

Universidade de Brasília - UnB Faculdade UnB Gama - FGA Engenharia Eletrônica

Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão

Autor: Luan Felipe Rodrigues Costa Orientador: Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade

> Brasília, DF 2014



Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão

Monografia submetida ao curso de graduação em Engenharia Eletrônica da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Eletrônica.

Universidade de Brasília - UnB Faculdade UnB Gama - FGA

Orientador: Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade

Brasília, DF 2014

Luan Felipe Rodrigues Costa

Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão/ Luan Felipe Rodrigues Costa. – Brasília, DF, 2014-

60 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade

Trabalho de Conclusão de Curso2– Universidade de Brasília - Un
B Faculdade Un B ${\rm Gama}$ - ${\rm FGA}$, 2014.

1. processamento de imagens, automático, região inibição, rótulos alfanuméricos, *Computer Aided Diagnosis.* 2. Antibiograma. I. Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade. II. Universidade de Brasília. III. Faculdade UnB Gama. IV. Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão

Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão

Monografia submetida ao curso de graduação em Engenharia Eletrônica da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Eletrônica.

Trabalho aprovado. Brasília, DF, em estado de avaliação:

Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade Orientador

Prof. Dr. Cristiano Jacques Miosso Convidado 1

Prof. Dr. Edson Alves da Costa Júnior Convidado 2

> Brasília, DF 2014

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela saúde, pela sanidade e pela oportunidade de conhecê-lo. Agradeço pela benção do livre arbítrio que me permitiu escolher a área de Engenharia Eletrônica, na qual pretendo exercer em louvor a Ti.

Agradeço imensamente a minha mãe Milvia, meu pai José Ricardo e minha irmã Lana. Vocês fizeram com que o desafio de morar sozinho em outra cidade fosse apenas um mero detalhe. Tudo que tenho e sou hoje devo a vocês, que foram, são e serão sempre a base da minha vida.

Agradeço ao meu professor, orientador e principalmente amigo Marcelino. Desde o terceiro semestre trabalhamos juntos e nestes três anos você contribuiu muito para minha formação acadêmica e pessoal. Obrigado pelas conversas interessantes, pela simpatia, bom humor e por expor sempre seus pontos de vista que ajudaram a construir os meus. Conte sempre comigo.

Agradeço a professora doutora Olga Pastor Nunes, professora doutora Ivone Vaz Moreira e os colegas Victor Teixeira e Eduardo Silva. Obrigado por aceitarem a parceria e contribuírem com tão boa vontade com o projeto AUTOBAC. Sem vocês não teríamos chegado até aqui.

"Disciplina é liberdade, Compaixão é fortaleza, Ter bondade é ter coragem." (Renato Russo)

Resumo

O antibiograma por disco-difusão consiste num método utilizado para avaliar a sensibilidade de microrganismos a antimicrobianos. Tal sensibilidade é aferida pelo diâmetro das regiões de inibição geradas pelos antimicrobianos, que apresentam formato circular. A medição do diâmetro realizada manualmente é caracterizada como tediosa e acarreta longo tempo para ser executada. O trabalho em questão visa descrever um método Automático de Identificação do Antibiograma (AIA) tanto para localização dos discos antimicrobianos quanto para o halo de inibição. Para tanto, foram selecionados dois padrões de imagens (nomeados Oxoid e DME) com diferentes dimensões, disposições de discos e antimicrobianos associados. O grupo experimental consistiu em 276 discos, abrangendo três estirpes de bactérias (Ochrobactrum Intermedium, Achromobacter denitrificans e Pseudoxanthomonas indica). O AIA apresentou um índice de correlação de 0.93 para o padrão Oxoid e 0.83 para o padrão DME comparado ao manual. Diferenças maiores que 3 mm entre a técnica manual e a automática atingiram 12,81% para o Oxoid e 25,83% dos casos para o DME. Concordâncias de classificação entre os métodos (resistente, intermediário ou sensível) corresponderam a 86.5% (Oxoid) e 87.5% (DME). Além disso, o teste t de Student pareado (p < 0, 05) não revelou diferenças significativas entre os métodos. Por fim, os resultados gerados foram similares aos encontrados na literatura, indicando viabilidade de aplicação da solução.

Palavras-chaves: antibiograma. disco-difusão. região de inibição. rótulos alfa-numéricos. método automático.

Abstract

The disk diffusion method is a susceptibility test used to evaluate the sensitivity of microorganisms to antibiotics. This sensitivity is measured by inhibition zone diameter generated by antimicrobials, which have circular shape. Manually diameter measurement is characterized as tedious issue and long time-consuming reading. This work describe the method Automatic Identification Antibiogram (AIA) that identifies antimicrobial disks labels and inhibition zones diameters. So, two images standards was chosen (named Oxoid and DME) with different dimensions, disks disposition and antimicrobial disks. The experimental group consisted of 276 disks, covering three strains of bacteria (Ochrobactrum Intermedium, Achromobacter denitrificans and Pseudoxanthomonas indica). The AIA presented a correlation coefficient of 0.93 (Oxoid standard) and 0.83 (DME standard) compared to the manual. The difference between the automatic and human diameter estimates was greater than 3 mm in 12.81% of the tests to Oxoid standard and 25.83% to DME standard. Concordance between the classification methods (susceptible, intermediate or resistant) corresponded to 86.5% (Oxoid) and 87.5% (DME). Furthermore, paired Student's t test (p < 0.05) conclude that there is no statistically significant difference between methods. Finally, the results generated were similar to the literature, indicating the feasibility of the solution.

Key-words: antibiogram. disk diffusion method. inhibition zone. antimicrobial discs labels. automatic method.

Lista de ilustrações

Figura 1 –	Exemplo de imagem de antibiograma por disco-difusão coletada	22
Figura 2 –	A esquerda dispensador manual de Antibiograma (Becton, Dickinson and Company) a direita placa de Petri com Polisensidisc da DME	22
Figura 3 –	A: medição do halo via régua milimétrica (BROCK, 1966), B: Sobre- posição de halos, C: problemas na semeação do microrganismo, D: não homogeneidade da circunferência, E: parcial atuação do antimicrobi- ano, F: formação de segundo halo.	23
Figura 4 –	Divisão dos 12 discos antimicrobianos em duas placas de Petri	30
Figura 5 –	Tela inicial do GUI desenvolvido.	31
Figura 6 –	Erro na seleção da imagem.	31
Figura 7 –	Configuração de padrão de placa	33
Figura 8 –	Opção detecção automática de forma direta	34
Figura 9 –	Fluxograma do Algorítimo de Identificação Automática.	35
Figura 10	–Imagem original binarizada.	36
Figura 11	–Identificação da posição dos discos.	37
Figura 12	 Extração do rótulo dos discos. (a) Imagem em nível de cinza do disco segmentado, (b) Histograma do disco segmentado e (c) Imagem binária do disco segmentado, com limiar igual ao nível de 50% da área sob o histograma. 	37
Figura 13	-Resultado do algoritmo de comparação de padrões. Em A) exemplo de rótulos coincidentes e em B) não coincidentes.	39
Figura 14	- Enhancement e filtragem da imagem original (exemplo padrão DME)	40
Figura 15	-Linhas verticais, horizontais e diagonais traçadas no quadrado segmen- tado, visando gerar um vetor com as variações de intensidade de <i>pixels</i> .	40
Figura 16	–Exemplo do vetor de promediação.	40
Figura 17	–Outros exemplos do vetor de promediação. A esquerda padrão DME e a direita Oxoid	41
Figura 18	-Exemplo dos níveis de cinza centrais e no halo de inibição	42
Figura 19	–Crescimento das semi-circunferências até atingir o valor de T	42
Figura 20	– Exemplos no qual o Polisensidisco afeta a medida das 4 semi-circunferência	s 43
Figura 21	-A direita, opção "Por partes" do GUI e suas funcionalidades. A es- querda, funcionalidade <i>imtool</i> (Matlab) acionada pelo botão "Analisar".	43

Figura 22	– Etapas parciais do AIA. A) Segmentação geral, B) Binarização da ima-	
	gem segmentada, C) Centro do objetos identificados como círculos com	
	raio de 6 mm, D) Construção da máscara de acordo com padrão esco-	
	lhido, E) Estimativa das posições dos discos, F) Var redura e identifica-	
	ção das posições do disco, G) Posições identificadas, H) Identificação	
	dos rótulos e I) Identificação dos halos e possibilidade de correção dos	
	mesmos	44
Figura 23	– Exemplo de seleção manual através do mouse	45
Figura 24	–Resultados típicos finais da rotulação dos caracteres numéricos dos dis-	
	cos de antibiograma (Padrão Oxoid)	47
Figura 25	$-{\rm R\acute{o}tulos}$ identificados para padrão DME. A esquerda Gram Negativo,	
	ao centro Gram Positivo e a direita Série Urinária.	47
Figura 26	$-{\rm Barras}$ pretas representa diferença absoluta na medição do diâmetro do	
	halo de inibição entre L_1 e L_2 e as barras cinzas entre L_M e AIA	48
Figura 27	–Superior: halos manuais e automáticos nas 156 imagens, inferior: repre-	
	sentação da Raiz do Erro Quadrático Médio (Padrão Oxoid)	49
Figura 28	–Barras pretas representa diferença absoluta na medição do diâmetro	
	do halo de inibição entre L_1 e L_2 e as barras cinzas entre L_M e AIA	
	(Padrão DME).	50
Figura 29	–Superior: halos manuais e automáticos nas 120 imagens, inferior: repre-	
	sentação da Raiz do Erro Quadrático Médio (Padrão DME)	51
Figura 30	–Importância da estratégia de vizinhança e do conhecimento prévio da	
	disposição dos discos	54

Lista de tabelas

Tabela 1 –	Discos no anel interno para os padrões DME e Oxoid	32
Tabela 2 –	Componentes do vetor de configuração	32
Tabela 3 –	Tabela de contingência para classificações de susceptibilidade entre lei-	
	tores e entre manual com automática (Padrão Oxoid)	49
Tabela 4 –	$Concordâncias e discordâncias das classificações clínicas.^{a} resultados idên-$	
	ticos em ambos métodos, b ${\rm I}$ em um método R ou S no outro, c S no	
	manual, R pelo AIA, ${}^{\rm d}{\rm R}$ no manual, S pelo AIA (Padrão Oxoid). $\ .$.	49
Tabela 5 –	Tabela de contingência para classificações de susceptibilidade entre lei-	
	tores e entre manual com automática (Padrão DME)	51
Tabela 6 –	Concordâncias e discordâncias das classificações clínicas. ^a resultados idên-	
	ticos em ambos métodos, b ${\rm I}$ em um método R ou S no outro, c S no	
	manual, R pelo AIA, ^d R no manual, S pelo AIA. (Padrão DME)	51

Lista de abreviaturas e siglas

DME Diagnóstico Microbiológico Especializado GUI Graphical User Interface CAD Computer Aided Diagnosis RAPD Random Amplified Polymorphic DNA IMA Invariância de Momento Afim R Resistente Ι Intermediário \mathbf{S} Sensível CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute NCCLS National Committe for Clinical Laboratory Standards MIC Minimum Inhibitory Concentration LIPIS Laboratório de Instrumentação e Processamento de Imagens e Sinais L_1, L_2, L_M Leitor 1, Leitor 2, Leitura média AIA Algoritmo de Identificação Automática CLAHE Contrast-limited Adaptive Histogram Equalization

Sumário

1	Intr	odução
	1.1	Contextualização
	1.2	Justificativa
	1.3	Projeto Autobac
	1.4	Requisitos Funcionais
	1.5	Objetivos
		1.5.1 Objetivo Geral
		1.5.2 Objetivos Específicos
2	Mat	eriais e Métodos
	2.1	Amostragem
	2.2	Medição Manual
	2.3	Interface gráfica com o usuário - GUI
	2.4	Algoritmo de Identificação Automática
		2.4.1 Identificação das posições dos discos
		2.4.2 Identificação dos Rótulos alfanuméricos
		2.4.3 Identificação dos halos de inibição
	2.5	Interface GUI - Opção: Por partes
	2.6	Interface GUI - Opção: Seleção manual
3	Res	ultados
	3.1	Halos padrão Oxoid
	3.2	Halos padrão DME
4	Disc	cussão
5	Con	clusão
	5.1	Desenvolvimentos Futuros
Re	eferêi	ncias

1 Introdução

1.1 Contextualização

Uma das importantes funções da microbiologia é julgar quais drogas serão efetivas no tratamento de infecções. Para tanto, é necessário avaliar a sensibilidade de microrganismos a antimicrobianos. Um antimicrobiano pode ser definido como uma substância química, produzida por um ser vivo ou derivada sinteticamente, que inibe ou retarda o crescimento de certos microorganismos. O tipo de antimicrobiano mais conhecido é o antibiótico, o qual atua contra bactérias e é normalmente utilizado para tratar infecções. Cada bactéria pode reagir de forma diferente a um determinado antibiótico. Quando este antibiótico é aplicado a um ser vivo, a reação dentro do organismo também pode ser diferente. Logo, para combater de forma mais adequada uma determinada infecção, é realizado um teste conhecido como antibiograma (BAUER et al., 1966).

Existem diferentes tipos de antibiogramas, tais como disco-difusão, microdiluição em caldo e o *E test*. O primeiro é o mais utilizado no Brasil e na maioria dos países pelo seu baixo custo e simplicidade. Basicamente, trata-se de uma prova *in vitro*, utilizando uma placa de Petri, no qual é aplicado um disco de papel de filtro impregnado com antimicrobiano a superfície do ágar onde o microrganismo foi inoculado. Cada antimicrobiano irá formar um halo de inibição, e o diâmetro deste halo é usado na classificação do disco em Resistente (R), Intermediário (I) ou Sensível (S) (BROCK, 1966). A Figura 1 ilustra um exemplo com seis discos antimicrobianos, por meio de identificadores alfanuméricos.

As organizações mais importantes que controlam a automação dos processos de testes de susceptibilidade, procedimentos e normas, são United States Food and Drug Administration, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o National Committe for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (BROCK, 1966). Dessa forma, são disponibilizadas tabelas contendo os limiares de diâmetro que definem as sensibilidades R, I e S, tabelas de conversões para minimum inhibitory concentration (MIC), preparo do inóculo, antimicrobianos a serem utilizados para cada microrganismo, etc. A disposição espacial dos discos antimicrobianos nas placas é definido pelo profissional encarregado. Entretanto, estratégias como dispensadores manuais e polisensidiscos facilitam e padronizam tal tarefa (Figura 2).

A medição do diâmetro dos halos é normalmente realizada por especialistas utilizando uma régua milimétrica (Figura 3). Aparentemente trivial, esta tarefa apresenta diversos desafios como sobreposição de halos, formação não homogênea da circunferência, parcial atuação do antimicrobiano, formação de segundo halo e problemas na semeação



Figura 1 – Exemplo de imagem de antibiograma por disco-difusão coletada.



Figura 2 – A esquerda dispensador manual de Antibiograma (Becton, Dickinson and Company) a direita placa de Petri com Polisensidisc da DME.

do microrganismo (Figura 3), que são interpretados de acordo com a experiência do profissional.

As medições manuais das zonas de inibição podem levar um tempo considerável de execução, tornando o método impraticável para alguns laboratórios de diagnóstico (HEJ-BLUM et al., 1993). Uma das soluções presentes na literatura são trabalhos para desenvolver métodos automáticos de interpretação do antibiograma. O objetivo desses métodos é simplificar o processo de leitura interpretada e evitar as variações intra e inter observador, decorrentes da interpretação manual [(LIVERMORE et al., 2002),(HEJBLUM et al., 1993)].



Figura 3 – A: medição do halo via régua milimétrica (BROCK, 1966), B: Sobreposição de halos, C: problemas na semeação do microrganismo, D: não homogeneidade da circunferência, E: parcial atuação do antimicrobiano, F: formação de segundo halo.

1.2 Justificativa

Com intuito de automatizar o método de disco-difusão, diversos autores propuseram técnicas de processamento de imagens. O trabalho proposto por (HEJBLUM et al., 1993) apresenta uma solução para identificação automática dos halos de inibição. Entretanto, não aborda estratégias para evitar problemas como sobreposição e não homogeneidade da circunferência (Figura 3). Já Gavoille et al. aborda tais problemas com detecção de bordas por textura, mas por outro lado, baseia-se apenas na saturação de *pixels* para localização dos discos (GAVOILLE; BARDY; ANDREMONT, 1994). Legrand et al. apresentam apenas resultados e não descrevem os métodos utilizados (LEGRAND; AHO; DUSSERRE, 1995). O Oxoid Aura Image System (ANDREWS; BOSWELL; WISE, 2000) apresenta resultados promissores, entretanto as técnicas utilizadas também não são plenamente divulgadas, o que impossibilita a reprodução e aplicação do algoritmo.

Sistemas automatizados para outros tipos de antibiograma são mais explorados por apresentarem maior controle dos resultados. O sistema proposto por (BACKES et al., 1984) por exemplo, automatiza o processo de microdiluição efetivamente. (KELLY et al., 1982) e (REIBER et al., 1985) comparam diversas técnicas de antibiogramas e usam como referência de comparação o método de disco-difusão. Dessa forma, apesar dos novos métodos apresentarem maior controle e automação, o de disco-difusão continua sendo o mais difundido, utilizado e com baixo custo de aplicação. O uso de sistemas CAD (*Compu*- ter Aided Diagnosis) nessas atividades pode reduzir os aspectos tediosos de interpretação humana no cumprimento das tarefas quantitativas. Entretanto, o processamento de imagens biológicas tende a apresentar formas irregulares e variáveis. Esse fator denota um desafio maior na automatização de aplicações práticas no campo das ciências biológicas (GLASBEY; HORGAN, 1994)

(LESTARI et al., 2008) demonstra um caso na Indonésia no qual os erros da medição manual superaram os provenientes do *Oxoid Aura Image System*. Apesar disso, o uso de softwares no auxílio da leitura interpretada é muito escasso no mundo e no Brasil. Sistemas semi-automáticos, como o Automic (produto oferecido pela empresa DME (Diagnóstico Microbiológico Especializado)), utilizam o *mouse* para medição dos halos de inibição.

A grande demanda e volume desses exames justificam uma maior automação deste processo. Além de diminuir o tempo de tarefa, softwares utilizam critérios bem definidos de medida, evitando erros humanos interpretativos e aumentando a padronização. Então, levanta-se a necessidade de uma solução que interprete e aborde os desafios descritos na Figura 3. Sendo assim, busca-se um método automático bem definido que possa ser realmente aplicado em situações reais, a fim de abranger a diversidade de padrões do antibiograma por disco-difusão. Enfatiza-se que, cabe ao microbiologista a decisão final, sendo que tais softwares são ferramentas de auxílio ao profissional.

1.3 Projeto Autobac

O trabalho é questão é parte do projeto AUTOBAC, uma iniciativa FINEP -Financiadora de Estudos e Projetos (Edital-Finep 05/2010 - Produtos Médicos e Biomaterias), com o objetivo de desenvolver um sistema computacional embarcado para a realização automática da leitura interpretada do antibiograma, incluindo a elaboração de uma plataforma para a aquisição da imagem digital. O algoritmo desenvolvido para aquisição, processamento e interpretação de imagens digitais de antibiograma vem sendo desenvolvido desde 2010. As descrições e resultados já obtidos foram publicados em dois congressos nacionais, um indicando um método automático para identificação dos rótulos alfanuméricos dos antibióticos (COSTA et al., 2012a) e outro da região de inibição (COSTA et al., 2012b).

Este trabalho foi realizado e supervisionado no Laboratório de Instrumentação e Processamento de Imagens e Sinais (LIPIS) da Faculdade UnB Gama. Nesta primeira abordagem foram processadas 8 imagens de placas contendo o polisensidisco 15 da DME (Figura 2). Tais imagens foram coletadas em um laboratório de um hospital de médio porte, na cidade de Taguatinga, Distrito Federal. Devido as limitações e dificuldade de acesso aos laboratórios, a aquisição de outros padrões foi impossibilitada. Além disso, tal aquisição foi realizada com uma câmera comercial SX130 com tripé, portanto, sem controle efetivo de iluminação e posicionamento das placas.

Visando suprir a pequena amostragem de imagens, durante o intercâmbio realizado na Universidade do Porto, Portugal (09/2012 - 08/2013), pelo programa Ciências sem Fronteiras, foi firmada uma parceria com o Laboratório de Engenharia de Processos Ambiente e Energia da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Com o auxílio da Pr. Dra. Olga Pastor Nunes, da Dra. Ivone Vaz Moreira e dos colegas Victor Teixeira e Eduardo Silva, 32 imagens de placas de Petri com 6 discos foram adquiridas e digitalizadas para teste e validação do software desenvolvido.

A partir deste ponto, o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) aqui apresentado foi iniciado. Na primeira etapa o software previamente desenvolvido para o padrão DME foi adaptado a uma placa menor de 90x15 mmm e com 6 discos. Para tanto, foram realizadas diversas melhorias e adaptações que serão apresentadas ao longo deste trabalho. Após resultados bastante positivos, foi desenvolvido na segunda etapa uma *Graphical User Interface* (GUI), no qual o usuário define o padrão de placa a ser analisada (tamanho da placa, tipo de dispensador ou polisensidisco e discos utilizados) e escolhe entre a identificação automática ou manual através do *mouse*. Dessa forma, preocupou-se em implementar o código de forma mais genérica possível, permitindo inserir outros padrões existentes ou futuras inclusões.

O algoritmo foi testado em onze microrganismos diferentes no padrão de 6 discos e, no padrão polisensidisco 15 DME, as séries urinária, gram positivo e gram negativo foram abordadas. Tais testes possibilitaram observar as variáveis a serem adaptadas conforme o padrão selecionado, bem como os novos desafios na solução computacional. Dessa forma, busca-se ao final uma solução robusta, capaz de automatizar o método de disco-difusão e permitir correções pontuais na medida do halo caso seja desejável.

1.4 Requisitos Funcionais

Visando facilitar o entendimento do software desenvolvido foi listado os requisitos funcionais do mesmo, seguindo o modelo (SANTOS; MASIERO, 1996).

- 1. O sistema deve listar na tela inicial as imagens contidas na pasta principal.
- 2. O sistema deve ilustrar qual imagem foi selecionada e apresentar mensagem de erro caso o arquivo não seja do tipo TIF, .JPG ou PNG.
- 3. O sistema deve permitir configurar o padrão do antibiograma, com as opções de dimensão, tipo de disposição dos discos e antimicrobianos envolvidos.
- 4. O sistema deve permitir salvar configurações e acessá-las para utilizações futuras.

- 5. Após seleção da configuração o sistema deve permitir a seleção da imagem e apresentar as opções: AIA - direto, AIA - Por partes, AIA - Seleção Manual.
- 6. Na opção AIA Direto o sistema deve executar o Algorítimo de Identificação Automática (AIA) e apresentar o diâmetro dos halos para os respectivos antimicrobianos.
- 7. O sistema deve possibilitar a correção manual das medidas automáticas caso seja pertinente.
- 8. O sistema deve salvar a imagem com os resultados e os diâmetro halos com respectivos antimicrobianos em um documento do tipo TXT.
- Na opção AIA Por partes, o sistema deve apresentar os resultados parciais descritos na seção 2.4.
- 10. O sistema deve permitir avançar e voltar as etapas além de apresentar a funcionalidade "Analisar" para cada uma (Figura 22).
- 11. A opção "Analisar" deve conter ferramentas de visualização pontual do nível de intensidade dos *pixels*, informações da imagem, ajuste de contraste, redimensionamento e medida de distância.
- 12. O sistema deve conter uma barra de ferramentas, com opção de impressão da imagem, *zoom* e manipulação.
- 13. O sistema deve apresentar o botão "Pausar" para interromper o processamento.
- 14. Na opção AIA Seleção Manual, o sistema deve permitir o usuário selecionar com o *mouse* os halos de inibição dos antimicrobianos selecionados na configuração.
- 15. O sistema deve ser capaz de cancelar toda operação final caso o usuário deseje.
- 16. O sistema deve acessar o banco de imagens contendo os rótulos e suas imagens.
- 17. Ao final das análises, o sistema deve listar novamente as imagens contidas na pasta principal para novo processamento.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Identificação automática da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiograma por disco-difusão, configurada por uma interface gráfica para auxílio ao diagnóstico.

1.5.2 Objetivos Específicos

- 1. Adaptar e aprimorar o algoritmo já desenvolvido para um propósito geral, mostrando sua eficácia em um cenário diferente.
- 2. Desenvolver uma GUI de fácil utilização que auxilie o usuário na interpretação do antibiograma por disco-difusão.
- 3. Realizar a identificação automática e robusta das regiões de inibição e rótulos alfanuméricos em no mínimo duas geometrias de aplicação.
- 4. Estabelecer comparação estatística, em nível de significância, entre identificação automática e manual.

2 Materiais e Métodos

Nesta seção será apresentado os critérios e as condições nas quais a amostra do trabalho foi coletada. Em seguida, a medição manual dos halos por especialistas é descrita, sendo utilizada como referência para comparação com a medição automática proposta. A interface gráfica com o usuário (GUI) é então apresentada, mostrando as funcionalidades do *software* desenvolvido. Por fim, o Algoritmo de Identificação Automática (AIA) é descrito, abrangendo suas três fases principais: identificação da posição dos discos, identificação dos rótulos alfanuméricos e identificação dos halos de inibição.

2.1 Amostragem

Para compor a amostra do presente estudo, três estirpes de bactérias (Ochrobactrum Intermedium, Achromobacter denitrificans e Pseudoxanthomonas indica) foram isolados a partir de uma estação de tratamento de águas residuais da cidade do Porto, Portugal. Duas dessas cepas tiveram seu crescimento induzido em meio mínimo contendo certos antibióticos (sulfametoxazol e/ou tetraciclina). Além disso, três dos cinco isolados da espécie Achromobacter denitrificans possuíam um perfil Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) diferente. Assim, o estudo teve 3 isolados de Ochrobactrum Intermedium, 5 isolados de Achromobacter denitrificans e 1 isolados de Pseudoxanthomonas indica. Mais dois isolados de E. coli e dois de Pseudomonas sp foram utilizadas como controle positivo no estudo.

Todas as treze amostras de estudo foram analisadas quanto à susceptibilidade a antibióticos, por um processo de rotina. Para este efeito, foram usadas as placas de Petri 90x15 mm contendo ágar de Mueller-Hinton (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido). Para cada um dos isolados, os testes de susceptibilidade aos fármacos foram realizados com 12 discos de diferentes antibióticos feitos de papel absorvente, que foram divididos em duas placas, cada uma contendo seis discos de acordo com um padrão previamente definido (Figura 4). A colocação dos discos foi realizada com um dispensador Oxoid de 6 discos. Ao todo, foram realizados 156 testes de susceptibilidade (13 microrganismos x 2 padrões x 6 discos), formando o grupo de controle. Já o grupo experimental consistiu em 6 placas aleatórias, sem conhecimento dos isolados envolvidos. As placas continham os mesmos padrões de 6 discos utilizados no grupo experimental.

A aquisição das imagens foi realizada no Laboratório de Engenharia de Processos Ambiente e Energia da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Foi utilizado o



Figura 4 – Divisão dos 12 discos antimicrobianos em duas placas de Petri.

instrumento ChemiDocTM MP System¹, da Bio-Rad no modo "*epi white illumination*". O *software* Image LabTM integrado ao sistema configura aquisições de imagens com tamanho de 1392x1040, 254 *dpi* e 8 *bits*. O padrão de aquisição não foi alterado, mantendo-se o mesmo para todas as imagens.

Também foram utilizadas 8 imagens de placa de Petri 110 x 15 mm coletadas em um laboratório de um hospital de médio porte, na cidade de Taguatinga, Distrito Federal, em 2012. As imagens foram adquiridas por uma câmera Canon SX130, com tripé, em matrizes de 3000x4000 pixels com resolução de 180 dpi. Os procedimentos para condicionamento e interpretação das placas seguiram a padronização prevista pela (CLSI, 2009). Já para aplicação dos discos às placas inoculadas de Ágar foram utilizados os Polisensidiscos 15 gram negativo, gram positivo e série urinária da Empresa DME. Tais imagens são as mesmas processadas na primeira solução desenvolvida [(COSTA et al., 2012b), (COSTA et al., 2012a)].

Por fim, a amostra final consiste em 156 testes de susceptibilidade para o padrão Oxoid e 120 para o DME, resultando em 276 testes em 34 imagens.

2.2 Medição Manual

As medidas manuais dos diâmetros dos halos de inibição foram realizadas por três medidores individuais. Dois deles Leitor 1 (L1) e Leitor 2 (L2) utilizaram um *software* desenvolvido em MATLAB para medir os halos usando o *mouse*. A Média das Leituras foi definida como LM. A terceira medição foi realizada *in loco* pela supervisora do laboratório (L3). Caso o desvio padrão entre L1, L2 e L3 fosse maior que 4mm a medida L3 era considerada como referência (HEJBLUM et al., 1993).

 $^{^{1} \}quad http://www.bio-rad.com/en-us/product/chemidoc-mp-system$

2.3 Interface gráfica com o usuário - GUI

A GUI desenvolvida visou atender as necessidades do especialista que irá analisar as imagens de antibiogramas, de forma a apresentar interfaces mais amigáveis e simples possível. A Figura 5 ilustra a tela inicial do GUI desenvolvido. O usuário é responsável por escolher a imagem a ser processada e, caso não seja um arquivo tipo TIFF, JPG ou PNG, a mensagem de erro é apresentada (Figura 6). As Figuras 5 e 6 também ilustram o botão "Selecionar", que se encontra desabilitado. O mesmo só será habilitado quando o usuário selecionar uma configuração que descreva o padrão da imagem escolhida.



Figura 5 – Tela inicial do GUI desenvolvido.

Selecionar Imagem C:Users\LuanFelipe\Dropbox \Luan (1)Material Portugal(terface_seleci	Erro! - 🗆
C:\Users\LuanFelipe\Dropbox \Luan (1)\Material Portugal\iterface_seleci	
Portugal\iterface_seleci	
	Apenas imagem tipo TIF, JPG ou PI
i naltif	
1.11	OK
2 final.tif	
2.tif 2.txt	
3.tif	
3.txt	
4 final.tif	

Figura 6 – Erro na seleção da imagem.

As Figuras 7.1 e 7.2 ilustram a interface gerada ao selecionar o botão "Nova configuração" da Figura 5. Dessa forma, o usuário pode escolher as dimensões da placa de Petri e a forma com que os discos estão dispostos na mesma. Nesta abordagem, foram cadastradas as dimensões de 90x15 mm e 110x15 mm e as disposições nomeadas "Oxoid de 6 discos" e "Polisensidisco DME 15 discos". Ao selecionar a opção da Oxoid é apresentado os Antimicrobianos disponíveis para inserção (Figura 7.1). O usuário é alertado em selecionar um disco como referência e, em seguida, seus vizinhos sequenciais no sentido anti-horário. Esta etapa é de crucial importância na estratégia de detecção automática que será descrita. Ao selecionar o padrão DME a opção "série" é disponibilizada com as três opções comerciais "série urinária", "gram positivo" e "gram negativo" (Figura 7.B).

Após definir as configurações desejadas é necessário salvá-las. Para tanto, basta atribuir o nome do arquivo e clicar no botão "Salvar" (Figura 7.A e 7.B). O arquivo só será salvo se as mínimas configurações solicitadas forem preenchidas, caso contrário, os erros representados na Figura 7.C são apresentados. Por fim, o arquivo é armazenado e pode ser utilizado em processos futuros (Figura 7.D).

O arquivo criado consiste em um vetor, contendo as informações necessárias para o processamento automático e manual. A Tabela 2 lista as variáveis salvas no vetor de configuração gerado. Os números 1, 2 e 3 do elemento 6 correspondem as séries urinária, gram positivo e gram negativo, respectivamente. De acordo com a série escolhida o elemento 7 do padrão DME é definido. A Tabela 1 lista os discos internos para cada série. Já para o padrão Oxoid os seis rótulos são definidos pelo usuário (Figura 7.A). O elemento 8 da Tabela 2 é utilizado para nomear os resultados obtidos e a imagem com os halos encontrados. A intenção é que tais variáveis abrangem outros padrões cadastrados posteriormente, de forma que o processamento seja o mais genérico possível.

Tabela 1 – Discos no anel interno para os padrões DME e Oxoid

Padrão	Possíveis antibióticos no anel interno
DME 15 Série Urinária DME 15 Cram Positivo	CFZ30, NAL30, NIT300, NOR10, OFX05 RIF05, CLO30, FRI15, CLI02, VAN30
DME 15 Gram Vegativo DME 15 Gram Negativo	PIT110, ATM30, CLO30, CAZ30, CFO30
Oxoid	TET30, SXT25, CIP5, CN10, AML25, KF30 CAZ30, MEM 10, S10, RL25, CT50,TIC75

Após selecionar a configuração e o botão "Selecionar", antes desabilitado, acionado o GUI desenvolvido apresenta três opções: AIA - Direto, Por partes ou Seleção Manual (Figura 8.A). O Algoritmo de Identificação Automática (AIA) é o principal motivo de

Elemento	vetor-conf[Elemento]	DME	Oxoid
1	Dimensão (mm)	110	90
2	Quantidade de discos internos	5	6
3	Quantidade de discos externos	10	0
4	Raio da máscara interna (mm)	18,7	26,5
5	Raio da máscara externa (mm)	39,6	0
6	Série do Polisensidisco	1, 2 ou 3	0
7	Rótulos dos discos internos	Rótulos da série	Rótulos pelo usuário
8	Nome do arquivo de imagem	Nome da imagem	Nome da imagem

Tabela 2 – Componentes do vetor de configuração.



Figura 7 – Configuração de padrão de placa.

estudo do trabalho em questão. Pretende-se automatizar o processo de antibiograma por disco-difusão de forma aumentar a rapidez, o volume e a robustez dos exames, auxiliando o especialista para tal. A Figura 8 ilustra a opção AIA - Direto, no qual resulta nos rótulos com respectivos halos de inibição, sem apresentar resultados parciais (descritos na seção 2.4). Caso o especialista discorde de alguma medida mal realizada, é possível corrigi-la conforme ilustra a Figura 8.D. Neste exemplo, a medida relacionada ao CIP 05 não apresentou valor coerente, sendo ajustada através das setas indicadas pelo círculo vermelho. A cada clique, é acrescentado ou decrementado 0,5 mm no raio, bem como na circunferência da imagem, permitindo o fácil ajuste desejado. O usuário seleciona a medida a ser corrigida clicando no valor automático a ser alterado na tabela.

2.4 Algoritmo de Identificação Automática

O AIA desenvolvido consiste em duas partes principais, ambas dependentes da posição dos discos de antibiograma. A primeira identifica os rótulos alfanuméricos dos discos e a segunda os halos de inibição. A Figura 9 ilustra o fluxograma do AIA, explicitando as etapas de processamento para os dois padrões utilizados, a esquerda o padrão nomeado Oxoid, nome devido a marca do dispensador utilizado, e a direita o padrão DME. Para melhor compreensão, tais etapas foram descritas individualmente. Foi utilizado o *software* MATLAB versão 7.6 para codificação da solução proposta.



Figura 8 – Opção detecção automática de forma direta.

2.4.1 Identificação das posições dos discos

Para identificação dos discos foi inicialmente realizada uma segmentação geral, no qual a região de interesse, contendo apenas a placa de Petri foi segmentada e convertida para a escala de cinza (Figura 9-B). Para tanto, foi aplicada uma binarização por histograma utilizando o método de Otsu (OTSU, 1994) para definição do limiar. Entretanto, como este método é indicado para histogramas bimodais, os *pixels* do fundo (com nível de intensidade de 0 a 5) foram mascarados para 255, resultando na Figura 10.

Em seguida, o objetivo foi evidenciar em uma imagem binária os discos antimicrobianos. Sendo assim, aplicou-se uma binarização por histograma (Fig. 9-B), utilizando um limiar de 97% da amplitude máxima de pixel da imagem. Isoladamente, esse limiar possibilita uma binarização não robusta dos discos que se encontram nas altas amplitudes, contudo combinando com técnicas posteriores a identificação tornou-se robusta.

Buscando confiabilidade na segmentação dos discos, um processamento morfológico foi aplicado em cada região rotulada na imagem binária. A razão entre altura (A) e



Figura 9 – Fluxograma do Algorítimo de Identificação Automática.



Figura 10 – Imagem original binarizada.

largura (L) e a área (A_r) das regiões foram analisadas, sendo que a razão A/L aceitável foi entre 0.9 e 1.1 e A_r do círculo (πr^2) compreendido entre $\pi (2.7mm)^2$ e $\pi (3.3mm)^2$. Esses parâmetros permitem eliminar todos os objetos não circulares de aproximadamente 6 mm de diâmetro (diâmetro do disco) da imagem binária. Para conversão de pixel para milímetros e vice-versa foi utilizado o vetor-conf[1] (Tabela 2) e o tamanho da imagem processada em pixel. A Figura 9-C.2 ilustra as regiões classificadas pelos parâmetros A/L e D supracitados.

Para estimar a posição dos demais discos possivelmente não classificados, foi criado uma máscara em formato de anel de acordo com o padrão de imagem (Oxoid ou DME) selecionado. Para tanto, foram utilizadas as medidas contidas no vetor-conf[4] e vetorconf[5] que definem o raio da máscara interna e o da externa caso haja. Dessa forma, foi possível definir quais discos classificados eram regidos pela máscara (Fig. 9-D.1.1 e D.2.1). Com posse de apenas um disco de referência no anel interno é possível estimar a posição dos demais usando o seguinte conjunto de equações de rotação (Eq 2.1),

$$\begin{bmatrix} x_r(i) \\ y_r(i) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos(\theta_i) & -\sin(\theta_i) \\ \sin(\theta_i) & \cos(\theta_i) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$$
(2.1)

no qual $x_R(i)$ e $y_R(i)$ correspondem as coordenadas de cada *i* pílula estimada e *x* e *y* as coordenadas do disco de referência e $\theta_i = \frac{2\pi}{i}$ sendo i = 1...vetor-conf[2] (Tabela 2). Para configurações com anel externo na máscara (DME) a mesma estratégia também é adotada, atribuindo i = 1...vetor-conf[3], estimando a posição dos discos externos. Caso não haja nenhum objeto classificado como disco na máscara, o software indica mensagem de erro, voltando ao menu inicial. A mensagem de erro sugere que a configuração selecionada não corresponde com a imagem escolhida.

A Figura 9-D.2 ilustra a estimativa de todas as posições mencionadas. Salientase que a mesma logística indicada em (COSTA et al., 2012a) foi utilizada, modificando o algoritmo conforme a quantidade de discos e geometria do dispensador. Dessa forma, sabendo a quantidade de discos e havendo um padrão de disposição dos mesmos na placa, é possível adaptar esta estratégia a diversos contextos. Após a estimativa, as posições foram identificadas. Para tanto, foi aplicada uma segmentação na imagem original utilizando um quadrado de 12 mm, centrado nas coordenadas de cada posição estimada. Então, foi realizada uma varredura dentro de cada quadrado segmentado, utilizando um circunferência de 6 mm. A cada passo era calculada a soma total dos *pixels* na imagem, sendo a soma de maior valor a posição correta da pílula. A Figura 11 ilustra alguns dos resultados enquanto que a Figura 9-E ilustra todos os resultados das posições contidas na placa de Petri.



Figura 11 – Identificação da posição dos discos.

2.4.2 Identificação dos Rótulos alfanuméricos

Sabendo a posição exata de cada pílula foi possível binarizar sua imagem, de forma que resultasse apenas o rótulo, como mostra a Figura 12. O limiar utilizado em tal binarização correspondeu na metade da área sob o histograma.



Figura 12 – Extração do rótulo dos discos. (a) Imagem em nível de cinza do disco segmentado, (b) Histograma do disco segmentado e (c) Imagem binária do disco segmentado, com limiar igual ao nível de 50% da área sob o histograma.

Com posse de todos os rótulos de todos os antimicrobianos foi possível comparar a sequência extraída com a do banco de imagens. Tal banco construído consistiu em todos os rótulos avulsos que foram instrumento de estudo neste trabalho e os contidos nos polisensidiscos 15 da DME (Tabela 1). Ressalta-se a possibilidade de inserção de novos rótulos em aplicações futuras.

Dessa forma, os rótulos contidos no vetor-conf[7] são utilizados para acessar suas respectivas imagens contidas no banco de imagens. O algoritmo utilizado para a comparação dos rótulos do banco de imagens supracitado com os identificadores extraídos das pílulas foi o de reconhecimento de padrões por Invariância de Momento Afim (IMA) (FLUSSER; SUK, 1993)². Encontrar características invariantes eficientes é a chave para a solução deste tipo de problema. O programa IMA agrega diversos tipos de características no reconhecimento, divididas nos quatro grupos:

- 1. Características visuais (bordas, texturas e contornos);
- 2. Características de coeficientes de transformadas (descritores de Fourier, coeficientes de Hadamard);
- 3. Características algébricas (baseada na decomposição matricial da imagem); e
- 4. Características estatísticas (invariâncias de momento);

O algoritmo da rotulação dos antibióticos das pílulas possui como núcleo o algoritmo de reconhecimento de padrões por IMA (FLUSSER; SUK, 1993), mas possui passos sistemáticos e bem definidos para identificar a correta rotulação, descritos a seguir:

- 1. Através das coordenadas dos centros das pílulas é obtido o grupo de n (correspondente ao vetor-conf[2]) rótulos contidos no anel interno da placa.
- 2. Tomando um dos rótulos como referência, é feita uma comparação dos n rótulos dos discos com os rótulos definidos no vetor-conf[7] (Tabela 2).
- 3. O algoritmo de reconhecimento de padrões entrega um indicador numérico de similaridade de um determinado padrão ao dado de entrada. Nesse contexto, quanto mais similar maior o valor obtido. Assim, sobre o conjunto das n correspondências realizadas nesse passo, foi calculado a média das mesmas.
- 4. É feita mudança de posição no vetor que armazena os rótulos, tomando como referência o rótulo subsequente no sentido anti-horário do anel.
- 5. O laço formado pelos passos 3 e 4 é repetido até que as n mudanças de posição (passo 4) sejam realizadas.
- 6. Realizada a comparação da sequência extraída com as contidas no vetor-conf[7], rotacionando nas n posições possíveis. A sequência com maior média de correspondências é adotada como a correta.
- 7. Para configurações com anel externo é utilizada a mesma estratégia. Com posse dos rótulos internos são obtidos os externos, visto que as vizinhanças são constantes para o padrão DME.



Figura 13 – Resultado do algoritmo de comparação de padrões. Em A) exemplo de rótulos coincidentes e em B) não coincidentes.

Para salientar a eficiência do processo de correspondência dos passos 2 e 3 pode-se visualizar na Figura 13-A e na Figura 13-B a significativa diferença de pontos coincidentes entre um rótulo da placa de Petri e o banco de padrões, quando estes se tratam do mesmo antibiótico e quando isto não é verdade, respectivamente. Adianta-se que a estratégia utilizada possibilita a inserção de novas sequências ao banco de imagens, possibilitando a adaptação do algoritmo conforme o contexto.

2.4.3 Identificação dos halos de inibição

A identificação dos halos de inibição limitou-se a diâmetros entre 8 e 30 milímetros, suficiente para os antibióticos adotados (CLSI, 2009). Inicialmente a imagem original foi processada com um filtro passa-baixas do tipo FIR de ordem 25 e frequência de corte em 5% da largura de banda da imagem. Tal filtragem suavizou a imagem, tornando a transição entre amplitudes dos *pixels* menos brusca.

Em seguida foi aplicado um *enhancement* e uma filtragem morfológica. O primeiro consistiu na técnica *Contrast-limited Adaptive Histogram Equalization* (CLAHE) no qual há um aumento do contraste controlando o nível máximo de amplitude dos *pixels*. Os parâmetros utilizados do CLAHE para a imagem de antibiograma foram um *Tile* de 8x8 e um nível de contraste de 0.01 [0-1], esse baixo valor visou manter as informações originais da imagem (GONZALEZ; WOODS, 2008). Como filtragem morfológica, foi aplicado um fechamento utilizando um elemento estruturante em forma de disco com raio de 10 *pixels*. Tal operação visou eliminar pequenos buracos e preencher fendas nos contornos (GONZALEZ; WOODS, 2008). A Figura 14 ilustra um exemplo do *enhancement* projetado.

Então cada região de interesse, contendo o disco e um quadrado com 30 mm de lado, foi segmentada. Dessa forma, foram traçadas quatro linhas de quatro *pixels* de espessura, uma vertical, uma horizontal e duas diagonais, que se cruzam no centro do disco (Figura 15).

 $^{^{2} \}quad http://www.mathworks.com/matlabcentral/file$ exchange/43218-visual-inertial-odometry/content/SIFT/match.m



Figura 14 – Enhancement e filtragem da imagem original (exemplo padrão DME).



Figura 15 – Linhas verticais, horizontais e diagonais traçadas no quadrado segmentado, visando gerar um vetor com as variações de intensidade de *pixels*.

A média de cada 4 *pixels* foi calculada, resultando em um vetor de médias por linha, sendo realizado uma nova média entre os vetores resultantes. Visando evidenciar ainda mais a região de inibição, os termos opostos ao centro do disco foram somados. Tal vetor de promediação foi denominado de *v*. A Figura 16 mostra a irregularidade da curva de promediação, devido aos desafios indicados na Figura 3. Ao analisar a curva da Figura 16 da maior posição para a menor é evidenciado que a amplitude dos discos é equivalente a 255 e decresce até atingir um pico descrito pelo número 2. Tal região corresponde a região de inibição desejada.



Figura 16 – Exemplo do vetor de promediação.

Dessa forma, foi realizada uma suavização por média móvel de cinco elementos. Em seguida foi utilizada a estratégia de cruzamentos por zero da primeira derivada do vetor v para identificar os picos do vetor de promediação. O pico de maior posição (P_m) foi considerado o ponto de transição entre o halo de inibição e a biomassa. A Figura 17 ilustra dois outros exemplos de vetores de promediação.

Outra estratégia desenvolvida para encontrar o nível aproximado de intensidade da região sem halos foi calcular uma média central $(M_{central})$. Para o padrão Oxoid, tal variável consistiu na média dos *pixels* localizados numa matriz 40x40 retirada no centro placa. Já para o padrão DME, consistiu na média de todos os *pixels* contidos na placa. A Figura 18 ilustra os níveis de cinza no centro da placa e na região de inibição, mostrando suas diferenças significativas. A Figura 14 mostra que a estratégia utilizada para o padrão Oxoid não pode ser aplicada ao padrão DME, visto que o Polisensidisco abrange o centro da placa e altera o nível de intensidade desses *pixels*.



Figura 17 – Outros exemplos do vetor de promediação. A esquerda padrão DME e a direita Oxoid.

Por fim, para definir um limiar satisfatório T foi utilizado a Equação 2.2,

$$T = \frac{v[P_m] + M_{central}}{2} \tag{2.2}$$

no qual v corresponde ao vetor de promediação, (P_m) o pico de maior posição e $(M_{central})$ a média dos elementos da matriz central. Para promediações sem picos, P_m é igual a zero, ou seja, o primeiro elemento de v será considerado.

Para identificar o diâmetro de cada região de inibição foi calculada a média de pixels de quatro semi-circunferências concêntricas ao disco. Para cada padrão foi adotada uma estratégia utilizando tais médias. No padrão Oxoid é incrementado o diâmetro das semi-circunferências e recalculado as médias, até que o valor de T atinja pelo menos uma delas. Destaca-se que a primeira circunferência foi definida com o diâmetro igual a 8 mm e que o valor do limiar T define a amplitude em pixels limítrofe da região de inibição.



Figura 18 – Exemplo dos níveis de cinza centrais e no halo de inibição.

Tal estratégia permitiu atacar a problemática da sobreposição (Figura 3-B), visto que pelo menos uma das semi-circunferências irá atingir o valor de T. A Figura 19 ilustra um exemplo de crescimento das semi-circunferências no caso de sobreposição.

Já para o padrão DME, é verificado a presença do Polisensidisco na região de inibição, evidenciando *pixels* de alta intensidade com localizações variáveis de acordo com a posição do disco. Sendo assim, a estratégia descrita acima é falha, visto que a máscara fará com que a média de duas semi-circunferências atinjam o valor de T. Dessa forma, foi comparado a média das quatro semi-circunferências com o limiar T estipulado, até que o valor de *threshold* fosse atingido.



Figura 19 – Crescimento das semi-circunferências até atingir o valor de T.

Considerando a experiência com o padrão em estudo, foi adotado critérios para identificar discos sem halos de inibição. Para o padrão Oxoid consistiu em verificar se havia dez ou menos *pixels* com nível de intensidade maior que 90% de T. Tal critério foi adotado para os *pixels* contidos apenas na primeira interação das quatro semi-circunferências. O valor de 10 *pixels* evita a quantificação em halos com atuações parciais (Figura 3-E), enquanto que o valor de 90% trata dos problemas de segundo halo (Figura 3-F), no qual há resquícios de biomassa com menor intensidade. Já no padrão DME, foi verificado se três ou mais semi-circunferências possuíam 50 ou menos *pixels* com nível de intensidade maior que 90% de T. Como anteriormente analisado, no mínimo duas semi-circunferências são regidas pelo Polisensidisco e sempre atingem o critério de ausência de halo na primeira interação, justificando a utilização de três semi-circunferências para este padrão. O valor superior de 50 *pixels* deve-se ao fato de que em algumas ocasiões o Polisensidisco afeta a medida das quatro semi-circunferências conforme ilustra a Figura 20.



Figura 20 – Exemplos no qual o Polisensidisco afeta a medida das 4 semi-circunferências

2.5 Interface GUI - Opção: Por partes

Outra opção oferecida ao usuário é executar o AIA por partes. Tal funcionalidade permite o usuário verificar os resultados parciais mais importantes, além de aplicar Zoom, imprimir e manipular os mesmos (Figura 21). A Figura 21 também ilustra a funcionalidade *imtool* (Matlab) acionada pelo botão "Analisar". As principais ferramentas de análise de imagem são evidenciadas na referida Figura, dentre elas: visualização pontual do nível de intensidade dos *pixels*, informações da imagem, ajuste de contraste, redimensionamento



Figura 21 – A direita, opção "Por partes" do GUI e suas funcionalidades. A esquerda, funcionalidade *imtool* (Matlab) acionada pelo botão "Analisar".



Figura 22 – Etapas parciais do AIA. A) Segmentação geral, B) Binarização da imagem segmentada, C) Centro do objetos identificados como círculos com raio de 6 mm, D) Construção da máscara de acordo com padrão escolhido, E) Estimativa das posições dos discos, F) Varredura e identificação das posições do disco, G) Posições identificadas, H) Identificação dos rótulos e I) Identificação dos halos e possibilidade de correção dos mesmos

e medida de distância. O software também permite pausar o processamento com o botão "Pausar" (Figura 21).

Os botões "Anterior" e "Próxima" retrocedem e avançam as etapas do AIA, respectivamente. As etapas são as contidas e descritas na seção 2.4: segmentação geral, processamento morfológico, estimativa de posição, identificação de posição, identificação de rótulos e identificação de halos. A Figura 22 ilustra alguns resultados parciais apresentados ao usuário, o crescimento dos halos (Figura 19) também é apresentado dinamicamente, junto ao vetor de promediação.

Tal funcionalidade visa auxiliar tanto o especialista quanto o desenvolvedor, que

pode acompanhar com maior detalhe os processos executados. Para testes futuros de outros padrões esta funcionalidade será útil para validação e correção de possíveis erros associados.

2.6 Interface GUI - Opção: Seleção manual

Por fim, o botão "AIA - Seleção Manual" (Figura 8) permite ao usuário selecionar os halos com o *mouse*. Para tanto, basta clicar no elemento da coluna de halos relacionado ao rótulo a ser medido (Figura 23). Neste momento, o *mouse* irá descrever uma elipse, com possibilidade de ajuste pelo usuário. As medidas são inicialmente definidas com 6 mm (sem halo).

A imagem selecionada passa pelo processo de segmentação geral (Figura 9-B). O diâmetro é definido como a média da altura e largura da elipse e convertido para milímetros através do vetor-conf[1] (Tabela 2) e da dimensão da imagem segmentada em *pixels*.



Figura 23 – Exemplo de seleção manual através do mouse.

3 Resultados

O AIA foi aplicado a todas as 34 imagens de placas (26 Oxoid e 8 DME) amostradas no grupo de teste. Todos os 276 rótulos alfanuméricos associados foram identificados com sucesso, confirmando a robustez da estratégia. A Figura 24 exemplifica um dos resultados obtidos para o padrão Oxoid e a Figura 25 exemplifica os resultados as três séries comerciais em questão. A confirmação ou não de tais resultados é evidente visualmente sendo realizada pelo especialista.



Figura 24 – Resultados típicos finais da rotulação dos caracteres numéricos dos discos de antibiograma (Padrão Oxoid).



Figura 25 – Rótulos identificados para padrão DME. A esquerda Gram Negativo, ao centro Gram Positivo e a direita Série Urinária.

3.1 Halos padrão Oxoid

Levando em consideração a diferença de diâmetros a Figura 26 ilustra o histograma da diferença entre a mediação automática e a manual. Os L_1 e L_2 mediram diâmetros iguais em 70 (44,87%) de 156 testes; as diferenças de 1, 2 e 3 mm foram de 57 (36,54%), 18 (11,54%) e 8 (5,13%) respectivamente. O L_3 (especialista) foi requerido apenas 3 vezes (1,92%). Com relação a diferença entre AIA e a leitura manual L_M , 93 (59,62%) delas foram iguais a zero enquanto que as diferenças de 1, 2, 3 e maiores que 3 foram de 19 (12,18%), 16 (10,26%), 8 (5,13%) e 20 (12,82%) respectivamente. As diferenças maiores que 11 mm foram de 6 ocorrências (3,85%).



Figura 26 – Barras pretas representa diferença absoluta na medição do diâmetro do halo de inibição entre L_1 e L_2 e as barras cinzas entre L_M e AIA.

Já com relação a classificações de susceptibilidade de acordo com os halos de inibição, foram utilizados os limiares recomendados pela (CLSI, 2009) para classificar as cepas em R, $I \in S$. Na medição manual os halos com valores acima de 30 mm foram considerados como "maior que 30" e não como seus valores propriamente ditos, a fim de manter conformidade com o algoritmo (limitado a halos com até 30 mm). A comparação com a medição manual foi expressa em termos de concordância e discordância, utilizada em diversos artigos (HEJBLUM et al., 1993) (KELLY et al., 1982) (REIBER et al., 1985) (GAVOILLE; BARDY; ANDREMONT, 1994). Concordância foi definida quando houve observação idêntica de classificação entre os métodos, pequena discordância quando observado classificação I em um método e R ou S em outro, maior discordância quando classificado como S pelo manual e R pelo AIA e discordância muito maior quando classificado como R pela medida manual e S pelo AIA.

A Tabela 3 apresenta os resultados da classificação de susceptibilidade entre os dois leitores $(L_1 \in L_2)$ e entre a leitura média e a automática desenvolvida $(L_M \in AIA)$. Através

	L	$L_1 \& L_2$		L _M &AIA		IA
Amostra total	S	Ι	R	\mathbf{S}	Ι	R
Sensível (S)	83	1	0	83	1	1
Intermediário (I)	2	8	0	8	1	0
Resistente (R)	1	1	60	6	5	51

Tabela 3 – Tabela de contingência para classificações de susceptibilidade entre leitores e entre manual com automática (Padrão Oxoid)

Tabela 4 – Concordâncias e discordâncias das classificações clínicas.^aresultados idênticos em ambos métodos,^b I em um método R ou S no outro, ^cS no manual, R pelo AIA, ^dR no manual, S pelo AIA (Padrão Oxoid).



Figura 27 – Superior: halos manuais e automáticos nas 156 imagens, inferior: representação da Raiz do Erro Quadrático Médio (Padrão Oxoid)

dessa tabela é possível descrever a Tabela 4 que apresenta as porcentagens de concordância e discordância. Concordância entre as classificações das leituras humanas correspondeu a 151 (96,8%) dos casos. Discordâncias atingiram os 5 (3,2%) casos restantes. Já o AIA apresentou concordância em 135 (86,5%) dos casos e menor discordância em 14 (9%) casos, sendo que as discordâncias maiores e muito maiores atingiram 7 (4,4%) casos.

A Figura 27 mostra a comparação entre os diâmetros manuais e automáticos. O coeficiente de correlação de Pearson (BEIGUELMAN, 2002) de 0,93 mostra a forte correlação entre as contagens automática e manual e o Erro Quadrático Médio indica a adequação do método. A aplicação do teste t de "Student pareado" (p < 0,05) não revelou diferenças significativas, entre os métodos manual e automático (p = 0,027).

3.2 Halos padrão DME

Já para o padrão DME a Figura 28 ilustra o histograma da diferença entre a mediação automática e a manual. Os L_1 e L_2 mediram diâmetros iguais em 88 (73,33%) de 120 testes; as diferenças de 1, 2 e 3 mm foram de 21 (17.50%), 8 (6.67%) e 2 (1.67%) respectivamente. O L3 (especialista) foi requerido apenas 1 vez (0,83%). Com relação a diferença entre AIA e a leitura manual L_M , 53 (44,17%) delas foram iguais a zero enquanto que as diferenças de 1, 2, 3 e maiores que 3 foram de 7 (5,83%), 13 (10,83%), 16 (13,33%) e 31 (25,83%) respectivamente. As diferenças maiores que 11 mm foram de 5 ocorrências (4,17%).



Figura 28 – Barras pretas representa diferença absoluta na medição do diâmetro do halo de inibição entre L_1 e L_2 e as barras cinzas entre L_M e AIA (Padrão DME).

A Tabela 5 apresenta os resultados da classificação de susceptibilidade entre os dois leitores $(L_1 \ e \ L_2)$ e entre a leitura média e a automática desenvolvida $(L_M \ e \ AIA)$. Através dessa tabela é possível descrever a Tabela 6 que apresenta as porcentagens de concordância e discordância. Concordância entre as classificações das leituras humanas correspondeu a 114 (95,0%) dos casos. Discordâncias atingiram os 5 (5,0%) casos restantes. Já o AIA apresentou concordância em 105 (87,5%) dos casos e menor discordância em 10 (8,3%) casos, sendo que as discordâncias maiores e muito maiores atingiram 5 (4,2%) casos.

A Figura 29 mostra a comparação entre os diâmetros manuais e automáticos. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,83 e o RMS apresentou média de 2,74 mm e

	$L_1 \& L_2$		L_M &AIA		IA	
Amostra total	S	Ι	R	\mathbf{S}	Ι	R
Sensível (S)	49	3	1	45	5	2
Intermediário (I)	0	6	2	2	3	2
Resistente (R)	0	0	59	3	1	57

Tabela 5 – Tabela de contingência para classificações de susceptibilidade entre leitores e entre manual com automática (Padrão DME)

Tabela 6 – Concordâncias e discordâncias das classificações clínicas.^aresultados idênticos em ambos métodos,^b I em um método R ou S no outro, ^cS no manual, R pelo AIA, ^dR no manual, S pelo AIA. (Padrão DME)

		Discordância (%)		
Amostra total	${\rm Concord} \hat{\rm a} {\rm ncia} (\%)^{\rm a}$	Menor ^b	Maior ^c	Muito maior ^d
$L_1 \& L_2$	114 (95,0)	5(4,2)	1(0,8)	0 (0)
L_M &AIA	105 (87,5)	10(8,3)	2(1,7)	3(2,5)

desvio de 4,46 mm. A aplicação do teste t
 de "Student pareado" (p < 0,05) não revelou diferenças significativas, entre os métodos manual e automático (p = 0,0067).



Figura 29 – Superior: halos manuais e automáticos nas 120 imagens, inferior: representação da Raiz do Erro Quadrático Médio (Padrão DME)

O tempo médio de processamento de cada imagem, usando o Matlab R2012b em um Core i7, 2,40 GHz, HDD Sata 5400 rpm e 8 GB RAM, correspondeu a 70 segundos.

4 Discussão

A utilização de dispensadores de antibiograma (Figura 2) ou de polisensidisco, permitem o posicionamento correto dos discos e a identificação dos mesmos. Complementarmente, essa estratégia garante a qualidade do exame, evitando colocação de discos incorretos ou em maior quantidade que a estipulada pela (CLSI, 2009). Para o padrão Oxoid a qualidade das imagens foi mantida devido a padronização controlada do equipamento da Bio-Rad descrito, evitando problemas de iluminação como descritos em (COSTA et al., 2012b), consequentemente apresentando melhores resultados.

O software utilizado para medição manual permite amplo zoom na imagem, bem como o ajuste das bordas limítrofes do halo de inibição (Figura 23). Está estratégia permitiu um alto índice de concordância nas medições manuais de 96,8% (Tabela 4) e 95,0 % (Tabela 6). Dessa forma, o padrão ouro de comparação utilizado mostrou-se confiável, mesmo porque, a medida L3 elevou a conformidade com medidas *in loco*.

O algoritmo desenvolvido possui a sua robustez na identificação na localização dos antibióticos garantida pelo conhecimento prévio das posições geométricas relativas entre os discos no gabarito descrito pelo dispensador e pelo Polisensidisco. O banco de imagens construído também limita o algoritmo em identificar apenas as sequências de discos estipuladas (Tabela 1). Entretanto, o faz de forma robusta, devido a estratégia de avaliação das vizinhanças dos discos descrita no presente trabalho. A Figura 30 exemplifica um caso no qual a binarização e classificação não é suficiente para identificar diversos discos. Com a estratégia de vizinhança, os mesmos são estimados e posteriormente identificados. Além disso, ressalta-se a possibilidade de inserção de novas sequências e rótulos no banco, conforme necessidade.

Conforme proposto, foi desenvolvida uma interface gráfica no qual o usuário é capaz de selecionar tipos de dispensadores, discos e sequencia de discos antimicrobianos disponíveis no mercado. O trabalho em questão mostrou a possibilidade de adaptação do código desenvolvido para outros contextos, utilizando para tanto o vetor de configuração proposto (Tabela 2).

Os desafios descritos na Figura 3 foram abordados no AIA, complementado a estratégia descrita em (COSTA et al., 2012b). A sobreposição de halos e a não homogeneidade da circunferência foram combatidas com a inserção de quatro semi-circunferências independentes (Figura 19) que ao atingir o limiar T determinava o diâmetro do halo. A parcial atuação do antibiótico e a formação de segundo halo foram abordadas devido a necessidade de haver 10 *pixels* (Oxoid) ou 50 *pixels* (DME) com nível de intensidade superior a 90% de T. Além disso, a geração da promediação foi incrementada com linhas diagonais e

Dicos classificados Dicos class

Dicos classificados e a máscara projetada



Posição dos dicos estimados



Figura 30 – Importância da estratégia de vizinhança e do conhecimento prévio da disposição dos discos.

tratamento de picos. A presença do Polisensidisco nos halos das imagens do padrão DME impossibilitou aplicar estratégia idêntica a desenvolvida para o padrão Oxoid. Entretanto, a logística utilizada foi a mesma, sendo justificada e discutida cada alteração (seção 2.4).

Nessa proposta o algoritmo foi limitado a um intervalo de 8 a 30 mm de diâmetro (CLSI, 2009) para a região de inibição do antibiótico. Salienta-se que a primeira circunferência usada no cálculo da região já parte de 8 mm de halo e que o filtro baseado no limiar T (equação 2.2) trata tanto casos com ausência de halo como os que ultrapassam os 30 mm. Nos casos fora desse intervalo (d > 30 e d < 8) a resposta do algoritmo fixa valores de 30 mm e 6 mm, respectivamente. Tal característica não foi implementada em (COSTA et al., 2012b) que apenas processava halos com diâmetro entre 8 e 30 mm. Dessa forma, o algoritmo está mais completo e próximo a realidade de sua aplicação.

O AIA apresentou 20 (12,81%) casos de resultados com diferenças acima de de 3 mm (Figura 27) para o padrão Oxoid e 31 casos (25,83%) para o padrão DME (Figura 28). Além disso, foi verificado 13,5% de discordâncias (Tabela 4) para o Oxoid e 12,5 % para o DME (Tabela 6). A funcionalidade de correção de halos automáticos desenvolvido (Figura 8.D) visa sanar tais erros, que são facilmente verificados visualmente.

Os resultados de discordância maior (0,6%) e muito maior (3,8%) para o padrão Oxoid e maior (1,7%) e muito maior (2,5%) para o DME, do AIA foram próximos a sistemas já desenvolvidos. Em (HEJBLUM et al., 1993) tais valores atingiram no pior caso 3,3% e 2,3%, respectivamente. Já (NOLTE et al., 1988) foi apresentado valores iguais a 2,6 e 3,3% para maior e muito maior discordância, respectivamente. O valor de 9% de menor discordância (Oxoid) foi considerado alto comparado aos sistemas existentes, que atingem em média 2%. Pretende-se analisar e corrigir o motivo de tal diferença em trabalhos futuros. Com relação a correlação, o AIA atingiu correlação de 0,93 para o padrão Oxoid, valor maior que o sistema Sirscan no pior caso (NIJS et al., 2003), que no melhor caso atinge 0,97. Já o padrão DME apresentou correlação de 0,83. Verifica-se neste caso a importância de uma coleta de imagem controlada, evitando sérios problemas de iluminação e reflexo presentes nas imagens do padrão DME.

As Figuras 26 e 28 mostram que a diferença entre medições concentrou-se em valores menores ou igual a 3 mm (87,19% para Oxoid e 74,16% para DME), enquanto que as tabelas 4 e 6 apresentaram uma alta concordância de 86,5% (Oxoid) e 87,5% (DME). Para o padrão Oxoid foi obtido uma média de Erro Médio Quadrático e desvio de 1,70 e 3,49 mm, respectivamente. Já para o DME tais valores foram de 2,74 mm e 4,46 mm, respectivamente. As médias atingidas foram menores que 3 mm, o que indica resultado positivo, já os altos desvios são devido as discordâncias maiores e muito maiores (Tabelas 6 e 4).

O teste t de "Student" (p < 0, 05) não revelou diferenças significativas entre os dois métodos de medida. Tais valores enfatizam o fato de que os valores obtidos automaticamente seguem de forma conjunta os valores manuais. Logo, o método automático foi capaz de determinar medidas com diferenças não significativas entre as geradas pelo método manual, sem as variações provenientes de erros instrumentais ou erros grosseiros e com tempo de interpretação médio de 70 segundos.

5 Conclusão

Neste trabalho foi descrito um método automático para identificação de rótulos alfanuméricos em discos de antibiograma pela técnica de disco-difusão, bem como a identificação dos halos de inibição envolvidos. Tal método visa auxiliar a interpretação da técnica para microbiologistas, acrescentando algumas vantagens quando comparado a medição manual, como por exemplo, o baixo tempo de consumo na leitura e a uniformização de procedimentos intra e inter-laboratorial.

O método proposto identificou corretamente todos os 276 rótulos dentro das 34 imagens coletadas. O mesmo se mostrou bastante robusto, e os resultados tendem a melhorar com a construção do sistema de coleta de imagens proposto do projeto. Complementarmente, a técnica desenvolvida no presente trabalho possibilitou a identificação da região de inibição dos antibióticos, com alta correlação e níveis de concordância e discordância condizentes com sistemas existentes na bibliografia.

Problemas de sobreposição de halos, semeação do microrganismo, não homogeneidade da circunferência, parcial atuação do antimicrobiano e formação de segundo halo foram abordados com técnicas automáticas e adaptativas a cada imagem recebida. A aplicação do AIA a padrões com placas de diferentes dimensões, disposições de discos e antimicrobianos associados foi realizada com sucesso, indicando viabilidade para aplicações gerais.

A interface gráfica desenvolvida visou atender tanto o especialista, possibilitando o controle das medidas, salvar configurações e resultados obtidos, quanto ao desenvolvedor, apresentando resultados parciais, ferramentas de análise e acompanhamento em tempo de processamento. Além disso, é oferecida a opção de seleção do diâmetro do halo de forma manual pelo *mouse*. Tais opções podem ser mantidas ou removidas de acordo com a aplicação e o cliente pretendido.

A combinação do *software* apresentado neste trabalho com a interface gráfica desenvolvida e o equipamento de aquisição, transmissão e recebimento de imagens contido no projeto Autobac, concebem um sistema para auxílio a interpretação do antibiograma por disco-difusão. Os resultados positivos apresentados visam facilitar ao máximo a tarefa do especialista, não diminuindo sua importância neste processo. Pelo contrário, o AIA permite que este trabalho seja mais efetivo, rápido e menos tedioso, combinando engenharia e microbiologia para um fim comum: a qualidade do exame.

5.1 Desenvolvimentos Futuros

Visando aumentar o controle e eficácia do processo de interpretação, será construído uma logística cliente-servidor, no qual o cliente será responsável por digitalizar as imagens de antibiograma (o projeto AUTOBAC presume a construção de uma *scanner* para tal fim) e, no servidor, as imagens serão processadas e os resultados supervisionados por um profissional. Dessa forma, a privacidade do software é garantida e os resultados recebem um *feedback* importante na confiabilidade do produto.

Complementarmente, o projeto tem por objetivo levantar outros padrões comerciais de placas de Petri, de disposições e tipos de dispensadores utilizados em clínicas, de discos antimicrobianos e de microrganismos aplicados. Após sua validação, o código será convertido e embarcado em plataforma embarcada, sendo tal procedimento de crucial importância no contexto do projeto AUTOBAC.

Referências

ANDREWS, J. M.; BOSWELL, F. J.; WISE, R. Evaluation of the oxoid aura image system for measuring zones of inhibition with the disc diffusion technique. In: *Journal of Antimicrobial Chemother*. [S.l.: s.n.], 2000. v. 46, p. 535–540. Citado na página 23.

BACKES, B. A. et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing of gram-negative clinical isolates with the automicrobic system. In: *Journal of Clinical Microbiology*. [S.l.: s.n.], 1984. p. 744–747. Citado na página 23.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. v. 45, p. 493–496, 1966. Citado na página 21.

BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. In: *Editora FUNPEC*. São Paulo, Brasil: [s.n.], 2002. Citado na página 49.

BROCK. *Biology of microorganisms*. Thirteenth edition. [S.l.: s.n.], 1966. Citado 3 vezes nas páginas 13, 21 e 23.

CLSI. Clinical laboratory standards institute. In: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, M02-A10.* [S.l.: s.n.], 2009. v. 29. Citado 5 vezes nas páginas 30, 39, 48, 53 e 54.

COSTA, L. F. R. et al. Método automático para identificação de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiograma. In: *Anais do XIX Congresso Brasileiro de Automática*. XIX Congresso Brasileiro de Automática, Campina Grande, Brazil: [s.n.], 2012. Citado 3 vezes nas páginas 24, 30 e 36.

COSTA, L. F. R. et al. Método automático para identificação robusta da região de inibição em antibiogramas. In: *Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*. XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2012, Porto de Galinhas, Brazil: [s.n.], 2012. Citado 4 vezes nas páginas 24, 30, 53 e 54.

FLUSSER, J.; SUK, T. Patter recognition by affine moment invariants. In: *Patter Recognition*. [S.l.: s.n.], 1993. v. 26, p. 167–174. Citado na página 38.

GAVOILLE, A.; BARDY, B.; ANDREMONT, A. Measurement of inhibition zone diameter in disk susceptibility tests by computerized image analysis. In: LTD, E. S. (Ed.). *Comput. Biol. Med.* [S.l.: s.n.], 1994. v. 24, p. 179–188. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 48.

GLASBEY, C. A.; HORGAN, G. W. Analysis for the biological sciences correas. In: . New York: John Wiley and Sons, Scotland, Edinburgh: [s.n.], 1994. Citado na página 24.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. Digital image processing. In: PRENTICE-HALL, E. (Ed.). *Journal of Clinical Microbiol*. Upper Saddle River, New Jersey: [s.n.], 2008. Citado na página 39.

HEJBLUM, G. et al. Automated interpretation of disk diffusion antibiotic susceptibility tests with the radial profile analysis algorithm. In: PATHOL, A. J. C. (Ed.). *Journal of Clinical Microbiology*. [S.l.: s.n.], 1993. p. 2396–2401. Citado 5 vezes nas páginas 22, 23, 30, 48 e 55.

KELLY, M. T. et al. Comparison of three automated systems for antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacilli. In: *Journal of Clinical Microbiology*. [S.l.: s.n.], 1982. p. 902–905. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 48.

LEGRAND, L. R.; AHO, L. S.; DUSSERRE, L. Antibigram automatic reading with a micro-computer based image processing system. In: *Proceeding RC IEEE-EMBS 14th BMESI.* [S.l.: s.n.], 1995. Citado na página 23.

LESTARI, E. S. et al. Comparison of the accuracy of disk diffusion zone diameters obtained by manual zone measurements to that by automated zone measurements to determine antimicrobial susceptibility. In: *Journal of Microbiology Methods*. [S.1.: s.n.], 2008. p. 177–181. Citado na página 24.

LIVERMORE, D. M. et al. Multicenter evaluation of the vitek 2 advance expert system for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. v. 49, p. 289–300, 2002. Citado na página 22.

NIJS, A. et al. Comparison and evaluation of osiris and sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. In: *Journal of Clinical Microbiol.* [S.I.: s.n.], 2003. v. 41, p. 3627–3630. Citado na página 55.

NOLTE, F. S. et al. Rapid and overnight microdilution antibiotic susceptibility testing with the sensititre autoreader system. In: *J. Clin. Microbiol.* [S.l.: s.n.], 1988. v. 26, p. 1079–1084. Citado na página 55.

OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histograms. In: *IEEE Trans.* Systems, Man, and Cybernetics. [S.l.: s.n.], 1994. v. 9, p. 62–66. Citado na página 34.

REIBER, N. E. et al. Comparison of the cathra repliscan ii, the automicrobic system gram-negative general susceptibility-plus card, and the micro- media system fox panel for dilution susceptibility testing of gram-negative bacilli. In: *Journal of Clinical Microbiology*. [S.l.: s.n.], 1985. p. 959–962. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 48.

SANTOS, M. A.; MASIERO, P. C. Especificação de requisitos: uma introdução. In: PAULO, U. de S. (Ed.). *Instituto de Ciências Matemáticas de São Carlos*. [S.l.: s.n.], 1996. Citado na página 25.