



UnB - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FGA - FACULDADE GAMA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
BIOMÉDICA**

**Métodos computacionais para o cálculo na
densidade superficial bacteriana em placa de Petri
como indicador de infecção urinária**

Autor: Fernanda Pereira Santana

Orientador: Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade

Brasília, DF

2018



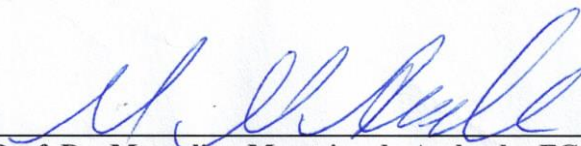
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DO GAMA
ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**"MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA O CÁLCULO NA
DENSIDADE SUPERFICIAL BACTERIANA EM PLACA DE PETRI
COMO INDICADOR DE INFECÇÃO URINÁRIA "**

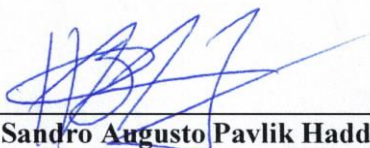
FERNANDA PEREIRA SANTANA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE UNB GAMA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA
A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.**

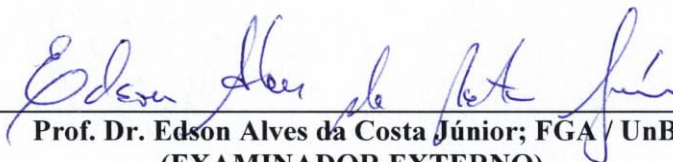
APROVADA POR:



**Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade; FGA / UnB
(ORIENTADOR)**



**Prof. Dr. Sandro Augusto Pavlik Haddad; FGA / UnB
(EXAMINADOR INTERNO)**



**Prof. Dr. Edson Alves da Costa Júnior; FGA / UnB
(EXAMINADOR EXTERNO)**

Brasília, 18 de outubro de 2018

BRASÍLIA/DF, 17 DE OUTUBRO DE 2018.

FICHA CATALOGRÁFICA

FERNANDA PEREIRA SANTANA

MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA O CÁLCULO NA DENSIDADE SUPERFICIAL BACTERIANA EM PLACA DE PETRI COMO INDICADOR DE INFECÇÃO URINÁRIA, [Distrito Federal] 2018.

Nº.p.60, 210 x 297 mm (FGA/UnB Gama, Mestre, Engenharia Biomédica, 2018).
Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília. Faculdade Gama. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica 45Ulc.

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| 1. PALAVRA-CHAVE Urocultura | 2. PALAVRA-CHAVE Contagem de colônias |
| 3. PALAVRA-CHAVE UFC | 4. PALAVRA-CHAVE Limiarização |
| I. FGA UnB Gama/ UnB. | II TÍTULO 101 A |

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SANTANA, F. P. (2018). MESTRE. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Publicação NO./2018, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Faculdade Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, nº.p.61.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: FERNANDA PEREIRA SANTANA.

TÍTULO: MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA O CÁLCULO NA DENSIDADE SUPERFICIAL BACTERIANA EM PLACA DE PETRI COMO INDICADOR DE INFECÇÃO URINÁRIA.

GRAU: Mestre

ANO: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

2018

Faculdade UnB Gama - FGA Universidade de Brasília Área Especial de Indústria
Projeção A Setor Leste Gama. CEP 72.444-240 Brasília, DF – Brasil.

*Pra quem tem fé, a vida
nunca tem fim....*

(Marcelo Falcão)

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor nosso Deus o maior e mais importante responsável por me fazer chegar a este objetivo, a Ele seja dada toda honra e toda glória.

À todos os meus familiares pela confiança e em especial à minha mãe dona Marcelina pelos anos de esforço para me ver fechar mais esse ciclo, obrigado por me dar educação e me fazer correr atrás dos meus objetivos e aspirações com um único e bem definido objetivo, mudar nosso futuro.

Ao Luan Costa, mestre que me ajudou a alcançar esse objetivo, meu muito obrigado pela disponibilidade e possibilidade de chegar até aqui. Ao Gustavo Arvelos, Engenheiro que me deu tanto suporte e alegria em tê-lo por perto sempre com tamanha disponibilidade para me auxiliar.

Aos meus amigos e professores, pelo conhecimento compartilhado pelos momentos agradáveis e de infinito aprendizado, meu mais tenro agradecimento.

Ao meu orientador Dr. Marcelino Monteiro de Andrade. Obrigado pela oportunidade e por ter aberto as portas de seu conhecimento e me permitir compartilhá-lo.

A todas as pessoas que estiveram envolvidas nas diferentes etapas de elaboração e execução deste trabalho. Obrigada pela credibilidade e força para que eu finalizasse essa etapa tão desejada e difícil.

A todos, minha gratidão e carinho.

RESUMO

MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA O CÁLCULO NA DENSIDADE SUPERFICIAL BACTERIANA EM PLACA DE PETRI COMO INDICADOR DE INFECÇÃO URINÁRIA.

Autor: Fernanda Pereira Santana

Orientador: Prof. Dr. Marcelino Monteiro de Andrade

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Brasília, Dezembro de 2018.

O crescimento bacteriano em amostras biológicas é analisado por meio da contagem de colônias bacterianas que são em sua maioria determinadas em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). Todas as técnicas de contagem atualmente disponíveis acarretam ônus e dificuldades na padronização do método e não mostraram-se eficazes para contagem de colônias bacterianas com características de espalhamento. Diante das dificuldades para padronização deste método, o objetivo desta pesquisa é propor um método semi automatizado, indicador de infecção urinária considerando a área superficial ocupada pelas colônias em placas de Petri e não o volume de amostra inoculada. Foram analisadas amostras que apresentaram crescimento bacteriano, e adquiridas imagens das placas por meio da plataforma AUTOBAC. Para a quantificação bacteriana foi determinada a área ocupada pelas colônias na superfície da placa de Petri, por meio de processos de limiarização realizados em um algoritmo desenvolvido no software *Matlab*. Os resultados obtidos por este algoritmo, foram satisfatórios e expressos em UFC/cm², e quando comparados ao método *Gold Standard* apresentaram correlação e concordância aceitáveis em métodos diagnósticos.

Palavras-chave: Contagem de colônias.; UFC/mL e Limiarização

ABSTRACT

COMPUTATIONAL METHODS FOR THE CALCULATION IN BACTERIAL SURFACE DENSITY IN PLATE OF PETRI AS INDICATOR OF URINARY INFECTION.

**Author: Fernanda Pereira Santana
Privacy Policy | Dr. Marcelino Monteiro de Andrade
Postgraduate Program in Biomedical Engineering
Brasília, October 2018.**

Bacterial growth in biological samples is analyzed by counting bacterial colonies that are mostly determined in Colony Forming Units per milliliter (CFU / mL). All counting techniques currently available entail burdens and difficulties in the standardization of the method and were not effective in counting bacterial colonies with spreading characteristics. In view of the difficulties to standardize this method, the objective of this research is to propose a semi automated method, indicative of urinary infection considering the surface area occupied by the colonies in Petri dishes and not the inoculated sample volume. Samples that showed bacterial growth were analyzed, and images of the plates were acquired through the AUTOBAC platform. For the bacterial quantification the area occupied by the colonies on the surface of the Petri dish was determined by means of thresholding processes performed in an algorithm developed in Matlab software. The results obtained by this algorithm were satisfactory and expressed in CFU / cm², and when compared to the Gold Standard method, they showed acceptable correlation and concordance in diagnostic methods

Key-words: Counting of colonies.; CFU/mL and Threshold

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	19
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 MICROBIOLOGIA NO AUXILIO DIAGNÓSTICO	20
3.1.1 Diagnóstico de infecções do trato urinário	20
3.1.2 Contagem de colônias	21
3.1.3 Morfologia bacteriana.....	25
3.2. TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS	26
3.2.1 Processamento de imagens.....	26
3.3. PLATAFORMA AUTOBAC.....	29
4 METODOLOGIA	34
4.1 AMOSTRAGEM	34
4.2 SEMEIO E LEITURA DAS AMOSTRAS POR MÉTODO DIRETO EM PLACA	34
4.3 AQUISIÇÃO DE IMAGENS.....	34
4.4 PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COLÔNIAS BACTERIANAS	35
4.4.1 Determinação por método direto de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).....	36
4.4.2 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia por determinação de área	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 CONTAGEM DE COLÔNIAS REALIZADA POR MÉTODO DIRETO EM PLACA E POR <i>SOFTWARE IMAGEJ</i> ®.....	47
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS EM UFC/cm ²	48
5.3.1 Calculando Sensibilidade e Especificidade	51
5.3.2 Determinação de concordância entre os métodos	52
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	57

ANEXO 1	61
----------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aparelho Contador de colônias com placa de Petri na bacia de sustentação	23
Figura 2: Curva de crescimento bacteriano. (Nascimento, 2009).....	25
Figura 3: Colônias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , com características de espalhamento sobre superfície de ágar Mac Conkey em placa de Petri.	26
Figura 4: Máscara para detecção de pixels isolados.....	27
Figura 5: Processamento das imagens de colônias bacterianas. (a) Imagem original das colônias, (b) Imagem pré processada (c) Espaço de <i>Hough</i> (d) Colônias detectadas após tratamento da imagem (PINHEIRO <i>et.al</i> , 2013).....	28
Figura 6: Imagem pré processada obtida após a aplicação de uma máscara sobre a imagem; b) Imagem resultante da aplicação do algoritmo de subtração de fundo na imagem da Figura (a); c) Resultado após o processo de limiarização (limiar igual a 12) e remoção da falsa borda gerada. (OSOWSKY E GAMBA, 2001).....	29
Figura 7: Organograma da subdivisão do sistema AUTOBAC (ARVELOS, 2015. adaptado).	30
Figura 8: Vista interna do protótipo AUTOBAC com fitas de LEDs orientados nas paredes e parte inferior.(ARVELOS, 2015)	31
Figura 9: Fluxograma de funcionamento do projeto AUTOBAC (ARVELOS, 2015)..	32
Figura 10: Protótipo final com sistema eletrônico integrado, a: Placa 1, alimentação, b: Placa 2, conexão com Raspberry Pi; c Raspberry Pi. (ARVELOS, 2015).....	32
Figura 11: Vista externa do protótipo da AUTOBAC, com placa de Petri posicionada sobre a gaveta de sustentação (ARVELOS, 2015).	33
Figura 12: Imagem de placa de Petri adquirida pela plataforma AUTOBAC, que apresentou crescimento de colônias de <i>Escherichia coli</i> (abaixo) e <i>Serratia marcescens</i> (acima).	35
Figura 13: Interface do <i>software Image J</i> e suas aplicações. (IGNÁCIO, 2013).	36
Figura 14: Conversão de imagem colorida para monocromática, com conversão em 8 <i>bits</i> , no <i>software ImageJ</i> ®.....	37
Figura 15: Processamento da imagem por limiarização. a) Imagem pré processada; b) Segmentação da imagem; c) Colônias detectadas após tratamento da imagem.....	37
Figura 16: Mascaramento de pixels com baixo nível de intensidade	39
Figura 17: binarização pelo método de Otsu.....	40

Figura 18: Determinação da área de interesse na placa de Petri.....	40
Figura 19: Segmentação da imagem para separação da área da placa de Petri utilizada para semeio.	41
Figura 20: Limiar de intensidade adotado para binarização	41
Figura 21: Contornos da Imagem obtidos por método de <i>Canny</i>	42
Figura 22: Transformada de Hough para detecção de linha central que divide a placa.	42
Figura 23: Secção da imagem em lado esquerdo e direito.	43
Figura 24: Segmentação de imagem bimodal utilizando o método de Otsu	43
Figura 25: A imagem resultante foi submetida a um ajuste de contraste adaptativo.	44
Figura 26: Fluxograma de desenvolvimento do Algoritmo de contagem de colônias bacterianas.....	44
Figura 27: Representação gráfica de resultados obtidos da contagem de colônias por método direto em placa e pelo <i>software ImageJ</i> ®.	46
Figura 28: Etapas de processamento de imagem para determinação de área em amostra com crescimento de <i>Escherichia coli</i>	49
Figura 29: Representação gráfica comparativa de resultados obtidos em UFC/mL e UFC/cm ²	49
Figura 30 Representação gráfica que combina a média das duas medidas (Eixo horizontal) e a diferença das duas medidas (Eixo vertical).	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação de métodos de contagem de colônias para ITU.....	21
Tabela 2: Determinação quantitativa das colônias bacterianas.....	22
Tabela 3-Volume de amostra inoculado por alça calibrada em amostra de urina:	24
Tabela 4: Relação da doença com o Teste	52
Tabela 5: Variáveis médias individuais e diferenças individuais obtidas entre as duas medidas.....	53

LISTA DE ABREVIACOES

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute

CV – Cateterismo vesical

ITU-RAS – Infecção de trato urinário de origem hospitalar

ITU – Infecção de trato urinário

LED – Light Emitting Diode

RGB – (Red Green Blue) Sistema de cores aditivas reproduz espectro cromático.

UFC – Unidade formadoras de colônia

UFC/mL – Unidade formadoras de colônia por mililitro

UFC/ cm² – Unidade formadoras de colônia por centímetro quadrado

UTI – Unidade de terapia intensiva

1 INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) se caracteriza por ser a infecção de maior incidência em pacientes que procuram os serviços de saúde. As ITUs podem ser de origem comunitária ou hospitalar, sendo que a segunda está amplamente relacionada a utilização de procedimentos invasivos (LIMA *et al.* 2007).

Para diagnóstico de infecções do trato urinário utiliza-se a cultura da urina, visando o crescimento do microrganismo que esteja relacionado a infecção. Após o isolamento do microrganismo em meios específicos, considera-se o método de contagem de colônias, um método utilizado para quantificação de células bacterianas em amostras biológicas que serve como fonte de diagnóstico da infecção urinária.

Dentre os métodos atualmente disponíveis o mais viável é a contagem direta em placa considerada *Gold standard*, que consiste em quantificar colônias diretamente na superfície da placa de Petri, considerando-se o volume de amostra inoculada por alça calibrada, no meio de cultura. A contagem em placa é uma técnica de difícil padronização, que demanda tempo para ser executada, podendo acarretar ônus e dificuldades de padronização (CAMARGO, 2001).

Considerando-se a importância da contagem das colônias para o diagnóstico de infecções do trato urinário e as dificuldades associadas aos métodos disponíveis, o desenvolvimento de métodos automatizados mostrou-se necessário para otimizar o processo. A literatura apresenta alguns métodos automatizados de contagem bacteriana por digitalização de imagens, executados por sistemas de visão computacional. Dentre eles estão o *Template matching* associado ao *Hough circles* e um sistema de contagem desenvolvido utilizando LEDs para iluminação e tratamento de imagem por limiarização (PISTORI & PISTORI, 2003).

Os resultados da contagem de colônias bacterianas são comumente expressos em UFC/mL, para os quais considera-se o volume de amostra inoculado no meio de cultura. Porém esse processo esbarra em problemas como a falta de padronização das técnicas disponíveis levando a uma subjetividade dos resultados, além da dificuldade para quantificação bacteriana em amostras que apresentem colônias com características de espalhamento (MASCHIETO, 2001). Propõe-se então um método de quantificação padronizado, que considera a área ocupada pelas colônias bacterianas na superfície de uma placa de Petri, no qual os resultados serão

expressos em UFC/cm².

Neste trabalho foi aplicada a plataforma AUTOBAC, um projeto desenvolvido com a colaboração do Laboratório de Instrumentação e Processamento de Imagens e Sinais (LIPIS), localizado na Faculdade UnB Gama (FGA). O AUTOBAC é um protótipo, composto por um sistema computacional embarcado para realização de leitura automática, e possui uma plataforma acoplada de aquisição de imagens digitais. É dividido em aquisição, iluminação e integração eletrônica onde as aquisições são realizadas sem a necessidade de desktop ou notebook.

A plataforma AUTOBAC foi validada em trabalho proposto por Costa (2014), para a identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos, de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão, e em trabalho desenvolvido por Arvelos (2015), para aquisição de imagens de antibiograma por Disco difusão, para reconhecimento das regiões de inibição e, respectivos, rótulos alfa numéricos. E foi aplicada neste trabalho para a aquisição de imagens digitais de placas de Petri, que apresentaram algum crescimento bacteriano.

O objetivo desse trabalho é semi automatizar na plataforma AUTOBAC, o procedimento de contagem de colônias bacterianas, um parâmetro indicador de infecção urinária. Conceber uma metodologia computacional para a quantificação das colônias bacterianas. Nesse contexto foi implementado um algoritmo por meio de sistema de visão computacional, esse algoritmo foi desenvolvido utilizando-se o *software MatLab (Matrix Laboratory)*. O *MatLab* é um software que faz cálculos com matrizes utilizando uma linguagem de programação de alto desempenho para computação técnica, é um software utilizado facilmente para realizar cálculos específicos (SANTOS, 2005)

Dentro do algoritmo desenvolvido foi realizada a contagem automática das colônias a partir de imagens de placas de Petri capturadas pela plataforma AUTOBAC. O processo de segmentação, para distinguir regiões de interesse de uma imagem, pode ser realizado por binarização, que consiste na determinação de um limiar que será o valor da escala de cinza, diferenciando o objeto do fundo da imagem (ARAUJO *et al.* 2017).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo é apresentada a revisão de literatura das referências levantadas e utilizadas nesse trabalho. A pesquisa foi realizada por meio de buscas em fontes especializadas como: PubMed, BVSalud, LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), MEDLINE (Literatura Internacional em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online). Os tipos de estudos selecionados foram: Revisões sistemáticas obtidas a partir da combinação dos seguintes unitermos: microbiologia, infecção urinária, urocultura, contagem de colônias e limiarização.

As pesquisas com os termos “infecção urinária” retornou 105 documentos, dos quais 7 foram selecionados e 2 são descritos a seguir por sua relevância para o tema proposto. No ano de 2004, a Sociedade Brasileira de Infectologia e a Sociedade Brasileira de Urologia, elaboraram um documento utilizado até os dias atuais como referência, esse documento apresenta de forma sucinta e didática as diretrizes fundamentais para o diagnóstico laboratorial das infecções do trato urinário e foi utilizado neste trabalho como referência, por conter instruções bem definidas para o diagnóstico das ITUs.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária disponibiliza em seu portal de Educação e pesquisa, manuais e notas técnicas relacionadas ao diagnóstico e epidemiologia da infecção urinária, dentre os documentos selecionados está o Manual de Principais Síndromes Infecciosas, (2004), que apresenta um conjunto de definições e instruções que devem ser seguidas por laboratórios clínicos.

A pesquisa com as palavras-chave “contagem de colônias” retornou 8 artigos dos quais 3 foram selecionados. Em trabalho realizado por Silva (2002), foram descritos os métodos disponíveis para contagem de colônias, fazendo uma comparação entre a técnica de tubos múltiplos e a técnica de contagem em placas. Esse estudo mostra que os resultados obtidos pela técnica de tubos múltiplos não podem ser expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC), pois é um método estatístico determinado por meio de tabelas e em sua maioria apresenta resultados maiores que os resultados da contagem em placa.

O CLSI (*Clinical Laboratory Standard Methods*) que promove o desenvolvimento e uso de padrões e diretrizes de consenso laboratorial, disponibilizou

para domínio público o documento “*Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine, specimens; Approved Guideline*”, que discorre sobre a coleta, transporte e avaliação de amostras de urina. Esse documento padroniza o procedimento de contagem de colônias em placas de Petri, sugerindo que para realizar contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), considere-se a diluição adotada para posteriormente obter-se o número de bactérias viáveis por mililitro determinando assim a quantidade de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

A pesquisa de CESARIL et al. (2016), “Verificação das condições higiênico-sanitárias de panificadoras em Francisco Beltrão, PR”, apresenta os critérios satisfatórios para crescimento bacteriano em superfícies, o qual define resultados satisfatórios até 50 UFC/cm². Este critério foi adotado como referência, para todas as análises em UFC/cm² realizadas neste trabalho.

A pesquisa com a palavra-chave “Limiarização” retornou 14 trabalhos, dos quais 3 foram selecionados por terem relevância sobre “Processamento e digitalização de imagens para contagem de colônias”. Em trabalho desenvolvido por de Araújo et al. (2017), implementou-se uma aplicação, que realiza o processo de contagem automática de colônias bacterianas por meio de digitalização de imagens e visão computacional por meio da interface de um *software*. As imagens foram submetidas a processos de segmentação utilizando o método de limiarização bimodal de Otsu.

No trabalho desenvolvido por Pinheiro et al. (2013), implementou-se um algoritmo utilizando as técnicas de *Template matching*, para determinar todas as sobreposições possíveis entre as duas imagens, e *hough circles*. O algoritmo valeu-se de cálculos trigonométricos apenas quando localiza o *pixel* com valor 255 na borda de algum objeto, como as colônias bacterianas podem apresentar-se em círculos de tamanhos variados, não é possível utilizar raio fixo para determinação da circunferência da colônia. No presente estudo, ficou evidente que o método de *Template matching* associado a técnica de *hough circles* apresentou melhor desempenho para contagem das colônias que a técnica de *Template matching* isolada, isso deve-se ao fato de alguns interferentes como regiões de aglomeração das colônias bacterianas e reflexo nas bordas das placas de Petri, além da melhora na iluminação para aumentar a qualidade de captação das imagens.

No trabalho de Osowsky e Gamba (2001), foi desenvolvido um método de

contagem de colônias por meio de um algoritmo de processamento digital. Foi implementado um protótipo composto por um sistema de iluminação com LEDs e câmera CCD que possibilita uma alta qualidade na aquisição das imagens das colônias, para realização da contagem de UFCs foi desenvolvido um algoritmo de etiquetagem recursivo para contar objetos de coloração branca em uma imagem binária. Concluiu-se desse estudo que o sistema automático para contagem de colônias por meio do desenvolvimento de um algoritmo mostra que um sistema de iluminação simples e compacto com LEDs pode alcançar resultados excelentes, com alta reprodutibilidade e velocidade pois o cálculo da média de mais de 10 imagens adquiridas não alterou o resultado final, com um tempo de contagem estimado de 10 segundos.

Foram descartados artigos que não tratavam diretamente do diagnóstico de infecções urinárias que é o enfoque deste trabalho.

2.1 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho está organizado em seis capítulos, incluindo este capítulo. No capítulo dois, é apresentada uma revisão da literatura, objetivando a compreensão das tecnologias, conceitos, e padrões utilizados disponíveis para a contagem de colônias bacterianas. Logo, são abordados os seguintes temas: (i) Urocultura, (ii) ITU; (iii) Contagem de colônias; (iv): UFC/cm², UFC/mL (v) AUTOBAC e (vi). Limiarização.

O capítulo três detalha a fundamentação teórica, utilizada como base para realização desse estudo.

O capítulo quatro descreve a metodologia aplicada para todos os processos neste estudo.

O capítulo cinco descreve todos os resultados obtidos nesse estudo, desde as contagens realizadas em UFC/mL e UFC/cm² e seus erros associados.

Por fim o capítulo seis, discute os pontos de maior importância envolvendo o tema deste estudo e apresenta as conclusões finais do trabalho.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo é apresentado a fundamentação teórica, utilizada para embasar por meio de ideias todos os aspectos teóricos relacionados a esta pesquisa.

3.1 MICROBIOLOGIA NO AUXILIO DIAGNÓSTICO

A microbiologia é um ramo da biologia que estuda a morfologia, a fisiologia e a taxonomia dos seres microscópicos. Os microrganismos raramente encontram-se isolados no meio ambiente, em geral estão misturados e se desenvolvem quando submetidos a condições ideais, dentre as técnicas utilizadas em microbiologia o cultivo, em meio sólido utilizando nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, é a técnica mais tradicional. Em muitas situações é necessário identificar e quantificar os microrganismos presentes em determinados meios (ALVES, 2006).

A microbiologia tem um papel essencial no diagnóstico de doenças que acometem a população, neste contexto vários órgãos e entidades tem estabelecido padrões para as análises microbiológicas, principalmente nos procedimentos de quantificação bacteriana (ANVISA, 2013). A contagem de colônias é adotada como técnica auxiliar no diagnóstico de infecções do trato respiratório, infecções de corrente sanguínea e infecções urinárias. Essa última é a mais frequente portanto será o enfoque deste trabalho.

3.1.1 Diagnóstico de infecções do trato urinário

A infecção do trato urinário (ITU), é uma das patologias mais comumente diagnosticadas e que exige conduta clínica adequada, para garantir um tratamento correto e eficaz. Define-se como ITU aquelas que acometem o trato urinário alto (pielonefrite) ou o trato urinário baixo (cistite) (MAFRA *et al.*, 2014). O diagnóstico da infecção urinária é realizado através da análise da urina, o método mais eficaz para realização dessa análise é a urocultura, uma técnica quantitativa que auxilia no diagnóstico das infecções do trato urinário.

A obtenção de resultados confiáveis depende diretamente das instruções de coleta, afim de evitar contaminações com a microbiota uretral, o que pode influenciar diretamente no resultado do exame (Sociedade Brasileira de Infectologia e Sociedade

Brasileira de Urologia, 2004).

Segundo TORTORA et.al (2017), os patógenos mais comuns causadores de infecção urinária são as enterobactérias, microrganismos colonizadores do trato gastrointestinal, que se duplicam em média a cada vinte minutos.

3.1.2 Contagem de colônias

Após o isolamento do microrganismo em meios específicos, considera-se a contagem de colônias, um método utilizado para quantificação de células bacterianas em amostras biológicas, que serve como fonte de diagnóstico da infecção urinária.

Hoje são conhecidos dois critérios para avaliação da existência de infecção urinária, baseado na contagem de colônias, o critério de Kass (1956), que considera como ITU amostras com contagem de colônia >100.000 UFC/mL e o critério de Stamm (1982), que considera ITU amostras com contagem de colônias >100 UFC/mL, a utilização de qualquer dos critérios é adotada pelo laboratorista (CAMARGO et al. ,2001).

A comparação dos critérios de contagem bacteriana disponíveis e a análise de sensibilidade e especificidade realizada para esses métodos, pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 Comparação de métodos de contagem de colônias para ITU

Pesquisador	Urina	Sensibilidade	Especificidade
Stamm (1982)	>100 coliformes/mL	0.95	0.85
Kass (1956)	>100.000 coliformes/mL	0.51	0.99

Nota. Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004). Manual de Principais Síndromes Infecciosas. Módulo I.

Em laboratórios clínicos considera-se como infectadas aquelas amostras que apresentarem um crescimento acima de 100.000UFC/mL (ANVISA, 2004).

Os Resultados de contagem de colônias estabelecidos pela Associação Americana de Saúde Pública, são interpretados considerando três contagens gerais

para classificar potenciais infecções que possam estar associadas ao crescimento bacteriano conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Determinação quantitativa das colônias bacterianas

Contagem UFC/mL	Interpretação
0 a 9.000	Contaminação
10.000 a 90.000	Infecção potencial
>100.000	Infecção estabelecida

Nota. Fonte: SATO, 2008. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. São Paulo.

As técnicas atualmente disponíveis para quantificação bacteriana são; Contagem direta em placa, Contagem manual por contador automático e a Técnica do Número mais Provável de Microrganismos (NMP).

A técnica de contagem direta em placa, exige um tempo de incubação de 24h para o aparecimento de colônias visíveis na placa. Tal método considera que cada colônia é originária de uma única célula, os resultados dessa contagem são expressos em unidades formadoras de colônia (UFC). Para o sucesso dessa técnica é necessário que um número limitado de 30 a 300 colônias cresça sobre a placa, pois quando há uma saturação de bactérias a contagem é dificultada (TORTORA, 2017).

O plaqueamento em meio sólido consiste em preparar uma solução e realizar diluições seriadas dessa amostra, essas diluições são posteriormente semeadas em placas de Petri com meios de cultura sólidos e incubadas em temperatura adequada afim de propiciar o crescimento bacteriano de colônias isoladas. O plaqueamento em meio sólido pode ser realizado em superfície ou em profundidade, tanto o plaqueamento em profundidade quanto o plaqueamento em superfície são métodos que demandam tempo de incubação e condições ideais para o crescimento bacteriano (CLSI, 2016).

A contagem utilizando o aparelho contador de colônias consiste em posicionar sobre a bacia de sustentação do aparelho a placa de ágar previamente incubada em condições ideais para o crescimento dos microrganismos até as colônias individuais aparecerem, em seguida ilumina-se a placa, marcando o número de colônias na placa

conforme a Figura 1.



Figura 1: Aparelho Contador de colônias com placa de Petri na bacia de sustentação

O método utilizado é realizado a olho nu e demanda tempo, no entanto é a forma mais acessível de realizar a contagem das colônias bacterianas nos laboratórios de microbiologia clínica (DAMASCENO, 2011).

A técnica de tubos múltiplos também conhecida como técnica do número mais provável (NMP), é uma técnica indireta, que segundo PEELER et.al. (1992), é estimada por resultados relatados como positivo ou negativo em diluições decimais de uma amostra. Ao contrário da contagem em placa a NMP não fornece medidas diretas de contagem bacteriana, os resultados não podem expressar unidades formadoras de colônias (UFC), pois é determinado por meio de tabelas como a da Associação Brasileira de normas técnicas ABNT. Este método é estatístico e geralmente apresenta resultados maiores que os resultados da contagem em placa (SILVA, 2002).

Para quantificar as colônias bacterianas crescidas em placas de Petri, recomenda-se a utilização de alça calibrada para inoculação do volume ideal da amostra no meio de cultura. Segundo o Manual de Principais Síndromes Infecciosas – ANVISA (2004), o calibre da alça utilizada na semeadura pode ser definido de acordo com a origem da amostra de urina a ser analisada, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3-Volume de amostra inoculado por alça calibrada em amostra de urina:

Amostra	0,001 ml ou 1 μ l	0,01 ml ou 10 μ l
Urina de Jato médio		X
Urina coletada de Cateter	X	
Urina de Punção supra púbica		X

Nota. Fonte: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (2004). Manual de Principais Síndromes Infeciosas. Módulo I.

O acompanhamento do crescimento bacteriano durante a realização da urocultura é primordial para obter resultados confiáveis. Um crescimento demasiado, ou seja, a realização de uma leitura tardia, aumenta consideravelmente a contagem de colônias, levando a resultados de uroculturas falso-positivas (SBPC, 2014).

CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

O entendimento do crescimento bacteriano faz se necessário para correta execução e avaliação do processo de tratamento de amostras biológicas. As bactérias multiplicam-se de forma assexual por fissão binária ou cissiparidade, dessa forma, durante um intervalo de tempo denominado (Tempo de geração) ocorre a multiplicação bacteriana. O tempo de multiplicação das células varia de acordo com a espécie analisada ou a fase de crescimento, a maioria das bactérias apresentam crescimento após uma a três horas.

A curva de crescimento bacteriano apresenta quatro fases distintas, são elas: Fase Lag onde há intenso metabolismo porém sem multiplicação, Fase Log onde ocorre divisões constantes das células, Fase Estacionária ocorre a diminuição da geração de novas células e Fase de declínio na qual a população diminui e algumas bactérias são capazes de manter-se viáveis por um longo período de tempo (NASCIMENTO, 2009).

A cinética do crescimento bacteriano é descrita na Figura 2.

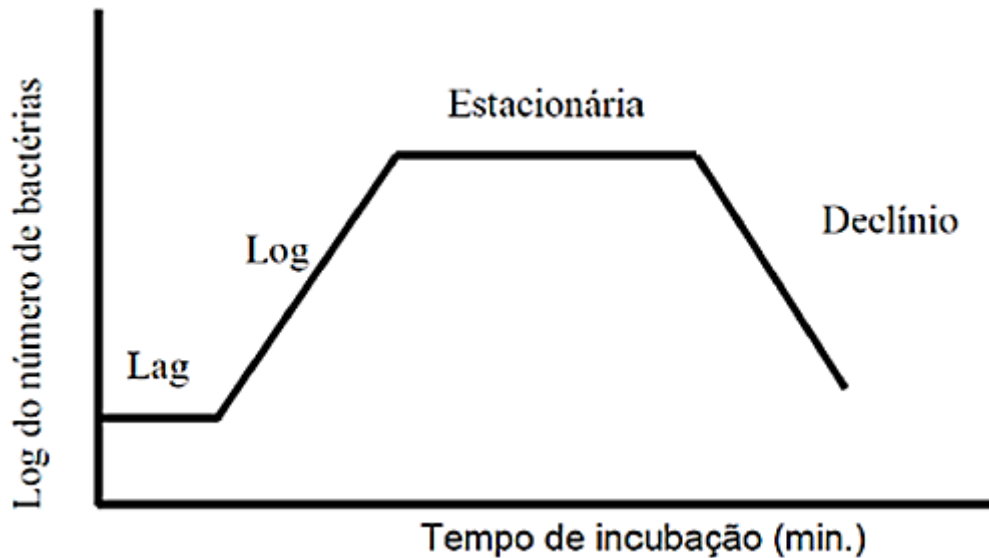


Figura 2: Curva de crescimento bacteriano. (Nascimento, 2009).

Durante a fase pré analítica, verifica-se uma significativa variação das condições utilizadas no preparo da amostra, basicamente o meio de cultura, a diluição do inóculo, a temperatura e o tempo de incubação são essenciais para que a contagem das colônias não exceda os valores aceitáveis.

3.1.3 Morfologia bacteriana

Mesmo obedecendo ao tempo de incubação e leitura da amostra, em alguns casos as colônias crescem de forma desordenada e com sobreposições umas sobre as outras na placa. A morfologia das colônias bacterianas é influenciada pelo tipo de meio e condições de crescimento a que as bactérias são submetidas, para uma boa contagem é importante que as colônias cresçam separadas sobre a placa de Petri para isso é importante a padronização da sementeira.

Em alguns casos, as características das bactérias influenciam diretamente na forma como as colônias crescem sobre a placa de Petri. Alguns microrganismos produzem a cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K), que tem a função de proteção contra a fagocitose por granulócitos, e contra a ação de fatores bactericidas do soro humano, e conferem característica mucóide às colônias como pode ser observado na Figura 3 (SANTOS, 2007).



Figura 3: Colônias de *Klebsiella pneumoniae*, com características de espalhamento sobre superfície de ágar Mac Conkey em placa de Petri.

Colônias que apresentam característica de espalhamento são o maior desafio para a automatização do processo de contagem.

3.2. TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

3.2.1 Processamento de imagens

O processamento de imagens consiste em transformar uma imagem sucessivamente a fim de extrair uma informação de interesse. Análises quantitativas e interpretação da imagem são utilizadas atualmente como apoio para diversas áreas científicas. Na microbiologia o processamento de imagens também tem sido aplicado, predominantemente para quantificação de colônias bacterianas. A padronização desse processo para garantir a precisão de resultados, tem sido o principal objetivo de pesquisa nessa área.

A detecção de *pixel*, a limiarização e o reconhecimento de padrões são os fundamentos básicos para o processamento de imagem. Uma imagem é formada por *pixels* dispostos em linhas e colunas sendo representada por uma matriz onde cada *pixel* tem uma cor. O *pixel* é detectado quando houver uma diferença entre o mesmo e o nível de cinza de uma máscara de convolução, como a descrita na Figura 4.

-1	-1	-1
-1	8	-1
-1	-1	-1

Figura 4: Máscara para detecção de pixels isolados.

Dentro do processamento de imagens aplica-se ainda a limiarização ou *Thresholding*, uma técnica simples que consiste na identificação de picos modais em um histograma e utiliza a intensidade do *pixel* como separador. Essa técnica tem sido empregada inclusive na automatização da contagem de colônias por ter a capacidade de seleção automática, mesmo que características da imagem possam variar dentro de uma faixa de intensidade (ESQUEF, 2003).

As técnicas de reconhecimento de padrões referem-se a qualquer elemento que possa ser definido quantitativamente ainda que sujeito a variações, o reconhecimento de um padrão pode ser feito por diferenciação ou por classificação ou ainda utilizando ambos. São utilizados descritores para caracterizar o objeto, cada descritor adequa-se a determinado aspecto, seja ele: cor, forma ou dimensão (AZEVEDO et al, 2007).

Considerando-se a importância da contagem de colônias no diagnóstico de infecções, novas tecnologias incluindo as técnicas de reconhecimento de padrões têm sido descritas na literatura, com a finalidade de automatização do processo. No trabalho desenvolvido por PINHEIRO *et.al* (2013), desenvolveu-se um algoritmo utilizando as técnicas de *Template matching* e *hough circles*.

A técnica de *Template matching* consiste em calcular a correlação entre a imagem analisada e um *template*, afim de determinar todas as sobreposições possíveis entre as duas imagens (PISTORI & PISTORI, 2003). É possível observar o processamento de imagens das colônias bacterianas onde utilizou-se o espaço *hough* na Figura 5.

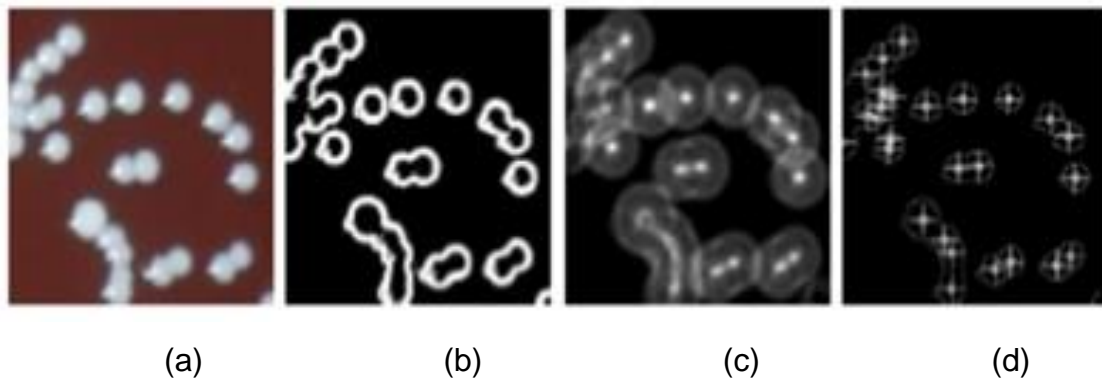


Figura 5: Processamento das imagens de colônias bacterianas. (a) Imagem original das colônias, (b) Imagem pré processada (c) Espaço de *Hough* (d) Colônias detectadas após tratamento da imagem (PINHEIRO *et.al*, 2013).

O algoritmo vale-se de cálculos trigonométricos apenas quando localiza o *pixel* com valor 255 (representa imagem binária) na borda de algum objeto, como as colônias bacterianas podem apresentar-se em círculos de tamanhos variados, não é possível utilizar raio fixo para determinação da circunferência da colônia.

Observou-se através do F-Score obtido no estudo que o desempenho da técnica Hough Circles é excelente quando aplicado em imagens com regiões circulares bem definidas, porém não é eficiente em regiões que apresentam aglomeração (PINHEIRO *et.al*, 2013).

No trabalho de Osowsky e Gamba (2001), foi desenvolvido um método de contagem de colônias por meio de um algoritmo de processamento digital, implementado em um protótipo composto por um sistema de iluminação com LEDs e câmera CCD que possibilita uma alta qualidade na aquisição das imagens. As imagens das colônias foram adquiridas e após calculadas as médias utilizou-se o método de *background subtraction* para separar as colônias de bactérias das imagens restantes.

Para realização da contagem de UFCs, foi desenvolvido um algoritmo de etiquetagem recursivo para contar objetos de coloração branca em uma imagem binária que pode ser observada na Figura 6.

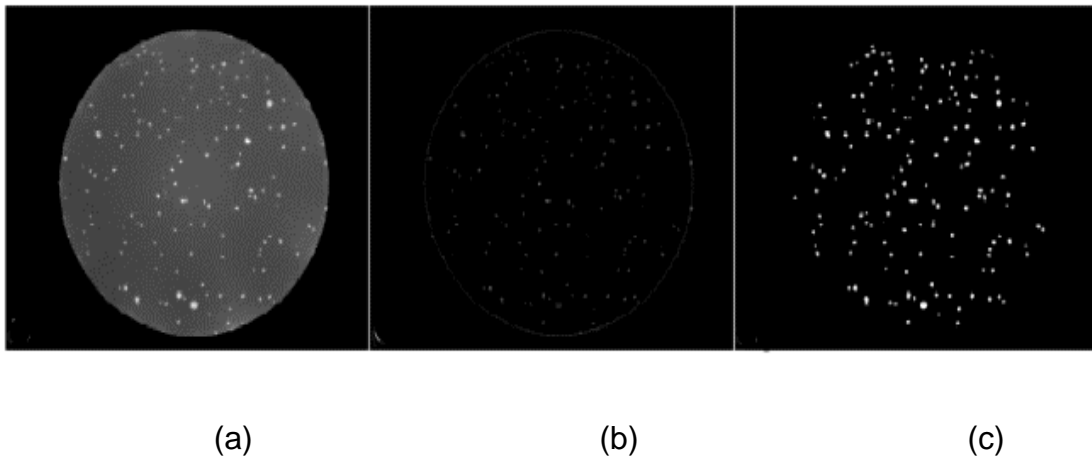


Figura 6: Imagem pré processada obtida após a aplicação de uma máscara sobre a imagem; b) Imagem resultante da aplicação do algoritmo de subtração de fundo na imagem da Figura (a); c) Resultado após o processo de limiarização (limiar igual a 12) e remoção da falsa borda gerada. (OSOWSKY E GAMBA, 2001).

A técnica de limiarização adotada permitiu que, independentemente da cor do meio de cultura, a definição da cor do fundo da imagem será sempre a mesma, o que garante a similaridade entre as imagens igual ao nível de cinza (preto:0; branco: 255). Após todos os testes, concluiu-se que, a presença de ondulações no meio de cultura e falta de uniformidade na distribuição da amostra na placa de Petri são fatores que interferem no desempenho do sistema.

Portanto, para que o processo de contagem proposto funcione, é necessário que a distribuição da amostra na placa de Petri seja realizada da forma mais uniforme possível. (OSOWSKY e GAMBA, 2001).

3.3. PLATAFORMA AUTOBAC

A plataforma AUTOBAC é um sistema de aquisição de imagens, desenvolvida por Costa, (2014) e Arvelos (2015), projetada com o objetivo de adquirir imagens digitalizadas de placas de Petri, usadas em laboratórios de microbiologia.

O desenvolvimento do sistema AUTOBAC, foi dividido em quatro etapas; aquisição e sistema, iluminação e dimensionamento físico, integração eletrônica e interação plataforma usuário, todas essas etapas podem ser vistas no organograma

apresentado na Figura 7.

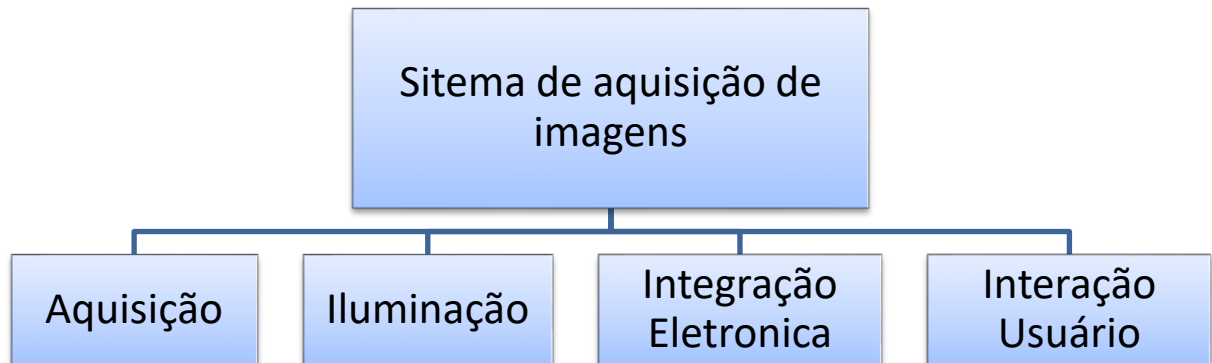


Figura 7: Organograma da subdivisão do sistema AUTOBAC (ARVELOS, 2015, adaptado).

Na etapa de aquisição, o foco principal foi realizar a aquisição de imagens com qualidade, para tal foi necessário garantir a nitidez e boa iluminação. A aquisição é realizada por um sistema controlado, no qual a luz não depende do ambiente e a posição da câmera não depende do usuário.

Para garantir a qualidade dos processos foram levantados alguns requisitos, como a definição da câmera, o dimensionamento físico do protótipo e a iluminação.

Foi implementada na plataforma uma câmera HP Webcam HD-4110, com foco automático, e para a iluminação do sistema foram adaptadas fitas de LEDs orientados alimentadas com 12V, nas paredes e na base do protótipo.

A ligação dos LEDs foi feita em série com pedaços de vários tamanhos para que cobrisse todo o fundo em dois conjuntos, para que a corrente fosse dividida, como pode ser observado na Figura 8.

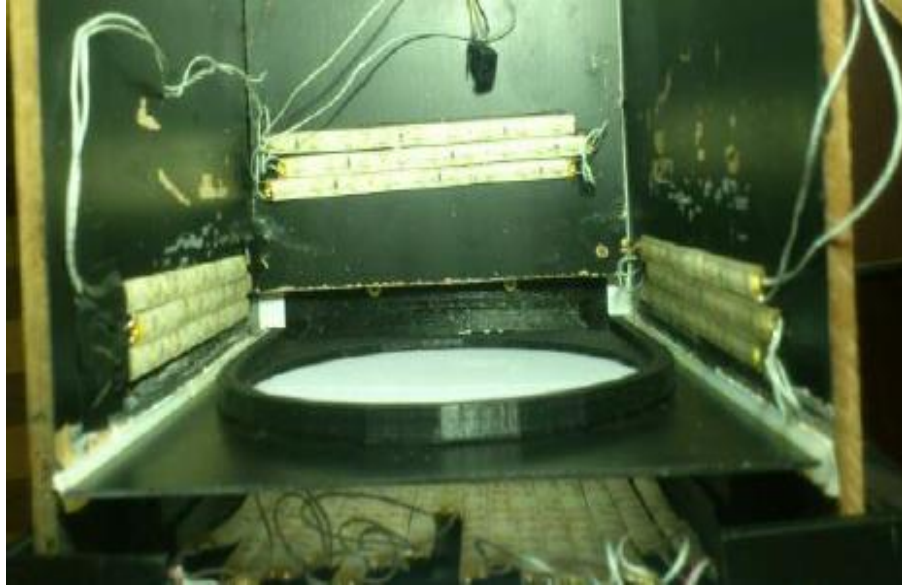


Figura 8: Vista interna do protótipo AUTOBAC com fitas de LEDs orientadas nas paredes e parte inferior.(ARVELOS, 2015)

O sistema permite ainda que dispositivos sejam conectados a qualquer tempo, para realização de manutenção ou para a transmissão das imagens adquiridas. O protótipo foi desenvolvido para receber placas de diversos tamanhos, para tal, foi construído e impresso em impressora 3D uma gaveta adaptável a qualquer tipo de placa disponível para utilização em laboratórios.

Foi desenvolvido um *software* em *python* para a aquisição de imagens pela plataforma. Esse *software* inicializa junto ao *Raspberry Pi* e tem a função de fazer a aquisição, salvar e desligar o sistema. Na implementação da nuvem e transmissão de dados foi implantado o POST no sistema, com esse método, uma nova gama de funcionalidades pode ser feita, desde comunicação entre vários Autobacs a um Mapeamento Nacional de ação de antibióticos.

Na Figura 9, observa-se o fluxograma do protótipo associado ao *software*, é possível observar a interface final visualizada pelo usuário.

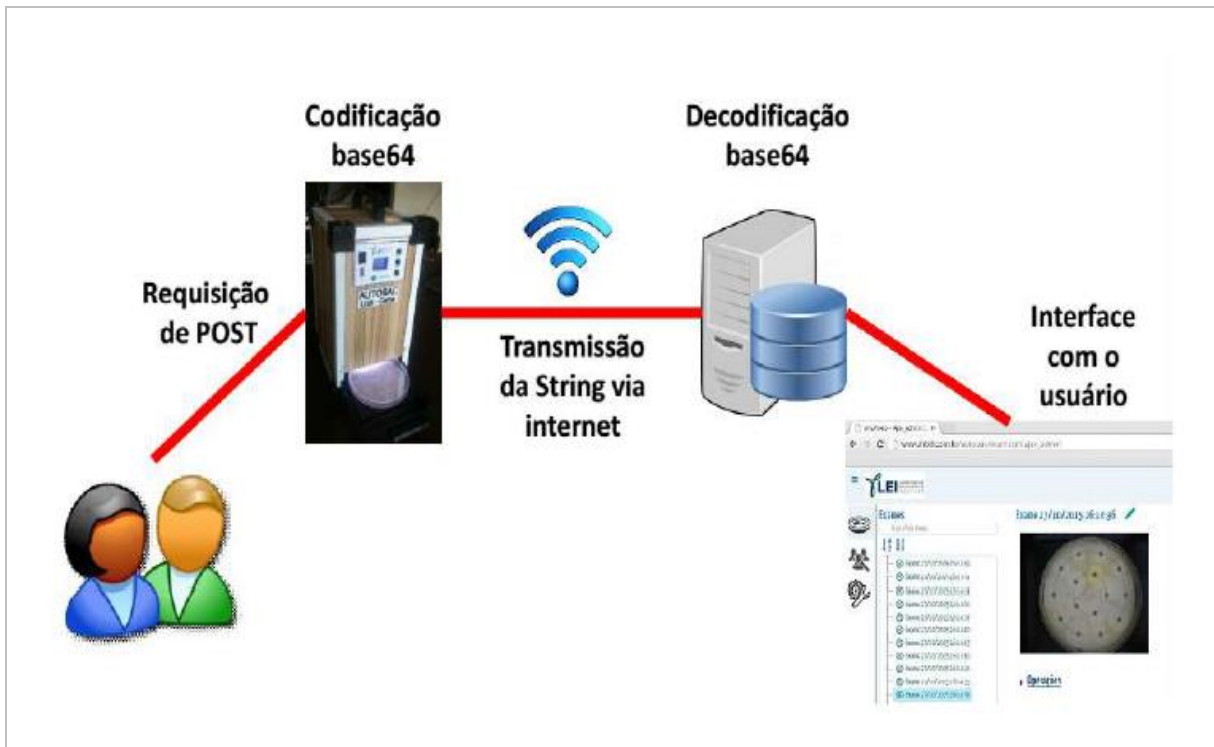


Figura 9: Fluxograma de funcionamento do projeto AUTOBAC (ARVELOS, 2015).

O protótipo final contou com um sistema integrado de placas de alimentação e conexão com Raspberry Pi, que podem ser vistos na Figura 10.

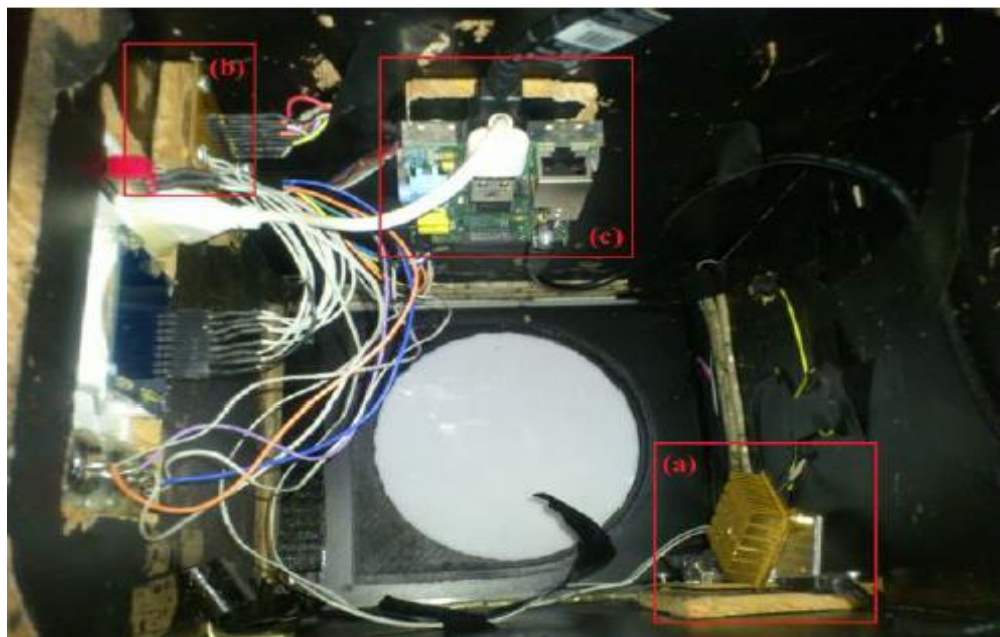


Figura 10: Protótipo final com sistema eletrônico integrado, a: Placa 1, alimentação, b: Placa 2, conexão com Raspberry Pi; c Raspberry Pi. (ARVELOS, 2015).

Como resultado, foi gerado um protótipo físico com os melhores ajustes alcançáveis, ao sistema físico é necessário um servidor que trabalhe de forma automatizada e com suporte em nuvem. Para tal, deve-se aplicar técnicas de processamento de imagem, tanto para a medição de halos como para a contagem de colônias método proposto por este trabalho. Na Figura 11 é possível observar o *Layout* externo do protótipo AUTOBAC.



Figura 11: Vista externa do protótipo da AUTOBAC, com placa de Petri posicionada sobre a gaveta de sustentação (ARVELOS, 2015).

4 METODOLOGIA

Neste capítulo, são apresentados os critérios e definições para escolha e coleta das amostras utilizadas, e as técnicas de processamento de imagens e a metodologia desenvolvida na implementação do sistema proposto neste trabalho. É apresentado ainda o processo de automatização da contagem de unidades formadoras de colônia em (cm²), em placas de Petri.

4.1 AMOSTRAGEM

Foi analisado um conjunto de cinquenta amostras que apresentaram algum crescimento bacteriano em placas de Petri, após correto tratamento e semeio em meios de cultura adequados. Para esse grupo foram realizadas análise computacional por meio de software e contagem manual direta em placa e, em seguida, calculado o valor de erro absoluto, o valor de erro relativo e o valor de erro percentual para cada amostra. A pesquisa foi realizada no laboratório de patologia clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

4.2 SEMEIO E LEITURA DAS AMOSTRAS POR MÉTODO DIRETO EM PLACA

O processamento foi iniciado pelo semeio realizado por técnica de espalhamento em varredura de 0,001 mL da amostra de urina, em superfície de ágar *Cromogênico* sobre placas bipartidas e submetidas a incubação em estufa bacteriológica a 37 °C por 24h. São semeadas duas amostras em cada lado da placa de Petri. Após a incubação as amostras que apresentaram algum crescimento bacteriano, foram separadas pelo analista do setor e as colônias quantificadas por método de contagem direta em placa.

4.3 AQUISIÇÃO DE IMAGENS

Após procedimento normal de quantificação das amostras pelo analista, foi realizada a aquisição das imagens digitais das placas de Petri, utilizando-se a plataforma AUTOBAC. Essas imagens foram aplicadas para todos os processos

descritos neste trabalho incluindo o desenvolvimento da metodologia de contagem de colônias semi automatizada, proposta neste trabalho.

Na Figura 12 é possível observar a imagem de uma placa de Petri adquirida pelo protótipo AUTOBAC, posicionada na bacia de sustentação da plataforma, com a iluminação de LEDs paralelos nas laterais do compartimento.

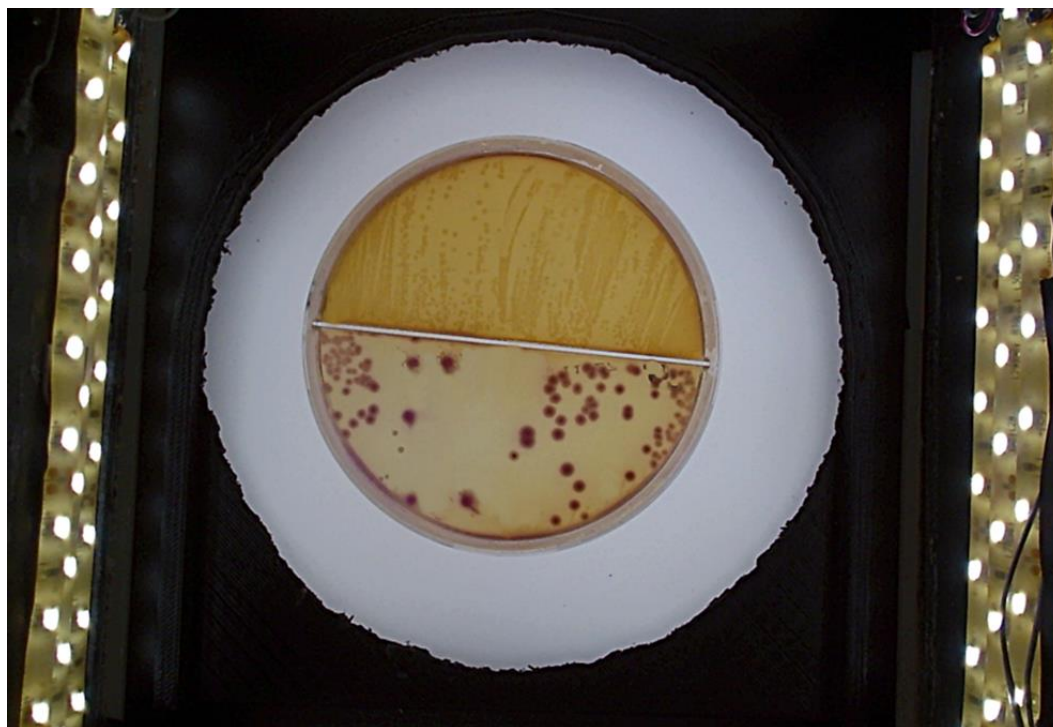


Figura 12: Imagem de placa de Petri adquirida pela plataforma AUTOBAC, que apresentou crescimento de colônias de *Escherichia coli* (abaixo) e *Serratia marcescens* (acima).

4.4 PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COLÔNIAS BACTERIANAS

Após a aquisição na plataforma AUTOBAC, as imagens foram processadas e utilizadas para contagem no software *ImageJ* onde os resultados obtidos foram comparados ao método *Gold Standard* de contagem direta em placa e os resultados foram expressos em (UFC/mL. As imagens foram ainda processadas pelo algoritmo proposto para a determinação de unidades formadoras de colônia em centímetro quadrado (UFC/cm²).

4.4.1 Determinação por método direto de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

A quantificação das unidades formadoras de colônia em mililitro (UFC/mL), foi primeiramente realizada pelo analista do setor de Microbiologia do laboratório onde foi realizada esta pesquisa, essa contagem foi considerada como *Gold Standard* para todos os processos realizados neste trabalho.

Afim de verificar a viabilidade da contagem direta em placa por meio de *software* considerou-se a unidade de medida padrão (UFC/mL), optou-se então pela aplicação do *software ImageJ*®. Esse é um *software* de domínio público que utiliza a linguagem de programação *Java*, uma ferramenta de apoio amplamente utilizada em pesquisa para processamento de imagens digitais.

Este *software* permite criar algoritmos e realizar processamento e análise de imagens digitais e sua interface pode ser vista na Figura 13.

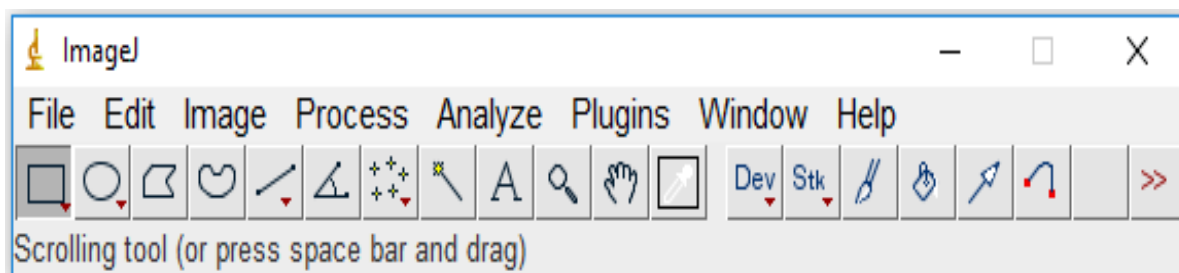


Figura 13: Interface do *software Image J* e suas aplicações. (IGNÁCIO, 2013).

As imagens adquiridas na plataforma AUTOBAC foram abertas no *software*, e convertidas de imagem colorida para uma imagem monocromática, com conversão para 8 bits, pelo comando (*Image > Type > 8-bit*).

Foi utilizada a ferramenta de linha reta ao longo do diâmetro da placa de Petri, determinando assim uma distância conhecida. Em seguida a imagem foi escalonada manualmente usando o comando (*Analyze > Set Scale*). A distância em pixel foi preenchida automaticamente, baseada na distância selecionada pela linha reta citada anteriormente. A opção global foi utilizada ao dimensionar a primeira imagem e essa mesma escala foi aplicada para as imagens seguintes.

Os valores utilizados para o escalonamento da imagem podem ser visualizados na Figura 14.



Figura 14: Conversão de imagem colorida para monocromática, com conversão em 8 bits, no software *ImageJ*®.

O software *ImageJ*® permitiu que no pré processamentos das imagens fosse adequada a qualidade dos *pixels* e na segmentação foi possível escolher a região de interesse. A calibração da imagem foi necessária e realizada pelo comando (*Adjust > Threshold*), após a segmentação e binarização os pontos e bordas na imagem, foram detectados e contados como pode ser observado na Figura 15.

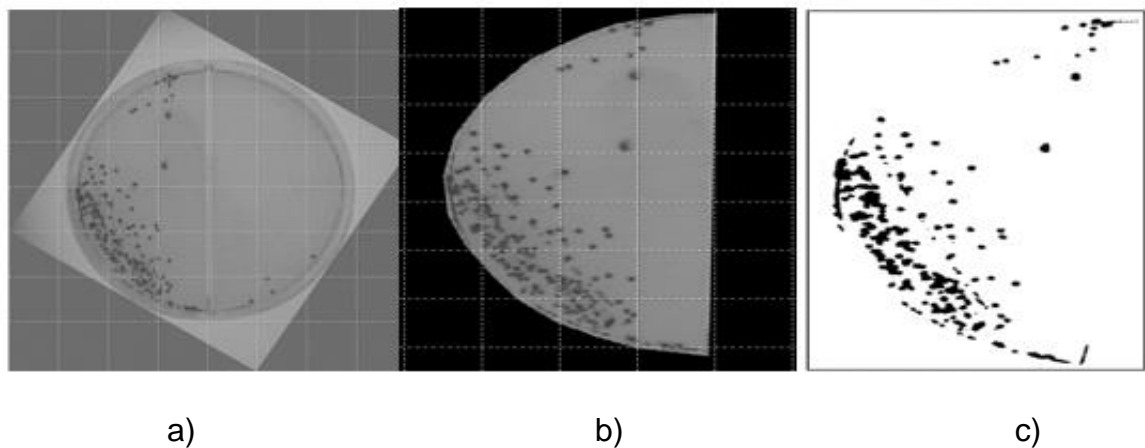


Figura 15: Processamento da imagem por limiarização. a) Imagem pré processada; b) Segmentação da imagem; c) Colônias detectadas após tratamento da imagem.

Segundo o manual de procedimentos básicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quando utiliza-se a alça calibrada de 0,001mL deve se considerar que em 1 colônia = 1000 UFC/mL. Portanto para a determinação final das UFCs os resultados obtidos tanto na contagem direta em placa, quanto na contagem realizada pelo *software* foram multiplicados por 1000. Logo UFC/mL foi dada por:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \text{UFC } 1000 \quad (1)$$

4.4.2 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia por determinação de área

Na quantificação das unidades formadoras de colônia por determinação de área, os resultados foram expressos em (UFC/cm²). O método foi aplicado para 40 amostras que apresentaram crescimento de *Escherichia coli*, por ser o microrganismo predominante nas amostras avaliadas (80%). Para determinação final das UFCs, foram calculadas: a área total da superfície da placa de Petri, a área ocupada pelas colônias sobre essa superfície e a densidade superficial máxima de crescimento bacteriano sobre uma placa de Petri.

4.4.2.1 Determinação de área total e área ocupada

Inicialmente calculou-se a área total da superfície da placa de Petri, para este cálculo considerou-se as dimensões da placa efetivamente utilizada para semeio das amostras (semicírculo). Para obter a área total da placa em (cm²), o diâmetro igual a 9 cm, foi dividido por dois, assim a área do semicírculo foi dada por:

$$\begin{aligned} A &= \frac{1}{2} \pi r^2 \\ &= 32 \text{ cm}^2 \end{aligned} \quad (2)$$

Onde (r) é o raio. Após o cálculo da área total, inicialmente foi realizado o cálculo para determinação da área ocupada pelas colônias na superfície do ágar, aplicando-se novamente o *software ImageJ*®. As imagens foram abertas no *software* e convertidas para 8 *bits* pelo comando (Image > Type > 8bit). Posteriormente foram

estabelecidos os valores padrão pelo comando (*Analyze > Set Scale*), delimitada a área ocupada pelas colônias, e o resultado final foi expresso em centímetros quadrados (cm²). Os resultados de área obtidos pelo software *ImageJ*® foram utilizados como parâmetro de comparação, para validação dos resultados obtidos no algoritmo proposto.

4.4.2.2 Implementação do algoritmo:

Para desenvolvimento do algoritmo de contagem de colônias foram realizadas 12 etapas, que vão desde o mascaramento de pixels da imagem até o resultado final expresso em UFC/cm². Todas essas etapas são descritas a seguir:

1) Mascaramento de pixels com nível de intensidade abaixo de 50. A imagem escolhida para processamento foi a componente Blue da imagem RGB por apresentar maior contraste. Como foi utilizado um equipamento com iluminação controlada, foi possível definir o nível de intensidade que descreve o fundo preto do aparelho, fixando em 50 (nível de intensidade da imagem em cima).

Os pixels de 0 a 50 foram mascarados para 255 a fim de enfatizar a placa como poder observado na Figura 16.

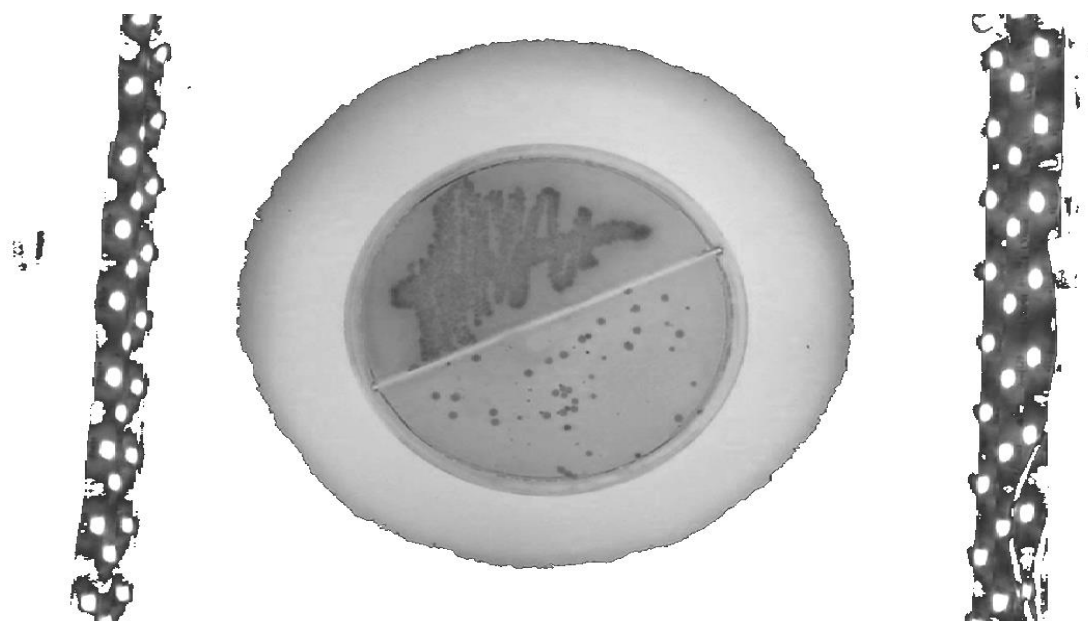


Figura 16: Mascaramento de pixels com baixo nível de intensidade

2) Em seguida foi realizada uma binarização pelo método de Otsu para segmentar a região da placa descrito na Figura 17.

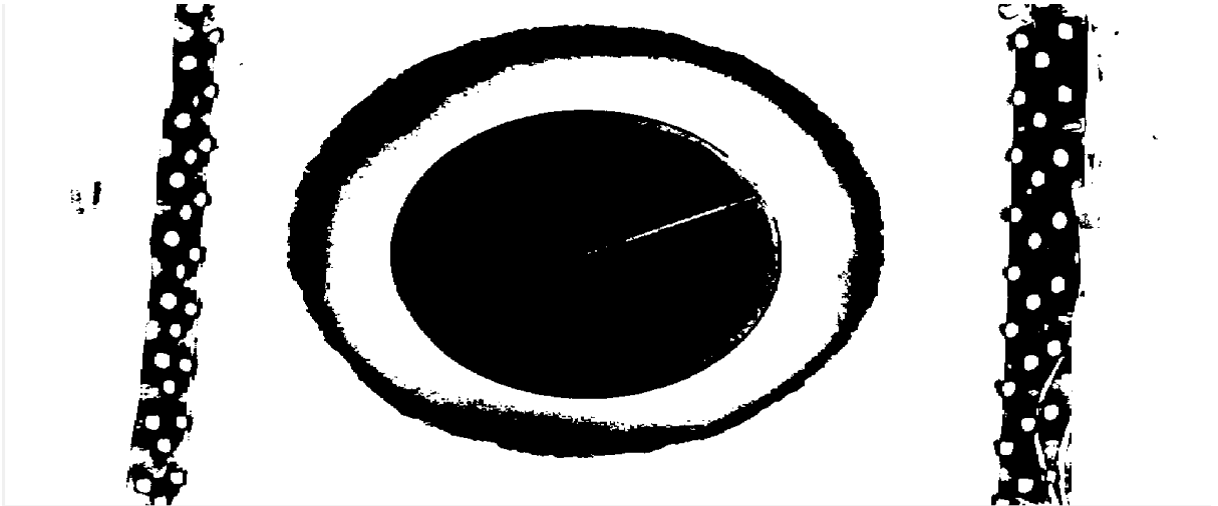


Figura 17: binarização pelo método de Otsu

3) Realizada uma operação de abertura, seguida de fechamento com elemento

estruturante em formato de disco de 20 pixels. O objeto com maior área foi considerado a região de interesse da placa essa etapa do processamento é apresentada na Figura 18.

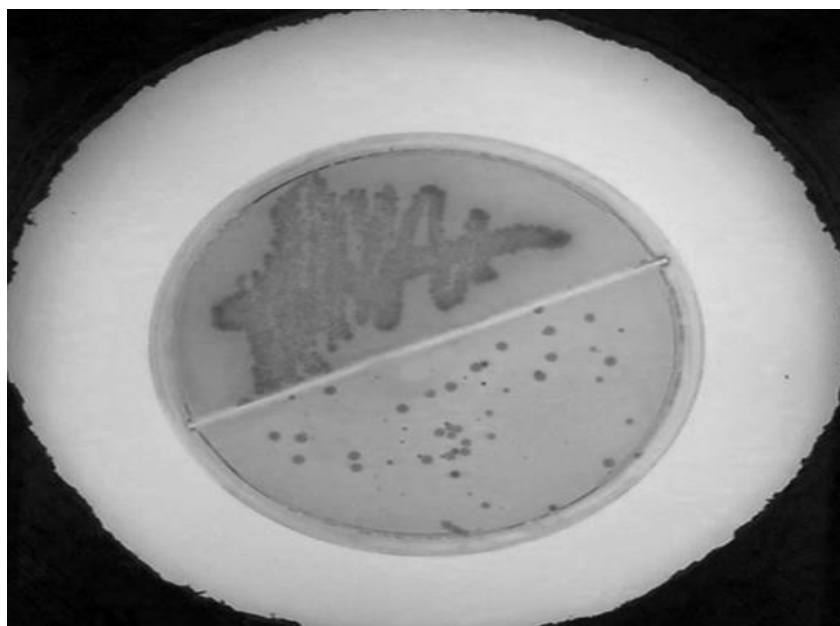


Figura 18: Determinação da área de interesse na placa de Petri

4) Foi selecionado um disco com 100 pixels de raio partindo do centro da imagem em 3). O objetivo é segmentar a reta central para realizar um corte da placa, dividindo entre lado esquerdo e direito. A segmentação da imagem teve como objetivo a separação da área da superfície da placa de Petri, visto que somente é utilizado um dos lados para semeio das amostras biológicas, a etapa de segmentação segue na Figura 19.

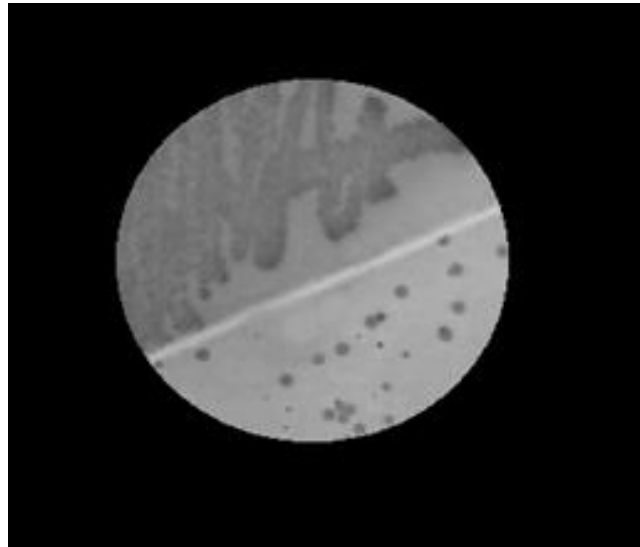


Figura 19: Segmentação da imagem para separação da área da placa de Petri utilizada para semeio.

5) Sabendo que a linha tem um alto valor de intensidade, foi adotado como limiar de binarização (98%) do valor máximo de intensidade da imagem descrita em 4). A limiarização adotada é descrita na Figura 20.



Figura 20: Limiar de intensidade adotado para binarização

6) A imagem resultante foi binarizada, utilizando o método de *Canny* com o objetivo de encontrar os contornos dessa imagem, como pode ser observado na Figura 21.

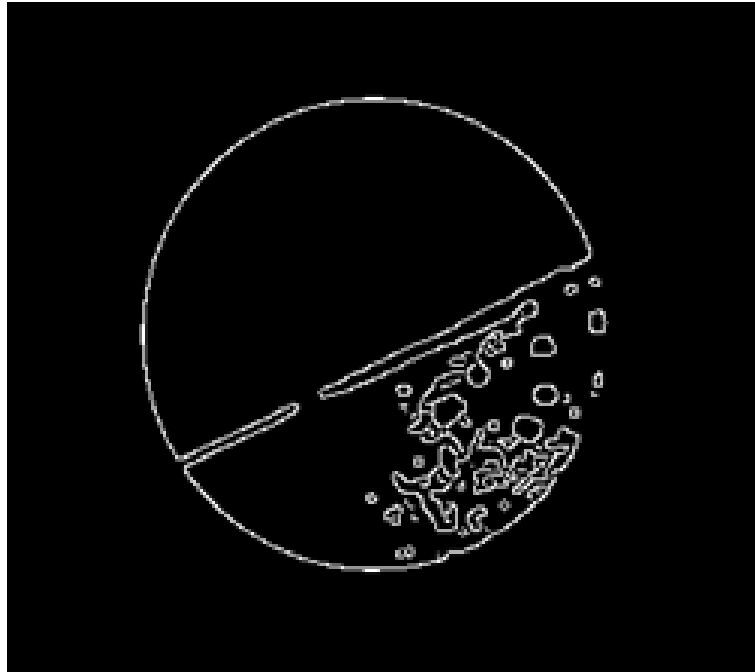


Figura 21: Contornos da Imagem obtidos por método de *Canny*

7) Em seguida foi realizada a transformada de Hough visando identificar a linha central que divide a placa conforme a Figura 22.

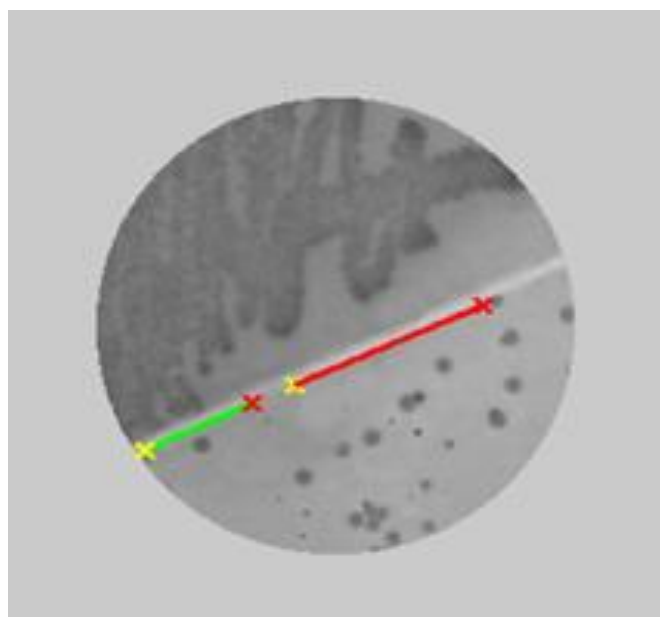


Figura 22: Transformada de Hough para detecção de linha central que divide a placa.

8) A linha central da placa foi selecionada como o elemento de maior pico da transformada de Hough. O ângulo desta linha foi utilizado para rotacionar a imagem e cortá-la no lado esquerdo e direito, conforme a Figura 23.



Figura 23: Secção da imagem em lado esquerdo e direito.

9) Com posse das duas partes da imagem foi possível iniciar o processo de cálculo de área. Primeiramente a região da placa foi segmentada utilizando o método de Otsu, visto que a imagem é claramente bimodal conforme a Figura 24.



Figura 24: Segmentação de imagem bimodal utilizando o método de Otsu

A área da placa foi considerada a maior área, sabe-se que metade da área total da placa é 32cm^2 . Logo, para cada imagem, foi calculado o fator de conversão área (pixel) para cm^2 . 10) A imagem resultante foi submetida a um ajuste de contraste

adaptativo pelo comando (*imadjust*) do *matlab*. Tendo em vista que a placa possui um background praticamente homogêneo, foi utilizado o valor de 75% da média dos pixels internos da placa como limiar de binarização. A adoção do valor 75%, foi escolhido tendo em vista que a colônia tem sempre níveis de intensidade bem menores do que a média calculada, essa etapa pode ser vista na Figura 25.

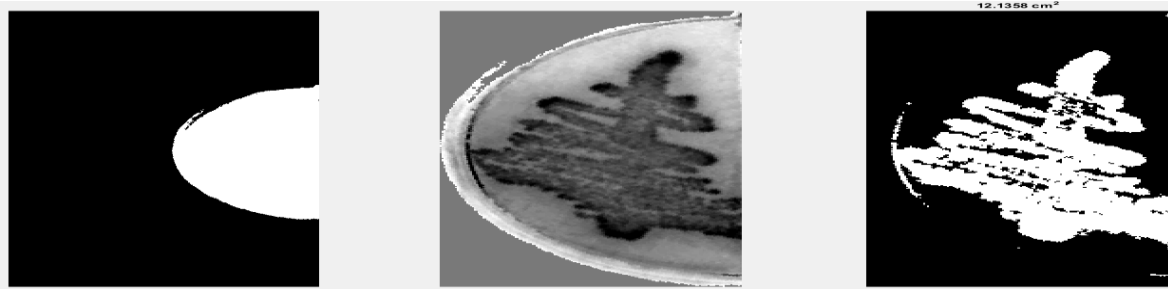


Figura 25: A imagem resultante foi submetida a um ajuste de contraste adaptativo

11) Foi realizada a soma de todas as áreas da imagem binarizada em 10 e multiplicado pelo fator encontrado em 10), resultando na área efetiva das colônias.

12) Por fim foi realizado o cálculo para determinação da densidade, para tal foi feita uma relação entre o crescimento bacteriano máximo sobre a superfície de uma placa de Petri, de até 300 UFCs e a área total dessa placa 32 cm² (ANVISA, 2010).

O resultado obtido foi aplicado como fator para a determinação final das UFC em centímetro quadrado dentro do algoritmo. Neste contexto a densidade bacteriana foi dada por:

$$D = \frac{300 \text{ UFC}}{32 \text{ cm}^2} \quad (3)$$

$$= 9,4 \text{ UFC/cm}^2$$

Finalmente a densidade obtida, foi multiplicada pela área ocupada pelas colônias na placa de Petri.

$$\text{UFC/cm}^2 = D \times A_o \quad (4)$$

Onde A_o é a área ocupada pelas colonias sobre a superfície da placa de Petri. Após o desenvolvimento do algoritmo e realizadas as contagens. Um fluxograma do desenvolvimento do algoritmo segue na Figura 26.

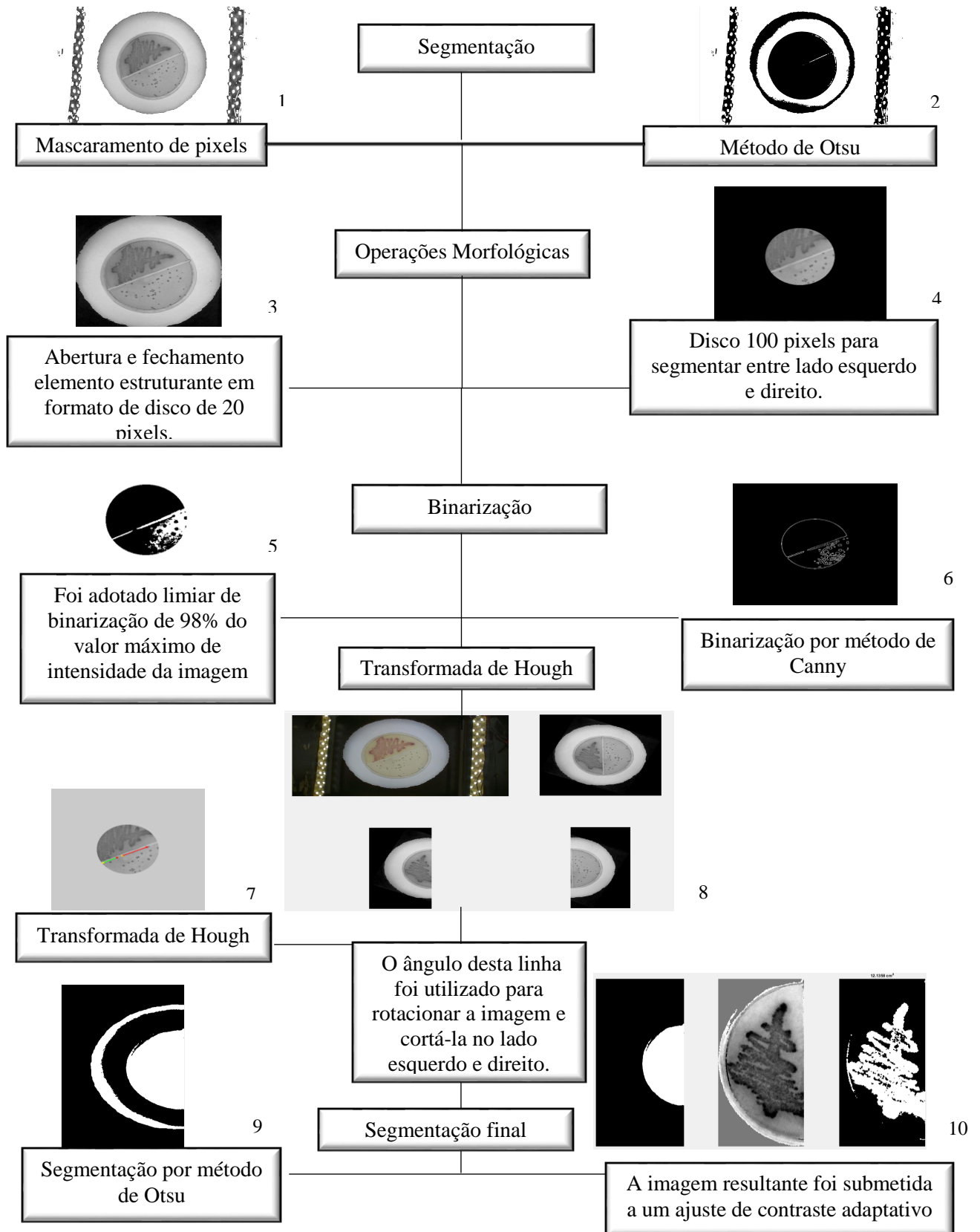


Figura 26: Fluxograma de desenvolvimento do Algoritmo de contagem de colônias bacterianas.

Foram calculadas a sensibilidade e especificidade do método de contagem por área

Sensibilidade (**s**):

$$s = VP / (VP + FN) \quad (4)$$

Especificidade (**e**):

$$e = VN / (VN + FP) \quad (5)$$

Valor preditivo positivo (**VPP**):

$$VPP = VP / (VP + FP) \quad (6)$$

Valor preditivo negativo (**VPN**):

$$VPN = VN / (VN + FN) \quad (7)$$

Foi analisada ainda a correlação por meio do método de Pearson, entre a contagem manual padrão ouro e a contagem pelo algoritmo. Para tal, foi calculada a correlação entre a contagem manual realizada por dois especialistas, essa correlação foi utilizada como padrão para avaliação da correlação entre a contagem manual padrão ouro e a contagem pelo algoritmo.

A concordância entre os dois métodos (UFC/mL e UFC/cm²), foi calculada e avaliada por meio do método Bland - Altman, com o objetivo de definir se o método proposto é equivalente ao já utilizado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos nas avaliações dos métodos aplicados para a contagem de colônias em placas de Petri.

5.1 CONTAGEM DE COLÔNIAS REALIZADA POR MÉTODO DIRETO EM PLACA E POR SOFTWARE IMAGEJ®.

Foi realizada contagem, por método direto em placa pelo analista e pelo software *ImageJ*®, (Ver Materiais e Métodos, Determinação por método direto de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Uma síntese dos resultados obtidos para as 50 amostras é apresentada na Figura 27.

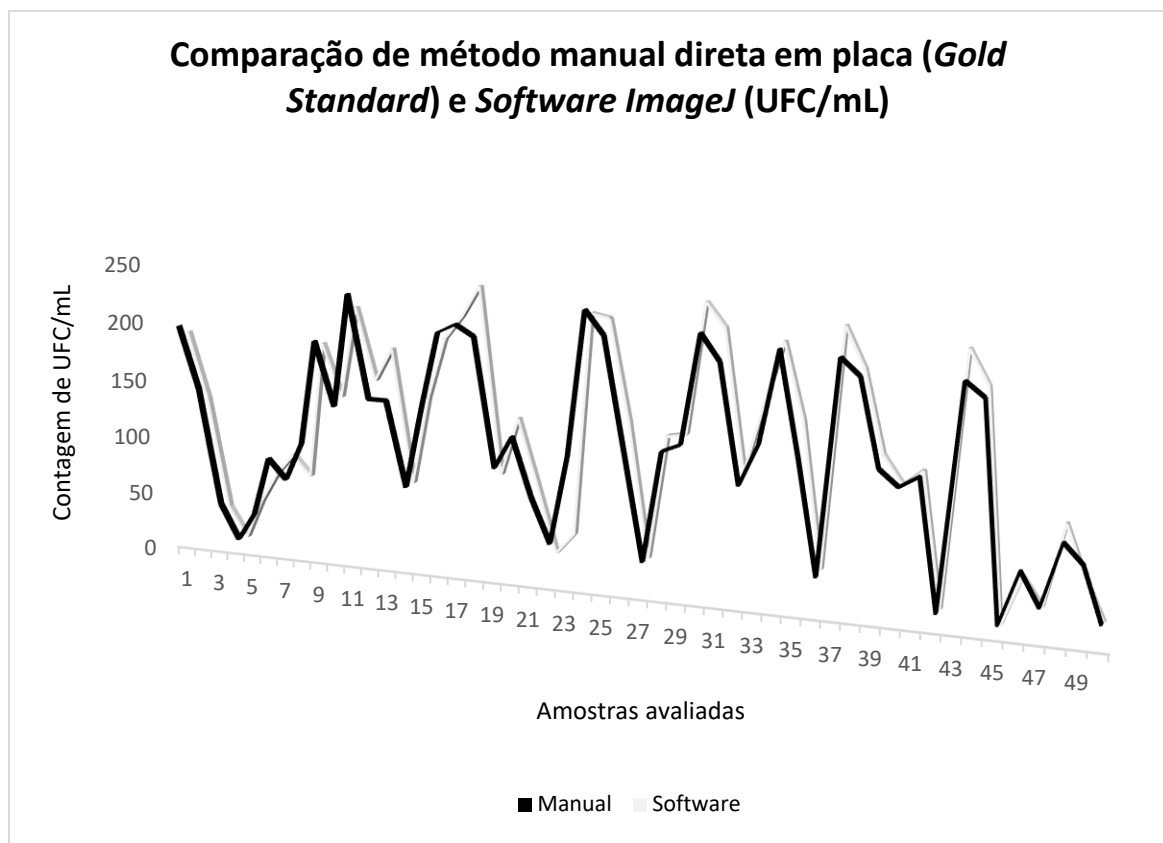


Figura 27: Representação gráfica de resultados obtidos da contagem de colônias por método direto em placa e pelo software *ImageJ*®.

Observou-se que os resultados de contagem, obtidos por método direto, foram

mais baixos que aqueles obtidos na contagem realizada pelo *software ImageJ*®, isso deve-se possivelmente ao processo de limiarização ao qual a imagem foi submetida, o que propiciou uma separação mais efetiva das colônias levando a obtenção de resultados mais elevados.

Afim de verificar a precisão da técnica, calculou-se os erros absoluto e percentual associados as duas técnicas. Para os erros absolutos, observou-se que em 20 amostras foi superior a 10. As amostras que apresentaram os maiores erros absolutos foram aquelas com o maior número de colônias crescidas sobre a placa, fator mais uma vez associado ao processo de limiarização ao qual as imagens foram submetidas. Verificou-se que em 4 amostras os erros absolutos foram superiores a 30 mostrando uma diferença maior que 30 colônias entre o valor medido e o valor esperado.

Para os erros percentuais as médias obtidas foram de 11,17% para amostras quantificadas manualmente por método direto, e 14,37% para amostras quantificadas pelo *software*. Verificou-se que para 19 amostras os erros percentuais foram superiores a 10%, limite aceitável para medidas biológicas (ALVES, 2006). Deve-se ressaltar que o aumento do erro percentual, neste caso, está associado a adequada seleção dos padrões pelo software que permite uma melhor separação das colônias.

Atribuiu-se possivelmente o aumento nos erros percentuais em algumas amostras a fatores como a falta de padronização no semeio da amostra, essa despadronização resulta em colônias bacterianas sobrepostas e espalhadas sobre a placa de Petri, o que gera grande dificuldade para quantificação em UFC/mL.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS EM UFC/cm²

O Algoritmo proposto foi implementado com o auxílio do software *MatLab*. A seleção de uma região de interesse na imagem analisada, foi empregada para melhorar o processo de limiarização melhorando assim o processo de detecção de colônias com o uso da transformada de *Hough*.

A Figura 28 apresenta a imagem de uma placa de Petri com crescimento do microrganismo *Escherichia coli* antes e após o processamento pelo algoritmo. Pode ser observada na última imagem, a área ocupada pelas colônias bacterianas na superfície da placa de Petri.

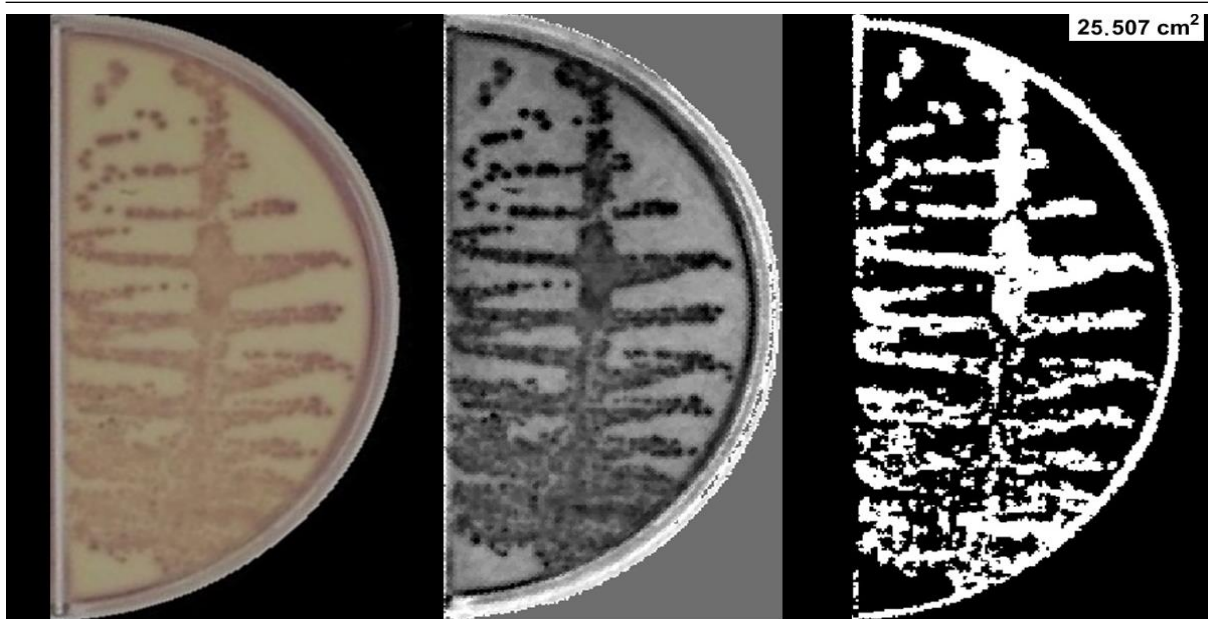


Figura 28: Etapas de processamento de imagem para determinação de área em amostra com crescimento de *Escherichia coli*.

O processo de definição da região de interesse consistiu em definir o total da área em pixels. O emprego do método de Otsu na etapa de limiarização para a determinação do limiar, foi relevante visto que em alguns casos o valor encontrado foi suficiente não necessitando da interferência externa para definição do limiar.

As áreas ocupadas pelas colônias calculadas pelo software foram em sua maioria próximas do percentual esperado. Na Figura 28 considerando-se a área total da placa de Petri de 32cm^2 , obteve-se uma área de $25,507\text{ cm}^2$, essa área condiz visualmente com as características de espalhamento dessa cepa sobre a superfície inoculada.

Observou-se que para realização do processo de limiarização das imagens no *software*, é de extrema importância, garantir a qualidade na aquisição das imagens, logo foi necessário descartar algumas imagens com baixa resolução adquiridas pelo protótipo AUTOBAC. A limiarização não apresenta resultados satisfatórios em imagens com iluminação não uniforme ou com baixo contraste entre as diversas regiões (LOPES, 2003).

Os resultados obtidos na contagem das amostras de urina que apresentaram crescimento de *Escherichia coli* (Ver Materiais e Métodos, Quantificação de unidades formadoras de colônia por determinação de área), foram expressos em UFC/ cm^2 . A contagem final de UFC em centímetro quadrado em 40 amostras, considerou a

densidade superficial máxima de crescimento bacteriano sobre uma placa e a área ocupada pelas colônias nessa superfície. Após determinadas as unidades formadoras de colônia para essas amostras, foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos no método de contagem direta em placa (UFC/mL) e o método de contagem sobre superfície (UFC/cm²). Tal comparação foi considerada apenas para fins de classificação de amostra infectada. Considerou-se amostras normais aquelas que apresentaram uma contagem abaixo de 100.000 para (UFC/mL) ou abaixo de 50 para (UFC/cm²), como pode ser observado na Figura 29.

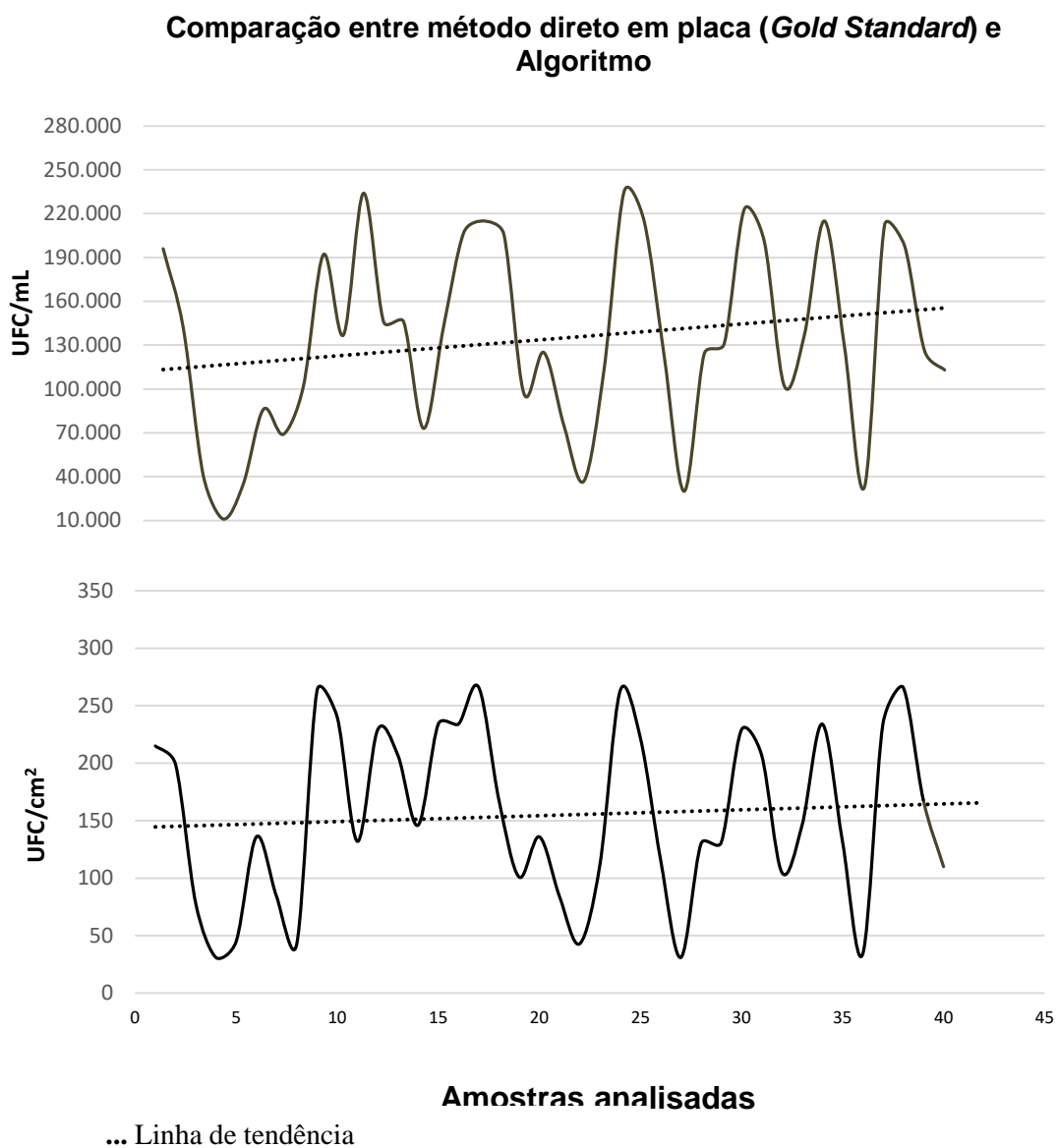


Figura 29: Representação gráfica comparativa de resultados obtidos em UFC/mL e UFC/cm².

Para avaliar a correlação entre os dois métodos foi utilizado o método de correlação linear de Pearson. Foi obtida uma correlação de 0,7 entre a contagem realizada pelo algoritmo proposto e a contagem padrão ouro. Esse valor indica uma correlação forte entre os métodos, considerando-se que a correlação obtida entre contagens de dois especialistas foi de 0,8.

Segundo CESARIL et al. (2016), os critérios para crescimento bacteriano em superfície recomendados, são satisfatórios até 50 UFC/cm². As amostras 4, 5, 22, 27 e 36, apresentaram resultado de contagem dentro do valor aceitável, essas amostras também foram consideradas sem infecção na contagem realizada em UFC/mL.

Na contagem em UFC/cm² as amostras 3,6,7,14,19 e 21 apresentaram valores de contagem de 78,136,84,146,101 e 84 respectivamente, esses valores caracterizam tais como amostras infectadas, considerando-se que apresentaram resultados superiores àquele aceitável. Esses resultados foram discrepantes daqueles obtidos em UFC/mL no qual essas amostras foram consideradas não infectadas.

As 29 amostras restantes foram consideradas contaminadas por apresentarem contagens acima de 50 UFC/cm², e quando comparadas a interpretação dada àquelas amostras quantificadas em UFC/mL, obtiveram classificação semelhante.

5.3.1 Calculando Sensibilidade e Especificidade

Para a identificação dos verdadeiros positivos dentre o total de positivos nas amostras quantificadas (verdadeiros positivos e falsos positivos), foram calculadas a sensibilidade e especificidade do teste, que é considerado negativo (normal) ou positivo (anormal), e a doença presente ou ausente.

A sensibilidade é a probabilidade de um teste ser positivo quando há presença de doença, detectando assim a doença quando ela realmente está presente. A especificidade é a probabilidade de um teste ser negativo quando a doença está ausente, detectando assim a ausência da doença quando ela está ausente. Os dados utilizados para os cálculos, bem como os resultados obtidos neste teste diagnóstico podem ser consultados na Tabela 4.

Tabela 4: Relação da doença com o Teste

DOENÇA Infecção Urinária	TESTE Contagem de colônias UFC/cm ²		Total
	Positivo	Negativo	
Presente	28	1	29
Ausente	6	5	11
Total	34	6	

Nota. Fonte: Próprio Autor. Nota- VP-Verdadeiro positivo; VN- Verdadeiro negativo; FP- Falso positivo; FN- Falso negativo.

A sensibilidade e a especificidade da contagem de colônias obtidas, foram de 96% e 45%, respectivamente. Após plotados os dados, encontrou-se os seguintes valores: VPP = 82% e VPN = 83%, assim, se o teste cultura de urina for positivo, existem 82% de chances do paciente realmente ser doente, contra 18% (100-82%) de chance de ser normal, apesar do resultado ser positivo.

Já se o teste for negativo, existem 83% de chances do paciente ser normal, contra 17% (100-83%) de chance ser doente, apesar do resultado ser negativo.

5.3.2 Determinação de concordância entre os métodos

A fim de determinar a concordância entre os dois métodos considerando-se as variáveis envolvidas, foi aplicado o método de *Bland e Altman* para a análise dos resultados. Na Tabela 5 são descritas as médias individuais e as diferenças individuais obtidas entre as duas medidas.

Tabela 5: Variáveis médias individuais e diferenças individuais obtidas entre as duas medidas.

Amostra	UFC/cm²	UFC/mL	Média	Diferenças
Amostra 1	215	196	205,5	19
Amostra 2	199	142	170,5	57
Amostra 3	78	41	59,5	37
Amostra 4	31	11	21	20
Amostra 5	45	35	40	10
Amostra 6	136	86	111	50
Amostra 7	84	69	76,5	15
Amostra 8	43	102	72,5	-59
Amostra 9	263	192	227,5	71
Amostra 10	240	137	188,5	103
Amostra 11	132	234	183	-102
Amostra 12	229	146	187,5	83
Amostra 13	207	146	176,5	61
Amostra 14	146	73	109,5	73
Amostra 15	234	143	188,5	91
Amostra 16	234	207	220,5	27
Amostra 17	266	215	240,5	51
Amostra 18	168	206	187	-38
Amostra 19	101	97	99	4
Amostra 20	136	125	130,5	11
Amostra 21	84	75	79,5	9
Amostra 22	43	37	40	6
Amostra 23	112	113	112,5	-1
Amostra 24	263	235	249	28
Amostra 25	222	215	218,5	7
Amostra 26	116	123	119,5	-7
Amostra 27	31	30	30,5	1
Amostra 28	130	124	127	6
Amostra 29	131	131	131	0
Amostra 30	229	223	226	6
Amostra 31	207	201	204	6
Amostra 32	105	102	103,5	3
Amostra 33	146	137	141,5	9
Amostra 34	234	215	224,5	19
Amostra 35	132	129	130,5	3
Amostra 36	34	33	33,5	1
Amostra 37	234	212	223	22
Amostra 38	266	198	232	68
Amostra 39	168	126	147	42
Amostra 40	110	113	111,5	-3

Nota. Fonte: Próprio Autor

A Figura 30 mostra a representação gráfica das médias e diferenças geradas nos dois métodos, no qual é possível avaliar a relação das discordâncias entre as medidas.

Representação gráfica de Bland Altman para os dois métodos

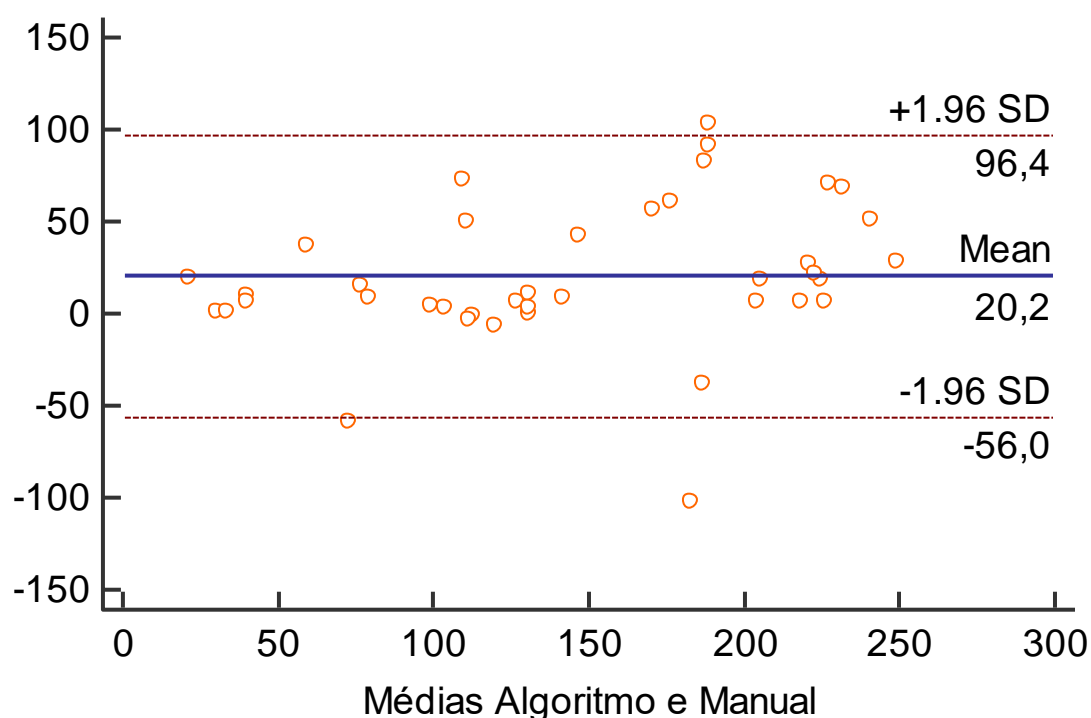


Figura 30: Representação gráfica que combina a média das duas medidas (Eixo horizontal) e a diferença das duas medidas (Eixo vertical).

Neste gráfico é possível visualizar o viés, o erro e as tendências. A repetibilidade foi avaliada, em média a contagem dos métodos referidos foi 20,2 (IC95%). Os limites de +2DP (95% de concordância) oscilaram entre -56,0 e +96,4. Os valores da diferença apresentaram-se bem distribuídos ao longo do eixo X representado pela média, entre a contagem do algoritmo e a contagem por método direto, isso representa que as contagens foram eficientes.

6 CONCLUSÃO

Através deste estudo foram realizadas investigações envolvendo as técnicas manuais de contagem de colônias bacterianas disponíveis, e o uso de tecnologias para a automatização desse processo. Essas investigações geraram como resultado a proposta da realização de contagem por um método que considere a densidade superficial bacteriana em placas de Petri, no qual não haja necessidade de contagem manual direta em placa. Ficou evidente nessa pesquisa que os métodos manuais para contagem de colônias, apesar de eficientes, são dispendiosos e sem padronização. A automatização desse processo favorece a contagem e avaliação do especialista na rotina diária de um laboratório clínico.

As técnicas para automatização desse processo, propostas na literatura, foram desenvolvidas utilizando métodos tradicionais de processamento de imagens, e apresentaram-se como alternativas viáveis para solucionar alguns problemas relacionados à contagem manual direta em placa. Porém, esses métodos não conseguiram quantificar amostras com colônias que crescem com características de espalhamento. O processo de contagem final de UFC/mL, está diretamente relacionado à distribuição da amostra sobre a placa de Petri, essa etapa quando realizada corretamente, garante que o processo funcione sem interferências no desempenho dos sistemas propostos.

Na comparação entre a contagem realizada em UFC/mL, pelo método *Gold Standard*, e a contagem realizada pelo *software ImageJ®*, observou-se que os resultados obtidos pelo *software* embora mais altos, culminaram em classificação de infecção similar àqueles obtidos pelo especialista, possibilitando a determinação ou exclusão de infecção urinária associada aos microrganismos quantificados por essa técnica.

As amostras com características de espalhamento foram as que apresentaram maior discrepâncias entre a contagem manual direta em placa e a contagem realizada pelo *software*. As colônias que apresentam característica de espalhamento são o maior desafio para a automatização do processo de contagem, os métodos disponíveis nos laboratórios não apresentam especificidade pela falta de padronização na técnica de semeio e contagem, resultando em colônias bacterianas sobrepostas, gerando maior dificuldade para quantificação.

O método proposto para contagem de colônias por determinação de área envolveu o desenvolvimento de um algoritmo capaz de quantificar a área ocupada pelas colônias sobre a superfície de uma placa de Petri. A contagem automática de unidades formadoras de colônias bacterianas em placas de Petri realizada por esse algoritmo contou com o uso da transformada de *Hough*

O método proposto de contagem de colônias em superfície UFC/cm², apresentou resultados satisfatórios com alta correlação e alta concordância, quando comparado ao método *Gold Standard* de contagem direta em placa UFC/mL. Observou-se que para realização do processo de limiarização das imagens no *software*, é de extrema importância, garantir a qualidade na aquisição das imagens, logo foi necessário descartar algumas imagens com baixa resolução adquiridas pelo protótipo AUTOBAC.

Para análises manuais recomenda-se um número de 250 UFC/mL por amostra e não mais do que 300 UFC/mL. Assim o método desenvolvido para análise automatizada de UFC/cm², em placas de Petri pode ser empregado em situações onde o número de UFC seja próximo a 300, sem perda de confiabilidade nos resultados

Verificou-se a viabilidade da quantificação de colônias em UFC/cm², o método proposto apresentou resultados coerentes e mostrou-se capaz de diminuir problemas como, a necessidade de contagem direta das colônias na placa de Petri e possibilitou a quantificação das UFCs em amostras com crescimento bacteriano com características de espalhamento.

REFERÊNCIAS

ABELHO, M. Protocolos de microbiologia ambiental. Escola Superior Agrária Instituto Politécnico de Coimbra, v. 1, p. 2–11, 2013.

ALVES, G.M. Método fundamentado em Processamento Digital de Imagens para Contagem Automática de Unidades Formadoras de Colônias. Universidade Federal de São Carlos. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar Caderno A Epidemiologia para o Controle de Infecção Hospitalar. p. 177, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde, 2004. (Nota técnica).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Principais Síndromes Infecciosas. Módulo I. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA critérios diagnósticos de infecção relacionada à assistência à saúde. v. 2, 2013.

ALVAREZ, C; J, LABARCA; M, SALLES. Estratégias de prevenção de Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) na América Latina. División de Enfermedades Infecciosas Departamento de Medicina Interna Hospital San Ignacio, and Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colômbia. 2010.

ANDRADE D & ANGERAMI E.L.S. Reflexões acerca das infecções hospitalares às portas do terceiro milênio. Medicina, Ribeirão Preto, 32: 492-497, Out. /Dez. 1999.

ARAUJO, E.V; AUGUSTO B.S; UCHÔA, N.C; SOUZA, R.W.R. Sistema de contagem automática de unidades formadoras de colônias de bactérias em placas de petri através de técnicas de visão computacional. Instituto federal de educação ciência e tecnologia do Ceará. 2017.

ARVELOS, G.V.M. Sistema de aquisição de imagem de Disco-difusão para avaliação da eficácia de antibióticos na nuvem. Universidade de Brasília. Brasília, 2015.

AZEVEDO E; CONCI A. Computação Gráfica. Teoria e Prática. Elsevier; Edição: 1ª.2007.

CAMARGO ILBC; MASCHIETO A; SALVINO C & DARINI ALC. Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário - Uma revisão técnica. Medicina, Ribeirão Preto, 34: 70-78, Jan./Mar. 2001.

CASTILHO, M.V. Comparação de Dois Métodos de Análise Química Considerando a modelagem Matemática da Precisão. Universidade Federal de Minas Gerais. 2001.

CESARIL, K.B.P.B. ABREU, A.S. Verificação das condições higiênico-sanitárias de panificadoras em Francisco Beltrão, PR. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.2016.

Clinical Laboratory Standard Methods (CLSI). Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine, specimens; Approved Guideline. 2.ed. CLSI GP16 - A2, vol. 21, n. 19, p. 1- 36. 3.

COSTA L.F.R. Desenvolvimento de um sistema de Diagnóstico Auxiliado por Computador para automatização do antibiograma por disco difusão. Universidade de Brasília – UnB Faculdade UnB Gama – FGA 2014.

DAMASCENO, R.G. Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

ESQUEF, I A; ALBUQUERQUE M P; ALBUQUERQUE, M P. Processamento Digital de Imagens. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2003.

HIRAKATA, V.N; CARNEY, S.A. Análise de concordância entre métodos de Bland Altman. Rev,HCPA. 2009.

IGNÁCIO, J.S. Processamento e análise digital de imagens em estudos da cinética de recristalização de ligas Al-Mg-X.USP. São Paulo. 2013.

LIMA, M.E, ANDRADE D, HAAS VJ. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de Unidade de Terapia Intensiva. Rev. Bras. Ter. Intensiva. 2007.

LOPES, F.M. Um modelo perceptivo de limiarização de imagens digitais. Universidade Federal do Paraná – UFPR. 2003.

LOPES, P.M; QUEIROZ, T.F.F; RODRIGUES, F.C; CASTRO, A.S.B. *Escherichia coli* como agente etiológico de infecções do trato urinário em pacientes do município de Viçosa-MG. UNIVIÇOSA, MG.2012.

MAFRA, A. D. A. et al. Protocolos de atenção à saúde infecção urinária, 2014. (Nota técnica).

MARTINS MA. Manual de Infecção Hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle. 2.ed., Belo Horizonte: CCIH – Hospital das Clínicas- UFMG. 2001.

MASCHIETO, A. et al. Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário - Uma revisão técnica. Ribeirão preto, v. 34, p. 70–78, 2001.

MERLE V, Germain JM, Bugel H, Nouvellon M, Lemeland JF, Czernichow P, Grise P. Nosocomial urinary tract infections in urology patients: assessment of a prospective surveillance program including 10,000 patients. Eur Urol 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº. 2.616, de 12 de maio de 1998. Dispõe sobre organização e implementação de programas de controle de infecção hospitalar em hospitais. [Online] São Paulo, 1998.

MONGELO, A.I. Validação de Método Baseado em Visão Computacional para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em Indústrias Alcooleiras. Campo Grande, MS. 2012.

NASCIMENTO J.S. Biologia de microrganismos- Introdução à Microbiologia. UFPB. 2009.

OSOWSKY, J.; GAMBA, H. R. Sistema automático para contagem de colônias em placas de Petri.”, in: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Florianópolis, Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica.2001. V, 1, p. 1204-1208.

PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A.; RAINOSEK, A.P. The most probable number technique. In; VANDERZANT.(Ed). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3ed. Washington; American Public Health Association, 1992. Chap.6,p.105-120.

PEREIRA, M. S. et al. a infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem hospital. v. 14, n. 2, p. 250–257, 2005.

PINHEIRO et al. Contagem automática de colônias bacterianas com o uso das técnicas template matching e hough circles. Universidade Federal da Grande Dourados. 2013.

PISTORI, H., PISTORI, J. COSTA, E.R. *Hough-Circles*: Um Modulo de Detecção de Circunferências para o *ImageJ*. Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, MS. 2005.

SANTOS, R.J. Introdução ao MatLab. Universidade Federal de Minas Gerais, MG. 2005.

SANTOS D.F. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial. Universidade Católica de Goiás, GO. 2007.

SILVA, C.M. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. Piracicaba;2002.

SILVA, V.R. CANETTI, A.C.V. Monitoramento microbiológico em um laboratório de microbiologia. Universidade do vale do Paraíba.2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA. Medicina Laboratorial. Boas práticas em microbiologia clínica. São Paulo, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA E SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Infecções do Trato Urinário: Diagnóstico. Projeto Diretrizes.2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10. Ed, Porto Alegre; Artmed 2010.

ANEXO 1

Neste trabalho os microrganismos crescidos nas amostras analisadas, após serem submetidas às técnicas de isolamento adequadas, seguem na Figura 30.

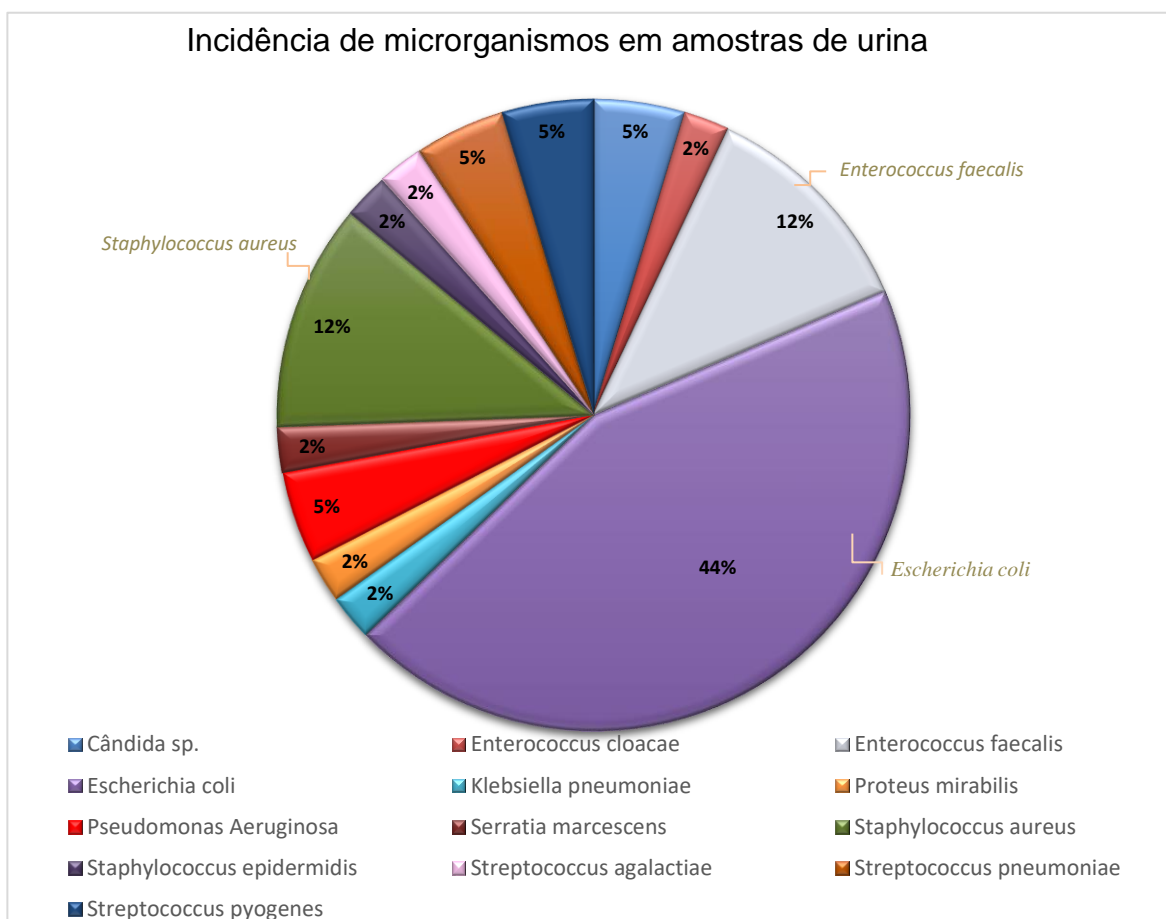


Figura 30: Incidência de microrganismos isolados nas amostras de urina analisada

O predomínio de *Escherichia coli*, justifica-se pelo fato de ser dentre os bacilos Gram negativos, o principal agente etiológico causador de ITU, seguida em menor frequência por *Pseudomonas aeruginosa*, ambas isoladas nas amostras analisadas (LOPES et al., 2012). Dentre as bactérias Gram positivas o agente etiológico mais isolado foi o *Staphylococcus aureus*, um agente colonizador da pele, que quando em desequilíbrio com a flora, pode causar infecções em diversos sítios, seguido por *Enterococcus faecalis*. Ambos microrganismos destacam-se por sua virulência e capacidade de desenvolverem importantes mecanismos de resistência a antibióticos como, MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina) e VRE (*Enterococcus spp.* resistentes à Vancomicina) (ALVAREZ et al.2010).