

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

BRUNO RODRIGUEZ TONDIN

**PROTÓTIPO DE DISPOSITIVO
AUTOMATIZADO PARA LEITURA
DO TESTE DE ANTIBIOGRAMA
POR DISCO-DIFUSÃO**

Porto Alegre
2022

BRUNO RODRIGUEZ TONDIN

**PROTÓTIPO DE DISPOSITIVO
AUTOMATIZADO PARA LEITURA
DO TESTE DE ANTIBIOGRAMA
POR DISCO-DIFUSÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.
Área de concentração: Controle e Automação

ORIENTADOR: Prof. Dr. Altamiro Amadeu Susin

Porto Alegre
2022

BRUNO RODRIGUEZ TONDIN

**PROTÓTIPO DE DISPOSITIVO
AUTOMATIZADO PARA LEITURA
DO TESTE DE ANTIBIOGRAMA
POR DISCO-DIFUSÃO**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: _____
Prof. Dr. Altamiro Amadeu Susin, UFRGS
Doutor pela Institut National Polytechnique de Grenoble
– Grenoble, França

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leticia Vieira Guimarães, UERGS
Doutora pela Muroran Institute of Technology – Muroran, Japão

Prof. Dr. Tiago Roberto Balen, UFRGS
Doutor pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre,
Brasil

Prof. Dr. Valner João Brusamarello, UFRGS
Doutor pela Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, Brasil

Coordenador do PPGEE: _____
Prof. Dr. Sérgio Luís Haffner.

Porto Alegre, março de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Magali Dias Rodriguez e ao meu pai Gilmar Tondin pelo suporte incondicional durante a jornada para conclusão desta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Altamiro Amadeu Susin pela contribuição e principalmente pela paciência no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial à Géssyca, que foram compreensivos quando o dever não permitia nossos encontros.

Aos colegas do Serviço de Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, principalmente os engenheiros André Müller, Danton Júnior, Paulo Sanches e Paulo Thomé, por todo o conhecimento e experiência transmitida não só nos temas acadêmicos.

Aos colegas Eliezer Bernart, Paul Atauchi, Bruno Cappellari e Xander Pinzas, que estão a dar prosseguimento ao trabalho realizado nesta dissertação de forma a torná-lo um produto final.

Aos colegas do Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS), em especial o Afonso Barth, a Amanda Martins e a Priscila Wink, pela grande contribuição na área de farmacologia e microbiologia, além do trabalho árduo de medirem manualmente as 53 placas de antibiograma utilizadas neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica pela confiança e oportunidade. Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por proporcionar o ambiente necessário para execução deste trabalho e à CAPES por fornecer a bolsa de pesquisa durante grande parte do tempo do meu período de pós-graduação.

RESUMO

O antibiograma por disco-difusão é uma das técnicas mais utilizadas para determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana. Consiste na difusão de diferentes agentes antimicrobianos na superfície de uma placa de Petri contendo a sementeira de uma bactéria, formando-se halos de inibição com diâmetros proporcionais a eficácia de cada agente. Devido ao rápido aumento da resistência bacteriana em âmbito mundial, é importante a rápida e correta identificação da bactéria e seu perfil nos laboratórios de microbiologia de clínicas e hospitais. Em laboratório sem recursos tecnológicos, estas medidas são tomadas manualmente utilizando régua ou paquímetro. É um método lento e tedioso, além de aumentar a chance de erros. Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um protótipo de um sistema automatizado para medição das zonas de inibição formadas nos testes de antibiograma por disco-difusão. Este sistema consiste em um aparato para aquisição das imagens das placas de Petri e um software para estimação dos diâmetros dos halos formados. O algoritmo proposto pré-processa a imagem, realçando seu contraste através da equalização por histograma e suavizando por meio de um filtro gaussiano. Mediante o uso da transformada de Hough circular, a posição central de cada halo de inibição é encontrada e por meio de um algoritmo de análise de perfil radial e clusterização, os diâmetros são estimados. Imagens de 49 placas, com uma média de 11 zonas de inibição cada, foram coletadas e o resultado encontrado pelo sistema com o algoritmo foi comparado aos obtidos com o equipamento comercial de referência Osiris[®] (este com correção manual das medidas pelo operador). O algoritmo proposto identificou corretamente as posições nas imagens de todos os 564 halos analisados. O coeficiente de correlação de Pearson entre as medidas de ambos os sistemas foi de 0,8893. Já o coeficiente Kappa de Cohen foi de 0,7799 e a concordância total foi de 89,68%. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA sob o número 170587.

Palavras-chave: Processamento de imagem, Visão computacional, Transformada de Hough, Antibiograma, Método de disco-difusão.

ABSTRACT

The disk diffusion method is still one of the most frequently used method to determine the antibiotic susceptibility profiles of pathogens. It consists of the diffusion of different antimicrobial agents on the surface of a Petri dish containing the seeding of a bacterium, forming inhibition halos with diameters proportional to the effectiveness of each agent. Due to the rapid rise in antimicrobial resistance worldwide it is important the rapid identification of their resistance profile in the microbiology laboratory routine. In laboratories without technological facilities such measurement is done manually using a ruler or a caliper. This method is time consuming and increases the chances of error. The aim of this study was the development of a system for the measurement of the growth inhibition zone diameter in the antibiogram disk diffusion method. The system consists of an apparatus for plate images acquisition and a software for estimation of the inhibition zone diameters. The proposed algorithm preprocesses the acquired image and improves its contrast by means of histogram equalizing and smoothing by a Gaussian filter. Using the Hough transform method, the central position of each inhibition zone is identified and through a radial profile analysis and clustering algorithm, the diameters are estimated. Images of 49 plates containing an average of 11 inhibition zones were acquired and the result of the algorithm was compared with the results obtained by the commercial equipment Osiris[®] (this with correction of the measurements by the operator). The proposed algorithm correctly identified the position of the 564 inhibition zones in 100% of the images. The Pearson correlation coefficient between the measurements of the inhibition zones diameters by the proposed algorithm and Osiris[®] was 0.8893. The Cohen's kappa coefficient between Osiris[®] and the proposed method was 0.7799 and the concordance between methods was 89.68%.

Keywords: Image processing, Computer vision, Hough transform, Antibiogram, Disc diffusion method.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Linha do tempo do desenvolvimento de resistência a antimicrobianos.	17
Figura 2 –	Placa de Petri de um teste de suscetibilidade por antibiograma. Note que o crescimento bacteriano (em amarelo) é inibido na região próxima aos discos de antibióticos.	18
Figura 3 –	Tabela que estabelece as faixas de sensibilidade para determinados antibióticos da bactéria do grupo <i>Acinetobacter</i> spp.	19
Figura 4 –	Métodos manuais para obtenção dos diâmetros dos halos de inibição.	20
Figura 5 –	Equipamentos comerciais para testes de antibiogramas por disco difusão. A) Bio-Rad ADAGIO™. B) Giles Scientific USA BIOMIC V™. C) Bio-Rad Osiris®. D) i2a Diagnostics SIRscan 2000™.	21
Figura 6 –	Representação de uma imagem digital e o conceito de <i>pixel</i>	24
Figura 7 –	Representação de pixels de borda (pontos) que compõe as bordas de uma certa imagem.	26
Figura 8 –	Ilustração do traçado das linhas auxiliares que cruzam cada um dos pontos que representam os pixels de borda da imagem	27
Figura 9 –	Exemplo da parametrização das linhas auxiliares que cruzam os pontos da imagem. Para cada uma são obtidos os valores de r e θ (os valores apresentados são aproximados)	27
Figura 10 –	Na esquerda, o Espaço de Imagem com os pontos que representam as bordas da imagem de forma simplificada. Na direita, Espaço de Hough correspondente com os votos dos acumuladores.	28
Figura 11 –	Um círculo de raio R é gerado no espaço de parâmetros (direita) para cada ponto elegível na imagem (esquerda). Estes círculos gerados se interceptam no ponto (a, b) , que é o centro do círculo existente na imagem.	29
Figura 12 –	Cone gerado no espaço de parâmetros relativo a um único ponto elegível na imagem. Um dos seus eixos representa os raios possíveis de serem encontrados na imagem.	29
Figura 13 –	Exemplo de placa de Petri utilizada no trabalho original de RPAA.	

Figura 14 – a) Ilustração do traçado dos 8 raios do algoritmo proposto por HEJBLUM <i>et al.</i> (1993) sobre uma figura de halo. b) Perfil resultante da média aritmética entre os pixels adquiridos nos 8 diferentes ângulos, onde 1 representa a média de intensidade de cinzas na região do disco de antibiótico, 2 a média das intensidades da zona que corresponde ao halo e 3 representa a média de intensidade da região fora do halo.	31
Figura 15 – Exemplo dos 3 casos que podem surgir ao realizar o perfil radial do halo. Percebe-se que em "a", o gráfico assume o formato de "U", quando há um halo bem definido. Em "b" o tipo "L" com halo de inibição maior que 35mm de diâmetro. Em "c" também ocorre o tipo "L", porém devido ao fato de não ocorrer halo de inibição a intensidade de cinza é alta.	32
Figura 16 – Fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho.	34
Figura 17 – Bio-Rad Osiris [®] utilizado nas rotinas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.	36
Figura 18 – A) Visão geral do equipamento montado. B) Extremidade inferior com os suportes para a fita de LEDs. C) Máscara para evitar ofuscamento da câmera. D) Imãs que auxiliam no correto posicionamento da gaveta.	37
Figura 19 – Gaveta desenvolvida utilizando impressão 3D. Sobre ela são posicionadas as placas de Petri para leitura.	38
Figura 20 – Ilustração do posicionamento relativo entre a guia da gaveta, a gaveta e o suporte dos LEDs de iluminação.	39
Figura 21 – Diagrama de blocos com as etapas existentes no algoritmo desenvolvido neste trabalho.	40
Figura 22 – a) Tela da interface gráfica do Osiris [®] onde os resultados da placa são apresentados. b) Etiqueta de identificação de paciente/prontuário vista por baixo da placa. c) Tabela onde foram armazenados manualmente os dados gerados pelo Osiris [®] e pelas medidas utilizando régua.	41
Figura 23 – Na esquerda: captura da imagem com tempo de exposição alto. Na direita: captura da imagem com tempo de exposição baixo. Ambas possuem resolução de 2304 x 1536 pixels.	42
Figura 24 – Na esquerda: captura da imagem com alto tempo de exposição. Na direita: captura da imagem com baixo tempo de exposição. Imagens foram cortadas a fim de realçar a região de interesse e suas escalas de cores foram convertidas de RGB para GS.	43
Figura 25 – Suavização da imagem com baixo tempo de exposição utilizando filtro gaussiano.	44
Figura 26 – Detecção de bordas na imagem com baixo tempo de exposição utilizando método de Canny.	44
Figura 27 – Na esquerda: imagem em alto tempo de exposição original. Na direita: imagem em alto tempo de exposição com aplicação de método do filtro gaussiano para minimizar o ruído.	45
Figura 28 – Exemplo da detecção das posições dos círculos na imagem em baixo tempo de exposição.	46

Figura 29 – Apresentação de forma ilustrada da máscara aplicada. Os pixels em vermelho são valores fora do padrão de intensidade de nível de cinza em 8 bits.	47
Figura 30 – Representação do kernel do filtro utilizado para identificação da posição da etiqueta na imagem.	48
Figura 31 – Representação do fatiamento do resultado da convolução entre a imagem da placa de antibiograma e o kernel em 6 ângulos diferentes. Nota-se que o máximo (destacado na seta vermelha) se encontra no plano referente ao kernel que "mais se alinha" à etiqueta na imagem da placa de Petri.	48
Figura 32 – Os pixels em vermelho representam aqueles que serão desconsiderados nas próximas etapas do processo.	49
Figura 33 – Exemplo de recorte da imagem em segmentos para avaliação de cada halo de forma independente.	50
Figura 34 – Ilustração do processo de transformação da imagem do halo de inibição em um perfil radial de intensidades que representa este halo. Note que os pixels em vermelho, que representam a etiqueta e a borda da placa de Petri, são desconsiderados.	51
Figura 35 – Relação entre os halos e os perfis gerados para cada um deles e um dada placa de Petri.	52
Figura 36 – Perfis dos halos de inibição após aplicação de filtro e da remoção da porção compreendida pelo disco de antibiótico.	53
Figura 37 – Gráfico da derivada segunda do vetor de média. O máximo encontrado está realçado em vermelho.	54
Figura 38 – Exemplo do comportamento do perfil quando não há halo de inibição (cima), ou quando este é muito grande (baixo). Estes perfis assumem o chamado tipo "L".	55
Figura 39 – Ilustração do agrupamento por <i>k-means</i> . Onde os agrupamentos acabam por representar, na maior parte das vezes, a região de inibição, a transição e a região de crescimento bacteriano.	56
Figura 40 – Tabela implementada a partir das regras do CLSI para a família Enterobacteriaceae. Cada linha apresenta os limiares de interpretação qualitativa correspondentes a cada antibiótico utilizado.	59
Figura 41 – Histograma das diferenças dos diâmetros medidos, em milímetros, entre a referência e o MM.	64
Figura 42 – Histograma das diferenças dos diâmetros medidos, em milímetros, entre a referência e o IRPAA.	65
Figura 43 – Histograma das diferenças dos diâmetros medidos, em milímetros, entre a referência e o algoritmo desenvolvido.	65
Figura 44 – Correlação linear entre as medidas da referência e o método manual. A ocorrência dos erros (Em, EM e EMM) é destacada em diferentes cores.	67
Figura 45 – Correlação linear entre as medidas da referência e a implementação do RPAA. A ocorrência dos erros (Em, EM e EMM) é destacada em diferentes cores.	67
Figura 46 – Correlação linear entre as medidas da referência e o algoritmo desenvolvido. A ocorrência dos erros (Em, EM e EMM) é destacada em diferentes cores.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tabela com a relação de agentes antimicrobianos utilizados, suas massas e contagem de usos.	58
Tabela 2 –	Tabela com a relação dos isolados de bactérias encontrados no decorrer dos testes.	60
Tabela 3 –	Relação entre índice Kappa e grau de acordo.	63
Tabela 4 –	Tabela que apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre as medidas de referência (REF) e os demais métodos.	64
Tabela 5 –	Tabela que apresenta os índices de concordância Kappa entre a avaliação qualitativa das medidas de referência (REF) e os demais métodos.	66
Tabela 6 –	Tabela que apresenta os percentuais de ocorrências dos Erros Menores, Maiores e Muito Maiores.	66
Tabela 7 –	Valores de correlação de Pearson, índice Kappa, concordância, erro muito maior e erro maior para métodos de outros autores.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Algoritmo Desenvolvido
AST	<i>Antibiotic Susceptibility Testing</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BrCAST	<i>Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
BSAC	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>
CHT	<i>Circular Hough Transform</i>
CLAHE	<i>Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CO	Concordância Observada
CRT	<i>Cathode Ray Tube</i>
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
EC	Equipamento Comercial
EM	Erros Maiores
Em	Erros Menores
EMM	Erros Muito Maiores
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
INCT	Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
INPRA	Instituto Nacional de Pesquisas em Resistência a Antimicrobianos
LABRESIS	Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana
MDGs	<i>Millennium Development Goals</i>
CIM	<i>Concentração Inibitória Mínima</i>
MM	Método Manual
PDR	Bactéria Pan-resistente

IRPAA	Implementação do RPAA original feita pelo autor
RPAA	<i>Radial Profile Analysis Algorithm</i>
XDR	Bactéria Extensivamente Resistente

LISTA DE SÍMBOLOS

- ρ Coeficiente de correlação de Pearson
- κ Coeficiente de concordância Kappa
- σ Desvio Padrão
- μ Média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Motivação	20
1.2	Objetivo	22
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	As Imagens Digitais	23
2.2	Detecção de bordas pelo método de Canny	24
2.3	Transformada de Hough e Transformada de Hough Circular	25
2.4	RPAA (<i>Radial Profile Analysis Algorithm</i>)	29
3	METODOLOGIA	34
3.1	Equipamentos Utilizados	35
3.2	Aparato desenvolvido	35
3.3	Software proposto	38
3.3.1	Captura das Imagens	39
3.3.2	Pré-processamento da imagem com baixo tempo de exposição	42
3.3.3	Pré-processamento da imagem com alto tempo de exposição	43
3.3.4	Localização das posições dos centros dos halos de inibição	45
3.3.5	Identificação das regiões de avaliação	46
3.3.6	Identificação das regiões compreendidas pela etiqueta de identificação	47
3.3.7	Individualização das imagens dos halos	49
3.3.8	Geração das curvas dos perfis radiais para cada halo de inibição	49
3.3.9	Estimação dos diâmetros dos halos de inibição	50
3.3.10	Identificação dos halos do tipo “L”	53
3.4	Obtenção dos dados utilizados	56
4	EXPERIMENTOS E RESULTADOS	61
4.1	Localização das posições dos centros dos halos de inibição	61
4.2	Identificação das regiões compreendidas pela etiqueta de identificação	62
4.3	Estimação dos diâmetros dos halos de inibição	62
4.3.1	Análise por histogramas	63
4.3.2	Avaliação da correlação entre os métodos	64
4.3.3	Avaliação da concordância entre os métodos	66
4.3.4	Avaliação de ocorrência de erros menores, maiores e muito maiores	66
5	CONCLUSÃO	70

REFERÊNCIAS	73
-----------------------	----

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas representam um número expressivo nas causas de mortes em todo o mundo e, de forma mais acentuada, em países em desenvolvimento. Apesar dos esforços por parte de governos e ONGs e das diretrizes do MDGs (Millennium Development Goals) desde o ano 2000, a diminuição do número de mortes causadas por doenças infecciosas baixou apenas 1 milhão por ano entre 1990 e 2010 (DYE, 2014). As mortes oriundas de bactérias resistentes são de aproximadamente 50 mil por ano apenas na Europa e Estados Unidos da América (COSTA, 2016).

Desde antes do emprego assistencial do primeiro antibiótico desenvolvido, a penicilina, foi verificada a ocorrência de resistência bacteriana relacionada ao uso deste fármaco, de forma que o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos é um efeito inerente à existência dos agentes antimicrobianos (FINLAND, 1955) (Figura 1). Pode-se notar que o período necessário para a ocorrência deste fenômeno é extremamente curto para determinadas drogas, mostrando uma grande capacidade de adaptação por parte dos microrganismos (PATERSON; BONOMO, 2005).

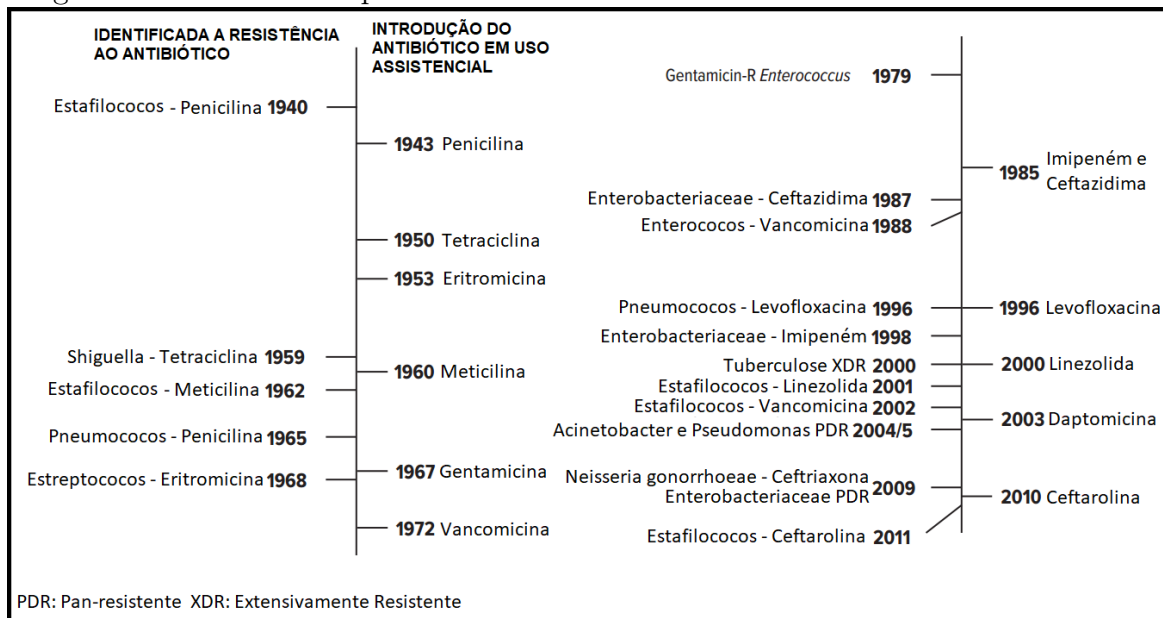
”Sem ações urgentes estaremos indo para uma era pós-antibiótico, em que infecções comuns e ferimentos leves podem mais uma vez matar”

(World Health Organization and others, 2014, tradução nossa).

Décadas após os primeiros pacientes infectados serem tratados com antibióticos, as infecções bacterianas tornaram-se novamente uma ameaça (SPELLBERG; GILBERT, 2014). Em alguns países, 33% dos usos de antibióticos são feitos sem receita médica. No entanto, quando isso não ocorre, muitas vezes esta prescrição é feita de forma equivocada. Isso pode ser atribuído a fatores como a expectativa do paciente em receber um tratamento eficaz, enxugamento do tempo de consultas para redução de custos por parte dos planos de saúde, pressão da indústria farmacêutica para vender remédios mais modernos e caros e o ceticismo, por parte do profissional da saúde, de que a indução à resistência bacteriana é um risco real. Percebe-se então a fundamental importância do uso racional dos agentes antimicrobianos, necessário

para redução do nível de mortalidade causada por bactérias com tratamentos cada vez mais complexos (ZIMERMAN, 2010).

Figura 1 – Linha do tempo do desenvolvimento de resistência a antimicrobianos.



Fonte: Adaptado de VENTOLA (2015)

Determinar o perfil de suscetibilidade bacteriana é de importância clínica pois, além de guiar as decisões no tratamento de doenças infecciosas, permite traçar a evolução e epidemiologia da resistência microbiana (JENKINS; SCHUETZ, 2012). Estes perfis são levantados utilizando os ASTs (Antibiotic Susceptibility Testings), também chamados de antibiogramas. Estes métodos permitem prever quais agentes, em determinadas concentrações, serão mais eficazes no tratamento de uma infecção, pois a bactéria reage de formas distintas dependendo do fármaco utilizado. Em geral esta avaliação é apenas preditiva pois não se pode garantir que a reação seja idêntica *in vitro* e no do organismo a ser tratado (BAUER *et al.*, 1966).

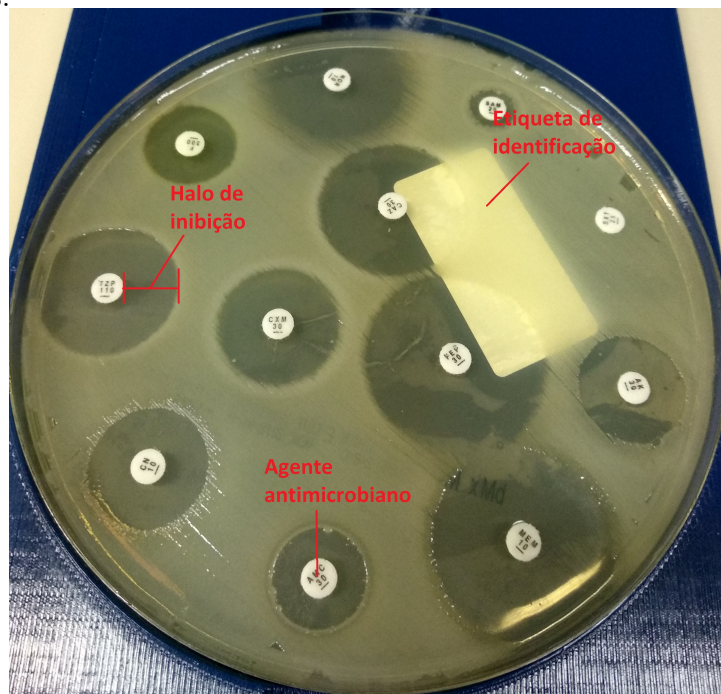
Diversos são os métodos existentes para a determinação do perfil de suscetibilidade de uma bactéria, sendo os mais conhecidos os métodos de diluição, que permite determinar o CIM (Concentração Inibitória Mínima) e métodos de disco-difusão, que geram um resultado dependente do diâmetro da zona de inibição (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Também pode-se categorizar os métodos como sendo de referência genérica, onde o processo é descrito e padronizado por organizações (como CLSI, EUCAST, BrCAST e BSAC) e seus insumos podem ser obtidos por diversos fornecedores, e métodos comerciais, que dependem de fabricantes específicos (PATEL *et al.*, 2011).

Por ser um método de baixo custo, simples e permitir testar um variado número de antibióticos, o antibiograma por disco-difusão é o método mais utilizado em laboratórios de microbiologia dos hospitais de todo o mundo (NIJS *et al.*, 2003).

Consiste em coletar uma amostra de sangue, urina, saliva ou tecido do paciente e isolar a bactéria de interesse. Deve-se permitir que esta bactéria isolada se desenvolva para que possa ser posteriormente aplicada, através da técnica de *swab*, na superfície do agar de Mueller-Hinton, substrato nutritivo que favorece o crescimento das bactérias, contido na placa de Petri onde será realizado o teste. Após a inoculação das bactérias, são posicionados discos de papel filtro impregnados com uma concentração conhecida de agente antimicrobiano sobre a placa de Petri (HUDZICKI, 2009).

Uma das vantagens desta técnica é a total flexibilidade para escolher os agentes que serão utilizados no teste. Quando a umidade contida na placa é absorvida pelos discos, ocorre a difusão do antibiótico pela placa de forma que a concentração do mesmo é inversamente proporcional a distância ao quadrado do centro do disco (PATEL *et al.*, 2011). Desta forma, o crescimento bacteriano ocorrerá apenas onde a concentração do agente não é suficiente para inibi-lo. A placa de Petri é colocada em uma incubadora a aproximadamente 35°C e após 18 horas terá a aparência vista na Figura 2.

Figura 2 – Placa de Petri de um teste de suscetibilidade por antibiograma. Note que o crescimento bacteriano (em amarelo) é inibido na região próxima aos discos de antibióticos.



Fonte: Autoria Própria

Nota-se que onde o crescimento foi inibido, formou-se um halo de inibição. Seu diâmetro determinará se o microrganismo é resistente, pouco resistente (intermediário) ou sensível ao agente testado.

Por se tratar de um teste *in vitro*, nem sempre o resultado reflete a exata efetividade do agente no tratamento do paciente, portanto em alguns casos é necessário considerar efeitos relacionados à farmacocinética (RODLOFF *et al.*, 2008). Para fins de simplificação as faixas de sensibilidade (Sensível, Intermediário e Resistente) são descritas por (ISO 20776-1, 2006):

- **Sensível:** Uma bactéria é dita sensível a um antibiótico quando este a inibe no teste *in vitro* com uma concentração associada a uma alta taxa de sucesso no tratamento do paciente.
- **Intermediário:** Uma bactéria é dita com sensibilidade intermediária a um antibiótico quando este a inibe no teste *in vitro* com uma concentração associada a uma taxa incerta de sucesso no tratamento do paciente.
- **Resistente:** Uma bactéria é dita resistente a um antibiótico quando este a inibe no teste *in vitro* com uma concentração associada a uma alta probabilidade de fracasso no tratamento do paciente.

Os diâmetros dos pontos de cortes, as normas de padronização dos procedimentos clínicos, controle de qualidade e concentrações padrões para os testes são definidos pelos órgãos *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)*, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST)*. O CLSI é o padrão utilizado neste trabalho pois foi o adotado nas rotinas de análises clínicas do HCPA durante a coleta de dados. No entanto, conforme a portaria N° 64 de de 11 de dezembro de 2018, o padrão BrCAST deve ser aderido em todos os laboratórios da rede privada e pública no Brasil, para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (PORTARIA n° 64, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2018., 2018). Um exemplo de padrões para as faixas de sensibilidade no padrão CSLI é mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Tabela que estabelece as faixas de sensibilidade para determinados antibióticos da bactéria do grupo *Acinetobacter spp.*

Tabela 2B-2. *Acinetobacter spp.* (Continua)

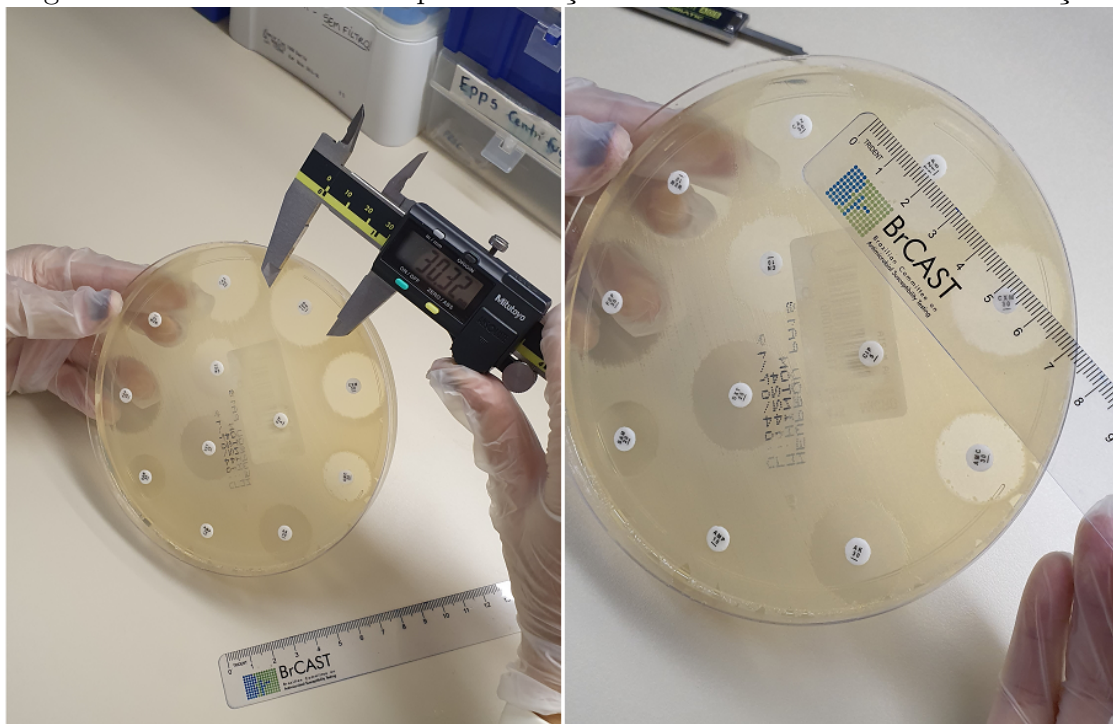
Grupo de Teste/Relatório	Agente Antimicrobiano	Conteúdo do Disco	Categorias Interpretativas e Breakpoints do Diâmetro da Zona, mm inteiro mais próximo			Categorias Interpretativas e Breakpoints da CIM µg/mL			Comentários
			S	I	R	S	I	R	
FLUOROQUINOLONAS									
A	Ciprofloxacino	5 µg	≥21	16–20	≤15	≤1	2	≥4	
A	Levofloxacino	5 µg	≥17	14–16	≤13	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacino	5 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	
AGENTES DIVERSOS									
B	Sulfametoxazol-trimetoprima	1.25/23.75 µg	≥16	11–15	≤10	≤2/38	–	≥4/76	

Fonte: CLSI (2018)

1.1 Motivação

Geralmente as medidas dos diâmetros dos halos formados são feitas manualmente, utilizando réguas ou paquímetros, como pode ser visto na Figura 4. No entanto, por se tratar de um processo repetitivo e de cada placa conter até 12 discos, ele se torna lento e tedioso, além de depender da perícia e condição mental do indivíduo que está medindo e do ambiente onde é realizado (NIJS *et al.*, 2003; HOMBACH; ZBINDEN; BÖTTGER, 2013).

Figura 4 – Métodos manuais para obtenção dos diâmetros dos halos de inibição.



Fonte: Autoria Própria

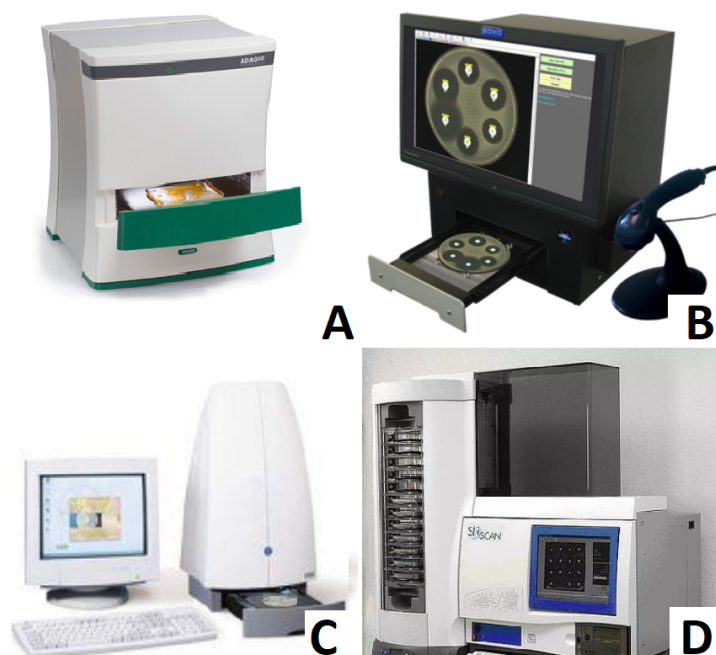
Existem sistemas automatizados para leitura de antibiogramas que prometem minimizar os problemas acarretados pelo processo manual de medição, além de simplificar e prevenir erros de transcrição de diagnóstico, identificar os pacientes, sendo o operador responsável apenas por validar o resultado.

As principais soluções comerciais disponibilizadas no mercado são o Bio-Rad ADAGIO[®], o Bio-Rad Osiris[®], o i2a Diagnostics SIRscan 2000[®], o Giles Scientific USA BIOMIC V[®] (Figura 5) e o Oxoid AURA[®]. Porém o Osiris[®] (utilizado neste trabalho) e o AURA já estão descontinuados. Em um contato com o fornecedor BIO-RAD, foi informado que o equipamento ADAGIO não está sendo comercializado no momento.

A legislação brasileira exige que todos os reagentes, calibradores, padrões, controles, coletores de amostra, com intenção de uso determinado pelo fabricante para avaliação *in vitro* de amostras humanas, para fins de diagnóstico, monitoramento,

triagem e para verificação de compatibilidade para potencial receptor de sangue, órgãos ou tecidos, devem ser registrados junto à Gerência de Produtos para Diagnóstico in vitro (MANUAL PARA REGULARIZAÇÃO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO NA ANVISA, 2016). Dos equipamentos listados, apenas o ADAGIO possui o registro vigente e o Osiris[®] teve seu registro vencido em 24 de outubro de 2010 (Agência nacional de Vigilância Sanitária, 2017), de forma que a única solução existente no Brasil é o BIOMIC, que apresenta problemas para uso na rotina do laboratório (GEISS; KLAR, 2000), possui um custo elevado (cotado a 34.710,00 dólares em 22 de junho de 2018) e é restrito a aplicações na pesquisa.

Figura 5 – Equipamentos comerciais para testes de antibiogramas por disco difusão. A) Bio-Rad ADAGIO[™]. B) Giles Scientific USA BIOMIC V[™]. C) Bio-Rad Osiris[®]. D) i2a Diagnostics SIRscan 2000[™].



Fonte: Sites dos respectivos fabricantes

Diante da carência de disponibilidade e do alto custo de aquisição de equipamentos comerciais, e para contornar os problemas inerentes às medidas manuais, foi desenvolvido um algoritmo de medição de halos de inibição em ASTs por disco difusão. Utilizando transformada de Hough, foi possível identificar a posição central dos círculos formados pelos papéis filtro. Sabendo os locais destes centros, um código para o cálculo dos diâmetros dos halos foi desenvolvido baseado na técnica de RPAA (*Radial Profile Analysis Algorithm*), proposta por HEJBLUM *et al.* (1993). As imagens necessárias para realizar os ASTs foram adquiridas utilizando um aparato desenvolvido especificamente para este trabalho, que garante um ambiente com iluminação uniforme e posicionamento fixo da placa de Petri.

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é desenvolver um sistema para detecção e estimação dos diâmetros de halos de inibição em testes de suscetibilidade por antibiograma de disco-difusão, utilizando técnicas de processamento de imagem e visão computacional tais como Transformada de Hough Circular(CHT), *k-means* e RPAA. Além disso, servirá de base para o desenvolvimento do sistema Hórus, objeto proposto no projeto homônimo a este trabalho, que visa disponibilizar esta tecnologia aos centros ligados ao INCT Instituto Nacional de Pesquisas em Resistência a Antimicrobianos (INPRA) e rede de hospitais da Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EB-SERH).

No capítulo seguinte será feita uma breve revisão bibliográfica das técnicas de processamento de imagem utilizadas neste trabalho. Em seguida será apresentada de forma breve alguns métodos existentes para detecção de halos de inibição em sistemas automatizados.

No capítulo 3 é mostrada a metodologia e todos os passos tomados para o desenvolvimento deste trabalho, desde a concepção do aparato de aquisição de imagem e detalhes do algoritmo desenvolvido. No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos para obtenção dos resultados dos testes, e os resultados em si. Por fim, é feita uma breve conclusão acerca dos resultados obtidos e o rumo que o trabalho tomará a partir desta etapa.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo é feita uma revisão dos principais métodos e conceitos utilizados neste trabalho. São mostrados fundamentos da representação de imagens em ambiente digital e a aquisição das mesmas, assim como as técnicas de processamento de imagem e visão computacional implementadas no sistema.

2.1 As Imagens Digitais

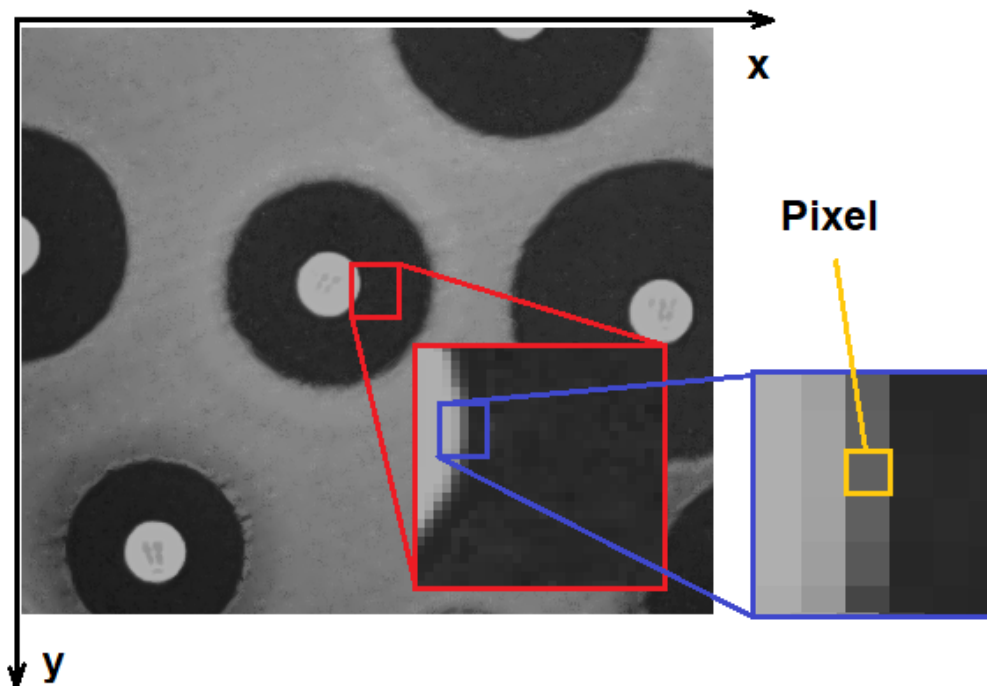
As imagens podem ser descritas como funções bidimensionais $f(x, y)$, conforme a Equação 1, com M linhas e N colunas onde f representa a intensidade do nível de cinza (brilho) em determinada posição x, y . Em geral, o valor de $f(x, y)$ é normalizado de forma que assuma um valor entre 0 e 1. Para que uma imagem possa ser armazenada e processada por um computador digital, ela deve ser quantizada, de modo que os valores x, y e f tenham valores finitos e discretos. Esta quantização permite dividir a imagem em pequenos elementos básicos chamados *picture elements*, *image elements*, *pels* ou *pixels* (GONZALEZ; WOODS, 2007).

A Figura 6 mostra a representação de uma imagem de forma digital, ilustrando o conceito de *pixel*. Também pode-se observar que, por convenção, a origem da representação é feita no canto superior esquerdo. Isto ocorre pois é uma herança da era dos monitores de tubo de raio catódico (CRT) (UMBAUGH, 2017a).

$$f(x, y) = \begin{bmatrix} f(0, 0) & f(0, 1) & \dots & f(0, N - 1) \\ f(1, 0) & f(1, 1) & \dots & f(1, N - 1) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ f(M - 1, 0) & f(M - 1, 1) & \dots & f(M - 1, N - 1) \end{bmatrix} \quad (1)$$

Um dos primeiros usos da digitalização de imagens foi a transmissão de fotografias através de cabos submarinos para uso em jornais do outro lado do oceano. Desta forma foi possível minimizar o tempo de envio que era de mais de uma semana, para poucas horas (MCFARLANE, 1972). A digitalização de imagens não só possibilitou uma maior facilidade na transmissão e disseminação das mesmas, como também

Figura 6 – Representação de uma imagem digital e o conceito de *pixel*.



Fonte: Autoria Própria

abriu possibilidade para que fossem tratadas e processadas utilizando algoritmos em computadores digitais. Isto permitiu diversas aplicações e praticamente todos os campos de aplicação, desde a fotografia, para fins estéticos, até aplicações que não utilizam faixas de luz humanamente visível. como nas áreas da medicina (raios-x, tomografia, ultrassonografia e ressonância magnética) e astronomia (raios-x, raios gama e faixa do ultravioleta).

2.2 Detecção de bordas pelo método de Canny

Apresentado em 1986 por John F. Canny no artigo *A Computational Approach to Edge Detection* (CANNY, 1986), é um método para detecção de bordas onde são utilizados 4 passos (UMBAUGH, 2017b):

- **Redução de Ruído** - Convolvendo-se a imagem com uma máscara Gaussiana, é possível mitigar a maior parte dos efeitos do ruído. Aumentando-se o desvio padrão deste filtro, menos bordas são detectadas, porém as encontradas são mais proeminentes.
- **Cálculo dos Gradientes** - Sabendo que cada uma das bordas contidas em uma imagem possui um sentido, pode-se identificá-los realizando a convolução

da imagem com uma máscara vertical e outra horizontal, como as apresentadas na Equação 2 :

$$\begin{array}{cc}
 \text{Horizontal} & \text{Vertical} \\
 \frac{1}{2} \begin{bmatrix} -1 & -1 \\ 1 & 1 \end{bmatrix} & \frac{1}{2} \begin{bmatrix} -1 & 1 \\ -1 & 1 \end{bmatrix}
 \end{array} \quad (2)$$

- Em cada pixel, serão retornados os valores c_1 , correspondente à máscara Vertical e c_2 correspondente à máscara horizontal. Com estes valores é possível obter a magnitude e a direção da borda em cada pixel. Para isso utiliza-se a Equação 3.

$$\begin{array}{l}
 \text{Magnitude da Borda} = \sqrt{c_1^2 + c_2^2} \\
 \text{Direção da Borda} = \tan^{-1} \begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \end{bmatrix}
 \end{array} \quad (3)$$

- **Detecção de Bordas** - Quanto maior a intensidade do gradiente, mais provável que o ponto seja uma borda. No entanto não há um valor pré definido para o limiar entre borda e não borda. Canny sugeriu utilizar dois limiares, um superior e outro inferior. Aplica-se primeiro o limiar mais alto, onde são encontradas as maiores probabilidades de bordas genuínas. Partindo-se destes, nas direções dos gradientes, avalia-se os outros pixel utilizando o menor limiar, permitindo identificar as fracas possibilidades de bordas partindo de um ponto inicial.

2.3 Transformada de Hough e Transformada de Hough Circular

A busca pela detecção de formas geométricas em imagens foi muito explorada desde o início do desenvolvimento das técnicas de processamento de imagens. Em particular, a identificação de linhas permitiu solucionar diversos problemas nas mais distintas áreas. No entanto o modo mais trivial de obtê-las, que consistia em testar um par de pontos adjacentes e encontrar linhas formadas ou não pelos mesmos, se mostrava muito custoso no ponto de vista matemático. Para cada n pontos seriam necessários n^2 operações, tornando essa abordagem proibitiva do ponto de

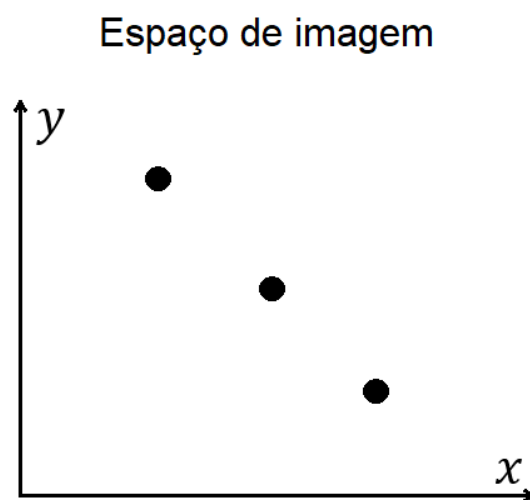
vista computacional, principalmente nos computadores dos anos 70 (DUDA; HART, 1971).

Em 1962 Paul Hough registrou uma patente que descrevia geometricamente uma versão rudimentar de uma técnica que permite identificar padrões de linhas em imagens utilizando um método de parametrização de retas com distintas inclinações (HOUGH, 1962). Além disso, desenvolveu uma aplicação utilizando circuitos analógicos para implementar sua invenção.

A técnica é aplicada a partir do resultado da detecção de bordas da figura que se quer encontrar as linhas. Consiste basicamente em transformar os pixels que compõem essas bordas em votos no espaço de Hough.

Para que seja possível visualizar com mais clareza este processo, um exemplo é apresentado na Figura 7, na qual está ilustrado uma imagem hipotética onde os pontos pretos representam os pixels que fazem parte de uma borda da imagem original. O algoritmo deve então avaliar se os pontos fazem parte de uma linha e, se fazem, onde ela se encontra.

Figura 7 – Representação de pixels de borda (pontos) que compõe as bordas de uma certa imagem.

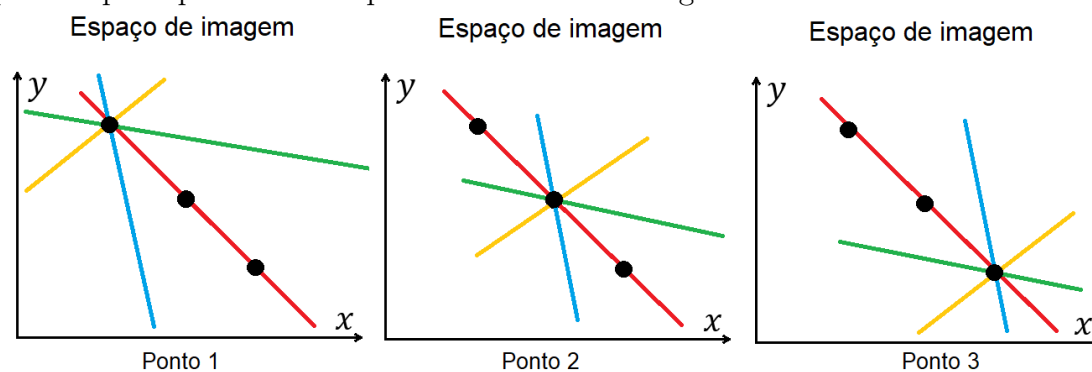


Autoria Própria

Em cada um desses pontos se cruzarão N linhas auxiliares espaçadas igualmente. A quantidade de linhas auxiliares aumenta tanto quanto se queira melhorar a precisão de identificação das retas na imagem original. Neste exemplo, para melhorar ilustrar, são traçadas apenas 4 delas para cada ponto, conforme Figura 8

Já é possível supor, de forma visual, que a linha auxiliar vermelha cruza todos os pontos testados. As etapas seguintes irão portanto comprovar esta suposição da seguinte forma: para cada linha auxiliar que cruza um ponto no Espaço de Imagem é possível parametrizá-la com as variáveis r (distância dela à origem) e θ (ângulo

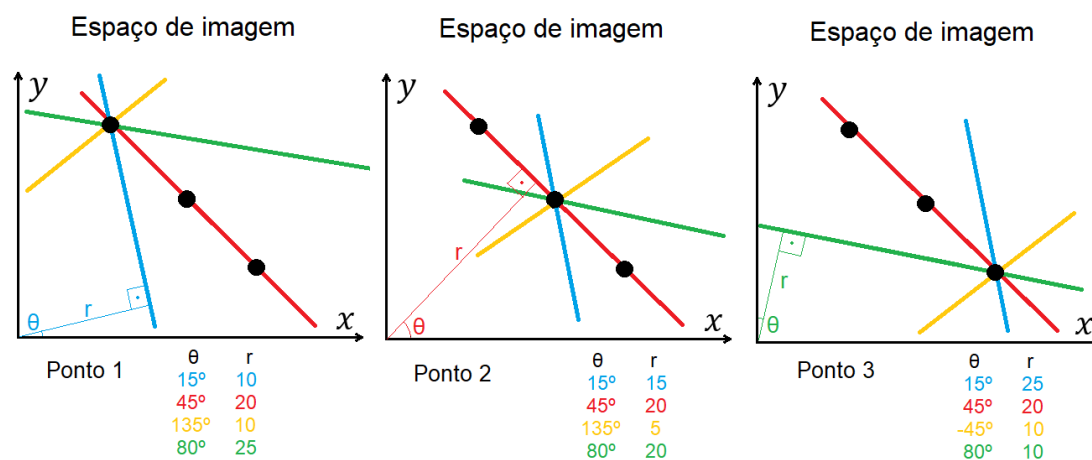
Figura 8 – Ilustração do traçado das linhas auxiliares que cruzam cada um dos pontos que representam os pixels de borda da imagem



Autoria Própria

entre a perpendicular desta linha e o eixo das abscissas), conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Exemplo da parametrização das linhas auxiliares que cruzam os pontos da imagem. Para cada uma são obtidos os valores de r e θ (os valores apresentados são aproximados)

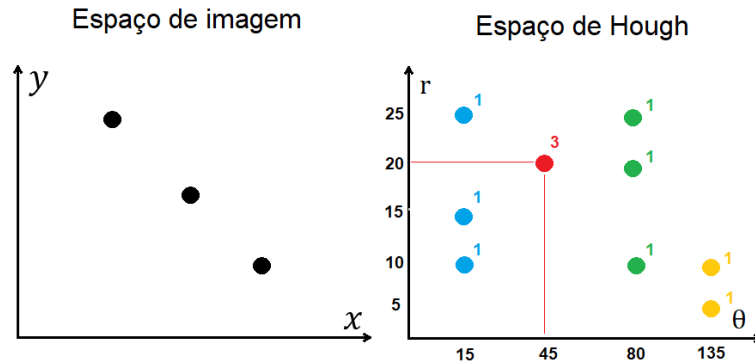


Autoria Própria

A partir do conjunto de pares r e θ obtidos da parametrização, pode-se preencher os acumuladores no Espaço de Hough, também chamado de Espaço de Acumuladores. Na Figura 10 pode ser visto que, para cada uma das linhas auxiliares, é gerado um voto no seu local correspondente. A linha vermelha, ou seja, aquela que foi coincidente nos 3 pontos, gerou 3 votos na posição $r = 20$ e $\theta = 45$, sendo estes os parâmetros mais plausíveis para ocorrência de uma reta na imagem analisada.

Na prática, as imagens analisadas possuirão centenas ou milhares de pixels de borda e, por consequência, uma quantidade enorme de linhas auxiliares para parametrizar, assim como acumuladores com diversas quantidade de votos. Cabe ao

Figura 10 – Na esquerda, o Espaço de Imagem com os pontos que representam as bordas da imagem de forma simplificada. Na direita, Espaço de Hough correspondente com os votos dos acumuladores.



Autoria Própria

projetista do sistema determinar o número mínimo de votos para que um acumulador represente de fato uma reta na imagem.

A Transformada de Hough foi estendida de forma a permitir identificar objetos circulares, a chamada Transformada de Hough Circular. Se tornou muito popular, pois o círculo é um dos formatos mais recorrentes na natureza, como em frutos, células e olhos humanos e também em objetos produzidos artificialmente, como bolas esportivas, placas de sinalização e peças mecânicas rotativas. Sua aplicação vai desde a identificação de padrões circulares na vegetação (LIU *et al.*, 2013) a contagem de glóbulos vermelhos em uma lâmina de microscopia (MAZALAN; MAHMOOD; RAZAK, 2013). Em geral a identificação de círculos é um passo intermediário quando se quer extrair informações em imagens com padrões conhecidos.

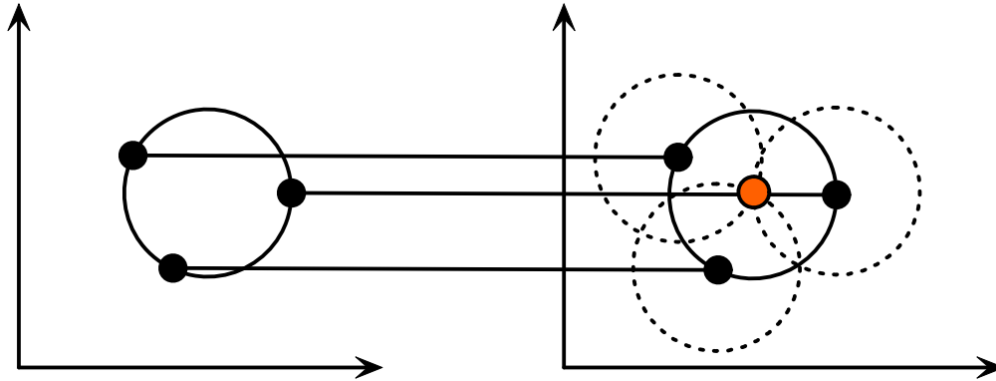
Um círculo com raio R e centro (a, b) pode ser descrito na Equação 4. Em uma imagem contendo diversos pixels que correspondem às bordas dos círculos, o papel da CHT é retornar os parâmetros (a, b, R) que representam cada um destes círculos.

$$\begin{aligned} x &= a + R \cdot \cos(\theta), \\ y &= b + R \cdot \sin(\theta). \end{aligned} \quad (4)$$

Quando o raio do círculo que se quer encontrar é conhecido e de valor R , para cada ponto elegível na imagem é traçado no espaço de parâmetros um círculo de raio R . Os locais onde ocorrem a maior parte das intersecções são eleitos como os centros dos prováveis círculos. A Figura 11 ilustra esta transformação.

No entanto, se o raio do círculo que se quer encontrar não é conhecido, o espaço de parâmetros se torna tridimensional. Neste caso cada ponto na imagem, elegível a pertencer a um círculo, assume o formato de uma superfície cônica, onde o raio de sua base possui o valor do raio do maior círculo que poderia ser encontrado na imagem, ou um limite máximo e mínimo pré determinado. Os locais onde se

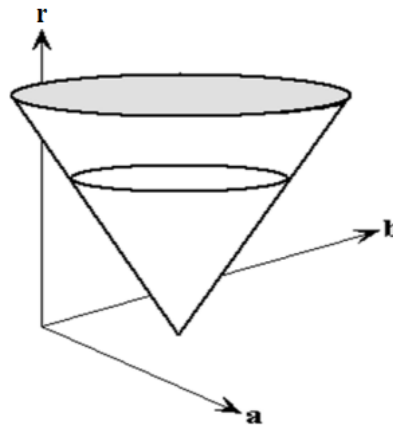
Figura 11 – Um círculo de raio R é gerado no espaço de parâmetros (direita) para cada ponto elegível na imagem (esquerda). Estes círculos gerados se interceptam no ponto (a, b) , que é o centro do círculo existente na imagem.



Fonte: RHODY (2005)

acumulam a maior quantidade de interseções destes cones são eleitos como os centros e o raio de cada círculo (a, b, R) . A Figura 12 ilustra um cone formado no espaço de parâmetros que representa um ponto da imagem analisada.

Figura 12 – Cone gerado no espaço de parâmetros relativo a um único ponto elegível na imagem. Um dos seus eixos representa os raios possíveis de serem encontrados na imagem.



Fonte: RHODY (2005)

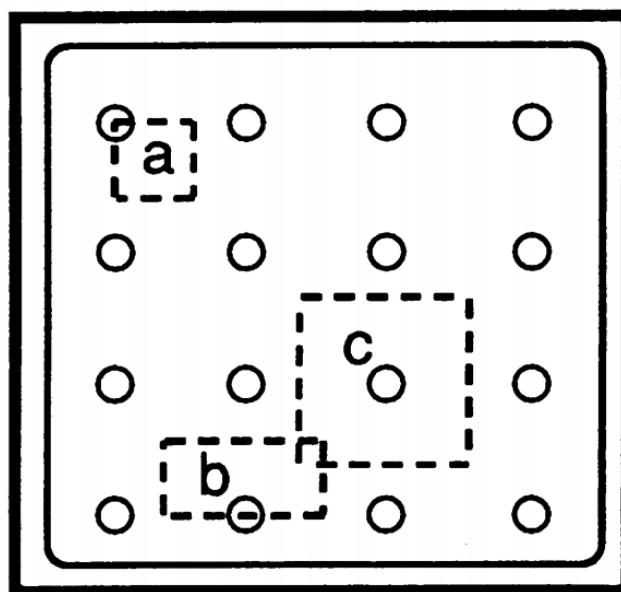
2.4 RPAA (*Radial Profile Analysis Algorithm*)

Originalmente proposto por HEJBLUM *et al.* (1993) para o desenvolvimento de um sistema de automatização de medição de halos de inibição em antibiogramas de disco-difusão. Consiste em 3 etapas básicas após o pré-processamento. A primeira identifica a posição dos discos de antibióticos através da técnica de *blob*

coloring (BALLARD; BROWN, 1982). Estas posições são então armazenadas e utilizadas na etapa futura.

A segunda etapa, que foi utilizada como base para o algoritmo desenvolvido neste trabalho, consiste em determinar as regiões de interesse para análise. Conforme visto na Figura 13, a placa utilizada possui formato quadrado, e por isso é fácil perceber que nos discos próximos às 4 bordas pode-se desconsiderar a avaliação dos pixels na direção destas bordas. Quando em regiões centrais, as regiões de interesse ao redor do disco possuem dimensão quadrada com 35mm de lado. Percebe-se que em "a", apenas um dos 4 quadrantes é considerado, pois os outros 3 seriam afetados pelas bordas do canto da placa. Em "b" apenas 2 quadrantes são desconsiderados, pois apenas os outros 2 são afetados pela borda da placa. Em "c" toda a área do quadrado de 35mm de lado é utilizado pois o disco está suficientemente distante das bordas da placa de Petri.

Figura 13 – Exemplo de placa de Petri utilizada no trabalho original de RPAA.



Fonte: HEJBLUM *et al.* (1993)

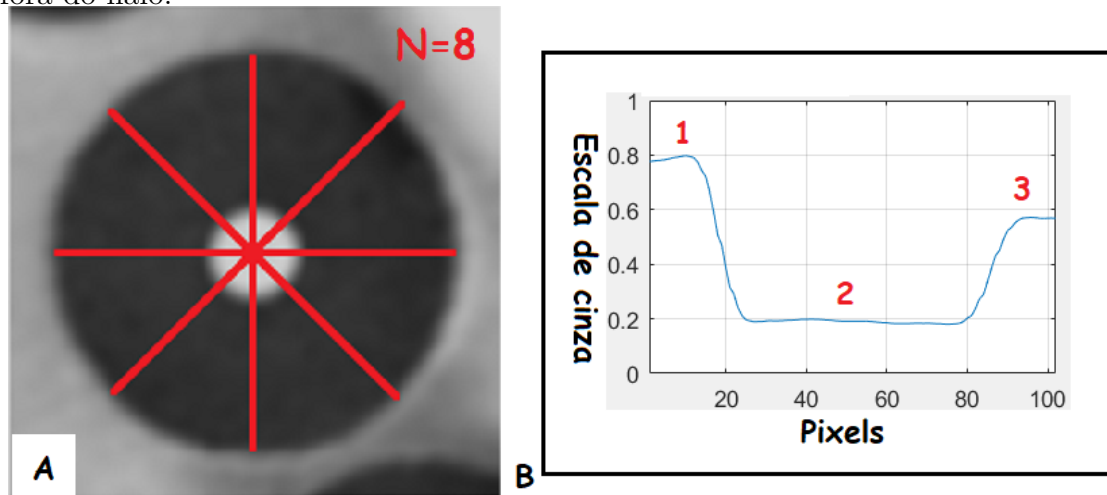
Para os halos distantes da borda da placa de Petri, são adquiridas as intensidade dos pixels nas 8 direções radiais a partir do centro do disco, conforme a Figura 14 A) e então é gerado uma curva que representa no eixo Y essas intensidades. O eixo X representa a distância do centro do halo, conforme Figura 14 B). Para os halos próximos à borda, são adquiridas apenas os pixels válidos, conforme mencionado no parágrafo anterior.

Um simples filtro de média de 5 pontos é utilizado para suavizar esta curva.

Esta curva, chamada de perfil radial pode assumir 3 formas, conforme o o tipo do halo que ele representa (Figura 15).

A terceira etapa consiste em analisar cada caso encontrado e enquadrá-los em:

Figura 14 – a) Ilustração do traçado dos 8 raios do algoritmo proposto por HEJ-BLUM *et al.* (1993) sobre uma figura de halo. b) Perfil resultante da média aritmética entre os pixels adquiridos nos 8 diferentes ângulos, onde 1 representa a média de intensidade de cinzas na região do disco de antibiótico, 2 a média das intensidades da zona que corresponde ao halo e 3 representa a média de intensidade da região fora do halo.



Autoria Própria

caso "a" da Figura 15 representa a existência de halo maior que 6mm e menor que 35mm. Chama-se este formato de "U". O caso "b" e "c" representam, respectivamente, a existência de halo maior que 35mm e a inexistência de um halo. Chamam-se estes dois casos de "L".

Para diferenciação entre os formatos foi utilizada a seguinte Equação 5:

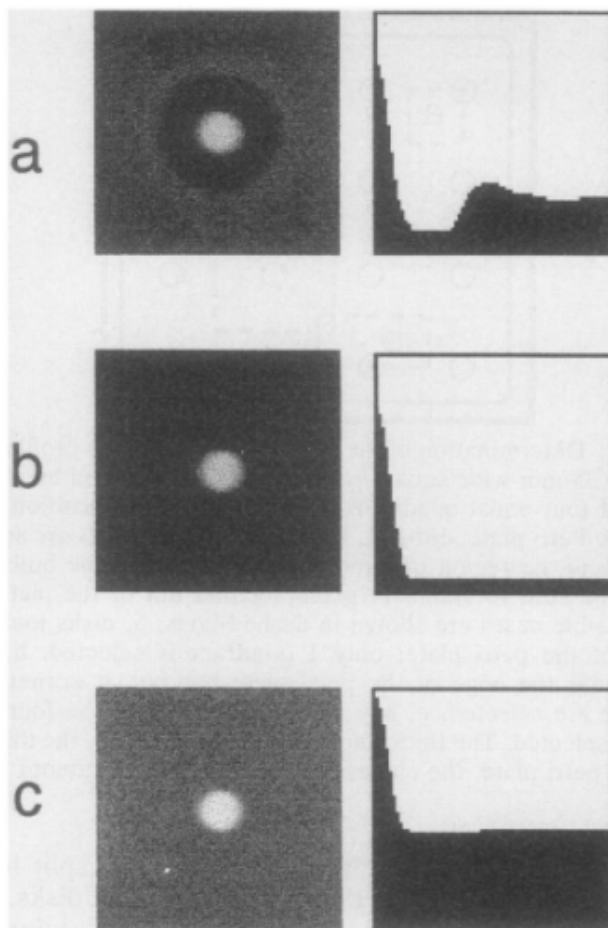
$$C = \frac{1}{x_{max} - x_{min}} \frac{V_{x_{max}} - V_{x_{min}}}{V_{x_{max}} + V_{x_{min}}} \quad (5)$$

Onde x_{min} e x_{max} representam a abcissa de início e a abcissa do final da região de subida do gráfico. A diferença entre o nível de cinza (C) dos dois pontos foi calculada. Se C assumisse um valor maior que 0,013 (T1), o formato era considerado "U". O raio r do halo de inibição foi considerado a distancia entre o ponto $x = 0$ e a posição V_r onde o gráfico subiu 1/4 de sua altura máxima, conforme a Equação 6.

$$V_r = V_{x_{min}} + \frac{V_{x_{max}} - V_{x_{min}}}{4} \quad (6)$$

Para diferenciar entre os dois casos "L" existentes. Foram gerados dois valores de limiar (T2 e T3) a partir de um caso com perfil do tipo "U". Perfis com intensidade mais próxima de T2 foram considerados como um halo acima de 35mm. E caso fosse

Figura 15 – Exemplo dos 3 casos que podem surgir ao realizar o perfil radial do halo. Percebe-se que em "a", o gráfico assume o formato de "U", quando há um halo bem definido. Em "b" o tipo "L" com halo de inibição maior que 35mm de diâmetro. Em "c" também ocorre o tipo "L", porém devido ao fato de não ocorrer halo de inibição a intensidade de cinza é alta.



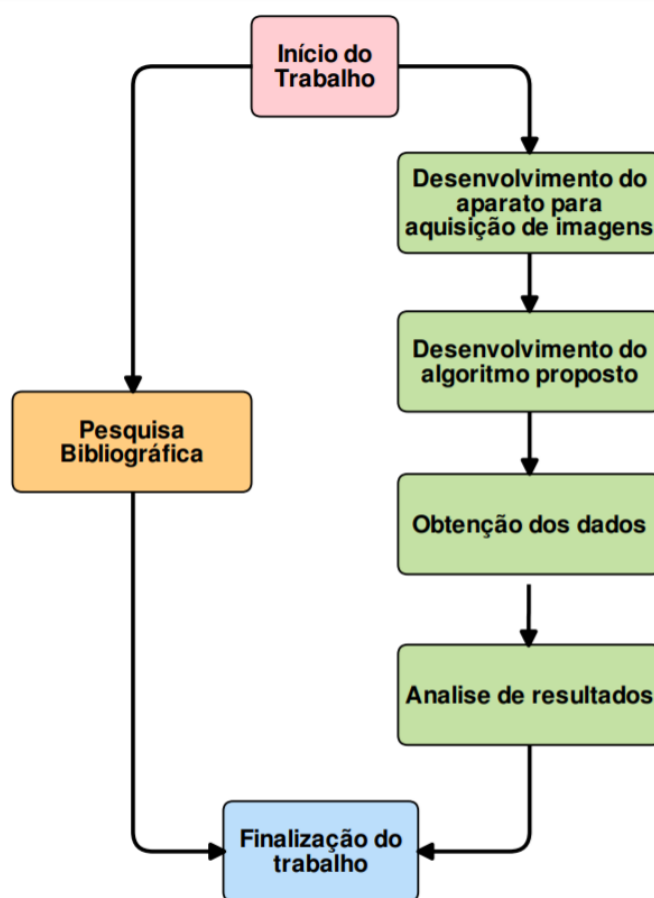
Fonte: HEJBLUM *et al.* (1993)

mais próximo de T3, significava a existência de halo. Ou seja, nesta abordagem é necessário que algum halo da placa seja do formato "U".

3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão detalhadas todas as etapas de Pesquisa Bibliográfica, aparato desenvolvido para a aquisição das imagens, o algoritmo proposto, obtenção dos dados e a análise dos resultados. Na Figura 16 está ilustrado o fluxograma destas etapas. Nota-se que a pesquisa bibliográfica ocorreu no decorrer de todo o desenvolvimento do trabalho pois a busca de informações foi necessária para sua realização em todos os momentos.

Figura 16 – Fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho.



Autoria Própria

3.1 Equipamentos Utilizados

No decorrer deste trabalho foram necessários equipamentos e softwares específicos em cada etapa de desenvolvimento. Na elaboração do algoritmo, foi utilizado um computador arquitetura PC de 64 bits com processador Intel Core I7 de 2,6 GHz, 8 GB de memória RAM e um placa de vídeo dedicada GeForce GTX 960M. O sistema operacional adotado foi o Windows 10 Home, onde foi utilizado o software matemático MATLAB 2020a, escolhido pela sua simplicidade em permitir a manipulação das imagens em forma de matriz, ricas e bem documentadas bibliotecas de processamento de imagens, possuir uma vasta comunidade de apoio e não menos importante, ter uma boa familiaridade por parte do autor.

Para a construção do aparato de aquisição das imagens, as peças foram desenhadas em sua totalidade no software de desenho 3D Autodesk Fusion 360, escolhido por disponibilizar uma licença gratuita para estudantes. A partir dos modelos projetados, foi utilizada uma impressora 3D do tipo FDM modelo Zmorph 2.0 SX. A escolha se deve pela sua flexibilidade pois, além de suportar variados tipos de materiais dos filamentos (insumo da impressão) e garantir uma boa qualidade final, permite a substituição de suas cabeças extrusoras por uma fresa ou uma gravadora/cortadora a laser.

O laboratório da Unidade de Microbiologia do HCPA emprega desde 2003, em sua rotina de trabalho, o equipamento Bio-Rad Osiris[®] (Figura 17) para avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos pelas bactérias extraídas nos exames clínicos. Uma interface por meio de um *middleware* customizado permite que os resultados dos testes sejam facilmente transferidos ao sistema de prontuários do HCPA. Além disso, admite que as atualizações nos critérios de cortes definidos pelo CLSI e futuramente o BrCAST sejam editados conforme a necessidade.

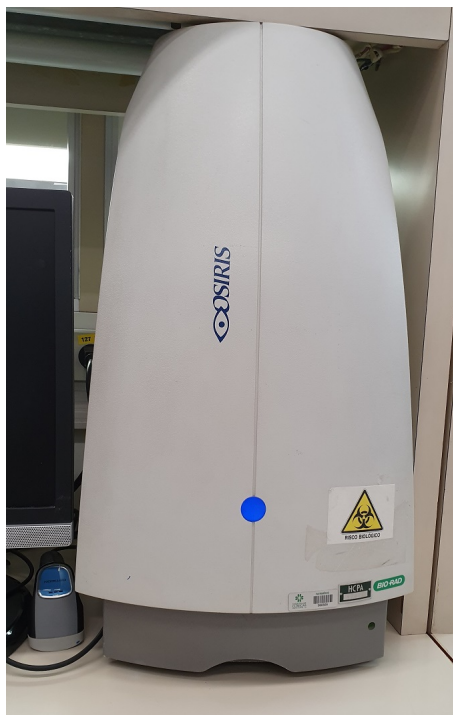
Se durante a avaliação de uma placa for constatado um erro na medição automática de algum halo, este equipamento permite uma intervenção manual para corrigir, antes que o laudo seja finalizado (NIJS *et al.*, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2001). Conforme relatado pelos usuários do Osiris[®], este recurso é utilizado constantemente, pois raramente o equipamento realiza medidas corretas de halos que estão próximos a etiqueta de identificação da placa.

3.2 Aparato desenvolvido

Para garantir a padronização da imagens que seriam adquiridas para o experimento, foi necessário desenvolver um equipamento onde deveria haver iluminação constante, posição fixa da câmera e da placa de antibiograma, além de ser de fácil replicabilidade. Uma foto geral do protótipo pode ser vista na Figura 18A.

A estrutura do equipamento foi feita com 6 chapas de MDF resultando em uma

Figura 17 – Bio-Rad Osiris[®] utilizado nas rotinas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



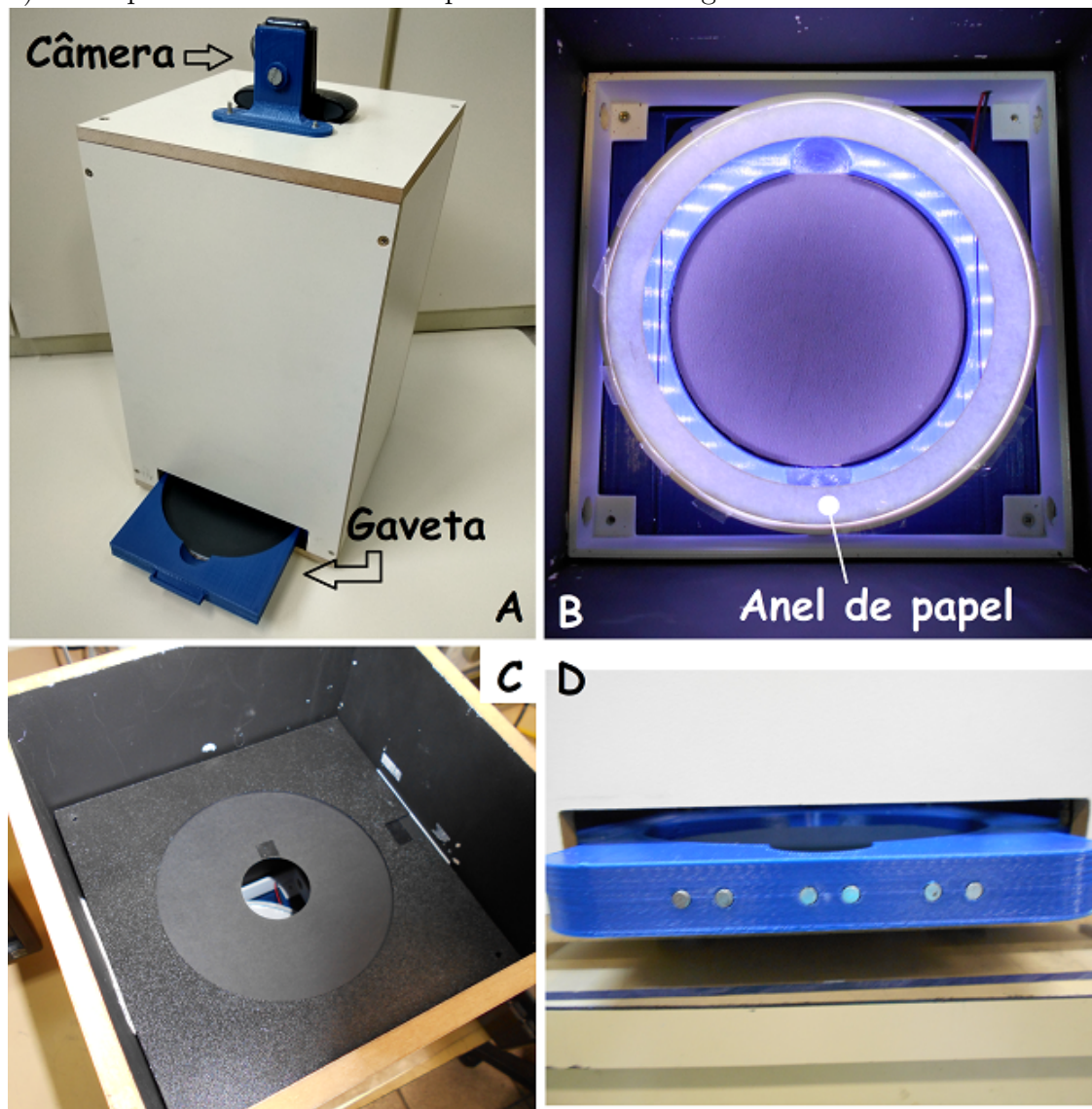
Autoria Própria

caixa com dimensões de $22 \times 22 \times 37 \text{ cm}$. Na extremidade inferior há um suporte cilíndrico, confeccionado na impressora, onde é fixada uma fita de LEDs brancos e intensidade fixa. Como pode ser visto na Figura 18B, para que a iluminação fosse constante em toda a superfície da placa de Petri, foi necessário posicionar os LEDs de forma que não incidissem diretamente na mesma. Além disso, foi colocado um anel de papel branco sobre a fita de LEDs para que houvesse uma difusão suave da luz.

Um dos problemas encontrados durante a aquisição das imagens, foi que a luz advinda quase que diretamente dos LEDs ofuscava a borda da placa de Petri na aquisição das imagens. Para solucioná-lo, foi inserido uma máscara de cartolina e Nylon preta entre a câmera e o suporte da iluminação (Figura 18C). Esta máscara, confeccionada utilizando o cabeçote *laser* da Impressora 3D Zmorph 2.0 SX, foi posicionada em uma distância suficientemente alta para que não refletisse a luz dos LEDs de forma tão intensa. Caso contrário, iria arruinar a uniformidade da iluminação.

Para garantir o alinhamento da placa de antibiograma, foi desenhada uma gaveta com um rebaixo cilíndrico para o correto posicionamento (Figura 19). Essencialmente, a superfície inferior deste rebaixo foi pintada de preto fosco, de forma a aumentar o contraste entre o disco de papel filtro (branco) e as demais áreas da placa. Também foi colocada uma alça para facilitar a sua remoção e ranhuras que

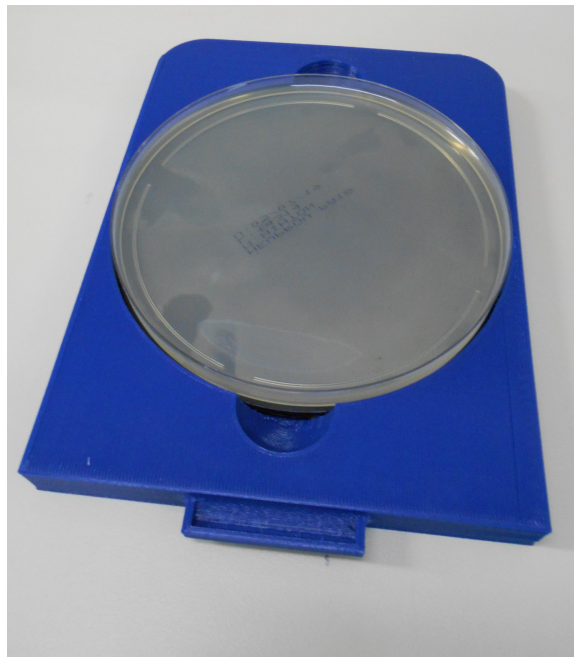
Figura 18 – A) Visão geral do equipamento montado. B) Extremidade inferior com os suportes para a fita de LEDs. C) Máscara para evitar ofuscamento da câmera. D) Imãs que auxiliam no correto posicionamento da gaveta.



Autoria Própria

auxiliam para retirada da placa. Na parte traseira da gaveta foram embutidos imãs de neodímio que, ao entrarem em contato com os imãs da caixa, mantêm o correto posicionamento entre as mesmas (Figura 18D).

Figura 19 – Gaveta desenvolvida utilizando impressão 3D. Sobre ela são posicionadas as placas de Petri para leitura.



Autoria Própria

É válido ressaltar que todos os componentes construídos, exceto as chapas de MDF, foram desenhadas em um software 3D para que pudessem ser impressas ou cortadas na Zmorph 2.0 SX. Na Figura 20 é apresentada uma renderização da gaveta, da guia para a gaveta e do suporte para iluminação em suas posições para montagem.

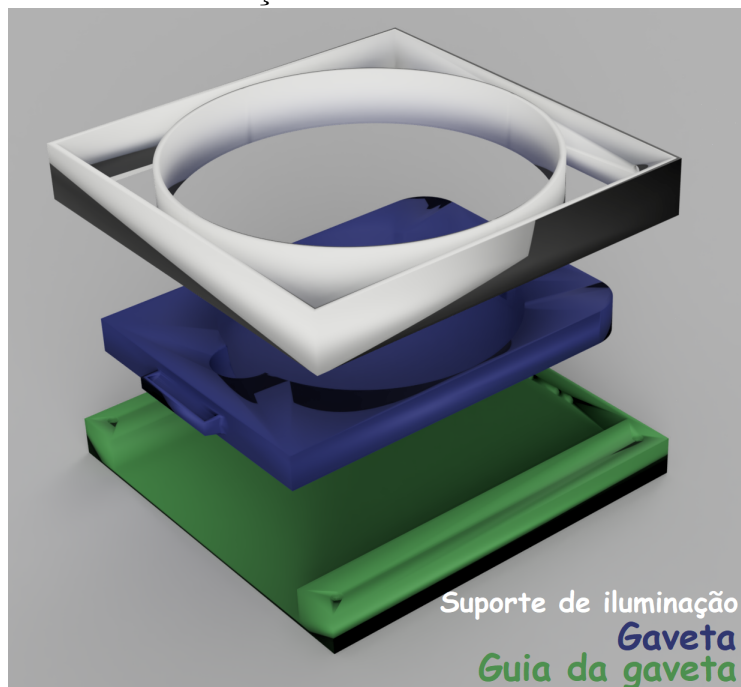
Por fim, a câmera utilizada para a captura das imagens foi a Logitech C920, por possuir uma boa integração com softwares de terceiros, como o MATLAB, foco manual e uma resolução máxima de 15 megapixels.

3.3 Software proposto

O algoritmo desenvolvido neste trabalho encontra-se ilustrado no diagrama de blocos da Figura 21. Ele possui 16 etapas classificadas em 4 grupos: Captura das imagens, Pré-Processamento, Medição dos Halos de Inibição e Interpretação.

Todas as etapas do programa foram desenvolvidas no ambiente MATLAB, se aproveitando da ampla biblioteca de processamento de imagem, da qual os algoritmos foram utilizados para a parte do pré-processamento das figuras obtidas, do algoritmo de identificação do centros dos discos, da localização da etiqueta e da estimação dos diâmetros dos halos de inibição. A parte da análise estatística dos

Figura 20 – Ilustração do posicionamento relativo entre a guia da gaveta, a gaveta e o suporte dos LEDs de iluminação.



Autoria Própria

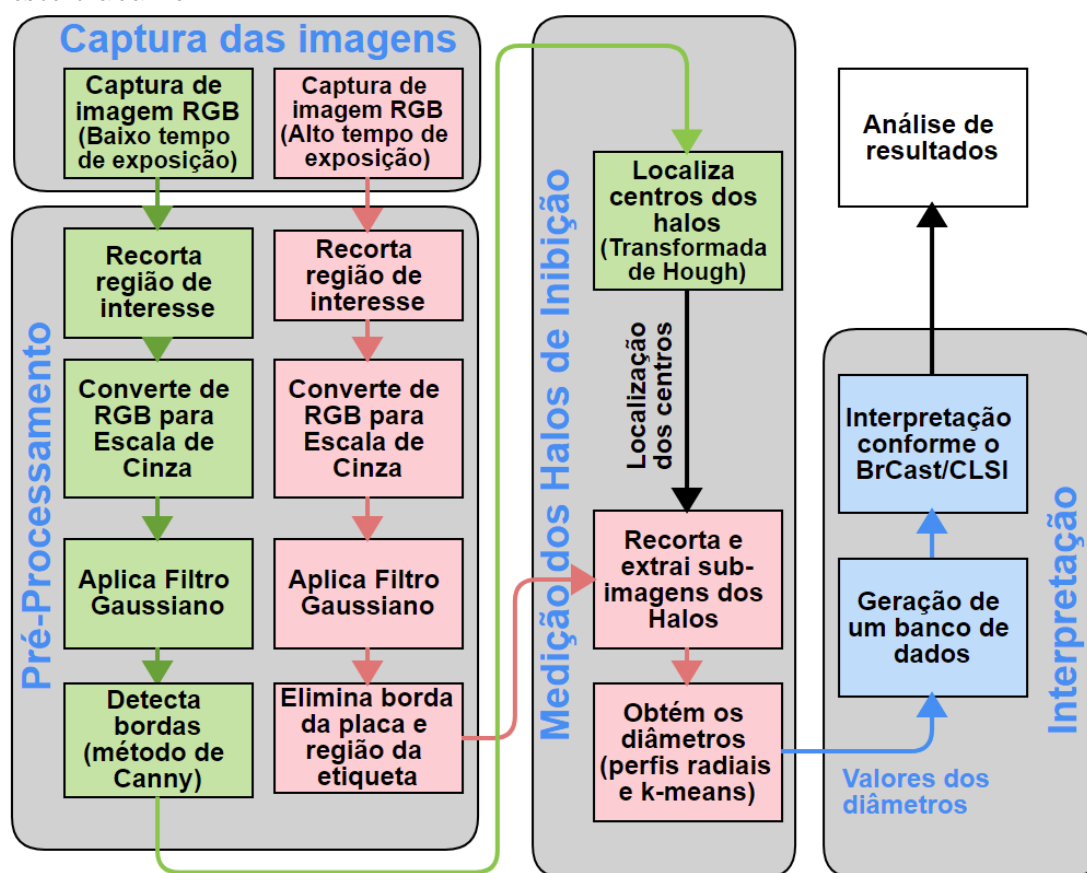
dados foi incorporada em uma rotina também no MATLAB, de forma que ao se fazer uma mudança no código, era possível analisar de forma fácil o resultado no desempenho do mesmo.

Os dados utilizados como referência (padrão ouro), foram extraídos manualmente do equipamento Osiris[®] e preenchidas em planilhas do Google Sheets. Posteriormente estes foram exportados para uma tabela do formato .mat (formato nativo para banco de dados do MATLAB). A Figura 22 a) mostra a uma das telas da interface gráfica do Osiris[®], que foi fotografada para obtenção de seus resultados, assim como a família da bactéria cultivada na placa. A Figura 22 b) mostra etiqueta com os dados de informação do paciente, que deve ser obtido para correta identificação da placa no sistema do Osiris. Por fim a Figura 22 c) apresenta a tabela onde foram armazenados os resultados das medidas com o Osiris assim como medidas manuais, realizadas por estudantes de farmácia habituados com o processo.

3.3.1 Captura das Imagens

Nesta etapa as imagens são obtidas e armazenadas da forma como são capturadas, sem nenhum pré-processamento, de forma a se gerar um conjunto de dados para este e trabalhos futuros. Para cada teste, são adquiridas, na sequência, uma imagem com tempo de exposição baixo e outra com tempo de exposição alto da superfície superior da placa de Petri. A primeira é utilizada para localização das posições dos

Figura 21 – Diagrama de blocos com as etapas existentes no algoritmo desenvolvido neste trabalho.



Autoria Própria

Figura 22 – a) Tela da interface gráfica do Osiris® onde os resultados da placa são apresentados. b) Etiqueta de identificação de paciente/prontuário vista por baixo da placa. c) Tabela onde foram armazenados manualmente os dados gerados pelo Osiris® e pelas medidas utilizando régua.

a

b

c

Número
P
Bact

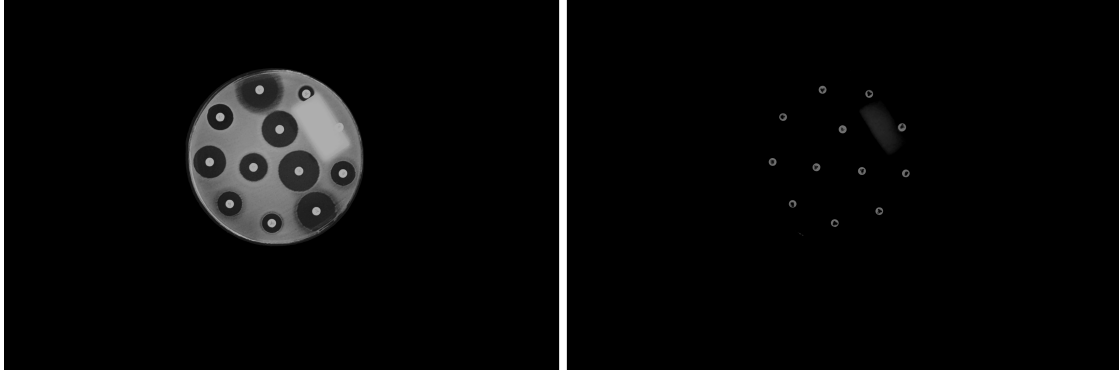
Escherichia coli
ENTEROBACTERIACEA
N MATLAB

Agente (Disco)	Agente (Osiris)	Agente (BrCast)	Diâmetro (Manual)	Manual RIS	Diâmetro (Osiris)	Osiris RIS
1 SAM20	Ampi+subl	Ampicilina-sulbactam20	6	R	9	R
2 SXT25	Trimsulf	Sulfametoxazol-trimetoprim25	6	R	6	R
3 AK30	Amika	Amicacina30	19	S	18	S
4 MEM10	Merop	Meropenem10	30	S	29	S
5 AMC30	Amox+clav	Amoxicilina-acido clavulanico30	6	R	13	R
6 CN10	Genta 10	Gentamicina10	20	S	18	S
7 TZP110	Pip+ taz110	Piperacilina-tazobactam110	26	S	25	S
8 F300	Furanes	Nitrofurantoina300	20	S	20	S
9 NOR10	Norflo10	Norfloxacino10	22	S	27	S
10 CAZ30	Ceftaz	Ceftazidima30	29	S	27	S
11 FEP30	Cefep	Cefepima30	34	S	31	S
12 CXM30	Cefurox	Cefuroxima30	32	S	23	S

Autoria Própria

centros dos halos de inibição em relação à totalidade da imagem e a segunda para a aplicação do algoritmo de medição dos diâmetros destes halos (Figura 23).

Figura 23 – Na esquerda: captura da imagem com tempo de exposição alto. Na direita: captura da imagem com tempo de exposição baixo. Ambas possuem resolução de 2304 x 1536 pixels.



Autoria Própria

Apesar de visualmente aparentarem já estarem em uma escala apenas de cinzas, elas estão na escala RGB. Isto se deve ao fato da câmera possuir melhor nitidez ao se diminuir a intensidade de cor.

O correto posicionamento da placa de Petri dentro do equipamento de aquisição garante a fixa disposição desta na imagem capturada. A partir desta premissa, a imagem é recortada de forma a se isolar a região de interesse e em seguida é convertida de RGB para a GS (escala de cinza) utilizando a Equação 7:

$$GS = \frac{R+G+B}{3} \quad (7)$$

O resultado desta operação para ambas as capturas se encontra na Figura 24.

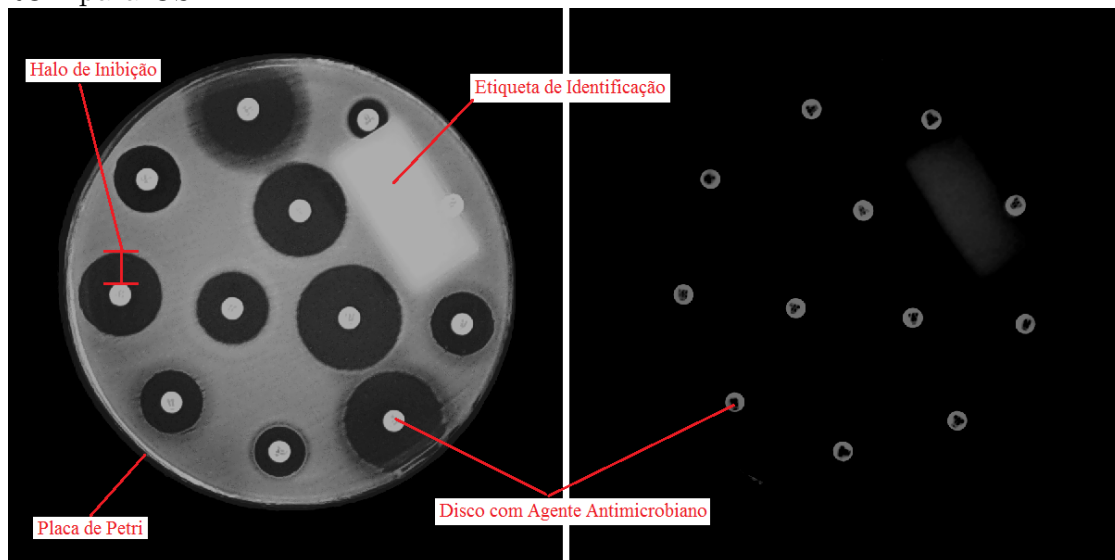
É muito importante perceber que a existência de uma etiqueta de identificação na parte inferior da placa de Petri cria um artefato considerável na imagem que será avaliada. No cotidiano dos serviços assistenciais, é imprescindível a identificação clara do paciente/prontuário no compartimento da amostra, conforme exigência da legislação vigente (Agência nacional de Vigilância Sanitária, 2019). Por este motivo foi implementado um algoritmo que visa identificar a posição desta etiqueta, de forma a minimizar a interferência da mesma.

Nas etapas subsequentes são aplicadas técnicas distintas para cada imagem adquirida, de forma que serão descritas individualmente a partir de agora.

3.3.2 Pré-processamento da imagem com baixo tempo de exposição

Um filtro Gaussiano de desvio padrão unitário foi utilizado para atenuar detalhes em frequências elevadas e minimizar possíveis erros nas etapas posteriores. A

Figura 24 – Na esquerda: captura da imagem com alto tempo de exposição. Na direita: captura da imagem com baixo tempo de exposição. Imagens foram cortadas a fim de realçar a região de interesse e suas escalas de cores foram convertidas de RGB para GS.



Autoria Própria

intensidade dos pixels foi multiplicada por uma constante de forma que o pixel de maior brilho assumisse o valor de 255, ou seja normalizou-se a imagem dentro do intervalo de cinza 8-bit. (Figura 25).

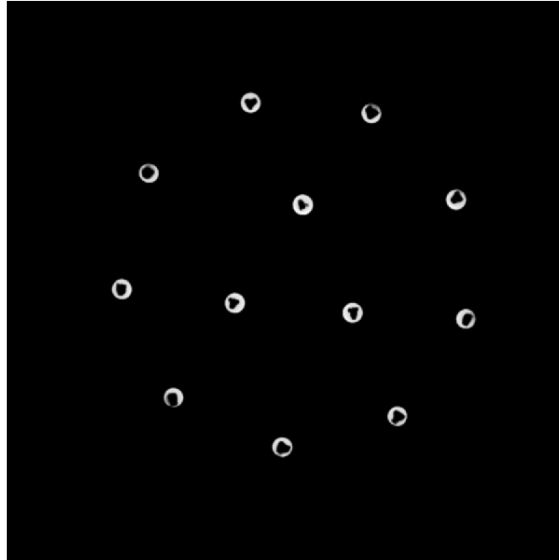
Com isso pôde-se aplicar a detecção de bordas utilizando o método de Canny, onde o limiar alto de avaliação foi selecionado para 230 e o limiar baixo para 150. Estes valores foram escolhidos de forma arbitrária a partir de testes visuais. Na Figura 26 é ilustrado o resultado deste método. Note que é possível eliminar a presença da etiqueta na imagem, antes das próximas etapas.

3.3.3 Pré-processamento da imagem com alto tempo de exposição

Foram avaliadas algumas técnicas de melhora de contraste da imagem a fim de evidenciar a região do halo. No entanto verificou-se que elas realçavam as variações de intensidade nas regiões que houve crescimento bacteriano, o que acarretavam alguns erros de avaliação nas etapas posteriores do software. De qualquer forma, o algoritmo proposto foi desenvolvido a fim de ser menos suscetível as diferenças de intensidade nas regiões com inibição e com crescimento bacteriano.

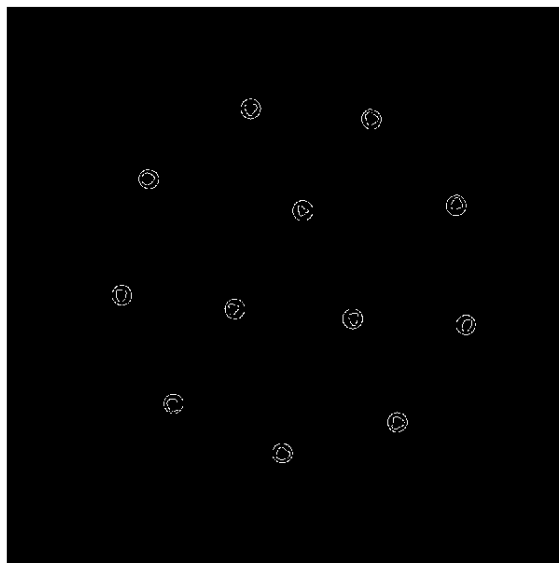
Assim como na imagem em baixo tempo de exposição, foi aplicado um filtro Gaussiano de desvio padrão 3 a fim de reduzir detalhes em frequências elevadas e minimizar possíveis erros nas etapas posteriores. (Figura 27).

Figura 25 – Suavização da imagem com baixo tempo de exposição utilizando filtro gaussiano.



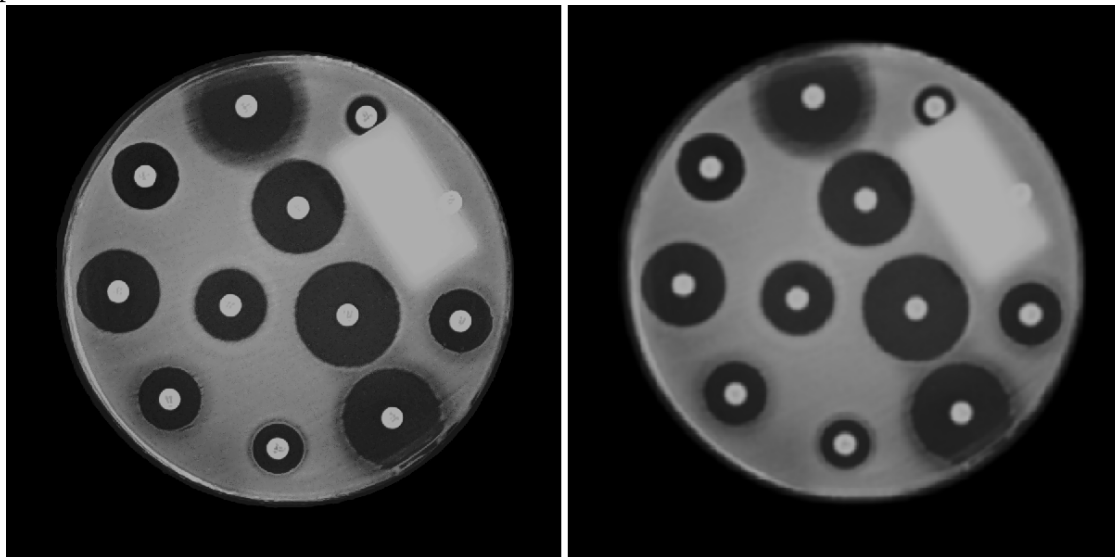
Autoria Própria

Figura 26 – Detecção de bordas na imagem com baixo tempo de exposição utilizando método de Canny.



Autoria Própria

Figura 27 – Na esquerda: imagem em alto tempo de exposição original. Na direita: imagem em alto tempo de exposição com aplicação de método do filtro gaussiano para minimizar o ruído.



Autoria Própria

3.3.4 Localização das posições dos centros dos halos de inibição

A aquisição da imagem de baixo tempo de exposição foi fundamental para o sucesso do algoritmo, visto que após processada, consiste em um fundo totalmente preto com as bordas dos discos com diâmetro conhecido ($6mm$) totalmente brancas, sendo conveniente para o sucesso desta etapa. Assim foi aplicado o método da Transformada de Hough Circular para correta identificação destes círculos. Diferentemente do método original do RPAA, que utilizou a técnica de *blob coloring* para localizar os centros dos halos.

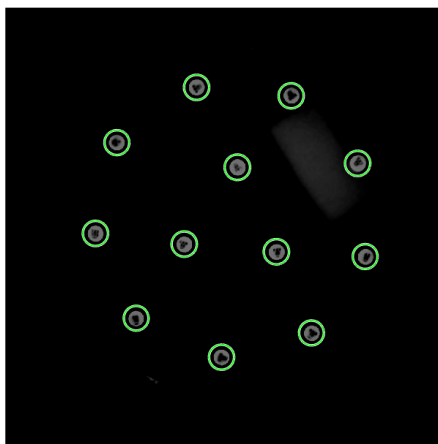
Foram testadas 3 implementações para a transformada de Hough:

1. Método primordial de detecção em duas etapas: é a implementação do conceito básico da transformada de Hough. Muito dispendiosa computacionalmente, visto que necessita traçar, no espaço de parâmetros, um círculo de raio definido para cada pixel de borda detectada (DAVIES, 2004).
2. Transformada de Hough sustentada pela curvatura, de Zhenjie e Weidong (YAO; YI, 2016): ao estimar a curvatura do círculo e a direção do gradiente da imagem, é possível prever as prováveis posições dos centros dos círculos existentes na imagem, e com isso minimizar o custo computacional ao se avaliar regiões pouco prováveis de ocorrência de um círculo.
3. Detecção de círculos não dependentes do tamanho, proposto em ATHERTON; KERBYSON (1999): consiste em avaliar a ocorrência de círculos dentro de

um intervalo de diâmetros definido. O algoritmo considera a orientação das bordas detectadas, com isso os votos aplicados no espaço de parâmetros se reduz a apenas 2 e não o traçado inteiro do círculo.

A primeira implementação foi elaborada no início do desenvolvimento do software a fim de servir como base para métodos mais modernos. O método proposto por Zhenjie e Weidong se mostrou útil quando se quer identificar círculos de variados tamanhos na imagem. Por esta razão apresentou-se pouco vantajosa para o presente trabalho, onde o diâmetro do círculo detectado é essencialmente o mesmo. A terceira proposta foi considerada para o trabalho pois, ao permitir a definição de um intervalo de diâmetros de interesse ($5,5mm \leq D \leq 6,5mm$), e este possuir um tamanho pequeno, o custo computacional se torna baixo. A Figura 28 mostra um exemplo da detecção das posições dos discos de papel em uma das placas testadas pela transformada de Hough sustentada pela curvatura.

Figura 28 – Exemplo da detecção das posições dos círculos na imagem em baixo tempo de exposição.



Autoria Própria

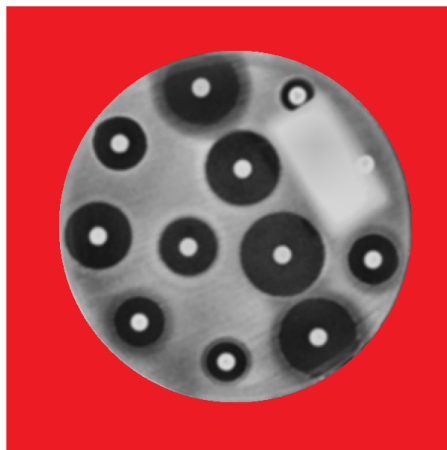
As informações que se quer obter desta etapa são a contagem do número de discos de papel e suas respectivas posições (X e Y) relativas na imagem.

3.3.5 Identificação das regiões de avaliação

Sabendo-se que todos os pixels existentes além da borda da placa de Petri são irrelevantes e até prejudiciais para as corretas medições dos halos de inibição, uma solução foi proposta. Adicionado uma máscara sobre a imagem, ou seja, trocando-se os valores dos pixels que estão na parte exterior da placa por um outro valor qualquer, fora do intervalo padrão para imagens GS (0 a 255), será possível descartá-los nas

etapas subsequentes. A Figura 29 ilustra esse passo. Pode-se notar que os artefatos que compreendem a borda da placa de Petri são substituídos pelos novos valores.

Figura 29 – Apresentação de forma ilustrada da máscara aplicada. Os pixels em vermelho são valores fora do padrão de intensidade de nível de cinza em 8 bits.



Autoria Própria

3.3.6 Identificação das regiões compreendidas pela etiqueta de identificação

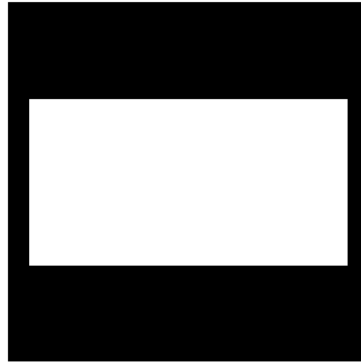
Assim como a região compreendida pela borda da placa, a região ocupada pela etiqueta possui informação que degrada o desempenho do algoritmo em identificar a borda do halo. Esta, na rotina assistencial é sempre fixada na parte de trás da placa de Petri, sendo essencial para a identificação do paciente de onde a bactéria foi coletada. Muitas vezes, em certas condições, o mesmo assume que a borda da etiqueta próxima ao halo é a própria borda do halo adjacente. Torna-se apropriado substituir os valores de intensidade pelos mesmo valores fora do intervalo padrão para imagens GS (0 a 255). Assim também serão descartados posteriormente.

Sabendo que a etiqueta possui sempre a mesma forma e tamanho, foi gerada uma imagem quadrada contendo um retângulo com as mesmas dimensões. Os pixels que representam este retângulo possuem valor 1, enquanto que os demais, 0 (Figura 30)

Este kernel então é rotacionado de 1 em 1 grau de 0 a 180 graus, e a cada incremento é realizada uma convolução entre o mesmo e a imagem de antibiograma em alta exposição. Cada um dos resultados é montado em uma matriz tridimensional. O máximo global desta matriz representa, no eixo X e Y a posição do centro da etiqueta e o Z representa o ângulo de inclinação da mesma. A (Figura 31) ilustra este processo.

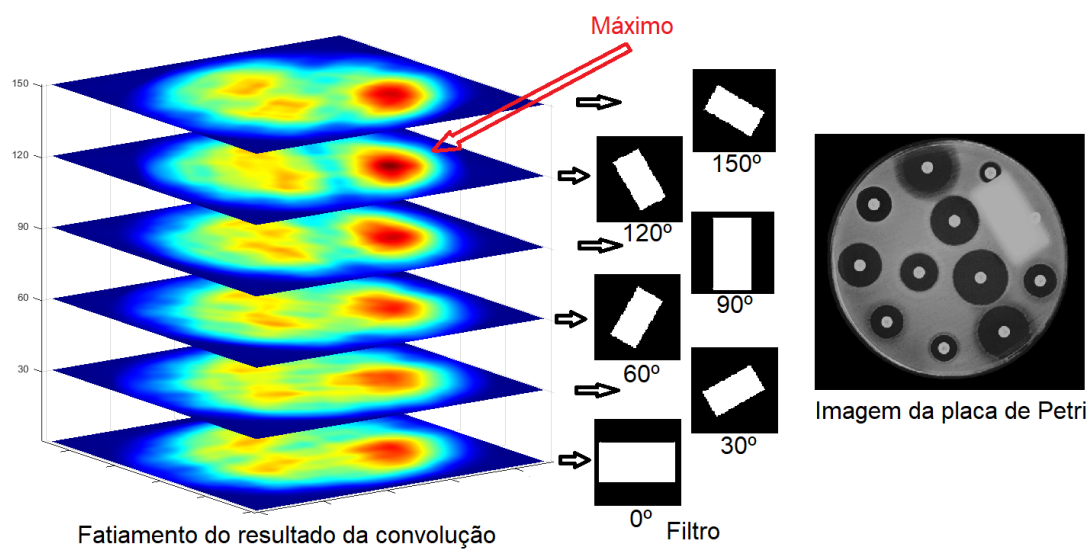
Sabendo as coordenadas do centro da etiqueta, seu ângulo e sua dimensão (sempre a mesma), pode-se eliminá-la. É utilizada a mesma estratégia de remoção da

Figura 30 – Representação do kernel do filtro utilizado para identificação da posição da etiqueta na imagem.



Autoria Própria

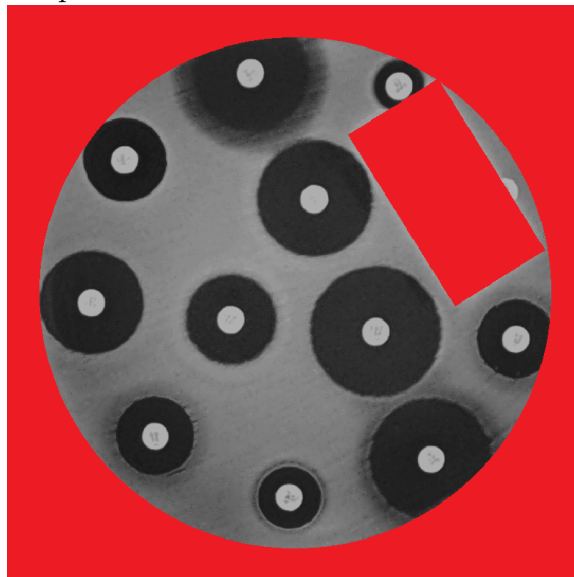
Figura 31 – Representação do fatiamento do resultado da convolução entre a imagem da placa de antibiograma e o kernel em 6 ângulos diferentes. Nota-se que o máximo (destacado na seta vermelha) se encontra no plano referente ao kernel que "mais se alinha" à etiqueta na imagem da placa de Petri.



Autoria Própria

borda da placa, porém o retângulo gerado é 5% maior que o tamanho padrão da etiqueta a fim de se garantir que ela seja completamente eliminada em qualquer circunstância. A (Figura 32) ilustra a aplicação das últimas duas etapas. Os pixels em vermelho representam aqueles que serão desconsiderados nas próximos estágios do processo.

Figura 32 – Os pixels em vermelho representam aqueles que serão desconsiderados nas próximas etapas do processo.



Autoria Própria

3.3.7 Individualização das imagens dos halos

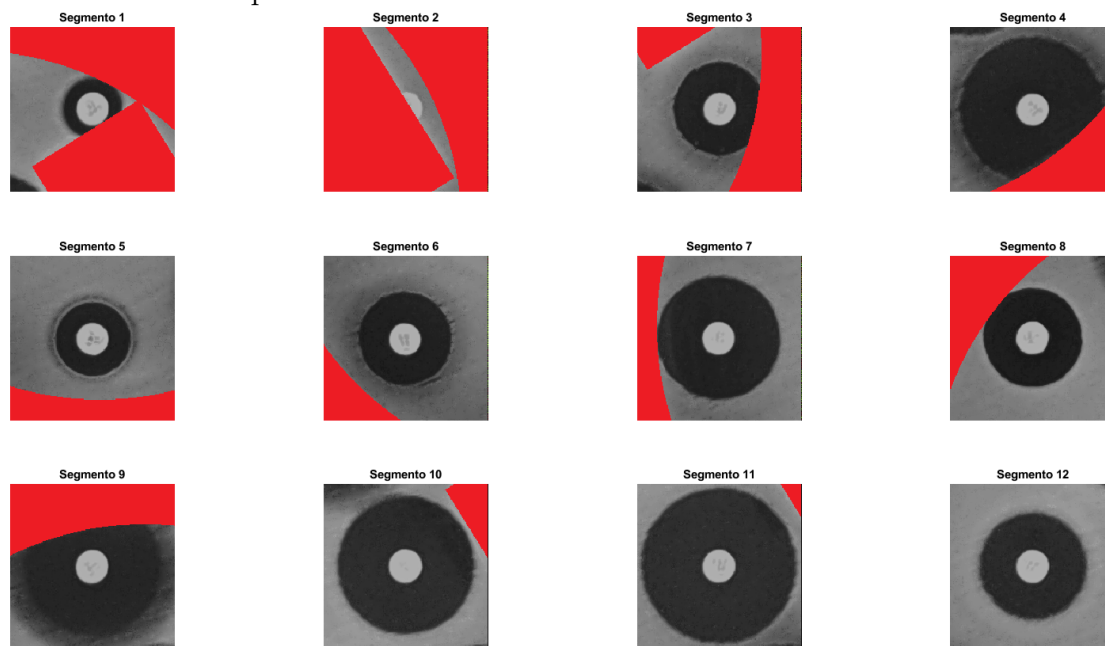
Posteriormente, cada possível halo será avaliado de forma isolada. Em razão disto, a imagem com alto tempo de exposição pré-processada é recortada. É feito um recorte quadrado para cada posição previamente detectada, com $35mm$ de lado. Este valor foi arbitrado pois dificilmente um halo de inibição atinge tal diâmetro e, mesmo que ocorra, este será sempre classificado como sensível. A Figura 33 mostra o exemplo de segmentos recortados da imagem.

3.3.8 Geração das curvas dos perfis radiais para cada halo de inibição

A próxima etapa do algoritmo consiste em traçar um perfil para cada halo de inibição, ou seja, transformar cada figura individualizada em uma curva que representa a intensidade do halo em função da distância do seu centro.

O primeiro passo foi gerar uma matriz de índices com as mesmas dimensões da imagem do segmento contendo o halo. Os valores dos elementos desta matriz são números inteiros e representam a distância euclidiana entre a posição do elemento e o elemento central desta matriz, conforme representado na Equação 8.

Figura 33 – Exemplo de recorte da imagem em segmentos para avaliação de cada halo de forma independente.



Autoria Própria

$$elemento(i, j) = \sqrt{(centro - i)^2 + (centro - j)^2} \quad (8)$$

O valor de intensidade de cinza de cada pixel do segmento é armazenado em um vetor conforme o índice correspondente na matriz de índices. A Figura 34 ilustra este processo. Pode-se perceber que o algoritmo desconsidera os pixels que representam a borda da placa e/ou a etiqueta, destacados em vermelho. O resultado da média de cada vetor se torna um dos pontos da curva do perfil do halo de inibição.

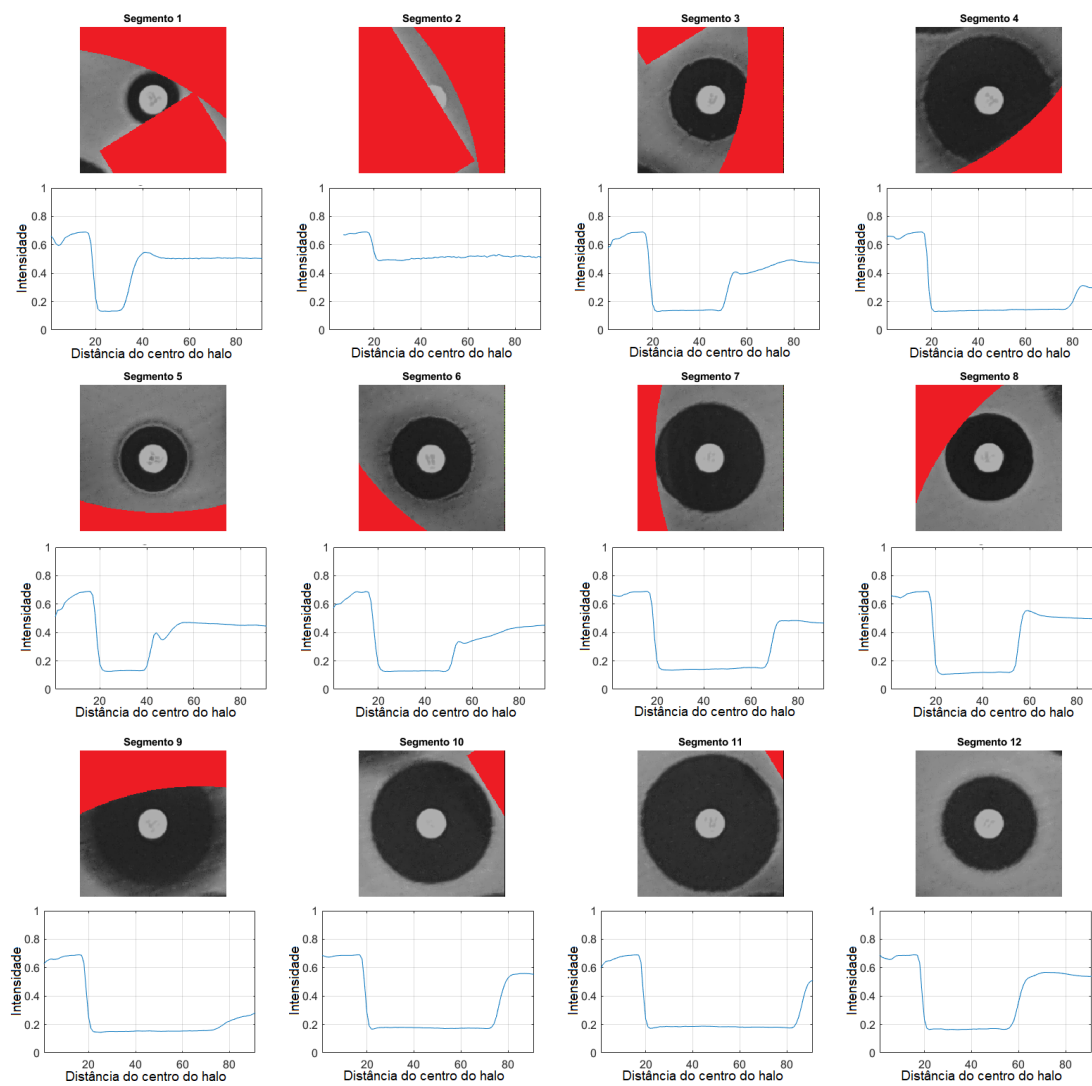
A Figura 35 ilustra os perfis gerados para cada um dos 12 segmentos de uma das placas de Petri. Note que a escala de cinza foi normalizada, assim a curva assume valores entre 0 e 1.

Por fim, nesta etapa, cada um das curvas é suavizada com um filtro de média de 5 pontos, e a porção que compreende o disco de antibiótico (raio de tamanho fixo), é removido pois não será utilizado. A Figura 36 ilustra o resultado desta etapa.

3.3.9 Estimação dos diâmetros dos halos de inibição

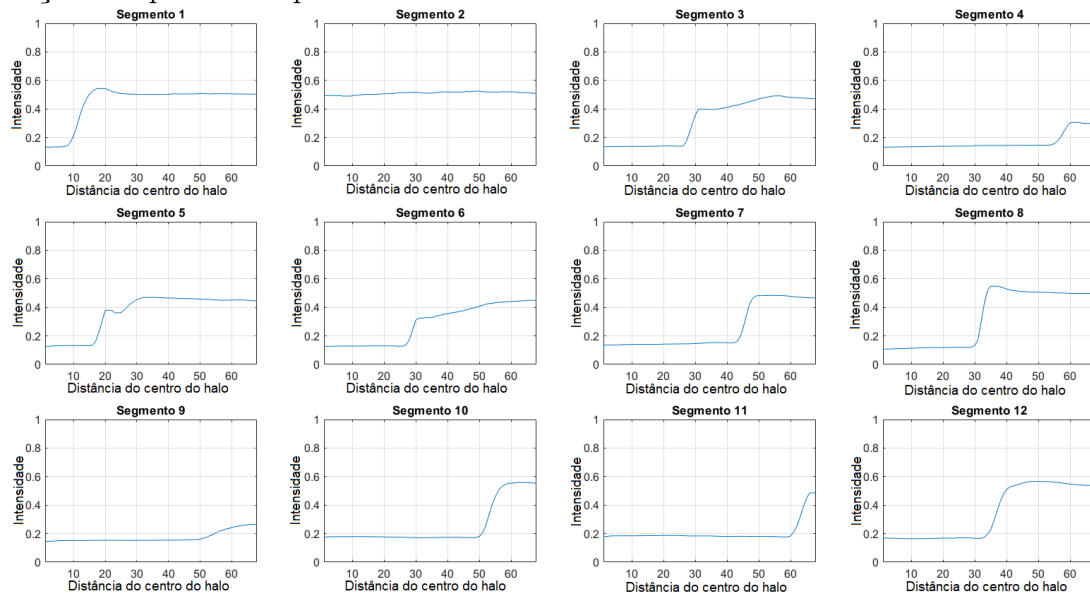
Estimar o diâmetro do halo consiste em identificar a posição da subida da curva do seu perfil, para isso foram realizadas duas derivadas consecutivas e a posição do máximo global foi considerado como o raio do halo de inibição (mais a distância referente ao disco de antibiótico previamente removido). Foi utilizada Equação 9 duas vezes consecutivas, fornecendo um resultado como no exemplo ilustrado na Figura 37.

Figura 35 – Relação entre os halos e os perfis gerados para cada um deles e um dada placa de Petri.



Autoria Própria

Figura 36 – Perfis dos halos de inibição após aplicação de filtro e da remoção da porção compreendida pelo disco de antibiótico.



Autoria Própria

$$\begin{aligned} X' &= [X(1) \quad X(2) \quad X(3) \quad \dots \quad X(m-1) \quad X(m)]' \\ &= [X(2) - X(1) \quad X(3) - X(2) \quad \dots \quad X(m) - X(m-1)] \end{aligned} \quad (9)$$

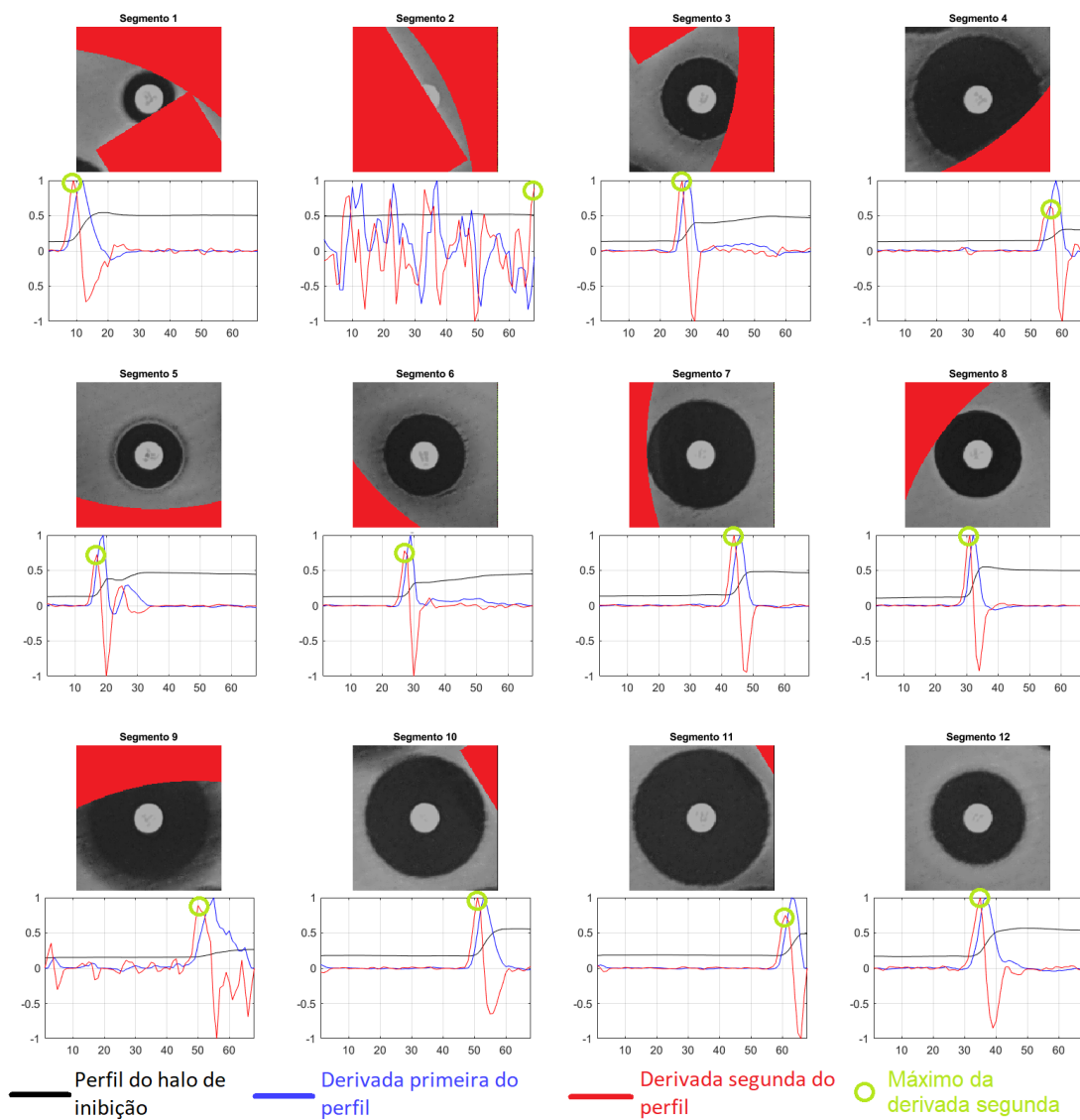
A posição no eixo das abcissas dos pontos encontrados é a informação bruta do raio do halo de inibição. Como sugestão de especialistas em resistência bacteriana, um fator de cautela foi inserido de modo a minimizar a probabilidade de um erro de medida grave. Subtraindo $1,5\text{mm}$ do valor encontrado, diminui-se a chance de um diagnóstico favorável a um antimicrobiano que na realidade não obteve desempenho satisfatório. Sabendo que os elementos dos vetores pertencentes ao disco de papel haviam sido removidos e que a informação relevante clinicamente é o diâmetro (D), pode-se calcular os valores com a Equação 10, onde R_{bruto} é o raio encontrado pelo algoritmo, R_{disco} é o raio do disco de antimicrobiano (conhecido) e $R_{cautela}$ é o fator de cautela.

$$\begin{aligned} D &= 2 \cdot (R_{bruto} + R_{disco} - R_{cautela}) = 2 \cdot (R_{bruto} + 3\text{mm} - 1,5\text{mm}) \\ D &= 2 \cdot R_{bruto} + 3\text{mm} \end{aligned} \quad (10)$$

3.3.10 Identificação dos halos do tipo “L”

Perfis de casos particulares em que não houve formação de halo, ou o mesmo é muito grande, são chamados tipo “L” na literatura. Este nome surge pois, considerando a região do disco de antibiótico, a intensidade conforme se afasta do centro, diminui e se mantém constante. Por outro lado, os perfis do tipo “U” decrescem

Figura 37 – Gráfico da derivada segunda do vetor de média. O máximo encontrado está realçado em vermelho.

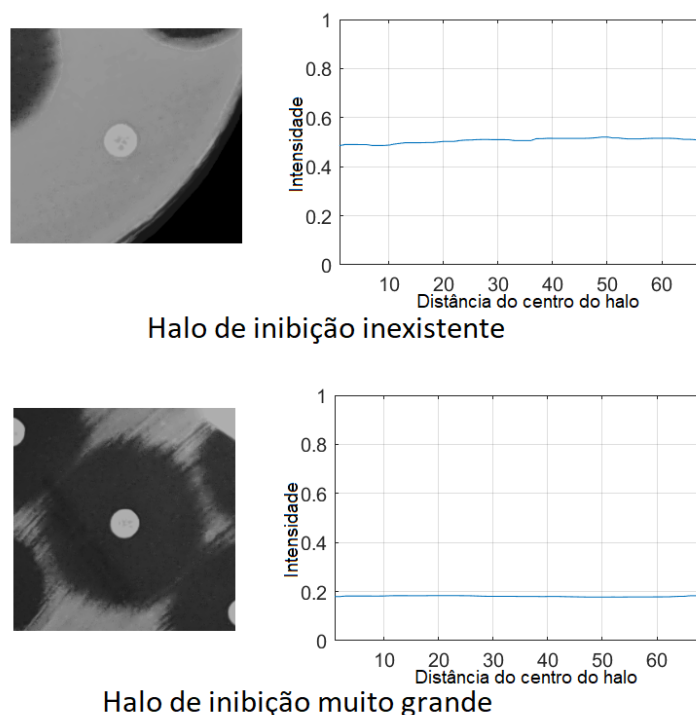


Autoria Própria

sua intensidade da região do disco até a região de inibição, e se eleva novamente na região de crescimento.

Os casos do tipo "L" devem ser detectados visto que, por gerarem um perfil praticamente constante, o método da derivada segunda não pode medi-los. Exemplos podem ser vistos na Figura 38

Figura 38 – Exemplo do comportamento do perfil quando não há halo de inibição (cima), ou quando este é muito grande (baixo). Estes perfis assumem o chamado tipo "L".

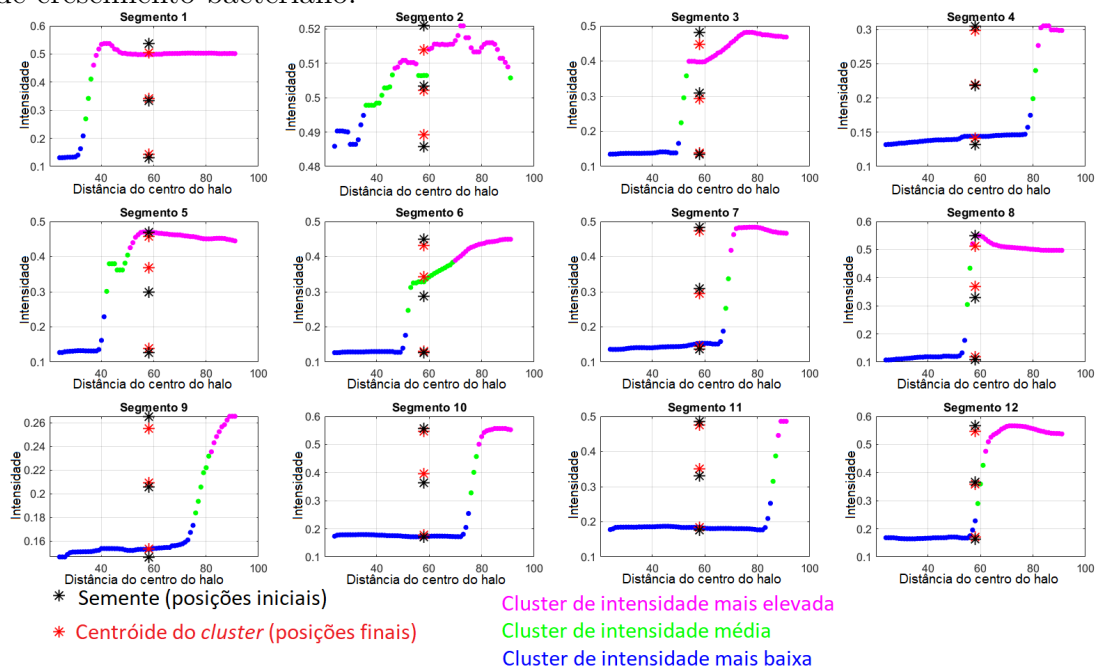


Autoria Própria

Cada elemento do halo de inibição foi agrupado em 3 *clusters* de intensidade utilizando o algoritmo de *K-means*, onde as sementes foram geradas a partir do valor mínimo, máximo e médio de cada um dos halos. A Figura 39 ilustra este processo de agrupamento, onde deve-se atentar-se especialmente no comportamento do "segmento 2", onde coincidentemente houve a presença significativa de parte da etiqueta. Note que os valores estão muito próximos, portanto os centroides possuem distâncias muito pequenas, ou seja, desvio padrão pequeno.

Desvios padrão menores que 0,03 (valor arbitrário que forneceu melhor resultado), foram marcados como perfis do tipo "L". A média dos valores dos centroides mais elevados e a média dos valores dos centroides mais reduzidos dos demais perfis (tipo "U" foram obtidos para cada placa. Se a média dos valores dos pontos de um perfil do "L" é mais próximo da média dos centroides mais altos, considera-se halo inexistente, caso contrário (mais próximo da média dos centroides mais baixos), é

Figura 39 – Ilustração do agrupamento por *k-means*. Onde os agrupamentos acabam por representar, na maior parte das vezes, a região de inibição, a transição e a região de crescimento bacteriano.



Autoria Própria

halo muito grande.

Para halos inexistentes foi atribuído o diâmetro de $6mm$ e para halos muito grandes foi atribuído o diâmetro de $35mm$, independente do valor calculado na Equação 10.

A partir deste algoritmo, todas as placas foram avaliadas, e uma tabela com todos os resultados foi gerada para posterior análise de desempenho.

3.4 Obtenção dos dados utilizados

A semeadura de bactérias foi realizada pela equipe de funcionários do laboratório de microbiologia do HCPA seguindo os procedimentos descritos pelo padrão de desempenho do CLSI (CLINICAL; INSTITUTE, 2019), de forma a garantir um crescimento conflúente. Uma média de 10 e um máximo de 12 discos foram distribuídas sobre placas de cultura de $120mm$ contendo ágar de Mueller-Hinton. A combinação de antimicrobianos designada para cada teste é predefinida a partir do microrganismo testado e do meio em que é coletado.

No período da manhã no HCPA, são realizados os testes clínicos com os isolados coletados de pacientes reais e, as medidas utilizando o Osiris[®] são armazenadas no sistema de prontuários do hospital. As placas são então descartadas em um contêiner

próprio para este rejeito, de onde foram obtidas para realização das aquisições no aparato desenvolvido e para as medições manuais pelo especialista do Laboratório de Resistência Bacteriana do HCPA. Posteriormente, via sistema de prontuários, são coletados os dados obtidos pelo equipamento comercial (diâmetros e espécie do isolado). Estes elementos compõem o conjunto de dados utilizados para todos os testes neste trabalho. Há baixo risco de contaminação durante estes procedimentos visto que são utilizadas luvas de vinil para a manipulação das placas e as bactérias se mantêm fixas ao meio de cultura.

A relação dos 24 tipos de discos de agentes microbianos utilizados está exposta na Tabela 1 e os isolados encontrados são apresentados na Tabela 2.

Do ponto de vista clínico, a informação necessária para a correta prescrição do fármaco não é um valor quantitativo (R: Resistente, I: Intermediário e S: Sensível), conforme mencionado no início deste trabalho. Esta informação é obtida através de tabelas disponibilizadas pelo CLSI (ou EUCAST e BrCAST), onde o resultado para cada halo depende de seu diâmetro da bactéria da cultura e do antibiótico do disco.

Estas tabelas foram compiladas de forma que pudessem ser acessadas a partir de uma combinação de indexações e estruturas condicionais (*if, else if, else*).

A Figura 40 apresenta a tabela gerada a partir das condições do CLSI referente à família de bactérias *Enterobacteriaceae*. Cada uma das linhas apresenta as condições que determinam o resultado "RIS" correspondente ao diâmetro e ao antimicrobiano correspondente.

Tabela 1 – Tabela com a relação de agentes antimicrobianos utilizados, suas massas e contagem de usos.

Antibiótico	Massa	Contagem de Discos Utilizados
Amicacina	30 μ g	36
Amoxicilina-acido clavulânico	30 μ g	44
Ampicilina10	10 μ g	4
Cloranfenicol30	30 μ g	7
Ceftazidima30	30 μ g	44
Ciprofloxacino5	5 μ g	7
Gentamicina10	10 μ g	52
Cefuroxima30	30 μ g	42
Clindamicina2	2 μ g	6
Doxiciclina30	30 μ g	7
Eritromicina15	15 μ g	6
Nitrofurantoina300	300 μ g	39
Cefepima30	30 μ g	45
Cefoxitina30	30 μ g	7
Levofloxacino5	5 μ g	6
Meropenem10	10 μ g	45
Norfloxacino10	10 μ g	39
Novobiocin5	5 μ g	1
PoliximinaB300	300 μ g	2
Rifampicina5	5 μ g	7
Ampicilina-sulbactam20	20 μ g	41
Sulfametoxazol-trimetoprim25	25 μ g	51
Tobramicina10	10 μ g	3
Piperacilina-tazobactam110	110 μ g	45

Figura 40 – Tabela implementada a partir das regras do CLSI para a família Enterobacteriaceae. Cada linha apresenta os limiares de interpretação qualitativa correspondentes a cada antibiótico utilizado.

Agente	S ≥	I	R <	R ≤
Ácido nalidixico30	19		14	13
Amicacina30	17		15	14
Amoxicilina-acido clavulânico30	18		14	13
Ampicilina-sulbactam20	15		12	11
Ampicilina10	17		14	13
Azitromicina15	13		13	12
Aztreonam30	21		18	17
Cefaclor30	18		15	14
Cefamandol30	18		15	14
Cefazolina30	15		15	14
Cefdinir5	20		17	16
Cefepima30	25		19	18
Cefetamete 10	18		15	14
Cefixima5	19		16	15
Cefmetazol30	16		13	12
Cefonicida30	18		15	14
Cefoperazona75	21		16	15
Cefotaxima30	26		23	22
Cefotetan30	16		13	12
Cefoxitina30	18		15	14
Cefpodoxima 10	21		18	17
Cefprozil30	18		15	14
Ceftarolina30	23		20	19
Ceftazidima-avibactam50	21		21	20
Ceftazidima30	21		18	17
Ceftibuteno30	21		18	17
Ceftizoxima30	25		22	21
Ceftolozana-tazobactam40	21		18	17
Ceftriaxona30	23		20	19
Cefuroxima30	23		15	14
Cefuroxima30 (parenteral)	18		15	14
Cinoxacino 100	19		15	14
Ciprofloxacino5	21		16	15

Autoria Própria

Tabela 2 – Tabela com a relação dos isolados de bactérias encontrados no decorrer dos testes.

Isolado	Contagem
Achromobacter sp	1
Enterobacter sp	1
Escherichia coli	29
Klebsiella pneumoniae	6
Morganella morganii	1
Proteus penneri	1
Pseudomonas aeruginosa	6
Serratia marcescens	1
Staphylococcus aureus	4
Staphylococcus epidermidis	2
Staphylococcus sp coagulase negativo	1

4 EXPERIMENTOS E RESULTADOS

Nos capítulos precedentes foi apresentado o desenvolvimento de um protótipo para medição de halos de inibição utilizando técnicas de processamento de imagens. Um conjunto de dados de 49 placas de Petri foi coletado, resultando em um total de 564 halos de inibição para serem medidos e avaliados. As medidas realizadas pelo algoritmo proposto neste trabalho foram comparadas com aquelas efetuadas pelo equipamento comercial Osiris[®] (REF). Pelo fato de todas as medidas utilizando do equipamento comercial terem sido realizadas em rotinas de diagnósticos reais, com interferência humana qualificada quando necessária, foi considerado como o padrão de referência. Também foram avaliados o desempenho do método manual (MM) usando régua e da implementação do RPAA (IRPAA) conforme o artigo original, para comparação.

Trabalhos anteriores não esbarraram na dificuldade proporcionada pela presença de uma etiqueta de identificação nas placas de antibiograma. Esta etiqueta é uma particularidade encontrada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e possivelmente em outras instituições assistenciais. Seu propósito é identificar o paciente e o número do teste que está sendo realizado, necessitando que sua posição deva ser de fácil visibilidade para os funcionários do laboratório. Ao acompanhar a rotina de leitura de placas do HCPA utilizando o equipamento Osiris[®], foi possível verificar que o mesmo realiza leituras errôneas dos diâmetros halos de inibição que a etiqueta interfere. Isto não configura um problema grave pois o operador consegue efetuar a correção manual destas leituras.

4.1 Localização das posições dos centros dos halos de inibição

Nesta etapa do código, o método se mostrou 100% eficiente, visto que em todas as 49 placas as 564 posições foram encontradas, e todas elas estavam corretas.

4.2 Identificação das regiões compreendidas pela etiqueta de identificação

Assim como a localização do centros dos halos, a localização da etiqueta se mostrou 100% correta ao se inspecionar o resultado para cada uma das 49 placas visualmente. Pequenos deslocamentos que podem ocorrer na posição do centro da etiqueta, assim como um desalinhamento na sua direção são compensados pelo fato do elemento que a elimina possuir dimensão ligeiramente superior.

4.3 Estimação dos diâmetros dos halos de inibição

As ferramentas estatísticas utilizadas neste trabalho, para avaliação dos métodos de medição de halos de inibição, foram:

1. Comparação direta entre as medidas: foram levantados histogramas para avaliar as diferenças obtidas nas medidas entre o equipamento comercial de referência (REF) e o algoritmo desenvolvido (AD), o método manual (MM) e a implementação do RPAA (IRPAA), descrito em HEJBLUM *et al.* (1993). Diferenças maiores de $14mm$ foram agrupadas, pois representam o pior caso onde a identificação errônea de um caso "resistente" é considerada "sensível".
2. Coeficiente de correlação de Pearson: apresenta o grau de associação linear entre as medidas dos métodos usando o algoritmo desenvolvido (AD), o Osiris[®] (REF), o método manual (MM) e a implementação original do RPAA (IRPAA). A partir da Equação 11 será avaliada o quão próximas as medidas variam entre $+1$ e -1 . Quanto mais próximo de $+1$, mais perfeitamente positiva é a correlação, quanto mais próxima de -1 , mais perfeitamente negativa é a correlação. E quanto mais próximo de 0 , menos correlacionadas são as medidas (MUKAKA, 2012).

$$\rho(A, B) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} \right) \left(\frac{B_i - \mu_B}{\sigma_B} \right) \quad (11)$$

onde μ_A e σ_A são respectivamente a média e o desvio padrão de A , e μ_B e σ_B são a média e o desvio padrão de B .

3. Coeficiente de concordância Kappa: avalia de forma qualitativa a concordância entre 2 avaliadores diferentes observando N itens. No caso deste trabalho, o consenso entre o algoritmo proposto e cada método de referência (REF e MM) (CYR; FRANCIS, 1992). O valor de Kappa (κ) pode assumir qualquer valor entre -1 (representa um desacordo sistemático entre os métodos) e $+1$ (total concordância entre métodos). Se o valor for 0 , a concordância entre

os métodos é nula (LANDIS; KOCH, 1977). A determinação de Kappa (κ) é feita utilizando a Equação 12, onde P_0 é proporção observada da concordância, ou seja, a razão entre as observações concordantes e todas as observações. P_e representa a taxa hipotética de aceitação, calculada com a Equação 13.

$$\kappa = 1 - \frac{1-P_0}{1-P_e} \quad (12)$$

$$p_e = \frac{1}{N^2} \sum_k n_{k1}n_{k2} \quad (13)$$

onde 1 e 2 são os avaliadores, k são as categorias avaliadas (no caso deste trabalho são 3 categorias: R, S e I). n_{ki} representa o número de vezes que o avaliador i predisse a categoria k .

A Tabela 3, proposta por Landis e Koch, sugere as seguintes relações entre o índice e grau de acordo entre as medidas.

Tabela 3 – Relação entre índice Kappa e grau de acordo.

Índice Kappa de Cohen	Grau de acordo
0,00	Sem acordo
0,00 a 0,20	Insignificante
0,21 a 0,40	Mediano
0,41 a 0,60	Moderado
0,61 a 0,80	Substancial
0,81 a 1,00	Quase Perfeito

Fonte: LANDIS; KOCH (1977).

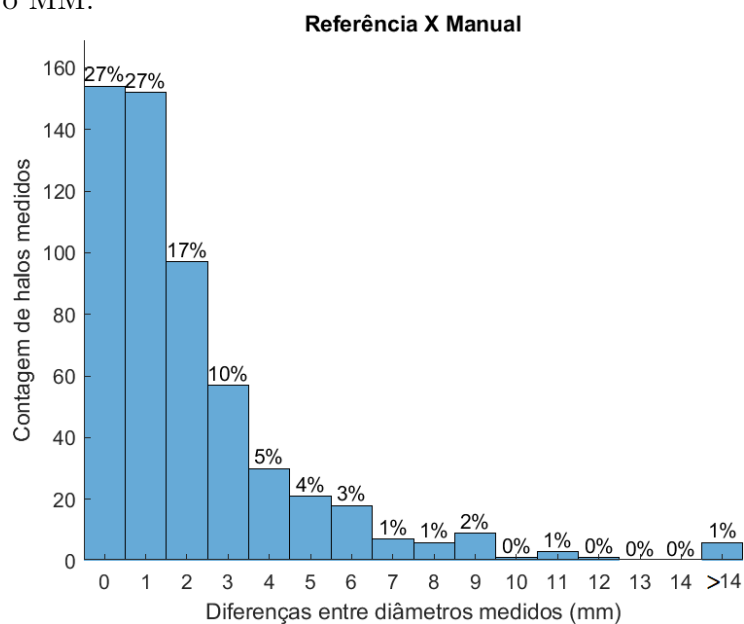
4. A FDA recomenda os seguintes limites para a discordância entre o método e o padrão utilizado como referência. Erros maiores (EM), ou seja, quando o método ou equipamento a ser testado fornece um resultado resistente, porém a referência garante que é sensível, devem corresponder a menos de 3% das medidas. Caso contrario, na referência seja resistente e o método ou equipamento avaliado entrega um resultado sensível, é considerado um erro muito maior (EMM), e este não deve ultrapassar 1.5% dos casos. Todas as outras discrepância são consideradas erros menores (Em) (HUMPHRIES *et al.*, 2018).

4.3.1 Análise por histogramas

A análise por histograma permite verificar de forma percentual as diferenças encontradas entre as medidas de referência (REF) e os outros métodos utilizados. Na Figura 41 pode-se verificar a diferença entre as medidas realizadas pelo REF

e pelo Método Manual (MM) realizado pelos integrantes do LABRESIS utilizando régua.

Figura 41 – Histograma das diferenças dos diâmetros medidos, em milímetros, entre a referência e o MM.



Autoria Própria

A Figura 42 apresenta o histograma da diferença entre as medidas realizadas entre o REF e o IRPAA.

Por fim a Figura 43 apresenta o histograma da diferença entre as medidas realizadas entre o REF e o algoritmo desenvolvido.

4.3.2 Avaliação da correlação entre os métodos

Na Tabela 4 são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson entre as medidas de referência e o MM, IRPAA e AD. As Figuras 44, 45 e 46 apresentam os gráficos destas correlações.

Tabela 4 – Tabela que apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre as medidas de referência (REF) e os demais métodos.

	Referência
Método Manual	$\rho = 0,9033$
RPAA Original	$\rho = 0,7312$
Algoritmo desenvolvido	$\rho = 0.8893$

Figura 42 – Histograma das diferenças dos diâmetros medidos, em milímetros, entre a referência e o IRPAA.

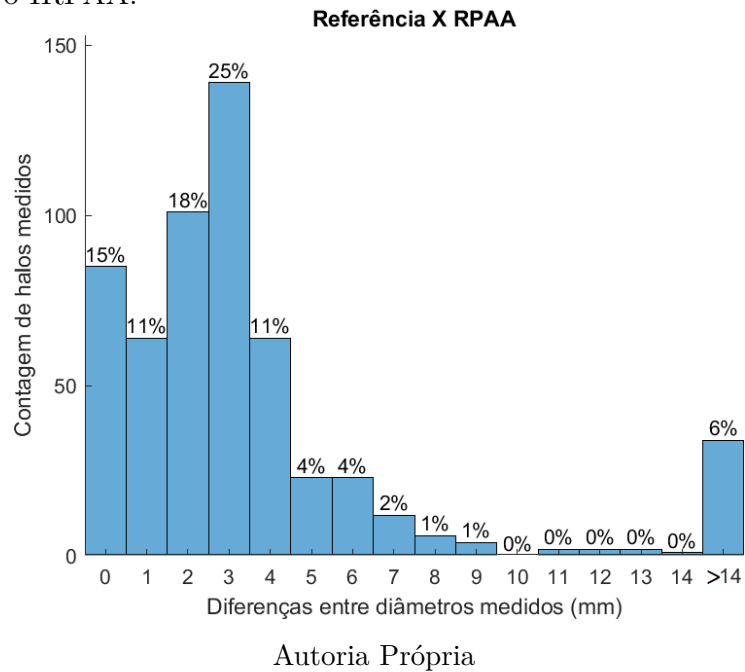
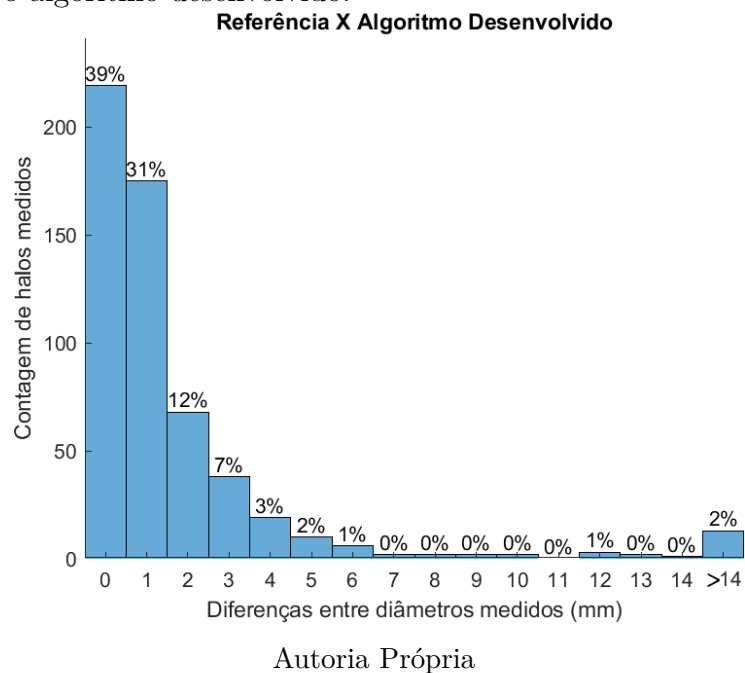


Figura 43 – Histograma das diferenças dos diâmetros medidos, em milímetros, entre a referência e o algoritmo desenvolvido.



4.3.3 Avaliação da concordância entre os métodos

A avaliação de concordância observada (CO) entre os resultados qualitativos das medidas com os métodos foi avaliada utilizando a concordância observada, ou seja, o percentual das vezes que os métodos encontraram o mesmo resultado entre a referência. Também foi calculado o índice Kappa (κ) nestas condições. Na Tabela 5 são apresentados estes resultados.

Tabela 5 – Tabela que apresenta os índices de concordância Kappa entre a avaliação qualitativa das medidas de referência (REF) e os demais métodos.

	Referência
Método Manual	$CO = 90,93\%$ $\kappa = 0.8056$
RPAA Original	$CO = 85,94\%$ $\kappa = 0,6861$
Algoritmo desenvolvido	$CO = 89,68\%$ $\kappa = 0.7799$

4.3.4 Avaliação de ocorrência de erros menores, maiores e muito maiores

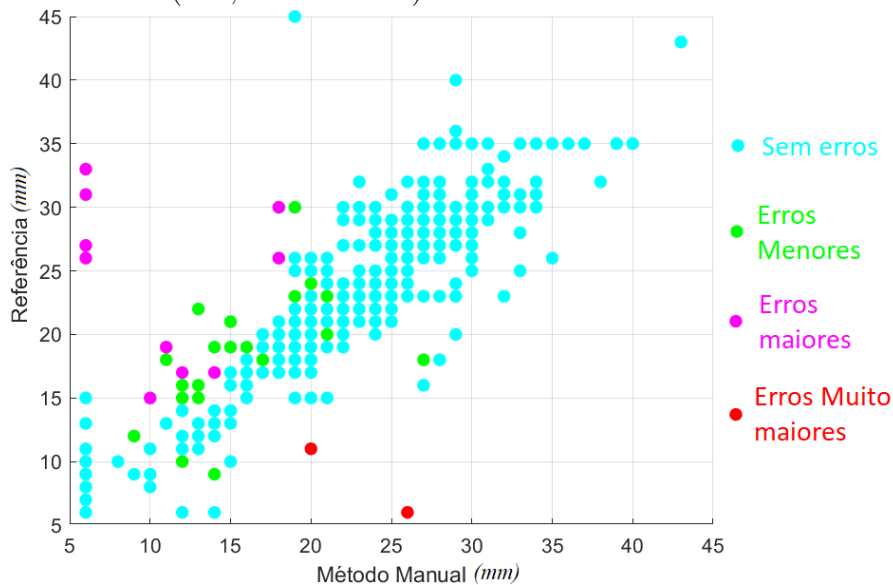
Por fim foram avaliadas as ocorrências dos Erros menores (Em), Erros Maiores (EM) e Erros Muito Maiores (EMM). A Tabela 6 mostra estes resultados, que são ilustrados nas Figuras 44, 45 e 46.

Tabela 6 – Tabela que apresenta os percentuais de ocorrências dos Erros Menores, Maiores e Muito Maiores.

	Referência
Método Manual	$Em = 6,76\%$ $EM = 1,96\%$ $EMM = 0,36\%$
RPAA Original	$Em = 6,94\%$ $EM = 5,52\%$ $EMM = 1,60\%$
Algoritmo desenvolvido	$Em = 7,83\%$ $EM = 1,25\%$ $EMM = 1,25\%$

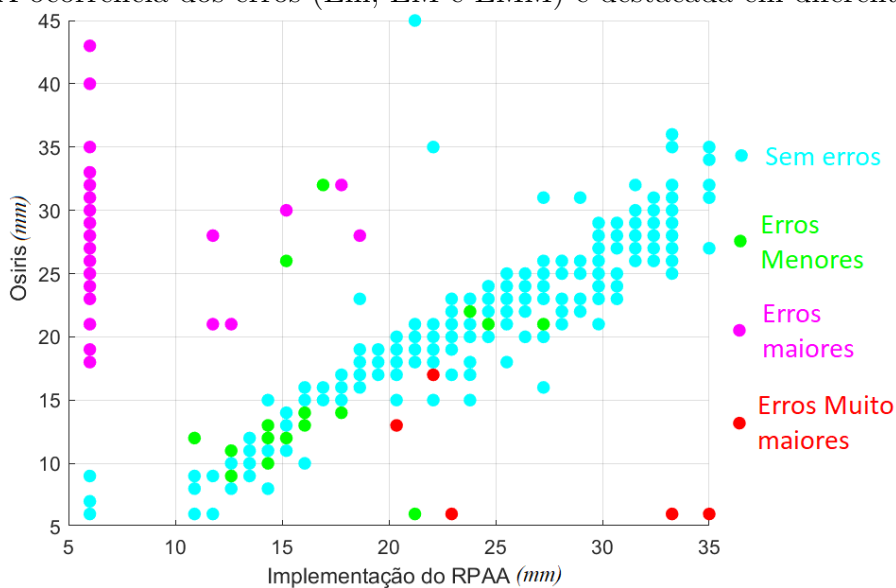
Na Tabela 7 são comparados os resultados do método proposto com os resultados de outros trabalhos.

Figura 44 – Correlação linear entre as medidas da referência e o método manual. A ocorrência dos erros (Em, EM e EMM) é destacada em diferentes cores.



Autoria Própria

Figura 45 – Correlação linear entre as medidas da referência e a implementação do RPAA. A ocorrência dos erros (Em, EM e EMM) é destacada em diferentes cores.



Autoria Própria

Figura 46 – Correlação linear entre as medidas da referência e o algoritmo desenvolvido. A ocorrência dos erros (Em, EM e EMM) é destacada em diferentes cores.

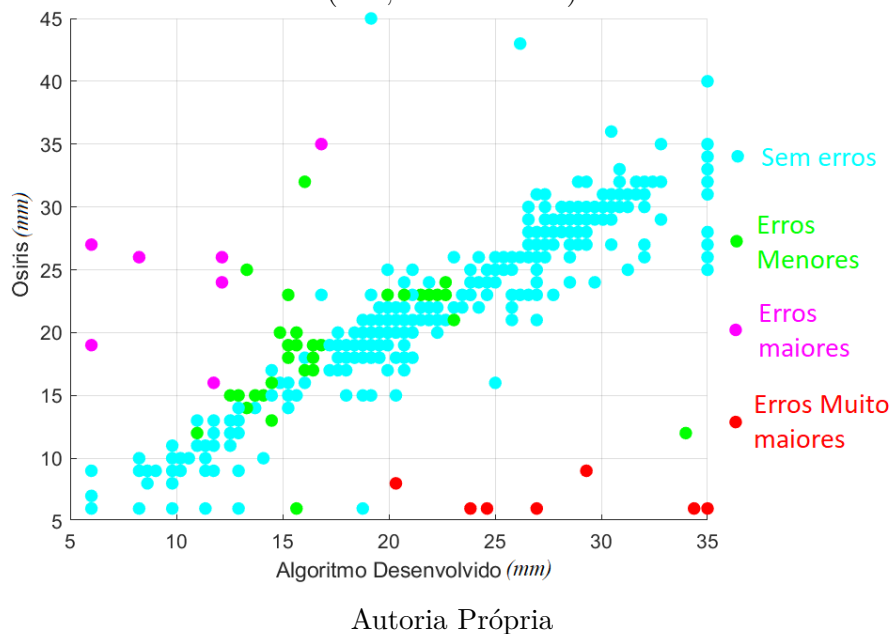


Tabela 7 – Valores de correlação de Pearson, índice Kappa, concordância, erro muito maior e erro maior para métodos de outros autores.

Trabalho	Pearson	Kappa	Concordância	Erro Muito Maior	Erro Maior
Este trabalho	0,89	0,780	89,7%	1,2%	1,2%
AIA ambientais ^a	0,85	0,773	88%	5,0%	2,0%
AIA clínicas ^a	0,87	0,823	93%	0,9%	2,6%
RPAA (resultados do artigo) ^b	-	0,919	95,5%	0,8%	1,2%
AntibiogramJ câmera ^c	-	0,8	89%	1%	4%
AntibiogramJ smartphone ^c	-	0,736	85%	3%	6%
Students t-test ^d	-	0,84	93,1%	1,4%	1,0%

^a COSTA(2016)

^b HEJBLUM et al. (1993)

^c ALONSO et al. (2017)

^d GAVOILLE; BARDY; ANDREMONT (1994)

Foi possível observar que o algoritmo desenvolvido mostrou uma correlação maior do que os demais trabalhos (que disponibilizaram este dado), comparando-se quantitativamente. No entanto, quando avaliado qualitativamente (correlação e Kappa) o mesmo apresenta um desempenho intermediário.

Deve-se ressaltar que este trabalho teve o desafio de realizar as leituras utilizando amostras de uso real em rotina assistencial de um hospital de grande porte, contendo as etiquetas de identificação que são colocadas de forma arbitrária na superfície inferior da placa de Petri. Portanto, a fim de fazer uma comparação com as mesmas condições, foi implementado o algoritmo proposto por HEJBLUM *et al.* (1993), a fim de testá-lo nas mesmas condições. Desta forma percebe-se que há uma grande degradação no desempenho deste, quando testado com a base de imagens deste trabalho, principalmente pelo fato de permitir identificar a posição da etiqueta na placa.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi apresentado o desenvolvimento do protótipo de um sistema para identificação e medição semiautomática de halos de inibição em testes de suscetibilidade por antibiograma de disco-difusão, utilizando conceitos de processamento de imagem e visão computacional.

Um conjunto de dados, para os testes de validação do algoritmo proposto, foi gerado a partir da aquisição de imagens de placas de antibiograma nas rotinas do laboratório de microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Desta forma foi possível fazer avaliações em situações e objetos reais da rotina clínica de um hospital de grande porte.

A utilização da transformada de Hough para identificar as posições dos centros das zonas de inibição se mostrou eficaz, visto que houve a localização correta de todos os discos de agente antimicrobiano nas 53 placas analisadas. Isto ocorreu ao se garantir uma iluminação padronizada e ao contraste significativo entre o disco branco e a superfície preta sob a placa de Petri.

Para medição dos diâmetros das zonas de inibição formadas, foi implementado o algoritmo original de RPAA descrito por HEJBLUM *et al.* (1993) a fim de sustentar uma comparação de performance entre o algoritmo proposto, na mesma base de dados.

Para o método manual (MM), a correlação de Pearson de 0,9033 é classificada como "muito forte", segundo MUKAKA (2012). O índice Kappa de 0,8056, segundo MCHUGH (2012), é tida como "quase perfeito". No entanto, comparando-se as medidas obtidas com a referência (equipamento comercial Osiris[®]), a concordância foi de 90.93%.

Para a implementação do RPAA (IRPAA), a correlação de Pearson de 0,7312 é classificada como "forte", segundo MUKAKA (2012). O índice Kappa de 0,6861, segundo MCHUGH (2012), é tida como "substancial". No entanto, comparando-se as medidas obtidas com a referência (equipamento comercial Osiris[®]), a concordância foi de 85.94%.

Para o algoritmo desenvolvido (AD), a correlação de Pearson de 0,8893 é clas-

sificada como "forte", segundo MUKAKA (2012). O índice Kappa de 0,7799, segundo MCHUGH (2012), é tida como "substancial". No entanto, comparando-se as medidas obtidas com a referência (equipamento comercial Osiris[®]), a concordância foi de 89,68%.

Isto mostra que a inclusão de novos recursos no algoritmo melhora a performance de medição dos halos de inibição da base de dados estudada, porém ainda é difícil obter um resultado tão satisfatório quanto o olho humano.

Quanto aos Erros Maiores (1,25%) e Erros Muito Maiores (1,25%), ambos ficaram dentro da faixa recomendada (3,0% e 1,5%). Significa, portanto, que é improvável que um antibiótico ineficaz seja administrado ao paciente de forma errônea, amparado no laudo do teste realizado por um equipamento baseado no algoritmo desenvolvido neste trabalho, sem interferência humana. De qualquer maneira, um dispositivo de uso em rotinas clínicas deve permitir um ajuste manual posterior, assim como já ocorre com os equipamentos comerciais disponíveis no mercado.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, observando o comportamento do algoritmo e os motivos que levam a ocorrência de erros, foi possível perceber de onde eles ocorrem. Na maior parte dos casos a não uniformidade de iluminação acarreta em variações de intensidade na própria região do halo e, principalmente entre halos distantes. Isto é prejudicial principalmente pois certas condições são alcançadas dentro do algoritmo se avaliando a placa como um todo. Em poucos casos a placa não se encontrava disposta bem no centro da zona de captura de imagem. Isto acarretava a incompleta eliminação da borda da placa, que interferia nas medidas dos halos adjacentes.

Atualmente, o algoritmo desenvolvido em MATLAB neste projeto foi portado parcialmente para a linguagem de programação Python, assim como as orientações definidas pelo BrCAST (que é o padrão sendo adotado no Brasil hoje em dia). Uma interface gráfica para interação com o operador e a interação com o sistema de prontuários eletrônicos está sendo desenvolvido em conjunto com a própria equipe do laboratório de microbiologia do HCPA e equipe de TI, de forma a torná-la a mais amigável e funcional possível para o público que se propõe. Com isto, como mencionado na seção de objetivos, está sendo desenvolvido um protótipo funcional que será avaliado durante os testes clínicos no HCPA.

Futuramente, do ponto de vista clínico, 10 centros de referência em microbiologia dentre os laboratórios do Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana (INPRA), bem como laboratórios de hospitais da rede EBSEH, receberão uma unidade do equipamento desenvolvido para realização de um ensaio clínico-laboratorial.

Do ponto de vista experimental poderão ser avaliadas outras abordagens para o algoritmo de detecção dos halos de inibição, baseados em técnicas modernas como

SVM e *Machine Learning*, além da busca por uma análise dinâmica do crescimento bacteriano nas placas ou com o tempo reduzido (menor que as 18 horas de incubação tradicional).

Um novo protótipo de aquisição de imagens, utilizando câmeras apropriadas para uso em laboratório e estudos mais aprofundados quanto a reflexos e sombras, está sendo desenvolvido a fim de garantir a uniformidade ideal que garantirá um melhor desempenho.

Os métodos que forem padronizados poderão ser difundidos aos laboratórios de hospitais e clínicas que tiverem interesse em utilizar essas técnicas em suas rotinas.

REFERÊNCIAS

Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Produtos para Saúde - Consultas**. <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/>, Acessado em 20/04/2020.

Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Coleta, acondicionamento, transporte, recepção e destinação de amostras para análises laboratoriais no âmbito do sistema nacional de vigilância sanitária**. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

ATHERTON, T. J.; KERBYSON, D. J. Size invariant circle detection. **Image and Vision computing**, [S.l.], v. 17, n. 11, p. 795–803, 1999.

BALLARD, D.; BROWN, C. Region growing; a local technique: blob coloring. **Computer vision**, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, [S.l.], p. 151–152, 1982.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of pharmaceutical analysis**, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, [S.l.], v. 45, n. 4_{ts}, p. 493–496, 1966.

CANNY, J. A computational approach to edge detection. **IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence**, [S.l.], n. 6, p. 679–698, 1986.

CLINICAL; INSTITUTE, L. S. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Eleventh Informational Document M_{Wo}-S₁₁. Wayne, EUA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Wayne, EUA, 2018.

COSTA, L. F. R. **Sistema de automatização do antibiograma por disco-difusão em aplicação clínica e ambiental**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) — Universidade de Brasília, 2016.

CYR, L.; FRANCIS, K. Measures of clinical agreement for nominal and categorical data: the kappa coefficient. **Computers in biology and medicine**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 239–246, 1992.

DAVIES, E. R. **Machine vision: theory, algorithms, practicalities**. [S.l.]: Elsevier, 2004.

DUDA, R. O.; HART, P. E. **Use of the Hough transformation to detect lines and curves in pictures**. [S.l.]: SRI INTERNATIONAL MENLO PARK CA ARTIFICIAL INTELLIGENCE CENTER, 1971.

DYE, C. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. **Phil. Trans. R. Soc. B**, [S.l.], v. 369, n. 1645, p. 20130426, 2014.

FINLAND, M. Emergence of antibiotic-resistant bacteria. **New England Journal of Medicine**, [S.l.], v. 253, n. 23, p. 1019–1028, 1955.

GEISS, H. K.; KLAR, U. E. Evaluation of the BIOMIC video reader system for routine use in the clinical microbiology laboratory. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 151–155, 2000.

PEARSON (Ed.). **Digital Image Processing**. Terceira. ed. [S.l.]: Pearson, 2007.

HEJBLUM, G. *et al.* Automated interpretation of disk diffusion antibiotic susceptibility tests with the radial profile analysis algorithm. **Journal of clinical microbiology**, [S.l.], v. 31, n. 9, p. 2396–2401, 1993.

HOMBACH, M.; ZBINDEN, R.; BÖTTGER, E. C. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader. **BMC microbiology**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 225, 2013.

HOUGH, P. V. C. **Method and means for recognizing complex patterns**. US Patent 3,069,654.

HUDZICKI, J. **Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol**. [S.l.]: American Society of Microbiology, 2009.

HUMPHRIES, R. M. *et al.* CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. **Journal of clinical microbiology**, [S.l.], v. 56, n. 4, p. e01934–17, 2018.

ISO 20776-1. **Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices.** [S.l.]:

International Organization for Standardization, 2006.

JENKINS, S. G.; SCHUETZ, A. N. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *In: MAYO CLINIC PROCEEDINGS*, 2012.

Proceedings [...] [S.l.: s.n.], 2012. v. 87, n. 3.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **biometrics**, [S.l.], p. 159–174, 1977.

LIU, Q. *et al.* Detection of Quasi-circular vegetation community patches using Circular Hough Transform based on ZY-3 satellite image in the Yellow River Delta, China. *In: GEOSCIENCE AND REMOTE SENSING SYMPOSIUM (IGARSS), 2013 IEEE INTERNATIONAL*, 2013. **Proceedings [...]** [S.l.: s.n.], 2013. p. 2149–2151.

MANUAL Para Regularização de Produtos para Diagnóstico in vitro na ANVISA. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016.

MAZALAN, S. M.; MAHMOOD, N. H.; RAZAK, M. A. A. Automated red blood cells counting in peripheral blood smear image using circular Hough transform. *In: ARTIFICIAL INTELLIGENCE, MODELLING AND SIMULATION (AIMS)*, 2013, 2013. **Proceedings [...]** [S.l.: s.n.], 2013. p. 320–324.

MCFARLANE, M. D. Digital pictures fifty years ago. **Proceedings of the IEEE**, [S.l.], v. 60, n. 7, p. 768–770, 1972.

MCHUGH, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. **Biochemia medica: Biochemia medica**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 276–282, 2012.

MUKAKA, M. M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

NIJS, A. *et al.* Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. **Journal of clinical microbiology**, [S.l.], v. 41, n. 8, p. 3627–3630, 2003.

PATEL, J. B. *et al.* Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *In: Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition.* [S.l.]: American Society of Microbiology, 2011. p. 1122–1143.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, [S.l.], v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PORTARIA n° 64, de 12 de dezembro de 2018. Brasília, DF, 2018.

RHODY, H. Lecture 10: Hough circle transform. **Chester F. Carlson Center for Imaging Science, Rochester Institute of Technology**, [S.l.], 2005.

RODLOFF, A. *et al.* Susceptible, intermediate, and resistant—the intensity of antibiotic action. **Deutsches Ärzteblatt International**, [S.l.], v. 105, n. 39, p. 657, 2008.

SANCHEZ, M. A. *et al.* Evaluation of the OSIRIS video reader system for disk diffusion susceptibility test reading. **Clinical microbiology and infection**, [S.l.], v. 7, n. 7, p. 352–357, 2001.

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, [S.l.], v. 59, n. suppl_2, p. S71–S75, 2014.

PRESS, C. (Ed.). **Digital Image Processing and Analysis: applications with matlab and cviptools**. [S.l.]: CRC Press, 2017.

UMBAUGH, S. E. **Digital Image Processing and Analysis: applications with matlab and cviptools**. [S.l.]: CRC Press, 2017.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, [S.l.], v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

World Health Organization and others. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva, Suíça: World Health Organization, 2014.

YAO, Z.; YI, W. Curvature aided Hough transform for circle detection. **Expert Systems with Applications**, [S.l.], v. 51, p. 26–33, 2016.

ZIMERMAN, R. A. Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana. **Uso racional de medicamentos: Temas selecionados. Ministério da saúde**, [S.l.], n. 3, 2010.