamental, confirmar los resultados obtenidos con otros métodos y con estudios con una población mayor, dado que la muestra en el presente estudio es pequeña.

Palabras claves: biospeckle dinámico, aplicación clínica, susceptibilidad antibiótica

SUMMARY

Objective: To determine if the dynamic biospeckle can assess the degree of bacterial activity and antibiotic susceptibility, in urine samples from patients with urinary tract infection.

Materials and Methods: 31 urine samples obtained from patients with fever, dysuria, abnormal urinary sediment analysis and, without antibiotics, admitted to the emergency adult Institute Hospital Universitario de los Andes in the analyzed period May / June 2015 and subjected to computer analysis vitek biospeckle and bacterial identification.

Results: positivity of urinary tract infection was obtained by physical examination and analysis of urine sediment of 86%, bacterial identification equipment vitek biospeckle 31% and 48%. Similarly coincidence antimicrobial susceptibility vitek-biospeckle of 91%

Discussion: Considering the clinical examination and analysis of urine sediment as statistical control, we can say that the biospeckle can detect bacterial activity in urine samples. However statistical tests chi-square test and Fisher seem to indicate otherwise. But when examining the patient matching patient results found 75% of matches. Contradiction could be explained by the fact the low number of samples for statistical analysis. Regarding the use of the bacterial susceptibility biospeckle measuring equipment matching vitek / biospeckle bacterial identification it is feasible to say that the biospeckle can detect antimicrobial susceptibility. Before recommending biospeckle to provide data to the clinical related to antibiotic therapy in the treatment of urinary tract infections, we consider fundamental, confirm the results obtained with other methods and studies with a larger population, as the sample in this study is small.

Keywords: Dynamic biospeckle, clinical application, antibiotic susceptibility

I. Introducción

Justificación

Para establecer el diagnóstico y tratamiento en los pacientes con enfermedades infecciosas, el médico requiere del apoyo del laboratorio de microbiología, para identificar de forma rápida y correcta el agente causal, para así iniciar en base a la sensibilidad a los antibióticos la terapia más adecuada. Sin embargo, en comparación con los otros campos del laboratorio, el de microbiología ha tenido un avance más lento en el desarrollo de métodos específicos y rápidos para el diagnóstico de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas y actualmente las herramientas diagnósticas más empleadas, siguen siendo la observación directa, con o sin tinción y las técnicas de cultivo. Considerando que estos últimos, suelen demorar algunos días, se plantea la posibilidad de complementar estos métodos con la introducción de sistemas ópticos y de software (biospeckle dinámico) y brindar información relevante al médico en las primeras horas y obtener así el máximo beneficio para los pacientes.

www.bdigital.ula.ve

Antecedentes

La década de los 60 estuvo marcada por una revolución tecnológica, con el advenimiento y descubrimiento del fenómeno laser. Desde entonces el láser ha tenido una importancia considerable y ha sido aplicado por los investigadores en múltiples áreas del conocimiento humano (1). En los últimos años se ha desarrollado una de sus aplicaciones, nos referimos a la “interferometría” de moteado o “speckle”.

En (2011), RamírezMiquet y colaboradores, en un trabajo experimental que aplicaron la técnica de speckle dinámico, utilizando dos configuraciones diferentes de incidencia del haz de luz láser en placas de petri algunas cultivadas con *Escherichiacoli* y otras como control no inoculadas. Concluyo que el método de speckle dinámico, específicamente en los compartimientos inoculados, permite detectar y caracterizar tanto cualitativamente como cuantitativamente, la actividad bacteriana así como su representación evolutiva en el tiempo (2)

En la Sección Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, se ha empleado la técnica de Biospeckle en diversos trabajos. 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 (5). 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, mayor que en ausencia de fármacos, estimulándose el patrón de speckle bajo estas condiciones, asimismo, esta 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 (6).

Simultáneamente en 2011, Lobo corroboró este planteamiento, utilizando el biospeckle para medir la actividad de diversos fármacos sobre *T. cruzi*, de esta manera se puede hacer una predicción rápida del efecto a corto plazo de los fármacos sobre los parásitos, produciéndose un efecto instantáneo cuando se emplea Tofranil y Tryptanol. En este trabajo no solamente se utilizaron nuevas propuestas de fármacos (antidepresivos tricíclicos) como trypanocidas, sino que también se evaluó el valor predictivo del biospeckle al comparar los resultados con experiencias desarrolladas *in vitro* e *in vivo* (7).

Belandría en 2011, diseñó experiencias de biospeckle tomando en cuenta los resultados de otros investigadores, García (2011) y Lobo (2011), pero aplicadas a *E.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 Biospeckle. Para ello desarrolló el Biospeckle 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

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

patrón de speckle, además se decidió esperar un tiempo prudencial de 15 min, y así evitar los efectos por movimiento, mezcla y difusión. Los resultados demuestran que el biospeckle 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 (8).

En estos 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 Di Rocco (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 por nosotros como comparación de base constante (6).

En un estudio similar, realizado por Díaz y Gallego en 2013, se utilizó biospeckle para medir el efecto de ciprofloxacina sobre *E.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 (9).

En la actualidad se están desarrollando dos trabajos (Méndez 2015, Abche 2015) que 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 IDABV. Abche (2015) tomó esa propuesta y reprocesó los videos obtenidos por Belandria (2011) y tomando en consideración el modo de acción de los antibióticos utilizados, contribuyó a constatar que ese nuevo procesamiento es más adecuado (10).

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 Biospeckle 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 biospeckle” Proyecto No. 2012001862.

Briceño y Ángel (2013), utilizando el Prototipo de Biospeckle en sus primeras etapas de fabricación, también aplicaron biospeckle en el estudio de bacterias, para ello emplearon métodos de atenuación del láser con el objetivo de detectar la presencia de las mismas, usando laser rojo, verde y azul con vidrio o filtros como atenuadores. Los resultados indican que el vidrio es buen atenuador cuando las bacterias están muy diluidas, sin

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

embargo ocurre saturación de la imagen y afecta la cámara, por lo que recomienda usar filtros. Así mismo demostraron que empleando el láser verde se detecta solo efecto antibiótico cuando se usa vidrio como atenuador, mientras que si se usa un filtro se detectan solo las bacterias. En el caso del láser azul se obtienen resultados similares aunque es mucho más versátil para detectar bacterias concentradas y diluidas en presencia y ausencia de antibióticos si se atenúa con filtro. En este trabajo los videos se procesaron manualmente por el método de comparación con base constante (12).

En este momento se está culminando otro trabajo (Moreno, 2015) que está reuniendo las experiencias anteriores para mejorar los datos de Biospeckle. Para ello se ha evaluado el efecto del antibiótico Ampicilina – Sulbactam sobre *Escherichiacoli*, por Biospeckle, usando láser verde en el prototipo construido. 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 Biospeckle” y se ha evaluado la presencia de sistemas particulados para aumentar las diferencias entre muestras vivas y aquellas afectadas por el antibiótico.

Aunque otros autores tales como Ramírez, Martí y Contreras (2011) también desarrollaron Biospeckle sobre bacterias, nuestro trabajo ha resultado ser novedoso y original por usar bacterias en medios líquidos y evaluar el efecto de antibióticos y lograr detectar pequeños cambios en la actividad bacteriana en tiempos cortos.

www.bdigital.ula.ve

Marco teórico

Las infecciones del tracto urinario (ITU), constituyen una de las infecciones más frecuentes en la atención primaria en salud y en el medio intrahospitalario. Se pueden presentar a cualquier edad y son más frecuentes en personas del sexo femenino. Otro aspecto a tomar en consideración en los actuales momentos es la proporción importante de patógenos resistentes a los antibióticos y las consecuencias que esto supone para el tratamiento y pronóstico de estas infecciones (14).

En el medio intrahospitalario las ITU ocupa la primera causa de infección constituyéndose en un significativo problema de salud pública, no solamente por su alta incidencia de morbilidad sino también por los altos costos financieros asociados a ésta.

La inmensa mayoría de las ITU son causadas por gérmenes que constituyen parte de la flora microbiana normal del intestino, se trata de gérmenes Gram negativos de la familia enterobacterias (flora fecal), representadas en primer lugar en las infecciones agudas comunitarias por la *Escherichiacoli* (85%). Se recuerda que los clones del grupo A de la *E. coli*uropatógena (011/017/077: K52:h18) pueden causar severos procesos infecciosos extrauritarios (pulmonares) y con una importante resistencia bacteriana a múltiples drogas. Los serogrupos de *E. coli* que originan una alta proporción de infecciones son: 01, 02, 04, 06, 07, 075, 0150 y ciertos serotipos también se correlacionan con la gravedad clínica sobre todo de las pielonefritis aguda. El genoma de la *E. coli* está constituido por 4.6 megapares de bases (Mbp). La virulencia de la *E. coli* se debe al antígeno K presente en su cápsula, lo cual le otorga la propiedad de resistir más a la fagocitosis y a la actividad bactericida del suero. También se ha postulado que las cepas de *E. coli* más virulentas son las que expresan las toxinas similares a Shiga. Otros gérmenes frecuentes en pacientes portadores de litiasis coraliforme es habitual encontrar *Klebsiellasp. Proteus* que se divide en indolpositivo (*P. rettgeri*, *P. vulgaris*, y *P. morganii*) e indolnegativo (*P. mirabilis*). En mujeres sexualmente activas se aíslan *Staphylococcus*, especialmente el aureus. También es frecuente conseguir ITU causadas por *Pseudomonas*. En las infecciones nosocomiales, la *Escherichiacoli* es la causa del 50% de ellas, otros bacilos Gram negativos implicados en la ITU adquirida en la comunidad tienen menor frecuencia, y se presentan casos debido a gérmenes como *Citrobacter* y *Serratia*. En pacientes hospitalizados con sonda vesical o que han recibido antibióticos de amplio espectro por tiempo prolongado se encuentran como patógenos causantes de la ITU *Staphylococcusepidermidis*, *Streptococcusfecalis* (enterococos) y *Cándidas* (transplante renal) (14).

Teóricamente se describen tres vías de penetración de los gérmenes: vía linfática, hematogena y ascendente. Existen pocas evidencias a favor de la vía linfática la cual ha sido demostrada en animales. En los recién nacidos o en pacientes portadores de sepsis, la infección puede llegar al riñón por vía hematogena y representa el 3% de todos los casos de ITU. La vía principal de infección es ascendente, responsable del 95% de las ITU, secundaria a la colonización de la uretra distal y región periuretral por gérmenes procedentes de la flora intestinal (14).

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Las propiedades adherentes de los gérmenes están involucradas en la llegada y colonización, en el aparato urinario normal e influyen en el nivel anatómico de la ITU.

La presencia de adhesinas, llamadas fimbrias o pilis, favorecen la unión a receptores celulares específicos, que por lo general son carbohidratos, con características hidrofóbicas al igual que la membrana de las células escamosas y transicionales del uroepitelio, lo que favorece la adhesión. Existen 2 tipos de pilis; los pilis tipo I, se encuentra tanto en la *Escherichiacoli* patógena como en la no patógena, juega un papel importante en la ITU bajas, contiene sustancias como la metilmanosina. La unión de las fimbrias a estos receptores es inhibida en presencia de manosa. Las pilis tipo II o Gal-Gal (globoserie), son el más potente inductor de inflamación y causa la mayor parte de las pielonefritis agudas, especialmente con riñón y vías urinarias normales. Los glucolípidos del receptor Gal-Gal, también son antígenos del grupo sanguíneo P el cual está presente en los eritrocitos humanos y en las células del epitelio urinario. Las fimbrias están constituidas por unidades de proteínas de forma helicoidal. La adherencia a las células epiteliales facilita la transferencia de toxinas al huésped. Las endotoxinas serían las causantes de una respuesta inflamatoria más intensa que la que se presenta en ITU debida a bacterias no adherentes. (14)

Es importante establecer si es el primer episodio de ITU, o si el paciente ha padecido episodios previos o si coexiste una enfermedad renal, también se investiga la posibilidad de que existan factores que predispongan a su aparición (litiasis, reflujo vesicoureteral, prostatismo, vejiga neurogénica, diabetes). Una vez realizada una exhaustiva anamnesis y exploración clínica que incluya tacto rectal en el hombre mayor de 50 años o en quienes presenten síntomas prostáticos, se establece un diagnóstico presuntivo, el cual debe confirmarse a través del sedimento urinario, tiras reactivas y el estudio microbiológico (15).

Las tiras reactivas pueden detectar leucocituria y nitritos, pueden confirmar la presencia de la enzima leucocitoestearasa en la orina, lo cual indica piuria, también detectan la reducción de nitratos por las bacterias, y es un indicador de bacteriuria; las infecciones por *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Enterococos*, no producen la reducción de nitratos, al igual que las muestras de orina que no sean la primera de la mañana, las cuales no han tenido tiempo de permitir la reducción, poseen una sensibilidad del 95% y una especificidad de 75%; un test positivo debe acompañarse de un urocultivo, ya que los tumores uroepiteliales suelen dar falsos positivos. El estudio microbiológico consta de tres partes: examen de los caracteres organolépticos, sedimento y cultivo en el que se identifican el número de colonias y el germen; se complementa con el antibiograma o prueba de susceptibilidad que determina in vitro la sensibilidad de los antimicrobianos. Es importante, que la muestra para la realización del urocultivo que constituye la comprobación diagnóstica, se realice en forma adecuada. Para cumplir con los requisitos de la toma de muestra se debe obtener la muestra de orina del segundo chorro durante la primera micción del día. La misma se envasará en recipiente con tapón de rosca estéril para su procesamiento inmediato, de no ser esto posible, se refrigera a 4° C y no se recomienda la cateterización ni la punción suprapúbica para obtener la muestra, excepto en pacientes portadores de vejiga neurogénica o gravemente enfermos.

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

En el Gram del sedimento urinario centrifugado, la presencia de 10 o más leucocitos por mm^3 , se correlaciona con 100.000 UFC/ml. En la orina no centrifugada, la presencia de un organismo observado con el objetivo de inmersión, se asocia con 100.000 UFC/ml. La sensibilidad y especificidad de estos hallazgos es mayor del 90% (14).

En el examen del sedimento los datos más importantes son la piuria y la bacteriuria. El hallazgo de más de 10 leucocitos por mm^3 está relacionado con la presencia de más de 400.000 leucocitos por hora y se correlaciona muy adecuadamente con urocultivos de más de 100.000 UFC/ml. La presencia de cilindros leucocitarios sugiere compromiso del parénquima renal. La proteinuria es rara de encontrar, pero en casos de pielonefritis severa o de nefritis intersticial, la proteinuria puede estar presente. La hematuria micro o macroscópica puede observarse cuando existe inflamación vesical (14).

No existe en la actualidad, un examen adecuado para determinar si la infección es alta o baja, excepto por la cateterización bilateral, pero es un método demasiado invasor para ser utilizado de rutina; la presencia de cilindros leucocitarios ayuda en la ITU alta, pero son los criterios clínicos los que definen el diagnóstico (15).

Speckle

El speckle, es un fenómeno óptico, que se produce cuando una luz láser incide sobre una superficie rugosa, (ver figura 1) la interferencia de los frentes de onda dispersados, produce una distribución de aspecto granular o de motas, conocido como patrón granular de alto contraste, o speckle, el cual consiste en secciones oscuras intercaladas con secciones brillantes (ver figura 2). (1)

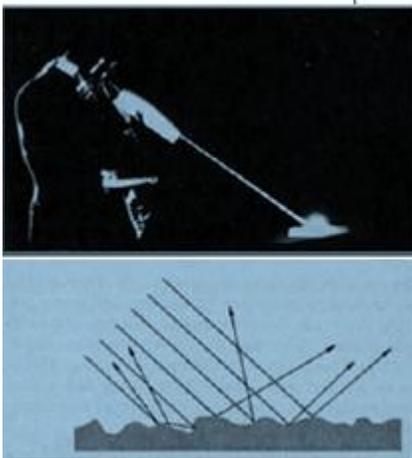


Figura 1. Luz láser que incide sobre superficie rugosa.

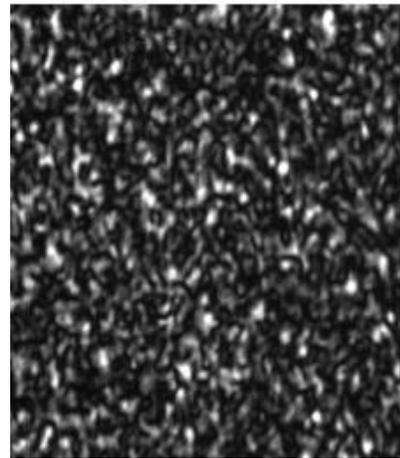


Figura 2. Patrón granular de alto contraste, también conocido como patrón de speckle.

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Los patrones de *Speckle* pueden ser estáticos o dinámicos. *Un Speckleestatico* es aquel que surge cuando la superficie irradiada se encuentra invariable, sin movimiento alguno. El *speckledinámico* se presenta, cuando la superficie dispersora muestra alguna actividad producida por movimiento de partículas y/o cambios en el camino óptico (debido a cambios en el índice de refracción del medio entre la superficie y el detector). Al aplicar el fenómeno de speckle, sobre entes biológicos, recibe el nombre de *biospeckle*, y teniendo en cuenta, que los medios biológicos se encuentran en continuo movimiento, también se le conoce como; *biospeckle dinámico* (8).

La luz dispersada, es captada por un sistema óptico, que transmite las señales a un sistema computarizado, el cual tiene un software que a través de algoritmos matemáticos, permiten analizar de manera espacial y temporal los procesos biológicos (Ver anexos) (9).

Los medios biológicos generan un patrón móvil de “speckles” que sirve para expresar el grado de movilidad del mismo, ya que la estadística del movimiento de los granos de “Speckle” es proporcional al grado de actividad de la muestra biológica, se ha usado el biospeckle, para determinar la respuesta quimiotáctica de algunas bacterias y células tumorales, evaluación del flujo sanguíneo en el cerebro, estudios en semillas, hongos, frutos, parásitos, *films* biológicos, helados, raíces, semen, entre otros. Las aplicaciones del Speckle dinámico, en materiales no biológicos son también varias, entre ellas podemos mencionar el análisis del secado de pinturas, el control de geles, espumas, corrosión (5)

www.bdigital.ula.ve

Vitek.

El sistema vitek originalmente diseñado por la NASA, es un sistema automatizado destinado a la identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. Una vez tomada la muestra, se coloca en un medio cultivo tradicional, posteriormente, una fracción de esta suspensión se coloca en tarjetas, que poseen micropocillos, cada uno con sustratos químicos y antimicrobianos. Estas tarjetas se sellan y colocan en un equipo, donde se incuban por un tiempo de 4 a 18 horas, siendo, analizadas por un lector óptico, el cual realiza un escaneo de las reacciones químicas y de calorimetría, y transmitiendo, cada hora, esta información a un programa, el cual realiza la identificación bacteriana. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar, en vista de que los diferentes paneles de las tarjetas, contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (7) (8). El propósito de la automatización con el sistema vitek consiste en mejorar la respuesta de los estudios microbiológicos manteniendo la calidad de los mismos con la utilización de nuevas tecnologías e informática. Aporta mayor seguridad, suprimiendo las manipulaciones repetitivas, y la rapidez de respuesta permite obtener resultados fiables más rápidamente que con las técnicas manuales (20)

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Este sistema automático vitekesta constituido por un inoculador/sellador, un incubador/lector, un ordenador y una impresora. El inoculador/sellador permite la inoculación de las tarjetas en pocos minutos. El incubador/lector asegura simultáneamente la incubación y la lectura de las tarjetas para una capacidad que varía de 32 a 480 tarjetas según el modelo. El ordenador equipado con los programas de vitek efectúa un control permanente de las operaciones en curso, memoriza los valores, trata e interpreta los resultados (20)

.Las ventajas de los sistemas automatizados en microbiología son:

- Estandarización de los procesos.
- Requieren de un proceso de incubación corto.
- Rapidez de respuesta 6 - 18 horas.
- Contiene una librería taxonómica amplia.
- Adecuación a la diversidad de agentes de importancia clínica.
- Objetividad de las determinaciones.
- Precisión y reproductividad de los resultados.
- Bioseguridad.
- Optimiza el tiempo del personal del laboratorio.
- Aplicación de programas que facilitan interpretación de las pruebas realizadas y análisis estadísticos.
- Almacenar gran cantidad de información.
- Control de las variables: disminuyen error, pre-analíticas (identificación de muestra) analíticas, post-analíticas (informes).

Las desventajas de los sistemas automatizados en microbiología son:

- Alto costo.
- No incluye características esenciales de ciertas especies.
- Grado de resolución es menor en algunos grupos bacterianos.
- No está disponible para todo el espectro de bacterias.
- Paneles ATB no definidos por el usuario.
- Necesidad de correlacionar en microbiología tradicional.
- Necesidad de cultivo puro.
- Necesidad de confirmar algunas CIM y ATB no presentes en la tarjeta.

Objetivo general

1. Determinar si el biospeckle puede detectar el grado de actividad bacteriana y susceptibilidad antibiótica en muestras de orina, en pacientes con infecciones del tracto urinario.

Objetivos específicos

1. Establecer si el biospeckle dinámico puede ser utilizado para determinar agente patógenos en orina.
2. Establecer si el biospeckle dinámico puede ser utilizado para detectar el grado de actividad biológica, en orina que contenga antibiótico.
3. Estimar la sensibilidad y especificidad del prototipo de biospeckle dinámico para determinar la presencia de bacterias en muestras de orina.
4. Establecer si el uso del biospeckle dinámico puede aportar al clínico datos de importancia para la toma de decisiones en la terapéutica antibiótica.
5. Determinar si el uso del biospeckle en el análisis de muestras de orina con fines clínicos tiene ventajas sobre el equipo de identificación bacteriana vitek.

II. Marco Metodológico

Modelo de Investigación

Considerando, que el biospeckle utilizado, es un prototipo y que existen pocas experiencias en su uso clínico sobre muestras de pacientes, se considera que el nivel de investigación de este trabajo es de tipo exploratoria.

Población y muestra

En vista de que se desea conocer la capacidad para detectar actividad bacteriana y susceptibilidad antibiótica, usando el biospeckle, se eligieron pacientes en los cuales se tenía una alta probabilidad de infección del tracto urinario. De esta manera se comparó muestras con criterios para diagnóstico de infección urinaria, con los resultados de esas mismas muestras pero analizadas con el biospeckle y el equipo de identificación bacteriana Vitek. Por tanto se realizó un muestreo no probabilístico, en pacientes hospitalizados, en el área de la emergencia adultos del IAHULA.

Diseño de la investigación

La selección de los pacientes a quienes se tomó muestras de orina, se hizo bajo los siguientes criterios:

1. Pacientes ingresados en la sala emergencia adultos del IAHULA durante el periodo comprendido entre Mayo/Junio 2015.
2. Mayores de 15 años de edad, y de ambos sexos.
3. Clínica de fiebre, a saber; temperatura axilar \geq a 39°C más disuria.
4. Uroanálisis con piuria, bacteriuria y leucocitos \geq 10 x campo.
5. Uso de sonda vesical con menos de 48 horas.

De igual manera se excluyeron del estudio aquellos pacientes que presentaban:

1. Uso previo de antibiótico.
2. Menores de 15 años de edad.
3. Embarazadas.
4. Uso de sonda vesical por un periodo mayor de 48 horas.

Antes de iniciar con la toma de muestras, se recolecto la orina de un niño de 7 años, sin antecedentes de infección del tracto urinario (muestra control que se considera sana). Esta orina se estudió bajo el biospeckle, obteniendo así un parámetro de comparación, de tal manera que toda muestra con un grado de actividad igual o menor a la muestra del niño, fue considerada como negativa, en tanto; aquellas muestras con actividad por encima hasta

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

el 10% se asignaron como contaminadas, mientras que las muestras con actividad detectada superior al 10% con respecto a la orina control, se calificaron como positivas.

Una vez, tomada cada muestra, se colocó en un envase estéril, con tapa de rosca, rotulado con los datos del paciente, y se conservaron a temperatura menor de 4°C, para ser enviadas de manera inmediata, con tiempo de llegada menor a 30 minutos, una parte al laboratorio de microbiología de Instituto de Previsión y Asistencia Social del Ministerio de Educación (IPASME) para ser analizada con el equipo de detección bacteriana Vitek y otra parte, al laboratorio de biotecnología de la facultad de farmacia de la Universidad de los Andes.

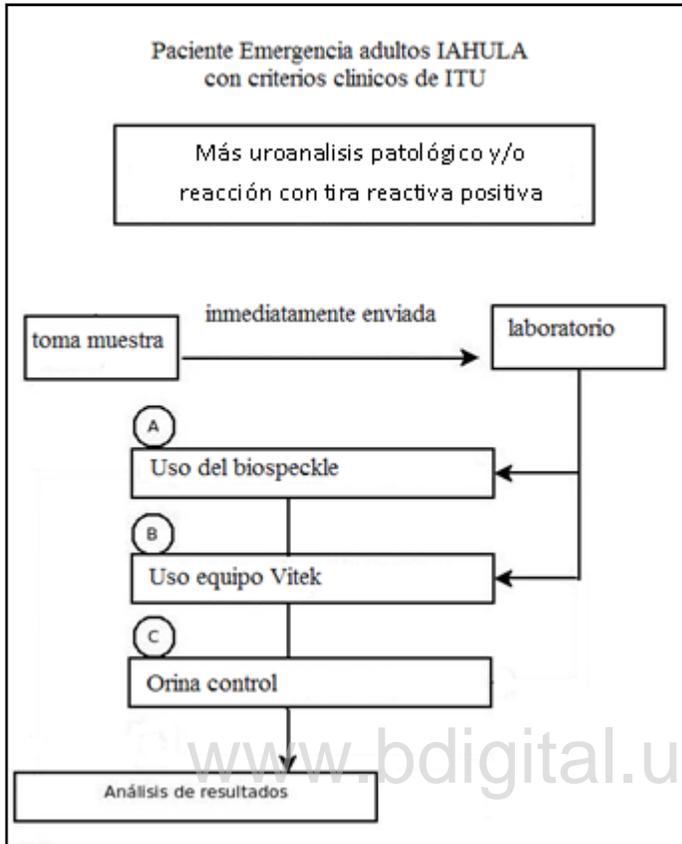
En el laboratorio de biotecnología de la facultad de farmacia, cada una de las muestras se distribuyó en 14 tubos de Eppendorf, previamente preparados con 10 µl de solución salina 0.9% más un solo tipo de antibiótico y se procedió a realizar la medida con el espectrómetro utilizando el espectro de onda roja de la luz láser.

Tabla 1. Diferentes antibióticos y concentraciones utilizadas durante los ensayos.

Nº	ANTIBIÓTICO	PRESENTACIÓN / CONCENTRACIÓN	MIC (S) ug/ml	CONCENTRACIÓN UTILIZADA EN EL ENSAYO ug/ml
1	Cefazoline	1g polvo	≤2	4
2	Cefepima	1g polvo	≤2	4
3	Cefotaxima	1g polvo	≤1	2
4	Ceftazidima	1g polvo	≤4	8
5	Meropenem	1g polvo	≤1	2
6	Gentamicin	80mg/2ml	≤4	8
7	Amikacin	500mg/2ml	≤16	32
8	Ciprofloxacina	200mg/100ml	≤1	2
9	Levofloxacina	500mg/100ml	≤2	4
10	Sulfametaxazol 400 / Trimetoprim 80	400/80	≤38 / 2	76/4
11	Clindamicina	150mg/ml	≤0,5	1
12	Fluconazol	200mg/100ml	≤8	16
13	Agua			
14	Agua + Orina control			

Posteriormente se realizó la recolección, organización, y análisis de los resultados.

Figura 3. Esquema diseño investigación.



Procesamiento de los datos

Se realizó un análisis de distribución de bernoulli, para cada técnica y un análisis de frecuencias, utilizando pruebas de chi-cuadrado y el test de Fisher. El programa utilizado fue el lenguaje estadístico R y la librería Rcdmr.

www.bdigital.ula.ve

III. Resultados

En este estudio se analizaron 31 muestras de orina, todas de pacientes hospitalizados en el área de emergencia adultos del IAHULA. Con diagnóstico de ingreso de infección del tracto urinario y previo al uso de antibioticoterapia alguna.

De las 31 muestras tomadas, 25 de ellas tenían piuria, bacteriuria y presencia de 10 o más leucocitos por mm^3 , lo cual se correlaciona con 100.000 UFC/ml dando una sensibilidad y especificidad mayor del 90% para ITU, por lo que bajo criterios clínicos y características del sedimento urinario se asignaron como positivas. El resto de las 6 muestras no cumplían con los criterios antes mencionados, por lo que se consideraron como negativas.

Del total de muestras recogidas apenas 29 muestras fueron analizadas con el equipo vitek, debido a que durante el traslado al laboratorio 2 muestras lamentablemente se perdieron. En relación a las muestras enviadas para ser procesadas con el biospeckle es de destacar que las 31 muestras recolectadas fueron analizadas.

Análisis por tipo de frecuencia de ocurrencia para cada una de las variables analizadas. Para el análisis estadístico se organizaron los datos en tres grupos: Examen clínico más sedimento urinario, vitek, biospeckle. El primer análisis que se realizó es el de ocurrencia de resultado, haciendo énfasis en los resultados positivos que son el blanco de este estudio. Para ello se tomaron en cuenta la totalidad de los datos. Las tablas 2, 3 y 4 muestran los resultados para Examen clínico más sedimento urinario vitek, y biospeckle respectivamente.

Tabla 2. Análisis de ocurrencia por Examen Clínico y sedimento urinario.

	Faltantes	Negativo	No Aplica	Positivo
Número de Casos	2	4	1	25
Número de Casos (%)	6.25	12.5	3.12	78.12

En la tabla 2. Se puede observar que se obtuvieron bajo criterios clínicos y características del sedimento urinario 25 resultados compatibles con infección del tracto urinario, lo que representa el 78%

Tabla 3. Análisis de ocurrencia de VITEK

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

	Faltantes	Inadecuada	Negativo	Positivo
Número de Casos	2	1	20	9
Número de Casos (%)	6.25	3.12	62.50	28.12

En la tabla 3. Podemos observar que se analizaron 29 muestras con el equipo de detección Vitek, con 20 casos negativos y 9 casos positivos para infección del tracto urinario.

Tabla 4. Análisis de ocurrencia Biospeckle

	No Determinado	Negativo	Positivo
Número de Casos	1	16	15
Número de Casos (%)	3.12	50.00	46.88

En la tabla 4. Se observa que se analizó un total de 31 muestras, con resultado compatible para infección del tracto urinario 15 muestras equivalente al 46% de igual manera 16 muestras negativas que representan 50%.

Distribución de tipo Bernoulli.

Se calculó la distribución de Bernoulli, con el fin de responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la probabilidad de que el Examen Clínico más sedimento urinario, y los equipos Vitek y Biospeckle sean médicamente identificatorios de la ocurrencia acertada o no de la enfermedad? El análisis se puede realizar de dos maneras, tomando en cuenta la totalidad de los datos, es decir sin excluir los no positivos (Faltantes, Negativos, No Aplica y No Determinados) y excluyendo los no positivos (Faltantes, Negativos, No Aplica y No Determinados) (Tabla 5).

Tabla 5. Función de probabilidad de cada una de las técnicas sin excluir los no positivos o negativos.

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Técnica	Sin Exclusión de Casos			Con Exclusión de Casos		
	Indicador	$P(X=r)$	$P(X \leq r)$	Indicador	$P(X=r)$	$P(X \leq r)$
Examen Clínico	Negativo	0.2188	0.2188	Negativo	0.138	0.138
	Positivo	0.7812	1	Positivo	0.862	1
VITEK	Negativo	0.7188	0.7188	Negativo	0.6896	0.6896
	Positivo	0.2812	1	Positivo	0.3103	1
BIOSPECKLE	Negativo	0.5312	0.5312	Negativo	0.5162	0.5162
	Positivo	0.4688	1	Positivo	0.4838	1

La tabla 5 presenta las características de la distribución de Bernoulli para cada una de las técnicas. Estos resultados se muestran en dos lotes, “Sin Exclusión de Casos” y “Con Exclusión de Casos”, siendo este último el que se describe a continuación. Este análisis muestra que el Examen Clínico (corresponde con el testigo estadístico) muestra un acierto de más del **86%** de los casos identificados como positivo, seguido por el BIOSPECKLE (**48%**) y por último el VITEK (**31%**).

Análisis Distribución de Frecuencias

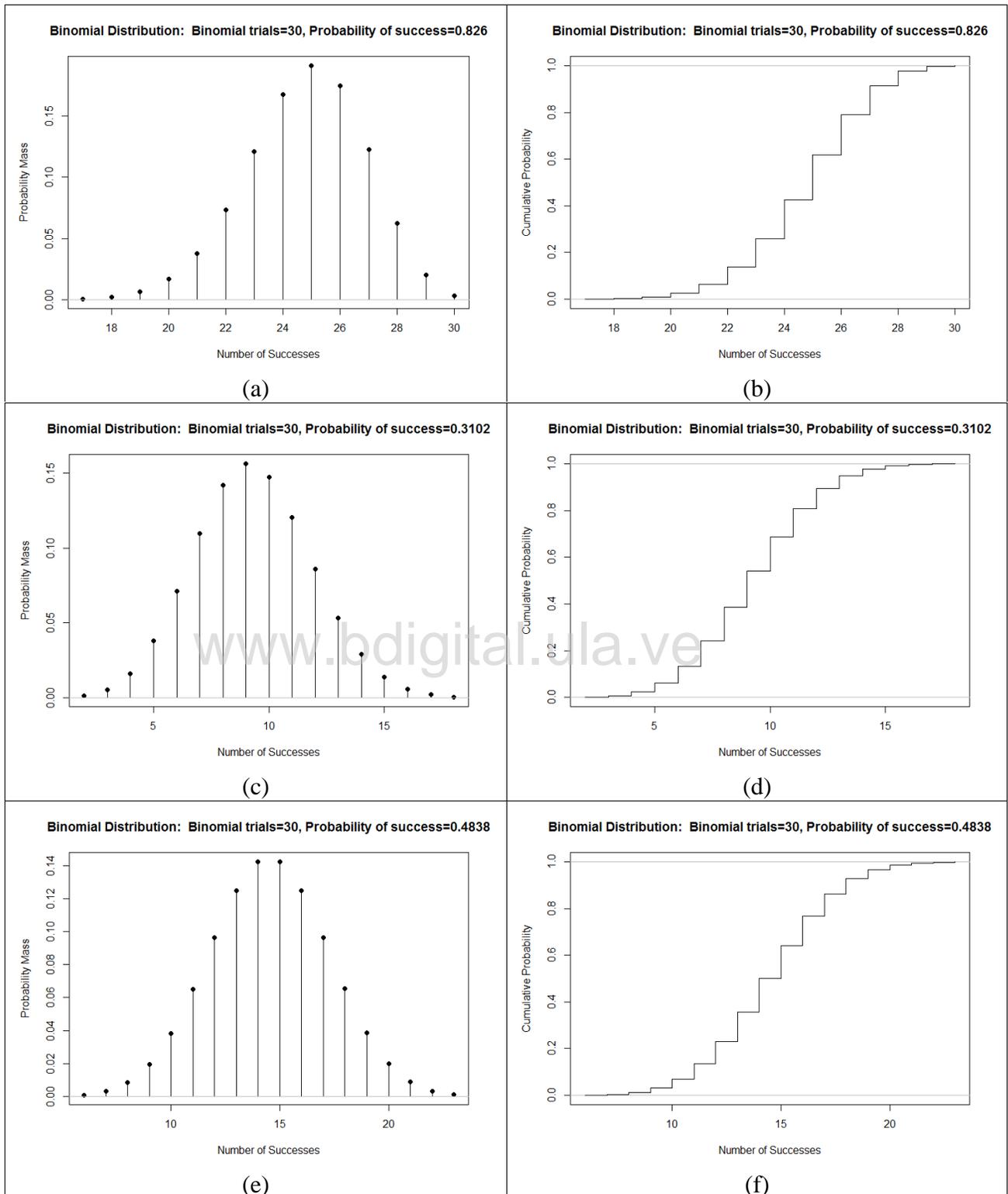
www.bdigital.ula.ve

En la Figura 4. Se muestra la Distribución de Frecuencias (gráficos de la izquierda) y Frecuencias Acumuladas (gráficos de la derecha) para Análisis Clínico más sedimento urinario, vitek y biospeckle.

En el caso de las Frecuencias Acumuladas, se toma en cuenta el valor asintótico, que corresponde a aproximadamente 29 pacientes para el Examen Clínico, 15 pacientes para vitek y 20 pacientes para biospeckle. Nuevamente se observa que el valor arrojado por el método de biospeckle se aproxima más al valor del testigo estadístico.

Figura 4. Gráfica de función de distribución de frecuencias y de frecuencias acumuladas para el Examen Clínico, Vitek y Biospeckle.

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE



Análisis de chi-cuadrado y test de fisher.

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Se ejecutó un test de correspondencia Chi-cuadrado y el Test Exacto de Fisher (que se emplea cuando los tamaños de muestra son pequeños), definiendo la Hipótesis Nula (H_0) y la Hipótesis Alternativa (H_1), de la siguiente manera (se seleccionó un nivel de significancia de 5%):

H_0 : Existe independencia entre el Examen Clínico y el VITEK y el BIOSPECKLE

H_1 : Existe correspondencia entre el Examen Clínico y el VITEK y el BIOSPECKLE

Tabla 6. Tabla de Frecuencias positivo o negativo frente a Examen Clínico, Vitek y Biospeckle.

	EXAMEN CLINICO	VITEK	BIOSPECKLE
POSITIVO	25	9	15
NEGATIVO	4	20	16

Los resultados del estadístico Chi-cuadrado y del Test Exacto de Fisher se muestran en el Tabla 7, rechazando la Hipótesis Nula (H_0) a un nivel de significancia del 5%.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 7. Resultado de la Prueba de Correspondencia

Chi-Cuadrado			Test exacto de Fisher
Estadístico Chi-cuadrado	Df	p-value	p-value
18.6926	2	8.729e-05	5.338e-05

Ya que se rechazó la hipótesis nula se procedió a realizar un contraste Post-Hoc para variables cualitativas (Tabla 8), en éste se rechaza la hipótesis nula de no correspondencia por pares de pruebas entre Examen clínico-Vitek, Examen clínico-Biospeckle a un nivel de significancia del 5%. En cuanto a la comparación VITEK-BIOSPECKLE, se acepta la hipótesis nula, es decir que se acepta que no hay correspondencia entre estas dos pruebas. Esto se concluye tanto para Chi-cuadrado como para el Test exacto de Fisher.

Cuadro 8. Contraste Post-Hoc para variables cualitativas

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

	Examen Clínico- VITEK	Examen Clínico- BIOSPECKLE	VITEK- BIOSPECKLE
Chi-Cuadrado (p-value)	1.993e-05	0.0019	0.1703
Test exacto de Fisher (p-value)	3.962e-05	0.002524	0.1968

Debido a la no correspondencia estadística entre vitek y Biospeckle por Chi-cuadrado y por Test Exacto de Fisher, se examinó la coincidencia de los resultados paciente por paciente, comparando pares de pruebas. Tabla 9.

Tabla 9. Comparación de Coincidencia paciente por paciente

	Examen Clínico- VITEK		Examen Clínico- BIOSPECKLE		VITEK- BIOSPECKLE	
	Número	%	Número	%	Número	%
Coincidencia	13	46	15	53	21	75
No Coincidencia	15	53	13	46	7	28

En la tabla 9 se puede apreciar que hay 46% de coincidencia en los resultados de examen clínico y vitek, 53% de coincidencia en los resultados de examen clínico y biospeckley 75% de coincidencia en los resultados de vtek y biospeckle, lo que sugiere que hay una buena correspondencia entre las dos últimas pruebas y que probablemente los números de muestras son bajos para los análisis estadísticos.

Análisis susceptibilidad antimicrobiana

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Finalmente, se hizo una comparación del efecto de los antibióticos en el ensayo. Para hacer este análisis se deben hacer algunas consideraciones previas, tales como que se pueden comparar solamente aquellos casos que fueron positivos por ambos métodos (vitek y biospeckle) y dentro de esos casos, se puede comparar el efecto de antibióticos idénticos. Adicionalmente, por biospeckle se puede determinar solamente la sensibilidad, ya que es un ensayo que se desarrolla en un lapso de dos horas, lo que indica que si se detecta un efecto de un antibiótico habrá Sensibilidad, pero si no se detecta un efecto, no necesariamente es resistencia ya que puede ser que no haya transcurrido el tiempo suficiente para la demostración de su efecto. Debido a esto, se tomaron solamente aquellos resultados que eran positivos por ambos métodos, se examinaron los antibióticos que daban sensibilidad por biospeckle, y se verificó si esos antibióticos habían dado sensibilidad por vitek, apuntando así coincidencia y no coincidencia. Se obtuvieron los resultados que se muestran en el Tabla 10 que aunque representan un número muy bajo de muestras, son indicativos de la detección de sensibilidad por biospeckle.

Tabla 10. Comparación de Coincidencia paciente por Antibióticos

	VITEK- BIOSPECKLE	
	Número	%
Coincidencia	10	91
No Coincidencia	1	9

IV. Discusión

Es oportuno al iniciar la discusión, hacer una comparación de las ventajas y desventajas de los dos métodos utilizados.

- VITEK requiere el aislamiento del microorganismo y toma 24 horas que se adicionan al tiempo requerido para el aislamiento, culminando con la identificación del microorganismo.
- BIOSPECKLE no requiere el aislamiento del microorganismo, haciendo una medida global sobre la actividad microbiana y toma 2 horas realizarlo, pudiendo tener un resultado en un máximo de 3 horas. Este método tiene la ventaja de desarrollarse en un tiempo corto y si bien pudiera ser una desventaja la no identificación del microorganismo, presenta una medida global de la actividad microbiana, incluyendo hongos y microorganismos no cultivables. En este método la comparación de la actividad de Biospeckle de la muestra con la orina control permitió concluir que era positiva para la presencia de microorganismos y en ese caso se analizaba la susceptibilidad a los antibióticos (aquellos que disminuían la actividad hasta niveles de la muestra control).
- VITEK utiliza antibióticos comercialmente preparados y estandarizados en condiciones repetitivas.
- BIOSPECKLE puede utilizar cualquier antibiótico, especialmente aquellos que se encuentran a disposición en este momento en Venezuela. Esto presenta la ventaja de poder utilizar aquellos antibióticos que estarán a disposición del médico.
- Se puede hacer la comparación de la función de probabilidad para Examen Clínico, VITEK y BIOSPECKLE que corresponden con 86%, 31% y 48% respectivamente, indicando que BIOSPECKLE se aproxima más al testigo del estudio que es el Examen Clínico.
- Haciendo el análisis por Chi-cuadrado y Test exacto de Fisher Post-Hoc para variables cualitativas se encuentra correspondencia entre pares de pruebas Examen Clínico-VITEK y Examen Clínico-BIOSPECKLE a un nivel de significancia del 5%. En cuanto a la comparación VITEK-BIOSPECKLE se acepta que no hay correspondencia entre estas dos pruebas. Esto posiblemente se deba al bajo número de muestras.
- Haciendo una comparación paciente por paciente se encuentra una coincidencia entre Examen Clínico-VITEK, Examen Clínico-BIOSPECKLE y VITEK-BIOSPECKLE, de 46%, 53% y 75%, respectivamente. Esto nuevamente sugiere una mayor coincidencia entre Examen Clínico-BIOSPECKLE que entre Examen Clínico-VITEK y una muy buena coincidencia entre VITEK-BIOSPECKLE.

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Finalmente, comparando la susceptibilidad antibiótico por antibiótico en las técnicas de VITEK y BIOSPECKLE, se obtiene un 91% de coincidencia. Sin embargo, este número debe ser tomado con cautela ya que el número de antibióticos que coinciden en dar susceptibilidad en las muestras que son positivas por ambos métodos, es bajo.

www.bdigital.ula.ve

V. Conclusiones

- Tomando en cuenta, el examen clínico como testigo estadístico para el análisis de frecuencia, y la distribución de bernoulli, así como los resultados obtenidos en la comparación de coincidencia paciente por paciente, Vitek-Biospeckle, esta última de 75% podemos afirmar que el biospeckle es capaz de detectar actividad biológica en muestras de orina, en un lapso que eventualmente podría ser de 2 horas.
- Basados, en la comparación de coincidencia paciente por paciente Vitek-Biospeckle y pruebas de sensibilidad antibiótica concordantes entre Vitek-Biospeckle en 91%, es factible decir; que el Biospeckle es capaz de detectar el grado de actividad biológica en muestras de orina con antibiótico. Sin embargo su utilidad, para aportar datos al clínico en las decisiones relacionadas con la terapéutica antibiótica, a pesar de la sensibilidad resultante, debe ser confirmada por otros métodos y estudios con mayor número de muestras, en vista de la población estudiada en este trabajo.
- En relación a la capacidad del biospeckle, para determinar la presencia de bacterias patológicas, debemos indicar que el diseño del estudio, permitió solo evaluar el efecto que tienen los antibióticos en el grado de actividad biológica, sobre los microorganismo presentes en muestras de orina patológicas. Por lo que determinar específicamente el agentes biológicos que puedan causar ITU, no se realiza por esta técnica. Es por ello que el Biospeckle da una indicación de la actividad microbiana global, incluyendo microorganismos cultivables y no cultivables y la susceptibilidad a los antibióticos que se ensayan. Es por ello que, si bien no arroja la identificación del microorganismo, tiene una probabilidad de identificar muestras positivas que es mayor que la de VITEK.
- Debido a estas conclusiones, es posible pensar que la prueba de Biospeckle podría llegar a ser, luego de su debida estandarización, 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

VI. Recomendaciones

Dado que el prototipo del biospeckle es capaz de detectar el efecto de los antibióticos sobre la concentración bacteriana, se recomienda para estudios posteriores:

- Realizar un estudio con un número mayor de muestras con urucultivo positivo así determinar si existe independencia Vitek-Biospeckle y/o correspondencia entre Vitek y Biospeckle. Dado que la muestra en el presente estudio fue insuficiente.
- Determinar las características de los patrones de movimientos de speckle, de los principales patógenos causantes de ITU, con la finalidad de poder comparar estos patrones, con los que se puedan obtener de muestras de orina de pacientes con ITU, y así intentar identificar los microorganismos presentes en dichas muestras utilizando el biospeckle.

www.bdigital.ula.ve

VII. Referencias bibliográficas

1. Rodrigo, E Estudio de las Propiedades de Biospeckle y sus Aplicaciones. Trabajo de grado para obtención título de maestría en ciencias. Instituto de Física de la Universidad de Sao Paulo. (2007)
2. Miquet, E., Martí, L. y Contreras, O. Dos configuraciones diferentes para la descripción temporal de actividad de *Escherichiacoli* mediante speckle dinámico. *Revista Mexicana de Física*, 57, pp. 446-451. (2011)
3. Brooks, G., Butel J, Morse E. MicrobiologíaMedica. Mexico: Mc Grill. (2009).
4. Sandin, D., y Algorta G. *Metodos de Estudios de Bacterias y Virus*. Temas de Bacteriologia y Virulogia medica. 18, pp 81- 97 (2005)
5. García, L. *Evaluación comparativa del ensayo de fármacos desenergizantes sobre Trypansomacruzi usado "biospeckle" 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. (2011).
6. Andrades, Francisco. Diseño, Elaboración y Ejecución para el procesamiento de Imágenes de Biospeckle por el Método Matemático de las Diferencias Temporales. Resultados no publicados. (2011).
7. Lobo, L. *Estrategias para evaluar la actividad biológica de fármacos comerciales sobre Trypansomacruzi*. 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. (2011)

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

8. Belandria, O. *Evaluación comparativa del de la quimiotaxis y el antioiograma con el método "biospeckle" sobre bacterias*. 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.(2011)
9. Díaz, K. y Gallego, K.) *Utilización del sistema dinámico "biospeckle" para medir el efecto de ciprofloxacina sobre Escherichiacoli 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.(2013)
10. Méndez, R. *Procesamiento de Imágenes de Biospeckle*. 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. Tutor Prof. Cristina Grassi, tesis en curso.(2015)
11. Abche, S. *El antibiograma realizado por la técnica de Biospeckle*. 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. Tutor Prof. Cristina Grassi, tesis en curso. (2015)
12. Briceño, M. y Ángel, A. *Detección de la presencia de bacterias por Biospeckle: Métodos de atenuación del láser*. Tesis de Pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.(2013)
13. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina Universidad Autónoma México (2015) [on line]
Disponible en:<http://www.famed.unam.mx>
14. Rondón, M., Rondón, A. y Leonett O.Infección del tracto urinario. Mérida: CODEPRE.(2009).

15. Echeverría J, Sarmiento, E y Osorio F. *Infección del tracto urinario y manejo antibiótico*. Acta Médica Peruana. Volumen 23 n 1. pp. 10-31(2006)
16. Martínez, R. Antibióticos en la práctica clínica. México: Manual Moderno.(2007)
17. Hernández, R. Instrumentos de recolección de Datos en Ciencias Sociales y Ciencias Biomédicas. Mérida: Universidad de Los Andes Consejo de Estudios de Postgrado.(2013).
18. Presentación de microbiología clínica, Chile(2010) [online]
Disponible
en:http://www.sochinf.cl/documentos/presentaciones_microbiologia_cli_2010/03_14_00_Sakurada.pdf
19. Scielo- ScientificElectronicLibrary,Argentina,Actabioquím. clín. latinoam. v.39 n.1 La Plata ene. /mar. (2005) [online] Disponible en:
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572005000100005&script=sci_arttext
20. Biomerieux, Sistema de identificación automática de Microbiología, España (2015) [online] Disponible en:
http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?doc=SPN_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_7

VIII. DEFINICION DE TERMINOS

Análisis de frecuencia acumuladas: Es el numero de n_j acumuladas en la muestra N

Bacteriuria: Se define en el examen de orina a > 20 células x campo en orina centrifugada.

Distribución de Bernoulli: Es una teoría de probabilidad discretas para variable dicotómicas, que mide el numero de éxitos en un único experimento con dos posibles resultados.

NationalCommiteeforclinicallaboratoryStandars: Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI). Organización sin fines de lucro que marca las pautas a seguir en las prácticas de laboratorio aplicadas a la clínica.

Piura: Presencia de pus en la orina

Infección del tracto urinario: Invasión, colonización, y multiplicación de gérmenes en el tracto urinario.

www.bdigital.ula.ve

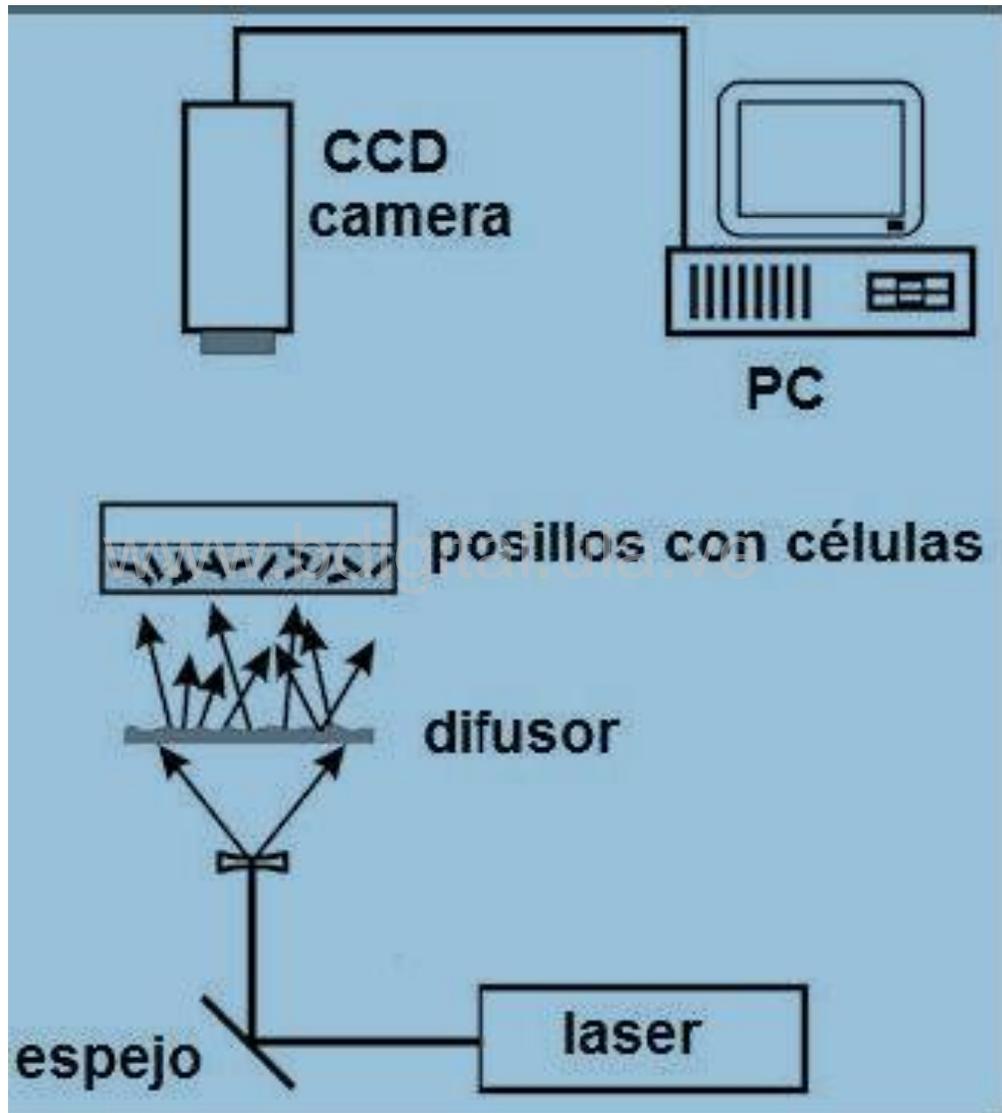
IX. Anexos

www.bdigital.ula.ve

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE

Criterios para el uso de antibióticos durante el estudio

- Se utilizaron los criterios de “Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI2015” (21), Tabla 2A, “Criterios para *Enterobacteriaceas*”.
- Como la técnica de Biospeckle se desarrolla en un lapso de dos horas, se mide Susceptibilidad a un determinado antimicrobiano. No se mide resistencia ya que ésta puede ser el producto de uno o varios pasos del metabolismo o de efectos sobre la pared que se reflejarán en tiempos mayores.
- Se usó el criterio de interpretación contenido en la página 24. En este trabajo nos interesa determinar la condición de SUSCEPTIBLE (no la de RESISTENCIA) por lo que se tomó la concentración requerida para dar una MIC de un organismo susceptible. Sin embargo, se hizo al doble de esa concentración para asegurar el resultado en un tiempo corto (2 horas).
- Por ejemplo, si la sensibilidad se observa a concentración ≤ 4 ug/ml y la resistencia a ≥ 32 ug/ml, utilizamos el dato de ≤ 4 ug/ml que luego se duplicó y se usó 8 ug/ml. Se tomó la decisión de usar la menor concentración debido a la sensibilidad del Biospeckle, y luego se duplicó, pensando en asegurar el resultado en 2 horas de interacción.
- Se tomaron los valores señalados como “S” de la Tabla 2A y se multiplicaron x2 con 10ul de antibiótico + 490 ul orina.
- Se procuró probar la mayor cantidad de antibióticos que coincidieran con los que se utilizan por la técnica de VITEK.
- Los antibióticos utilizados eran de presentación para inyección i.v., constatándose que se contaba con una solución translúcida, sin agregados ni precipitados que pudieran interferir en el desarrollo de la técnica.
- Se utilizó una muestra de orina control que fue la misma para todos los ensayos.



Esquema del sistema experimental Biospeckle dinámico.

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE



www.bdigital.ula.ve

Prototipo de Biospeckle utilizado durante el estudio.

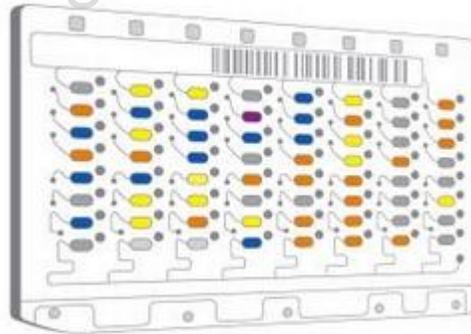
Diseñado y elaborado en el Proyecto de Innovación del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, intitulado: “Producto y proceso para medir el efecto de antibióticos sobre microorganismos en un tiempo corto y utilizando biospeckle” Proyecto No. 2012001862, Responsable: H.C. Grassi

USO PROTOTIPO DE BIOSPECKLE



Equipo de procesamiento
microbiológico Vitek

www.bdigital.ula.ve



Tarjetas del equipo Vitek