



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0605465-0 B1

(22) Data do Depósito: 30/11/2006

(45) Data de Concessão: 31/07/2018



(54) Título: SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS INTESTINAIS POR ANÁLISE
COMPUTADORIZADA DE IMAGENS

(51) Int.Cl.: G01N 33/483

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

(72) Inventor(es): ALEXANDRE XAVIER FALCÃO; CELSO TETSUO NAGASE SUZUKI; JANCARLO
FERREIRA GOMES; JOÃO PAULO PAPA; LUIZ CÂNDIDO DE SOUZA DIAS; SUMIE HOSHINO
SHIMIZU

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/11/2006

"SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS INTESTINAIS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS"

CAMPO DE INVENÇÃO

[1] A presente invenção apresenta uma solicitação de patente para um sistema de diagnóstico de parasitos intestinais de humanos e animais por análise computadorizada de imagens microscópicas obtidas de amostras fecais.

[2] O sistema utiliza equipamentos disponíveis no mercado, um *kit* parasitológico diferenciado, e técnicas computacionais e parasitológicas, especialmente desenvolvidas para resolver o problema.

[3] O sistema melhora consideravelmente a sensibilidade diagnóstica praticada pelos laboratórios de análises clínicas, principalmente levando em consideração, os erros humanos praticados no processamento e na identificação de espécies parasitárias, além de eliminar o uso de métodos convencionais e/ou *kits* comerciais com limitações técnicas.

[4] Neste sentido, o sistema contribui para o aumento da produtividade e credibilidade diagnóstica, e para a redução e o melhor aproveitamento de recursos humanos, espaço físico e utensílios de laboratório na realização de exames parasitológicos das fezes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[5] As parasitoses intestinais no homem são ainda altamente prevalentes no mundo, principalmente em regiões tropicais onde está inserido o Brasil. A Organização Mundial da Saúde - OMS, estima que no mundo exista mais de 3,5 bilhões de pessoas

infectadas com alguma espécie de parasito intestinal.

[6] Sugerem alguns autores que esses números podem atingir 1/3 da população mundial. As doenças infecciosas e parasitárias continuam, segundo a OMS, a figurar entre as principais causas de morte, sendo responsável por 2 a 3 milhões de óbitos por ano, em todo o mundo. Para se ter ideia, uma de cada dez pessoas no mundo sofre por infecção de uma ou mais das dez principais parasitoses, que incluem: ascaríase, ancilostomíase, tricuriase, amebíase, esquistossomíase, giardíase, malária etc. Ainda, de acordo com a OMS, do total de pessoas infectadas no mundo, aproximadamente 450 milhões encontram-se doentes. Em muitas regiões da América Latina e da África, as doenças parasitárias ocupam o primeiro lugar como causa de morte, em outras são ultrapassadas apenas pelas doenças do aparelho circulatório. No Brasil, em meados do ano de 2001, a Organização dos Países Sul Americanos - OPAS, realizou um levantamento e constatou que mais da metade da população brasileira encontrava-se infectada por uma ou mais espécie de parasito intestinal. Há regiões que apresentam alta endemicidade, chegando ao ponto de somente no Brasil existir mais de 7 milhões de esquistossomóticos.

[7] As atuais prevalências de infecções ocasionadas por protozoários e helmintos do trato digestivo justificam o diagnóstico preciso do agente, a fim de implantar medidas adequadas para solucionar este problema de saúde pública.

[8] Para isto, segundo dados do DATASUS, fonte IBGE, somente nos laboratórios públicos brasileiros são realizados mais de 19 milhões de exames das fezes por ano.

[9] O diagnóstico laboratorial dos parasitos intestinais é

efetuado manualmente, por microscopia óptica, através da identificação visual das espécies parasitárias existentes em amostras fecais. Este procedimento não é o ideal, deixando em muitas vezes a desejar, devido:

[10] a) a apresentar baixas e médias sensibilidades diagnósticas;

[11] b) à pequena quantidade de material fecal analisado (50ul);

[12] c) ao alto teor de resíduos fecais presentes nas lâminas de microscopia, falseando em muitas vezes o resultado; e

[13] d) à necessidade de um profissional de microscopia que saiba diagnosticar todas as espécies parasitárias intestinais, mão de obra esta rara.

[14] Uma avaliação realizada pelo INMETRO no ano de 1997, envolvendo vários exames parasitológicos das fezes e grandes laboratórios das cidades do Rio de Janeiro e São Paulo, concluiu como insatisfatória a análise desses laboratórios, pois, 3 entre 4 laboratórios de São Paulo apresentaram uma quantidade significativa de erros de diagnóstico e 7 entre 10 laboratórios do Rio de Janeiro também erraram significativamente.

[15] Em vista do exposto, torna-se evidente a carência de técnicas, métodos, *Kits* ou sistemas que tenha bom desempenho diagnóstico, com características de alta sensibilidade, reprodutibilidade e praticidade.

[16] Uma alternativa para resolver este problema é a automação do diagnóstico parasitológico das fezes, através da análise de imagens por computador. Atualmente não há solução semelhante disponível no mercado, estando os laboratórios totalmente dependentes do diagnóstico visual (praticado por um profissional

de microscopia).

[17] O diagnóstico na maioria dos casos é realizado com técnicas decenárias, em menor escala com *kits* comerciais e, em pequeno número, com técnicas imunológicas.

[18] Técnicas para a análise automática de amostras biológicas são conhecidas. A patente US6005964 descreve um sistema para detectar automaticamente protozoários em amostras de água, com o uso de microscópio controlado por computador. Esta patente difere do presente invento por detectar somente protozoários em materiais livres de impurezas (água), por não detectar helmintos intestinais, e por não ter um processo automático para o resgate e descarte de sedimento fecal, o que facilita em muito o diagnóstico nesta condição.

[19] Detectar parasitos intestinais em material fecal trata-se de uma tarefa de difícil execução, pois, exige a concentração dos parasitos presentes na amostra fecal, e a eliminação de grande parte de impurezas fecais que poderão falsear o resultado.

[20] Mesmo assim, muitas micro impurezas permanece no sedimento fecal processado junto a lâmina de microscopia, o que vem a exigir a utilização de precisas técnicas computacionais e a utilização de inovadores reagentes que possam favorecer um bom diagnóstico.

[21] Além do que, a técnica de concentração parasitária aplicada em amostras de água é diferenciada quando comparada com a de fezes, e bem mais onerosa quando comparada com a técnica parasitológica empregada no atual invento. Outro fator discorde da patente acima mencionada com o atual invento é que apesar de apresentar componentes em comum como microscópio,

câmera digital e computador, difere do sistema proposto no objetivo principal, processos e demais componentes, pois, o presente invento consiste de um sistema automatizado do diagnóstico das parasitoses intestinais, dentre helmintos e protozoários intestinais, por análise computadorizada de imagens.

[22] A patente W0-03102210 descreve técnicas para a identificação de anomalias em células, com o uso de computador, microscópio e câmera digital. O material concentrado (sangue) a ser analisado é adicionado em meio livre de impurezas com auxílio de técnicas de coloração, favorecendo o diagnóstico por meio da análise computacional. Estas técnicas não se aplicam ao diagnóstico de parasitos intestinais.

[23] O mesmo comentário se aplica à patente FR2572528, que descreve um sistema para contagem de células em sangue e bactérias em água e leite, também com o uso de microscópio e computador.

[24] A patente RU2123682 apresenta um método para a detecção de agentes parasitas com corante e microscópio fluorescente, através de câmera de vídeo e computador.

[25] Detecção de espécies parasitárias com corante fluorescente é uma detecção indireta, ou seja, através do uso de anticorpos e antígeno no estudo da variabilidade antigênica. Vários métodos são utilizados para estes fins, porém, apresentam como limitação a detecção de poucas espécies de parasitos intestinais, além de mostrar limitações quanto a sensibilidade e especificidade, podendo variar esses fatores entre os laboratórios. Em rotina, o método é também inviável financeiramente em larga escala.

[26] As patentes EP0774734 e US20060133657 apresentam sistemas para a análise visual de objetos genéricos em imagens, com o uso de microscópio, câmera e computador. Portanto, não se aplicam ao diagnóstico automático de parasitos intestinais.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[27] A presente invenção consiste dos seguintes elementos, que combinados com alguns procedimentos que em uma dada ordem formam um sistema para diagnóstico de parasitos intestinais de humanos e animais por análise computadorizada de imagens: Kit parasitológico diferenciado, para múltiplas coletas e dupla filtragem de material fecal; bomba peristáltica com suporte para vários tubos de centrifugação, lâmina tubular, e robô de controle da haste de sucção da bomba; microscópio; câmera digital acoplada ao microscópio; platina motorizada acoplada ao microscópio; driver para controlar os dispositivos (platina, driver de foco, câmera, bomba e robô), realizar a análise automática das imagens, e gerar os resultados do diagnóstico.

[28] As amostras fecais são coletadas e processadas em laboratório seguindo o protocolo operacional do kit parasitológico diferenciado até a obtenção do sedimento fecal em um tubo de centrifugação.

[29] O sedimento processado deve ser homogeneizado no tubo com solução salina fisiológica, solução corante, a base de Lugol, e solução clarificadora.

[30] A referida solução clarificadora tem por objetivo a eliminação de impurezas das amostras de fezes, para que seja realizada uma análise de diagnóstico coproparasitológico isenta de possibilidade de ocorrência de falsos positivos, e

compreende um reagente gerador de cloro ativo selecionado dentre hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio ou suas misturas para gerar um teor de cloro ativo de 2 a 2,5% pp.

[31] Os tubos de centrifugação contendo sedimento processado e homogeneizado são colocados no suporte da bomba.

[32] O profissional de laboratório fornece pelo teclado ao computador os dados sobre cada tubo (exame), o número deles e a posição de cada um no suporte, dando início ao processo de diagnóstico.

[33] Em seguida, o computador envia uma sequência de comandos para o robô posicionar a haste da bomba no primeiro tubo (ou no tubo correspondente da sequência de processamento das amostras); para mover a platina para a posição inicial de varredura; para estabelecer o foco inicial; para a bomba realizar um resgate de sedimento fecal; e para a câmera adquirir uma imagem.

[34] A imagem é analisada pelo computador para verificar o foco. Se a imagem estiver fora de foco, o computador verifica se o percurso de foco chegou ao fim e, caso contrário, envia um comando para ajustar o foco e um comando para a câmera adquirir uma nova imagem.

[35] Este processo é repetido enquanto as imagens estiverem fora de foco. Ao detectar uma imagem em foco, o computador armazena esta imagem e verifica se o percurso do *driver* de foco foi finalizado. Caso negativo, o *driver* de foco é ajustado e o processo continua para aquisição de mais imagens. Todas as

imagens detectadas em foco são armazenadas para análise computadorizada. Assim que o percurso do *driver* de foco finaliza, o computador inicia a análise dessas imagens.

[36] A análise das imagens consiste da detecção, segmentação e reconhecimento das espécies de parasitos presentes na imagem.

[37] Após a análise, o computador verifica se a lâmina foi inteiramente fotografada (i.e., se o percurso de varredura da platina chegou ao fim) e, no caso contrário, envia um comando para posicionar a platina em um próximo campo de visão da lâmina ainda não visitado e reinicializa o *driver* de foco.

[38] Os movimentos da platina são programados para cobrir todos os campos de visão da lâmina tubular. O processo de aquisição de imagem, ajuste de foco, armazenamento de imagens em foco e análise das imagens em foco é repetido para cada um desses campos de visão.

[39] Após analisar toda a lâmina, o computador aciona a bomba para descartar a amostra em recipiente apropriado e limpar a tubulação para iniciar a análise do próximo resgate do sedimento. O computador verifica se todo o sedimento foi analisado (i.e., se um certo número de resgates, que garanta esta tarefa, foi atingido) e, caso contrário, reinicializa a platina e o *driver* de foco, e aciona a bomba para realizar um novo resgate do mesmo sedimento. O processo todo se repete até finalizar o sedimento no tubo de centrifugação.

[40] Neste instante, o computador gera o resultado do diagnóstico do exame (imagens dos parasitos identificados e laudo).

[41] O computador verifica se todos os tubos foram analisados e, no caso contrário, aciona o robô para movimentar a haste da

bomba, para iniciar o próximo exame, e realiza os demais procedimentos de início de diagnóstico.

[42] O processo se repete até que todos os tubos sejam analisados, finalizando os diagnósticos.

[43] Opcionalmente, o sistema pode ser usado com controle manual (por parte do profissional de microscopia) da bomba peristáltica (sem robô), platina, *driver* de foco, e câmera digital.

[44] Pode ainda ser usado sem platina e *driver* de foco. Neste caso, porém, a aquisição das imagens seria completamente manual e apenas a análise das imagens seria feita automaticamente pelo computador (i.e., o diagnóstico é ainda automático).

[45] O sistema pode ainda ser simplificado para detectar a presença ou não de parasitos, ficando a determinação da espécie sob responsabilidade de um profissional de microscopia.

[46] Em qualquer uma dessas variações do sistema, incluídas no escopo desta invenção, está presente o caráter inventivo desta tecnologia, sem precedentes no estado da técnica.

[47] Em outras palavras, embora existam documentos de patentes com elementos em comum a presente invenção (microscópio, câmera digital e computador), elas diferem no objetivo principal, nos processos, e nos demais elementos do sistema. As vantagens do sistema proposto em relação aos procedimentos adotados atualmente nos laboratórios de análises clínicas são: maior produtividade; maior sensibilidade diagnóstica; menor despesa com mão-de-obra; redução de utensílios e espaço físico no laboratório de parasitologia; rapidez, praticidade e segurança diagnóstica; diminuição do risco de contato e contaminação do profissional de laboratório; descarte de material

analisado em recipiente apropriado para material tóxico, seguindo normas de biossegurança; inovação na liberação dos resultados através de imagens; resgate da credibilidade no diagnóstico de parasitoses intestinais por parte da classe médica, evitando o uso empírico, indiscriminado e ineficaz de medicamentos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[48] A Figura .1 apresenta um esquema contendo:

[49] Componentes do sistema: Bomba peristáltica (a); Computador (b); Microscópio (c); Platina motorizada (d); Driver de foco (e); Câmera digital (f). As linhas tracejadas indicam acoplamento e/ou transferência de dados (imagens, amostras). As linhas cheias com setas indicam transferência de comandos de controle.

[50] A Figura .2 apresenta um diagrama com os processos do sistema.

[51] A Figura .3 apresenta etapas do módulo de análise de imagens.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[52] A) Conceito construtivo:

[53] O invento consiste dos seguintes elementos, que combinados com alguns procedimentos em uma dada ordem formam um sistema para diagnóstico de parasitos intestinais por análise computadorizada de imagens (ver Figura 1):

[54] 1) Kit parasitológico diferenciado: trata de um kit para múltiplas coletas e dupla filtragem de material. De forma remissiva contempla os seguintes componentes (conforme documento

de patente PI 01043722): um recipiente cônico com três bocais para acoplamento de em cada qual de um recipiente para a coleta primária com pá coletora; sendo que no interior desse recipiente cônico é montado um par de telas metálicas de 400 e 200 micrometros. Este kit é utilizado para a realização de procedimentos de coleta de campo, homogeneização, preservação, transporte e processamento laboratorial de amostras fecais.

[55] As condições de múltiplas coletas e dupla filtragem de material fecal são fundamentais para aumentar a sensibilidade diagnóstica e reduzir a quantidade de impurezas.

[56] 2) Bomba peristáltica (a): este equipamento possui um suporte para vários tubos de centrifugação (onde são sedimentadas as amostras fecais processadas) e uma bomba peristáltica (a) para aspirar e enviar amostras do sedimento fecal através de uma tubulação plástica até uma lâmina tubular de vidro.

[57] A lâmina apresenta profundidade e, portanto, o sedimento deve ser diluído e resgatado em meio líquido (solução salina fisiológica). A lâmina tubular possibilita imagens com bem menos impurezas do que as lâminas convencionais.

[58] Além de evitar o resgate manual e reduzir o uso de utensílios de laboratório, o equipamento, na forma de bomba peristáltica (a) permite o resgate de todo o sedimento fecal de forma descontínua, realiza o descarte automático do material analisado em recipiente apropriado para líquidos tóxicos, seguindo normas de biossegurança, e em seguida lava automaticamente a tubulação plástica para uma próxima análise com solução fisiológica.

[59] A passagem da haste de sucção da bomba peristáltica (a) de um tubo para outro é realizada por um robô.

[60] O robô e as demais funções da bomba (a) são controlados pelo computador (f).

[61] 3) Microscópio(b): Um microscópio óptico.

[62] 4) Câmera digital (c): acoplada ao microscópio (b), trata de uma câmera digital utilizada para adquirir as imagens de diferentes campos de visão da lâmina tubular, incluindo varreduras horizontal e vertical no plano da base do microscópio (b), e em profundidade (ajuste de foco).

[63] 5) Platina motorizada (d): acoplada ao microscópio (b), a lâmina tubular é fixa na platina que move-se nas direções horizontal e vertical sobre a base do microscópio (b);

[64] 6) Driver de ajuste foco (e): um driver para ajuste de foco (e) do microscópio (b) é usado para a varredura em profundidade da lâmina tubular;

[65] 7) Computador (f): cujo software aplicativo é usado para controlar a platina motorizada (d), o *driver* de foco (e), a câmera digital (c), a bomba peristáltica (a) e seu robô; e análise das imagens adquiridas, gerando os resultados do diagnóstico.

[66] B) Conceito operacional:

[67] Os objetivos da análise são detectar a presença de parasitos nas imagens, isolar (segmentar) esses parasitos dos demais componentes da imagem, e reconhecer a espécie parasitária, concluindo o diagnóstico, e obedece as etapas operacionais (vide figura .2):

[68] Etapa .1: Coleta e processamento do kit parasitológico diferenciado, onde as amostras fecais coletadas são processadas em laboratório seguindo o protocolo operacional do kit parasitológico diferenciado até a obtenção do sedimento fecal

em um tubo de centrifugação.

[69] De forma remissiva o protocolo operacional do kit parasitológico diferenciado contempla os seguintes passos (conforme documento de patente PI 01043722):

[70] Passo 1. Orientar o paciente a colher para cada tubo somente uma pazinha de fezes (cerca de 1,5 g), de acordo com a instrução que se encontra na embalagem (kit paciente) contendo os três tubos coletores-usuário, em dias alternados, e em um período de tempo que não ultrapasse a 10 dias;

[71] Passo 2. No laboratório, agitar vigorosamente os tubos coletores-usuário contendo as amostras fecais, homogeneizando-as para serem processadas;

[72] Passo 3. Em uma estante própria para a técnica de kit parasitológico diferenciado, acomodar os três tubos coletores pertencentes a cada paciente, em separado, com as tampas semiabertas. Em seguida, adicionar em um dos tubos uma gota de solvente orgânico (detergente neutro incolor) e 3 mL de acetato de etila p.a.;

[73] Passo 4. Fechar os tubos coletores com as suas respectivas tampas, e agitar vigorosamente por 30 segundos todos os tubos coletores, a fim de obter uma suspensão homogênea de partículas fecais;

[74] Passo 5. Retirar as tampas dos tubos coletores, descartando-as em um recipiente apropriado para descarte de material sólido contaminante, seguindo normas de biossegurança;

[75] Passo 6. 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 do

kit parasitológico diferenciado;

[76] Passo 7. Verificar se o conjunto processador não apresenta nenhum vazamento de material a ser processado, fazendo para isto a inversão do conjunto;

[77] Passo 8. 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;

[78] Passo .9 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;

[79] Passo .10 Decantar o líquido sobrenadante do tubo de centrifugação em recipiente para descarte de líquido contaminante, também conforme as normas de biossegurança;

[80] Passo .11 Adicionar cerca de 10 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, de modo formar uma suspensão fecal;

[81] Passo .12 Com a mesma pipeta, transferir uma ou duas gotas do material processado (suspensão) sobre uma lâmina de microscopia;

[82] Passo .13 Adicionar, sobre a(s) gota(s), uma gota de solução de Lugol diluído, e mais uma gota de solução salina fisiológica. Preparar, em seguida, um esfregaço de todo o material sobre a lâmina;

[83] Passo .14 Cobrir o esfregaço com lamínula e examiná-lo em microscopia de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes; e

[84] Passo .15 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.

[85] Etapa .2: preparação das amostras para análise, onde as amostras processadas de cada paciente (exame) são preparadas para análise da seguinte forma: o sedimento processado deve ser homogeneizado com solução salina fisiológica a 0,85% e solução corante. O sistema requer uma diluição padronizada de solução salina, e coloração homogênea e forte para todas as espécies de parasitos. Esta condição é obtida com soluções corantes comerciais (a base de iodo), devido à amostra se encontrar em meio líquido dentro de uma lâmina tubular (não convencional). O sedimento homogeneizado fica em repouso por um certo período. Em seguida, uma solução clarificadora a base de KOH é adicionada ao sedimento, finalizando a etapa de preparação do sedimento para análise.

[86] Esta solução foi desenvolvida para este projeto com a finalidade de evitar impurezas, que dependendo da natureza, acabam absorvendo a solução corante em igualdade de coloração com os parasitos. Algumas dessas impurezas aderem à membrana do parasito gerando falsos resultados negativos, e outras possuem forma similar a dos parasitos, gerando falsos resultados positivos. A solução clarificadora reduz e modifica a coloração e a forma das impurezas, facilitando a segmentação dos parasitos nas imagens. Outro benefício da solução clarificadora é que ela evita entupimentos na tubulação da bomba (b),

o que ocorre com frequência quando usamos técnicas convencionais e outros *kits* comerciais.

[87] Etapa .3: profissional de laboratório realiza procedimentos de início dos diagnósticos, onde cada tubo de centrifugação contém sedimento fecal homogeneizado com soluções salina, corante e solução clarificadora de um dado paciente.

[88] A solução corante é a base de Lugol.

[89] A solução clarificante compreende um reagente gerador de cloro ativo selecionado dentre hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio ou suas misturas para gerar um teor de cloro ativo de 2 a 2,5% pp.

[90] Após a colocação dos tubos no suporte da bomba (b), o profissional de laboratório fornece pelo teclado ao computador (f) os dados sobre cada tubo (exame), o número deles e a posição de cada um no suporte, dando início ao processo de diagnóstico automático.

[91] Etapa .4 computador envia a sequência de comandos para iniciar um (próximo) diagnóstico:

[92] - um comando para o robô posicionar a haste da bomba (b) no primeiro tubo (ou no tubo correspondente da sequência de processamento das amostras);

[93] - um comando para mover a platina motorizada (d) para a posição inicial de varredura; um comando para estabelecer o foco inicial;

[94] Etapa .5: o computador (f) envia um comando para a bomba (a) realizar um resgate de sedimento fecal;

[95] Etapa .6: o computador (f) envia um comando para a câmera (c) adquirir uma imagem;

[96] Etapa .7: Drive é acionado para ajuste de foco, onde a imagem é analisada pelo computador (f) para verificar o foco. Se a imagem estiver fora de foco, o computador (f) verifica se o percurso de foco chegou ao fim e, caso contrário, envia um comando para ajustar o foco e um comando para a câmera (c) adquirir uma nova imagem, onde as etapas .f e .g são repetidas enquanto as imagens estiverem fora de foco.

[97] Etapa .8: Armazena imagem em foco, ao detectar uma imagem em foco, o computador (f) armazena esta imagem (~~Figura 2-h~~) e verifica se o percurso do *driver* de foco (e) foi finalizado.

[98] Caso negativo, o *driver* de foco (e) é ajustado (Etapa .g) e o processo continua para aquisição de mais imagens (Etapa .f, Etapa .g e Etapa .h). Todas as imagens detectadas em foco são armazenadas para análise computadorizada.

[99] Etapa .9: computador analisa as imagens em foco, assim que o percurso do *driver* de foco (e) finaliza, o computador (f) inicia a análise dessas imagens, onde a análise das imagens tem por meta isolar e classificar as espécies parasitárias presentes nas imagens.

[100] Existem diversas técnicas possíveis de serem usadas nesta etapa. Nós desenvolvemos uma técnica própria que será descrita no exemplo.

[101] Todos os parasitos detectados nesta etapa têm sua imagem armazenada para impressão no relatório final.

[102] Após análise das imagens, o computador (f) verifica se a lâmina foi inteiramente analisada (i.e., se o percurso de varredura da platina (d) chegou ao fim);

[103] Etapa .10: Platina é colocada em campo de visão ainda não visitado e reinicializa o drive de foco a lamina não tenha

sido inteiramente analisada, o computador (f) envia um comando para posicionar a platina (d) em um próximo campo de visão da lâmina ainda não visitado e reinicializa o *driver* de foco (e).

[104] Os movimentos da platina (d) são programados para cobrir todos os campos de visão da lâmina tubular.

[105] O processo de aquisição de imagem (Etapa .6), ajuste de foco (Etapa .7), armazenamento de imagens em foco (Etapa .8) e análise das imagens em foco (Etapa .9 e Etapa .10) é repetido para cada um desses campos de visão;

[106] Etapa .11: Bomba é acionada para descarte da amostra e lavagem da tubulação, onde após analisar toda a lâmina, o computador (f) aciona a bomba (a) para descartar a amostra em recipiente apropriado e limpar a tubulação para iniciar a análise do próximo resgate do sedimento;

[107] Etapa .12: Reinicializa platina e driver de foco, onde o computador (f) verifica se todo o sedimento foi analisado (i.e., se um certo número de resgates, que garanta esta tarefa, foi atingido) e, caso contrário, reinicializa a platina (d) e o *driver* de foco (e), e aciona a bomba (a) para realizar um novo resgate do mesmo sedimento (Etapa .5). O processo todo se repete para a Etapa .9, Etapa .10 e Etapa .11, até finalizar o sedimento no tubo de centrifugação;

[108] Etapa .13: Computador gera relatório com o diagnóstico, o computador (f) gera o resultado do diagnóstico do exame (imagens dos parasitos identificados) e laudo;

[109] Em seguida, o computador (f) verifica se todos os tubos foram analisados e, no caso contrário, aciona o robô para movimentar a haste da bomba (a), para iniciar o próximo exame, e realiza os demais procedimentos a partir da Etapa .4, de

início de diagnóstico.

[110] O processo se repete até que todos os tubos sejam analisados, finalizando os diagnósticos (Etapa .4 a Etapa .13).

[111] Opcionalmente, o sistema pode ser usado com controle manual (por parte do profissional de microscopia) da bomba peristáltica (a), (sem robô), platina (d), *driver* de foco (e), e câmera digital (c).

[112] Pode ainda ser usado sem platina (d) e *driver* de foco (e). Neste caso, porém, a aquisição das imagens seria completamente manual e apenas a análise das imagens seria feita automaticamente pelo computador (i.e., o diagnóstico é ainda automático).

[113] O sistema pode ainda ser simplificado para detectar a presença ou não de parasitos intestinais, ficando a determinação da espécie sob responsabilidade de um profissional de microscopia.

[114] As vantagens do sistema proposto em relação ao procedimentos adotados atualmente nos laboratórios de análises clínicas são:

[115] - Maior produtividade;

[116] - Maior sensibilidade diagnóstica;

[117] - Menor despesa com mão-de-obra;

[118] - Redução de espaço físico no laboratório de parasitologia;

[119] - Redução no uso e lavagens de utensílios;

[120] - Rapidez, praticidade e segurança diagnóstica;

[121] - Diminuição do risco de contato e contaminação do profissional de laboratório;

- [122]** - Vantagens de custo-benefício a curto e médio prazos;
- [123]** - Descarte de material analisado em recipiente apropriado para líquidos tóxicos, seguindo normas de biossegurança;
- [124]** - Inovação na liberação dos resultados através de imagens;
- [125]** - Resgate da credibilidade no diagnóstico de parasitoses intestinais por parte da classe médica, evitando o uso empírico, indiscriminado e ineficaz de medicamentos;
- [126]** - Possibilita a criação de um banco de imagens para levantamento confiável das prevalências em diferentes regiões do país;
- [127]** - Permite a quantificação dos parasitos para fins de levantamento epidemiológico.
- [128]** O sistema descrito tem sido testado para o diagnóstico automático de 18 parasitos intestinais. de 30 humanos (os mais comuns no Brasil) com a seguinte configuração:
- [129]** O *kit* parasitológico diferenciado é revelado no documento de patente de invenção PI 0104372-2, depositada em 06/08/2001, de título "KIT PARA MÚLTIPLAS COLETAS DE MATERIAL FECAL PARA ANÁLISE LABORATORIAL", onde este *kit* destaca-se dos demais *kits* comerciais e técnicas convencionais de rotina por apresentar três coletas de amostras fecais, processadas no laboratório de uma só vez, aumentando a sensibilidade diagnóstica em mais de 20%, sendo que para tal dito kit é composto dos seguintes elementos:
- [130]** - um recipiente cônico com três bocais para acoplamento de em cada qual de um recipiente para a coleta primária com pá coletora; sendo que no interior desse recipiente cônico é montado um par de telas metálicas de 400 e 200 micrometros, e um procedimento para redução de impurezas (detritos, resíduos

alimentares, microorganismos, células animais e vegetais) a base de reagentes apropriados, resultando uma lâmina microscópica com menos impurezas do que as obtidas usando as demais técnicas.

[131] O sedimento processado foi homogeneizado com solução salina fisiológica a 0,85% e solução corante à base de iodo de Lugol e uma solução clarificadora testada foi desenvolvida à base de hidróxido de potássio (KOH).

[132] Mais especificamente a solução clarificadora pode ser especificada como compreendendo um reagente gerador de cloro ativo selecionado dentre hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio ou suas misturas para gerar um teor de cloro ativo de 2 a 2,5% pp.

[133] A metodologia de análise das imagens testada é composta por etapas de: etapa de pré-processamento, etapa de segmentação com sub etapas de delineamento, com sub etapas de Quantização, Realce de borda, Localização de elipses, Watershed e união de contornos e etapa de reconhecimento, com sub etapas de classificação e divisão de componentes, ilustradas na Figura .3, e aqui descritas em detalhamento:

[134] - Etapa .1 Pré-processamento, é responsável por eliminar pequenas impurezas e realçar características da imagem que facilitarão a etapa de segmentação .2.

[135] Para tal é aplicada na lamina com amostra uma solução corante, de forma a criar um bom contraste entre o fundo da imagem, de cor azul, e os parasitos, que adquirem um tom castanho.

[136] - Etapa .2 Segmentação, visa detectar e isolar os parasitos dos demais componentes da imagem. Na prática os componentes isolados podem ser parasitos, impurezas (detritos, resíduos alimentares, microorganismos, células animais e vegetais), ou impurezas aderidas a parasitos.

[137] Essa etapa de segmentação é representada por um pipeline de parasitos, que por sua vez é representado por duas macro etapas, de delineamento e reconhecimento, onde:

[138] - Etapa .2.1 Delineamento: identifica componentes com forma elíptica ou esférica e para tal utiliza operadores baseados na Transformada Imagem-Floresta - IFT , e para tal compreende as seguintes sub etapas:

[139] - Etapa .2.1.1 Quantização, converte a imagem original colorida para 64 níveis de cor cinza;

[140] - Etapa .2.1.2 Realce de borda, Calcula a imagem de gradiente, com as bordas dos componentes realçadas;

[141] -Etapa .2.1.3 Localização de elipses, é utilizada para localizar elipses em regiões da imagem com grande chance de serem componentes elípticos ou esféricos, onde as elipses serão usadas na etapa posterior como sementes da IFT. O peso desta elipse é dado pela soma do gradiente dos pixels ao longo do contorno, dividido pelo perímetro (gradiente médio do contorno). Quanto maior o peso, mais elíptico é o componente coberto pela elipse. As medidas de comprimento e largura dos parasitos especificadas em uma base de dados para parasitas são usadas para limitar o menor e maior tamanho possível das elipses, e assim reduzir o número de elipses encontradas.

[142] - Etapa .2.1.4 Watershed , usa as elipses de maior peso, com escala da imagem original, como marcadores da "transformada de watershed", executada sobre a imagem de gradiente. Cada elipse é erodida e usada como semente interna (componente). Em todos os casos, os pixels da borda (frame) da imagem são marcados como semente externa. O uso da elipse dilatada como semente externa serve para eliminar as impurezas que encobrem parte dos parasitos. O gradiente fica fraco nas partes encobertas, e este marcador impede o vazamento do watershed por essas regiões;

[143] - Etapa 2.1.5 União de contornos, verifica se o componente segmentado possui, além do contorno externo, um contorno interno. Caso possua, há uma região de fundo de imagem no interior do componente, e o contorno interno é unido ao contorno externo no ponto de menor distância entre eles, fornecendo a medida correta das larvas, subsidiando a Etapa posterior de classificação. O delineamento gera máscaras binárias dos componentes segmentados, usadas na etapa de reconhecimento.

[144] - Etapa .2.2 Reconhecimento: também utiliza operadores baseados na Transformada Imagem-Floresta - IFT , em suas etapas, aqui descritas:

[145] - Etapa .2.2.1 Extração de características, extrai características relevantes dos componentes delineados, fazendo uso da técnica de Transformada Imagem-floresta -IFT, sendo definidas 12 características chave:

[146] - Elipsidade, calculada a elipse sobre o componente;

[147] - Razão entre maior e menor distância geodésica;

[148] - Variância das curvaturas ao longo do contorno;

- [149]** - Variância das saliências ao longo do contorno;
- [150]** - Textura do vermelho, e usado para diferenciar componentes através da variação de textura na banda vermelha da imagem original colorida;
- [151]** - Média do vermelho; calcula a média dos valores dos pixels do componente na banda vermelha da imagem original colorida;
- [152]** - Razão entre o número de mínimos regionais do gradiente e a área do componente, usa a IFT para encontrar os mínimos regionais do componente, no gradiente da imagem original;
- [153]** - Perímetro - Calcula o perímetro do componente;
- [154]** - Área, calcula a quantidade de pixels do componente;
- [155]** - Momentos - são calculados o segundo, terceiro e quarto momentos do histograma do componente quantizado em 512 níveis de cinza;
- [156]** - Etapa de classificação 2.2.2, visa reconhecer as espécies de parasitos e identificar como não-parasitos as impurezas isoladas ou aderidas a parasitos.
- [157]** Foi idealizado um classificador de padrões, que interpreta o conjunto de treinamento como um grafo completo e constrói uma floresta de caminhos ótimos, Optimum-Path Forest (OPF) sobre o grafo, balizada na técnica de Transformada Imagem-Floresta (IFT)
- [158]** Caso o componente seja classificado como uma espécie parasitária, a imagem do parasito é armazenada para a geração do relatório final.
- [159]** - Etapa 2.2.2.3 Divisão de componentes, onde os componentes classificados como não-parasitos são submetidos a uma subsegmentação (divisão de componentes) na tentativa de separar

parasitos de impurezas.

[160] Em essência a divisão de componentes trata da remoção de componentes semelhantes, realizado após a etapa 2.2 de classificação dos componentes. O software aplicativo do computador (f) procede à comparação de todos os componentes entre si, e para componentes com superposição maior que 50% é selecionado aquele com a maior pontuação do classificador. Os outros componentes com pontuação inferior são eliminados.

[161] Os subcomponentes desta divisão são sujeitos a etapa .2.2.2 de classificação, analisados novamente pelo classificador. Subcomponentes muito pequenos são eliminados e o processo se repete até não haver mais componentes para classificação.

[162] Os resultados apresentaram uma sensibilidade diagnóstica média de 82,86% bem acima da normalmente obtida nos laboratórios de análises clínicas (Le., 48,3% a 75,9%).

[163] A descrição acima da presente invenção foi apresentada com o propósito de ilustração e descrição. Além disso, a descrição não tenciona limitar a invenção a forma aqui revelada.

[164] Em consequência, variações e modificações compatíveis com os ensinamentos acima, e a habilidade ou conhecimento da técnica relevante, estão dentro do escopo da presente invenção.

[165] Assim sendo, as modalidades acima descritas tencionam melhor explicar os modos conhecidos para a prática da invenção e para permitir que os técnicos na área utilizem em tais, ou outras, modalidades, e com várias modificações necessárias pelas aplicações específicas ou usos da presente invenção.

[166] É a intenção que a presente invenção inclua todas as modificações e variações da mesma, dentro do escopo descrito no relatório e nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1ª) "SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS INTESTINAIS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS" caracterizado por conter os seguintes componentes:

- Kit parasitológico para múltiplas coletas e dupla filtragem de material fecal, formado por um recipiente cônico com três bocais para acoplamento em cada qual de um recipiente para a coleta primária com pá coletora, sendo que no interior desse recipiente cônico é montado um par de telas metálicas de 400 e 200 micrometros;
- Bomba peristáltica (a);
- Braço mecanizado (robô) para resgate de sedimentos processados;
- Microscópio óptico (b);
- Câmera digital (c) acoplada ao microscópio (b);
- Platina (d) motorizada acoplada ao microscópio (b);
- Controle driver de foco (e) do microscópio (b);
- Um computador (f) para controle da Bomba peristáltica (a), Braço mecanizado (robô), Microscópio óptico (b), Câmera digital (c), Platina (d) motorizada, Controle driver de foco (e), e
- software aplicativo, utilizado para a análise das imagens;

2ª) "ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS", cujo processo baseado no sistema definido na reivindicação .1 é **caracterizado pelas** etapas:

Etapla .1 As amostras fecais coletadas são processadas em laboratório seguindo o protocolo operacional do *kit* parasitológico, até a obtenção do sedimento fecal em um tubo de centrifugação;

Etapla .2 Cada tubo de centrifugação que contém sedimento fecal deverá ser homogeneizado com soluções, corante, a base de iodo e clarificadora, a base de base

de KOH e colocado no suporte da bomba (a);

Etapa .3 Cada tubo é identificado individualmente com o respectivo paciente e essa informação é transmitida ao computador de controle;

Etapa .4 O computador (f) envia uma sequência de comandos para os diferentes elementos do sistema: um comando para o robô posicionar a haste da bomba (a); um comando para mover a platina (d) para a posição inicial de varredura; um comando para estabelecer o foco inicial; um comando para a bomba (a) realizar um resgate de sedimento fecal; e um comando para a câmera (c) adquirir uma imagem;

Etapa .5 A imagem é analisada pelo computador (f) para verificar o foco; ao detectar uma imagem em foco, o computador (f) armazena esta imagem; todas as imagens detectadas em foco são armazenadas para análise computadorizada;

Etapa .6 O computador (f) inicia a análise das imagens armazenadas; esta análise tem por meta isolar e classificar as espécies parasitárias presentes nas imagens;

Etapa .7 Após analisar toda a lâmina, o computador (f) aciona a bomba (a) para descartar a amostra em recipiente apropriado e limpar a tubulação para iniciar a análise do próximo resgate do sedimento; e

Etapa .8 Após finalizar todo o resgate do sedimento, o computador (f) gera o resultado do exame: imagens dos parasitos identificados e laudo;

3ª) "SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS INTESTINAIS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS", de acordo com as

reivindicações 1 e 2 **caracterizado por**, opcionalmente, o sistema poder ser usado com controle manual (por parte do profissional de microscopia) da bomba (a) peristáltica (sem robô), platina (d), driver de foco (e);

4ª) "SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS INTESTINAIS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS", de acordo com as reivindicações 1 e 2 **caracterizado por** poder ser usado sem platina (d) e *driver* de foco (e); neste caso, porém, a aquisição das imagens é completamente manual e apenas a análise das imagens é feita automaticamente pelo computador (f);

5ª) "SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS INTESTINAIS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS", de acordo com as reivindicações 1 e 2 **caracterizado pelo** o sistema poder ser simplificado para detectar a presença ou não de parasitos intestinais, ficando a determinação da espécie sob responsabilidade de um profissional de microscopia; e

6ª) "SISTEMA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS INTESTINAIS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS", de acordo com as reivindicações 1 e 2 **caracterizado por** poder analisar amostras fecais de seres humanos e animais.

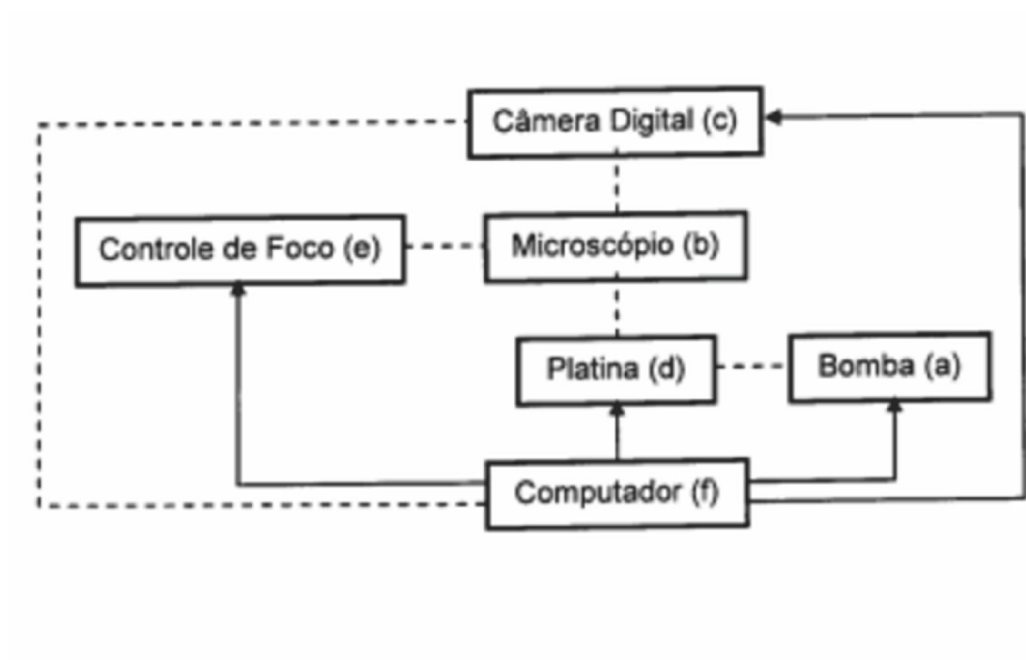
Figura .1

Figura .2

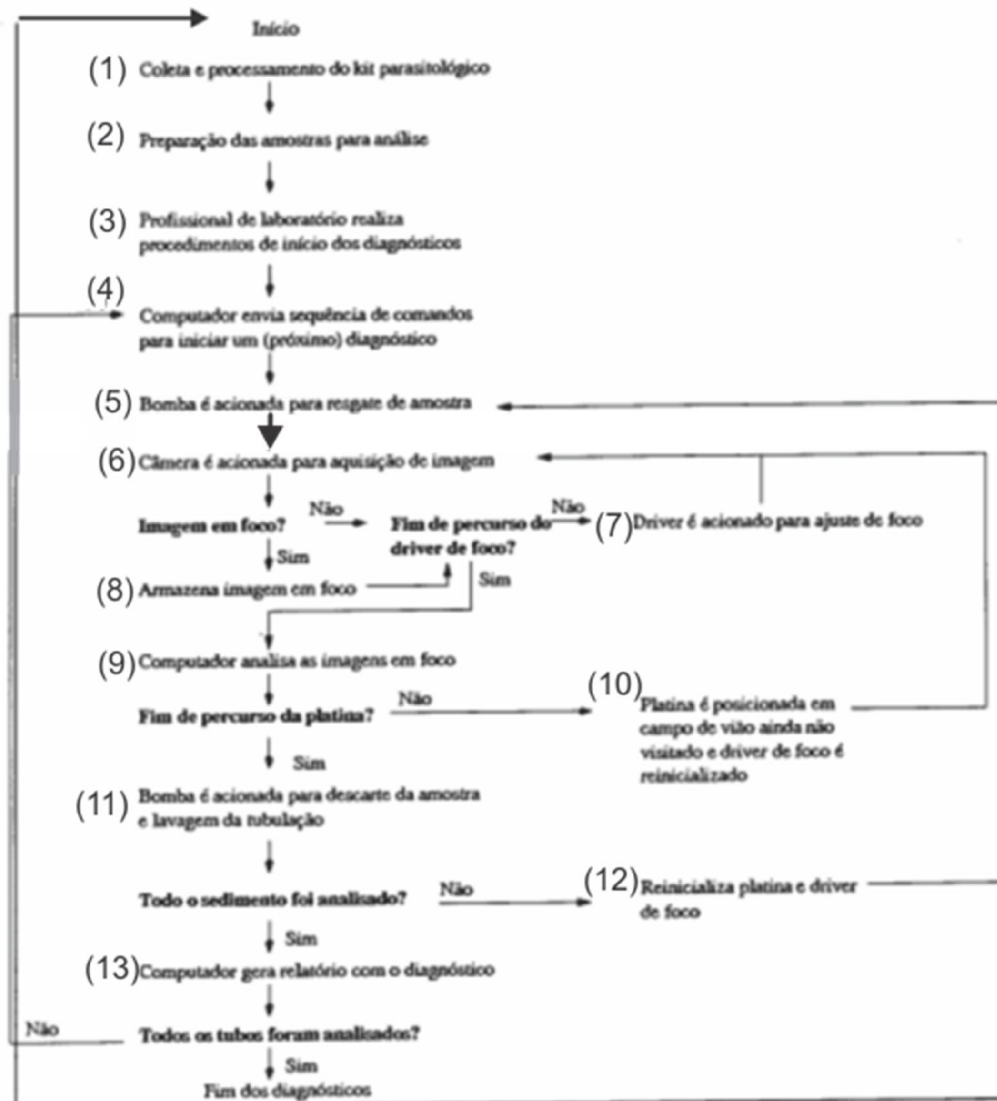


Figura .3