

# Propiedades del Bio-Speckle Producido por Muestras de Sangre con Trypanosoma Cruzi

E. ALANÍS, G. ROMERO<sup>1</sup>, C. MARTINEZ, D. HOYOS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA.  
BUENOS AIRES 177, 4400 SALTA.

H. RABAL

CENTRO DE INVESTIGACIONES ÓPTICAS, (CIOP)

CASILLA DE CORREO 124, 1900 LA PLATA.

## Resumen

Se estudian comparativamente las estadísticas de primero y segundo orden, espacial y temporal, de las fluctuaciones de intensidad en el campo de speckle de Fresnel producido cuando se iluminan con un haz láser, respectivamente, muestras de sangre de ratones sanos y de ratones infectados con el parásito de la enfermedad de Chagas (Trypanosoma-Cruzi). Tanto las funciones de autocorrelación como la potencia espectral de las señales producidas por ambos tipos de sangre tienen comportamientos similares. Sin embargo, las experiencias muestran diferencias significativas en el comportamiento estadístico del bio-speckle cuando se comparan la dispersión relativa de las fluctuaciones y las funciones de distribución de probabilidad de la intensidad, lo que en principio permitiría distinguirlas.

## Abstract

Intensity fluctuation of laser speckles, produced by illuminating with laser blood samples of mice, either normal or infected with Trypanosoma Cruzi parasite, are comparatively studied. Time varying properties of the Bio-Speckle produced by both types of blood was investigated from an analysis of the power spectrum and the autocorrelation function, and it was found that they exhibit similar behaviors. However, experimental results show significant differences in the statistic of Bio-Speckle when comparing relative dispersion of the intensity fluctuations and probability distribution of the intensity.

## Introducción:

En nuestro país se estima que hay más de un millón de habitantes infectados con Trypanosoma Cruzi, agente portador de la enfermedad conocida como mal de Chagas. El parásito ingresa al organismo a través del torrente sanguíneo y afecta diversos órganos del individuo lo que puede producir distintos grados de incapacidades.

Se estima que el número de incapacidades laborales causadas por la enfermedad en la Argentina estaría en el orden de los 250.000 entre los actuales o inminentes. Como no existen medidas a corto plazo para solucionar este problema, se considera necesario dirigir esfuerzos tendientes a

lograr soluciones intermedias como la que se propone en el presente trabajo.

En la enfermedad del Chagas, uno de los problemas diagnósticos es la visualización del parásito etiológico. Este es un organismo visible al microscopio y presenta una movilidad notable frente a los glóbulos rojos circundantes, a pesar de lo cuál su detección por este medio resulta difícil dada la baja concentración del parásito, del orden de 100 organismos por *ml* o menor. Debido a la escasa profundidad de campo del microscopio, la visualización del parásito requiere el empleo de una delgada capa de sangre, prácticamente monocelular, lo que implica un volumen reducido, necesiándose en consecuen-

---

<sup>1</sup> Becaria del CONICET

cia una concentración mucho mayor para que esta forma de detección sea practicable. De manera que habitualmente se recurre a otros métodos alternativos, los que requieren efectuar cultivos o incubaciones que demandan un tiempo de alrededor de tres meses.

El objetivo de este trabajo es encontrar un método alternativo a la microscopía óptica tradicional, que permita detectar en forma instantánea la presencia de bajas concentraciones de parásitos en un volumen relativamente grande de sangre.

En un trabajo preliminar <sup>(1)</sup> se analizaron los espectros de Fourier de las señales obtenidas por un fotodetector ubicado en el campo de speckle producido cuando se transilumina con un haz láser una muestra de sangre de ratón extendida sobre un portaobjeto de microscopio. Se hizo un estudio estadístico comparativo, de los espectros correspondientes a muestras de sangre de ratones infectados con el *Trypanosoma Cruzi* y de ratones no infectados, respectivamente. Las muestras de sangre utilizadas entonces, tenían un espesor de unos pocos micrones de manera de permitir la observación microscópica simultáneamente. Por las razones apuntadas anteriormente, se hace necesario investigar las propiedades del speckle en volúmenes mayores (muestra con mayor espesor) a la vez que se reduce la concentración de parásitos.

### Antecedentes

Numerosos trabajos anteriores tratan de caracterizar las fluctuaciones del campo de speckle producido por reflexión en la superficie de distintos especímenes biológicos, como por ejemplo cáscara de vegetales, mucosa gástrica, ocular fundus, etc. Para mayor referencia véase por ejemplo los trabajos de BRIERS, <sup>(2,3,4,5)</sup> y ASAKURA, <sup>(6,7)</sup>. Si bien Briers está interesado, en principio, en los problemas que causa el speckle dinámico en relación a la construcción de hologramas interferenciales de objetos biológicos, parece adecuado el criterio de utilizar la desviación standard relativa de la intensidad, para caracterizar el comportamiento de las muestras de sangre que nos interesan. El caso que nos ocupa es ligeramente distinto, debido al hecho que nos interesa indagar las propiedades de "volumen" y no las de la superficie, de los especímenes. Por ello es necesario

hacer pasar el haz a través de la muestra, lo que plantea problemas adicionales de absorción y disminución del tamaño del grano del speckle, lo que a su vez impone serias condiciones a la potencia del láser y la sensibilidad del fotodetector (FD).

La señal es la salida de un FD ubicado en el campo de speckle, la cual es amplificada y se supone reproduce las fluctuaciones de la intensidad luminosa incidente en el FD, cuya abertura es similar al tamaño de los granos.

### Montaje Experimental

Tal como se ve en la figura 1, una muestra de sangre de ratón, es colocada entre porta y cubre dentro de un volumen cerrado, de espesor  $d = 0,8 \text{ mm}$ . El volumen está cerrado herméticamente para evitar evaporación, movimientos convectivos, etc. Sobre un mismo portaobjetos, se fabrican dos celdas adyacentes para colocar sendas muestras de sangre de ambos tipos, las que alternadamente son monitoreadas para asegurar la mayor similitud en las condiciones externas e internas (esto último referido al tiempo de extracción de las muestras de sangre de los animalitos). Un haz láser, concentrado por un objetivo de 10X, ilumina la muestra desde abajo, y se regula su distancia a los efectos de obtener un tamaño de grano adecuado.

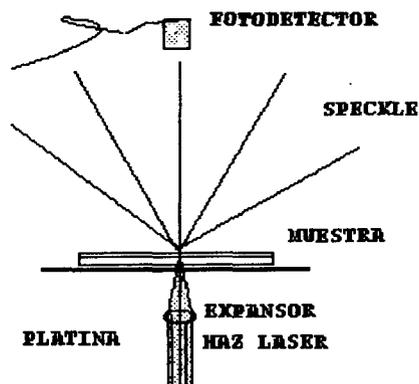


Figura 1. Dispositivo experimental.

El diámetro del haz a la entrada de la celda es  $\phi_1 \sim 0,02 \text{ mm}$ , en tanto que a la salida de ella es de  $\phi_2 \sim 0,2 \text{ mm}$ , de manera que el volumen de sangre iluminado que contribuye a la formación del speckle es de orden de  $10^{-2} \text{ mm}^3$ . En dicho volumen y teniendo en cuenta la concentración de parásitos que contiene la sangre provista por el

Laboratorio de Patología Experimental, (~1.600.000 parásitos por *ml*) existe un promedio de unos 20 *Trypanosoma Cruzi*, mientras que el número de glóbulos rojos es del orden de los 50.000.

El FD se coloca a unos 70 *cm* de la muestra, montado en un sistema que permite eventualmente variar el ángulo entre 0 (dirección del haz de iluminación) y 90 grados. Finalmente, las muestras se colocan sobre una platina móvil (*x,y,z*), con el objeto de obtener registros de ambos tipos de sangre en forma alternada, asegurando igualdad de condiciones para ambas, y permite variar la zona de las muestras iluminadas por el haz incidente.

La señal es enviada a la computadora donde es digitalizada para su procesamiento, a la vez que es monitoreada con un osciloscopio en paralelo.

### Procedimiento.

La frecuencia de toma de datos se fijó en 20 *Hz*, y el número de datos en 500, lo que hace a un tiempo de toma de 25 segundos (duración de la señal). Estos parámetros parecen adecuados a la frecuencia de las fluctuaciones, dado que la FFT tiende a cero más allá de los 10 *Hz*. Una señal típica y su espectro de Fourier se muestran en la figura 2.

Se coloca la muestra en el dispositivo y luego de un tiempo de reposo se inicia la toma de datos. Se realizan cinco registros sucesivos, para cada tipo de sangre, manteniendo las condiciones invariadas.

Esto se repite a intervalos de 30 a 60 minutos, durante varias horas, totalizando un conjunto de 50 a 90 archivos de señal. De cada archivo de señal se calculan su valor medio ( $\langle I \rangle$ ) y la desviación standard ( $\sigma$ ), como así también su función de autocorrelación, y la potencia espectral. El campo de speckle revela a simple vista una estructura *fija* (o cuasi estacionaria), y una intensidad de fondo fluctuante. Por lo tanto, los parámetros de la señal de salida del FD, dependen de su ubicación respecto del speckle *fijo*.

En consecuencia, tanto la intensidad media de la señal como su dispersión ( $\sigma$ ) dependerán del lugar que ocupe el FD en el campo.

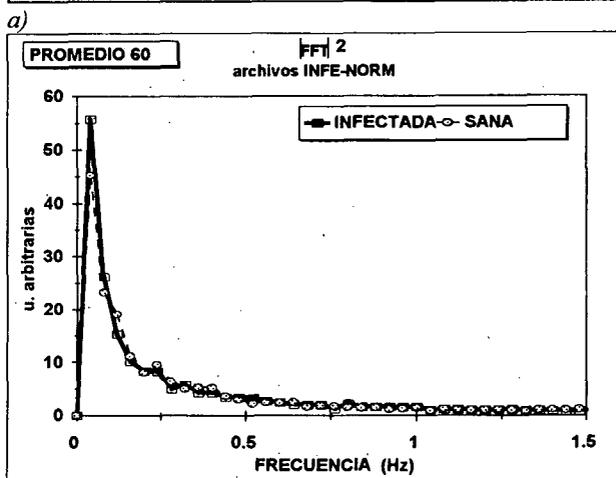
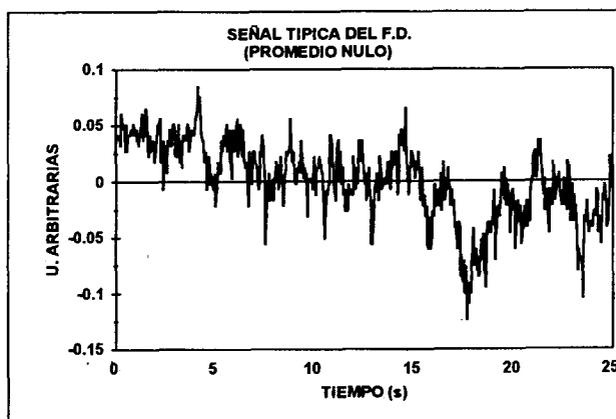


Figura 2: a) Señal típica y b) su espectro

## Resultados Experimentales.

### Análisis temporal

En las figuras 3 y 4 se muestran las variaciones de  $\sigma$ , en función de la intensidad promedio ( $\langle I \rangle$ )

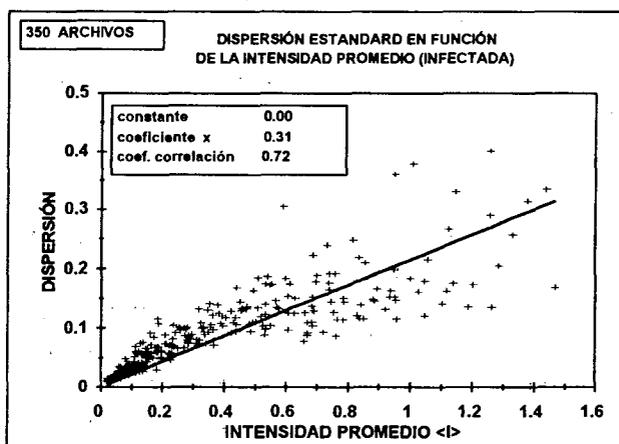


Figura 3: Dispersión vs. intensidad promedio (sangre infectada).

correspondientes a varias experiencias realizadas en distintas oportunidades, con muestras de sangre infectada y sana respectivamente. Es dable observar, en el gráfico correspondiente a sangre sana, (figura 4) que los puntos están casi alineados, de forma que el cociente de Briers,  $\sigma / \langle I \rangle$ , es cuasi constante. Es decir cuanto mayor es la intensidad promedio del speckle, proporcionalmente mayor es la dispersión. Los resultados correspondientes a muestras de sangre infectada indican un comportamiento ligeramente diferente, en el sentido de que se observa una menor correlación entre la dispersión de las fluctuaciones y la intensidad promedio. Para ilustrar este hecho se dibujan en los mismos gráficos las rectas de regresión lineal y el cuadro de estadística correspondiente, sin que ello implique establecer una correlación entre las variables.

El gráfico de la figura 5 muestra la distribución de los cocientes  $\sigma / \langle I \rangle$ , correspondientes a las mismas experiencias, donde se aprecia de otra manera lo observado anteriormente.

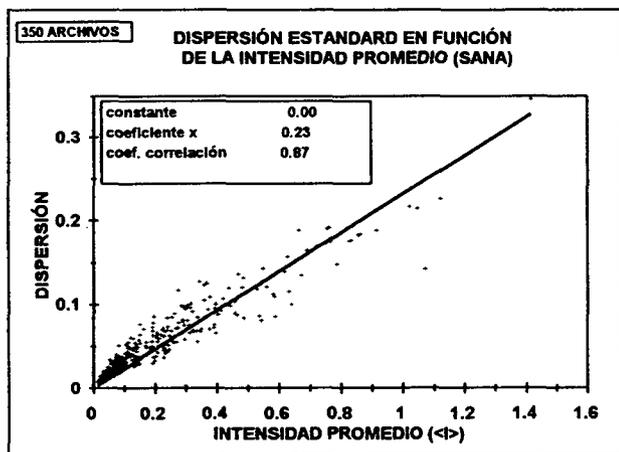


Figura 4: Dispersión vs. intensidad promedio (sangre sana)

### Análisis Espacial

En esta serie de experiencias se procede con una ligera variante respecto de los casos anteriores. Se registran 40 archivos de señal provenientes del mismo lugar de la muestra, pero variando la posición del FD. en el campo de speckle, con el fin de estudiar la estadística espacial del patrón.

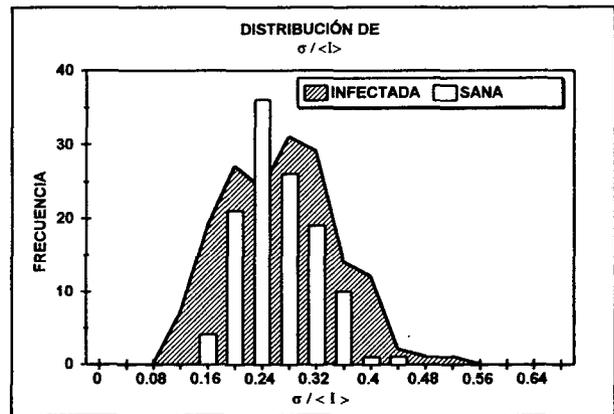


Figura 5: Distribución de los cocientes  $\sigma / \langle I \rangle$

En la figura 6, se muestran los resultados correspondientes a sangre sana e infectada respectivamente y se observa la misma tendencia apuntada anteriormente.

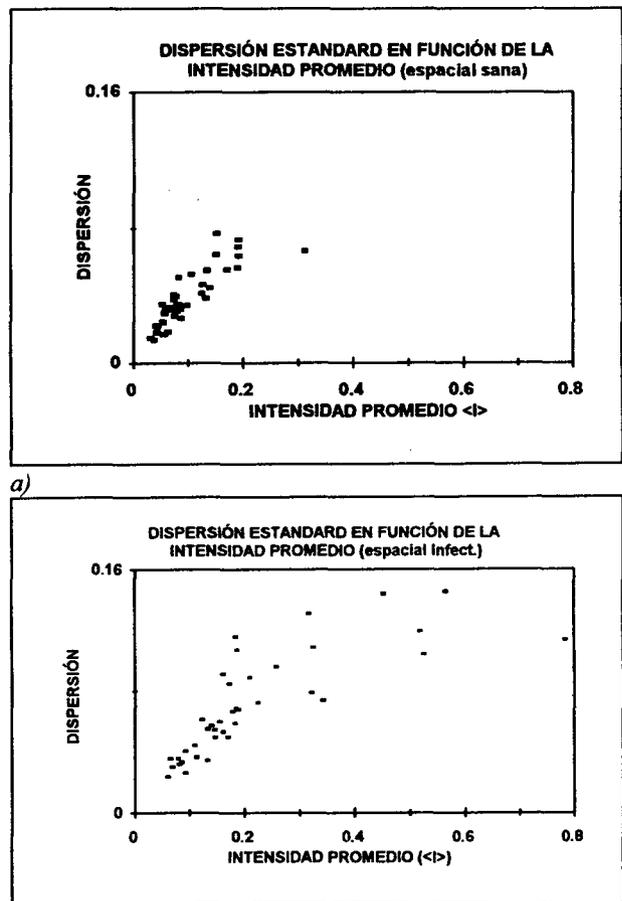


Figura 6 : a) Dispersión estándar de la intensidad promedio espacial, sangre sana y b) Dispersión estándar de la intensidad promedio espacial, sangre infectada.

## Distribución de Probabilidad

En la figura 7 se muestra la probabilidad  $P(I/\langle I \rangle)$ , en función de  $I/\langle I \rangle$ , donde se comparan los resultados totales de varias experiencias obtenidos con ambos tipos de muestras de sangre. La diferencia que se observa en las distribuciones de probabilidad para ambos tipos, se manifiesta también en las curvas obtenidas para las experiencias individuales.

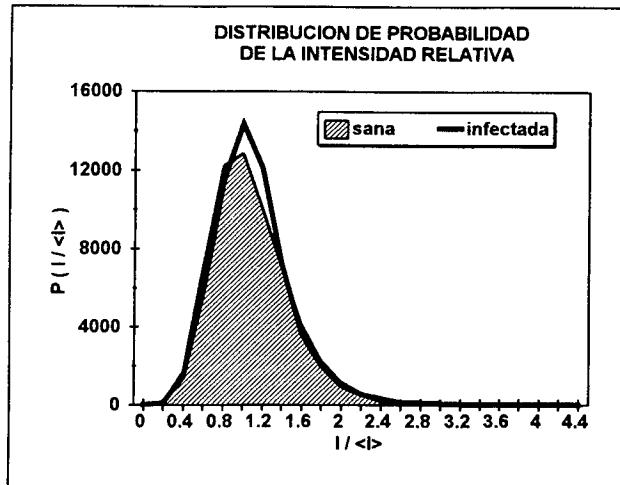


Figura 7: Distribución de probabilidad de la intensidad relativa.

## Autocorrelación

La autocorrelación de cada señal se calculó mediante la siguiente expresión, aplicando un programa en Qbasic:

$$A(kT) = \sum_{i=0}^{499} I(iT) \times I[(k+i)T] = A(t)$$

donde  $T$  es la inversa de la frecuencia de muestreo, y  $t$  el tiempo. El tiempo de correlación  $t_c$ , se definió como el correspondiente a la altura 0,5 de la función de autocorrelación normalizada. Los resultados para cuatro de las experiencias anteriores se muestran en la figura 8, donde se graficaron los histogramas de  $t_c$  para ambos tipos de muestras (sana e infectada). Se observa una pequeña diferencia en la distribución de tiempos de autocorrelación, indicando que las señales provenientes de sangre infectada se decorrelacionan en general antes que las correspondientes a sangre sana.

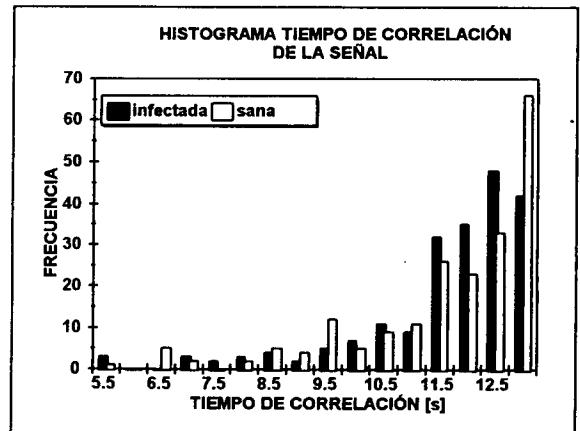


Figura 8: Histograma de tiempos de correlación sangre sana e infectada.

## Comentarios:

Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de Trypanosomas en el campo iluminado se manifiesta en una ligera dispersión de los valores de  $\sigma / \langle I \rangle$ , con respecto a la sangre sana. Por otra parte las señales producidas se decorrelacionan en un tiempo menor. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la contribución de los glóbulos rojos es significativa debido a su gran número, por lo que sería necesario atenuarla. En este sentido se prevé realizar nuevas experiencias disminuyendo la temperatura de las muestras.

## Agradecimientos

Al Dr. Miguel Ángel Basombrio, director del Laboratorio de Patología Experimental (UNSa-CONICET) y a su personal, por la valiosa colaboración en la preparación de muestras y asesoramiento.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Consejo de Investigación y Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Salta.
- CONICET PID N° 3579/93

## Referencias

1. Alanís, E. - Romero, G. - Rabal, H. y otros. --Anales AFA 1991. p 459-461
2. Briers, J. D. -Optical Engineering, Feb.1993, vol 32, n°2, p 277
3. Briers, J.D. -Journal of Experimental Botany, vol. 29, n° 109, pp395-399, april 1978.
4. Briers, J. D. - Optics Communications, Vol 13, n° 3, march 1975
5. Briers, J. D. -Short Communication-Optical and Quantum Electronics, 10 (1978)
6. Aizu, Y. Asakura, T. -Optics and Laser Technology, Vol. 23, n° 4, 1991.
7. Blood Flow Observed by Time -Varying laser Speckle. Fujii, H. Asakura, T. -Opt Lett, 10 (1985), pp 104-106.