

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Jancarlo Ferreira Gomes

**“PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS FECAIS E
DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE ANÁLISES DE
IMAGENS POR COMPUTADOR, PARA O DIAGNÓSTICO
DAS ENTEROPARASIToses”**

Este exemplar corresponde à edição final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JANCARLO FERREIRA GOMES
Alexandre Xavier Falcão
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em 29 de agosto de 2008, na
área de Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Xavier Falcão

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

G585p

Gomes, Jancarlo Ferreira

Processamento de amostras fecais e desenvolvimento da técnica de análises de imagens por computador, para diagnóstico das enteroparasitoses / Jancarlo Ferreira Gomes. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Alexandre Xavier Falcão.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Parasitos. 2. Fezes. 3. Análise de imagens. I. Falcão, Alexandre Xavier. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Processing of samples feces and development of the technique of analyses of images for computer, for the diagnosis of the enteroparasitoses.

Palavras-chave em inglês: Parasites; Feces; Image analysis.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Doutor em Parasitologia.

Banca examinadora: Alexandre Xavier Falcão, Ana Maria Aparecida Guaraldo, Sumie Hoshino Shimizu, Luiz Augusto Magalhães, Alessandro Francisco Talamini do Amarante.

Data da defesa: 29/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

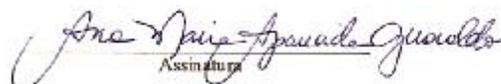
Campinas, 29 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

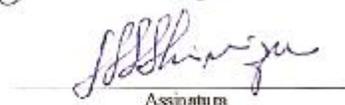
Prof. Dr. Alexandre Xavier Falcão


Assinatura

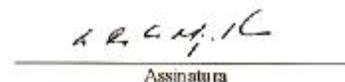
Profª. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo


Assinatura

Profª. Dra. Sumie Hoshino Shimizu


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães


Assinatura

Prof. Dr. Alessandro Francisco T. do Amarante


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias

Assinatura

Profª. Dra. Regina Maura Bueno Franco

Assinatura

Profª. Dra. Kioko Takei

Assinatura

A

minha mãe Maria,

ao meu pai José e,

ao meu filho Gustavo,

dedico este trabalho.



“Puro amor de minha alma, estrela linda e brilhante, de rostinho fascinante, razão desse meu viver. Es toda a felicidade na minha vida meu filho, razão de todo o meu amor, iluminando os meus dias, eu te amarei para sempre”.

Jancarlo, 2008.

AGRADECIMENTOS

“A Deus nosso Senhor, por me permitir realizar este trabalho com equilíbrio, confiança, perseverança, paciência e ação construtiva”.

Em especial ao Prof. Alexandre Xavier Falcão, pela orientação deste trabalho, pela amizade, pelas oportunidades, pelos ensinamentos e pelos estímulos constantes.

Com muito carinho ao Prof. Luiz Cândido de Souza Dias, pela amizade, pelos ensinamentos, pela compreensão e pelo apoio constante.

Com eterna gratidão à Profa. Sumie Hoshino Shimizu, pela amizade, pelas oportunidades, pelos ensinamentos de valores e de conceitos de vida, ajudando-me a manter o equilíbrio e a funcionalidade.

Aos amigos pesquisadores Celso Tetsuo Nagase Suzuki e João Paulo Papa, pela constante colaboração ao projeto.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por permitirem e tornarem possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Luiz Augusto Magalhães, Alessandro Francisco Talamini do Amarante, Ana Maria Aparecida Guaraldo, Regina Maura Bueno Franco, Ângelo Pires do Prado, Marlene Toduko Ueta, Kioko Takei, Angela Lauand Teixeira, Hermínia Yohko Kanamura dentre outros, pelos auxílios constantes, principalmente para o aperfeiçoamento desta obra.

Aos membros dos Laboratórios de Parasitologia do Instituto de Biologia e do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pelo apoio constante.

A toda a minha família, em especial aos meus sobrinhos Raphael e Livia, pela alegria e carinho da nossa convivência.

À Aline, pela educação do meu filho Gustavo e pela compreensão dos meus dias distantes.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho, e que continuarei devedor.

OBSERVAÇÃO

O presente trabalho de tese de doutorado constitui a continuação do projeto de pesquisa desenvolvido para a dissertação de mestrado (*Avaliação de um Novo Kit [TF-Test] Nacional Destinado ao Diagnóstico de Enteroparasitoses em Amostras Fecais*), no Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em 2004. É também parte de um projeto maior, intitulado *Análise de Imagens de Parasitos Intestinais do Homem*, tendo auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 03/14096-8). Algumas partes de resultados obtidos neste projeto foram já apresentadas em eventos científicos, revistas de divulgação, em jornais de circulação interna ou externa do campus, portal da Unicamp, e documentos de patentes. Artigos completos aguardam para serem publicados em periódicos conceituados, que deverá ocorrer possivelmente em 2008, após a ocasião em que um segundo depósito de patente internacional for solicitado. Encontram-se abaixo discriminadas as referidas partes do trabalho já apresentadas.

Resumo:

GOMES, J.F.; SUZUKI, C.T.N.; PAPA, J.P.; FALCÃO, A.X.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; e DIAS, L.C.S. - Análise de Imagens de Parasitos Intestinais do Homem: Uma Realidade. *Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial*, Tema livre 456, 2006.

Congressos:

Apresentação em mesa redonda no III Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, realizado na cidade de Ubatuba, SP, em 13 de outubro de 2006. Título da mesa redonda: Avanços no diagnóstico parasitológico das enteroparasitoses e da esquistossomose.

Apresentação de conferência no 41º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, realizado na cidade de Salvador, BA, em 07 de setembro de 2007. Título da conferência: Automação em parasitologia de fezes.

Reunião:

Apresentação em mesa redonda na 60ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada na cidade de Campinas, SP, de 13 a 18 de julho de 2008. Título da mesa redonda: Avanços no tratamento e diagnóstico de doenças parasitárias que acometem o homem.

Revista:

Reportagem na revista *Ciência Hoje*, volume 40, maio de 2007.

Matérias Jornalísticas:

Jornal *Correio Popular* da cidade de Campinas, SP, em 25 de fevereiro de 2007. Título da reportagem: Sistema aperfeiçoa detecção de parasitos. *Cenário XXI*, pág. B14.

Jornal da Unicamp da cidade de Campinas, SP, de 11 a 17 de junho de 2007. Título da reportagem: “Olho eletrônico” obtém detecção automática de parasitos intestinais. *Jornal da Unicamp*, pág. 5.

Portal da Unicamp:

Reportagem exibida na data de 15 de dezembro de 2006, com o título: Novo sistema faz diagnóstico de parasitos intestinais por computador.

Depósito de Patentes (Nacional e Internacional):

Depósito de patente nacional solicitado pela UNICAMP ao *Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI* (PI 0605465-0), em 30 de novembro de 2006 (www.inpi.gov.br).

Depósito de patente internacional solicitado pela UNICAMP e aprovado (publicado) pela *Patent Cooperation Treaty – PCT* (WO2008/064442), em 05 de julho de 2008 (WIPO:<http://wipo.int/pctdb>).

Depósito de patente nacional solicitado pela UNICAMP ao *Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI* (Protocolo 018080046387), em 23 de julho de 2008 (www.inpi.gov.br).

RESUMO

No presente trabalho, averiguamos sobre processamentos de amostra fecal, desenvolvimento e avaliação de um sistema de computador para análise de imagem parasitária. Observamos que a etapa de processamento de fezes consistiu a etapa crítica, mas, essencial para o fornecimento de estruturas parasitárias limpas, com reduzida quantidade de microimpurezas fecais, ao sistema de análise por computador. Algumas técnicas parasitológicas convencionais, utilizando ou não *kits* comerciais, foram estudadas, e a de *TF-Test (Three Fecal Test)* apresentou menor teor de microimpurezas no final de processamento fecal. Todavia, este teor de microimpurezas era ainda muito grande, sendo ainda inadequado para análise computacional. Modificações foram introduzidas à técnica de *TF-Test*, com coloração dos componentes do sedimento fecal, utilizando um corante desenvolvido à base de Lugol, e seguido por degradação alcalina de microimpurezas, com uma solução clarificadora, previamente padronizada. Assim, a técnica de *TF-Test* Modificada contribuiu para o fornecimento de parasitos com poucas microimpurezas. O desenho do protótipo do sistema computacional para a análise de imagens incorporou: a técnica de *TF-Test* Modificada; um microscópio óptico adaptado a uma bomba sucção peristáltica para conduzir uma alíquota de suspensão fecal processada à uma lâmina ou câmara tubular, onde estruturas parasitárias ou não apareciam em imagem; uma câmera digital; um monitor de vídeo para regulagem e captura de imagens; e um computador. Um banco de imagens foi construído, após coletas de amostras fecais foram efetuadas previamente em 4 regiões diferentes (Campinas, Botucatu, Avaré e Piraju) do estado de São Paulo, onde as enteroparasitoses são prevalentes. Os procedimentos de biossegurança e controle de qualidade contribuíram para que a perda da amostra fecal fosse pequena, não ultrapassando de 8%. Foi obtido um total de 16 espécies parasitárias, constituídos de helmintos e protozoários, e estes proveram uma coleção de 1.126 imagens ao computador. Ademais, o banco de imagens foi formado por informações adquiridas de 5.626 componentes parasitários e não parasitários, assim como, de dados sobre suas características de forma, textura e cor. A análise computacional baseou-se em um sistema de *pipeline* de técnicas de processamento de imagens, incluindo o uso de uma técnica denominada de *Image-Foresting Transform (IFT)*. O *pipeline* consistiu em técnicas de segmentação de imagens para separar estruturas parasitárias e impurezas do fundo das imagens; em técnicas de extração para codificar características da forma, da cor e da textura dos parasitos; e em técnicas

de reconhecimento e delineamento de imagens, visando distinguir parasitos de microimpurezas, de acordo com suas características próprias. A técnica de análise de imagens por computador (CIA) foi avaliada em comparação com a técnica de *TF-Test* Modificada de microscopia óptica, demonstrando alta sensibilidade de 95,3%, especificidade de 96,4%, e eficiência de 96,2 %. O conceito de concordância observada entre as duas técnicas estudadas foi de *Quase Perfeito*, em virtude do índice *kapa* (*k*) ter sido elevado, de 0,88. Esta técnica demonstrou ser altamente reprodutível, quando se ensaiaram em 10 diferentes ocasiões. Os achados deste trabalho apresentam perspectivas para industrialização do protótipo aqui desenvolvido, causando impacto na área de Saúde Pública, pois, no exame de fezes para população, há uma forte demanda de um sistema de automatização para detecção de enteroparasitos.

ABSTRACT

In the present study, we investigated on fecal sample processings, development and evaluation of a computer system for parasite image analysis. We observed that the fecal processing step was critical, but, essential for providing clean parasite structures, with reduced amount of fecal microdebris, to the system of computer analysis. Several conventional parasitologic techniques, using or not commercial kit, were studied, and TF-Test (Three Fecal Test) showed lower rate of microdebris at the end of fecal processing. However, this microdebris rate was still great, being unsuitable for computer analysis. The TF-Test technique was modified by staining the fecal sediment components, with a Lugol-based stain, followed by an alkaline degradation of fecal microdebris, using a clarifier solution. So, the modified TF-Test technique became capable to supply parasite structure with little fecal microdebris. The prototype design of the computer system for the image analysis incorporated: the modified TF-Test technique; a optical microscope coupled to a peristaltic suction pump for leading an aliquot of processed fecal suspension to the tubular slide or chamber, where the parasite structures or microdebris appeared in tridimensional images; a digital camera; a video monitor to calibrate and capture images; and a computer. An image database was formed, after collecting fecal samples from prevalent regions (Campinas, Botucatu, Avaré and Piraju) of the State of São Paulo for enteroparasitosis. The total fecal sample loss was low, being less than 8%, since biosecurity and laboratory quality control protocols were frequently checked. A total of 16 parasite species were identified, consisting of helminths and protozoans, which provided a collection of 1.126 parasite images to the computer. Moreover, the image database was formed by information acquired from 5.626 parasite and non-parasite components, in addition to data on their shape characteristics, texture and color. The computational analysis was based on a pipeline of image processing techniques, including the use of a technique known as Image-Foresting Transform (IFT). The pipeline consisted of: a technique for image segmentation, in order to separate parasites and microdebris from background image; a technique for feature extraction to encode shape, color and texture characteristics of parasites; and techniques for pattern recognition and delineation, permitting to distinguish parasites from microdebris, according to their own features. The technique of computer image analysis (CIA) was evaluated in comparison with the optical microscope technique, named modified TF-Test, demonstrating a high sensitivity of 95,3%, specificity of 96,4% and efficiency of 96.2%. The

agreement between two techniques was ranked as *Almost Perfect*, since the kappa (k) index has been high as much as 0.88. This technique proved to be reproducible, in a study, in which the assay was repeated 10 times, in different occasions. Our findings present good perspectives for the industrial production of the here developed prototype, causing impact on the Public Health area, since, in the fecal examination of the population, there is a strong demand for an automated system of enteroparasite detections.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

OBSERVAÇÃO

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO

- I.1 Parte Geral, 01
- I.2 Problema de Saúde Pública, 03
- I.3 Técnicas Diagnósticas e Fatores Interferentes, 06
 - I.3.1 Coleta de Material Fecal, 06
 - I.3.2 Processamento de Amostra Fecal, 07
 - I.3.3 Microscopia Óptica, 08
 - I.3.4 Sensibilidade das Técnicas, 09
 - I.3.5 Técnica de Alta Eficiência Diagnóstica, 10

II OBJETIVOS

- II.1 Objetivo Geral, 13
- II.2 Objetivos Específicos, 13

III MATERIAL E MÉTODOS

- III.1 Sistema de Estudo, 14
- III.2 Técnicas Parasitológicas, 15
 - III.2.1 Kits Comerciais, 15
 - III.2.1.1 Técnica de *TF-Test*[®], 15
 - III.2.1.1.1 Protocolo de Execução da Técnica de *TF-Test*, 16
 - III.2.1.1.2 Protocolo de Execução da Técnica de *TF-Test* Modificada, 18
 - III.2.1.2 *Kit Paratest*[®], 20

III.2.2	Técnica Convencional,	21
III.2.2.1	Técnica de Lutz ou Técnica de Hoffman, Pons e Janer,	21
III.3	Controle de Qualidade (CQ) e Biossegurança,	22
III.4	Laboratórios Colaboradores para Coleta de Material Fecal,	23
III.5	Desenvolvimento de Técnica Computacional de Análise de Imagens (CIA),	23
III.5.1	Base de Imagens,	24
III.5.2	Análise de Imagens,	25
III.5.2.1	Técnica de Segmentação de Imagens,	25
III.5.3	Validação da Técnica de Segmentação de Imagens,	29
III. 6	Equipamentos e Acessórios Utilizados,	31

IV *RESULTADOS*

IV.1	Técnica Parasitológica Empregada para a Coleta, Preservação, Homogeneização e Transporte de Material Fecal,	36
IV.2	Padronização e Repadronização da Técnica,	37
IV.2.1	Coloração de Estruturas Parasitárias,	37
VI.2.2	Microscopia Óptica,	44
VI.2.3	Solução Clarificadora,	45
IV.3	Formação da Base de Imagens,	47
IV.4	Técnica Computacional de Segmentação de Imagens,	56
IV.5	Desempenho Diagnóstico da Técnica Computacional de Análise de Imagens,	60

V *DISCUSSÃO*, 62

VI *CONCLUSÕES*, 73

VII *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*, 75

VIII *ANEXO*, 90

I INTRODUÇÃO

I.1 Parte Geral

As enteroparasitoses são altamente prevalentes na população mundial, principalmente nas regiões dos trópicos onde o Brasil está localizado^{1,11}. Atualmente, a maioria dos países em desenvolvimento está situada nas regiões tropicais, tendo alta prevalência de parasitoses, e serviços de Saúde Pública precários. O descaso de nossas autoridades médico-sanitaristas faz-se notória desde o ano de 1918, quando Monteiro Lobato descreveu o homem de campo na figura de “Jeca Tatu”, não como um indivíduo indolente por natureza, mas sim, como um parasitado crônico. Monteiro Lobato referia-se ao homem do campo como o grande prejudicado, sobretudo, porque na época, as doenças causadas por enteroparasitos eram chamadas de "endemias rurais", em virtude de uma grande parte da população viver concentrada na zona rural. Ressalta-se que, no ano de 1940, a população brasileira estimada era de 41 milhões de habitantes, e 30% destes, vivendo em ambiente urbano, e 70%, em zona rural^{11,27}. No entanto, no transcorrer dos anos e principalmente em decorrência do êxodo rural estimulado pelo processo industrial dos centros urbanos, associado à falta de higiene da população, de serviços sanitários eficientes, e de moradias adequadas, as endemias hoje estudadas consistem-se em "endemias urbanas", diferindo consideravelmente do perfil epidemiológico rural. Este fato torna-se relevante quando se leva em consideração a atual população do Brasil, representada por mais de 180 milhões de pessoas, das quais aproximadamente 80%, vivendo em cidades e o restante em zona rural^{11,27}. Esse processo de urbanização com altas concentrações de pobreza é o panorama atual do planeta, revelando que cerca de 50% da população mundial se encontra nos centros urbanos e 50%, no meio rural [Fig. 1]¹¹⁷. Todavia, em termos de números, os dados são alarmantes, pois, em aproximadamente 57 anos, a população urbana cresceu mais de 21%, atingindo nos dias de hoje quase 3,3 bilhões de pessoas. Algumas regiões do planeta como, América do Norte, América Latina, Caribe, Europa e Oceania já apresentam mais de 70% de suas populações concentradas nas áreas urbanas. A previsão do Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA) é a de que, por volta de 2030, a população mundial em áreas urbanas poderá atingir cerca de 60%.

De acordo com o exposto, pode-se considerar que uma grande parte das atuais endemias reflete características de endemias urbanas. Desta forma, torna-se patente a necessidade de desenvolver

novas e seguras técnicas laboratoriais de identificação parasitária, principalmente, por causa de suas variações diversas ocorridas em consequência das adaptações ao meio ambiente, que com o passar dos anos, foram se consolidando como parte da sua evolução, a par de preservar bom relacionamento com o hospedeiro. As adaptações de parasitos são de origem biológica, fisiológica e morfológica, e às vezes as modificações são tais, tornando-os impossíveis de se estabelecer alguma ligação com seus ancestrais. Assim, os recentes casos de infecção por via oral do homem pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, constitui um exemplo de uma nova via de transmissão. Outrossim, podemos ainda citar as coccidíases intestinais, que passaram a se destacar com relevância na parasitologia humana, após a década dos anos 80, principalmente com o advento da pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS)³⁰. Da mesma forma, algumas parasitoses anteriormente quase inexistentes ou desconhecidas são hoje consideradas emergentes e oportunistas, pelo fato de terem se tornado muito freqüentes em humanos. Estas observações acrescidas de outros relatos da literatura vêm demonstrando que os genes tanto de procariotos como de eucariotos são plásticos e se alteraram após gerações, desde que os organismos permaneçam nas mesmas condições do meio, novo ou adverso, ocasionando adaptações naturais para a sobrevivência da espécie.

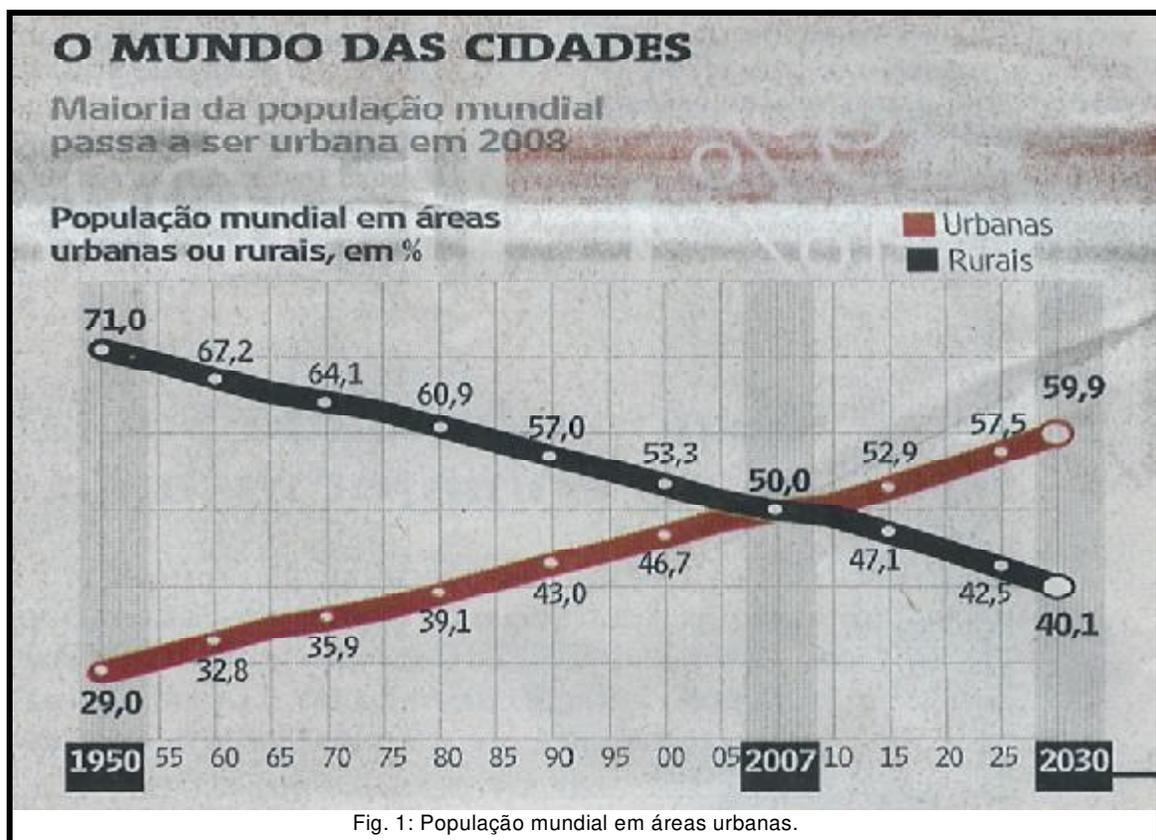


Fig. 1: População mundial em áreas urbanas.

No decorrer dos anos, alguns fatores têm contribuído para melhorar o entendimento sobre a presença ou ausência de determinados parasitos. Por exemplo, as publicações recentes demonstram maior prevalência de protozoários intestinais quando avaliados juntamente com helmintos^{3,4,5}. Este fato é atribuído à maior adaptação dos protozoários às condições atuais do que helmintos e, segundo autores, esta maior prevalência é referida como sendo “marca do parasitismo”. Por outro lado, a situação onde há a redução da prevalência e/ou da intensidade de parasitismo por helmintos intestinais é explicada pela existência de algumas adversidades encontradas para esse agrupamento parasitário como: mudanças de hábito e comportamento do hospedeiro; e do contínuo uso de quimioterápicos, com apoio de exames laboratoriais.

I.2 Problema de Saúde Pública

Atualmente no Brasil, as prevalências de infecções ocasionadas por parasitos intestinais justificam a necessidade de técnicas altamente sensíveis e práticas para finalidades diagnósticas, visando obter resultados eficientes em programas de controle dessas infecções em Saúde Pública. Nas últimas décadas em países desenvolvidos, a prevalência de muitas parasitoses foi interrompida ou controlada, no entanto o mesmo não ocorreu nos países em desenvolvimento^{129,130}. Todavia, por causa da marcante adaptação do parasitismo, do turismo global, das migrações crescentes, das transmissões zoonóticas, do comprometimento da defesa imunológica, e da utilização de drogas imunossupressoras, muitos parasitos considerados extintos, ou que se encontravam albergados no organismo humano, habitualmente considerados não-patogênicos, passaram a constituir problema de Saúde Pública também para países desenvolvidos^{1,6,11,32}. Alguns autores sugerem que muitas destas infecções são causadas por parasitos de forma oportunística, destacando entre estes: *Isospora belli*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*, *Strongyloides stercoralis* etc.

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) emitiu relatório divulgando que 3,5 bilhões de pessoas no mundo encontram-se infectadas por parasitos intestinais^{5,6}. Destas, aproximadamente 450 milhões de pessoas encontram-se doentes, sendo na sua grande maioria crianças, vivendo em áreas tropicais e em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil³¹. Acredita-se que crianças nas idades de oito a doze meses estejam mais afetadas por causa: do

sistema imunológico imaturo; da falta de higiene; e na maioria das vezes com deficiência nutricional, embora em grau moderado.

Ainda, segundo estimativas da O.M.S, as doenças infecciosas e parasitárias são responsáveis por 2 a 3 milhões de óbitos por ano no mundo. As doenças parasitárias acometem uma em cada dez pessoas no mundo, tendo uma ou mais das dez principais agentes etiológicos, como por exemplo: ameba, giárdia, tricuris, ascaris, esquistossoma, além de outras como, tripanossoma, malária, leishmania, etc.

Entre os protozoários intestinais, amebíase atinge 10% da população mundial, infectando cerca de 48 milhões de pessoas e ocasionando mortalidade anual de aproximadamente 100.000 indivíduos. Esta doença constitui a segunda maior causa de mortes entre as parasitoses humanas ocasionadas por protozoários, estando a malária em primeiro lugar. Estima-se ainda que, *Ascaris lumbricoides* parasite 250 milhões de indivíduos, com 20.000 óbitos anuais. A família Ascarididae é de grande importância médico-veterinária, representada principalmente por *A.lumbricoides* e *A.suum*, os quais parasitam respectivamente humanos e suínos. Há controvérsias entre autores quanto à ascaridíase ser uma zoonose ou não, porém, registros demonstram a ocorrência de infecções cruzadas, ou seja, estas espécies parasitando sem distinção os humanos e suínos^{11,38}. Já os ancilostomatídeos infectam aproximadamente 151 milhões de pessoas no mundo, ocasionando a mortalidade anual de 60.000 pessoas. *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* são os principais ancilostomatídeos que acometem humanos. O parasito *Trichuris trichiura* está presente em aproximadamente 49 milhões de indivíduos, correspondendo a quase 11% da população mundial. Vale ressaltar que 1/3 dos indivíduos infectados são de idade inferior a 15 anos e apresentam alta carga parasitária. Infecções ocasionadas por *Schistosoma mansoni* acometem no mundo cerca de 200 milhões de pessoas, com óbitos anuais superiores a 500.000. No Brasil, esta doença parasitária é classificada como persistente e admite-se a existência de mais de nove milhões de portadores dessa infecção^{1,11}. O gênero de protozoário flagelado *Giardia* spp., que parasita o homem, apresenta várias denominações e empregadas como sinônima, tais como: *Giardia intestinalis*, *G. lamblia*, *G. duodenalis* e *Lambliia intestinalis*^{1,11}. É um parasito que está presente em diversas regiões do mundo, com alta prevalência, podendo variar de 4% a 30%, dependendo da região do país. *Giardia* spp.é considerado por muitos autores como reemergente, e é muito frequente em países desenvolvidos, perfazendo uma incidência mundial da ordem de 500.000 casos por ano. Apesar de muita

controvérsia quanto ao potencial zoonótico que este parasito apresenta, a O.M.S. considera a giardíase como sendo uma zoonose ¹¹.

Por diversas razões, algumas parasitoses intestinais vem se destacando recentemente, estando entre essas as causadas por esporozoários. É fato conhecido que, após a década de 80, sobretudo pela infecção de indivíduos imunologicamente comprometidos, estes esporozoários formam hoje um agrupamento parasitário de destaque, de importância na parasitologia humana. Três são as famílias de parasitos que infectam o ser humano e, no momento, a família Cryptosporidiidae desperta maior interesse, por estar incluída nela o gênero *Cryptosporidium*, que apesar de ser geralmente inócuo, tornou-se patogênico em hospedeiro imunodeprimido, por exemplo, naquele infectado por HIV. Há estimativas que criptosporidiose acometa atualmente populações de mais de 90 países e seis continentes³⁰. Trata-se de uma antropozoonose de interesse tanto da patologia humana como animal. Há também outras famílias pertencentes à classe Sporozoa, que apesar de apresentarem baixa prevalência, estão incluídas entre agentes de parasitoses de importância médica, representadas pelas espécies: *Isospora belli*, *Sarcocystis hominis*, *Cyclospora cayetanensis* entre outras.

Ademais, alguns fatores têm contribuído para o surgimento de surtos epidêmicos para determinadas doenças parasitárias em algumas regiões do Brasil e do mundo, como por exemplo, aqueles ocasionados pela importação de alimentos contaminados de regiões endêmicas para outras regiões livres destas endemias. Exemplo está no fato ocorrido com infecções recentes de mais de 28 casos por parasito, *Diphyllobothrium* spp., na cidade de São Paulo. Este acontecimento poderá favorecer a ampliação da prevalência de algumas espécies, como também, de gerar novas adaptações genéticas, que por motivos da sua evolução como espécie, propagarão para diferentes regiões. Vale trazer à memória que, o parasito *D. latum* é originário das regiões européias, propagou-se para a Ásia e América do Norte, e depois para regiões andinas do Chile e da Argentina. Entretanto, os casos iniciais e considerados autóctones do Chile, atribuídos como *D. latum*, foram depois reconhecidos como pertencente à outra espécie, *D. pacificum*.

I.3 Técnicas Diagnósticas e Fatores Interferentes

I.3.1 Coleta de Material Fecal

A maioria dos laboratórios diagnósticos solicita uma coleta de amostra fecal a fresco para o exame de fezes, e por esta razão, a amostra é levada sem demora ao laboratório, no mesmo dia, ou em um período que não ultrapasse a 24 horas, dependendo da sua consistência ^{2,6}. Não obedecendo estes critérios, a amostra deverá ser armazenada temporariamente em refrigeração, com uma temperatura próxima de 4°C ^{2,6}. Há ainda outro procedimento para a coleta de material fecal que consiste em utilizar uma solução conservante ou preservadora, possibilitando a preservação do material a ser analisado à temperatura ambiente. Segundo alguns relatos, esses conservantes podem preservar as estruturas morfológicas dos parasitos, sem refrigeração, por até 30 dias ^{2,6}.

Um fator de relevância a ser considerado é quanto ao número de amostras coletadas, pois, quando se realiza apenas uma coleta de fezes, somente um terço ou metade das espécies parasitárias estará presente nessa amostra, em virtude da: intermitência da passagem de certos parasitos no hospedeiro; distribuição heterogênea dos ovos de helmintos no bolo fecal; eliminação irregular dos protozoários, ocorrendo em picos e ciclos horários, diários, semanais e até mensais, que limitam a detecção parasitária por técnicas laboratoriais ^{2,5,6,31}.

Atualmente, existe uma técnica parasitológica (*TF-Test*) que processa três coletas de amostras fecais, em dias alternados, sem prejudicar a rotina laboratorial, pois, as amostras são introduzidas, individualmente, em frascos contendo solução conservante, que no caso poderão ser armazenadas sem prejuízos por um período de duas semanas ⁵.

Apesar de a maioria dos exames parasitológicos serem efetuados em amostras fecais, em outros materiais clínicos como, urina, escarro, secreções urogenitárias, tecidos, aspirados, conteúdo duodenal e biópsia, formas parasitárias podem ser também demonstradas, por meio de microscopia óptica.

Ademais, para a correta identificação do parasito em microscopia, é necessário que a sua morfologia esteja íntegra, constituindo este um fator de maior relevância para o diagnóstico. Desta forma, enfatizam-se adotar procedimentos corretos tanto para a coleta como para a conservação de amostras fecais ^{2,6}.

I.3.2 Processamento de Amostra Fecal

Geralmente no laboratório de análises clínicas, a amostra fecal coletada é submetida a processos mecânicos e/ou biológicos para a remoção de excessos de detritos ou impurezas. A amostra fecal é normalmente composta na sua totalidade de resíduos digestivos, porém, em certas ocasiões observa-se o aparecimento de sangue, muco, tecidos mortos etc. Outrossim, é freqüente o encontro de fragmentos alimentares, células vegetais, grãos de pólen, leucócitos, células de tecido animal e outros artefatos, constituindo impurezas.

Após a remoção de impurezas da amostra fecal, uma pequena alíquota do material fecal processado é obtida, e colocada entre uma lâmina e lamínula, para ser efetuada a identificação de parasito, em microscopia óptica. Este procedimento foi sempre empregado em larga escala pelos laboratórios de análises clínicas, para diferentes técnicas parasitológicas convencionais, mesmo em se tratando de *kits* comerciais. Os *kits* comerciais apresentam vantagens por serem mais práticos e a remoção de detritos é efetuada por filtração em malhas e por centrifugação. Vale aqui mencionar que atualmente há várias técnicas convencionais e *kits* comerciais que vêm sendo utilizados na rotina para o diagnóstico das enteroparasitoses.

Na inobservância de recomendações solicitadas na etapa anterior de coleta de material fecal, podem aparecer, após à etapa de processamento do material, formas parasitárias alteradas em grande proporção, portanto, difíceis de serem identificadas, e não se prestando para finalidades diagnósticas.

Algumas vezes, o alto teor de resíduos fecais impossibilita a visualização de parasitos em microscópio, podendo reduzir a eficiência diagnóstica. Por outro lado, a análise de um pequeno volume de material fecal processado (25 µl), que é um outro fator pertinente às técnicas já preconizadas, influencia para o encontro de poucas estruturas parasitárias. A técnica de *TF-Test* por sua vez, em uma única etapa, processa dupla filtração de detritos do material fecal, e realiza ao mesmo tempo uma concentração parasitária de 3 amostras coletadas de um mesmo indivíduo, enriquecendo os achados em microscopia óptica.

I.3.3 Microscopia Óptica

Em se tratando de microscopia óptica, os erros diagnósticos podem decorrer da má utilização do equipamento, por falta de conhecimento adequado das características das lentes, regulagem de iluminação e calibração, além da falta de uso de aparelhos de mensuração de parasitos. A estes fatores acrescem-se a leitura microscópica muito rápida e outros fatores humanos como cansaço após a análise de muitas lâminas, além do fato de que algumas lâminas estarem mal preparadas em forma de esfregaço.

Na etapa de identificação parasitária, constitui um fator sério e de gravidade a falta de conhecimento, por parte dos profissionais de microscopia, sobre várias espécies de parasitos e dos diferentes tipos de artefatos, aqui denominados de impureza ou microimpureza, presentes na amostra fecal^{2,6,17}. Algumas espécies de parasitos podem apresentar características morfológicas que diferem das figuras e fotografias encontradas ilustradas em livros ou manuais, e causar dúvidas quanto às suas identificações. Nestas condições, é aconselhado dedicar-se ao estudo desses parasitos até a sua identificação, ou então, encaminhá-los a um especialista, ou ainda, solicitar a coleta de uma nova amostra do paciente para análise adicional da espécie^{2,6}.

A dificuldade de identificação e diferenciação dos parasitos de detritos fecais, ou artefatos, ou impurezas, que apresentam mesma similaridade morfológica, é muito comum em laboratório de análises clínicas. Muitos resíduos, células e microrganismos são responsáveis por reconhecimento incorreto de trofozoítos, cistos, oocistos e esporocistos de protozoários, e ovos e larvas de helmintos intestinais. Com o objetivo de minimizar esses erros, são recomendados treinamentos apropriados, bem como, seguir a observação dos protocolos operacionais, controle de qualidade, atualizações, etc.

Vale comentar que, no ano de 1997, o INMETRO procurou avaliar criteriosamente sobre a eficiência diagnóstica dos resultados de exames parasitológicos fornecidos por diferentes laboratórios de análises clínicas das cidades de São Paulo e do Rio de Janeiro. Este Instituto concluiu que os resultados dos exames apresentados por esses laboratórios foram na maioria insatisfatórios, pois, três entre quatro laboratórios da cidade de São Paulo, e sete entre dez laboratórios da cidade do Rio de Janeiro forneceram um número significativo de erros diagnósticos⁷.

I.3.4 Sensibilidade das Técnicas

As técnicas parasitológicas convencionais, utilizando ou não *kits* comerciais, apesar de terem muitas vezes baixos custos, apresentam sensibilidades que oscilam desde 30,2% a 77,8%^{3,4,5,18,31,73,114}, interpretadas como sendo de níveis baixos a médios. Entretanto, a técnica de *TF-Test*³¹, fazendo-se o uso de *kit*, foi capaz de atingir altos níveis de sensibilidade diagnóstica, variando de 73% a 97,8%^{5,31,114}. Esta técnica foi por nós idealizada e desenvolvida, sendo considerada como uma contribuição recente para o avanço tecnológico na área diagnóstica de enteroparasitoses.

Os laboratórios de análises clínicas, do setor público e privado nacional, vêm utilizando um grande número de técnicas convencionais, por décadas. As técnicas convencionais mais empregados são: Lutz¹¹⁹ ou Hoffman, Pons and Janer¹²⁴; Faust and cols.¹²⁰; Rugai, Mattos and Brisola¹²¹; Kato-Katz¹²²; e Willis¹²³. Estas técnicas foram desenvolvidas em épocas remotas, quando a população humana endêmica apresentava altos níveis de intensidade de infecção. Nestas condições, qualquer uma dessas técnicas mostravam um bom desempenho diagnóstico, fornecendo resultados sensíveis.

Entretanto, com o passar dos anos e com a decorrente adaptação do parasitismo, aliado a algumas melhorias nas condições de saúde e vida da população tais como, serviços sanitários, alimentação, higiene, e maior eficiência de medicamentos, houve a redução da intensidade de parasitismo, ocasionando paralelamente a diminuição da sensibilidade das mencionadas técnicas. Assim, alguns autores na tentativa de suprir tais reduções de sensibilidade recomendam a combinação de técnicas parasitológicas, em geral de três, na rotina laboratorial. Desta forma é preconizada: uma coleta de amostra fecal para um método mais abrangente ou geral; outra coleta de amostra para um método específico para larvas de helmintos; e, por fim, uma coleta de amostra para processar um método específico para cistos e oocistos de protozoários. Todavia, tais procedimentos tornam-se impraticáveis para a rotina diagnóstica, seja por exigir uma coleta de material fecal para cada tipo de técnica, ou por elevar o número de exames a serem processados, onerando e tornando complexa a rotina de trabalho laboratorial. Em laboratórios de Saúde Pública, este procedimento não é factível, por contarem com baixos repasses financeiros^{28,31}. Diante do exposto, ficou evidente a necessidade de desenvolvimento de uma técnica que apresentasse boas características diagnósticas de alta sensibilidade e praticidade, aliado ao

enriquecimento de formas parasitárias, para solucionar o problema de enteroparasitoses com baixa e moderada intensidade^{3,4,5,10,19,20,31,64,73,114,118}. Alguns autores também sugerem que mesmo para infecções consideradas altas, no mínimo duas coletas de fezes têm de ser efetuadas devido à inconstância na eliminação de estruturas parasitárias durante seu ciclo biológico^{33,34}. Desta forma, como já comentado anteriormente, a técnica de *TF-Test* veio resolver esta questão da variabilidade na eliminação de estruturas parasitárias pelas fezes.

Métodos sofisticados como os imunológicos e moleculares, hoje em amplo desenvolvimento, são altamente sensíveis, mas, apresentam problemas de especificidade. Pois, encontram-se ainda impossibilitados de resolverem a questão, principalmente, de resultados falsos positivos por causa do princípio de seus métodos estarem fundamentados em evidências indiretas²², e não na de visualização direta do agente infeccioso. Contudo, permanece como expectativa a possibilidade do desenvolvimento de métodos imunológicos ou moleculares de baixo custo, que venham contribuir para estabelecer diferença entre uma infecção ativa de uma passada, assim como, para avaliações de eficiência de programas de controle parasitológico e terapêutico³⁷.

Em resumo, a ineficiência diagnóstica resulta de diversos fatores, sendo uma parte inerente à própria técnica utilizada, e outra parte pertinente a fatores humanos, passíveis de serem corrigidos, como já comentado.

I.3.5 Técnica de Alta Eficiência Diagnóstica

Como mencionado anteriormente, *TF-Test* foi a técnica parasitológica desenvolvida na nossa dissertação de mestrado, cujos estudos estão ainda tendo continuidade no presente projeto, que pretende acoplá-la ao sistema computacional para aquisição e análise de imagens de parasitos. A execução desta técnica foi realizada com o *kit TF-Test*[®], já existente atualmente no comércio (Immunoassay Ind. Com. S.A.), e é um conjunto constituído de diferentes peças conectadas entre si, fabricado em plástico reciclável. O conjunto apresenta três tubos coletores, com fechamento, cuja tampa tem uma baioneta e batoque, que possibilita a vedação hermética do material clínico e líquido conservante. Este sistema de vedação constituiu também um objeto de estudo e desenvolvimento industrial. Os tubos coletores contendo amostras fecais são acoplados a um conjunto de sistema de dupla filtragem e um tubo cônico, todos tendo tipo de conexão hermética em forma de clique e batoque. Esta técnica destaca-se das demais por apresentar alta

sensibilidade diagnóstica de helmintoses e protozooses intestinais ^{3,4,5,10}, em virtude do processo de enriquecimento parasitário, preconizado com tríplice coleta de material fecal. O manuseio do *kit TF-Test*[®] em laboratório é simples e prático, pois, requer apenas uma etapa para o processamento de amostras. O *kit* é descartável em todas as suas fases, higiênico, e obedece aos critérios e normas de Biossegurança e Controle de Qualidade ^{31,35}, além de apresentar o fator custo-benefício satisfatório.

Apesar de a técnica de *TF-Test* e outros *Kits* comerciais terem trazido inovações para o exame parasitológico de fezes, fica evidenciada a necessidade de um diagnóstico populacional conveniente e que apresente alta eficiência diagnóstica, para assegurar o tratamento e controle da transmissão das parasitoses intestinais ^{2,5,6,31,35}. Uma alternativa por nós apresentada para resolver este problema de Saúde Pública, que em muitos casos é de vital importância para a família e a comunidade, foi a do emprego do exame enteroparasitológico por meio de computador. Algumas técnicas de análise automática de amostras biológicas são conhecidas, porém, estão distantes da nossa proposta de trabalho¹³¹. Por exemplo, a patente US6005964 descreve um sistema para detectar automaticamente protozoários em amostras de água, com o uso de microscópio controlado por computador. Todavia, esta patente detecta somente protozoários em materiais livres de impurezas, não detecta helmintos e não apresenta um processo automático para o resgate e descarte de suspensão fecal. Já a patente WO03102210 descreve técnicas para a identificação de anomalias em células, através do uso de computador, microscópio e câmera digital. Porém, esta patente executa somente a detecção de células presentes em sangue e livre de impurezas. O mesmo comentário se aplica para a patente FR2572528, que descreve um sistema desenvolvido para a contagem de células presentes em sangue, além de bactérias presentes em água e leite, também livres de impurezas, com o uso de microscópio e computador. Por outro lado, a patente RU2123682 apresenta uma técnica para a detecção parasitária, com o uso de corante e microscópio fluorescente, através de câmera de vídeo e computador. Esta patente difere da nossa proposta de trabalho por realizar uma detecção indireta de parasitos, ou seja, através do uso de anticorpos e antígeno no estudo de viabilidade antigênica. E por fim, as patentes EP0774734 e US20060133657 apresentam sistemas de análise visual de objetos genéricos em imagens, com o uso de microscópio, câmera e computador. Portanto, não se aplicam especificamente ao diagnóstico automático de parasitos intestinais.

Como acima demonstrado, a automatização está distante do exame parasitológico de fezes, o que vem a exigir atenção individual exaustiva para cada amostra, resultando muitas vezes em erro de reconhecimento parasitário, após a leitura de um número razoável de lâmina de microscopia, na grande rotina laboratorial.

Ademais, a automatização de exames é uma realidade em vários setores ou áreas de um laboratório de análises clínicas, resultando em credibilidade diagnóstica ¹².

II OBJETIVOS

II.1 Objetivo Geral

Realizar estudo para processamento de amostras fecais, desenvolver e validar a técnica computacional de análise de imagens, destinada ao diagnóstico laboratorial automatizado de enteroparasitoses de maior prevalência no nosso meio.

II.2 Objetivos Específicos

O projeto abordará as fases abaixo discriminadas:

- Estudar processamentos de amostras fecais, que permitam obter enteroparasitos com reduzido grau de impurezas, para prover o banco de imagens com estruturas parasitárias de boa qualidade, imprescindíveis à análise por computador.
- Obter espécies parasitárias representativas e prevalentes em quatro regiões diferentes do Estado de São Paulo, de acordo com os procedimentos recomendados pelo sistema de biossegurança e controle de qualidade.
- Estudar e desenvolver a técnica computacional de segmentação de imagens, com a incorporação de técnicas de delineamento de componentes e de reconhecimento de padrões, fundamentando-se em algoritmo.
- Validar a técnica computacional de análise parasitológica de imagens, em relação à técnica parasitológica de microscopia óptica, com bases na análise estatística dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, eficiência, assim como, índice de concordância *Kapa* (*k*) e sua conceituação.

III MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Sistema de Estudo

Para o desenvolvimento de um sistema computacional [Fig. 2], diferentes aspectos foram estudados, otimizando as condições de trabalho: a) técnicas parasitológicas para realização de coleta, homogeneização, preservação, transporte, processamento e triagem de material fecal; b) bomba peristáltica para efetuar o resgate por sucção em meio líquido de material fecal processado; c) câmara ou lâmina tubular para acomodação de sedimento fecal em meio líquido; d) lâmina de microscopia convencional para processamentos de técnica parasitológica convencional e *Kits* comerciais; e) solução corante para evidenciar parasitos e solução clarificadora para diminuição das impurezas fecais; f) microscópio óptico; g) câmera de vídeo digital acoplada ao microscópio com resolução de 5 Megapixels (= 5 milhões de pixels); h) monitor para regulagem e captura de imagens; e i) computador para armazenar e processar a análise automática de imagens dos parasitos intestinais.

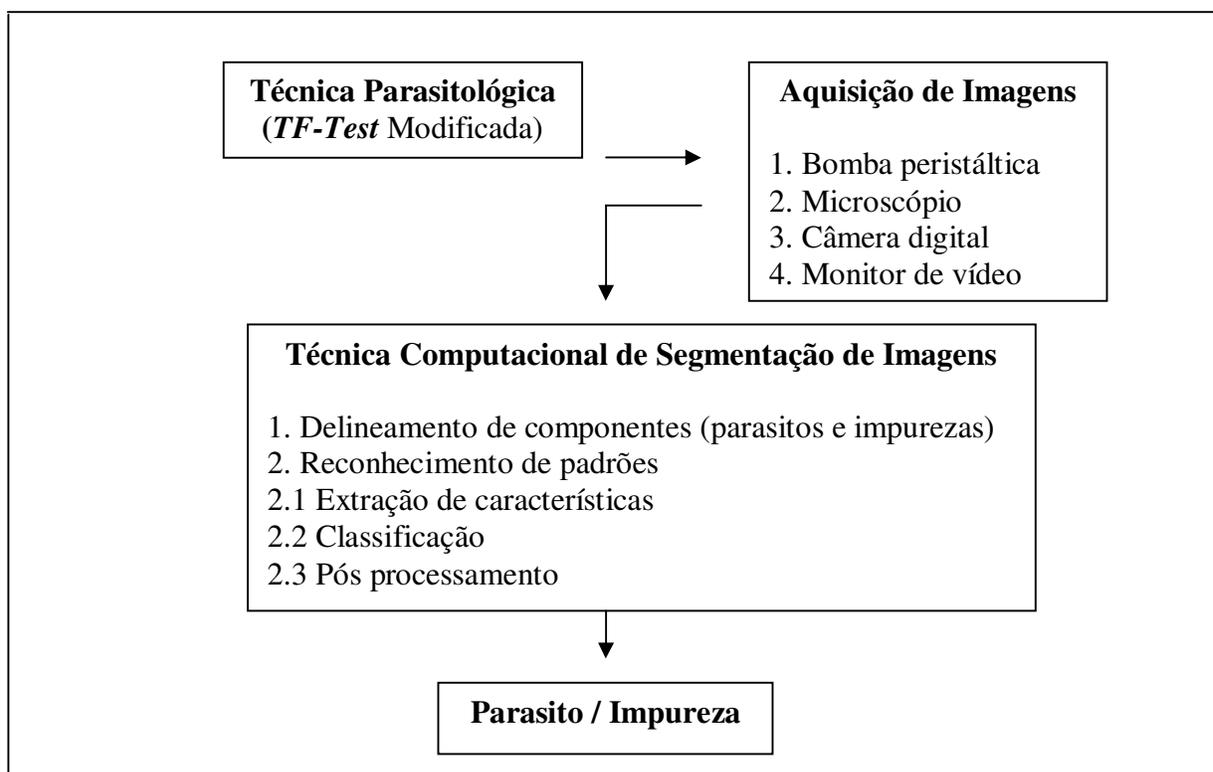


Fig. 2: Sistema computacional de estudo.

III.2 Técnicas Parasitológicas

Um total de quatro técnicas parasitológicas foi estudado, introduzindo ou não modificações, visando obter parasitos na presença de poucas impurezas; condição relevante para realizar o acoplamento à bomba peristáltica mais lâmina ou câmara de microscopia tubular, reduzindo o problema de possíveis entupimentos, além de fornecer imagens parasitárias límpidas ao sistema de análise computacional.

III. 2.1 Kits Comerciais

III.2.1.1 Técnica de *TF-Test*[®]

A técnica parasitológica de *TF-Test*, utilizando o *kit* comercial *TF-Test*, foi avaliada para o estudo de fatores interferentes na realização da coleta, homogeneização, preservação, transporte, processamento e triagem de material fecal.

O mencionado *kit* é constituído por um conjunto de diferentes componentes ou peças confeccionados em plásticos recicláveis [Fig. 3], sendo dois componentes mantidos em laboratório, e o terceiro componente constituído de três tubos, denominados de tubos coletores-usuário, com capacidade de 12 mL de volume cada. Estes tubos são fornecidos ao paciente para a realização de coleta de material fecal, em dias alternados, conforme a bula explicativa encontrada na embalagem. Externamente aos tubos coletores-usuário existem graduações de 1 mL até 10 mL. Cada tubo contém 5 mL de um líquido preservador, à base de solução neutra de formalina. Ainda, em cada tubo, externamente, há uma faixa indicando que o nível do líquido preservador não deverá ultrapassá-la, após a introdução do material fecal. Internamente à tampa do tubo coletor está conectada uma peça plástica em forma de pá, que é utilizada para a coleta de material fecal, de aproximadamente de 1,2 g de fezes. No laboratório, os três tubos coletores-usuário contendo amostras fecais são acoplados por encaixe em três orifícios de um sistema duplo de filtros, denominado conjunto de filtros, contendo internamente malhas metálicas filtrantes de 400 µm e 200 µm. Ao conjunto já acoplado, de tubos coletores-usuário com o sistema de filtros, é conectado um tubo de centrifugação. O tubo de centrifugação apresenta-se na forma de cone, com o fundo em forma de “V”. Por fim, a montagem dos três tubos coletores-

usuário, mais conjunto de filtros e tubo de centrifugação, vem a constituir o conjunto processador *TF-Test*[®] [Fig. 4, (A)].

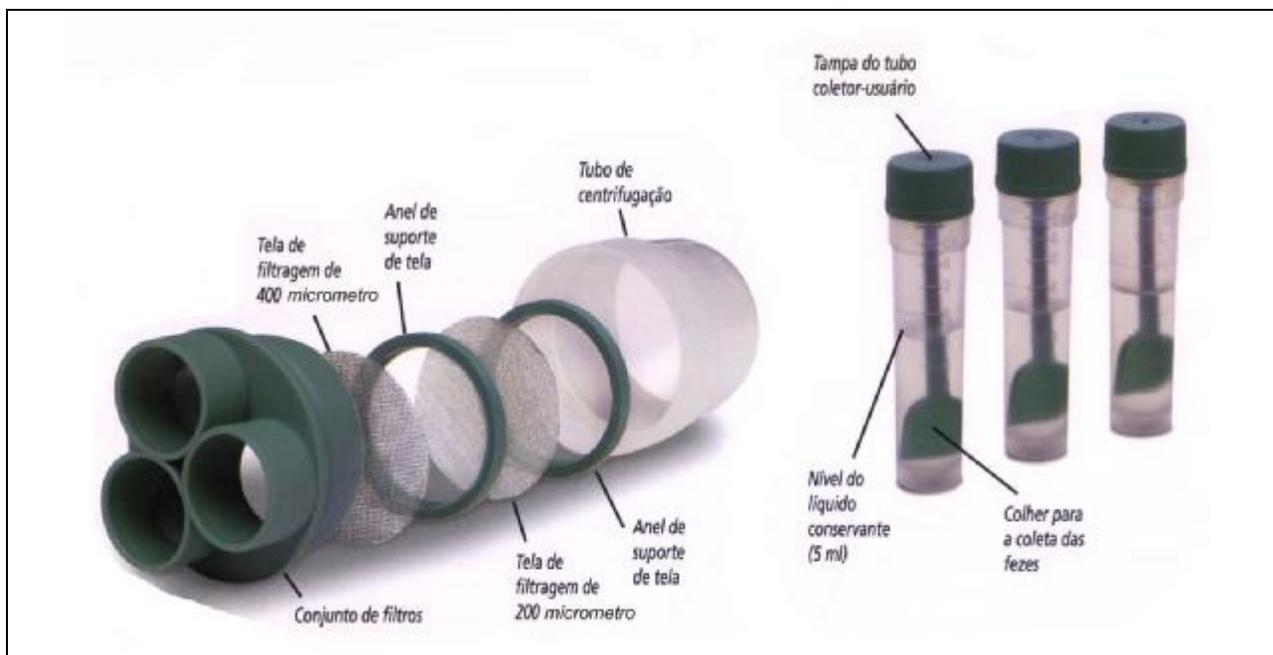


Fig. 3: Detalhamento de peças do *Kit TF-Test*[®].

III.2.1.1.1 Protocolo de Execução da Técnica de *TF-Test*

O protocolo fornecido pela empresa detentora da técnica de *TF-Test* (Immunoassay Indústria e Comércio S/A)⁵ consiste em:

- a) Orientar o paciente a coletar somente uma pazinha de fezes, de acordo com a instrução que se encontra na embalagem contendo os três tubos coletores-usuário, em dias alternados, e em um período de tempo que não ultrapasse a 10 dias;
- b) No laboratório, agitar vigorosamente os tubos coletores-usuário contendo as amostras fecais, homogeneizando-as para serem processadas;
- c) Em uma estante própria para a técnica de *TF-Test*, acomodar os três tubos coletores pertencentes a cada paciente, em separado, com as tampas semi-abertas. Em seguida, adicionar em um dos tubos uma gota de solvente orgânico (detergente neutro incolor) e 3 mL de acetato de etila p.a.;

- d) Fechar os tubos coletores com as suas respectivas tampas, e com o auxílio de uma régua homogeneizadora, agitar vigorosamente todos os tubos coletores inseridos na referida estante, a fim de obter uma suspensão homogênea de partículas fecais;
- e) Retirar as tampas dos tubos coletores, descartando-as em um recipiente apropriado para descarte de material sólido contaminante, seguindo normas de biossegurança;
- f) Encaixar os três tubos coletores pertencentes ao mesmo paciente ao conjunto de filtros, que já contém o tubo de centrifugação acoplado em uma de suas extremidades. A unificação de todas essas peças constitui o conjunto processador *TF-Test*[®];
- g) Verificar se o conjunto processador não apresenta nenhum vazamento do material a ser processado, fazendo para isto a inversão do conjunto;
- h) Centrifugar o conjunto processador por um minuto, a 500 g (1.500 rpm), tendo os três tubos coletores voltados para a parte superior da caçapa e o tubo de centrifugação voltado para a parte inferior da caçapa. A caçapa utilizada é a de 100 mL universal;
- i) Após a centrifugação, desacoplar cuidadosamente, do restante das peças do conjunto processador, o tubo de centrifugação, colocando-o na estante, descartando o restante das peças em recipiente próprio para material sólido contaminante, seguindo normas de biossegurança;
- j) Decantar o líquido sobrenadante do tubo de centrifugação em recipiente para descarte de líquido contaminante, também conforme as normas de biossegurança;
- k) Adicionar cerca de 5 gotas de solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) sobre o sedimento formado no fundo do tubo de centrifugação, ressuspendendo-o e homogeneizando-o delicadamente com o auxílio de pipeta plástica descartável;
- l) Com a mesma pipeta, transferir uma ou duas gotas do material processado sobre uma lâmina de microscopia;
- m) Adicionar, sobre a(s) gota(s), uma gota de solução de lugol diluído a 2%, e mais uma gota de solução salina fisiológica. Preparar, em seguida, um esfregaço de todo o material sobre a lâmina;
- n) Cobrir o esfregaço com lamínula e examina-lo em microscopia de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes; e

o) Finalizado a leitura microscópica, descartar o tubo de centrifugação com o resto da suspensão de material fecal em um recipiente para material sólido contaminante, como já referido anteriormente.

III.2.1.1.2 Protocolo de Execução da Técnica de *TF-Test* Modificada

A técnica de *TF-Test* sofreu modificação com o uso de bomba peristáltica. Os itens abaixo de “a” a “e” são semelhantes ao do protocolo original acima mencionado, porém, logo após estes itens algumas modificações foram acrescentadas à técnica, inclusive com a introdução de novas soluções corante e clarificadora adequadas.

f) Os três tubos coletores pertencentes ao mesmo paciente são encaixados em uma peça denominada de conjunto de filtros, que contém a peça tubo de centrifugação acoplada na extremidade inversa ao encaixe dos tubos coletores. A montagem de todas as peças dá origem ao conjunto processador *TF-Test*[®] [Fig. 4, (A)];

g) Verificar se os encaixes do conjunto processador foram bem executados, como também, se o conjunto não apresenta nenhum tipo de vazamento, fazendo-se a inversão de todo o conjunto montado;

h) Centrifugar o conjunto processador por um período de dois minutos a 333 x g. No movimento de centrifugação, os três tubos coletores são posicionados para a parte superior da centrífuga e o tubo de centrifugação voltado para a parte inferior da caçapa. O conjunto processador é acomodado em uma caçapa de plástico com capacidade de 100 mL, conhecida como caçapa universal, sendo iguais para qualquer centrífuga;

i) A seguir, desacoplar cuidadosamente o tubo de centrifugação do conjunto processador [Fig. 4, (B)], simulando abertura de uma rosca. Logo após este procedimento, o tubo é acomodado na estante *TF-Test*, sendo que, os demais componentes do conjunto processador são descartados em recipiente próprio para o descarte de material sólido contaminante;

j) O líquido sobrenadante do tubo de centrifugação é decantado e adicionado também em recipiente para descarte de material líquido contaminante;

k) Após a retirada de todo o líquido sobrenadante, adicionar 10 gotas de solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) sobre o sedimento fecal localizado no fundo cônico do tubo de centrifugação;

l) Em seguida, este material é ressuspensado e homogeneizado delicadamente por meio de um canudo, pipeta pasteur de vidro ou plástica descartável, individualmente para cada amostra de paciente;

m) Um volume padronizado de 10 gotas da nova solução de Lugol, desenvolvida neste projeto, é adicionado ao tubo de centrifugação, contendo as suspensões de material fecal processado e de salina fisiológica. Este material é novamente homogeneizado e mantido em repouso por um período de 15 minutos;

n) Após este período de repouso, adiciona-se à suspensão um volume correspondente a 10 gotas da solução clarificadora, preparada à base de uma parte de hidróxido de potássio a 10% para quinze partes de solução salina fisiológica, com bases em técnicas já descritas ^{2,6}, efetuando-se a homogeneização;

o) Após 5 minutos de repouso, o dispositivo metálico de sucção ou haste da bomba peristáltica é introduzido em cada tubo de centrifugação contendo material fecal homogeneizado e, através de um procedimento individualizado de sucção, por fluxo descontínuo, a suspensão fecal é aspirada à lâmina tubular de microscopia;

p) Após cada leitura (varredura) da lâmina tubular de microscopia, que ocorre com aumento microscópico de 400 vezes, o material fecal é descartado pela bomba peristáltica em local apropriado para líquidos tóxicos. Procedimentos de lavagens das tubulações plásticas são realizados pela bomba e, em seguida, repete-se, por fluxo descontínuo, a sucção do restante do sedimento fecal e os dados de reconhecimento parasitário são armazenados para a posterior análise por computador;

q) Após o resgate e análise de todo o sedimento fecal presente no fundo cônico do tubo de centrifugação, de aproximadamente 1.800 µl, o tubo é descartado em recipiente próprio para fins de biossegurança; e

r) Os resultados sobre a detecção parasitária são apresentados pelo computador, sem a interferência do homem, mediante a análise de imagens armazenadas.

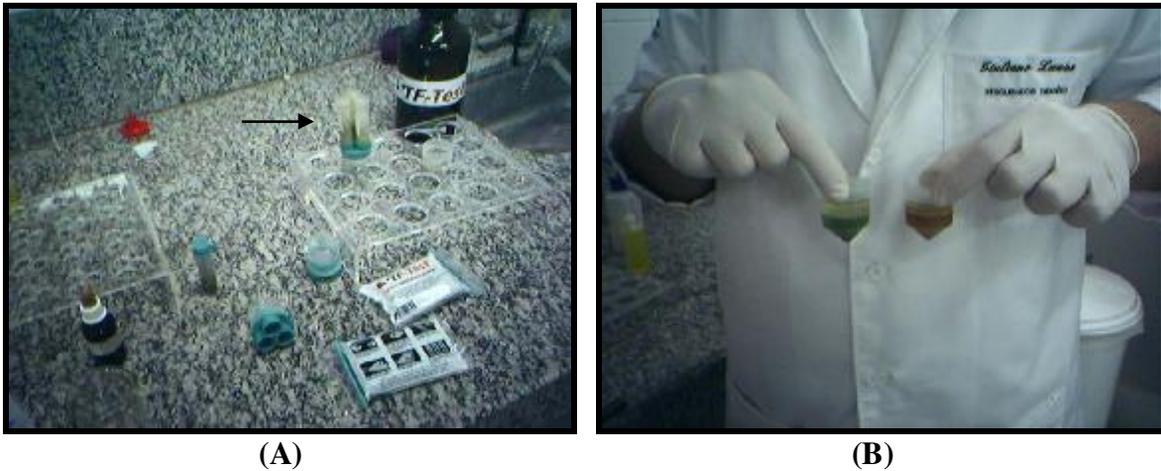


Fig. 4: (A). Conjunto processador *TF-Test* acondicionado na estante antes do procedimento de centrifugação; (B). Tubos de centrifugação *TF-Test* após o procedimento de centrifugação.

III.2.1.2 *Kit Paratest*[®]

O *kit Paratest*[®] é de fabricação de Diagnostek Indústria e Comércio de Produtos Científicos, e o protocolo para seu uso está abaixo apresentado.

- a) Abra o frasco sem derramar o líquido interno [Fig. 5];
- b) Colha a amostra de fezes com o próprio recipiente, que é a porção necessária para o exame. Em caso de diarreia, colocar diretamente uma colher de chá das fezes no líquido;
- c) Feche bem o frasco e agite até diluir as fezes;
- d) Guarde o frasco e leve-o ao laboratório, mantendo-o sempre em pé;
- e) No laboratório, agite bem o frasco para homogeneizar a amostra;
- f) Retire o “cap” de vedação e vire o frasco. Apertando levemente, gotege diretamente sobre a lâmina de vidro, e cubra com uma lamínula; e
- g) Leve a lâmina ao microscópio e análise a amostra.

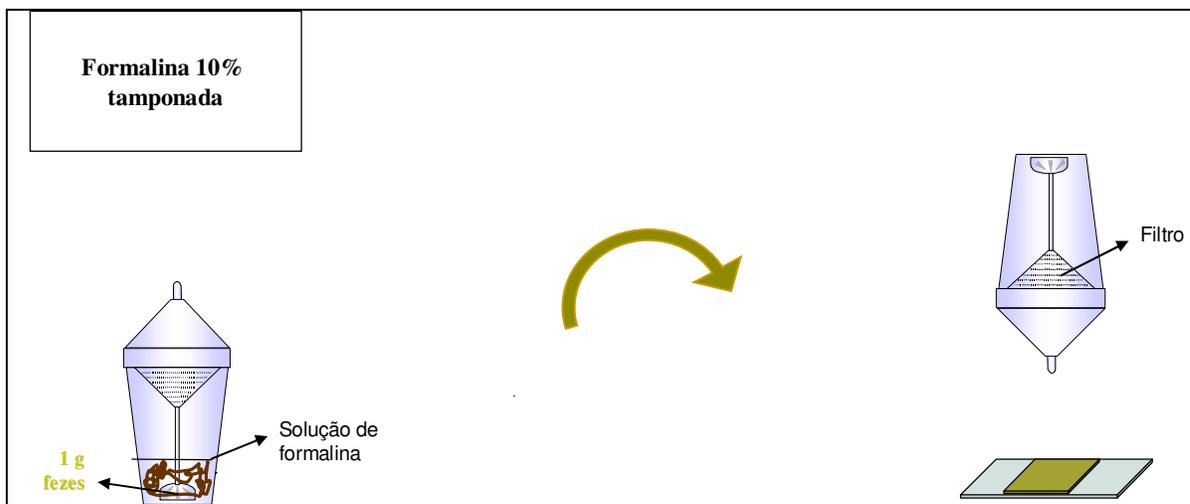


Fig. 5: Uso do *kit* comercial *Paratest*[®].

III. 2.2 Técnica Convencional

III. 2.2.1 Técnica de Lutz ou Técnica de Hoffman, Pons e Janer

Esta técnica foi descrita por Lutz (1919) e, anos após, por Hoffman e cols. (1934), como segue abaixo.

- a) Coletar a amostra de material fecal sem o uso de líquido preservador (p.ex., fezes frescas);
- b) De acordo com a Figura 6, transferir, da amostra fecal coletada, cerca de 2 a 5 g de fezes para um copo ou béquer de 250 mL. Completar este recipiente com o volume de 50 a 60 mL de água corrente. Misturar vigorosamente todo o material contido no recipiente com a utilização de espátula de madeira descartável ou bastão de vidro;
- c) Logo após, inverter o copo ou béquer, contendo material fecal homogeneizado, em um copo cônico de 125 mL, embocado com gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada de duas a quatro vezes, e filtrar a suspensão;
- d) Em caso de necessidade, adicionar água corrente até completar cerca de 3/4 do volume do copo cônico. Deixar a suspensão em repouso durante o tempo de 12 horas;
- e) Após, com a utilização de canudo, pipeta Pasteur ou plástica descartável, coletar de uma a duas gotas do sedimento fecal, localizado na camada inferior, e depositar sobre uma

lâmina de microscopia. Aplicar sobre a(s) gota(s) do sedimento, depositado na lâmina, uma gota de solução de iodo diluído a 2%; e

- f) Por fim, examinar o material em microscopia de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes.

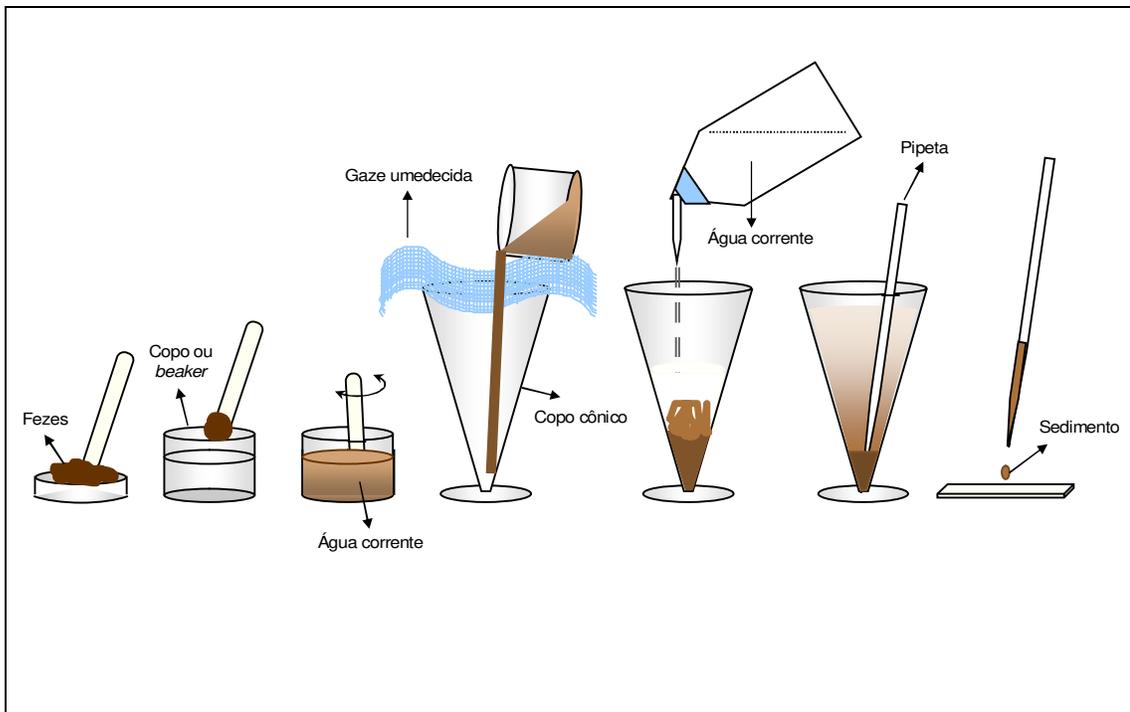


Fig. 6: Técnica de Lutz ou de Hoffman (segundo Dias, 2000).

III.3 Controle de Qualidade (CQ) e Biossegurança

Os enteroparasitos do homem, na sua grande maioria, são identificados pelos seus aspectos morfológicos nos exames parasitológicos de fezes. Para assegurar a qualidade desses exames é imprescindível que o material fecal coletado se apresente em boas condições, preservando a integridade das estruturas parasitárias. Com o objetivo de obter resultados confiáveis, e, sobretudo, de manter alto nível de práticas de laboratório, decidimos estabelecer normas para a técnica de *TF-Test*, pertinente aos procedimentos de coleta, homogeneização, preservação e transporte de material fecal, constituindo o controle externo de qualidade. Este novo tipo de controle de qualidade proporcionou maior segurança no trabalho, bem como, reduziu o risco de

contaminação e posterior infecção durante o procedimento operacional do profissional de laboratório, e de pacientes com o material clínico contaminado.

No laboratório, para o processamento do material fecal, realizaram-se: a) o controle interno de qualidade, com protocolo de normas, incluindo boas práticas de laboratório para materiais contaminantes; b) controle funcional do *Kit* fornecido pelo fabricante, quanto à qualidade do líquido preservador, que deverá manter a morfologia das espécies parasitárias em boas condições para a análise; e c) manutenção periódica dos equipamentos utilizados.

III.4 Laboratórios Colaboradores para Coleta de Material Fecal

Com o propósito de enriquecer o banco de imagens para a investigação e desenvolvimento do atual projeto, foram realizadas coletas de material fecal em diferentes localidades do Estado de São Paulo, onde ocorrem infecções por diferentes espécies de parasitos. Um total de sete laboratórios públicos, sendo três pertencentes a universidades, colaborou para as etapas de coleta de parasitos no campo. Os laboratórios colaboradores foram: a) Laboratório de Parasitologia, do Hospital de Clínicas, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; b) Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital de Clínicas, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Botucatu-SP; c) Delegacia Regional de Saúde (DIR XI), dos Municípios de Botucatu-SP, Avaré-SP e Piraju-SP; d) Hospital Pronto Socorro Ouro Verde, do município de Campinas, SP; e e) Laboratório de Parasitologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. No Laboratório de Parasitologia, do Hospital de Clínicas da UNICAMP, todo o material fecal coletado das diversas regiões do Estado de São Paulo foi processado, centralizando-se os trabalhos pertinentes aos exames parasitológicos.

III.5 Desenvolvimento de Técnica de Análise de Imagens por Computador (CIA)

No Instituto de Computação, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, foi realizada a pesquisa, desenvolvimento e execução das etapas de: formação da base de imagens; estudo e desenvolvimento de técnica de análise de imagem por computador (*CIA = Computer Image Analysis*); e validação e análise de desempenho diagnóstico.

III.5.1 Base de Imagens

O programa para a aquisição da base de imagens foi desenvolvido através da ferramenta computacional em Java. As espécies de parasitos estudadas constituíram de helmintos, nas formas de ovos e larvas, e protozoários, nos estágios de cistos. Os quadros 1 e 2 referem-se aos parasitos estudados mais freqüentemente encontrados do Brasil.

Espécie Parasitária ⁽⁴⁾	Doença	Estrutura ⁽¹⁾
<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	amebíase	cistos
<i>Giardia duodenalis</i>	giardíase	cistos
<i>Entamoeba coli</i>	-----	cistos
<i>Entamoeba hartmanni</i>	-----	cistos
<i>Endolimax nana</i>	-----	cistos
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	-----	cistos
<i>Blastocystis hominis</i> ⁽³⁾	controverso	vacuolar e granular

Quadro 1: Protozoários intestinais mais comumente encontrados no Brasil.

Espécie Parasitária	Doença	Estrutura ⁽¹⁾
<i>Ascaris lumbricoides</i>	ascaríase	ovos
<i>Enterobius vermicularis</i>	enterobíase	ovos
Ancilostomatídeos	ancilostomíase	ovos e raramente larvas
<i>Trichuris trichiura</i>	tricuríase	ovos
<i>Hymenolepis nana</i>	himenolepíase	ovos
<i>Hymenolepis diminuta</i>	himenolepíase	ovos
<i>Schistosoma mansoni</i>	esquistossomíase	ovos
<i>Taenia</i> spp.	teníase e cisticercose	ovos
<i>Diphyllobothrium</i> spp. ⁽²⁾	difilobotríase	ovos
<i>Strongyloides stercoralis</i>	estrongiloidíase	larvas

Quadro 2: Helmintos intestinais mais comumente encontrados no Brasil.

⁽¹⁾ → As estruturas de parasitos das tabelas acima apresentadas foram encontradas através do emprego da técnica de *TF-Test*.

⁽²⁾ → O gênero *Diphyllobothrium* apesar de ser mais prevalente em regiões andinas da América do Sul, como por exemplo, Chile e Argentina, foi incluído na base de imagens do atual projeto.

⁽³⁾ → *B. hominis* foi aqui estudado embora haja controvérsias entre autores quanto à sua patogenicidade.

⁽⁴⁾ → Os esporozoários intestinais do homem, pertencentes à classe Sporozoa, não foram aqui estudados, e serão motivo de estudos em fase posterior a este projeto.

III.5.2 Análise de Imagens

O estudo da análise de imagens envolveu a técnica computacional de segmentação de imagens dos parasitos intestinais^{15,16,116}. Esta técnica localiza e detecta em uma devida imagem o parasito, quanto aos aspectos de ovo, larva e cisto, discriminando-o de elementos não-parasitários, representados por microimpurezas, contrastando com o fundo dessas imagens.

III.5.2.1 Técnica de Segmentação de Imagens

A técnica computacional de segmentação de imagens^{15,16,116} dos parasitos intestinais consistiu em empregar o critério de particionar o campo de uma imagem em regiões de pixels, os quais representam parasitos e fundo de imagem, como por exemplo, artefatos ou resíduos ou impurezas. Esta técnica computacional fundamentou-se em características de forma, cor e textura, sobretudo em relação às extraídas e obtidas dos parasitos, evitando-se desta maneira confusões com impurezas, denominadas por alguns autores de pseudoparasitos ou pseudo-simbiontes³⁸.

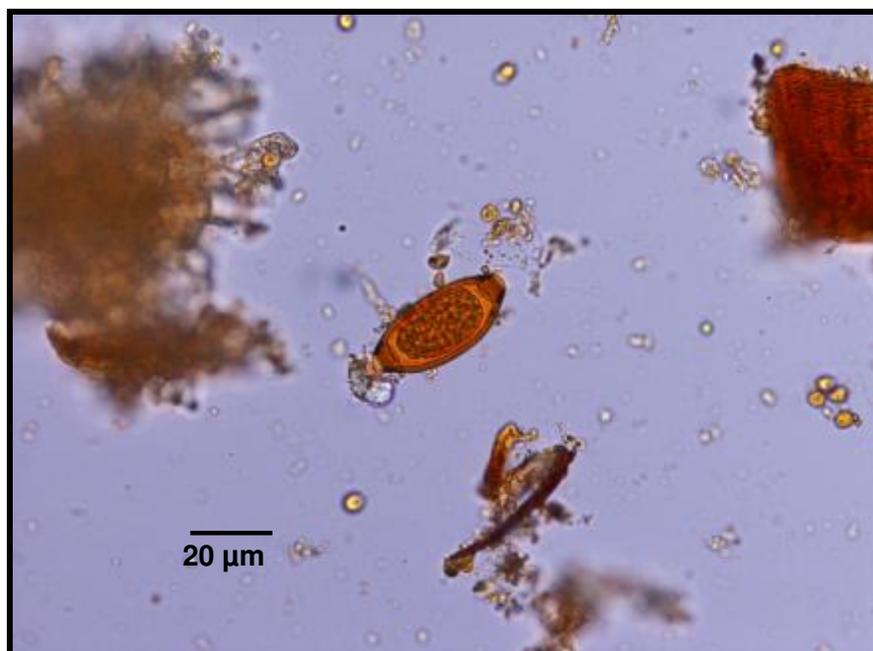
Assim, podemos dizer que, a técnica computacional de segmentação de imagens nada mais é do que um procedimento de particionar imagens em regiões de importância para uma devida aplicação. Constitui-se em uma fase fundamental de sistemas de reconhecimento de padrões, responsável pela extração de objetos. A perfeita segmentação de imagens apresenta duas tarefas fortemente acopladas: delineamento de componentes e reconhecimento de padrões^{115,116}. O delineamento define com precisão a extensão espacial do objeto na imagem [Fig. 7, (B)]. Já o reconhecimento executa subtarefas como a localização do objeto e a verificação do delineamento. Neste contexto, o ser humano supera a máquina no aspecto de reconhecimento, contudo, o inverso ocorre com o de delineamento¹¹⁶. Vale aqui comentar que, um parasito localizado em uma imagem é resultante de um objeto representado por um único conjunto conexo de pixels.

No atual estudo, a técnica de segmentação de imagens foi apresentada em forma de *pipeline* [Fig. 8 e 9], composta por várias etapas em seqüência para a execução do delineamento de componentes e reconhecimento de padrões. Sendo assim, os parasitos, quando analisados pela técnica de segmentação de imagens, foram separados em dois *pipelines*: o primeiro, para detectar cistos de protozoários, que apresentam tamanho pequeno e forma elíptica ou esférica, e ovos de

helmintos, que apresentam tamanho grande e forma esférica ou elíptica mais irregular que a dos protozoários [Fig. 8]; e o segundo, para detectar larvas de helmintos, que apresentam tamanho grande e alongado [Fig. 9]. Assim, o *pipeline* foi desenvolvido de tal forma a ficar com as seguintes etapas e funções:

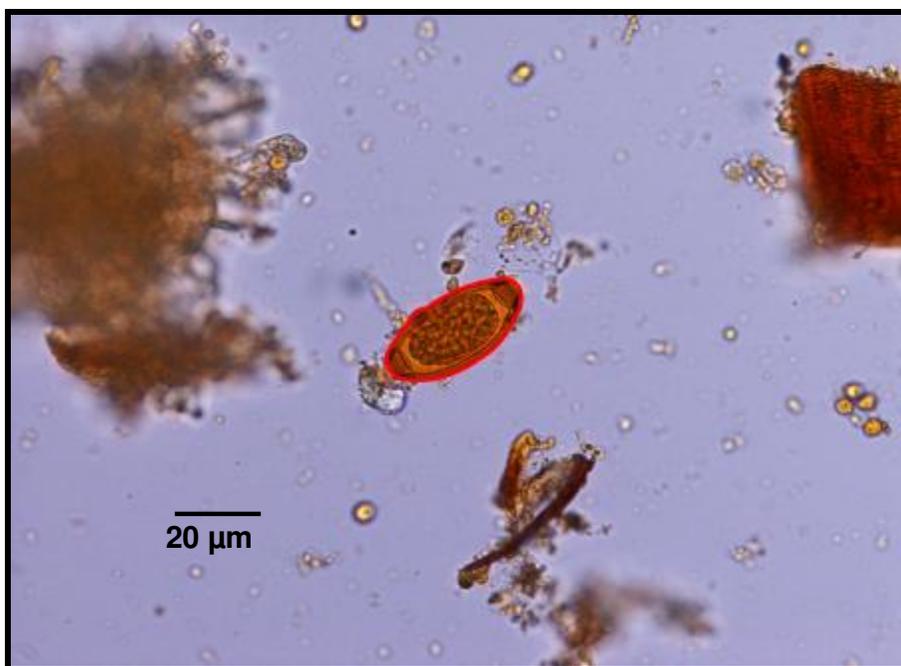
- a) Imagem original - composta pelas imagens obtidas na formação do banco de imagens. Estas imagens foram utilizadas para os testes e avaliação da acurácia do *pipeline*;
- b) Quantização - etapa responsável por converter a imagem original em uma imagem simplificada, sem perder o contorno dos componentes;
- c) Realce de borda – etapa responsável por realçar as bordas dos componentes presentes na imagem;
- d) Localização de elipses – etapa responsável por localizar as elipses em regiões da imagem, sendo estas elipses utilizadas em etapa posterior pela técnica de *Image-Foresting Transform (IFT)*¹⁵;
- e) *Watershed* – etapa que usa as elipses encontradas na etapa (d) como marcadores de região interna e externa dos componentes [Fig. 29, **(B)**], e que calcula o contorno dos componentes entre os dois marcadores;
- i) União de contornos – etapa utilizada somente no *pipeline* de larvas, por estas em algumas imagens mostrarem no delineamento contorno externo e interno (p.ex., larvas curvadas) [Fig. 34, **(A)** e **(B)** – anexo].
- f) Extração de características – etapa responsável pela informação de todas as características dos componentes, fundamentando-se em cor, forma e textura;
- g) Classificador – etapa responsável por classificar os componentes em parasitos e impurezas; e
- h) Remoção de componentes semelhantes – etapa responsável pela eliminação de componentes com poucas diferenças de delineamento.

Ademais, a principal metodologia aplicada para o delineamento foi a de IFT. Esta técnica computacional foi recentemente desenvolvida para a implementação e avaliação de operadores de imagens.



(A)

Fig. 7: (A). Ovo de *Trichuris trichiura* em imagem original, com 400 vezes de aumento microscópico.



(B)

Fig.7: (B). Mesma imagem anterior, porém, com o parasito detectado pela técnica computacional de segmentação de imagens (contorno na cor vermelha).

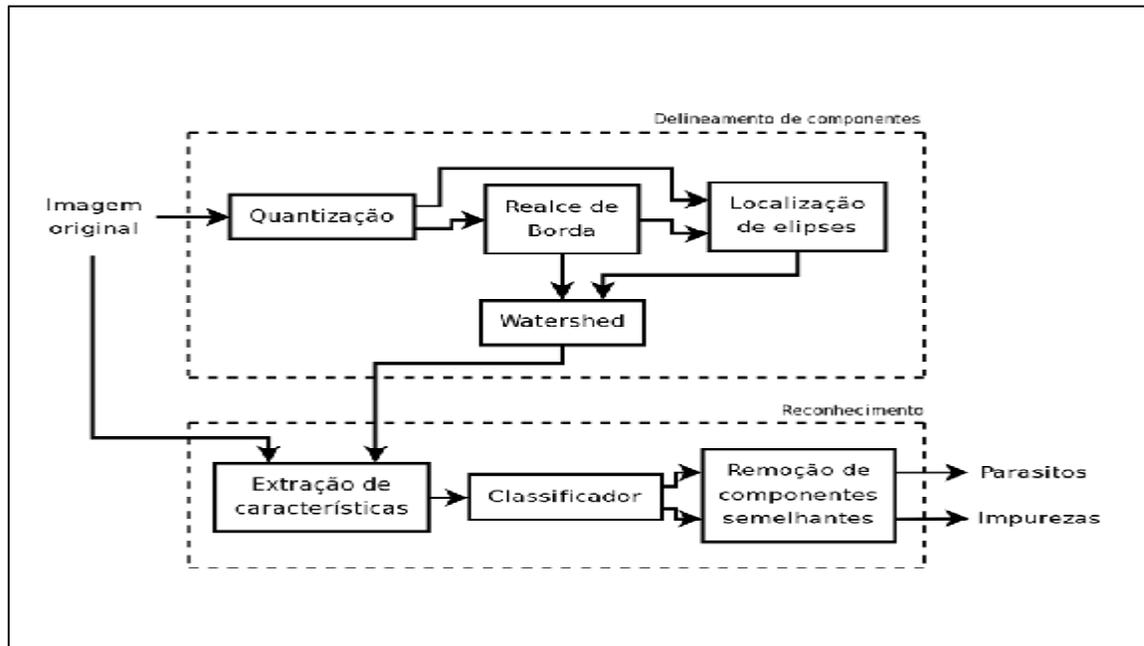


Fig.8: Etapas do *pipeline* para a detecção de cistos de protozoários e ovos de helmintos.

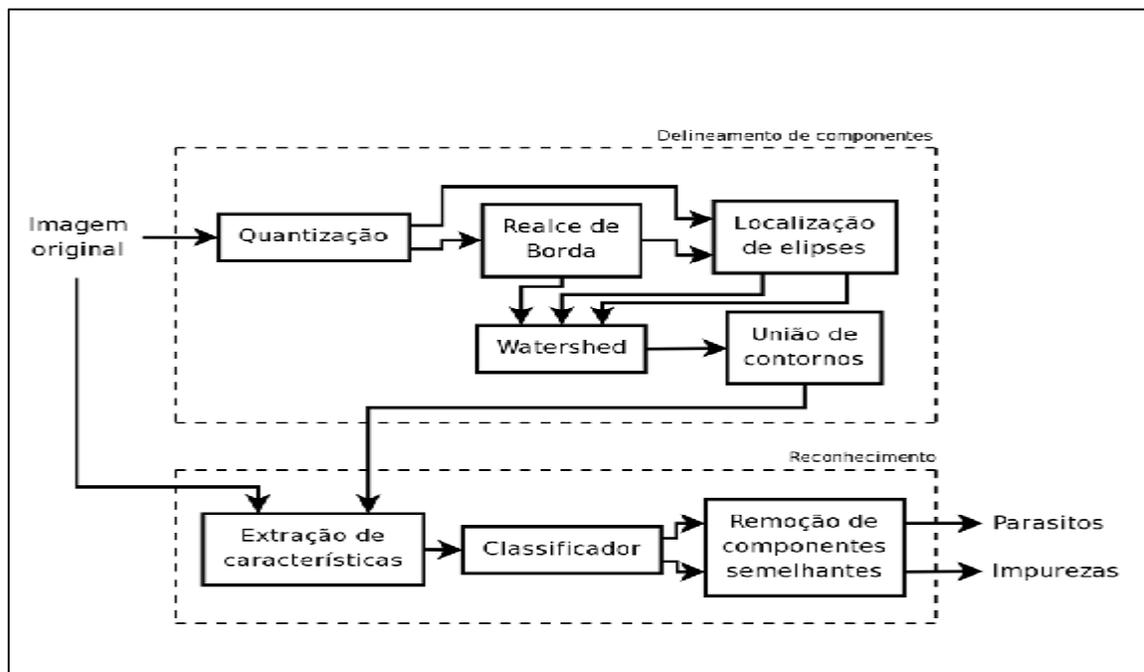
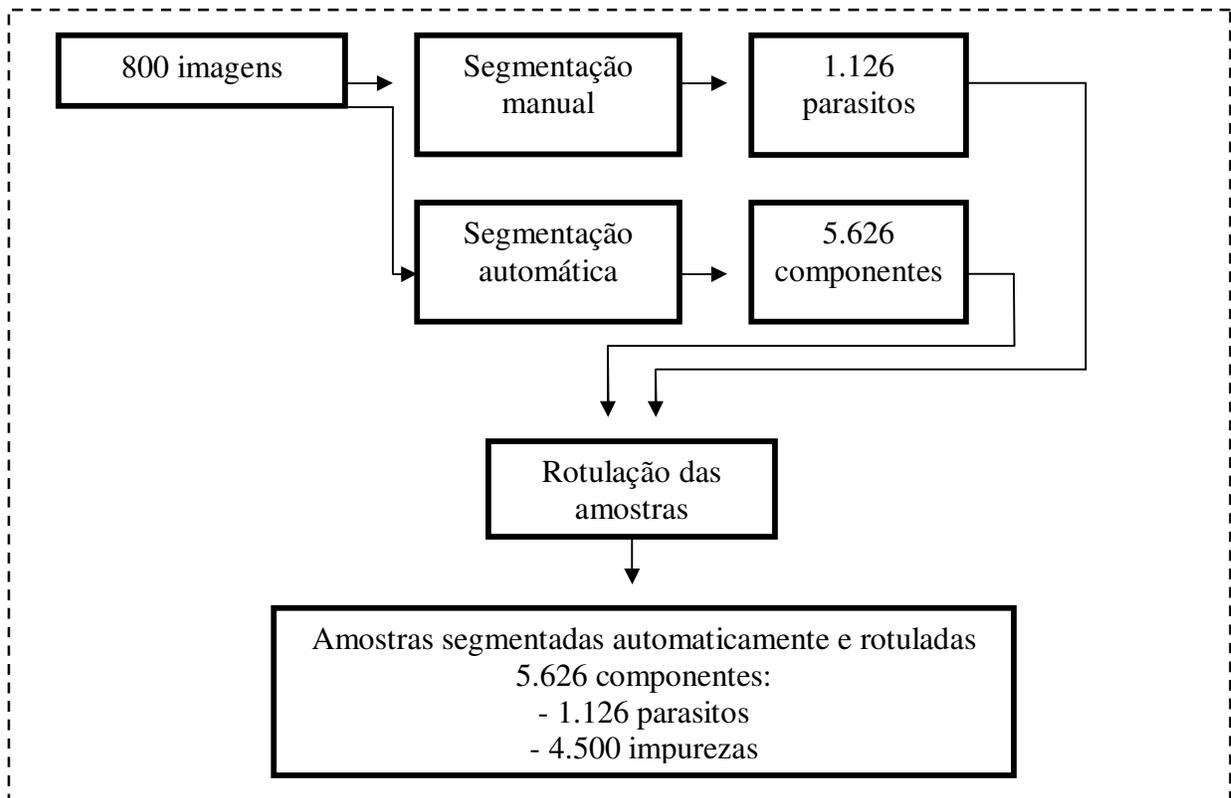


Fig. 9: Etapas do *pipeline* para a detecção de larvas de helmintos.

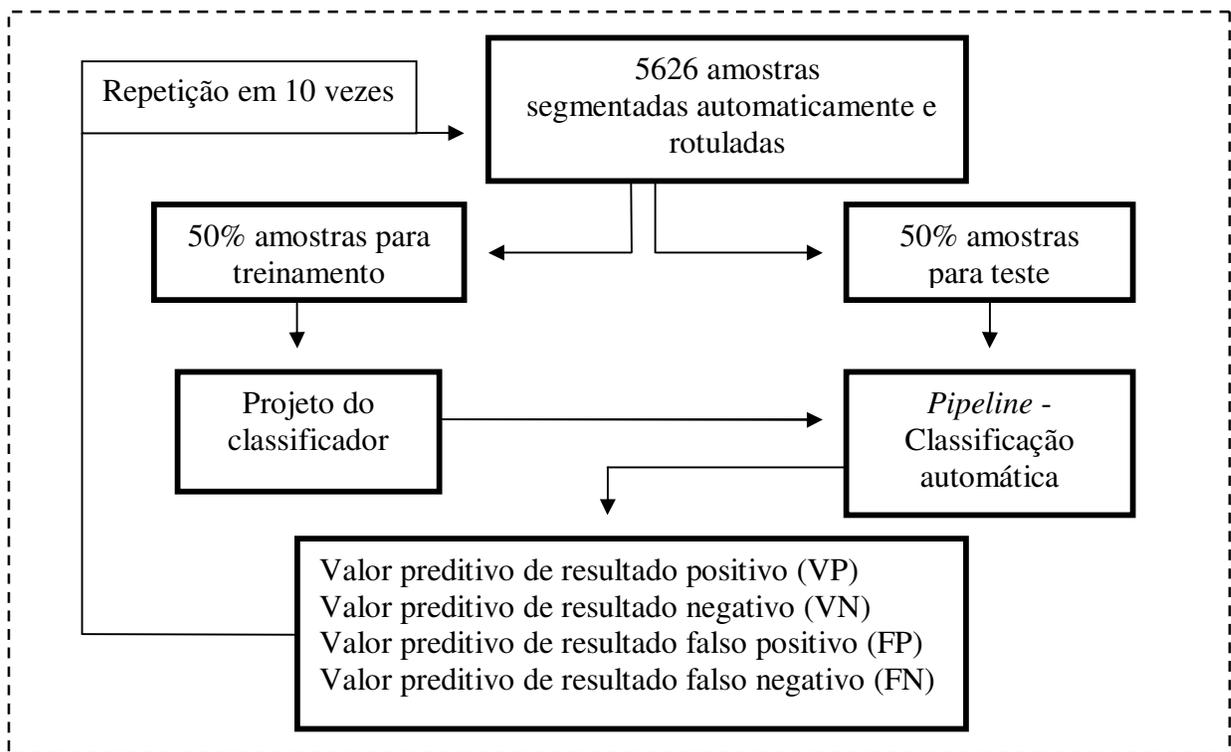
III. 5.3 Validação da Técnica de Segmentação de Imagens

A validação da técnica computacional de segmentação de imagens foi composta pelas etapas a saber: formação de um banco de imagens com amostras rotuladas de parasitos e impurezas; validação em 10 vezes com conjuntos de amostras de treinamento e teste; e análise estatística de dados. Para a formação do banco de imagens [Fluxograma: 1^a etapa], foi realizada a segmentação manual de 800 imagens obtidas por uma técnica parasitológica (*TF-Test* Modificada) no estudo de amostras fecais coletadas, subentendendo-se que, nesta condição, esta técnica foi considerada como sendo de referência (*gold standard*), resultando em 1.126 parasitos. Paralelamente, as mesmas 800 imagens tiveram seus componentes delineados automaticamente, produzindo 5.626 amostras não rotuladas de estruturas parasitárias e impurezas. Estas amostras foram rotuladas por intersecção com a segmentação manual, identificando-se 1.126 parasitos e 4.500 impurezas fecais para a formação da base de dados. Uma segunda etapa consistiu da validação propriamente dita da técnica de segmentação automática (*pipeline*) através de 10 experimentos com conjuntos aleatórios de treinamento e teste. Basicamente, em cada experimento, 50% das amostras rotuladas foram aproveitadas para o treinamento (projeto do classificador baseado em florestas de caminhos ótimos), e as 50% restante foram utilizadas para o teste com o classificador projetado. Desta forma, dez valores de falsos positivos, falsos negativos, verdadeiros positivos e verdadeiros negativos da classificação foram obtidos ao final do Fluxograma da 2^a etapa.

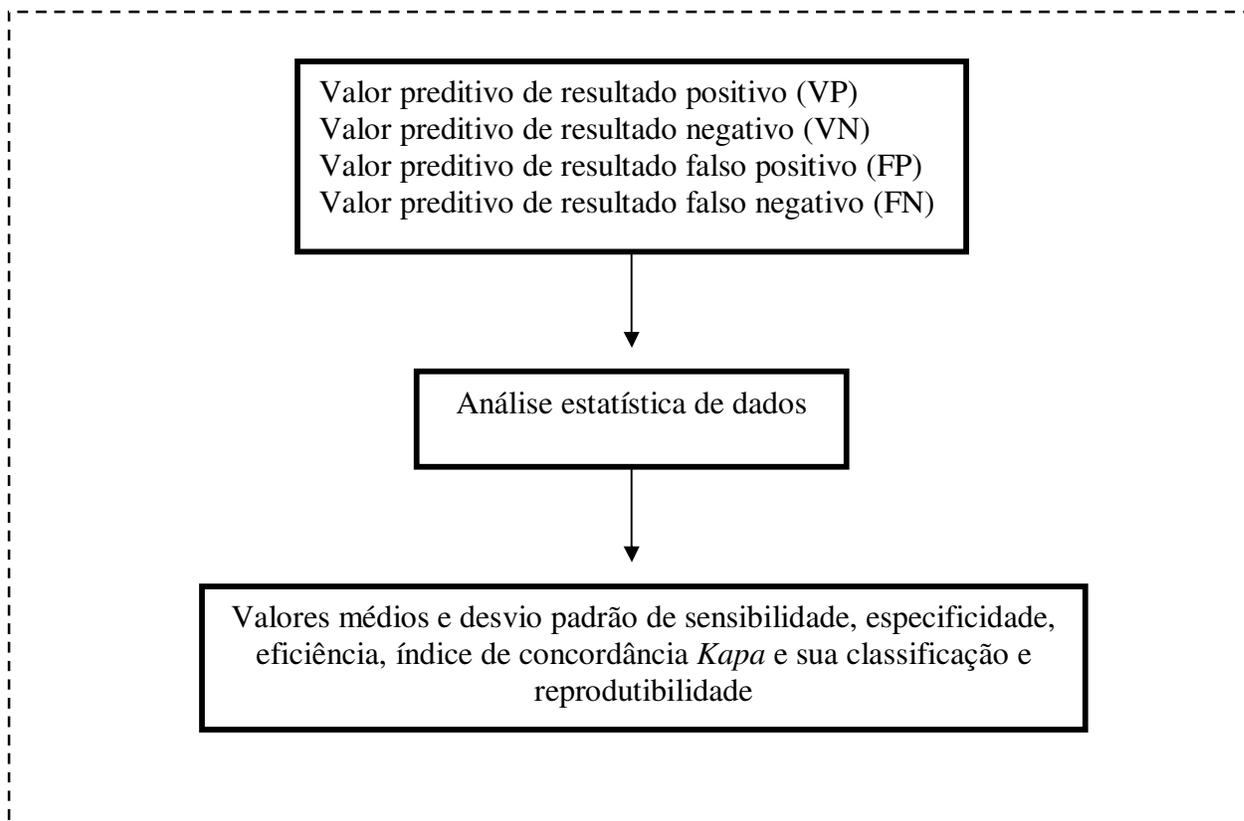
Em uma última etapa, a análise estatística desses dados revelou os valores médios e os desvios padrões das medidas de sensibilidade, especificidade, eficiência, e índice de concordância *Kapa* da técnica de segmentação automática de imagens^{22,24,25,26} [Fluxograma: 3^a etapa]. Estes valores permitiram concluir que a técnica de análise de imagens proposta possui alta eficácia (Tabela 1) e alta precisão ou reprodutibilidade (Tabela 2).



Fluxograma: 1ª etapa, formação do banco de imagens.



Fluxograma: 2ª etapa, validação em 10 vezes com conjuntos aleatórios de treinamento e teste.



Fluxograma: 3ª etapa, análise estatística de dados qualitativos.

III. 6 Equipamentos e Acessórios Utilizados

Foram instalados equipamentos e acessórios para atividades operacionais do projeto, constituídos por: microscópio óptico marca Nikon, modelo Eclipse 200 [Fig. 11, (C)]; bomba peristáltica; lâmina ou câmara de microscopia tubular; câmera de vídeo digital marca Nikon [Fig. 11, (A)], de 5 Megapixels, monitor para regulagem e captura de imagem, marca Nikon, e computador [Fig. 10.1 e 10.2, (A) e (B)].

Com o objetivo de melhorar a resolução de imagens de protozoários intestinais de reduzido tamanho ($<12\ \mu\text{m}$), como por exemplo, algumas amebas intestinais, foram utilizados e instalados no microscópio os seguintes componentes: lâmpada de maior potência (30 watts); diafragma de campo diferenciado; lente objetiva com aumento de 40x; e um moderno monitor individual de regulagens de imagens (*zoom*), com a função de capturar e/ou transferir as imagens focadas para o computador [Fig.11, (B)].

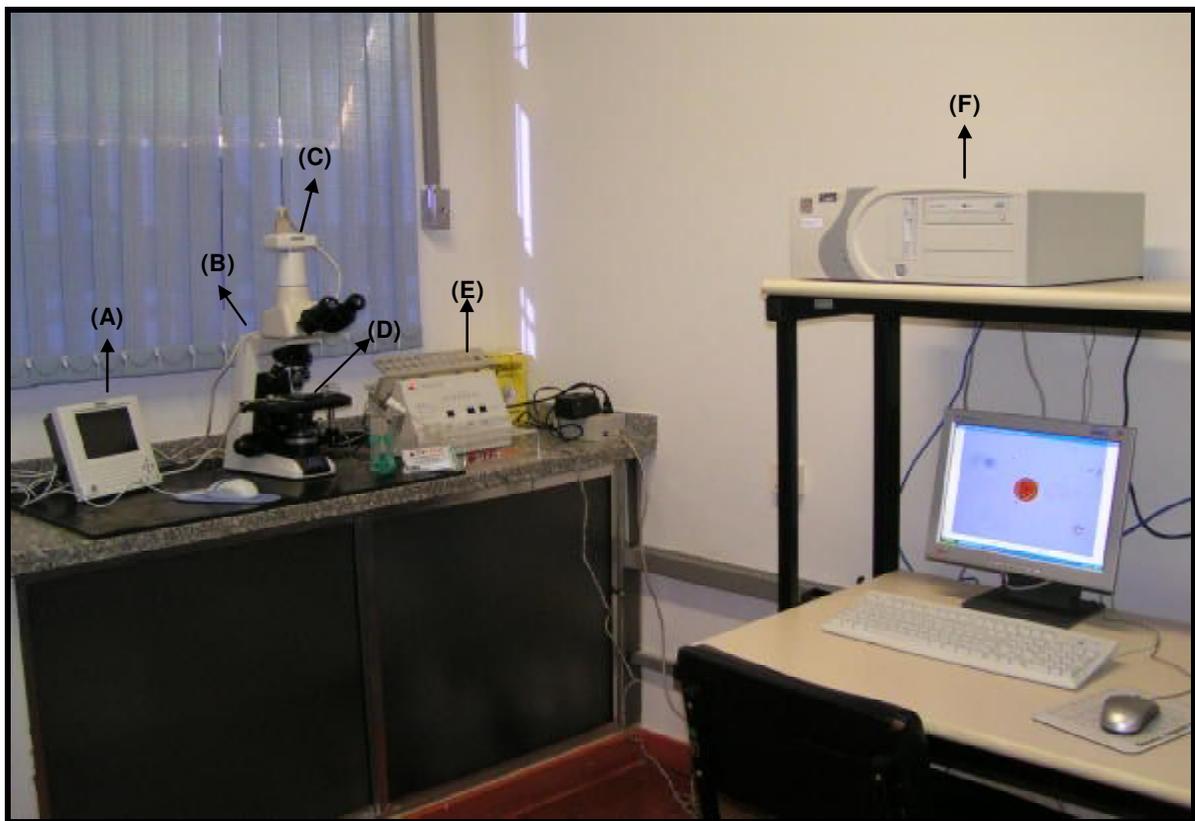
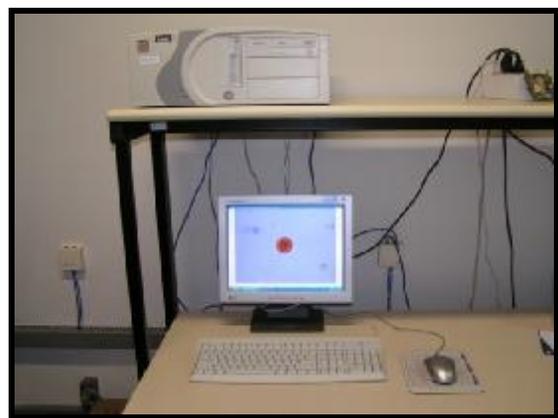


Fig. 10.1: Da esquerda à direita: (A). Monitor; (B). Microscópio; (C). Câmera digital; (D). Lâmina microscópica tubular; (E). Bomba peristáltica; e (F). Computador.



(A)



(B)

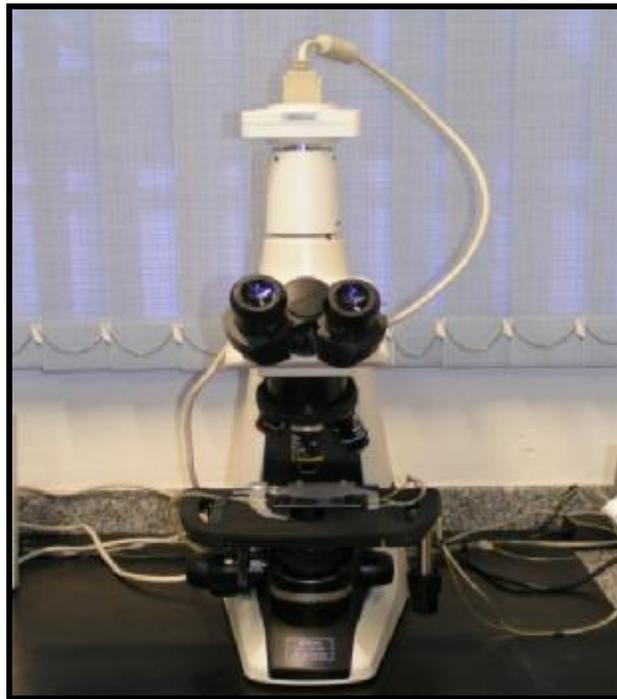
Fig. 10.2: Vista frontal: (A). Monitor, microscópio, câmera digital, lâmina tubular microscópica e bomba peristáltica; (B). Computador.



(A)



(B)



(C)

Fig.11: (A). Câmera digital; (B). Monitor de regulagem de imagem; (C). Microscópio óptico.

Um computador marca LG [Fig. 10.1, (F) e Fig. 10.2, (B)] foi utilizado para as funções de armazenar, executar e processar os programas da base e análise de imagens parasitárias.

A bomba peristáltica marca *DiaSys Corporation* – EUA, modelo *FE Workstation*[®] [Fig. 12, (A)], foi empregada para as etapas de resgate e leitura do sedimento fecal processado. Esta bomba é apropriada para o resgate por sucção de suspensão fecal, e esta sucção não se processa

por fluxo contínuo. O resgate descontínuo da suspensão fecal, contido no tubo de centrifugação da técnica parasitológica, é feito por meio de controle manual, através do uso de um dispositivo de metal ou haste [Fig. 12, (B)]. A bomba peristáltica elimina o uso de pipetas plásticas descartáveis, pipeta Pasteur ou canudo, além de lâmina e lamínula de microscopia. A bomba peristáltica é composta por um sistema de tubulação plástica, que por meio de um procedimento de aspiração programada succiona em meio líquido o sedimento fecal. Uma vez succionado, o sedimento fecal é conduzido para uma lâmina ou câmara tubular de microscopia, apropriada para meios líquidos, localizada na base do microscópio - *charriot* [Fig. 13, (C)]. Um volume de 60 μl é introduzido na lâmina tubular para cada uma das três leituras que é feita. A suspensão total preparada para cada paciente é de aproximadamente 600 μl . Desta suspensão, 540 μl permanecem na tubulação plástica. A bomba, através de um procedimento mecânico e manuseado pelo homem, descarta a suspensão analisada em recipiente apropriado para líquidos contaminantes e processa a lavagem interna das tubulações plásticas, para análise de uma nova suspensão de amostra fecal.



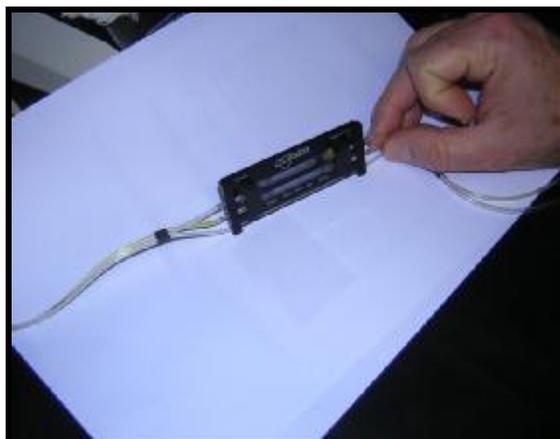
Fig. 12: (A). Bomba peristáltica (*DiaSys Corporation* – EUA); (B).Dispositivo de metal ou haste utilizado para resgate de sedimento fecal.

A lâmina tubular ou câmara tubular de microscopia, também de marca *DiaSys Corporation* - EUA, apresenta profundidade e é apropriada para o recebimento e acomodamento de suspensão de material fecal processado. É constituída por material plástico, sendo que, internamente, é composta por duas lâminas paralelas de vidro. É uma peça que fica acoplada à base do microscópio, encontrando-se ligada à bomba peristáltica mediante tubulações plásticas [Fig. 13,

(A), (B) e (C)]. Parte da suspensão fecal succionada ($60 \mu\text{l}$) é depositada no espaçamento tubular interno das duas lâminas, onde a transparência do vidro permite a leitura microscópica.



(A)



(B)



(C)

Fig. 13: (A). Lâmina tubular vista por cima; (B). Mesma lâmina vista de lado; (C). Lâmina tubular acoplada à base do microscópio.

IV RESULTADOS

Os resultados obtidos serão abordados conforme os tópicos que seguem abaixo.

IV.1 Técnica Parasitológica Empregada para a Coleta, Preservação, Homogeneização e Transporte de Material Fecal

Quatro regiões do Estado de São Paulo foram utilizadas para a coleta de material fecal, e a técnica de estudo que forneceu melhores resultados foi a de *TF-Test* Modificada, em associação com a bomba peristáltica. Esta técnica, de escolha, foi empregada no desenvolvimento do projeto para todas as etapas de coleta e processamento de material fecal. Em dois laboratórios públicos, o protocolo operacional desta técnica estava sendo utilizado há mais de um ano, e este fato veio a contribuir na redução de coleta incorreta de amostra fecal pelos pacientes, resultando em baixa perda de amostras no laboratório, não ultrapassando o índice de 8%. Portanto, nesta condição, o processamento laboratorial foi consideravelmente facilitado, favorecendo, sobretudo as tarefas na etapa de padronização do sistema em estudo. O uso da referida técnica parasitológica fez com que todos os procedimentos laboratoriais por profissionais fossem adequados, assim como, a manutenção de equipamentos utilizados para o desenvolvimento do projeto. Ademais, outros critérios de segurança foram também observados durante a realização do processamento laboratorial da técnica de *TF-Test* Modificada, como, por exemplo, cuidado com o descarte de materiais sólidos e líquidos tóxicos ou contaminantes em recipientes apropriados para sólidos e líquidos contaminantes, seguindo as normas de biossegurança.

Observou-se também que o uso do líquido preservador da técnica parasitológica foi apropriado para o trabalho de campo quando comparado com a coleta de fezes a fresco, pelo fato de: a) o fator distância e tempo não interferirem na morfologia de parasitos; e b) prevenir o contínuo desenvolvimento do ciclo biológico de algumas espécies de parasitos, como exemplo, larvas de *Strongyloides stercoralis* e ovos de Ancilostomatídeos. A solução preservadora, constituída de formalina neutra, demonstrou ser conveniente para a coleta, preservação, homogeneização e transporte de amostra fecal, além de reduzir o risco de contaminação e/ou infecção dos envolvidos no projeto. Vale ressaltar que, as amostras fecais sofreram danos tais como, alteração

morfológica e dessecação, quando coletadas a fresco, sem refrigeração e entregues ao laboratório além do período de 24 horas.

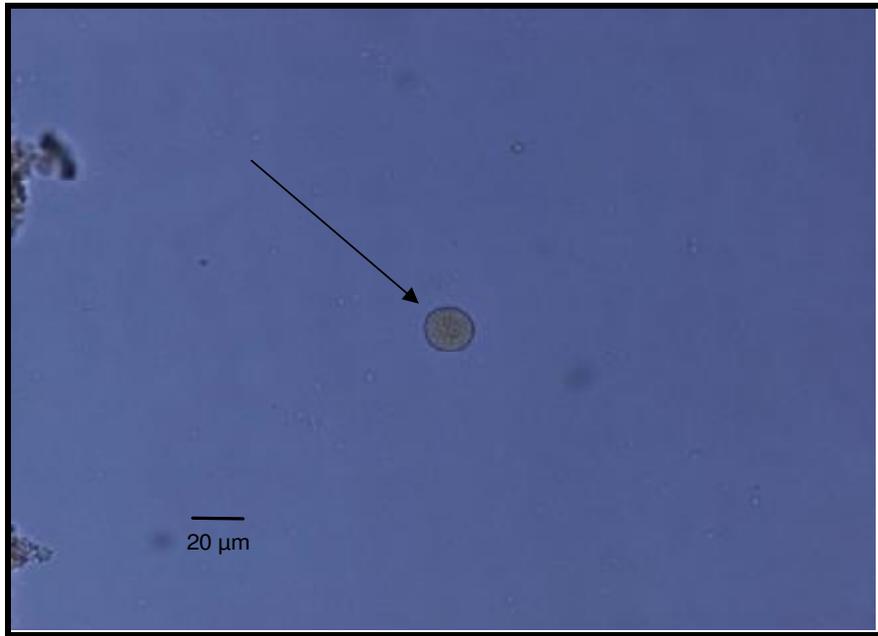
Ademais, os frascos coletores do *Kit TF-Test*[®], por apresentarem reduzida dimensão, mostraram a vantagem de ocupar pequeno espaço físico no veículo de transporte, sem a necessidade do uso de refrigeração.

IV.2 Padronização e Repadronização da Técnica

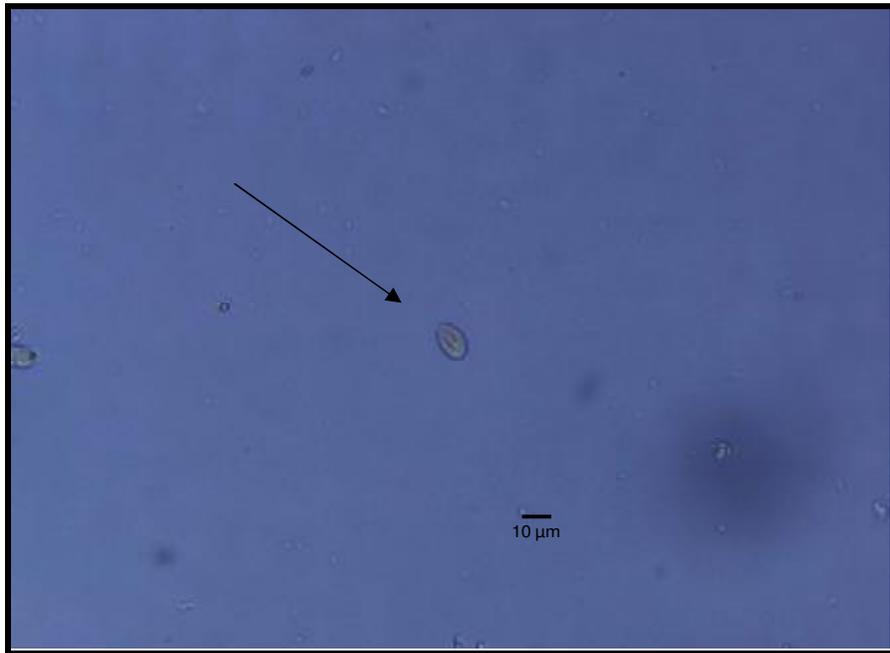
No capítulo III de Materiais e Métodos está apresentada a técnica que foi utilizada em definitivo no presente trabalho, *TF-Test* Modificada, consistindo de protocolo que já havia sido padronizado, mas, que teve de ser repadronizado, com a introdução de modificações, no sentido de conseguir melhor qualidade na morfologia de parasitos, com poucas impurezas. Estas condições consistiram como sendo fatores preponderantes para promover melhor adaptação ao sistema computacional em questão.

IV.2.1 Coloração de Estruturas Parasitárias

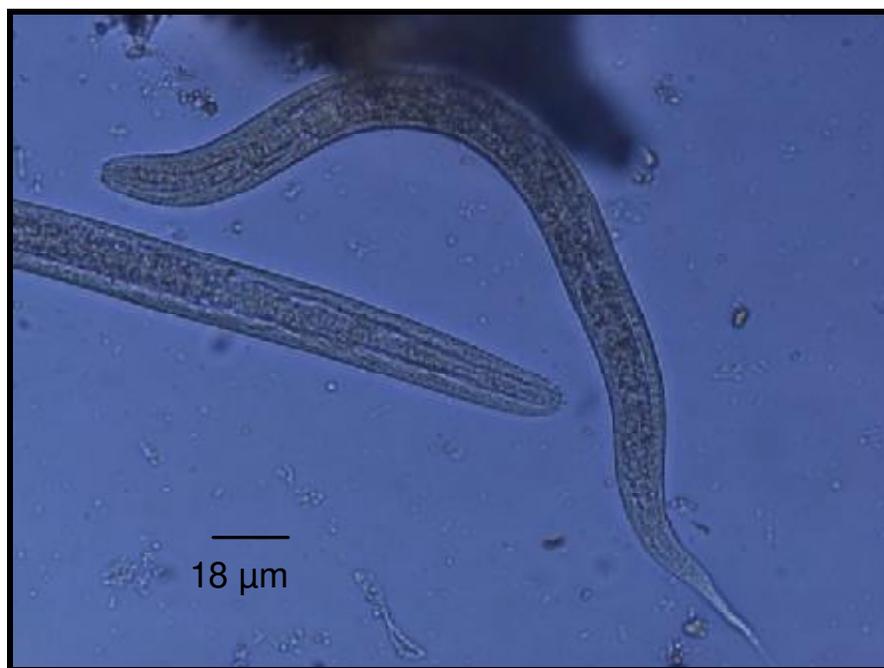
Na câmara ou lâmina tubular de microscopia, empregada na técnica de *TF-Test* Modificada, a estrutura parasitária observada difere daquela visualizada na lâmina de microscopia convencional (plana, de vidro). Na lâmina tubular, a visão é em profundidade, estando o parasito solto, ou seja, disperso em meio líquido juntamente com as impurezas. Assim, nesta condição, na fase inicial de triagem de espécies parasitárias para a base de imagens, foi notada que a solução de Lugol de procedência comercial fornecia coloração fraca e heterogênea para protozoários e helmintos intestinais [Fig.14, (A), (B) e (C)].



(A)



(B)



(C)

Fig.14: (A). Cisto de *Entamoeba coli*; (B). Cisto de *Giardia duodenalis*; e (C). Larvas de *Strongyloides stercoralis* apresentando colorações fracas. Aumento microscópico de 400 vezes.

No entanto, este problema não ocorria quando se aplicou esta mesma solução corante em material processado e observado entre lâmina e lamínula de microscopia convencional. A coloração fraca apresentada pelos parasitos, na lâmina tubular, interferiu diretamente no desenvolvimento da técnica computacional de segmentação de imagens. Vale comentar que, para se ter um reconhecimento perfeito de estruturas parasitárias, a técnica computacional exigia um contraste evidente de cor entre as espécies parasitárias estudadas e impurezas, além de não confundir com o fundo da imagem. Por esta razão, a solução de Lugol foi modificada, aumentando ao dobro a concentração de seus componentes. Este corante modificado, quando aplicado ao sedimento fecal processado, resultou em coloração mais homogênea para os helmintos e protozoários intestinais. A intensidade de coloração apesar de variar ligeiramente, de acordo com a espécie parasitária, forneceu resultados favoráveis à técnica computacional de segmentação de imagens, nas suas funções de delineamento de componentes e reconhecimento de padrões. As figuras 15, (A), (B), (C), (D), (E) e (F) mostram que a técnica computacional de segmentação de imagens necessita de um forte contraste de coloração entre parasitos, impurezas e fundo de imagem.

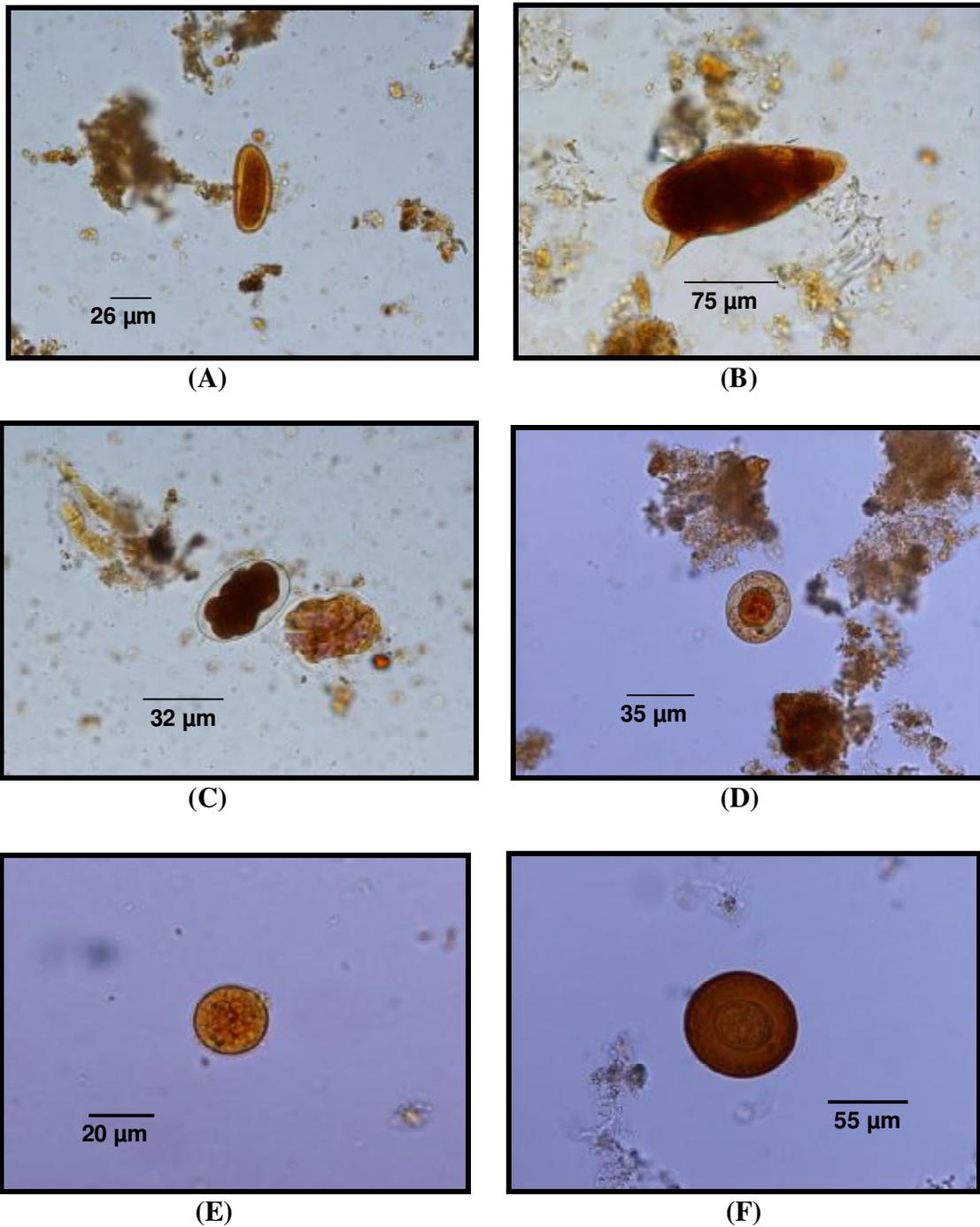


Fig.15: (A). Ovo de *Enterobius vermicularis*; (B). Ovo de *Schistosoma mansoni*; (C). Ovo de Ancilostomatídeo; (D). Ovo de *Hymenolepis nana*; (E). Cisto de *Entamoeba coli*; e (F). Ovo de *Hymenolepis diminuta* apresentando fortes colorações, com aumentos microscópicos de 400 vezes.

Assim, o volume de adição da nova solução corante ao sedimento fecal foi padronizado na proporção de 1:1 (sedimento fecal : solução corante). Nesta proporção, os enteroparasitos mostraram maior homogeneidade e reprodutibilidade de coloração, favorecendo o desenvolvimento da técnica computacional de segmentação de imagens, assim como, as fases subsequentes de delineamento de componentes e reconhecimento de padrões.

A nova solução corante evidenciou que helmintos se coram com maior rapidez em comparação aos protozoários. As figuras 15 (C) e 15 (F) ilustram os achados e referem-se aos estudos realizados com ovos de Ancilostomatídeo e *Hymenolepis diminuta*. No entanto, os cistos de *Entamoeba coli*, espécie de protozoário, sobressairam por serem exceções. A figura 15 (E) exemplifica a coloração forte mencionada.

Ainda, foi evidenciado que, entre os protozoários há diferentes formas colorações. Por exemplo, cistos de *Giardia duodenalis* perderam a coloração inicial, com o aumento de exposição à solução corante e com a maior concentração de corante, com o ofuscamento de organelas da região citoplasmática, como, fibrilas, axóstilo, núcleos etc [Fig. 16].

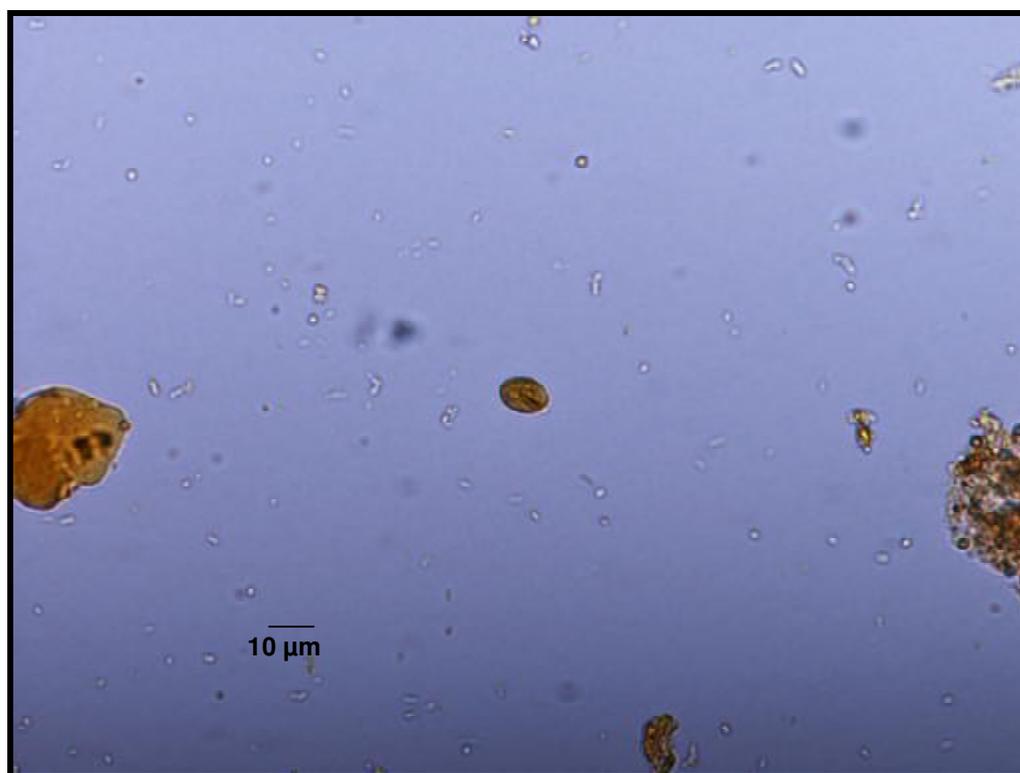


Fig.16: Cisto de *Giardia duodenalis* com tempo limite de exposição à solução corante. Aumento microscópico de 400 vezes.

Houve, porém, uma observação inversa à da acima mencionada com as amebas do trato digestivo, principalmente com cistos de *Entamoeba coli*. Os fatores de maior concentração do corante e maior tempo de exposição ao corante acondicionaram fortes colorações para os cistos do gênero *Entamoeba*. Estes cistos adquiriram fortes colorações por conterem em suas regiões citoplasmáticas grande quantidade de glicogênio, além de organelas citoplasmáticas que se coram com intensidade, como exemplo, estruturas nucleares de cromatina periférica, cariossomos ou endossomo etc. Todavia, mesmo em um tempo superior a 2 horas de exposição com a solução corante, a técnica computacional de segmentação de imagens detectou perfeitamente as amebas do trato digestório [Fig. 17].



Fig.17: Cisto imaturo (uninuclear) de *Entamoeba histolytica* / *E.dispar* fortemente corado, após 2 horas de exposição em solução corante, com aumento microscópico de 400 vezes.

Levando em consideração a variabilidade na coloração de enteroparasitos, sobretudo em relação ao tempo de exposição do parasito ao corante, foi padronizado um tempo mínimo e

máximo para a coloração das estruturas parasitárias. Foi determinado que o tempo mínimo de exposição de parasitos com o corante seria de 15 minutos. Este tempo veio a satisfazer a coloração uniforme de todas as espécies. Em virtude do fato de que algumas espécies continuarem a corar em demasia, interferindo diretamente na técnica computacional de segmentação de imagens, o prazo máximo de exposição para tais espécies seria de 2 horas com o corante. Vale ressaltar que, ovos de *Taenia* spp tornaram-se imprestáveis para o uso na referida técnica computacional, quando expostos por mais de 2 horas com o corante, principalmente para a fase de reconhecimento morfológico [Fig. 18]. Resumindo, observamos que o novo corante aumentou de cerca de 90% em termos de intensidade de coloração, conforme a comparação das figuras 14 (A) e 15 (E).



Fig.18: Ovo de *Taenia* spp. fortemente corado, após o tempo de 2 horas em solução corante, com 400 vezes de aumento microscópico.

IV.2.2 Microscopia Óptica

Nova regulagem de iluminação e de foco de imagem na microscopia óptica foi necessária quando se acoplou a câmara digital no sistema trabalhado. Esta nova regulagem foi necessária, considerando-se diferenciados os caminhos ópticos apresentados pela câmara digital e visão humana, que observa através de lentes ocular e objetiva do microscópio. Desta forma, o sucesso da técnica computacional de segmentação de imagens dependeu da boa qualidade de imagem formada consequente da maior luminosidade oferecida pelo microscópio. Para a obtenção deste efeito, instalou-se no microscópio uma lâmpada de potência maior, 30 watts, além de uma regulagem no botão da intensidade da luz do microscópio, que trouxeram um acréscimo de cerca de 1/3 na intensidade da luz na imagem de interesse.

Visando melhorar as imagens obtidas dos parasitos, foram efetuados vários ajustes no foco do microscópio, através dos botões macro e micrométrico, do condensador e do diafragma do campo luminoso, pois, ora a região citoplasmática de parasitos, em geral cistos de protozoários, estavam bem nítidos, mas, com a perda do foco na periferia da membrana; e ora, a região periférica ganhava a nitidez, mas, as estruturas internas do citoplasma tornavam-se indistintos. Conseguiu-se finalmente encontrar um ajuste ideal que permitiram os trabalhos posteriores da técnica computacional de segmentação, incluindo as fases de delineamento e reconhecimento de imagens.

Outro fator que chamou a atenção foi quanto ao uso da lente objetiva de 40 vezes de aumento para a detecção dos parasitos fortemente corados. Esta lente evidenciou com boa resolução os parasitos de pequena dimensão, como alguns protozoários com tamanho inferior a 12 μm [Fig. 19]. Esta lente objetiva atendeu plenamente a técnica computacional de segmentação de imagens.

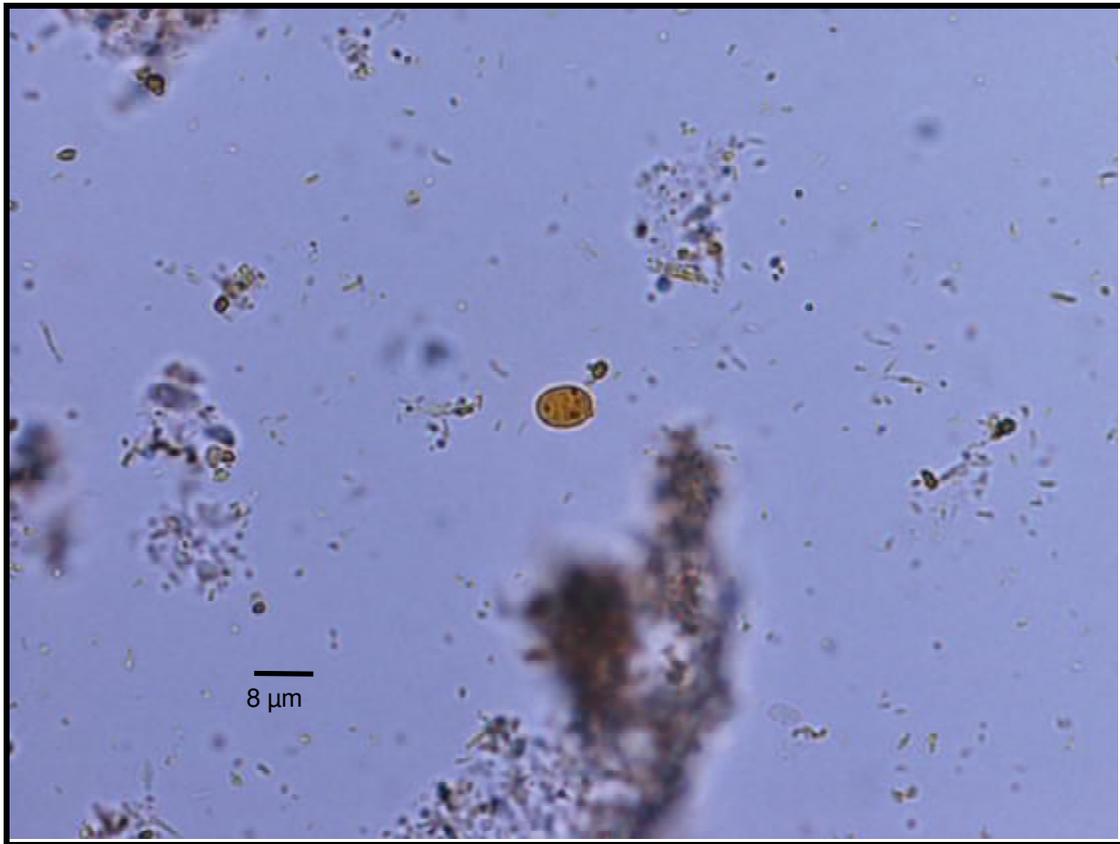


Fig. 19: Cisto de *Endolimax nana* detectado com o uso de lente objetiva de 40 vezes de aumento.

IV.2.3 Solução Clarificadora

A técnica parasitológica de *TF-Test* Modificada associada ao novo corante apresentou uma boa redução de impurezas fecais, além de evidenciação das estruturas parasitárias. Entretanto, muitas microimpurezas (artefatos, detritos e sujeiras) ainda permaneceram dispersas ao lado de parasitos na lâmina tubular de microscopia. Estas microimpurezas interferiram na técnica computacional de segmentação de padrões.

Assim na tentativa de diminuir ainda mais a interferência de microimpurezas remanescentes, foi desenvolvida uma solução denominada de clarificadora, baseada em publicações anteriores^{2,6}, que veio melhorar a técnica computacional de segmentação de imagens. A solução foi preparada à base de hidróxido de potássio a 10%, que eliminou grande parte das impurezas fecais, além das mesmas impurezas não serem confundidas com o parasito corado na imagem vista por

computador [Fig. 20]. No caso em que a solução clarificadora não foi empregada, a diferença entre parasito e impurezas, incapacitava o reconhecimento parasitário por computador [Fig. 21].

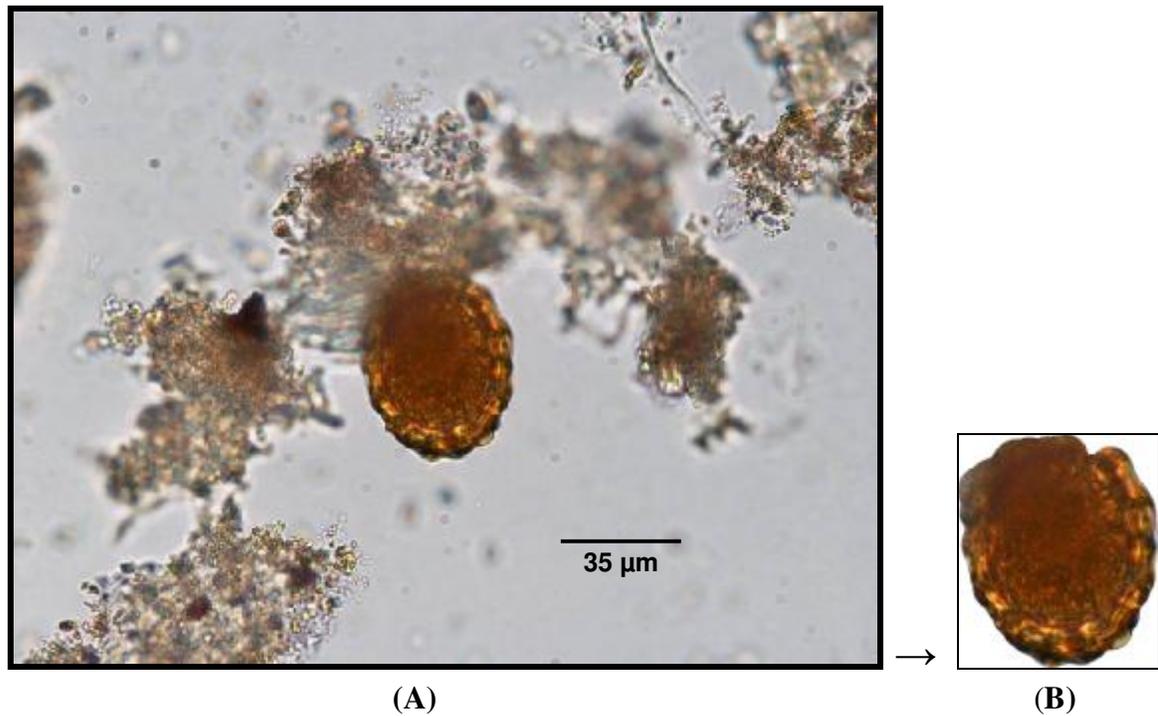


Fig 20: (A). Ovo de *Ascaris lumbricoides* corado e restante das impurezas sem coloração e quebradas pela ação da solução clarificadora. Aumento microscópico de 400 vezes; (B). Mesmo ovo detectado pela técnica computacional de segmentação de imagens.

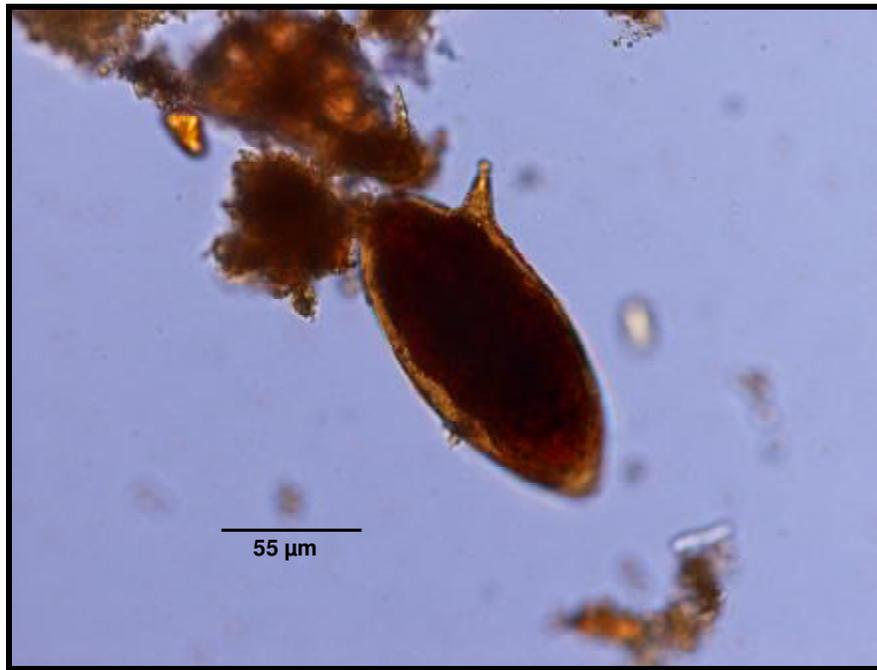


Fig.21: Ovo de *Schistosoma mansoni* aderido a detritos fecais com as mesmas colorações, sem a solução clarificadora. Aumento microscópico de 400 vezes.

IV.3 Formação da Base de Imagens

Como já mencionado anteriormente, o programa para a aquisição da base de imagens foi desenvolvido através da ferramenta computacional Java [Fig.22]. Um total de 800 imagens, contendo 5.626 componentes (parasitos e impurezas), foi obtido para a formação da base de imagens e validação da técnica computacional de análise de imagens. Deste total de componentes, foram obtidas 1.126 imagens de 16 espécies parasitárias. Estas imagens refletiram todas as possíveis manifestações dos parasitos, na respectiva classe de trabalho empregada. A classe criada para cada espécie de parasito foi utilizada para o desenvolvimento do algoritmo de classificação da técnica computacional. O bom encaminhamento da base de imagens favoreceu o desenvolvimento da técnica computacional de segmentação de imagens, nas fases de delineamento de componentes e reconhecimento de padrões.



Fig. 22: Programa computacional Java.

Para a seleção de uma técnica parasitológica a ser acoplado ao sistema computacional utilizado, foram realizadas avaliações de três técnicas parasitológicas [Figs. (A) a (I)], onde se incluíram os que fazem o uso de *Kits* comerciais, com lâmina de microscopia convencional. Para isto, mais de 50 imagens para cada técnica foram avaliadas comparativamente. As avaliações comparativas mostraram uma ligeira superioridade das imagens obtidas na técnica de *TF-Test* Modificada, com lâmina tubular associada com bomba peristáltica, conforme demonstram figuras 23 (J) a (L) que seguem.

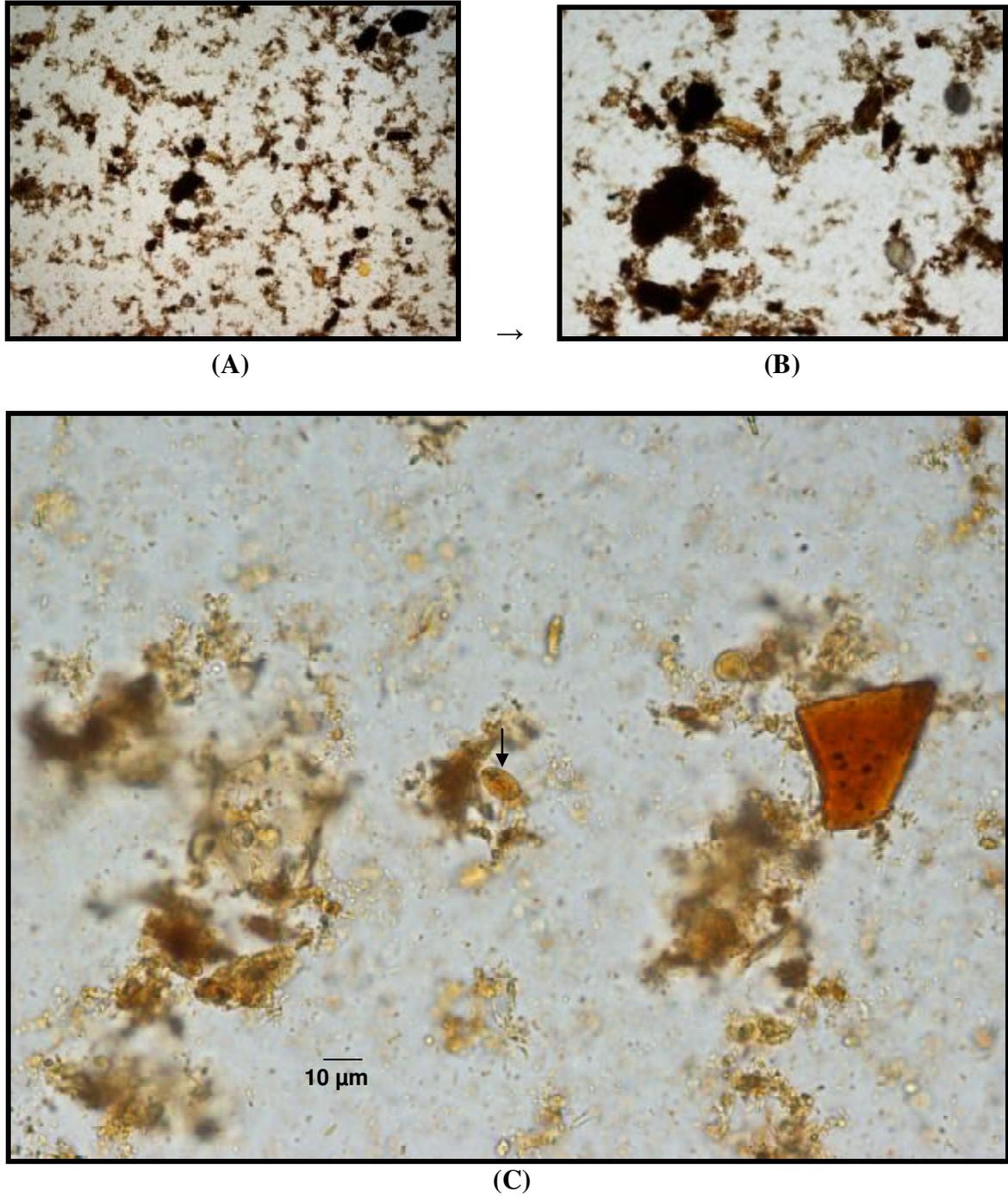


Fig.23: Imagens obtidas pela técnica de Lutz, com lâmina de microscopia: **(A)**. Quatro vezes de aumento em lente objetiva; **(B)**. Dez vezes de aumento em lente objetiva; e **(C)**. Cisto de giárdia na mesma imagem, porém, com quarenta vezes de aumento em lente objetiva.

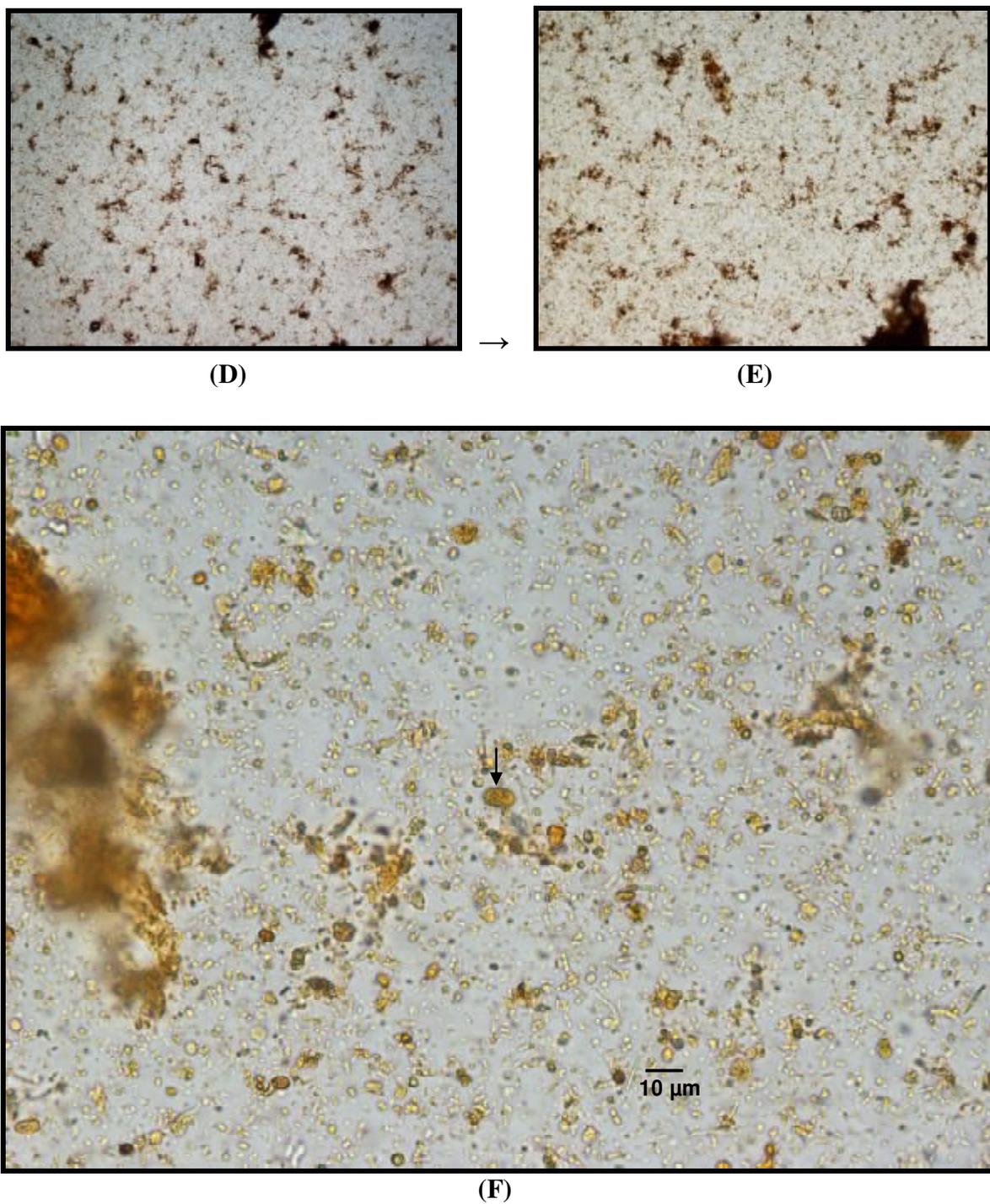


Fig. 23: Imagens obtidas pelo *Kit* comercial Paratest[®], com lâmina de microscopia: (D). Quatro vezes de aumento em lente objetiva; (E). Dez vezes de aumento em lente objetiva; e (F). Cisto de giárdia visto na mesma imagem, porém, com quarenta vezes de aumento em lente objetiva.

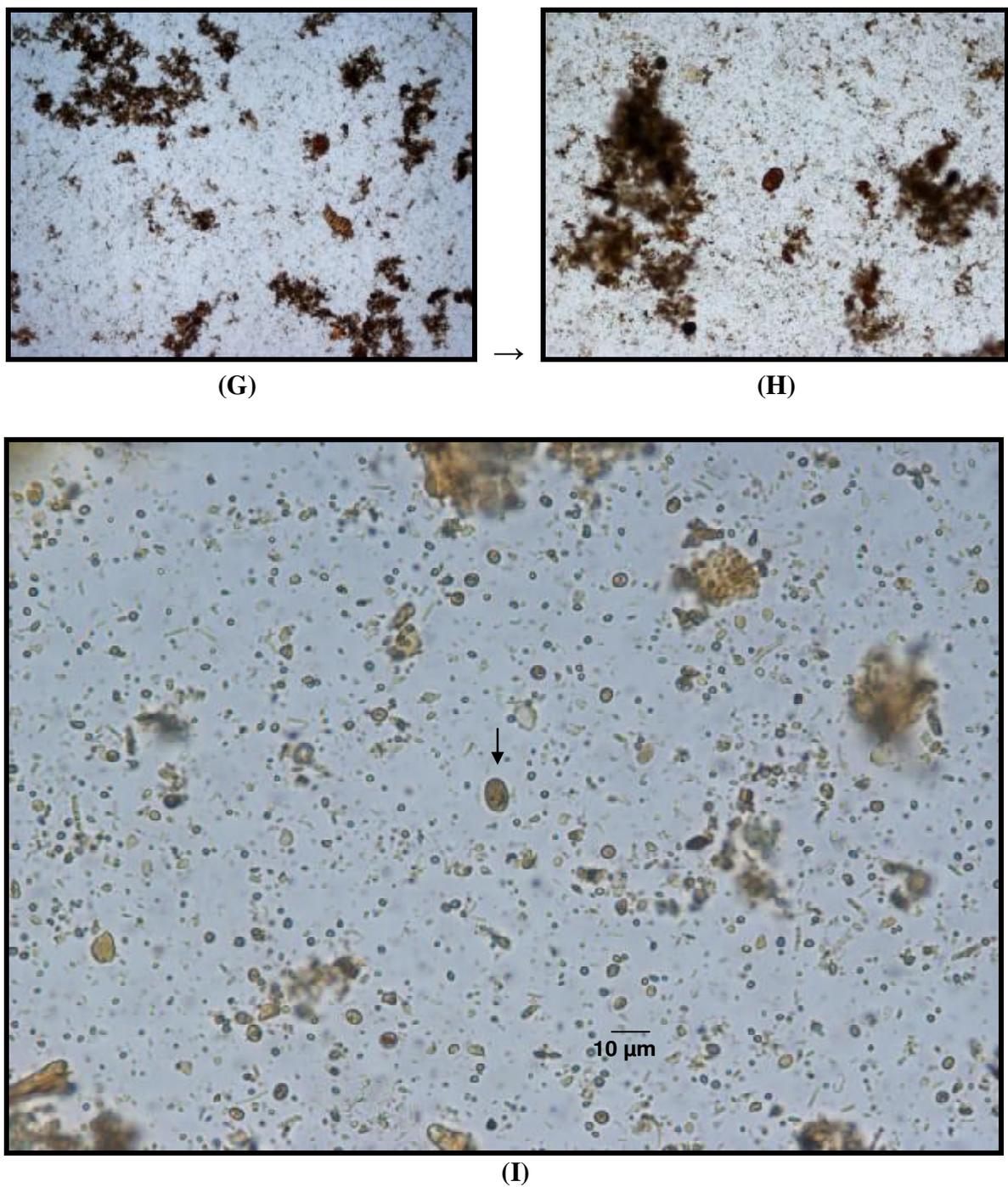


Fig. 23: Imagens obtidas pela técnica convencional de *TF-Test*, com lâmina de microscopia: **(G)**. Aumento de quatro vezes em lente objetiva; **(H)**. Aumento de dez vezes em lente objetiva; e **(I)**. Cisto de giárdia visto na mesma imagem, porém, com aumento de quarenta vezes em lente objetiva.

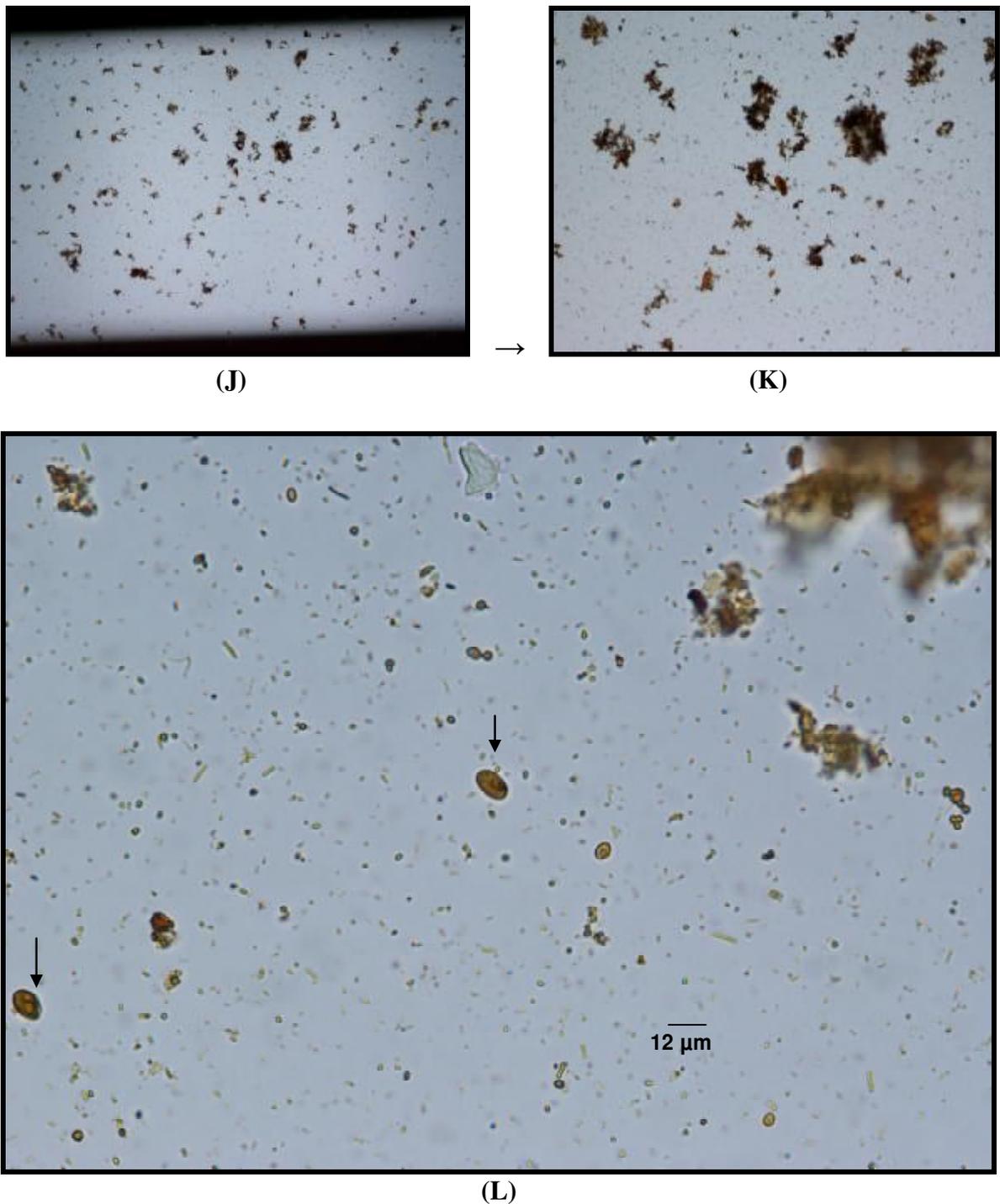
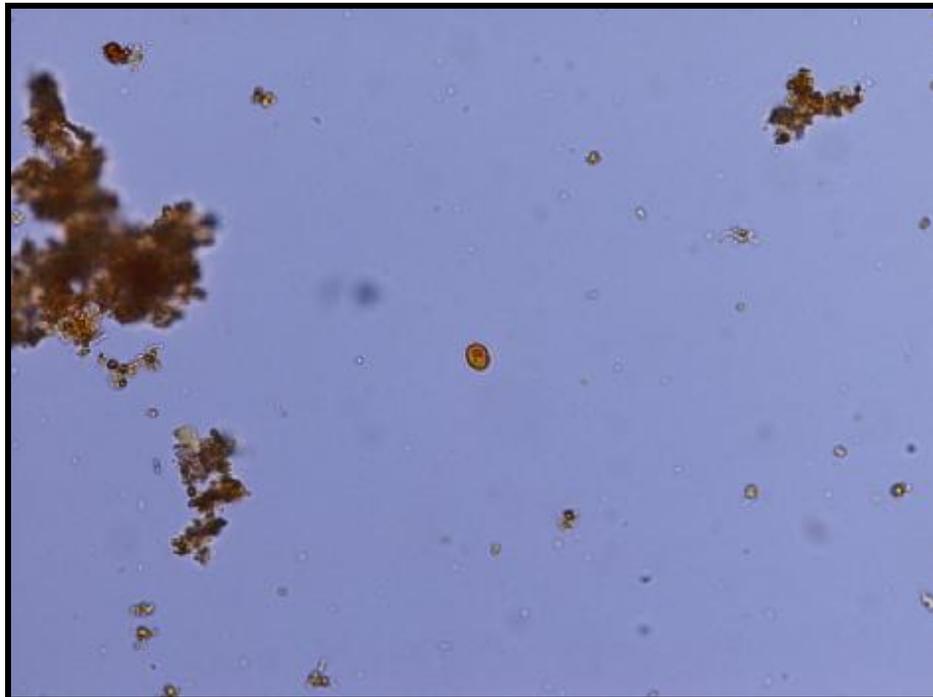


Fig. 23: Imagens obtidas pela técnica de *TF-Test* Modificada, com uso de lâmina tubular conectado à bomba peristáltica: (J). Aumento de quatro vezes em lente objetiva; (K). Aumento de dez vezes em lente objetiva; (L). Cistos de giárdia vistos na mesma imagem, porém, com aumento de quarenta vezes em lente objetiva.

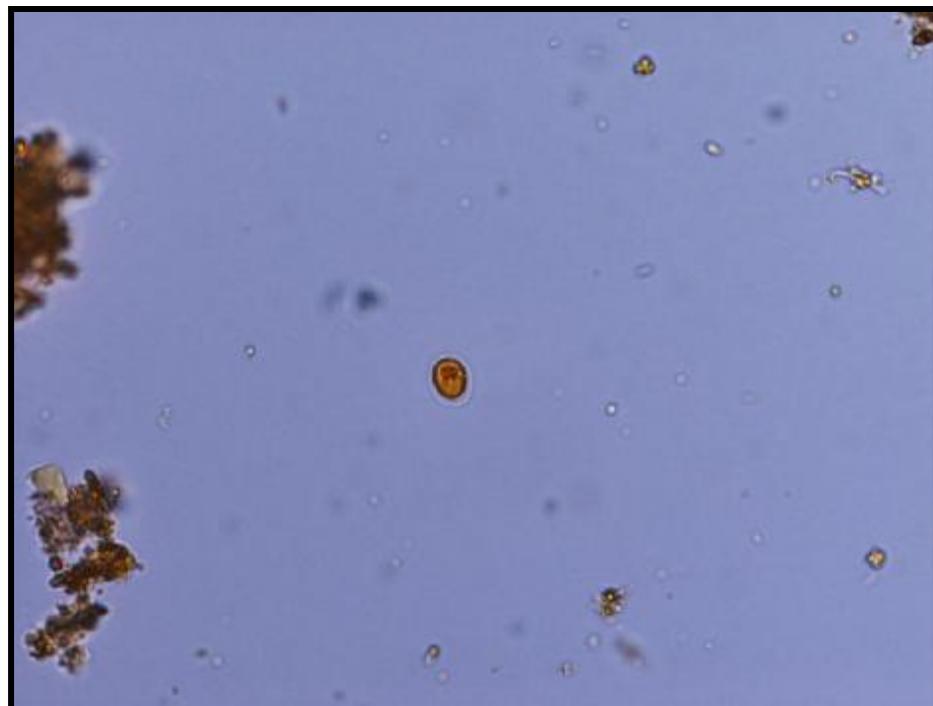
No tocante à solução clarificadora, as figuras 23 (I) e (L) ilustram uma diminuição de cerca de 70% de microimpurezas.

Protozoários intestinais, principalmente as pequenas amebas do trato digestório, apresentaram algumas vezes dificuldade em se corar com solução de Lugol, impossibilitando às vezes de serem detectados na técnica computacional. Na tentativa de contornar tal dificuldade, algumas alternativas foram tomadas, como por exemplo: a) utilização de lente objetiva com aumento de 60x, a seco; b) utilização de lente objetiva com aumento de 100x, em óleo de imersão; c) novas regulagens de condensador e diafragma de campo do microscópio; d) ajustes diferenciados de foco imagens para o microscópio (lente ocular vs. objetiva) e monitor de captura de imagens (câmera digital vs. monitor); e) melhorias adicionadas à técnica computacional de segmentação de imagens; e f) uso de lente objetiva com 40x de aumento.

As alternativas dos itens “a” e “b” acima não trouxeram melhoras. A lente objetiva de 60x de aumento apresentou qualidade semelhante de imagem da lente objetiva de 40x de aumento, na análise automática por computador. Nesta condição, somente a imagem do parasito veio a ganhar aumento de tamanho, quando exposta no monitor do computador [Fig.24, (A) e 24, (B)]. Esta diferença de tamanho de imagem do parasito não impediu o uso continuado da lente objetiva com aumento de 40x. Já o uso de lente objetiva de 100x de aumento, em óleo de imersão, foi invalidado por mostrar imagem com difração e considerável perda de definição [Fig.25]. Outras lentes objetivas com diferentes aumentos foram também avaliadas, porém, sem resultar em benefício esperado de boa qualidade de imagens de protozoários intestinais, similares às obtidas por lente objetiva de 40 vezes de aumento.



(A)



(B)

Fig. 24: (A). Cisto de *Iodamoeba butschlii* com aumento microscópico de 400 vezes; (B). Mesmo cisto, porém, com aumento microscópico de 600 vezes.



Fig.25: Cisto de *Giardia duodenalis* detectado através de lente objetiva de 100 vezes de aumento, em óleo de imersão.

Desta maneira, a lente objetiva de escolha para o sistema utilizado foi a acromática de 40 vezes de aumento, por identificar com exatidão todos os protozoários estudados, bem como, os helmintos, apesar de em algumas vezes perder a visão por inteira da imagem das larvas de nematelmintos do trato digestivo. Apesar desta lente ser simples e de grande uso em rotinas laboratoriais, foi capaz de corrigir as aberrações cromáticas das cores, favorecendo a técnica computacional de segmentação de imagens. A lente acromática de 10x de aumento contribuiu com maior rapidez na varredura da lâmina de microscopia, porém, não satisfaz a detecção de pequenos protozoários intestinais, principalmente os que apresentaram dimensões menores que 12 μm . A lente objetiva de escolha favoreceu com exatidão o levantamento da base de imagens, mostrando os contrastes das cores exigidos pela técnica de segmentação entre parasito, impurezas e o fundo dessas imagens, dando subsídios para o bom desempenho da técnica computacional.

Ademais, todas as espécies listadas foram coletadas com sucesso, em diversas regiões do Estado de São Paulo, vindo a favorecer a formação da base de imagens de parasitos intestinais criada para a execução do presente projeto.

IV.4 Técnica Computacional de Segmentação de Imagens

Com o propósito de aplicar uma técnica computacional adequada para a segmentação de imagens de diversas espécies de enteroparasitos, foram realizados estudo e avaliação preliminar de técnicas computacionais simplificadas de segmentação automática de imagens. Entretanto, estas técnicas de segmentação mais simplificadas demonstraram falhas, evidenciando que apenas o uso destas não era suficiente para solucionar o problema. Como exemplo de falhas, as figuras 27, **(B)** e 28, **(A)** mostram as imagens originais dos parasitos com os delineamentos automáticos realizados de forma incorreta. Esses delineamentos incorretos ocorreram, principalmente, quando o parasito apresentou algum tipo de impureza aderida em sua membrana externa, fato este visto com maior frequência em helmintos intestinais.

Devido aos problemas acima mencionados, outros operadores de imagens foram combinados em forma de *pipeline* de segmentação, com o objetivo de obter um delineamento superior que as técnicas mais simplificadas. Este modelo automático foi avaliado em relação à técnica de *TF-Test* Modificada, demonstrando que ainda muitas impurezas encontravam-se aderidas aos parasitos, proporcionando um delineamento incorreto. Foram efetuadas diferentes tentativas para se obter resultados bem discriminativos. Os melhores resultados foram obtidos com o desenvolvimento de *pipelines* específicos para estruturas de parasitos, entre cistos de protozoários e ovos de helmintos, e larvas de helmintos, e assim, cada imagem de entrada passou a ser processada em dois *pipelines*. Os resultados dos *pipelines* foram combinados de tal forma a obter uma única saída final, indicando entre parasito e não-parasito (impureza).

Para determinar a validade da técnica de segmentação automática com dois *pipelines*, foi implementado no computador um programa para o delineamento de estruturas parasitárias da base de imagens [Fig. 26]. Os resultados obtidos não foram como esperados, continuamos tentando melhorar a técnica computacional.



Fig. 26: Larva do parasito *Strongyloides stercoralis* detectada pela técnica computacional de segmentação de imagens, com o delineamento correto contornando o parasito na coloração vermelha. Aumento microscópico de 400 vezes.

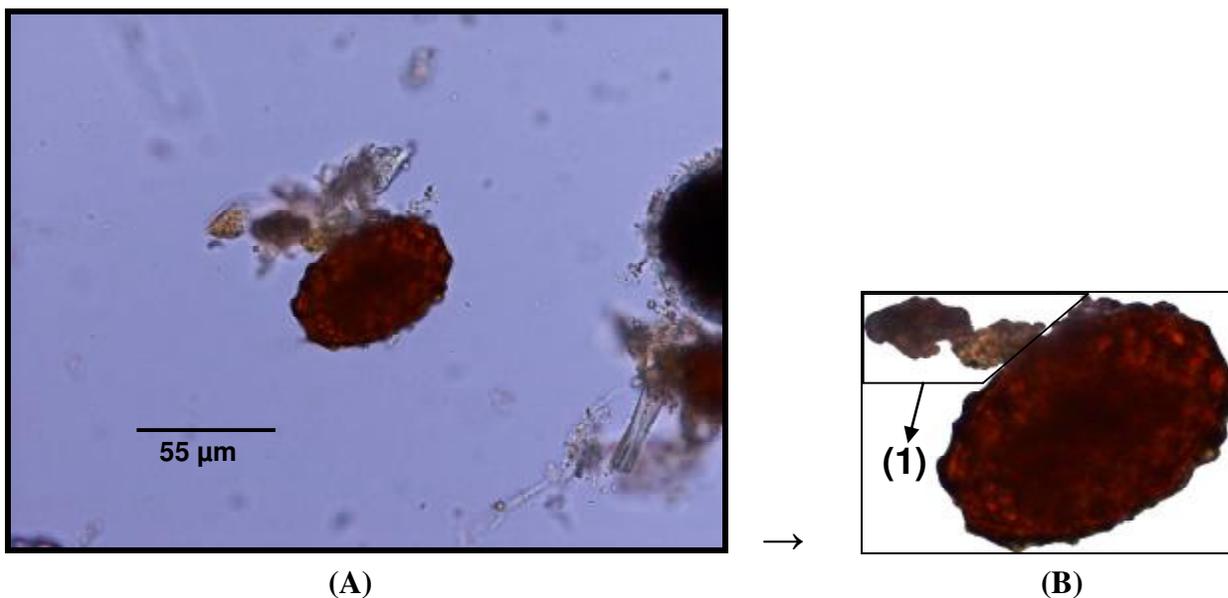


Fig. 27: (A). Imagem original de um ovo do parasito *Ascaris lumbricoides*, com aumento microscópico de 400 vezes; (B). mesma imagem com delineamento automático incorreto; e (B), (1). Impurezas aderidas ao ovo e delineadas incorretamente pelo computador.

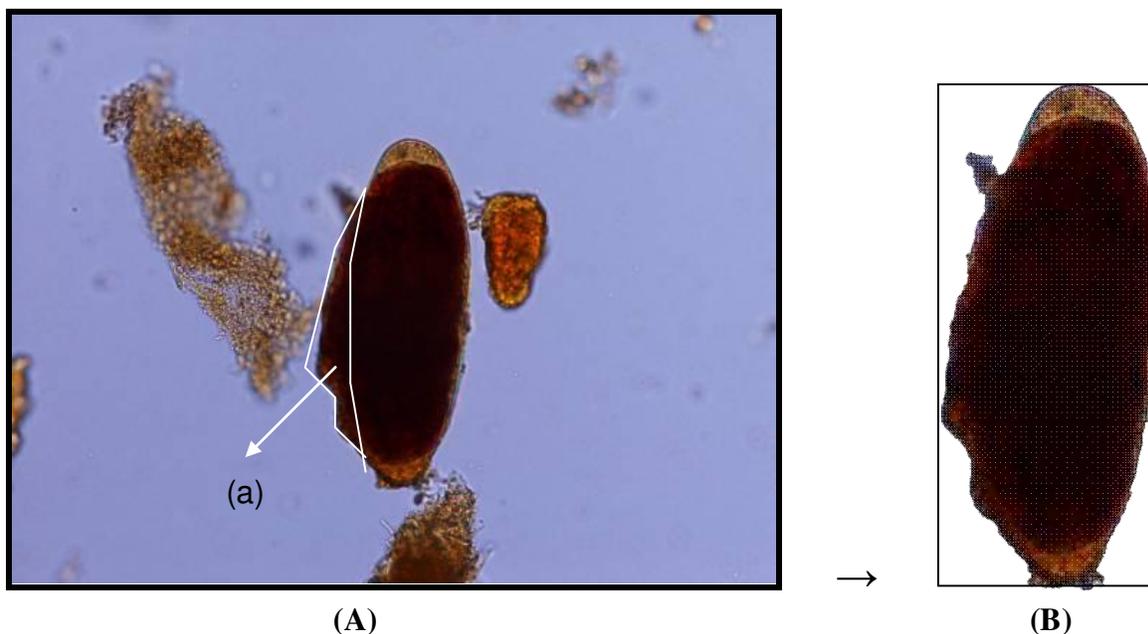


Fig. 28: **(A)**. Imagem original de um ovo do parasito *Schistosoma mansoni*, com aumento microscópico de 400 vezes; **(A).(a)**. Impurezas aderidas ao ovo, e com mesma coloração; **(B)**. mesma imagem do parasito com delineamento automático incorreto (impurezas aderidas).

Objetivando então conseguir progresso na técnica computacional, acrescentou-se a técnica computacional de IFT (*Image-Foresting Transform*) para o delineamento dos componentes, tendo como principal ferramenta a exploração maior da característica de forma elíptica do parasito. Basicamente, esta técnica detecta automaticamente a imagem original de interesse [Fig. 29, **(A)**], aplica sobre esta imagem uma elipse interna de coloração azul, [Fig. 29, **(B)**] e, para cada componente da imagem, uma elipse externa de coloração vermelha. A elipse interna corresponde a um marcador do objeto de interesse (parasito) e a externa do fundo de imagem e/ou impureza. Esta nova técnica de segmentação, na fase de delineamento de componentes, utiliza-se de uma área intermediária entre duas elipses como base na imagem considerada de interesse. Por outro lado, todos os componentes da imagem são enviados para um classificador, que os classifica como parasito [Fig. 29, **(C)**] ou impureza. Esta técnica computacional unifica e estende muitas técnicas de análise de imagens que, apesar de serem baseadas em conceitos semelhantes, são apresentadas como técnicas não relacionadas. Este procedimento técnico apresentou desempenho muito superior que as outras técnicas avaliadas, sendo assim, apresentada como a técnica computacional de melhor desempenho. Para isto, como já mencionado, foi desenvolvido um novo

pipeline especializado em delinear protozoários e ovos de helmintos [Fig. 8], e um novo *pipeline* para delinear larvas de helmintos [Fig. 9]. A figura 30 mostra a boa qualidade de imagem obtida pela técnica de IFT, na presença de parasito e fundo de imagem contendo impurezas. Este procedimento trouxe um avanço de cerca de 30%.

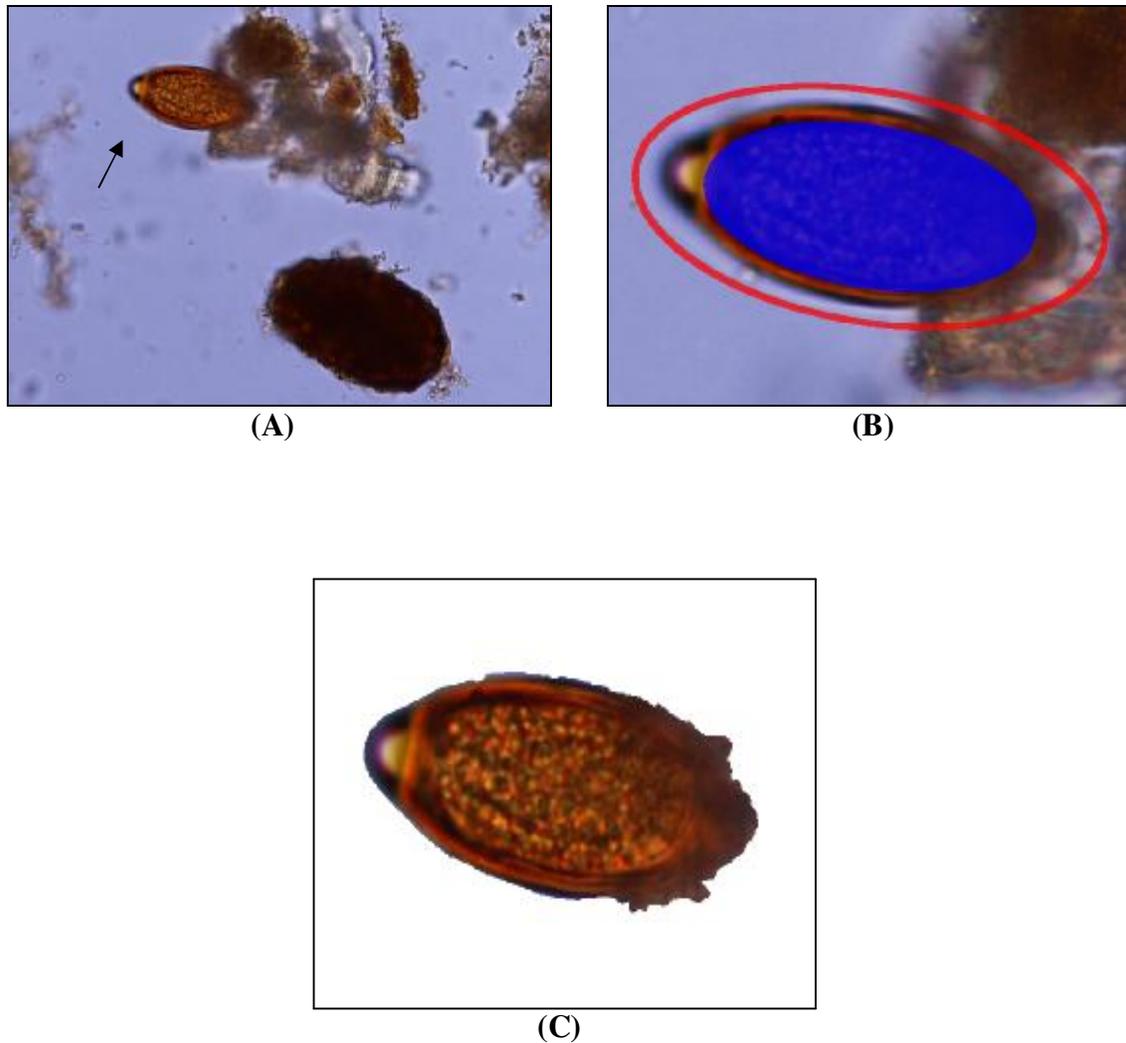


Fig. 29: Ovo do parasito *Trichuris trichiura* devidamente detectado pela técnica computacional (C), após ser submetido ao procedimento de delineamento de componentes proporcionado pela técnica de IFT.

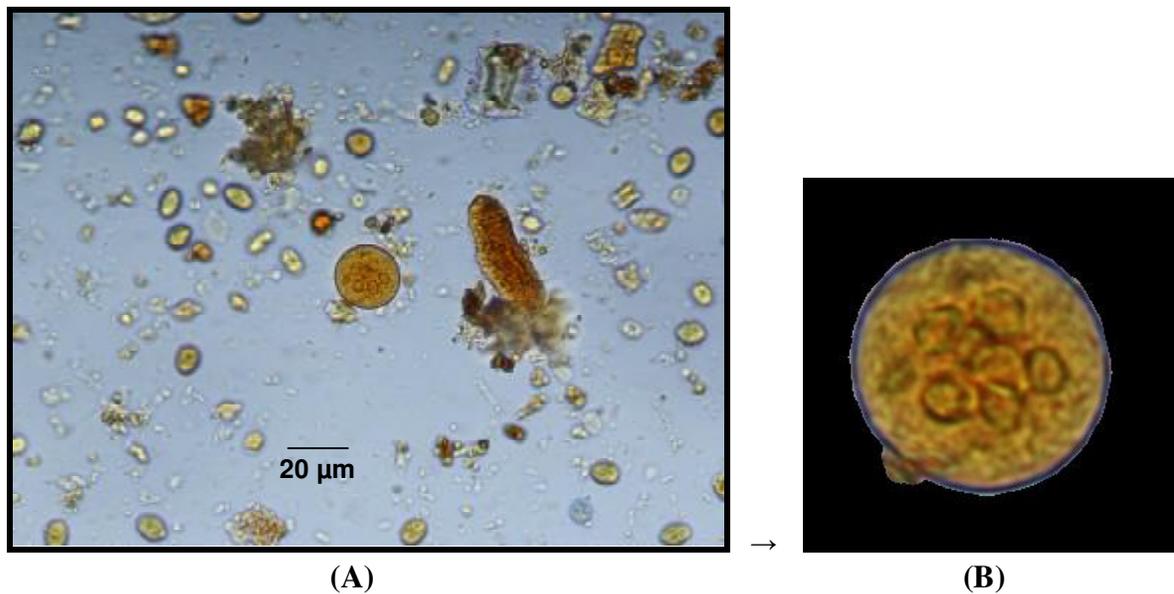


Fig. 30: (A). Imagem original de um cisto do parasito *Entamoeba coli*, com aumento microscópico de 400 vezes; (B). Mesma imagem delineada automática e corretamente pela máquina.

IV.5 Desempenho Diagnóstico da Técnica Computacional de Análise de Imagens (CIA)

A capacidade da técnica de segmentação de imagens em reconhecer estruturas parasitárias por meio de computador foi avaliada em comparação com à técnica de *TF-Test* Modificada, conforme os parâmetros médios de sensibilidade, especificidade, como apresentados na tabela 1. Um total de 800 imagens com 5.626 componentes foi estudado, tendo 1.126 imagens positivas para parasitos e 4.500 imagens para impurezas. Deste total, 50% dos componentes de cada classe foram utilizados para treinamento do classificador (projeto) e os demais 50% para teste do classificador. O processo todo é repetido 10 vezes com amostragens aleatórias de treinamento e teste, resultando em 10 medidas de falsos positivos, falsos negativos, verdadeiros negativos e verdadeiros positivos. Estas medidas foram utilizadas para calcular valores médios e desvios padrões de sensibilidade, especificidade, eficiência e coeficiente *Kapa*.

Tabela 1. Os parâmetros médios diagnósticos de sensibilidade, especificidade, e eficiência, assim como, o índice de concordância *Kapa* (κ) e sua classificação obtidos na avaliação da técnica computacional de análise de imagens, em relação à técnica de *TF-Test* Modificada, no estudo de 800 imagens com 5.626 componentes (parasitos/impurezas).

Sensibilidade	Especificidade	Eficiência	Índice κ	Classificação
95,3 %	96,4 %	96,2 %	0,88*	Concordância
(536)	(2.169)	(2.706)	(2.475)	<i>Quase Perfeita</i>

* (P<0,05)

Tabela 2. Foi observado que a técnica de *CIA* apresenta resultados reprodutíveis (desvios padrões baixos), pois, os valores obtidos em 10 diferentes ocasiões não geraram diferenças significativas nas medidas, de acordo com validação da técnica de segmentação de imagens.

	Índice <i>Kapa</i> (κ)	Sensibilidade	Especificidade	Eficiência
1	0,886827	0,959147	0,963111	0,962318
2	0,888391	0,953819	0,965333	0,963029
3	0,877297	0,952043	0,960889	0,959118
4	0,893874	0,946714	0,969778	0,965162
5	0,878077	0,960924	0,958667	0,959118
6	0,895161	0,950266	0,969333	0,965517
7	0,895904	0,946714	0,970667	0,965873
8	0,881413	0,953819	0,962222	0,96054
9	0,879892	0,959147	0,96	0,959829
10	0,882255	0,952043	0,963111	0,960896
Valor Médio	0,885909	0,953464	0,964311	0,96214
Desvio Padrão	0,007159	0,00501	0,004294	0,002646

V. *DISCUSSÃO*

As parasitoses intestinais são altamente prevalentes no mundo, como mencionado anteriormente, constituindo sério problema de Saúde Pública e, desta maneira, e o desenvolvimento de técnicas parasitológicas práticas e de alta eficiência tornaram-se necessárias. Os nossos dados demonstram que contribuímos substancialmente neste aspecto ao abordarmos a técnica de *CIA* para a detecção de parasitos, etapa de relevância para o fornecimento de subsídios para o desenvolvimento futuro de um sistema automatizado para o exame parasitológico de fezes.

As fezes, diferindo de outros tipos de material clínico, quase a sua totalidade é descartada para a evidenciação de estruturas parasitárias. Para desenvolvimento de técnicas cada vez mais sensíveis e sofisticadas, o material clínico, assim como, regentes, exigem que estejam isentos de contaminações, pois, traços de impurezas líquidas ou sólidas conduzem a erros grandes no diagnóstico. Assim, o exame parasitológico de fezes vem até hoje enfrentando obstáculos para se efetuar a remoção de detritos para a visualização de estruturas parasitárias. O exame parasitológico nas décadas passadas não apresentava problema em virtude das infecções terem sido em elevada intensidade. Nas últimas décadas, todavia, o exame de fezes vem apresentando falhas diagnósticas, por conta da diminuição na intensidade de infecção, fornecendo freqüentemente resultados negativos falsos. Ademais, o desenvolvimento de um sistema de automatização vem contornar o problema de exaustão, repercutindo em falha diagnóstica, para a execução de um grande número de exames.

No presente trabalho, estudos foram realizados nos diferentes aspectos a seguir discriminados, para propiciar o desenvolvimento da técnica computacional:

- a) comparação de técnicas parasitológicas convencionais, para selecionar aquela que forneça estruturas parasitárias com poucas microimpurezas;
- b) desenvolvimento de corante e solução clarificadora para promover maior evidenciação de estruturas parasitárias;
- c) padronização para a operação de microscópio óptico adaptado ao sistema de bomba peristáltica com lâmina tubular;
- d) controle de qualidade para coleta de amostras fecais e equipamentos;
- e) obtenção de banco de imagens parasitárias;
- f) desenvolvimento de técnicas computacionais para análise de imagens; e

g) avaliação da técnica computacional.

No desenvolvimento da técnica de *CIA*, três técnicas parasitológicas convencionais foram estudadas e a de *TF-Test* foi a que apresentou menor proporção de microimpurezas. As figuras 23, (A) a (I) são exemplos do emprego de técnicas parasitológicas convencionais ou *kits* comerciais, mostrando grande número de microimpurezas, prejudicando o sistema computacional. A técnica de *TF-Test* tem dupla filtragem (200 µm e 400 µm) e apesar de apresentar poucas impurezas fecais em relação às demais técnicas convencionais e outros *kits* comerciais^{5,31}, ao ser acoplada à técnica de *CIA* forneceu resultados pouco sensíveis.

A condição primordial para o desenvolvimento de um sistema para a técnica de *CIA* é, como mencionado, dispor de estruturas parasitárias em boas condições, além de reduzido número de microimpurezas presentes. Assim, a técnica de *TF-Test* foi aprimorada para reduzir ainda mais o teor de microimpurezas, passando a ser denominada de *TF-Test* Modificada (técnica parasitológica + bomba peristáltica). Após o aprimoramento, esta técnica apresentou as seguintes características: a) enriquecimento de estruturas parasitárias, pois é processada cerca de 5g de amostra representativa de fezes, diferindo das demais técnicas e *kits* parasitológicos, onde a coleta é de aproximadamente 1g de fezes; b) realização de leituras de um grande volume da suspensão de material fecal processado (180 µl), e não apenas de 20 µl ou 30 µl como é utilizado rotineiramente em técnicas convencionais e *kits* comerciais; e c) apresentação de baixo teor de microimpurezas, diferindo de impurezas relativamente maiores presentes em suspensão fecal de outras técnicas ou *kits*. O emprego desta técnica reduziu as chances de erro de detecção parasitária, sobretudo, por permitir o resgate de toda a suspensão fecal processada, que equivale a aproximadamente 1.800 µl. Todavia, convém comentar que, deste grande volume, a bomba resgata cerca de 600 µl por vez, para se fazer três leituras são 180 µl (60 µl por leitura), correspondendo a 7 vezes mais do que praticado usualmente por técnicas convencionais e *kits* comerciais. A técnica de *TF-Test* Modificada contribuiu para reduzir cerca de 70% de microimpurezas [Fig. 23, (L)].

O uso da nova técnica parasitológica proporcionou assim aumento da sensibilidade na detecção parasitária, principalmente para casos de infecções médias e baixas, visto com frequência principalmente em se tratando de parasitoses por protozoários [Fig. 23, (J) a (L)].

A lâmina tubular [Fig. 13, (A), (B) e (C)] usada neste sistema fornece imagens tridimensionais, diferindo consideravelmente daquelas da lâmina de microscopia óptica. Esta lâmina tubular apresenta: profundidade, pois, tanto as estruturas parasitárias como as microimpurezas são vistas tendo volumes próprios contra o fundo da lâmina. No entanto, o oposto foi observado com o emprego de lâminas de microscopia, resultante do processamento laboratorial de técnicas convencionais e *kits* comerciais [Fig. 23, (A) a (I)].

Contudo, apesar das vantagens da técnica parasitológica escolhida, um problema que tentaremos solucionar posteriormente é o entupimento das tubulações plásticas da bomba peristáltica. Apesar da recomendação para se fazer o uso de um detergente (*Enzymatic Detergent – DiaSys Corporation*) por fabricante, em nossos estudos, demos preferência para o uso da solução clarificadora, a base de hidróxido de potássio a 10%, que é indicada pela equipe de Engenharia de Manutenção da UNICAMP, para a limpeza de tubulações plásticas de equipamentos de outras áreas de um laboratório de Análises Clínicas (p.ex., Hematologia). Em um período de 2 anos, mais de três entupimentos ocorreram, o que consideramos ser demasiado. Vale ressaltar que, este mesmo problema de entupimento ocorreu num trabalho de avaliação da funcionalidade de um equipamento similar, realizado no Laboratório de Parasitologia, do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Provavelmente, os entupimentos do mencionado equipamento podem estar relacionados, em maior ou menor frequência, com a origem do material fecal, que pode variar de um paciente para o outro, dependendo do hábito alimentar. Em geral, observamos que, após a última sucção (3^a) da suspensão de sedimento fecal processada, feita pela bomba peristáltica para a leitura, os entupimentos eram freqüentes. Os entupimentos podem ser explicados, no nosso caso, em decorrência da sedimentação de partículas durante a espera para a chegada da 3^a sucção. Uma alternativa para solucionar este problema seria o uso constante de um agitador constante. A solução clarificadora para o sistema proposto proporcionou uma desobstrução parcial das tubulações plásticas da bomba peristáltica.

Sem dúvida, esta bomba peristáltica deverá ser melhorada no sentido de se adaptar às nossas condições de trabalho, onde se faz o uso de solução clarificadora e um corante diferente daquele normalmente preconizado. Ademais, a bomba peristáltica fazia parte original para o uso do *kit Parasep*[®] (*DiaSys Corporation*), em um sistema fechado, portanto com o uso de um protocolo bem diverso.

Nas técnicas convencionais, ovos e larvas de helmintos são detectados facilmente sem o uso de coloração, entretanto, os vários estágios de protozoários são somente detectados com uso de diferentes colorações, pois sem o uso de coloração, algumas organelas de protozoários são imperceptíveis, como exemplo, núcleos de cistos. Em nosso estudo de técnica computacional, o corante empregado para técnicas convencionais para protozoários e helmintos não forneceram resultados satisfatórios. Para a nova técnica, foi imprescindível coloração forte para a visualização de estruturas parasitárias, a fim de diferenciar com nitidez microimpurezas de fundo de imagens, além de outros requisitos como a forma e textura. Há vários tipos de corantes descritos na literatura para utilização em técnicas parasitológicas, porém, devido às incompatibilidades encontradas entre as soluções empregadas no nosso projeto, demos preferência ao corante à base de Lugol. Ao aplicarmos a solução de Lugol comercial na lâmina tubular, os enteroparasitos adquiriram colorações fracas [Fig. 14, (A), (B) e (C)], inapropriadas para técnica computacional. O novo corante foi desenvolvido à base de iodo, tendo alterações na sua concentração e na sua formulação, basicamente constituído de: iodo (I_2) e iodeto de potássio (KI), em meio apropriado de pH. Este novo corante ocasionou a coloração homogênea dos enteroparasitos, o que até então não ocorria com o corante comercial. O uso deste novo corante fez com os parasitos adquirissem colorações fortes, preferencial da técnica computacional, as vezes mais fraco, as vezes mais forte, sobretudo em relação ao tempo de exposição destes com o corante.

Os enteroparasitos apresentam alta variabilidade de coloração. Foi feito então um estudo de padronização no tempo de coloração de diferentes estruturas parasitárias a fim de se obter uma homogeneidade na intensidade da coloração destas estruturas, facilitando a detecção posterior pela técnica computacional. O corante foi adicionado ao sedimento fecal e, ao invés de se realizarem 3 leituras na lâmina tubular de imediato, efetuamos incubação de no mínimo 15 minutos até 2 horas. Algumas espécies parasitárias quando expostas ao corante com um tempo inferior a 15 minutos, como exemplo, cistos de giárdia, prejudicaram a detecção automática realizada pela técnica computacional. Da mesma forma, procedeu-se com o tempo superior a 2 horas, onde alguns ovos de helmintos, *Taenia* spp., por exemplo, prejudicaram também a detecção realizada pela técnica computacional [Fig. 18]. Os ovos de *Taenia* spp. foram estruturas que mais fortemente coraram, principalmente na sua membrana externa irregular, estriada, formada por prismas truncados, denominados de embrióforo. O mecanismo de coloração é

complexo e depende muito da natureza química da estrutura parasitária e do corante. Contudo, sabe-se que o Lugol age mediante a sua carga eletronegativa e assim, sua afinidade é com estruturas eletropositivas.

Foi ainda padronizado o volume ótimo para o corante a ser adicionado ao sedimento fecal. Na proporção de 1:1 (sedimento fecal : corante), os resultados foram satisfatórios [Fig.15, (B), (C), e (F)], sendo que em demais proporções os dados foram inadequados.

Na nossa experiência, larvas e ovos de helmintos coraram rapidamente e intensamente, em comparação a cistos de protozoários. Entretanto, há uma exceção com o protozoário *Entamoeba coli* [Fig.15, (E)], que apresentou as mesmas características de coloração de helmintos. Vale ressaltar que, as fortes colorações apresentadas pelos diversos gêneros de parasitos colaboraram para o desenvolvimento e validação da técnica computacional [Fig. 15, (A) a (F)].

Alguns cistos de protozoários evidenciaram diferentes maneiras de coloração. Por exemplo, cistos de giárdia mostraram uma excessiva coloração, com um período superior a 2 horas, impossibilitando a técnica computacional de visualizar suas organelas, tais como: fibrilas, axóstilo, núcleos, etc. [Fig.16], presentes na região citoplasmática. Convém comentar que, coloração excessiva de organismos não se prestaram para a técnica computacional. Alguns autores sugerem que a ocorrência de maior ou menor coloração destes cistos relaciona-se com a resistência e a patogenicidade da espécie, ou ainda com o seu grupo genotípico ^{1,11}. Independentemente do comentário anterior e, principalmente, levando em consideração às necessidades da técnica computacional, foi padronizado um tempo mínimo 15 minutos e máximo de 2 horas de exposição dos cistos de giárdia à nova solução corante.

Os cistos de amebas apresentam intensidades de colorações diferentes, dependendo da espécie em questão. Provavelmente, a composição química das estruturas de membranas císticas, ao lado de estruturas presentes em regiões citoplasmáticas, como exemplo, glicogênio, estruturas nucleares de cromatina periférica, cariossomo ou endossomo, etc., contribui para a diferenciação de coloração de espécies. Em período superior a 2 horas de exposição ao corante, estes cistos não apresentaram modificações na coloração, sendo adequados para a técnica computacional. Nesta condição, todas as espécies de amebas intestinais foram detectadas, por apresentarem fortes traços nas suas membranas, como também, nos núcleos presentes na região citoplasmática [Fig. 15, (E)]. Contudo, as amebas *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* e *Endolimax nana* coraram menos do que as demais amebas do trato intestinal.

As fezes são constituídas de vários elementos do trânsito intestinal, neste estudo denominados de impurezas ou microimpurezas, destacando-se: restos alimentares não digeridos; restos alimentares digeridos; células animais e vegetais; muco e outras secreções do trato intestinal; e microrganismos. Após o processamento da amostra fecal na técnica de *TF-Test* Modificada, o sedimento corado mostra ainda a presença de microimpurezas, que podem falsear o resultado diagnóstico obtido em técnica computacional. Os resultados positivos falsos decorrem da presença de elementos denominados de pseudo-parasitas ou pseudo-simbiontes. Por outro lado, resultados negativos falsos ocorrem na análise computacional, como por exemplo com ovos de helmintos como: *Taenia* spp., *Ascaris lumbricoides*, Ancilostomatídeos e *Schistosoma mansoni*, por apresentarem substâncias pegajosas em suas membranas externas de revestimento, fazendo-os aderir às impurezas, sendo reconhecido pelo computador como sendo um componente não parasitário. Um outro fator observado, que leva à interpretação de falso resultado negativo, é a presença de um envoltório transparente, apesar de pouco freqüente, encontrado em ovos de *Taenia* spp.[Fig. 32 - anexo]. Este envoltório dificultou a detecção automática de parasitos. Vale ressaltar que, alguns autores sugerem ser este envoltório resultante do momento da expulsão de forma ativa das proglotes, através do ânus do hospedeiro (paciente), onde essas estruturas são espremidas de tal forma que tendem a expulsar parte do conteúdo uterino juntamente com o ovo^{1,11}.

As figuras 27 (A) e 28 (A) ilustram o problema da interferência de microimpurezas na técnica computacional. Visando solucionar o problema das impurezas presentes no sedimento corado de amostras fecais processadas, colocamos em prática algumas tentativas. Inicialmente, tentamos aprimorar a técnica computacional e introduzir outros melhoramentos no protocolo da técnica parasitológica de *TF-Test* Modificado. Todavia, essas tentativas não lograram resultados esperados. Desta forma, amparando-se na técnica já descrita para eliminação de impurezas mediante uma digestão alcalina, adaptamos o processo de tal forma que as microimpurezas desaparecessem sem afetar a morfologia do parasito. Para isto, foi empregada uma solução-mãe de hidróxido de potássio (KOH) a 10%, denominada neste projeto de “solução clarificadora”. Esta solução desintegrou e diminuiu a coloração de grande parte das impurezas aderidas aos parasitos, mantendo, porém, a coloração castanha original do corante no parasito [Fig. 20, (A)]. Este procedimento contribuiu para a redução de resultados negativos falsos na detecção

automática de enteroparasitos. Vale ressaltar que, a menor diferença de cor existente entre parasito e impureza, imperceptível à visão humana, foi perceptível para o computador e fundamental para o aumento de detecção parasitária.

O uso da solução clarificadora, após a coloração com o novo corante, e as melhorias aplicadas no protocolo da técnica de *TF-Test* Modificado ocasionaram a alta precisão na detecção parasitária por computador, de modo a ter acréscimo de cerca de 17% na sensibilidade diagnóstica por computador.

As regulagens convencionais de microscopia para a visualização de estruturas parasitárias, sem duvida, são diferenciadas quando comparadas com aquelas empregadas no programa computacional. O nosso estudo evidenciou que a iluminação necessária para a visualização do parasito por microscópio óptico não era suficiente para a técnica computacional de análises de imagens. Assim, visando beneficiar a técnica computacional, introduzimos vários artifícios tais como: aumentar a intensidade da coloração de parasitos, aplicar diferentes regulagens de foco de imagem, além de aumentar a intensidade da luz incidente na lâmina tubular.

Para a obtenção de base de imagens parasitárias, foi necessária a padronização de duas regulagens de foco de imagem por parasito detectado, sendo, a primeira no microscópio, adequando para a visão humana, e a segunda no computador. Afora estas regulagens, uma terceira regulagem de foco de imagem foi padronizada para o sistema computacional. Estruturas parasitárias focalizadas na primeira regulagem do microscópio, o computador em paralelo visualizava somente a região externa, como exemplo, a membrana cística de um protozoário. Para a visualização de uma região mais profunda de um parasito, como organelas presentes no citoplasma, uma segunda regulagem foi necessária no computador. Isto ocorre porque, as lentes objetivas do microscópio trabalham com uma profundidade de foco, variando, em média, 0,5 μm . Nestas condições, a técnica computacional foi fortemente prejudicada, principalmente nas suas fases de delineamento e reconhecimento de imagens, por apresentar alto percentual de resultados negativos falsos na identificação de parasitos. Em vista disto, um novo procedimento de regulagem de foco de imagem foi definido, em nível intermediário entre a visualização da superfície externa e mais profunda do parasito, sobretudo dando destaque ao contorno externo do organismo, diminuindo, desta forma, o aparecimento de resultados negativos falsos.

Ademais, no tocante à iluminação do microscópio, foram ajustadas a regulagem da intensidade de luz e a abertura do diafragma de campo. Essas novas mudanças contribuíram para o

desenvolvimento da técnica computacional, pois ocasionaram maior quantidade de luminosidade à imagem detectada no monitor, além de proporcionar expressivo aumento no contraste de coloração entre parasitos, impurezas fecais e fundo das imagens.

Várias lentes objetivas de microscopia, com diferentes aumentos, foram por nós avaliadas, porém, foi a lente objetiva de 40 vezes de aumento que obteve a melhor definição de imagens. Esta lente evidenciou o parasito com boa resolução de imagem, principalmente os de pequena dimensão, como os protozoários de tamanhos reduzidos, inferiores a 12 μm [Fig. 19]. A mencionada lente apresentou os parasitos com exatidão, mostrando com nitidez os contornos externos e as organelas citoplasmáticas, tanto para cistos de protozoários, como para a morfologia das estruturas de platelmintos e nematelmintos intestinais [Fig. 15, (A) a (F)]. Todavia, esta lente faz com que o campo de visão do monitor não ultrapasse a 300 μm de comprimento horizontal, por 225 μm de comprimento vertical. Este campo de visão é perfeito para o processamento automático das imagens de grande parte de espécies parasitárias, porém, insuficiente para a detecção automática por inteira de alguns nematelmintos parasitos. Por exemplo, os nossos achados demonstraram que este campo de visão foi insuficiente para acomodar por inteiro algumas larvas de nematóides, como as rabditóides de *Strongyloides stercoralis*, que podem variar os seus comprimentos de 200 μm – 400 μm , por 15 μm – 20 μm de largura [Fig. 31 – anexo]. Desta forma, muitas imagens adquiridas acabaram ficando com partes destas larvas fora da visão do monitor do computador, sobretudo para as larvas detectadas em comprimento vertical ao monitor. Este fato, contudo, não ocorreu na visão das lentes ocular mais objetiva do microscópio, por este conjunto de lentes possuir maior campo de visão, quando comparado ao campo de visão do computador, ou câmera de vídeo, formado por lente objetiva do microscópio e câmera digital. Entretanto, para o desenvolvimento da técnica computacional, este assunto passou a não ser relevante, devido ao fato de larvas conterem, em sua porção anterior, mediana e posterior, órgãos característicos de identificação, como exemplo: vestíbulo bucal; esôfago (p.ex., rabditóide); primórdio genital; poro anal; e terminação caudal. Há ainda a considerar, apesar da mencionada perda de campo de visão do monitor, outras características morfológicas apresentadas pelas referidas larvas, compensando a técnica computacional, como: boa simetria; largura quase que definida; e membrana externa fortemente marcada pelo novo corante.

Apesar das vantagens oferecidas pela lente objetiva com aumento de 40 vezes, há de se considerar que, em um estudo futuro, a utilização da lente objetiva de 60 vezes de aumento para a

detecção de esporozoários intestinais deverá ser por nós estudada, principalmente, levando em consideração a pequena dimensão apresentada por este agrupamento de protozoários.

Visando atingir um alto nível de desempenho na detecção de parasitos, um rigoroso controle de qualidade (CQ) foi instituído em várias etapas do desenvolvimento do projeto. O emprego do CQ foi de grande valia à coleta, processamento e triagem das espécies parasitárias. Esta fase de trabalho foi considerada como de controle de qualidade externo (CQE). Foi fundamental para esta fase a escolha correta de técnica parasitológica, pois, mediante esta técnica obteve-se a identificação segura e correta de enteroparasitos. Já, o controle de qualidade interno (CQI) correspondeu ao controle praticado nos espaços de pesquisa da UNICAMP, mais precisamente no Laboratório de Parasitologia, do Hospital de Clínicas, e na sala nº 44, do Instituto de Computação. Sem o emprego deste controle, o projeto poderia também ser impraticável por causa do uso incorreto de equipamentos e reagentes. Como exemplo deste controle, podemos citar: a manutenção preventiva constante das tubulações plásticas da bomba peristáltica, visando evitar entupimentos; avaliações de todos os lotes produzidos de reagentes; e manutenção constante do microscópio óptico. Uma série de problemas pôde ser evitada e o projeto seguiu o seu curso normal com um alto nível de desempenho. Assim observaram-se que: os procedimentos técnicos, segundo o protocolo operacional de controle de qualidade foram essenciais para os nossos objetivos propostos, evitando perdas pequenas de amostras fecais, não ultrapassando a 8%.

Para o desenvolvimento da base de imagens e validação da técnica de *CIA*, um total de 800 imagens com 5.626 componentes foi estudado, entre estruturas parasitárias e não parasitárias, sendo que 1.126 estruturas corresponderam a 16 espécies parasitárias. Estes valores superaram a expectativa da proposta inicial deste trabalho. Cada espécie parasitária contou com suas estruturas em diversas fases biológicas, que consideramos como sendo suficiente para a validação da nova técnica.

A técnica de *CIA* nada mais é do que um procedimento de particionar imagens, ou seja, uma técnica de segmentação de imagens, incluindo regiões de importância para uma devida aplicação. Nesta técnica, duas tarefas estão fortemente acopladas, representadas por técnicas de delineamento de componentes e a de reconhecimento de padrões. Várias são as técnicas simplificadas de segmentação de imagens disponíveis para a aplicação no computador, contudo, os nossos estudos demonstraram que essas técnicas foram insuficientes à aplicação no nosso projeto. Algumas dessas técnicas foram por nós avaliadas, demonstrando falhas nas fases de

delineamento e também de reconhecimento [Fig. 27, **(B)** e Fig. 28,**(B)**], pois, realizaram delineamentos incorretos das estruturas dos parasitos, sobretudo quando estes apresentavam impurezas aderidas em suas membranas externas, como mencionado anteriormente. No entanto, a utilização da técnica de IFT - *Image-Foresting Transform*, recentemente publicada¹⁵, para a implementação e avaliação de operadores de imagens, veio resolver parte do problema de delineamento das estruturas parasitárias [Fig. 30, **(B)**], principalmente, quando a técnica de segmentação de imagens foi apresentada em forma de *pipelines*. Todavia, há de se ressaltar que, para a obtenção de eficiência da técnica computacional, foram necessários os estudos anteriores de: melhoramento do protocolo de execução da técnica de *TF-Test* Modificada; calibração do uso de microscópio acoplado ao sistema de monitor do computador; desenvolvimento de uma nova solução corante; e introdução de uma nova solução clarificadora. Sem estas melhorias, por melhor que seja a técnica de *CIA*, o projeto não poderia ser concluído. O trabalho aqui desenvolvido exigiu a colaboração de pesquisadores de diferentes áreas de conhecimento.

Ainda que o delineamento de componentes tivesse obtido eficiência com a implantação da técnica computacional de IFT, esta técnica, no transcorrer do projeto, teve de ser aperfeiçoada, visando melhorar a sua aplicação. Por exemplo, este aperfeiçoamento trouxe o uso da forma elíptica para a detecção automática de cistos de protozoários, ovos de helmintos e larvas de helmintos. Isto resultou em um avanço considerável para o desempenho da técnica de *CIA*, repercutindo para a boa qualidade de delineamento de componentes, sobretudo, contribuindo para discriminação de parasitos, de fundo das imagens e de microimpurezas [Fig. 30, **(B)**].

O desempenho da técnica computacional de análise de imagens foi avaliado estatisticamente, em relação à técnica de referência de *TF-Test* Modificada. Para isto, foram determinados os parâmetros diagnósticos em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência, além do índice de concordância *Kapa* (*k*) e sua classificação. A técnica computacional apresentou alta sensibilidade de 95,3% (536/563) [Tab. 1], sensibilidade esta com perspectiva de ser muito acima da técnica de *TF-Test* Modificada, com aprimoramentos futuros que pretendemos introduzidos. A técnica de *CIA* apresentou também elevadas especificidade e eficiência de detecção parasitária de 96,4% (2.169/2.250) e de 96,2% (2.706/2.813), respectivamente [Tab. 1]. Os dados aqui obtidos reforçam a onal, em virtude da alta concordância de resultados em relação à técnica de *TF-Test* Modificada, expressa em termos de índice *kapa* (κ), de 0,88 [(2.475/2.813) (P<0,05)], sendo categorizada como *Quase Perfeita*. A nova técnica demonstrou ser reprodutível, sem

variação nos resultados quando as imagens parasitárias foram testadas em 10 diferentes ocasiões [Tab. 2]. Levando em consideração que técnicas parasitológicas convencionais e *kits* comerciais apresentam sensibilidades que variam de 30,2% a 77,8%^{3,4,5,18}, o atual estudo demonstra um grande avanço no diagnóstico parasitológico de fezes, de repercussão na área de Saúde Pública.

Por último, visando prosseguir ao projeto maior sobre análise de imagens de parasitos intestinais do homem, demos início a uma nova etapa de trabalho no mês de agosto de 2007, abordando o estudo da análise automatizada de parasitos intestinais do homem (Proj. FAPESP – nº 03/14096-8). Este estudo deverá se estender até o primeiro semestre do ano de 2009. Para a sua plena realização, um sistema foi proposto constituído por técnica parasitológica de *TF-Test* Modificada e um equipamento denominado de *Coolscope*[®] (Nikon,USA) [Fig. 33, (A) e (B) - Anexo]. Este equipamento contém internamente, em um compartimento fechado: platina motorizada, microscópio óptico e câmera digital de 5 megapixels. Assim a técnica de *CIA* poderá, a médio prazo, resultar na automatização total do exame parasitológico de fezes, fornecendo resultados altamente sensíveis. Este feito virá inovar a área da parasitologia clínica nacional e internacional, mais precisamente beneficiando os laboratórios públicos e privados, onde se realizam grande número de exames. O exame automatizado de fezes repercutirá favoravelmente aliviando os programas governamentais, e obtendo resultados confiáveis em muito curto prazo de tempo.

VI. CONCLUSÕES

O estudo realizado para o processamento de amostras fecais, desenvolvimento e validação da técnica de análise computacional de imagens de parasitos intestinais permitiu concluir que:

- Entre as diferentes técnicas parasitológicas e *kit* comercial empregados para o processamento de amostras fecais, a técnica de *TF-Test* Modificada revelou resultados satisfatórios, fornecendo estruturas parasitárias de boa qualidade com poucas microimpurezas, contribuindo para boa resolução na análise de imagens por computador.

- A introdução de modificações na técnica de *TF-Test* original foi relevante para obtenção de estruturas parasitárias com reduzido número de microimpurezas. As modificações consistiram em acrescentar duas etapas de tratamento do sedimento fecal já processado: coloração com um novo corante à base de Lugol; e degradação alcalina de microimpurezas com uma solução clarificadora.

- As amostras fecais, procedentes de quatro diferentes regiões de prevalência de enteroparasitoses do Estado de São Paulo, após coletadas e processadas conforme as normas de biossegurança e controle de qualidade, demonstraram 16 espécies de helmintos e protozoários, que deram subsídios para a formação de base de imagens do computador.

- Um protótipo de sistema computacional foi desenvolvido, destinado à análise de imagem parasitária, incorporando a técnica de *TF-Test* Modificada, e um conjunto de equipamentos e acessórios: um microscópio óptico adaptado a uma bomba peristáltica acoplada à lâmina tubular onde a suspensão fecal processada era observada em três dimensões, uma câmara de vídeo digital, um monitor para regulagem e captura de imagem, e um computador.

- O banco de imagens foi formado manualmente com um total de 5.626 componentes, constituídos por estruturas parasitárias e não parasitárias. As características peculiares de cada espécie parasitária, ou assinaturas, puderam ser extraídas, por observação no microscópio óptico

e, concomitantemente, por câmera de vídeo digital, sendo armazenadas no computador, para permitir o reconhecimento automático posterior de parasitos.

- A análise computacional obteve sucesso com base em algoritmo, tendo o processo de segmentação de imagens apoiado em um sistema de *pipeline* de técnicas, utilizando principalmente a técnica de *Image-foresting transform* para as fases de delineamento de componentes e de reconhecimento de padrões.

- A técnica de análise de imagens (*CIA*) demonstrou ser reprodutível e ter um bom desempenho na detecção e identificação de parasitos, com a sensibilidade de 95,3%, especificidade de 96,4% e eficiência de 96,2%. Os dados obtidos pela técnica de *CIA* e de *TF-Test* Modificada de microscopia foram similares e a concordância de resultados entre as duas técnicas foi conceituada como sendo *Quase Perfeita* ($\kappa = 0,88$, consistência $p < 0,05$).

- O presente trabalho constitui uma pesquisa tecnológica, esperando causar impacto na área de Saúde Pública, pois, pretende contribuir para o avanço no exame de fezes, que atualmente é realizado por microscopia óptica, dificultando a execução de grande número de exames parasitológicos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 REY, L. *Parasitologia*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 4ª Edição, 2008.
- 2 DE CARLI, G.A. *Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. Atheneu, São Paulo, 2ª Edição, 2007.
- 3 HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J.F.; DIAS, L.C. Parasitos Intestinais: Técnicas Tradicionais e Conjuntos Comerciais. *Jornal Brasileiro de Parasitologia*, 37(4): 44, 2001.
- 4 HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J.F.; DIAS, L.C.S.; ARAUJO, A.J.U.S.; CASTILHO, V.L.P.; NEVES, F.A.M.A. Enteroparasitoses: Inovação Tecnológica do Kit (*TF-Test*) Destinado ao Exame Parasitológico. *Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial*, 38(3): 199, 2002.
- 5 GOMES, J.F.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S.; ARAUJO, A.J.U.S.; CASTILHO, V.L.P.; NEVES, F.A.M.A. Evaluation of a Novel Kit (*TF-Test*) for the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, USA. 18(2): 132-8, 2004.
- 6 GARCIA, L.S. *Diagnostic Medical Parasitology*. ASM, Washington D.C., USA, 4th Edition, 2001.
- 7 Curso de Formação de Auditores Internos de Laboratórios Clínicos de Patologia: Implantação de Qualidade, Auditoria e Credenciamento. Realização INMETRO, CTLE-04, 1997.
- 8 GONZALES, R.C.; WOODS, R.E. Digital Image Processing. Addison Wesley, 1993.
- 9 DUDA, R.O.; HART, P.E. Pattern Classification and Scene Analysis. John Wiley and Sons, 1973.

- 10 HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J.F.; DIAS, L.C.S. e cols. Detecção de enteroparasitoses em amostras fecais procedentes de diferentes localidades do Estado de São Paulo, utilizando a técnica de *TF-Test*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 35(2): 46 B, 2003.
- 11 NEVES, D.P.; MELO, A.L.; ALMEIDA, R.W.; LINARDI, P.M. *Parasitologia Humana*. Atheneu, São Paulo, 11^a Edição, 2005.
- 12 YANG, Y.S.; PARK, D.K.; KIM, H.C. Automatic identification of human helminth eggs on microscopic fecal specimens using digital image processing and artificial neural network. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48(6): 718-730, 2001.
- 13 SOMMER, C. Quantitative characterization of texture used for identification of eggs of bovine parasitic nematodes. *Journal of Helminthology*, 72(2): 179-182, 1998.
- 14 DAUGSCHIES, A.; IMAROM, S.; BOLLWAHN, W. Differentiation of porcine *Eimeria* spp. by morphologic algorithms. *Veterinary Parasitology*, 81: 201-210, 1999.
- 15 FALCÃO, A.X.; STOLFI, J.; LOTUFO, R.A. The image foresting transform: Theory, algorithms and applications. *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 26(1): 19-29, 2004.
- 16 TORRES, R.S.; FALCÃO, A.X.; COSTA, L.F. A graph-based approach for multiscale shape analysis. *Pattern Recognition*, pp. 1163-1174, vol. 37, n^o 6, 2004.
- 17 RISPAIL, P.; JARRY, D.M. Parasitic fecal analyses. Prescription, application and interpretation of results. *Ann Gastroenterol Hepatol*. 29: 207-212, 1993.
- 18 DIAS, L.C.S.; MANGINI, A.C.S.; TEIXEIRA, A.T.L.; DIAS, R.M.D.S. Total Test e métodos usados no exame de fezes: Um estudo comparativo. *Revista Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial*., 29: 98, 1997.

- 19 HIATT, R.A.; MARKELL, E.K. How many stool examinations are necessary detect pathogenic intestinal protozoa. *Am. J. Trop. Hyg.*, 53: 36-39, 1995.
- 20 NAZER, H.; GREER, W.; SONNELLY, K.; MOHAMED, A.E.; YAISH, H.; KAGAWALLA, P.R. The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. *Br. J. Clin. Pract.*, 47: 76-78, 1993.
- 21 FEINSTEIN, A.R. (editor) *Clinical Epidemiology*. The architecture of clinical research. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1985.
- 22 GALEN, R.S.; GAMBINO, S.R. *Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnosis*. John Wiley & Sons, N.Y., USA, 1975.
- 23 GIOIA, I. The prevalence of intestinal parasitosis among the users of the Health Center. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25: 177-182, 1992.
- 24 ROTHMAN, K.J.; BOICE, J.D. *Epidemiologic Analysis with a Programmable Calculator*. Epidemiology Resources Inc., Boston, M.A., USA, 1982.
- 25 FLEISS, J.L. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. N.Y., John Wiley & Sons, p. 217-225, 1981.
- 26 MACLURE, M.; WILLET, W.C. Misinterpretation and Misuse of the *Kappa* Statistic. *American Journal of Epidemiology*, 126: 161-169, 1978.
- 27 I.B.G.E. (Instituto Brasileiro de Geografia Estatística). Pesquisa de Assistência Médica Sanitária, 2002.
- 28 DATASUS (Sistema Único de Saúde). Pesquisa de Assistência Médica Sanitária, 2002.

- 29 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica*. São Paulo: Editora Santos, 1994.
- 30 FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1305-22, 2000.
- 31 GOMES, J.F. Avaliação de um novo *Kit (TF-Test)* nacional destinado ao diagnóstico de enteroparasitoses em amostras fecais. 62p. (Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Campinas / UNICAMP – Instituto de Biologia), 2004.
- 32 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and estimates*. Who, Geneva, p. 27-29, 2001.
- 33 CATWRIGHT, C.P. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high prevalence setting. *Journal Clinical of Microbiology*, 37: 2408-2411, 1999.
- 34 HANSON, K.L.; CARTWRIGHT, C.P. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyse multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *Journal Clinical of Microbiology*, 39: 474-477, 2001.
- 35 LUMINA, G. Avaliação do *Kit TF-Test* para o diagnóstico das infecções por parasitos gastrintestinais em ovinos. 30p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista / UNESP/Botucatu), 2004.
- 36 LOUVELAND, R.P. *Photomicrography. A comprehensive treatise*. N.Y.: John Wiley & Sons, Inc, v: 1 and 2, 1970.
- 37 STITES, D.P.; TERR, A.L.; PARSLOW, T.G. *Medical Immunology*. Stanford: Appleton & Lange, 1997.
- 38 MARKELL, E.K.; VOGEL, M.; JOHN, D.T. *Medical Parasitology*. 7th edition, Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1992.

- 39 FALCÃO, A.X.; CUNHA, B.S.; LOTUFO, R.A. Desing of connected operators using the image foresting transform. *In proceedings of SPIE on Medical Imaging*, vol. 4322, p. 468-479, San Diego, CA, 2001.
- 40 KAUFMAN, L.; POUSSEEUW, P.J. *Finding Groups in Data: Introduction to Cluster Analysis*. Wiley Interscience, 1989.
- 41 BIMBO, A. *Visual Information Retrieval*. Morgan Publishers, 1999.
- 42 STEHLING, R.O.; NASCIMENTO, M.A.; FALCÃO, A. Techniques for color-based image retrieval. In *Multimedia Mining – a high way to intelligent multimedia document*, chapter 4, *Kluwer Academic*, 2002.
- 43 TORRES, R.S.; FALCÃO, A.X.; COSTA, L.F. A graph-based approach for multiscale shape analysis. *Pattern Recognition*, 2004.
- 44 ABBASI, S.; MOKHTARIAN, F.; KITTLER, J. Enhancing CSS-based Shape Retrieval for Objects with Shallow Concavities. *Image and Vision Computing*, 18: 199-211, 2000.
- 45 ARICA, N.; VURAL, F.T.Y. BAS: A Perceptual Shape Descriptor based on the Beam Angle Statistics. *Pattern Recognition Letters*, pages 1627-1639, 2003.
- 46 COSTA, L.F.; CESAR Jr, R.M. *Shape Analysis and Classification: Theory and Practice*. CRC Press, 2001.
- 47 KAUFMAN, L.; ROUSSEEUW, P.J. *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*. Wiley Interscience, 1989.
- 48 MULLER, H.; MULLER, W.; SQUIRE, D.M.; MARCHAND-MAILLET, S.; PUN, T. Perfomance evaluation in content-based image retrieval: Overview and proposals. *Pattern Recognition letters*, 22(593-601), 2001.

- 49 FALCÃO, A.X.; UDUPA, J.K.; MIYAZAWA, F.K. An ultra-fast user-steered image segmentation paradigm: Live-wire-on-the-fly. *IEEE Trans. on Medical Imaging*, 19(1): 55-62, 2000.
- 50 Kuncheva, L. I. *Combining Pattern Classifiers – Methods and Algorithms*. Wiley-Interscience, 2004.
- 51 LOTUFO, R.A.; FALCÃO, A.X. The ordered queue and the optimality of the watershed approaches. In *Mathematical Morphology and its Applications to Image and Signal Processing*, volume 18, pages 341-350. Kluwer, Jun 2000.
- 52 LOTUFO, R.A.; FALCÃO, A.X.; ZAMPIROLI F. IFT-Watershed from gray-scale marker. Technical Report IC-02-12, *Institute of Computing, University of Campinas*, Dec 2002.
- 53 MEIJSTER, A.; WILKINSON, M.H.F. A comparison of algorithms for connected set openings and closings. *IEEE Trans.on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 24(4): 484-494, Apr. 2002.
- 54 OTSU, N. A threshold selection method from gray level histograms. *IEEE Trans. Systems, Man and Cybernetics*, 9: 62-66, March 1979.
- 55 CHIEFFI, P.P.; CRYSCHEK, D.C.B.; AMATO NETO, V. Diagnóstico e tratamento de parasitoses intestinais. *Revista Brasileira de Clínica Terapeuta.*; 26: 163-70, 2000.
- 56 DE CARLI, G.A. *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas; métodos e técnicas*. Rio de Janeiro: Medsi, 1994.
- 57 LEVENTHAL, R.; CHEADLE R. *Parasitologia médica; texto e atlas*. São Paulo: Premier, 1997.

- 58 MINAMI, O.S., MICHE, M.P.; YAMANOTO, Y.I. *Métodos laboratoriais aplicados ao diagnóstico das parasitoses*. São Paulo: McWill, 1985.
- 59 NEVES, D.P.; FILIPPIS, T. *Parasitologia Básica*. Coopmed Editora, Belo Horizonte, 2003.
- 60 REY, L. *Parasitologia* – 2ª edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1991.
- 61 VALLADA, E.P. *Manual de exames de fezes; coprologia e parasitologia*. São Paulo, Editora Atheneu, 1993.
- 62 BURROWS, R.B. *Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man*. New Haven: Yale University Press, 1965.
- 63 CARROL, M.J. Collection and Preservation of Fecal Specimes: Collection of Fresh Specimes. In: Insenberg, H.D., Ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington (DC): ASM Press, p. 7.2.1.1-7.2.1.2, v2, 1992.
- 64 COSTA, P.S.; SOUZA, E.; KIMURA, R.J.; CAMPOS, M.C.R.M.; OLIVEIRA, P.A.; CAMPOS, M.R.M. Importância do Parasitológico de Fezes Três Amostras e Incidência dos Parasitos em Exames do SANCET Laboratório de Análises Clínicas – Mogi das Cruzes,SP. *Revista Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial*, T.L. 466, 2006.
- 65 SANTOS, S.J.; OLIVEIRA, R.E.; SAURO, A.C.; SARRAIPO, L.L.; COELHO, F.A.S.; COELHO, M.D.G. Avaliação do uso do *Kit* comercial Paratest como ferramenta no diagnóstico coproparasitológico. *Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia*, resumos: 97tecno, 2006.
- 66 REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.
- 67 NEVES, F.A.M.A.; GOMES, J.F.; PASCOTTO, V.M.; VALLE, A.P.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S. Diagnóstico de infecção causada por *Blastocystis hominis*, utilizando o *Kit TF-*

Test em amostras fecais procedentes de região com baixa prevalência de enteroparasitoses, Botucatu. *Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial*, pag. 393, 2005.

68 GOMES, J.F.; NEVES, F.A.M.A.; PASCOTTO, V.M.; VALLE, A.P.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S. Aumento da detecção de enteroparasitoses, com a utilização do *Kit TF-Test*, em regiões de baixa prevalência, Botucatu. *Revista Brasileira de Patologia Tropical*, vol. 34, supl. esp. cocrop., 2005.

69 GARGIONI, C.; SILVA, R.M.; THOMÉ, C.M.; QUADROS, C.M.S.; BATISTA, J.A.S.; GOMES, J.F.; KANAMURA, H.Y. Avaliação do *Kit TF-Test* para a detecção de ovos de *Schistosoma mansoni*, em amostras fecais provenientes de área de baixa endemicidade para esquistossomose. *Revista Brasileira de Patologia Tropical*, vol. 34, supl. esp. coprop., 2005.

70 LUMINA, G.; GOMES, J.F.; AMARANTE, A.F.T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S.; BRITTO, L.M.P.; GODOY, M.S. Detecção de parasitos intestinais em cães com o *Kit TF-Test*. *Revista Brasileira de Patologia Tropical*, vol. 34, supl. esp. coprop., 2005.

71 ARAUJO, A.J.U.S.; KANAMURA, H.Y.; GOMES, J.F. Avaliação do Sistema *TF-Test* para a Detecção de Cistos de *Giardia duodenalis* em Amostras de Estudo Populacional. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 39, supl. 1, pag. 150, 2006.

72 GOMES, J.F.; SUZUKI, C.T.N.; PAPA, J.P.; FALCÃO, A.X.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S. Análise de Imagens de Parasitos Intestinais do Homem: Uma Realidade. *Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial*, tema livre 456, 2006.

73 LUMINA, G.; BRICARELLO, P.A.; GOMES, J.F.; AMARANTE, A.F.T. The Evaluation of *TF-Test Kit* for Diagnosis of Gastrointestinal Parasite Infections in Sheep. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*, n.4, vol.43, 2006.

74 SHI, J.; MALIK, J. Normalized cuts and image segmentation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 22(8): 888-905, 2000.

75 WILKINSON, M.; ROERDINK, J. Fast morphological attribute operations using tarjan's union-find algorithm. In *Mathematical Morphology and its Applications to Image and Signal Processing*, Kluwer, pages 311-320, 2000.

76 MEIJSTER, A.; WILKINSON, M. A comparison of algorithms for connected set openings and closings. *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 24(4): 484-494, 2002.

77 BURROWS, R.B. A new fixative and techniques for diagnosis of intestinal parasites. *American Journal Clinical Pathology*, 48: 342-346, 1967.

78 D'ANTONI, J.S. Standardization of the iodine stain for wet preparations of intestinal protozoa. *American Journal Tropical Medicine*, 17:79-84, 1937.

79 HIGGINS, G.V. Iodine-trichrome staining technique: a replacement of iodine solution on fecal examination. *Lab. Med.*, 19:824-825, 1988.

80 SAPERO, J.J.; LAWLESS, D.; STRONE, S.P.A. An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. *Science*, 114:550-551, 1951.

81 BERLIN, O.G.W. Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. *Clin. Infect. Dis.*, 18:606-609, 1994.

82 CREDE, P. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Direct Smears, 1992.7.3.5.1-7.3.5.4., v.2. In: Insenberg, H.D., Editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington (DC): ASM Press, 7.3.3.1-7.3.3.3, v.2, 1992.

83 MARKELL, E.K.; VOGEL, M.; JOHN, D.T. *Medical Parasitology*. 7^a ed., Philadelphia (Pa): WB Saunders Co., 1992.

84 MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; KROTOSKI, W.A. Markell and Voges *Medical Parasitology*. 8^a ed., Philadelphia (Pa): WB Saunders Co., 1999.

- 85 ASH, L.R.; ORIEHL, T.C. *Parasites: A Guide to Laboratory. Procedures and Identification*. Chicago (III): ASCP Press, 1991.
- 86 DE CARLI, G.A. *Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1994.
- 87 GARCIA, L.S. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Insenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington: ASM Press, 7.3.2.1-7.3.2.4, v.2, 1992.
- 88 GONZÁLEZ-RUIZ, A.; BENDALL, R.P. Size Matters: The use of ocular micrometer in diagnostic parasitology. *Parasitology Today*, 11;83-85, 1995.
- 89 STEWART, C.E.; KOEPKE, J.A. *Basic Quality Assurance Practices for Clinical Laboratories*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- 90 DHARAN, M. *Control de Calidad em los Laboratorios Clínicos*. Barcelona: Editorial Reverte AS, 1980.
- 91 POZZOLI, JIMENEZ, L.V. ; GÓMEZ, V. et al. *Manual de Control de Calidad en Química Clínica*. Asunción: Cooperación Técnica Alemana, 1991.
- 92 WILKOX, K.R. Jr.; BAYNES, T.E. Jr.; CRABLE, J.V. et al. Laboratory Management. In: Inhorn SL, ed. *Quality Assurance Practices for Health laboratories*. Washington: *American Public Health Association*, 3-125, 1978.
- 93 CRIST, N.R. *Manual de Biossegurança para o Laboratório*. 2^a ed., World Health Organization, Geneva: Livraria Editora Santos, 1995.
- 94 TEIXEIRA, P.; VALLE, S. *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora FIOCUZ, 1996.

- 95 AMARAL, A.D.F. *Manual de Aulas Práticas*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: Departamento de Parasitologia, 1969.
- 96 FRITSCHÉ, T.R.; SMITH, J.A. Introduction to Diagnostic Parasitology: Biologic, Clinical and Laboratory Considerations. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A. et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*., 6th, ed. Washington: ASM Press, p. 1141-1144, 1995.
- 97 MEHLHORN, H., ed. *Parasitology in focus*. Berlin: Springer-Verlag, 1988.
- 98 PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. *Pessoa Parasitologia Médica*. 11^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.
- 99 *Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica*. São Paulo: Livraria Editora-Santos, 1994.
- 100 SUM, T. Parasitic Disorders. *Pathology, Diagnosis and Management*. 2nd ed. Baltimore: Willian & Wilkins, 1999.
- 101 GILLESPIE, S.H.; HAWKEY, P.M. eds. *Medical Parasitology*. A Pratical Approach. Oxford, England: IRL Press, 1995.
- 102 NEZELOF, C.; GALLE, P.; HINGLAIS, N. *Techniques Microscopiques*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1972.
- 103 NOBEL, E.R.; NOBEL, G.A. *Parasitology: The Biology of Animal Parasites*. 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982.
- 104 PRICE, D.L. *Procedure Manual for Diagnosis of Intestinal Parasites*. Boca Raton: CRC Press, 1993.

105 ASH, L.R.; ORIEH, T.C. *Atlas of Human Parasitology*. 4th ed. Chicago (III): ASCP Press, 1997.

106 PETERS, W.; GILLES, H.M. *Color Atlas of Tropical Medicine and Parasitology*. Chicago: Year Book Medical, 1977.

107 SUM, T. *Color Atlas and Textbook of Diagnosis Parasitology*. New York: Masson, 1988.

108 LEVENTHAL, R.; CHEADLE, R. *Parasitologia Médica; texto e atlas*. São Paulo: Premier, 160 p., 1997

109 VALLADA, E.P. *Manual de exames de fezes: coprologia e parasitologia*. São Paulo: Atheneu, 201 p., 1993.

110 LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, Ar 3rd; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLIANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, FR.G. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27(1):37-58, 1980.

111 BARER, R. *Lecture notes on the use of the microscope*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1956.

112 LOVELAND, R.P. *Photomicrography. A comprehensive treatise*. New York: John Wiley & Sons, Inc., v. 1 e 2, 1970.

113 NEEDHAN, G.H. *The practical use of microscope*. Springfield (III): Charles C. Thomas Publisher, 1958.

114 GOMES, J.F.; LUMINA, G.; AMARANTE, A.F.T.; LEME, D.P.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S.; BRITTO, L.M.P.; MAZZOCHI, R.E. Uso do *Kit TF-Test* para o diagnóstico

parasitológico em cães (*Canis familiaris*). *Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, div.-res. 001 a 043, pg. 406, 2006.

115 FALCÃO, A.X.; UDUPA, J.K.; SAMARASEKERA, S.; SHARMA, S.; HIRSCH, B.E. LOTUFO, R.A. User-steered image segmentation paradigms: Live-wire and live-lane. *Graphical Models and Image Processing*, 60(4): 233-260, 1998.

116 SUZUKI, C.T.N. Segmentação de Imagens de Parasitos Intestinais do Homem. 66p. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Computação – Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP), 2007.

117 UNFPA – *Fundo de População das Nações Unidas*. Folha de São Paulo, p. A14, nº 28.575, 2007.

118 VAN GOOL, T.; WEIJTS, R.; LOMMERSE, E.; MANK, T.G. Triple Faeces Test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *European Society of Clinical Microbiology*. 22 (5): 284-290, 2003.

119 LUTZ, A.O. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 11: 121-155, 1919.

120 FAUST, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D.R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. *Jornal Brasileiro de Parasitologia*, 25: 241-262, 1939.

121 RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A.P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes-modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 14: 5-8, 1954.

122 KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. *Japan Journal of Parasitology*. 3: 35 (texto em Japonês), 1954.

123 WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medicine Journal of Australia*, 29: 375-376, 1921.

124 HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis *mansoni*. *Journal Public of Health*, 9: 281-298, 1934.

125 TORRES, R.S.; FALCÃO, A.X. Contour Saliency Descriptors for Effective Image Retrieval and Analysis. *Image and Vision Computing*, 25(1): 3-13, 2007.

126 PAPA, J.P.; FALCÃO, A.X.; MIRANDA, P.A.V.; SUZUKI, C.T.N.; MASCARENHAS, N.D.A. A new pattern classifier based on optimum path forest. Technical Report IC-07-13, Institute of Computing, State University of Campinas, 2007. Technical report available at <http://www.dcc.unicamp.br/ic-tr-ftp/2007/07-13.ps.gz>.

127 PAPA, J.P.; FALCÃO, A.X.; MIRANDA, P.A.V.; SUZUKI, C.T.N.; MASCARENHAS, N.D.A. Design of robust pattern classifiers based on optimum-path forest. In *ISMM'07: Proceedings of the 8th International Symposium on Mathematical Morphology*, 2007. accepted for publication.

128 INPANKAEW, T.; TRAUB, R.; THOMPSON, R.C.; SUKTHANA, Y. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *J. Trop. Med. Public. Health*, 38(2): 247-255, 2007.

129 SANTOS, L.P.; SANTOS, F.L.N.; SOARES, N.M. Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Salvador-Bahia. *Revista de Patologia Tropical*, vol.36(3):237-246.set-dez., 2007.

130 SANTOS-JUNIOR, G.O.; SILVA, M.M.; SANTOS, F.L.N. Prevalência de enteroparasitoses em crianças do sertão baiano pelo método de sedimentação espontânea. *Revista de Patologia Tropical*, vol.35(3):233-240.set-dez., 2006.

131 BASES PÚBLICAS DE CONSULTA DE PATENTES – INPI (patentes brasileiras), USPTO (patentes norte americanas), ESP@CENET (patentes do mundo todo), EPOLINE (patentes europeias), JPO (patentes japonesas), CIPO (patentes canadenses), FREE PATENTS ONLINE (patentes norte americanas) – Internet Explorer, 2007.

VIII. ANEXO



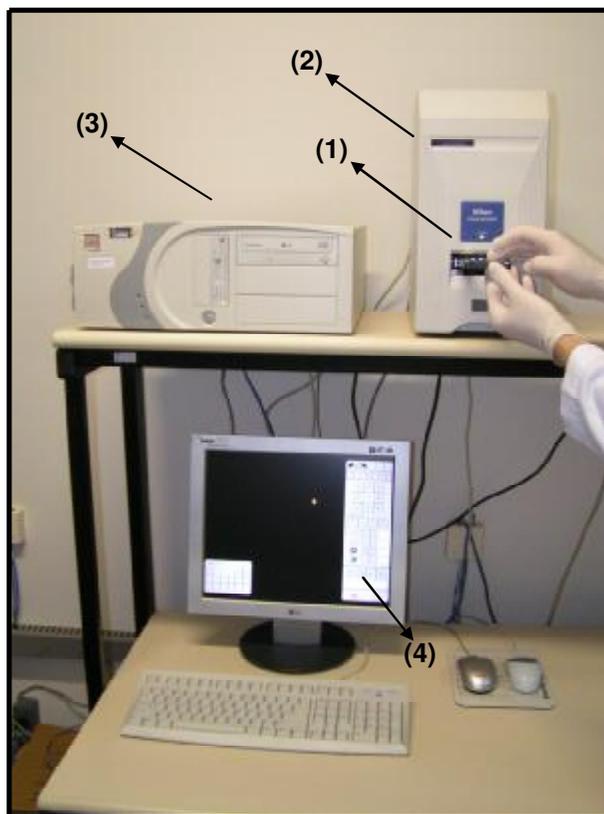
Fig.31: Imagem, com aumento microscópico de 400 vezes, mostrando a região posterior (caudal) da larva de *S.stercoralis* fora da visão do monitor.



Fig. 32: Ovo de *Taenia* spp., com um envoltório transparente, aderido em um resíduo alimentar. Aumento microscópico de 400 vezes.



(A)



(B)

Fig. 33. (A). Equipamento *Coolscope*[®]; (B). Lâmina de microscopia (1), *Coolscope*[®] (2), Computador (3), e Vídeo do computador (4).

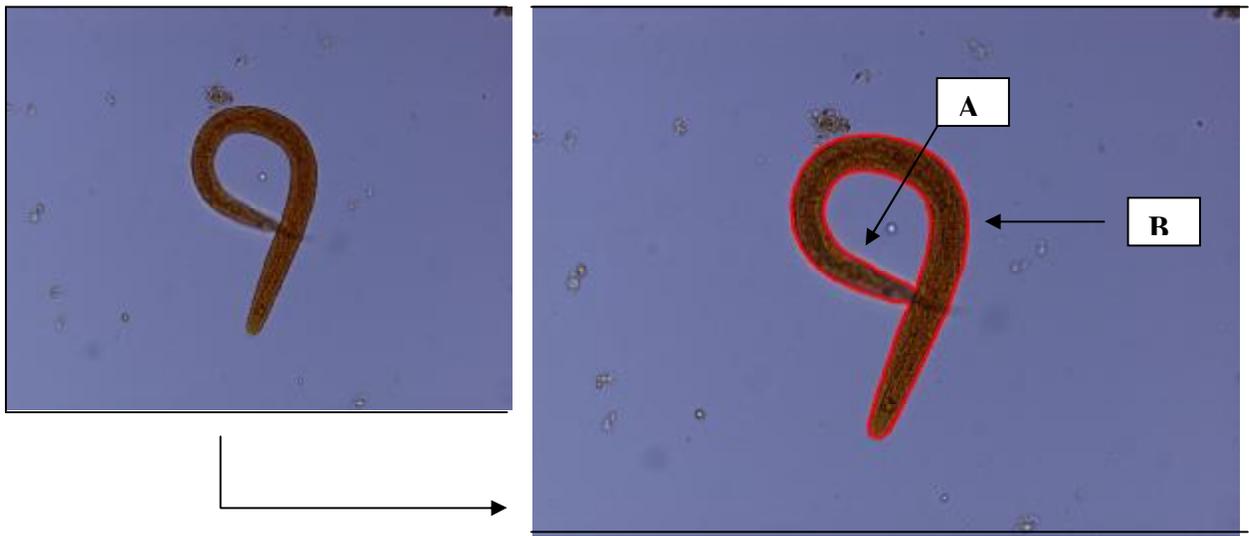


Fig. 34: Larva curvada mostrando contorno interno (A) e contorno externo (B).