MARCO ANTONIO FERNANDES

**Diagnóstico da Sífilis Auxiliado por Computador: Proposta de um
Método Híbrido Fuzzy Neural para Análise de Imagem de
Fluorescência**

São Paulo
2011

MARCO ANTONIO FERNANDES

**Diagnóstico da Sífilis Auxiliado por Computador: Proposta de um
Método Híbrido Fuzzy Neural para Análise de Imagem de
Fluorescência**

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EPUSP) como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Eletricidade no Departamento de Engenharia de Computação e Sistemas Digitais (PCS).

Área de Concentração: Sistemas Digitais

Orientador: Prof. Marco Túlio Carvalho de Andrade

São Paulo
2011

Marco Antonio Fernandes

Diagnóstico da Sífilis Auxiliado por Computador: Proposta de um Método Híbrido Fuzzy Neural para Análise de Imagem de Fluorescência

p. 71.

Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Computação e Sistemas Digitais.

1. Inteligência Computacional 2. Inteligência Artificial.

I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Computação e Sistemas Digitais

DEDICATÓRIA

À minha querida família e amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família pelo apoio nos momentos em que as forças estavam acabando.

À amiga Vanessa Mota, principal incentivadora e que esteve comigo desde o processo de seleção do mestrado até a conclusão da pesquisa.

À amiga Alexandra Veiga pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo e pela amizade nessa jornada.

Aos colegas de turma pelos bons momentos de estudo e por transmitirem um pouco de sua experiência como professores e por me mostrar o quanto eu preciso aprender.

Aos colegas do Knoma pela troca de experiência e pelas contribuições para a minha pesquisa.

Ao meu orientador professor Marco Túlio por compartilhar um pouco do seu tempo nas orientações, por me ajudar a expressar meu ponto de vista em relação à pesquisa desenvolvida.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente, muito obrigado.

RESUMO

Neste trabalho foi proposto um método e desenvolvido um protótipo para analisar imagens de microscopia de fluorescência obtidas a partir do teste FTA-ABS. Este teste é utilizado como comprovação do diagnóstico da sífilis por meio da identificação da bactéria causadora da doença. Um problema considerável na análise de tais imagens é a subjetividade na interpretação da intensidade de fluorescência apresentada, pois não existe uma descrição formal desse valor, outra dificuldade encontrada trata do baixo contraste entre o objeto de estudo e o fundo da imagem e finalmente a distribuição da fluorescência sobre as bactérias não é uniforme. O método proposto para auxiliar no diagnóstico por meio de análise de imagem consiste de três etapas. A primeira etapa é a de processamento das imagens. Para tal são utilizados algoritmos para aumentar o contraste entre o fundo da imagem e o objeto em estudo. Segue-se a realização da segmentação da imagem, utilizando-se algoritmos de binarização e crescimento de regiões. A segunda etapa realizada é a de classificação de *pixels* em grupos de cores pré-definidas por meio da utilização de Redes Neurais Artificiais treinadas com o algoritmo *Backpropagation*. Nesta etapa são treinadas e testadas diversas redes. De posse de todos os pixels classificados realiza-se a interpretação do diagnóstico por meio de técnicas *fuzzy*.

ABSTRACT

In this work we have developed a prototype to analyze fluorescence microscopy images obtained from the FTA-ABS. This test is used as confirmation of the diagnosis of syphilis by identifying the bacteria causing the disease. A considerable problem in the analysis of such images is the subjectivity in the interpretation of fluorescence intensity shown, because there is not a formal description of this value, another difficulty is the low contrast between the object of study and the background and finally the distribution of fluorescence on bacteria is not uniform. The proposed methodology for the diagnosis by means of image analysis consists of three stages. The first step is to image processing. For such algorithms are used to increase the contrast between the background image and the object under study. It follows the completion of the segmentation of the image, using algorithms for binarization and region growing. The second step is performed for the classification of pixels into color groups predefined by using Artificial Neural Networks trained with the Backpropagation algorithm. At this stage several neural networks are trained and tested to classify pixels into five classes of different colors. The interpretation of these colors in the third step is accomplished through the use of fuzzy techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Morfologia das Bactérias (adaptado de TORTORA, FUNKE e CASE, 2005)	26
Figura 2 - Treponema pallidum visualizado em microscópio de campo escuro	28
Figura 3 - Bacillus anthracis visto em microscópio de fluorescência	29
Figura 4 - Mycobacterium tuberculosis visto em microscópio de fluorescência	29
Figura 5 - Imunofluorescência Direta (adaptado de VERMELHO, PEREIRA e COELHO, 2006)	30
Figura 6 - Imunofluorescência Indireta (adaptado de VERMELHO, PEREIRA e COELHO, 2006)	30
Figura 7 - Espectro visual humano (adaptado de http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm)	36
Figura 8 - O olho humano e distribuição de cones e bastonetes na retina (adaptado de http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm)	36
Figura 9 - Plano de cores aditivas (RGB) (adaptado de http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm)	38
Figura 10 - Plano de cores subtrativas (CMY) (adaptado de http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm)	39
Figura 11 - Modelo de cores HSB	40
Figura 12 - Nove pixels em tons de cinza	40
Figura 13 - Conectividade de pixel	41
Figura 14 - O neurônio biológico	46
Figura 15 - O neurônio artificial	47
Figura 16 - Arquiteturas de redes neurais artificiais	48
Figura 17 - Perceptron com múltiplas camadas	52
Figura 18 - Esquema de treinamento Backpropagation	53
Figura 19 - Modelo de lâmina utilizada no teste FTA-ABS	65
Figura 20 - Estudos para entendimento do domínio do problema	69
Figura 21 - Variação de tons de verde	71
Figura 22 - Etapas da proposta de solução	73
Figura 23 - Cubo RGB (adaptado de http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00020)	75
Figura 24 - Realce da Imagem	76
Figura 25 - Testes com diferentes valores de threshold para binarizar imagens	78
Figura 26 - Imagem binarizada de um exame	79
Figura 27 - Correspondência entre as imagens binarizada e original	81
Figura 28 - Rede neural para a classificação de pixels	82
Figura 29 - Interface para criação do conjunto de treinamento	83
Figura 30 - Resultado do treinamento das redes após 2000 ciclos de iterações	85
Figura 31 - Resultado do treinamento das redes após 4000 ciclos de iterações	86
Figura 32 - Resultado do treinamento das redes após 6000 ciclos de iterações	86
Figura 33 - Modelo da máquina de inferência nebulosa	88
Figura 34 - Variável de entrada para modelar a concentração de pixels amarelos	90
Figura 35 - Variável de entrada para modelar a concentração de pixels brancos	90
Figura 36 - Variável de entrada para modelar a concentração de pixels verdes	91
Figura 37 - Função de pertinência triangular	92

Figura 38 - Função de pertinência trapezoidal.....	93
Figura 39 - Metades esquerda e direita da função de pertinência trapezoidal.....	93
Figura 40 - Base de regras	95
Figura 41 - Variável de saída para representar o diagnóstico	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do método proposto	97
Tabela 2 - Amostra de valores de pixels utilizados no conjunto de treinamento.....	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Exames sorológicos para sífilis e condições associadas a falsos resultados positivos (adaptado de MIMS, DOCKRELL, et al., 2005).....	33
Quadro 2 - Estágios da doença e patogênese (adaptado de MIMS, DOCKRELL, et al., 2005).....	34
Quadro 4 - Algoritmo para realce de imagem	76
Quadro 5 - Algoritmo para conversão de pixel colorido para um tom de cinza.....	77
Quadro 6 - Algoritmo para binarização de imagem.....	80
Quadro 7 - Valores dos neurônios das camadas de entrada e saída	83
Quadro 8 - Faixa de valores RGB para definir conjunto de treinamento da Rede Neural	84
Quadro 9 - Exemplos de redes neurais treinadas para classificar pixels	Error!
Bookmark not defined.	
Quadro 10 - Definição das variáveis linguísticas	89
Quadro 11 - Base de regras para definir a fluorescência das imagens	94

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE QUADROS	10
SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Justificativas da Pesquisa	17
1.2 Objetivos	18
1.3 Trabalhos Correlatos	19
1.4 Métodos e Técnicas	20
1.5 Estrutura do Texto	22
2. CONCEITOS DE MICROBIOLOGIA	24
2.1 Microbiologia e Campos de Ação	24
2.1.1 Bactérias	25
2.1.2 Características das Bactérias	25
2.1.2 Observação dos Microrganismos Através do Microscópio	26
2.1.3 Microscopia Óptica	27
2.1.4 Microscópio de Campo Escuro	27
2.1.5 Microscópio de Fluorescência	28
2.2 Sífilis	31
2.2.1 Estágios da doença	31
2.1.3 Diagnóstico Laboratorial da Sífilis	32
2.1.4 Tratamento	33
3. TÉCNICAS DE INTELIGÊNCIA COMPUTACIONAL	35
3.1 Processamento e Análise de Imagem	35
3.1.1 O Sistema Visual Humano	35

3.1.2 Modelo de cores	37
3.1.3 Cores aditivas.....	37
3.1.4 Cores subtrativas	38
3.1.5 Modelo de cores HSB	39
3.1.6 Definição de imagem digital	40
3.1.7 Processamento de Imagem	41
3.1.8 Segmentação de Imagem	42
3.1.8.1 Binarização da imagem.....	42
3.1.8.2 Crescimento de região	43
3.2 Redes Neurais Artificiais	44
3.2.1 Neurônio Biológico	45
3.2.2 Neurônio Artificial	46
3.2.3 Arquiteturas de RNA	47
3.2.4 Processos de Aprendizado	49
3.2.5 Treinamento Supervisionado	50
3.2.6 O Modelo Perceptron Multi-Camadas.....	51
3.2.7 Algoritmo Backpropagation	52
3.2.8 Etapas para o Desenvolvimento de Aplicações de Redes Neurais	53
3.2.8.1 Coleta de Dados e Separação em Conjuntos	54
3.2.8.2 Configuração da Rede	54
3.2.8.3 Treinamento	55
3.2.8.4 Teste	56
3.2.8.5 Integração	56
3.3 Teoria Fuzzy	56
3.3.1 Introdução	56
3.3.2 Variáveis lingüísticas.....	57
3.3.3 Base de Regras.....	57
3.3.4 Fuzificação	58
3.3.5 Inferência.....	58
3.3.6 Defuzificação.....	59
3.3.6.1 Defuzificação Centro-da-Área.....	60
3.3.6.2 Defuzificação Centro-do-Máximo.....	60
3.3.6.3 Defuzificação Média-do-Máximo.....	61
3.3.6.7 Configuração básica de um sistema fuzzy	61
4. ESPECIFICAÇÃO DO PROBLEMA.....	63
4.1. Introdução	63
4.2 Detalhamento do problema	63
4.3 Teste não-específico VDRL	64
4.4 Teste específico FTA-ABS.....	64
4.4.1 Controle de qualidade na preparação das lâminas	65
4.4.2 Interpretação das lâminas e definição do diagnóstico	66
4.4.3 Limitações da técnica da imunofluorescência indireta	67
4.5 Problemas relacionados ao desenvolvimento da pesquisa.....	67
4.5.1 Aquisição do conhecimento	67
4.5.2 Aquisição das imagens para validar as técnicas propostas nesta pesquisa.....	69
4.5.3 O problema da classificação das cores	70
5. DESENVOLVIMENTO DA SOLUÇÃO.....	72

5.1 Introdução	72
5.2 Ambiente da aplicação	74
5.3 Aquisição das imagens utilizadas na simulação	74
5.4 Processamento Digital das Imagens	74
5.4.1 Realce de imagens	75
5.4.2 Binarização da Imagem	77
5.4.3 Remoção de Ruídos e Localização das Bactérias na Imagem	80
5.4 Rede Neural para a Classificação dos Pixels	81
5.4.1 Criação do Conjunto de Treinamento	82
5.4.2 Treinamento e Avaliação da Rede Neural	85
5.5 Interpretação do Diagnóstico por meio da Teoria <i>Fuzzy</i>	87
5.5.1 Variáveis de Entrada	88
5.5.2 Fuzificação dos Dados	91
5.5.3 Base de Regras	94
5.5.4 Variável de Saída	95
5.6 Resultados Experimentais	96
5.6.1 Análise de exames positivos	97
5.6.2 Análise de exames negativos	98
5.6.3 Análise de exames indeterminados	99
5.6.4 Treinamento da Rede Neural	100
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
6.1 Cumprimento dos Objetivos	102
6.2 Considerações Gerais	103
6.3 Trabalhos Futuros	105
7. REFERÊNCIAS	106
8. GLOSSÁRIO	110

1. INTRODUÇÃO

A sífilis é uma doença infecciosa crônica causada por uma bactéria chamada *Treponema pallidum*, caracterizada por períodos sintomáticos e assintomáticos (SANTOS, *et al.*, 2007). A transmissão ocorre freqüentemente por via sexual e placentária e o tratamento é realizado com o uso de penicilina.

De acordo com o Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis (1999) a doença é classificada em: sífilis primária, secundária, terciária e congênita

O diagnóstico da sífilis é baseado na avaliação clínica, na identificação do agente etiológico e nos testes sorológicos. Geralmente utiliza-se o teste sorológico para obtenção do diagnóstico, pois na maioria das vezes em que o paciente procura o serviço de saúde a doença já não mais se encontra na fase inicial, cujo principal sintoma é o surgimento da úlcera ou cancro.

Os testes sorológicos são o único meio de identificação para a forma latente da sífilis adquirida, na qual não se observa a presença de sintomas clínicos que sugiram a presença da doença (SANTANA, *et al.*, 2006).

Quando uma pessoa é infectada pela bactéria causadora da sífilis o organismo inicia a produção de anticorpos específicos e não específicos.

Anticorpos não específicos (denominados de reaginas) reconhecem os lipídios originários do treponema que são liberados dos tecidos lesionados do indivíduo infectado. Os testes para detecção destes anticorpos são do tipo não treponêmicos como o VDRL.

Anticorpos específicos (anti-treponema) que são evidenciados por meio de testes treponêmicos com o FTA-ABS, TPHA ou os métodos imunoenzimáticos.

Dois grupos de testes sorológicos são utilizados para o diagnóstico com o objetivo de identificar anticorpos específicos e não específicos (SANTANA, *et al.*, 2006):

- a) testes antigênicos não treponêmicos;
 - 1) VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*),
 - 2) RPR (*Rapid Plasm Reagin*),

- b) testes treponêmicos ou pesquisa de anticorpos verdadeiros;
 - 1) FTA-ABS (*Fluorescent Treponema Antigen Absorvent*),
 - 2) MHA-TP (Micro Hemo-Aglutinação para *Treponema pallidum*),
 - 3) ELISA (Enzimaimunoensaio para anticorpo anti-*Treponema*),
 - 4) PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

Embora o VDRL não seja imunologicamente específico para a sífilis e também não seja o mais sensível, é o teste de triagem mais empregado no Brasil (AZEVEDO, *et al.*, 2006). O VDRL é utilizado em larga escala nos laboratórios de análises clínicas e serviço de hemoterapia, possui baixo custo e facilidade na execução além de ser utilizado para o acompanhamento do tratamento da doença. O VDRL, no entanto, está sujeito a resultados falsos negativos e positivos. Uma grande produção de anticorpos, principalmente na sífilis secundária, pode determinar o chamado fenômeno pró-zona, que ocorre devido a uma grande quantidade de anticorpos presentes no soro puro, tornando a reação negativa ou fracamente reagente no teste VDRL.

O FTA-ABS constitui o teste treponêmico (teste específico) mais empregado na sorologia para sífilis (AZEVEDO, *et al.*, 2006), sendo sua execução dividida em duas fases:

- a) a primeira fase consiste em absorver os anticorpos inespecíficos resultantes de outros treponemas não patogênicos;
- b) na segunda fase, incuba-se o soro absorvido em retículos de uma lâmina de imunofluorescência contendo *Treponema pallidum* fixados. A reação antígeno-anticorpo é revelada após a adição de um anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado a uma substância utilizada para coloração.

Utiliza-se microscópio de fluorescência para analisar as lâminas preparadas no teste FTA-ABS. Em caso de reação positiva, a presença de anticorpos específicos para sífilis é evidenciado pela emissão de fluorescência verde dos treponemas marcados na lâmina.

Apesar de o FTA-ABS ser um dos testes específicos para sífilis mais utilizados para confirmar a doença, existem alguns problemas a serem considerados (SANTANA, *et al.*, 2006): processo de preparação do exame

complexo; o exame não está disponível como exame de rotina; possui alto custo; não é adequado para avaliação da resposta terapêutica.

O uso de microscópio para observação direta de bactérias é uma técnica atraente, contudo, as principais desvantagens do método são a baixa sensibilidade, fadiga do profissional após uso prolongado do microscópio e, em alguns casos, a dificuldade de diferenciação entre resíduos e bactérias.

Além dos problemas apresentados existe o desafio da interpretação do exame quanto à intensidade da coloração observada na visualização em microscópio: a experiência do profissional responsável é colocada a prova a cada exame, pois é necessário determinar a intensidade da fluorescência e classificá-la em quatro valores possíveis (inexistente, fraca, moderada e forte). Esta classificação determina o resultado do exame que deve ser positivo, negativo ou indeterminado.

Mesmo profissionais experientes estão sujeitos a dúvidas quanto à determinação do resultado do exame, pois é comum encontrar exames que apresentam uma intensidade de fluorescência que não é fraca o suficiente para que leve ao resultado negativo nem forte o suficiente para que leve ao resultado positivo. Nesses casos o profissional pode solicitar a opinião de outro especialista para que juntos possam determinar o resultado do exame ou realizar novamente todo o procedimento de preparação da lâmina (média de três horas) para comprovar o resultado.

Pelo exposto fica claro que o diagnóstico do teste FTA-ABS é obtido através de inspeção visual das imagens de microscopia de fluorescência. Esta análise é feita de forma subjetiva e o resultado é dependente do profissional que a efetua. O ideal seria uma solução computacional para auxiliar o profissional na realização desse trabalho. Dessa maneira, o resultado seria mais preciso e independente do profissional o que possibilitaria fazer um diagnóstico exato e possivelmente aplicar uma terapia mais adequada ao tratamento da doença.

Esta pesquisa propõe a criação de um método computacional para análise das imagens de microscopia de fluorescência, obtidas como produto final do teste FTA-ABS, com o objetivo de auxiliar o profissional na interpretação da intensidade de fluorescência fornecendo um subsídio a mais para o diagnóstico da sífilis.

Muitos pesquisadores investigam a possibilidade de integração de duas ou mais técnicas de inteligência computacional na resolução prática de problemas complexos. É neste contexto que se propõe, para a geração deste método computacional, uma solução híbrida que utiliza uma rede neural para classificar os *pixels* das imagens em classes de cores pré-definidas e a teoria fuzzy para interpretar a forte subjetividade na análise de cores levando-se em conta a natureza lingüística na qual as variáveis são expressas (intensidade de fluorescência fraca, moderada e forte).

1.1 Justificativas da Pesquisa

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos para análise de imagens de microscopia de fluorescência (NARAYANASWAMY, et al., 2010; DZYUBACHYK, et al., 2010) dada sua importância na área da biologia e das ciências biomédicas.

Muitos estudos biológicos realizam análise de imagens de populações celulares por meio do uso de microscópio. Especialmente quando o objetivo é estudar fenômenos intracelulares, microscopia de fluorescência geralmente é usada para tais estudos, permitindo aos biólogos realizar experimentos com alta sensibilidade e especificidade (DZYUBACHYK, et al., 2010).

No campo da imunologia utiliza-se a microscopia de fluorescência para identificar a presença de anticorpos específicos para uma determinada patologia dentre as quais se destaca a sífilis que é o objetivo desta pesquisa (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Com o avanço da tecnologia, tem-se realizado pesquisas para a automatização de exames que utilizam imagens de microscopia (COSTA, *et al.*, 2008; RICHETTO, 2007), com objetivo de obter resultados padronizados e maior velocidade na análise. Diversas técnicas de tratamento de imagens foram desenvolvidas nos últimos anos, alcançando resultados satisfatórios.

A realização desta pesquisa se justifica pela necessidade de uma solução computacional para padronizar a interpretação da característica cor em imagens obtidas pelo método da imunofluorescência indireta. O teste FTA-ABS, utilizado

para confirmar o diagnóstico da sífilis, determina que o diagnóstico deva ser interpretado de acordo a intensidade de fluorescência observada em microscópio, mas, esta é uma avaliação que depende de interpretação subjetiva, portanto o resultado pode variar de um profissional para outro. Sendo este um teste de caráter confirmatório cujo processo de preparação é complexo e de custo elevado (SANTANA, *et al.*, 2006) têm-se a motivação da busca de uma solução eficaz para instabilidade dos diagnósticos atuais utilizando-se da exatidão e eficiência da área computacional em prol da melhoria na confiabilidade dos serviços de saúde.

Há uma forte subjetividade na avaliação de cores e estas são expressas de forma lingüística. Quando uma pessoa se refere à cor, são utilizadas expressões como: verde claro, verde escuro, amarelo, amarelo queimado entre outras. Dessa forma acredita-se que a Teoria *Fuzzy* torna-se bastante apropriada na tarefa de avaliar esta subjetividade, pela sua característica de descrever estes atributos lingüísticos de cores na forma de conjuntos nebulosos (ZADEH, 1973), porém uma solução computacional precisa analisar cores utilizando números que representam estas cores, como por exemplo, o padrão de cores RGB. Trabalhos anteriores mostram a utilização de redes neurais para a extração de característica de cores em imagens digitais, pela sua capacidade de aprender por meio de exemplos e sua capacidade de generalização para situações em que a rede não foi treinada (MITCHELL, 1997). Pelas características do problema apresentado acredita-se que uma solução híbrida utilizando rede neural e teoria fuzzy seja aplicada no contexto dessa pesquisa.

A pesquisa realizada possui a potencialidade de se aplicar ao diagnóstico de outras doenças, como a doença da imunodeficiência adquirida HIV, que segundo Ferreira, *et al.* (1997) utiliza a técnica da imunofluorescência indireta no teste confirmatório.

1.2 Objetivos

Entre os objetivos desta pesquisa está o de desenvolver uma ferramenta computacional para identificação do *Treponema Pallidum* por meio de análise de

imagens de microscopia de fluorescência para auxiliar o diagnóstico da sífilis. Este objetivo pode ser detalhado no cumprimento das seguintes metas intermediárias:

- ✓ Propor o uso de técnicas de Inteligência Computacional para a solução do problema do diagnóstico;
- ✓ Propor uma técnica para mapear o raciocínio do especialista na determinação do diagnóstico
- ✓ Identificar os padrões de fluorescência necessários para a determinação do diagnóstico
- ✓ Implementar um conjunto de ferramentas computacionais para aplicação das técnicas propostas;
- ✓ Avaliar a eficiência das técnicas propostas utilizando como estudo de caso os exames realizados por um laboratório de imunologia localizado em Manaus no Estado do Amazonas.

1.3 Trabalhos Correlatos

Vários autores têm proposto diferentes métodos para automatização ou semi-automatização do processo de análise de bactérias utilizando imagens digitais. A pesquisa realizada por Demantova, Sakamoto e Ioshii (2001) apresenta um método para segmentar bactérias a partir de análise de cores e de uma matriz de desvio padrão. Com essas informações são estabelecidos parâmetros necessários para seleção de todas as regiões da imagem que contenham bactérias. Alguns destes parâmetros foram:

- a) as regiões do fundo da imagem e das bactérias apresentam intensidade, cor e textura homogêneas;
- b) as regiões contendo bactérias apresentam maiores níveis de intensidade nos canais de cor vermelha e verde, com ausência da cor azul;
- c) o tamanho mínimo das bactérias é $8\mu m$ e partículas menores que este tamanho são consideradas ruídos.

O algoritmo implementado foi dividido em uma etapa de pré-processamento para descobrir as regiões que continham bactérias, em uma fase

seguinte foi realizada a segmentação que consiste em separar a imagem em regiões de interesse e finalmente, selecionadas as regiões que continham bactérias utilizou-se o processo de limiarização automática conhecido como Kapur. A pesquisa obteve bons resultados frente às imagens utilizadas para validar o método, porém não foi possível segmentar as bactérias em imagens em que a bactéria apresentava baixa fluorescência.

Xiong et. al (2006) propôs um método para segmentação de núcleo e citoplasma em imagens de fluorescência. O método apresentado é composto de uma etapa de pré-processamento, pois o autor afirma que nenhum sistema de aquisição de imagem é perfeito: existem ruídos na imagem, problemas com iluminação, imagem fora de foco, entre outros. Assim como em outras pesquisas, são estabelecidas algumas regras para a implementação do algoritmo de segmentação do núcleo da célula, onde o principal atributo é definir os tamanhos máximo e mínimo para o núcleo. Quando uma área candidata a núcleo é menor que o valor mínimo esta área é classificada como ruído e quando a área candidata é maior que o valor máximo, esta é desconsiderada.

Os problemas encontrados para a segmentação do citoplasma também são apresentados na pesquisa, os principais problemas apontados são:

- a) variação na intensidade de fluorescência no interior da célula;
- b) o agrupamento das células.

Algoritmos conhecidos da área de processamento de imagens como *region growing* (crescimento de região) não mostraram resultados relevantes.

Os trabalhos pesquisados mostram técnicas para identificar objetos em imagens de fluorescência. Estes trabalhos possuem em comum a etapa de pré-processamento da imagem para eliminação de ruídos, mas não consideram a intensidade de fluorescência como o objetivo da pesquisa.

1.4 Métodos e Técnicas

Para alcançar os objetivos da pesquisa se faz necessária a execução de atividades que levam à construção do protótipo para validar a solução proposta nesta pesquisa.

Foram realizadas visitas ao laboratório para fazer o levantamento de dados a respeito e entender o ambiente na qual a pesquisa está inserida. O estudo se concentrou em seis aspectos principais:

- a) Conhecer a doença: foram realizadas pesquisas para entender o que é a sífilis, as formas de transmissão, os tipos ou estágios da doença, entre outras informações relevantes.
- b) As formas de diagnosticar: foram realizadas pesquisas para conhecer as técnicas existentes, a forma como funcionam, os testes específicos e não específicos.
- c) Estudos sobre microbiologia: para melhorar a qualidade das reuniões de levantamento de dados e para facilitar a delimitação do escopo da pesquisa foram realizados estudos sobre os conceitos de microbiologia, os tipos de microscopia existentes, quando optar por um tipo ou outro de microscópio na realização do diagnóstico e outros conceitos considerados importantes para o entendimento do problema.
- d) Imunologia: para entender o princípio das técnicas utilizadas nos diagnósticos foi necessária a realização de estudos sobre imunologia, foram realizadas consultas em livros, vídeos explicativos e reuniões para esclarecimentos de dúvidas na qual todos os conceitos estudados foram apresentados ao especialista para que não houvesse dúvidas.
- e) Entender a rotina do especialista no processo de realização do exame: com o entendimento dos conceitos partiu-se para a fase de observação no ambiente do especialista, nesta etapa da pesquisa o especialista explicou todo o procedimento realizado na realização do exame e demonstrou como a análise deveria ser realizada na prática.
- f) Entendimento das cores: foram feitos questionamentos a respeito da cor observada na análise dos exames para que fosse possível entender o motivo pelo qual a cor observada é o verde e não vermelho ou amarelo como acontece em outros exames.

Foram realizadas pesquisas bibliográficas para identificar projetos semelhantes ao proposto nesta pesquisa.

Para a construção da solução computacional foram realizados estudos na área de processamento digital de imagens, redes neurais artificiais e teoria *fuzzy*.

Depois do levantamento do referencial teórico partiu-se para a construção do protótipo computacional para validar a solução proposta utilizando como base de simulação um banco de imagens simuladas de exames previamente classificados pelo especialista como resultados de exames positivos negativos e indeterminados.

Após a implementação do protótipo iniciaram-se os testes com para validar o desempenho do protótipo frente às imagens apresentadas para que fossem realizadas as análises.

Por fim, relatar os resultados obtidos dos experimentos computacionais, as conclusões obtidas, necessidades de melhorias, entre outros.

1.5 Estrutura do Texto

Para facilitar o entendimento e a compreensão do trabalho é de fundamental importância descrever os conceitos básicos empregados na pesquisa.

No capítulo 2 são apresentados alguns tópicos sobre microbiologia, bactérias, tipos de microscopia, a sífilis e as formas de diagnosticar a doença, pois estes tópicos são necessários para a compreensão do domínio do problema.

No capítulo 3 abordam-se alguns conceitos referentes ao processamento de imagens digitais em âmbito global, são abordados alguns itens como definição de imagem digital, canais de cores e algoritmos para segmentação de imagem. São introduzidos conceitos de Inteligência Computacional, na qual são abordados as Redes Neurais Artificiais e a Teoria Fuzzy

O capítulo 4 aborda os problemas relacionados ao diagnóstico da doença, dificuldades encontradas na fase de levantamento de dados para que fosse possível entender o domínio do problema.

O capítulo 5 apresenta em detalhes a solução computacional dividida em três fases: a fase de processamento de imagens, a fase de classificação dos *pixels* por

meio de uma rede neural artificial e a interpretação do diagnóstico por meio da teoria *fuzzy*. Neste capítulo também são apresentados os resultados das simulações.

O capítulo 6 relata as considerações finais, oportunidades de melhorias, contribuições da pesquisa e os trabalhos futuros.

No capítulo 7 são encontradas as referências bibliográficas seguida de um pequeno glossário que abrange os termos da área de microbiologia que foram utilizados no texto.

2. CONCEITOS DE MICROBIOLOGIA

Neste capítulo são abordados os conceitos da área de microbiologia, conceitos necessários para o entendimento do estudo de caso escolhido para a pesquisa.

2.1 Microbiologia e Campos de Ação

A microbiologia é o estudo dos micróbios, organismos tão pequenos que um microscópio se faz necessário para estudá-los. Estes incluem as bactérias, as algas, os fungos, os vírus e os protozoários (BLACK, 2002).

Os microbiologistas estudam diversos tipos de problemas que envolvem os micróbios. Alguns estudam micróbios principalmente para descobrir mais sobre um tipo específico de organismo, os estágios de vida de um determinado fungo, por exemplo. Outros microbiologistas focalizam diretamente problemas práticos, tais como purificar ou sintetizar um novo antibiótico ou desenvolver uma vacina contra uma doença específica.

Do ponto de vista das ciências da saúde, a pesquisa de hoje é a fonte das novas tecnologias do futuro. Existem pesquisas em diversas áreas da saúde como imunologia, virologia, quimioterapia e genética (BLACK, 2002).

A pesquisa em imunologia está aumentando o conhecimento de como os micróbios acionam as respostas do hospedeiro e como os micróbios escapam dessas respostas, essas pesquisas contribuem para o desenvolvimento de novas vacinas e no tratamento de ordens imunológicas.

A pesquisa em virologia está melhorando o conhecimento de como os vírus causam infecções e como eles estão relacionados ao câncer.

A pesquisa na quimioterapia está aumentando o número de drogas disponíveis para o tratamento de infecções e também aumentando o conhecimento de como essas drogas funcionam.

Finalmente pesquisas em genética estão trazendo novas informações sobre transferências de informações genéticas e, especialmente, como as informações genéticas atuam em nível molecular.

Para o entendimento desta pesquisa é necessário o conhecimento sobre um tipo específico de micróbio, as bactérias, pois a sífilis é causada por uma bactéria chamada *Treponema pallidum*. Nos tópicos seguintes serão apresentadas características importantes da morfologia das bactérias e as técnicas utilizadas para observação na realização de exames.

2.1.1 Bactérias

As bactérias são organismos relativamente simples, de uma única célula (unicelulares) cujo material genético não está envolto por uma membrana nuclear especial. Por esta razão, as bactérias são denominadas procariotos, que em grego significa pré-núcleo (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

2.1.2 Características das Bactérias

As células bacterianas assumem vários formatos. Os cocos de forma esférica ou oval, os bacilos em forma de bastão, e os espiros também conhecidos como espiroquetas (forma de saca-rolhas ou curvada) estão entre as formas mais comuns. As bactérias individuais podem formar pares, grupos, cadeias ou outros agrupamentos; tais formações são geralmente características de um gênero particular ou de uma espécie de bactéria. A figura 1 ilustra as formas mais comuns de bactérias

Figura 1- Morfologia das Bactérias (adaptado de TORTORA, FUNKE e CASE, 2005)

As bactérias são envolvidas por uma parede celular que é composta por um complexo de carboidrato e proteína denominado peptidoglicana.

As bactérias geralmente se reproduzem pela divisão de uma célula em outras idênticas; esse processo é chamado de fissão binária. Para sua nutrição, muitas bactérias utilizam compostos orgânicos encontrados na natureza a partir de organismos vivos ou mortos. Para se locomoverem bactérias contam com os flagelos, que são pequenos cílios que ficam em movimento, fazendo a bactéria se mover (semelhante ao espermatozóide humano). Também podem possuir fímbrias, que são microfibrilhas protéicas que se estendem da parede celular, essa estrutura auxilia as bactérias patogênicas a se fixarem no hospedeiro (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

2.1.2 Observação dos Microrganismos Através do Microscópio

Os microorganismos são pequenos demais para serem vistos a olho nu, sua observação só é possível através de um microscópio. Os microbiologistas utilizam microscópios que produzem ampliações com grande clareza.

Existem diferentes tipos de microscópio, é importante saber o tipo de microscópio apropriado para a realização de um exame. Alguns microrganismos são mais visíveis que outros, devido ao seu tamanho maior ou às características mais facilmente observáveis, muitos deles devem sofrer vários procedimentos de coloração antes que suas paredes celulares, membranas e outras estruturas percam seu estado natural, incolor.

2.1.3 Microscopia Óptica

Microscopia óptica se refere à utilização de qualquer tipo de microscópio que faça uso da luz para observar espécimes (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005). Os microscópios ópticos mais conhecidos são: Microscópio Óptico Composto, Microscópio de Campo Escuro, Microscópio de Contraste de Fase, Microscópio de Contraste com Interferência Diferencial (CID), Microscópio de Fluorescência e Microscópio Confocal.

Serão destacados nesse trabalho apenas os dois tipos de microscópio óptico utilizados para identificação do *Treponema pallidu*., o microscópio de campo escuro e a microscópio de fluorescência.

2.1.4 Microscópio de Campo Escuro

Um microscópio de campo escuro é usado para examinar microrganismos vivos que são invisíveis ao microscópio óptico comum e que não podem ser corados por métodos-padrão ou que são tão distorcidos pela coloração que suas características não podem ser identificadas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Ao invés do condensador normal, um microscópio de campo escuro utiliza um condensador de campo escuro, que contém um disco opaco. O disco bloqueia a luz que penetraria diretamente na lente objetiva e somente a luz que é refletida pela amostra penetra nesta lente. Uma vez que não existe luz de fundo direta, a amostra aparece como luz contra um fundo negro – campo escuro. Essa técnica é frequentemente usada para examinar microrganismos não corados suspensos em líquido, ou seja, nessa modalidade de microscopia o profissional realiza a coleta de uma amostra e visualiza-a diretamente no microscópio sem um processo de preparação de lâminas. A figura 2 apresenta um *Treponema pallidum* visualizado em microscópio de campo escuro.

Figura 2 - *Treponema pallidum* visualizado em microscópio de campo escuro

2.1.5 Microscópio de Fluorescência

A microscopia de fluorescência é baseada na utilização de corantes fluorescentes. Tais corantes são capazes de absorver luz de um determinado comprimento de onda (ultravioleta) e produzir luz em um comprimento de onda maior, visível ao olho humano.

Alguns organismos fluorescem naturalmente sob iluminação ultravioleta. Se a amostra a ser examinada não fluoresce naturalmente, é corada com um dos corantes fluorescentes denominados fluorocromos. Quando os microrganismos corados com um fluorocromo são examinados sob um microscópio de fluorescência, com uma fonte de luz ultravioleta ou próxima da ultravioleta, estes são revelados na forma de objetos brilhantes contra um fundo escuro (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Os fluorocromos têm atrações especiais por diferentes microrganismos. Por exemplo, o fluorocromo Auramina O, apresenta um brilho amarelo quando exposto à luz ultravioleta, este é fortemente absorvido pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a bactéria que causa tuberculose (figura 4). O *Bacillus anthracis*, o agente causador do antraz (carbúnculo), adquire cor verde-maçã quando corado com outro fluorocromo, o isoticianato de fluoresceína (FITC) (figura 3).

Figura 3 - Bacillus anthracis visto em microscópio de fluorescência

Figura 4 - Mycobacterium tuberculosis visto em microscópio de fluorescência

A microscopia de fluorescência é uma técnica diagnóstica denominada técnica de anticorpo fluorescente (AF) ou imunofluorescência e baseia-se na busca de anticorpos que se ligam aos antígenos presentes no organismo. Os anticorpos são moléculas de defesa natural e são produzidas pelos seres humanos e muitos animais quando em contato com uma substância estranha, ou antígeno.

A modalidade de microscopia de fluorescência mais utilizada em laboratórios de diagnóstico é a imunofluorescência, na qual a marcação de uma determinada molécula é feita com o uso de anticorpos específicos conjugados a fluorocromos. Existem dois tipos de imunofluorescência: a direta e a indireta.

Na imunofluorescência direta o fluorocromo é ligado diretamente ao anticorpo específico (anticorpo primário) que reconhece a molécula que se deseja detectar (figura 5). A reação de marcação se faz com uma única incubação de amostra na presença do anticorpo primário (VERMELHO, PEREIRA e COELHO, 2006).

Figura 5 - Imunofluorescência Direta (adaptado de VERMELHO, PEREIRA e COELHO, 2006)

Na imunofluorescência indireta (figura 6) faz-se a incubação da amostra com o primeiro anticorpo, em seguida, uma segunda incubação na presença de um anticorpo secundário (reconhece o anticorpo primário) previamente conjugado a um fluorocromo (VERMELHO, PEREIRA e COELHO, 2006).

Figura 6 - Imunofluorescência Indireta (adaptado de VERMELHO, PEREIRA e COELHO, 2006)

Na maioria das vezes, as imunofluorescências são do tipo indireta, pois normalmente a quantidade de anticorpo primário é pequena e um pouco da sua atividade pode ser perdida durante o processo de marcação com o anticorpo. As marcações indiretas têm como vantagem o uso de um mesmo anticorpo secundário para revelar diferentes antígenos e a amplificação da reação (na figura 6 é possível observar que sobre um anticorpo primário existem pelo menos dois anticorpos secundários), o que facilita a observação das marcações em imunofluorescência.

A técnica de imunofluorescência pode detectar bactérias ou outros microrganismos patogênicos mesmo dentro das células, dos tecidos ou de outras amostras clínicas. Além disso, pode ser usada para identificar um micróbio em poucos minutos. A imunofluorescência é especialmente útil no diagnóstico de sífilis e raiva.

2.2 Sífilis

A sífilis é uma doença infecciosa crônica causada pela espiroqueta *Treponema pallidum*, caracterizada por períodos sintomáticos e assintomáticos (SANTOS, *et al.*, 2007). A transmissão ocorre freqüentemente por via sexual e placentária e o tratamento preconiza o uso de penicilina.

O *Treponema pallidum* está intimamente ligado aos treponemas que causam as infecções não-venéreas como a pinta e a boubá. O *Treponema pallidum* tem uma distribuição global e a sífilis se mantém como um problema (é a terceira DST bacteriana mais frequente nos EUA), especialmente em países em desenvolvimento, devido às sérias seqüelas e o risco de infecção congênita.

O *Treponema pallidum* penetra no corpo através da pele ou mucosas. A transmissão requer contato pessoal próximo porque o organismo não sobrevive muito tempo fora do corpo, além de ser muito sensível ao ressecamento, ao calor e a desinfetantes. A disseminação horizontal ocorre através de contato sexual, e a disseminação vertical ocorre via infecção transplacentária do feto. A bactéria se multiplica bem lentamente e o período médio de incubação é de três semanas.

2.2.1 Estágios da doença

Os três estágios clássicos de sífilis são sífilis primária, secundária e terciária. No entanto, nem sempre todos os pacientes passam pelos três estágios; uma proporção substancial fica livre da doença, de forma permanente, depois de sofrer o estágio primário ou secundário da infecção. O estágio secundário pode ser seguido de uma fase de incubação de três a trinta anos, período após o qual a doença possa atingir o estado terciário. Ao contrário da maioria dos patógenos bacterianos, o *Treponema pallidum* pode sobreviver no organismo por muitos anos apesar de uma resposta imunológica vigorosa.

2.1.3 Diagnóstico Laboratorial da Sífilis

Embora a bactéria causadora da sífilis obtidas das lesões primárias e secundárias possa ser detectada microscopicamente com imunofluorescência ou iluminação em campo escuro, a sífilis em geral é diagnosticada sorologicamente (HARVEY, CHAMPE e FISHER, 2008).

A infecção com *Treponema pallidum* desencadeia dois tipos de anticorpos:

- a) anticorpos antitreponêmicos, que são específicos para as proteínas treponêmicas de superfície;
- b) anticorpos não treponêmicos, denominados reagina, que são dirigidos contra componentes fosfolipídicos normais das membranas dos mamíferos.

Existem testes sorológicos para identificação dos dois tipos de anticorpos citados anteriormente. Os testes sorológicos (quadro 1) têm como objetivo a identificação dos anticorpos, sejam eles específicos para uma determinada doença ou não específicos.

Os testes de anticorpo antitreponêmico são mais específicos do que os testes baseados em reagina, porém permanecem positivos durante o tratamento bem-sucedido e assim, não são úteis para monitorar a terapia.

Os testes baseados em reagina são menos específicos e sujeitos a produzir mais falso-positivos, contudo eles são úteis na triagem e monitoração da terapia, pois os testes para reagina tornam-se negativos cerca de um ano após o tratamento bem-sucedido.

RESULTADOS FALSO-POSITIVOS NAS SOROLOGIAS PARA SÍFILIS	
Exame	Condições associadas a falsos resultados positivos
Não-específico (não-treponêmico) VDRL RPR	Infecção viral, colagenose, doença febril aguda, pós-imunização, gravidez, hanseníase, malária

Específico (treponêmico) FTA-ABS MHA-TP	Doenças associadas ao aumento de globulinas ou anormalidades destas, lúpus eritematoso, doenças dermatológicas, anticorpos antinucleares, abuso de medicamento, gravidez
---	--

Quadro 1- Exames sorológicos para sífilis e condições associadas a falsos resultados positivos (adaptado de MIMS, DOCKRELL, et al., 2005)

Os testes específicos devem ser empregados para confirmação de um resultado de um teste não-específico. Também por eles tornarem-se positivos no estágio inicial do desenvolvimento de doença, podem ser usados como confirmação quando existe uma forte indicação de sífilis no quadro clínico. Esses resultados tendem a permanecer positivos durante anos, e talvez sejam os únicos exames positivos em pacientes com sífilis tardia. No entanto, os exames permanecem positivos após tratamento com antibiótico apropriado e, logo, não podem ser utilizados como indicadores de resposta terapêutica. Eles podem ainda prover reações falso-positivas (quadro 1).

2.1.4 Tratamento

A penicilina é muito ativa contra o *Treponema pallidum*. Para pacientes que são alérgicos à penicilina, o tratamento deve ser com tetraciclina ou doxiciclina. Somente penicilina como terapia pode tratar de forma confiável um feto quando administrada a uma mulher grávida.

A prevenção da doença secundária ou terciária depende de pronto diagnóstico e tratamento adequado. O rastreamento e o tratamento de parceiros também são importantes. Várias DST podem estar presentes simultaneamente em um mesmo paciente.

A sífilis congênita é de fácil prevenção se as mulheres forem submetidas a uma avaliação sorológica no início da gestação (antes dos três meses) e, as positivas, tratadas com penicilina. O quadro 2 mostra os estágios da doença e a patogênese em cada fase.

PATOGÊNESE DA SÍFILIS		
Estágio da Doença	Exame	Patogênese
Contato inicial 2 – 10 semanas (depende do inóculo)	Cancro primário* no sítio de infecção	Multiplicação dos treponemas no local da lesão, reposta imune do hospedeiro associada
Sífilis primária 1 – 3 meses	Linfadenopatia inguinal, cura espontânea	Proliferação dos treponemas nos linfonodos regionais
Sífilis secundária 2 – 6 semanas	Quadro gripal, mialgia, cefaléia, febre, exantema maculopapular* resolução espontânea	Multiplicação e produção de lesão nos linfonodos, fígado, articulações, músculos, pele e mucosas
Sífilis latente 3 – 30 anos		Treponemas latentes (?) no fígado e no baço Reativação e multiplicação dos treponemas
Sífilis terciária	Neurossífilis, paralisia geral do demente, <i>tabets dorsalis</i> Sífilis cardiovascular; lesões de aorta, insuficiência cardíaca, doença destrutiva progressiva	Nova disseminação e invasão e resposta imune (hipersensibilidade celular) Gomas na pele, ossos e testículos
* cancro: inicialmente uma pápula, progride para uma úlcera indolor, cura sem tratamento em até dois meses. Podem ser vistos treponemas vivos em microscopia de campo escuro exsudado dessas lesões; paciente altamente infectante		

Quadro 2 - Estágios da doença e patogênese (adaptado de MIMS, DOCKRELL, et al., 2005)

3. TÉCNICAS DE INTELIGÊNCIA COMPUTACIONAL

Este capítulo apresenta uma introdução aos conceitos de Processamento e Análise de Imagem, utilização das Redes Neurais Artificiais (RNAs), dando ênfase ao treinamento supervisionado, ao modelo *Perceptron* Multi-Camadas e ao algoritmo *backpropagation*. No final do capítulo é feita uma introdução dos conceitos de Teoria *Fuzzy* abordando tópicos como variáveis lingüísticas, fuzificação, inferência e defuzificação.

3.1 Processamento e Análise de Imagem

Para um melhor entendimento do problema será feita uma breve introdução aos conceitos de imagem digital e processamento de imagem.

3.1.1 O Sistema Visual Humano

No início do século XIX, o físico inglês Thomas Young (1773-1829) postulou que olho devia conter fotorreceptores feitos de partículas que oscilavam com determinados comprimentos de onda de luz, sensíveis apenas a um número limitado de cores. Nos anos 1960 cientistas confirmaram a existência dos fotorreceptores que Yong e Von Helmholtz haviam descrito (FRASER e BANKS, 2007). Estes fotorreceptores estão localizados no fundo da retina e são chamados de cones e bastonetes.

Os cones são responsáveis pela percepção da cor e os bastonetes pela percepção do brilho (JAHNE, 2002). Os cones são divididos em três tipos sensíveis a comprimentos de onda específicos que correspondem ao vermelho (570 nanômetros), verde (535nm) e azul (425nm) (FRASER e BANKS, 2007). Esta faixa de valores é chamada de espectro visual humano (figura 7).

Figura 7 - Espectro visual humano (adaptado de <http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm>)

A luz entra no olho através da pupila e é focada pelo cristalino na retina, onde estimula os bastonetes e os cones. Cones e bastonetes convertem energia luminosa em impulsos elétricos que são capturados pelo nervo óptico. A informação sobre o que estamos vendo é transmitida ao cérebro por meio do nervo óptico e interpretada pela região do cérebro chamada de córtex cerebral (FRASER e BANKS, 2007).

Figura 8 - O olho humano e distribuição de cones e bastonetes na retina (adaptado de <http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm>)

O número de cones em cada olho varia de 6 a 7 milhões. Eles são posicionados principalmente na região central da retina chamada fóvea (figura 8), sendo altamente sensíveis a cores (GONZALEZ e WOODS, 1992).

O número de bastonetes é muito maior: cerca de 75 a 50 milhões são distribuídos sobre a superfície da retina. Os bastonetes servem para dar uma visão geral do campo de visão. Eles não estão envolvidos em visão colorida e são sensíveis a baixos níveis de iluminação (GONZALEZ e WOODS, 1992).

3.1.2 Modelo de cores

Gonzalez (2000) afirma que o objetivo de um modelo de cores é facilitar a especificação das cores em alguma forma padrão e de aceite geral, define o modelo de cores como uma especificação de um sistema de coordenadas tridimensionais e um subespaço dentro deste sistema onde cada cor é representada por um único ponto.

Keese (2003) fala sobre a importância de compreender como cada cor é descrita e utilizada por diversos aplicativos e dispositivos, sejam eles de captura como scanners e máquinas digitais; de visualização, como monitores e projetores ou mesmo dispositivos de impressões como impressoras digitais, *offset*, entre outras.

Cada um dos dispositivos trabalha com uma linguagem própria, descrevendo e utilizando a cor a partir de um modelo; os modelos mais conhecidos são: RGB (vermelho, verde, azul), HSB (matiz, saturação, brilho), CMYK (ciano, magenta, amarelo, preto) e CIE $L^*a^*b^*$ (L sendo para luminosidade e os valores de a^* e b^* para dois componentes cromáticos). A primeira observação importante neste espectro de cores é que o mesmo é composto por dois modelos: o modelo RGB (cores aditivas) e o modelo CMYK (cores subtrativas).

3.1.3 Cores aditivas

O modelo de cores aditivas (RGB) da figura 9, composto por vermelho (*Red*), verde (*Green*) e azul (*Blue*) e que utiliza luz para criar cores geralmente descritas com valores de intensidade para cada pixel, variando de 0 a 255 para cada um dos componentes de RGB. O sistema é denominado aditivo por adicionar o total (255) de todas as cores para se obter luminosidade.

Figura 9 - Plano de cores aditivas (RGB) (adaptado de <http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm>)

As imagens que utilizam o modelo RGB possuem três canais de cores que podem reproduzir até 16,7 milhões de cores na tela e são, conhecidas também como imagens de 24 bits pelo fato de os canais que as compõem possuírem 8 bits de informações de cores por pixel.

O sistema RGB gera cores de forma induzida pois precisa ativar seus canais por meio da geração de luz, por isso é o sistema utilizado por dispositivos eletrônicos.

O RGB é utilizado por dispositivos que trabalham com luz com scanners, máquinas digitais, gravadores de filmes/cromos, monitores e projetores.

3.1.4 Cores subtrativas

O modelo de cores subtrativas (CMY) da figura 10, composto de ciano, magenta e amarelo, utiliza um pigmento de tinta impresso sobre o papel que absorve uma parte da luz incidente criando assim cores que são descritas a partir de porcentagens dos pigmentos para cada pixel.

Figura 10 - Plano de cores subtrativas (CMY) (adaptado de <http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00010.htm>)

Uma vez detectado que o sistema de CMY não consegue reproduzir alguns tons, foi adicionada a tinta preta representada pela letra K (já que a letra B pode ser confundida com o B que representa o azul) formando assim o modelo de cor CMYK muito conhecido na indústria gráfica.

As imagens que utilizam o processo de CMYK têm por sua vez quatro canais de cores gerando uma imagem de 32 bits (8 bits x 4 canais) e não conseguem reproduzir o mesmo universo de cores do RGB.

3.1.5 Modelo de cores HSB

Baseado na percepção humana das cores, o modelo HSB (figura 11) descreve as cores a partir de três propriedades fundamentais que são Matiz (*Hue*), a Saturação (*Saturation*) e o Brilho (*Lightness*).

Matiz é o posicionamento da cor no espectro. A saturação também chamada de cromaticidade é a intensidade ou pureza da cor. O brilho é responsável pela quantidade de luz ou pela definição de uma cor clara (com luminosidade) ou escura (sem luminosidade).

Figura 11 - Modelo de cores HSB

3.1.6 Definição de imagem digital

Segundo Gonzalez (1992), uma imagem digital pode ser considerada como uma matriz cujos índices de linhas e de colunas identificam um ponto na imagem, e o correspondente valor do elemento nessa matriz identifica o nível da cor naquele ponto (exemplo na figura 12). Cada elemento desta matriz digital é chamado de elemento da imagem, originário da língua inglesa *pixel* ou *pel* que é a abreviação de *picture element*. Esta matriz associa-se a um espaço da memória interna de imagem utilizada no armazenamento e processamento do *pixel* que será exibido no monitor de vídeo em ciclos pré-estabelecidos. Sendo bidimensional (2D), esta matriz requer coordenadas de linha e coluna para identificar um *pixel*, gerando portanto uma matriz m por n , ou $m \times n$ onde m é o número de linhas e n o número de colunas.

Figura 12 - Nove *pixels* em tons de cinza

Gonzalez e Woods (1992) fazem uma abordagem simples aos relacionamentos entre *pixel*, que apresenta dois vizinhos horizontais, dois vizinhos verticais e quatro vizinhos diagonais, totalizando em oito vizinhos. Este relacionamento determina a conectividade do *pixel*.

A conectividade é utilizada no estabelecimento de bordas de objetos na imagem, regiões de uma imagem, aplicações de filtros de restauração e realce entre outros. As regiões vizinhas são chamadas de 4-conexa e 8-conexa dependendo de sua conectividade.

Na vizinhança de *pixel* do tipo 4-conexa os *pixels* são percorridos somente na vertical e horizontal a partir do *pixel* central, já na 8-conexa os *pixels* são percorridos na vertical, horizontal e diagonal. Na figura 13 o *pixel* central na cor preta indica a semente e as setas indicam a direção e o tipo de conectividade de pixels.

Figura 13 - Conectividade de pixel

O processamento de imagens digitais envolve aplicações de algoritmos na imagem para reduzir ou eliminar ruídos, realçar, restaurar, manipular e extrair informações destas imagens.

O processamento de imagens é marcado por soluções em que técnicas aplicáveis a uma aplicação específica podem não ser totalmente adequadas a outras, ou seja, é dependente de aplicação (GONZALEZ e WOODS, 1992)

3.1.7 Processamento de Imagem

Existem duas atividades no tratamento de imagem: o processamento e a análise. O processamento inicia com uma imagem e produz como resultado uma versão modificada da mesma (CASTLEMAN, 1995); este produto poderá ser submetido a outros processamentos ou uma análise, quer seja por parte de um usuário ou por parte de um sistema artificial. Exemplos da utilização do processamento de imagem são: correção da forma da imagem fora de foco, correção

de cor, brilho ou contraste, suavização de ruído de fundo e, principalmente, o realce de estruturas que representem informações importantes.

A análise de imagem é feita sobre uma imagem normalmente resultante de um processamento. Porém, o resultado gerado é um conjunto de medidas ou até mesmo uma decisão. A análise de imagem geralmente extrai o objeto de interesse do restante da imagem com o intuito de caracterizá-lo, seja por meio de sua forma geométrica, ou por meio de suas características como cor, textura, entre outros.

3.1.8 Segmentação de Imagem

Gonzalez e Woods (2000) afirmam que a primeira atividade a ser realizada em análise de imagens é a segmentação da imagem. A segmentação subdivide a imagem em suas partes constituintes, em geral diferenciando os objetos de interesse do fundo da imagem. O nível até o qual a subdivisão deve ocorrer depende do problema que se pretende resolver.

Para Jahne (2002) o objetivo da segmentação é verificar se um determinado *pixel* pertence a um objeto de interesse. Essa operação produz uma imagem binária onde o *pixel* possui o valor um se este pertencer ao objeto, caso contrário seu valor é zero. Segmentação é uma operação que utiliza *threshold* para processamento e análise de imagem. Depois da segmentação é possível identificar os *pixels* que pertencem ao objeto.

Entre as técnicas de segmentação de imagens se destacam pela facilidade de implementação e baixo custo computacional, a binarização e o crescimento de regiões.

3.1.8.1 Binarização da imagem

Imagens binárias são aquelas que possuem somente dois níveis de intensidade, constituem um importante subconjunto de imagens digitais e

normalmente resultam de uma operação de segmentação. A qualidade da etapa de binarização é crítica para análises subseqüentes (LIU e SRIHARI, 1997).

Essa técnica é utilizada nesta pesquisa para viabilizar uma análise por similaridade, ou seja, uma procura por regiões da imagem que possuam o mesmo padrão. Nesta pesquisa o padrão a ser observado é a cor e no final da fase de binarização da imagem todas as bactérias deverão estar na cor branca.

A técnica de binarização de imagem escolhida foi a limiarização, ou *threshold*. Uma das mais importantes abordagens da segmentação de imagens, tal técnica costuma ser utilizada em sistemas de apoio ao diagnóstico do câncer como o trabalho apresentado por Marques (2001). Segundo Gonzalez e Woods (1992) esta é uma técnica de análise por região particularmente útil para cenas que contém objeto sobre um fundo contrastante. A implementação computacional geralmente é simples e tem como base o valor escolhido como *threshold*: quando o valor do *pixel* analisado é maior que o valor definido, o *pixel* é considerado pertencente ao objeto, do contrário, ele é considerado pertencente ao fundo.

Com a imagem binarizada faz-se necessário a implementação de um algoritmo capaz de analisar a similaridade entre os *pixels*. O algoritmo escolhido foi o algoritmo de crescimento de região descrito por Gonzalez e Woods (1992), este algoritmo será detalhado na próxima seção.

3.1.8.2 Crescimento de região

Este método de segmentação de imagem consiste em agregar conjuntos de *pixels* em regiões maiores. A aproximação de processamento mais simples é a agregação de *pixels*, isto é: escolhem-se um pixel ou um conjunto de pixels denominados “sementes” e faz-se o crescimento da região através da agregação de *pixels* vizinhos às sementes que possuem propriedades similares (intensidade, cor, textura, entre outros). O processo continua até se atingir uma condição pré-estabelecida de parada, como por exemplo, um determinado nível de cinza ou uma distância específica (GONZALEZ e WOODS, 1992)

A vantagem é que a imagem não precisa ser homogênea, pois as suas características são previamente analisadas e incluídas nos descritores de semelhança. As principais desvantagens são: dificuldade na seleção dos pixels sementes; dificuldade no estabelecimento das propriedades de semelhança e dificuldade na determinação de condições de parada.

Com as regiões de interesse identificadas faz-se necessária a utilização de técnicas computacionais para analisar e interpretar a imagem. Nesta pesquisa será utilizado Redes Neurais para classificar os padrões de cor e a interpretação do diagnóstico por meio da Teoria *Fuzzy*.

3.2 Redes Neurais Artificiais

É possível encontrar várias definições do que seja uma Rede Neural Artificial, contudo, as três palavras chave: neurônio, arquitetura e aprendizagem, requerem um entendimento em qualquer definição de Rede Neural Artificial. O neurônio é a unidade computacional básica da rede em questão; a arquitetura é a estrutura topológica de como os neurônios são conectados; e a aprendizagem é um processo que adapta a rede, de modo a computar uma função desejada ou realizar uma tarefa.

Segundo Kohoen (*apud* FERNANDES, 2003), as Redes Neurais Artificiais são definidas como redes massivamente paralelas e interconectadas, de elementos simples, com organização hierárquica. Estes elementos devem interagir com objetivos do mundo real, da mesma maneira que o sistema nervoso biológico.

Para Lippmann (*apud* FERNANDES, 2003), “as Redes Neurais Artificiais são sistemas físicos que podem adquirir armazenar e utilizar conhecimentos experimentais, que podem alcançar um bom desempenho devido à sua densa interconexão entre os nós da rede”. Elas também são conhecidas por: modelos connexionistas, modelos de processamento paralelo distribuído e sistemas neuromorfológicos.

Segundo Loesch (*apud* FERNANDES, 2003), “Redes Neurais Artificiais são sistemas computacionais, de implementação em *hardware* e *software*, que imitam as

habilidades computacionais do sistema nervoso biológico, utilizando para isso um grande número de simples neurônios artificiais interconectados”.

Atualmente, existe um grande interesse nos modelos de Redes Neurais Artificiais. Os psicólogos se interessam por este modelo devido às suas semelhanças estruturais com a mente humana. Os pesquisadores da área de Inteligência Artificial buscam nestes modelos soluções para um dos grandes problemas desta área, o aprendizado de máquina.

3.2.1 Neurônio Biológico

Para entender melhor o que são as Redes Neurais Artificiais é necessário conhecer a estrutura do sistema nervoso que as inspira. A seguir serão apresentadas as principais características de um neurônio biológico.

O cérebro é constituído por aproximadamente 10 bilhões de células nervosas (neurônios). Cada célula nervosa possui três partes: pequenas ramificações denominadas dendritos, o corpo celular (também conhecido como soma) e o axônio (Figura 14).

A conexão entre o axônio de um neurônio e o dendrito de outro é chamada de sinapse. As células nervosas estão interconectadas por meio de sinapses. O axônio de um neurônio pode estar conectado a dendritos de vários outros neurônios.

Figura 14 - O neurônio biológico

Os estímulos do meio externo são captados pelos órgãos sensores e conduzidos até o cérebro, onde são recebidos pelos dendritos dos neurônios. Em seguida, ocorrem reações químicas e elétricas no corpo celular, ou seja, o processamento da informação. A seguir, a saída, em forma de impulsos elétricos inibidores ou excitadores, é propagada para os neurônios vizinhos através das sinapses.

3.2.2 Neurônio Artificial

O modelo matemático de um neurônio artificial (figura 15) foi apresentado por McCulloch e Pitts em 1943 (*apud* BRAGA, CARVALHO E LUDEMIR, 2000). Este modelo é baseado nas informações a respeito do neurônio biológico existentes naquela época. O modelo é composto por n terminais de entradas, $x_1, x_2, \dots, x_n$ (representando os dendritos) e um terminal de saída (representando o axônio).

Cada sinal de entrada é ponderado por um peso (w_i) existente na conexão entre os neurônios (representando a função das sinapses). Estes pesos, $w_1, w_2, \dots, w_n$, podem ser negativos ou positivos, de acordo com as sinapses correspondentes serem inibitórias ou excitatórias. Desta forma, o efeito da sinapse y sobre o neurônio é representado por $x_i w_i$. Em suma, os pesos indicam qual a relevância de um sinal de entrada para um neurônio.

Figura 15 - O neurônio artificial

A informação recebida pelo neurônio será a soma ponderada das entradas ($\sum_{i=1}^n x_i w_i$). O neurônio possui um limiar de excitação chamado de *threshold* que decidirá qual será a sua saída. Se a soma dos impulsos recebidos for maior ou igual ao *threshold*, o neurônio dispara um sinal excitador (com valor igual a 1). Caso contrário, ele dispara um sinal inibidor (com valor igual a zero). A saída do neurônio é binária e definida pela função *threshold* descrita abaixo:

$$\sum_{i=1}^n x_i w_i \geq \theta$$

Onde, n é o número de entradas, w_i é o peso associado à entrada x_i e θ é o limiar do neurônio. A partir desse modelo, foram construídos vários outros que permitissem uma saída diferente de 0 e 1 e que utilizassem outras funções de ativação.

3.2.3 Arquiteturas de RNA

A arquitetura de uma rede neural artificial depende diretamente do problema que será tratado pela rede. Como parte da definição da arquitetura da rede tem-se: quantidades de camadas, números de neurônios em cada camada e tipo de conexão entre os neurônios (BRAGA, CARVALHO e LUDEMIR, 2000).

Quanto ao número de camadas, temos:

1. Redes de camada única: A forma mais simples de uma rede em camadas surge quando se tem uma camada de entrada que se projeta para a camada de saída, mas não vice-versa, como mostrado na figura 16 (a) e (d);

2. Redes com múltiplas camadas: Redes com múltiplas camadas se distinguem de redes com camada única, pela presença de uma ou mais camadas ocultas. A função das camadas ocultas é extrair informações das amostras. Como apresentado na figura 16 (b) e (c),

Quanto aos tipos de conexões entre neurônios, têm-se:

1. Feedforward ou acíclica: As saídas dos neurônios na i -ésima camada não podem ter entradas com neurônios em camadas de índice menor ou igual a i , como mostrado na figura 16 (a), (b) e (c);

2. Feedback ou cíclica: A saída do neurônio na i -ésima camada tem entradas com neurônios em camadas de índice menor ou igual a i , como mostrado na figura 16 (d).

Figura 16 - Arquiteturas de redes neurais artificiais

Finalmente, quanto a sua conectividade, têm-se:

1. Rede fracamente (ou parcialmente) conectada: Neste caso o neurônio de uma camada não está conectado a todos os neurônios da camada seguinte como apresentado na figura 16 (c);

2. Rede completamente conectada: O neurônio de uma camada está conectado a todos os neurônios da camada seguinte, figura 16 (a), (b) e (d).

A RNA *feedforward* multicamada, também chamada de *Perceptron* multicamada, é bastante discutida na literatura. Segundo Welstead (1994) é a RNA mais utilizada, onde estimativas apontam para noventa por cento (90%) de todas as aplicações de RNA implementadas. De acordo com Loesch (1996), elas são uma extensão dos *perceptrons*, também são hetero-associativas, mas possuem uma ou mais camadas ocultas, têm uma função de ativação diferente e capacidades mais potentes e genéricas. Além de grande capacidade de abstração e generalização que permite a ela classificar um padrão complexo que não pertenceu ao conjunto de treino, possui robustez que a faz imune a pequenas falhas relativas a ruídos e distorções da entrada.

3.2.4 Processos de Aprendizado

A propriedade mais importante das redes neurais é a sua habilidade de aprender através de seu ambiente, e com isso melhorar seu desempenho. Isso é feito por meio de um processo iterativo de ajustes. O aprendizado ocorre quando a rede neural atinge uma solução generalizada para uma classe de problemas.

Existem muitos tipos de algoritmos de aprendizado específicos para determinados modelos de redes neurais, estes algoritmos diferem entre si principalmente pelo modo como os pesos são modificados.

Outro fator importante é a maneira pela qual uma rede neural se relaciona com o ambiente. Konar (2000) afirma que o processo de treinamento de uma rede neural é largamente classificado em três categorias:

Aprendizado Supervisionado - quando é utilizado um agente externo que indica à rede a resposta desejada para o padrão de entrada;

Aprendizado Não Supervisionado (auto-organização) - quando não existe um agente externo indicando a resposta desejada para os padrões de entrada;

Reforço - quando um crítico externo avalia a resposta fornecida pela rede.

Denomina-se ciclo ou época, uma apresentação de todos os N pares (entrada e saída) do conjunto de treinamento no processo de aprendizado. A correção dos pesos num ciclo pode ser executada de dois modos:

Modo Padrão - A correção dos pesos acontece a cada apresentação à rede de um exemplo do conjunto de treinamento. Cada correção de pesos baseia-se somente no erro do exemplo apresentado naquela iteração. Assim, em cada ciclo ocorrem N correções.

Modo *Batch* - Apenas uma correção é feita por ciclo. Todos os exemplos do conjunto de treinamento são apresentados à rede, seu erro médio é calculado e a partir deste erro fazem-se as correções dos pesos.

3.2.5 Treinamento Supervisionado

O treinamento supervisionado, do modelo de rede *Perceptron*, consiste em ajustar os pesos e os *thresholds* de suas unidades para que a classificação desejada seja obtida. Para a adaptação do *threshold* juntamente com os pesos pode-se considerá-lo como sendo o peso associado a uma conexão, cuja entrada é sempre igual à -1 e adaptar o peso relativo a essa entrada.

Quando um padrão é inicialmente apresentado à rede, ela produz uma saída. Após medir a distância entre a resposta atual e a desejada, são realizados os ajustes apropriados nos pesos das conexões de modo a reduzir esta distância. Este procedimento é conhecido como Regra Delta. Deste modo, temos o seguinte esquema de treinamento.

Iniciar todas as conexões com pesos aleatórios;

Repita até que o erro E seja satisfatoriamente pequeno ($E \leq e$);

Para cada par de treinamentos (X, d) , faça:

Calcular a resposta obtida O ;

Se o erro não for satisfatoriamente pequeno $E > e$, então:

Atualizar pesos: $W_{\text{novo}} := W_{\text{anterior}} + \eta (d - O) X$

onde:

O par de treinamentos (X, d) corresponde ao padrão de entrada e a sua respectiva resposta desejada;

O erro E é definido como: Resposta Desejada - Resposta Obtida ($d - O$);

A taxa de aprendizado η é uma constante positiva, que corresponde à velocidade do aprendizado.

As respostas geradas pelas unidades são calculadas através de uma função de ativação. Existem vários tipos de funções de ativação, as mais comuns são: *Hard Limiter*, *Threshold Logic* e *Sigmoid*.

3.2.6 O Modelo Perceptron Multi-Camadas

Uma das redes neurais mais conhecidas é a rede *Perceptron* multi-camadas, simbolizada por MLP (*Multi-Layer Perceptron* - Figura 17) e introduzida por Widrow em 1962. Esta rede possui pelo menos uma camada intermediária entre as camadas de entrada e saída. Outra característica é que esta rede é do tipo *feedforward*, ou seja, não há conexão entre neurônios de uma mesma camada e nem entre neurônios de uma camada e neurônios de camadas anteriores. As redes *Perceptron* multi-camadas possuem um poder computacional maior que o apresentado pelas redes *Perceptron* de camada única. Segundo Cybenko (*apud* BRAGA, CARVALHO E LUDEMIR, 2000) redes com uma camada intermediária podem implementar qualquer

função contínua e redes com duas camadas intermediárias podem implementar qualquer função matemática.

Figura 17 - Perceptron com múltiplas camadas

3.2.7 Algoritmo *Backpropagation*

O algoritmo *backpropagation* de Rumelhart é um método de aprendizado por correção de erros, seu conjunto de treinamento é formado por pares entrada-saída desejado. Este algoritmo é baseado no método do gradiente descendente para minimizar o erro total ao quadrado computado pela rede. Devido a isso, as funções de ativação utilizadas devem ser contínuas e diferenciáveis. O algoritmo passa por três fases: a *forward*, a *backward* e a fase de atualização dos pesos da rede.

Durante a fase *forward*, os sinais de entrada são propagados da camada de entrada para as próximas camadas intermediárias até chegar à camada de saída.

A seguir, o erro na saída da rede é calculado através da comparação entre a saída atual (calculada) e a desejada.

Durante a fase *backward* (retropropagação do erro e cálculo dos ajustes dos pesos), o erro calculado na saída é usado para calcular o ajuste dos pesos da camada de saída, e então é retropropagado para a penúltima camada. Os nodos dessa camada escondida recebem esse erro ponderado pelos pesos da camada de saída.

O passo seguinte é calcular o erro para cada um desses nodos, em seguida calcular o ajuste dos pesos dessa camada e então retropropagar o erro para a camada anterior. Este processo se repete até que sejam calculados os ajustes para os pesos da primeira camada escondida. A última fase consiste em atualizar todos os pesos da rede, somando os ajustes calculados aos pesos correspondentes. A figura 18 ilustra o treinamento com o algoritmo *backpropagation*.

Figura 18 - Esquema de treinamento Backpropagation

3.2.8 Etapas para o Desenvolvimento de Aplicações de Redes Neurais

Segundo Gurney (*apud* FERNANDES, 2003), as etapas de desenvolvimento de aplicações de redes neurais são: coleta de dados e separação em conjuntos, configuração da rede, treinamento, teste e integração. Estas etapas serão descritas a seguir.

3.2.8.1 Coleta de Dados e Separação em Conjuntos

As duas primeiras etapas do processo de desenvolvimento de redes neurais artificiais são a coleta de dados relativos ao problema e a sua separação em conjunto de treinamento e conjunto de testes. A criação dos conjuntos de treinamento e teste requer uma análise cuidadosa sobre o problema para minimizar ambigüidades e erros nos dados. Além disso, os dados coletados devem ser significativos e cobrir amplamente o domínio do problema; não devem cobrir apenas as operações normais ou rotineiras, mas também as exceções.

Normalmente, os dados coletados são separados em duas categorias: dados de treinamento, que serão utilizados para o treinamento da rede, e dados de teste, que serão utilizados para verificar o desempenho sob condições reais de utilização. Além dessa divisão, pode-se usar também uma subdivisão do conjunto de treinamento, criando um conjunto de validação, utilizado para verificar a eficiência da rede quanto à capacidade de generalização durante o treinamento, e podendo ser empregado como critério de parada do treinamento.

Depois de determinados estes conjuntos, eles são, geralmente, colocados em ordem aleatória para prevenção de tendências associadas à ordem de apresentação dos dados.

3.2.8.2 Configuração da Rede

A terceira etapa é a definição da configuração da rede, que pode ser dividida em três atividades:

- a) seleção do paradigma neural apropriado à aplicação;
- b) determinação da topologia da rede a ser utilizada: número de camadas, número de neurônios em cada camada, entre outros;
- c) determinação de parâmetros do algoritmo de treinamento e funções de ativação. Este passo tem um grande impacto no desempenho do sistema resultante.

A definição da configuração de redes neurais requer grande experiência dos projetistas, algumas vezes as escolhas são feitas de forma empírica.

3.2.8.3 Treinamento

A quarta etapa é o treinamento da rede utilizando o algoritmo de treinamento escolhido, o algoritmo tem a função de ajustar os pesos das conexões. É importante considerar, nesta fase, alguns aspectos tais como a inicialização da rede, o modo e o tempo de treinamento.

Uma boa escolha dos valores iniciais dos pesos da rede pode diminuir o tempo necessário para o treinamento. Normalmente, os valores iniciais dos pesos da rede são números aleatórios uniformemente distribuídos, em um intervalo definido.

Quanto ao tempo de treinamento, vários fatores podem influenciar a sua duração, porém sempre será necessário utilizar algum critério de parada. O critério de parada do algoritmo *backpropagation* não é bem definido, e geralmente, é utilizado um número máximo de ciclos. Contudo, deve ser considerada a taxa de erro médio por ciclo, e a capacidade de generalização da rede. Pode ocorrer que em um determinado instante do treinamento a generalização comece a degenerar, causando o problema de *over-training*, ou seja, a rede se especializa no conjunto de dados do treinamento e perde a capacidade de generalização.

O treinamento deve ser interrompido quando a rede apresentar uma boa capacidade de generalização e quando a taxa de erro for suficientemente pequena, ou seja, menor que um erro admissível. Assim, deve-se encontrar um ponto ótimo de parada com erro mínimo e capacidade de generalização máxima.

3.2.8.4 Teste

A quinta etapa é o teste da rede. Durante esta etapa, o conjunto de teste é utilizado para determinar o desempenho da rede com dados que não foram previamente utilizados.

3.2.8.5 Integração

Finalmente, com a rede treinada e avaliada, ela pode ser integrada ao ambiente operacional da aplicação. Para maior eficiência da solução, este sistema deverá conter facilidades de utilização como interface conveniente e facilidades de aquisição de dados por meio de planilhas eletrônicas, interfaces com unidades de processamento de sinais, ou arquivos padronizados.

3.3 Teoria Fuzzy

3.3.1 Introdução

A lógica fuzzy foi introduzida por Zadeh em 1965 (ZADEH, 1965). A diferença entre a lógica fuzzy e a lógica clássica é que na clássica um elemento pertence ou não pertence a um conjunto. Nela são modelados os conjuntos fuzzy, que são funções que mapeiam um valor escalar entre 0 e 1, indicando o grau de pertinência de um elemento do conjunto.

A lógica fuzzy também conhecida como lógica nebulosa, tem o objetivo de modelar o raciocínio humano de forma aproximada, a fim de desenvolver sistemas computacionais para a tomada de decisão racional em ambientes de incerteza (ZADEH, 1965 apud ZERBINATTI e JÚNIOR, 2006).

De acordo com Munakata (2008) os sistemas fuzzy são especialmente úteis em aplicações onde as técnicas tradicionais não funcionam bem. O mais bem sucedido domínio em termos de praticidade tem estado no controle difuso de vários física ou características químicas, como temperatura, corrente elétrica, o fluxos de líquido e gás, movimento de máquinas, entre outros.

Sistemas Fuzzy são adequados para o raciocínio incerto ou aproximados, especialmente para o sistema cujo modelo matemático é difícil de obter. Possibilita uma representação descritiva ou qualitativa, expressões como "lenta" ou "moderadamente rápido" são facilmente incorporados com afirmações simbólicas. Estas expressões e representações são mais naturais do que equações matemáticas para muitos humanos como regras de julgamento e declarações.

3.3.2 Variáveis lingüísticas

As variáveis lingüísticas são importantes na inferência fuzzy. Basicamente uma variável lingüística é usada para caracterizar aproximadamente tanto os valores das variáveis como as suas relações. Por exemplo, números podem ser utilizados para caracterizar a altura de uma pessoa, mas palavras podem atribuir categorias a essa altura, tais como alta, muito alta, baixa, mediana, entre outros. Os limites entre os termos lingüísticos são fuzzy, além de existir superposição entre eles. Isso significa que se pode estar mais ou menos certo sobre a verdade ou falsidade de um fato particular (MEECH, 1997).

3.3.3 Base de Regras

A base de regras é formada por estruturas do tipo
Se <premissa> Então <conclusão>,
como exemplo:

Se (verde-escuro é alto) e (verde-médio é baixo) e (verde-claro é baixo) e (amarelo é baixo) e (branco é baixo) **Então** Diagnóstico é Negativo

Em um dado controlador nebuloso, é importante que existam tantas regras quantas forem necessárias para mapear totalmente as combinações dos termos das variáveis, isto é, que a base seja completa, garantindo que exista sempre ao menos uma regra a ser disparada para qualquer entrada (SANDRI e CORREA, 1999).

Também é essencial a consistência, onde se procura evitar a possibilidade de contradições e a interação entre as regras, gerenciada pela função de implicação de modo a contornar as situações de ciclo.

3.3.4 Fuzificação

Fuzificação é um mapeamento do domínio de números reais (em geral discretos) para o domínio *fuzzy*. Fuzificação também representa que há distribuição de valores lingüísticos, descrições vagas ou qualitativas, definidas por funções de pertinência às variáveis de entrada.

A fuzificação é um pré-processamento de categorias ou classes dos sinais de entrada, reduzindo o número de valores a serem processados.

Conforme Fernandes (1997), o tipo e a quantidade de funções de pertinência usadas em um sistema dependem de: (i) precisão; (ii) estabilidade; (iii) facilidade de implementação; (iv) manipulação e (v) manutenção.

3.3.5 Inferência

As variáveis lingüísticas são interpretadas, por meio da fuzificação, a etapa seguinte é a descrição das situações nas quais há reações, ou seja, a determinação das regras SE-ENTÃO ativadas pelos valores de entrada.

O lado SE (IF) de uma regra contém uma ou mais condições, chamadas antecedentes que constituem uma premissa; o lado ENTÃO (THEN) contém uma ou mais ações chamadas conseqüentes (CABRAL, 1994).

O antecedente da regra contém uma ou mais condições, o conseqüente contém uma ou mais ações.

O antecedente corresponde diretamente aos graus de pertinência calculados durante o processo de fuzificação. Cada antecedente tem um grau de pertinência indicado para ele como resultado da fuzificação. Durante a avaliação das regras (a inferência), a intensidade é calculada com base em valores dos antecedentes e estão indicadas para saídas difusas da regra (FERNANDES, 1997).

Sandri e Correa (1999) afirmam que o processo de inferência consiste em:

- a) Verificação do grau de compatibilidade entre os fatos e as cláusulas nas premissas das regras;
- b) Determinação do grau de compatibilidade global da premissa de cada regra;
- c) Determinação do valor da conclusão, em função do grau de compatibilidade da regra com os dados e a ação de controle constante na conclusão (precisa ou não);
- d) Agregação dos valores obtidos como conclusão nas várias regras, obtendo-se uma ação de controle global.

3.3.6 Defuzificação

Na defuzificação, o valor da variável lingüística de saída inferida pelas regras *fuzzy* será traduzido em um valor discreto. O objetivo é obter um único valor numérico discreto que melhor represente os valores *fuzzy* inferidos da variável lingüística de saída (SIMÕES e SHAW, 2007).

Para selecionar o método apropriado de defuzificação, pode-se utilizar uma abordagem baseada no centróide ou nos valores máximos que ocorrem da função de pertinência resultante. Alguns autores sugerem (TERANO, *et al.*, 1992; PEDRYCZ, 1993) diferentes métodos para o cálculo de defuzificação. Os seguintes métodos são

bastante utilizados: Centro-da-Área(C-o-A), Centro-do-Máximo(C-o-M), Centro-do-Máximo(M-o-M).

3.3.6.1 Defuzificação Centro-da-Área

O método do Centro-da-Área (C-o-A) é frequentemente chamado de método do Centro-de-Gravidade, pois ele calcula o centróide da área composta que representa o termo de saída fuzzy (μ_{out}). Esse termo de saída fuzzy é composto pela união de todas as contribuições de regras (SIMÕES e SHAW, 2007) conforme demonstrado na fórmula abaixo.

$$u_{CG} = \frac{\sum_{i=1}^N u_i \cdot \mu_u(u_i)}{\sum_{i=1}^N \mu_u(u_i)}$$

3.3.6.2 Defuzificação Centro-do-Máximo

No método C-o-M são usados os picos das funções de pertinência representados no universo de discurso da variável de saída, enquanto ignoram-se as áreas das funções de pertinência; as contribuições múltiplas de regras são consideradas por esse método (SIMÕES e SHAW, 2007) conforme demonstrdo na fórmula abaixo.

$$u_{CA} = \frac{\sum_{i=1}^N u_i \sum_{k=1}^n \mu_{Bk}(u_i)}{\sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^n \mu_{Bk}(u_i)}$$

3.3.6.3 Defuzificação Média-do-Máximo

O M-o-M é outra abordagem para defuzificação que consiste na utilização da saída cujo valor tenha o maior valor de pertinência $\mu_{out}(u_i)$. Em casos onde a função de pertinência tenha mais de um máximo essa idéia não poderia ser utilizada. A abordagem C-o-M também não funcionaria bem, devido à necessidade de se escolher qual máximo utilizar. Pode-se então tomar a média de todos os máximos (SIMÕES e SHAW, 2007), que nos leva ao método média do máximo ilustrado a seguir por meio da fórmula matemática:

$$u_{MM} = \sum_{i=1}^M \frac{u_m}{M}$$

3.6.7 Configuração básica de um sistema fuzzy

Para Simões e Shaw (2007) um sistema fuzzy é composto dos seguintes blocos funcionais:

- a) interface de fuzificação;
- b) base de conhecimento ou base de regras;
- c) lógica de tomada de decisões;
- d) interface de defuzificação.

A interface de fuzificação é responsável pela conversão dos valores discretos (não-fuzzy) das variáveis de entrada que geralmente são provenientes de sensores ou de dispositivos de entrada computadorizados. A interface de fuzificação utiliza funções de pertinência contidas na base de conhecimento, convertendo os sinais de entrada em um intervalo $[0,1]$ que pode estar associado às variáveis lingüísticas.

A base de conhecimento representa o modelo do sistema a ser controlado, consistindo de uma base de dados (funções de pertinências lingüísticas) e uma base de regras fuzzy lingüísticas.

A base de dados fornece as definições numéricas necessárias às funções de pertinências usadas no conjunto de regras *fuzzy*.

A base de regras caracteriza os objetivos de controle e a estratégia de controle utilizada por especialistas na área, por meio de um conjunto de regras de controle em geral lingüísticas.

A lógica de tomada de decisões, incorporadas na estrutura de inferência da base de regras, utiliza implicações fuzzy para simular tomada de decisão humana gerando ações de controle (conseqüentes) inferidas a partir de um conjunto de condições de entradas (antecedentes).

A defuzificação consiste em obter um único valor discreto, utilizável em uma ação de controle concreta no mundo real, a partir de valores *fuzzy* de saída obtidos. Este único valor discreto representa um compromisso entre os diferentes valores *fuzzy* contidos na saída do controlador. Existem sistemas que não exigem defuzificação porque a saída *fuzzy* é interpretada de modo qualitativo.

4. ESPECIFICAÇÃO DO PROBLEMA

Este capítulo apresenta os detalhes relacionados ao domínio do problema e os fatores que exercem influência sobre o desenvolvimento desta pesquisa.

4.1. Introdução

Neste capítulo é apresentado o problema do diagnóstico e os problemas relacionados à pesquisa como as dificuldades encontradas na aquisição do conhecimento para concepção da solução.

4.2 Detalhamento do problema

O laboratório de imunologia utilizado no estudo de caso desta pesquisa atende à demanda interna de um hospital público e realiza diariamente diversos tipos de exames para diagnosticar HIV, sífilis, clamídia, hepatite e outras patologias. Um dos desafios de qualquer laboratório é garantir que os procedimentos laboratoriais sejam seguidos rigorosamente para alcançar resultados corretos nos exames realizados, fornecendo assim o melhor serviço aos seus pacientes.

Muitos exames não possuem recursos computacionais para auxiliar os profissionais de saúde na execução dessa tarefa, alguns destes exames dependem de uma interpretação subjetiva que algumas vezes pode levar a diferentes resultados dependendo do profissional que o analisa. Entre os exames que apresenta esse tipo de subjetividade na análise destaca-se o exame confirmatório para o diagnóstico da sífilis chamado de FTA-ABS .

Dentre os vários testes disponíveis para o diagnóstico da sífilis o hospital adota o VDRL como teste de triagem e acompanhamento da evolução do tratamento e o teste FTA-ABS para confirmar o diagnóstico da doença.

4.3 Teste não-específico VDRL

O VDRL é um teste que possui facilidade na execução e tem baixo custo, por isso é amplamente utilizado nas unidades básicas de saúde. No entanto, de acordo com Camargo (2001) *apud* Santos et al, (2007) algumas patologias como malária, doenças auto-imunes, infecções virais, bacterianas e câncer podem levar a resultados falso-positivos para o teste VDRL, pois a manifestação dessas doenças induz a produção de reagina no organismo, substância que é base do teste de VDRL.

O resultado do teste é expresso na forma de títulos, 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256, sendo que 1:2 representa um título mais baixo que 1:64 e assim sucessivamente.

4.4 Teste específico FTA-ABS

Este teste utiliza o método da imunofluorescência indireta descrito no capítulo 2, neste método os anticorpos anti-treponema presentes no soro do paciente ligam-se ao antígeno fixado na lâmina e são revelados por uma antigamaglobulina humana (anticorpo secundário) marcada com um fluorocromo que produz fluorescência verde.

Para a realização do exame FTA-ABS o paciente se dirige ao setor de coleta onde é retirada uma amostra de sangue que é encaminhada ao laboratório de imunologia para ser analisada.

As amostras de sangue passam por um processo de centrifugação para separar a parte sólida da parte líquida e é nesse processo que se obtém o soro sanguíneo. Os testes sorológicos têm como princípio a busca de anticorpos específicos para uma doença, estes anticorpos são encontrados no soro.

Com a amostra de soro dos pacientes inicia-se o processo de preparação das lâminas realizado em duas etapas.

- a) na primeira etapa o soro do paciente é colocado em contato com o substrato antigênico. Se os anticorpos estiverem presentes no soro, estes se ligam ao antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo. Se no soro testado não houver anticorpos dirigidos a este antígeno em particular, não se formará o complexo antígeno-anticorpo e todos os componentes do soro serão eliminados;
- b) na segunda etapa adiciona-se um anticorpo secundário marcado com o fluorocromo específico para o teste FTA-ABS. Nesta etapa o anticorpo secundário fará uma ligação com o anticorpo primário somente se o anticorpo primário tiver se ligado ao antígeno na primeira etapa.

4.4.1 Controle de qualidade na preparação das lâminas

Para averiguar se o procedimento foi realizado corretamente, o profissional observa no microscópio de fluorescência as duas primeiras áreas da lâmina indicadas pelos sinais positivo (+) e negativo (-), (figura 19). Estas áreas correspondem aos controles positivo e negativo do teste, ou seja, simulam o resultado de um exame positivo e um exame negativo. O *kit* utilizado para preparação do teste possui duas amostras de soros sanguíneos fornecidos pelo fabricante, onde uma das amostras contém anticorpos específicos para a sífilis e outra que não contém esses anticorpos.

Figura 19 - Modelo de lâmina utilizada no teste FTA-ABS

Caso o controle não apresente o resultado esperado todas as lâminas devem ser descartadas e o procedimento deve ser realizado novamente, do contrário, as lâminas obtidas podem ser consideradas válidas para a realização do diagnóstico.

4.4.2 Interpretação das lâminas e definição do diagnóstico

Para interpretar o resultado do exame o profissional utiliza um microscópio de fluorescência. Para se chegar a um diagnóstico duas características devem ser observadas nas imagens, formato e coloração.

Quanto ao formato a bactéria (*Treponema pallidum*) causadora da sífilis deve ter a forma de espiral, por isso é chamada de espiroqueta;

Quanto à coloração deve-se observar a ocorrência de fluorescência esverdeada na bactéria.

Reação negativa: Ausência de fluorescência esverdeada na bactéria, nesse caso não se observa a bactéria ou vê-se muito tenuamente.

Reação positiva: Presença de fluorescência esverdeada característica da bactéria.

O uso prolongado do microscópio na atividade de observação pode levar à fadiga visual algumas vezes e a resultados incorretos, sendo que profissionais menos experientes estão mais suscetíveis a esse tipo de problema. Mesmo profissionais experientes podem ter dúvidas quanto ao resultado de um exame e a maior dúvida acontece na interpretação da fluorescência moderada ou indeterminada. Nesses casos o profissional pode por vezes considerar a intensidade fraca (resultado negativo) ou intensidade forte (resultado positivo).

Existe uma faixa de intensidade de fluorescência que determina o resultado do exame, são elas: ausência de fluorescência, fluorescência fraca, fluorescência moderada ou indeterminada e a fluorescência forte. A interpretação dessas intensidades de fluorescência deve levar a três resultados possíveis: positivo, negativo e indeterminado.

A definição da faixa de intensidade de fluorescência depende muito do conhecimento do especialista e do que este considera como fraca ou forte e isso se

torna um problema quando nos deparamos com um exame com intensidade de fluorescência moderada. Nesse caso o procedimento recomendado é que um novo exame seja realizado e todo o procedimento de preparação da lâmina seja refeito para uma nova inspeção visual no microscópio até que seja possível determinar o diagnóstico.

4.4.3 Limitações da técnica da imunofluorescência indireta

Uma reação indeterminada em uma amostra de paciente significa que o resultado não pode ser interpretado como reagente e nem como não reagente. Se for a primeira amostra de sangue, deve ser feita uma nova reação FTA-ABS em uma segunda amostra do paciente. Se a segunda amostra também apresentar o resultado indeterminado, não será possível estabelecer de maneira definitiva se o paciente apresenta ou não prova sorológica de infecção sífilica. Neste caso, sugere-se utilizar uma técnica alternativa (ELISA, MHATP) e a realização de um estudo cuidadoso do histórico do paciente e dos sinais físicos, baseando o diagnóstico nas evidências clínicas.

A intensidade e reatividade do ponto final de uma reação em técnica de imunofluorescência indireta estão suscetíveis ao estado do microscópio de fluorescência utilizado.

4.5 Problemas relacionados ao desenvolvimento da pesquisa

4.5.1 Aquisição do conhecimento

Na fase de aquisição do conhecimento para elaboração da pesquisa foram consultadas fontes documentadas, tais como: livros, filmes, gráficos, diagramas, manuais, entre outras. As fontes não documentadas são as que residem na mente dos profissionais que conhecem o domínio do problema.

As fontes documentadas e não documentadas são importantes para garantir o conhecimento sobre o domínio do problema, as duas se complementam, pois é difícil para um leigo estudar livros de microbiologia e conseguir tirar os conhecimentos mais relevantes. Para auxiliar nessa fase consultou-se profissionais que trabalham diretamente com o assunto em questão.

Alguns problemas ocorreram nessa fase:

- a) Realizar entrevistas sem conhecimento do domínio do problema faz com que o profissional use termos que não expressam a maneira como o trabalho é realizado, nesse momento pode haver a omissão de informações importantes para a pesquisa.
- b) Algumas vezes o profissional lembra-se de informações apenas no desempenho de suas atividades e estas não são transmitidas em entrevistas.
- c) Algumas vezes o profissional sabe realizar um procedimento, mas não consegue explicar.
- d) Os profissionais são muito requisitados em suas instituições, por isso é difícil tê-los dedicados a uma pesquisa.

A aquisição do conhecimento, no que diz respeito à extração de informações, foi executada por meio de entrevistas com os especialistas e de observação no desempenho de suas tarefas, além de consultas em bibliografias da área de diagnóstico sorológico da sífilis. As entrevistas foram individuais, com duração média de uma hora. Após estas entrevistas, foram feitas visitas aos especialistas em seu local de trabalho tendo como objetivo acompanhar o processo de preparação das lâminas e ao final a observação em microscópio de fluorescência.

A aquisição de imagens de microscopia de fluorescência para analisar o padrão de coloração e determinação do diagnóstico não foi suficiente para a elaboração do projeto.

Foi identificada a necessidade de um estudo aprofundado na área de microbiologia e imunologia para entender o ambiente no qual o projeto de pesquisa está inserido, tal conhecimento é fundamental para garantir a qualidade das informações e entender as necessidades e expectativas do especialista em relação à pesquisa. Para isso se fez necessário subir o nível de abstração e realizar estudos

específicos sobre a área de microbiologia para garantir uma boa reunião de levantamento de requisitos.

Para um melhor aproveitamento do tempo do especialista foi realizado um estudo sobre os conceitos que fundamentam o domínio do problema pesquisado, organizando o pensamento em tópicos e detalhando através de perguntas para definir a linha de raciocínio (figura 20).

Figura 20 - Estudos para entendimento do domínio do problema

4.5.2 Aquisição das imagens para validar as técnicas propostas nesta pesquisa

Uma das maiores dificuldades desta pesquisa é a possível variação na qualidade das imagens devido à inexistência de sistema de aquisição montado exclusivamente para este projeto, porém, a falta de uma câmera específica para microscópio não inviabiliza a pesquisa desde que a forma de captura seja padronizada. Algumas pesquisas sobre análise de imagens de microscopia

apresentam soluções de baixo custo utilizando *webcam* para captura de imagens como a pesquisa realizada por Richetto (2007)

Na pesquisa realizada por Costa et al (2008) foi apresentado um método para identificação automática da bactéria causadora da Tuberculose por meio de análise de microscopia convencional, este trabalho utilizou imagens capturadas com câmera digital acoplada ao microscópio. Para conseguir imagens padronizadas alguns ajustes foram necessários: aumento de 100x na lente objetiva do microscópio e aumento de 4x a 4.7x no zoom óptico da câmera. Tais ajustes resultaram em imagens cuja resolução espacial variou de 1600x1200 pixels a 3072x2304 *pixels*.

O trabalho desenvolvido por Richetto (2007) apresentou como proposta a automatização de microscópio convencional para seleção e contagem de células brancas de sangue. Algoritmos com aplicações em histogramas foram utilizados para a realização do reconhecimento das células. A estratégia de captura da imagem se fez pelo uso de uma *webcam* acoplada diretamente à USB do computador sem que fosse necessário uma placa de captura, o autor também afirma que a diminuição na qualidade das imagens não afetou o processo de reconhecimento proposto.

4.5.3 O problema da classificação das cores

É importante compreender como cada cor é descrita e utilizada por diversos aplicativos e dispositivos, sejam eles de captura como scanners e máquinas digitais, de visualização, como monitores e projetores ou mesmo dispositivos de impressão como impressora digital, *offset*, rotativas entre tantas outras. Com esse conhecimento é possível tomar decisões consistentes e controlar assim as informações de cores para que estas sejam utilizadas de forma correta do início ao fim do processo, não apresentando nenhuma surpresa desagradável.

Cada um dos dispositivos trabalha com uma linguagem própria, descrevendo e utilizando a cor a partir de um modelo; os modelos de cores mais conhecidos são: RGB (vermelho, verde, azul), HSB (matiz, saturação, brilho), CMYK (ciano, magenta, amarelo, preto).

Na medicina, a cor ajuda na investigação de doenças e diagnóstico. Em quase todas as culturas se estabeleceu uma relação entre cor e diagnóstico médico, que até hoje é utilizado: a análise da cor da pele, da língua, dos olhos e das secreções do corpo, continua sendo a base do diagnóstico.

A cor aliada à tecnologia permite diagnosticar a doença e a disfunção das partes mais inacessíveis do corpo: sonografia, termografia, entre outros.

Um dos desafios dessa pesquisa é encontrar uma representação formal (computacional) dos tons de fluorescência que são expressos de forma lingüística pelo especialista. Os tons de verde que representam a fluorescência visualizada nos exames podem ser definidos em três classes: fraca, moderada e forte.

Determinar os tons de verde que fazem parte de cada uma das classes não é uma tarefa trivial, pois dentro de cada classe existe uma variação tonal que deve ser considerada. Outro problema a ser considerado nessa classificação é a existência de tonalidades (figura 21) que são muito próximas.

Figura 21 - Variação de tons de verde

Em entrevistas e visitas ao laboratório o especialista apresentou alguns exames utilizando o microscópio de fluorescência, explicou os padrões de cores que o profissional precisa entender para determinar o diagnóstico.

5. DESENVOLVIMENTO DA SOLUÇÃO

Este capítulo apresenta em detalhes as etapas da solução proposta para o problema do diagnóstico. A solução será apresentada em três fases, iniciando com a fase de pré-processamento da imagem, seguida da classificação de *pixels* utilizando uma RNA e finalmente a interpretação do diagnóstico por meio da teoria fuzzy. Os resultados obtidos serão apresentados na forma de matriz de confusão e em seguida as considerações a respeito do resultado obtido pelo protótipo implementado nesta pesquisa.

5.1 Introdução

O uso da microscopia de fluorescência para diagnosticar sífilis tem quatro desafios a superar. Inicialmente a inexistência de uma descrição formal da intensidade de fluorescência, sua interpretação é subjetiva. Em seguida, o baixo contraste entre o objeto em estudo e o fundo da imagem. A distribuição da fluorescência sobre as bactérias não é uniforme gerando variação de contraste. Finalmente, vários artefatos podem ser encontrados na imagem, estes devem ser rejeitados na análise.

Esta pesquisa propõe a criação de um método para análise de imagens de microscopia de fluorescência, obtidas como produto final do teste FTA-ABS, com o objetivo de auxiliar o profissional na interpretação da intensidade de fluorescência fornecendo um subsídio a mais para auxiliar no diagnóstico da sífilis.

O primeiro passo da solução proposta consiste em aumentar o contraste entre o fundo da imagem e o objeto de interesse. O segundo, a segmentação da imagem utilizando os algoritmos de binarização e crescimento de regiões. Com as áreas de interesse identificadas segue-se para o terceiro passo que consiste na classificação dos *pixels* das imagens por meio de uma RNA treinada com o algoritmo de aprendizado *backpropagation*. O resultado da classificação dos *pixels* é utilizado na

última etapa da solução que consiste na utilização da teoria *fuzzy* para a interpretação do diagnóstico.

A figura 22 ilustra as etapas da solução proposta, os detalhes de cada etapa são apresentados no decorrer do capítulo.

Figura 22 - Etapas da proposta de solução

O protótipo desenvolvido teve por objetivo gerar um sistema para tomada de decisões observando a característica cor nas imagens de exames. Para que isso fosse possível, diversos estudos e pesquisas foram realizados buscando compreender o funcionamento de um sistema nebuloso para então empregá-lo no protótipo, além de entrevistas com o especialista, que com base em sua experiência forneceu os parâmetros a serem avaliados no projeto.

5.2 Ambiente da aplicação

Para validar o método proposto foi construído um protótipo funcional em linguagem Object Pascal/Delphi. Além das bibliotecas padrões de componentes (formulários, botões, caixas de edição, caixas de textos e outros) que acompanham a linguagem de programação foi utilizado o componente MLP para a construção e treinamento da rede neural, os detalhes sobre a utilização do componente são apresentados em Medeiros (2006).

5.3 Aquisição das imagens utilizadas na simulação

As imagens utilizadas para o desenvolvimento dessa pesquisa foram criadas utilizando um software gráfico com o auxílio de ferramentas que simulam imagens fluorescentes.

Foram criadas 107 imagens (extensão bmp) para simular os diversos exames observados em laboratório, estas imagens simulam diversas condições de iluminação e ruídos para assemelhar-se ao máximo às condições reais.

Para a validação do diagnóstico um especialista do laboratório de imunologia localizado em Manaus no estado do Amazonas rotulou todas as imagens nos três diagnósticos possíveis: positivo, negativo e indeterminado.

5.4 Processamento Digital das Imagens

Com o objetivo de aumentar as chances para o sucesso na análise da imagem faz-se necessário uma fase de pré-processamento que envolve entre outras técnicas, as técnicas de realce de contraste e remoção de ruídos (Gonzalez, 2000).

5.4.1 Realce de imagens

O principal objetivo das técnicas de realce é processar uma imagem, de modo que o resultado seja mais apropriado para uma aplicação específica do que a imagem original (Gonzalez, 2000).

Nesta pesquisa foi desenvolvido um algoritmo para realçar o fundo da imagem colorida e promover o aumento do contraste. O algoritmo desenvolvido segue o método do domínio espacial, este se refere ao próprio plano da imagem, e as abordagens nessa categoria são baseadas na manipulação direta dos *pixels* da imagem.

O algoritmo desenvolvido identifica todos os *pixels* escuros que estão dentro de uma faixa pré-definida e os converte para a cor preta ideal, RGB(0,0,0).

A figura 23 mostra um cubo RGB adaptado com pontos em vermelho ao redor da linha que representa a escala de cinza para demonstrar a área coberta pelo algoritmo.

Figura 23 - Cubo RGB (adaptado de <http://photo.net/learn/optics/edscott/vis00020>)

Inicialmente o algoritmo captura os valores de vermelho, verde e azul de cada *pixel* da imagem, em seguida identifica o maior valor entre os três.

O passo seguinte consiste na conversão de todos os *pixels* da escala de cor cinza para a cor preta. Um *pixel* pertence à escala de cinza quando possui iguais valores de vermelho, verde e azul.

Para identificar um *pixel* que pertence à faixa de valores ao redor da escala de cinza é necessário identificar o maior valor entre vermelho, verde e azul e em seguida calcular a diferença entre o maior valor e os demais valores. Se a diferença for menor que o valor pré-definido (valor igual a 46) no algoritmo o *pixel* recebe a cor preta, caso contrário o *pixel* continua com o valor original.

O valor 46, utilizado para calcular a diferença entre os valores de *pixels*, foi definido após testes com diversos valores e observação da imagem obtida no final do processamento.

O trecho de código que implementa o algoritmo descrito acima é apresentado abaixo (quadro 4) e o resultado do processamento pode ser visto na figura 24.

Algoritmo para realçar e uniformizar o fundo da imagem do exame	
Entrada: Imagem original	Saída: Imagem realçada
<pre> maior := 0; if Red > maior then maior := Red; if Green > maior then maior := Green; if Blue > maior then maior := Blue; if ((Red=Green) and (Red=Blue) and (Green=Blue) and (Red < 240)) then Imagem[I,J] := RGB(0,0,0); if (maior < 240) and ((maior-Red) < 46) and ((maior-Green) < 46) and ((maior-Blue) < 46) then Imagem[I,J] := RGB(0,0,0) else Imagem[I,J] := RGB(Red,Green,Blue); </pre>	

Quadro 3 - Algoritmo para realce de imagem

Figura 24 - Realce da Imagem

5.4.2 Binarização da Imagem

O processo de binarização consiste em transformar imagens em tons de cinza em imagens binárias. Tendo como entrada uma imagem em tons de cinza verificam-se os valores de intensidade dos *pixels* para decidir se este receberá o valor preto ou branco. A decisão é feita pela comparação numérica dos *pixels* com um determinado valor chamado de *threshold* ou limiar. Se o *pixel* de interesse tiver valor menor que o nível de *threshold*, então o receberá o valor preto, caso contrário receberá valor branco (Gonzalez, 2000).

Inicialmente os valores do canal RGB das imagens foram convertidas em tons de cinza e posteriormente foi aplicado o algoritmo para binarização.

Para realizar a conversão da imagem para tons de cinza fez-se uma varredura na imagem onde para cada *pixel* da imagem original foi calculado o valor correspondente para um tom de cinza.

A conversão de um valor de um *pixel* colorido para um valor correspondente em tom de cinza é necessária realização de quatro passos:

- a) Identificar os valores de R, G, e B.
- b) Somar os três valores.
- c) Dividir o valor da soma por 3.
- d) Pegar a parte inteira da divisão e substituir o valor obtido nos canais RGB.

Algoritmo para converter um <i>pixel</i> colorido em um <i>pixel</i> em tom de cinza	
Entrada: Valor do <i>pixel</i> colorido	Saída: Valor do <i>pixel</i> em tom de cinza
tom_cinza := Inteiro((valor_R, valor_G, valor_B) / 3); Imagem[c,l] := RGB(tom_cinza, tom_cinza, tom_cinza);	

Quadro 4 - Algoritmo para conversão de pixel colorido para um tom de cinza

O próximo passo consiste na aplicação do *thresholding*, ou seja, a segmentação da imagem em objeto e plano de fundo. Dessa maneira a imagem fica binarizada, com valores de pixel 1 (para o branco) e 0 (para o fundo).

Se $\text{imagem}[c,l] \geq \theta$ $\text{imagem}[c,l] := \text{branco}$
 Senão $\text{imagem}[c,l] := \text{preto}$

O resultado da segmentação utilizando *threshold* pode ser observado na figura 25. A figura ilustra o resultado final da utilização de quatro valores diferentes de *threshold*.

Para o valor de *threshold* igual a cinco observa-se que as bactérias aparecem em destaque na imagem, porém uma concentração de luminosidade no interior da imagem compromete o resultado. Os valores de *threshold* iguais a dez, quinze e trinta minimizam o problema da luminosidade, porém não conseguem destacar a imagem das bactérias fazendo com que elas sejam eliminadas da imagem.

Figura 25 - Testes com diferentes valores de threshold para binarizar imagens

Nesta pesquisa foram testados diferentes valores de *threshold*, porém não foi alcançado o resultado esperado devido a problemas de ruídos e luminosidade da imagem.

Com base nos conceitos apresentados acima foi implementado um algoritmo que tem como princípio avaliar se um *pixel* possui valor claro ou escuro para os três

canais de cores ao mesmo tempo e então definir se o valor do *pixel* será 1 (para o plano) ou 0 (para o fundo). O resultado pode ser observado na figura 26.

Figura 26 - Imagem binarizada de um exame

Para obter uma imagem binarizada foi utilizado o mesmo princípio de *threshold* quando se trabalha com imagens em tons de cinza, porém essa lógica foi aplicada diretamente nos canais de cores RGB da imagem obtida após a aplicação do algoritmo de realce da imagem.

Foi determinado um valor de *threshold* com valor igual 50 para cada canal de cor, este valor foi definido após análise do espectro de cores utilizando uma ferramenta de um *software* gráfico.

Na análise foi verificado que quando os valores de RGB estavam todos próximos e com valores abaixo de 50 cada um a cor obtida era escura o suficiente para que um algoritmo implementado pudesse determinar automaticamente como fundo da imagem.

Também foi verificado que quando uma das cores tinha valores mais altos a cor obtida não se parecia com a cor preta. O trecho de código que implementa o algoritmo descrito acima é apresentado abaixo (quadro 6).

Algoritmo para binarização de imagem	
Entrada: Imagem realçada	Saída: Imagem binarizada
<pre> if (Red <= 50) and (Green <= 50) and (Blue <= 50) then Imagem[I,J] := preto else Imagem[I,J] := branco; </pre>	

Quadro 5 - Algoritmo para binarização de imagem

5.4.3 Remoção de Ruídos e Localização das Bactérias na Imagem

Os ruídos são pequenas distorções na imagem, estas distorções podem dificultar a extração de informação relevante (FERNANDES e BARCELOS, 2004).

Nesta pesquisa são considerados como ruído os pontos isolados na imagem que não possuem relevância para o diagnóstico.

Para eliminar os ruídos fez-se uma varredura pela resolução total da imagem para encontrar regiões de *pixels* com o mesmo valor. Nessa busca são usados os conceitos de vizinhança e conectividade de *pixels*.

O algoritmo de crescimento de região foi utilizado para segmentação das bactérias. Cada bactéria identificada teve o valor de uma das coordenadas da imagem armazenada em uma lista. Esta coordenada representa a semente, ou seja, a partir desta coordenada é possível executar o algoritmo para identificar uma bactéria específica na imagem sem a necessidade de realizar uma varredura em toda a imagem do exame. Em consequência disto obteve-se como resultado o número de bactérias presentes na amostra.

A lista de coordenadas que identificam a localização do objeto de estudo finaliza a fase de pré-processamento da imagem. As coordenadas de *pixels* obtidas das imagens binarizadas foram utilizadas para fazer uma correspondência com a imagem original (colorida) e apresentar os *pixels* coloridos à rede neural para a classificação da intensidade de fluorescência (figura 27).

Figura 27 - Correspondência entre as imagens binarizada e original

Esta pesquisa se concentra na característica cor, mas para o desenvolvimento de uma solução mais robusta seria interessante a criação de um algoritmo para avaliar a forma da bactéria, por esse motivo foi realizada a etapa de identificação da bactéria para que seja utilizada em trabalhos futuros.

O objetivo da aplicação de algoritmos de processamento digital de imagens nesta pesquisa é a extração de informações importantes para análise, sendo esta informação adquirida por meio da interpretação do computador.

Para Jain (1969) a análise de imagens é uma técnica que se utiliza de diversos outros recursos do processamento de imagens. Estes estão divididos em três grandes classes: recursos de extração, de segmentação e de classificação.

Os recursos de extração e segmentação adotados nesta pesquisa foram apresentados nesta seção. Para a classificação dos *pixels* foi utilizada uma RNA com algoritmo de aprendizado *backpropagation*, os detalhes da aplicação da rede neural serão apresentados na seção seguinte.

5.4 Rede Neural para a Classificação dos Pixels

Em trabalhos prévios (LEITE e FILHO, 2009), (SARTORI, GALO e IMAI, 2009), (JUNIOR, PINTO, et al., 2001) a aplicabilidade da rede neural treinada com o algoritmo de aprendizado *backpropagation* no contexto da classificação de cores foi demonstrada.

A abordagem para classificação dos *pixels* em classes de cores foi implementada pela utilização de uma RNA (figura 28) com três neurônios na camada de entrada que recebem os valores do canal de cores RGB. Na camada de saída,

cinco neurônios representam a fluorescência (VC – verde claro; VM – verde médio, VE – verde escuro, Am – amarelo, Br – branco) e um neurônio criado para representar o fundo da imagem, este tem a finalidade classificar os pixels muito escuros que geralmente se encontram na borda das imagens das bactérias.

As redes neurais foram treinadas com valores de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 neurônios na camada oculta. O conjunto de treinamento que representam as classes de cores foi apresentado às redes em ciclos de 2000, 4000 e 6000 iterações. No total 30 redes foram treinadas e testadas.

Após os treinos as redes foram testadas com padrões não apresentados ao conjunto de treinamento. As RNAs que no final do treinamento obtiveram o menor erro quadrático médio (EQM) foram consideradas mais adequadas que as demais.

Figura 28 - Rede neural para a classificação de pixels

5.4.1 Criação do Conjunto de Treinamento

Nesta pesquisa foi implementado um programa para que o profissional pudesse interagir fornecendo exemplos extraídos do domínio do problema, o procedimento acontece em três passos:

- a) Selecionar a imagem de um exame.
- b) Clicar em uma área do exame.

c) Observar a cor que aparece no neurônio de exemplo de cor (na figura 29, este neurônio está localizado entre as palavras entrada e saída). Para incluir o valor no conjunto de treinamento o profissional deve clicar no neurônio de saída que melhor representa a cor selecionada.

Desta forma o conjunto de treinamento composto pelos campos descritos no quadro 7.

Figura 29 - Interface para criação do conjunto de treinamento

Campo	Faixa de valores
Valor R (vermelho)	0 a 255
Valor G (verde)	0 a 255
Valor B (azul)	0 a 255
Classe	1 – verde-claro 2 – verde-médio 3 – verde-escuro 4 – amarelo 5 – branco 6 – preto

Quadro 6 - Valores dos neurônios das camadas de entrada e saída

O conjunto de treinamento obtido para o treinamento da rede contém valores de 0 a 255 para cada canal de cor do espaço de cores RGB e valores de 1 a 6 para as classes de cores a serem identificadas. O conjunto de treinamento construído

utilizando o programa implementado para essa finalidade continha cerca de 40 exemplos para cada classe de cor.

Esta solução para construção do conjunto de treinamento apresentou uma desvantagem. Após um determinado tempo classificando as cores perde-se a concentração e o trabalho torna-se cansativo para quem o realiza, uma vez que para cada classe de cor era necessário informar 40 exemplos, totalizando 240 exemplos.

Para contornar este problema foi implementado um programa para inserir automaticamente um conjunto de valores de *pixels* com as suas respectivas classificações de cores. Estes novos exemplos somaram-se aos exemplos já fornecidos pelo especialista.

Foram gerados mais 100 exemplos para cada classe de cor, estes valores foram obtidos aleatoriamente obedecendo a um intervalo de valores para os canais de cores vermelho, verde e azul do modelo RGB. As faixas de valores foram definidas empiricamente por meio de observação do espectro luminoso de uma ferramenta gráfica. Abaixo (quadro 8), a faixa de valores utilizados para definir a classe de cores.

Classe de cor	Vermelho	Verde	Azul
Verde claro	0 – 80	182 – 255	0 – 50
Verde médio	0 – 80	121 – 180	0 – 50
Verde escuro	0 – 30	70 – 120	0 – 30
Amarelo	225 – 255	225 – 255	0 – 110
Branco	200 – 255	200 – 255	200 – 255
Preto	0 – 60	0 – 60	0 – 60

Quadro 7 - Faixa de valores RGB para definir conjunto de treinamento da Rede Neural

5.4.2 Treinamento e Avaliação da Rede Neural

A RNA é considerada treinada quando o erro entre as saídas obtidas e as saídas desejadas estiver reduzido a um valor aceitável, ou seja, um valor baixo que irá depender da aplicação para a qual a rede esta sendo treinada.

A escolha de uma rede ideal para a tarefa de classificação de *pixels* não é uma tarefa fácil. Algumas redes foram treinadas para que pudessem ser avaliadas. Cada rede foi configurada de acordo com os seguintes critérios:

- a) Quantidade de neurônios na camada oculta.
- b) Número de interações.
- c) Taxa de EQM.

As figuras 30, 31 e 32 ilustram o resultado do treinamento. No eixo x, a quantidade de neurônios utilizados na camada oculta, no eixo y, o valor do EQM.

Figura 30 - Resultado do treinamento das redes após 2000 ciclos de iterações

Na figura 30 observa-se que os valores de EQM variam bastante e não se aproximaram de zero, os valores mais baixos foram obtidos quando treinadas com 18 e 21 neurônios na camada oculta com valores de EQM x e y respectivamente.

Figura 31 - Resultado do treinamento das redes após 4000 ciclos de iterações

Na figura 31 observa-se que os valores de EQM já se apresentam mais baixos a partir do treinamento com 6 neurônios na camada oculta, estes valores tendem a baixar até o treinamento com 18 neurônios, depois os valores começam a aumentar.

Figura 32 - Resultado do treinamento das redes após 6000 ciclos de iterações

Na figura 32 observa-se que as redes chegam a um valor de EQM mais próximo de zero a partir do treinamento com 12 neurônios, há pouca variação no valor de EQM à medida que aumenta a quantidade de neurônios na camada oculta.

Dentre todos os testes realizados, as melhores configurações apontam para as redes treinadas em ciclos de 6000 iterações que possuíam os menores valores de EQM. O desempenho da RNA foi avaliado por meio do percentual de acerto global de classificação. Os resultados obtidos pela classificação com a RNA apontaram 100% de acerto na fase de treinamento e 98% de acerto total na fase de testes.

A rede neural foi utilizada para classificar os *pixels* das imagens dos exames em uma das seis classes de interesse. No final desta fase de classificação foi obtida a

concentração de *pixels* para cada classe de cor, estes valores são utilizados como entrada para a máquina de inferência fuzzy implementada para interpretar o diagnóstico do exame.

5.5 Interpretação do Diagnóstico por meio da Teoria *Fuzzy*

A subjetividade da interpretação das cores para obtenção do diagnóstico foi modelado por meio da técnica da teoria fuzzy tendo como informação de entrada os *pixels* classificados pela rede neural.

A imagem apresentada à rede neural tem seus *pixels* classificados entre as seis classes de cores (VC - verde-claro, VM - verde-médio, VE - verde-escuro, Am - amarelo, Br - branco e preto) que representam a fluorescência das imagens. A contagem dos *pixels* é apresentada a uma máquina de inferência para interpretação do diagnóstico.

Os três resultados possíveis para o teste FTA-ABS conduzem a três diagnósticos possíveis, são eles: positivo, negativo e indeterminado.

Este diagnóstico é dado pelo profissional seguindo um critério de classificação de fluorescência nas imagens que obedece ao princípio da intensidade da fluorescência observada no microscópio.

Fluorescência baixa ou inexistente resulta em diagnóstico negativo.

Fluorescência alta resulta em diagnóstico positivo.

Fluorescência média resulta em diagnóstico indeterminado.

O modelo nebuloso proposto para a interpretação do diagnóstico é apresentado na figura 30. Nesta fase do projeto foi utilizado o software MatLab da empresa MathWorks, mais especificamente o *toolbox* referente à lógica *Fuzzy*, mais tarde uma implementação em Delphi também foi realizada para que fosse possível integrar com as fases de processamento de imagem e classificação dos *pixels* também implementada nesta linguagem.

Figura 33 - Modelo da máquina de inferência nebulosa

5.5.1 Variáveis de Entrada

No protótipo, para que fosse possível sugerir o diagnóstico fez-se necessário avaliar todos os fatores possíveis nesse processo, neste caso, o agrupamento de *pixels* de tonalidades semelhantes que juntos determinam a intensidade de fluorescência.

Desta forma, o protótipo ficou estruturado com as seguintes variáveis de entrada: verde-escuro (VE), verde-médio (VM), verde-claro (VC), amarelo (Am) e branco (Br).

As variáveis de entrada são apresentadas em termos de valor percentual, para obter o valor de cada variável de entrada basta dividir a quantidade de *pixels* de uma determinada classe de cor pela quantidade total de *pixels* classificados na imagem (exceto *pixels* do fundo da imagem) e multiplicar o valor por 100. Nesta pesquisa, o valor percentual é chamado de concentração de *pixels*.

Todas as variáveis de entrada possuem os valores lingüísticos, alto, médio e baixo. A variável de saída chamada de diagnóstico possui os seguintes valores

lingüísticos: positivo, negativo e indeterminado. As variáveis utilizadas são apresentadas no quadro 10.

Variáveis Lingüísticas		Conjunto Nebuloso	Universo de Discurso	Descrição
Entrada	Verde-Escuro	Alto Medio Baixo	[0:100]	Define a concentração de <i>pixels</i> que representa a fluorescência na imagem
	Verde-Medio	Alto Medio Baixo	[0:100]	
	Verde-Claro	Alto Medio Baixo	[0:100]	
	Amarelo	Alto Medio Baixo	[0:50]	
	Branco	Alto Medio Baixo	[0:30]	
Saída	Diagnóstico	Positivo Negativo Indeterminado	[0:10]	Define o diagnóstico obtido pela máquina de inferência

Quadro 8 - Definição das variáveis lingüísticas

A figura 31 ilustra a variável de entrada criada para representar a concentração de *pixels* amarelos nas imagens dos exames, o valor 50 foi definido após analisar a concentração de *pixels* de algumas imagens, especialmente as que representam resultados positivos que representam as fluorescências mais altas.

Figura 34 - Variável de entrada para modelar a concentração de *pixels* amarelos

A figura 32 ilustra a variável de entrada criada para representar a concentração de *pixels* brancos nas imagens dos exames, o valor 30 foi definido após analisar a concentração de *pixels* de algumas imagens, a contribuição dos brancos nas imagens é menos significativa que a contribuição dos *pixels* amarelos.

Figura 35 - Variável de entrada para modelar a concentração de *pixels* brancos

A figura 33 ilustra a variável de entrada criada para representar a concentração de *pixels* verdes (claro, médio e escuro). O universo de discurso varia de 0 à 100 pois, representam a fluorescência verde obtidas dos exames.

Figura 36 - Variável de entrada para modelar a concentração de pixels verdes

Identificadas e definidas as funções de pertinência é necessário definir como os conjuntos de entrada serão combinados de forma a gerar o vetor de pertinência da variável de saída diagnóstico. Isto é feito a partir da criação da base de regras.

5.5.2 Fuzificação dos Dados

A fuzificação dos dados indica que há atribuição de valores lingüísticos, descrições vagas ou qualitativas, definidas por funções de pertinência às variáveis de entrada (CAMPOS e SILVA, 2008)

Para Simões e Shaw (2007) a fuzificação é o mapeamento do domínio de números reais (em geral discretos) para o domínio fuzzy.

No protótipo desenvolvido a fuzificação dos dados atribuem graus de pertinência às entradas em cada um dos conjuntos correspondentes, tais conjuntos modelados com o auxílio do especialista.

Os valores das variáveis de entrada são representados no eixo x dos gráficos que modelam as variáveis, desde que seus valores estejam dentro dos limites do conjunto, no eixo y são apresentados os valores dos graus de pertinência correspondentes, assim cada valor de entrada possui um grau de pertinência em cada um dos conjuntos *fuzzy*, caso os valores estejam fora dos limites do conjunto seu grau de pertinência será zero e dentro dos limites seu grau de pertinência é definido pela função de pertinência.

Para a modelagem do protótipo foram utilizadas funções de pertinência triangulares e trapezoidais.

Na modelagem das variáveis de entrada Am e Br foram utilizadas funções triangulares. Para modelar o conjunto Baixo foi utilizado somente a parte decrescente da função triangular (trecho [m,b]) e para modelar o conjunto Alto foi utilizada a parte crescente da função (trecho [a,m]). As equações utilizadas para calcular o grau de pertinência são mostradas na figura 37.

Figura 37 - Função de pertinência triangular

Na modelagem das variáveis de entrada VC, VM, VE e da variável de saída Diagnostico foram utilizadas funções trapezoidais. As equações utilizadas para calcular o grau de pertinência são mostradas na figura 38. Para modelar o conjunto Medio das variáveis de entrada e o conjunto Indeterminado da variável de saída foram utilizadas as funções triangulares.

Figura 38 - Função de pertinência trapezoidal

No entanto para modelagem dos conjuntos, Baixo e Alto das variáveis de entrada e dos conjuntos Negativo e Positivo da variável de saída, foram necessárias adaptações nas funções trapezoidais. Os conjuntos Baixo e Negativo foram representados apenas pela metade esquerda da função e os conjuntos Alto e Positivo foram representado apenas pela metade direita da função, como ilustrado abaixo na figura 39.

Figura 39 - Metades esquerda e direita da função de pertinência trapezoidal

Dessa forma é possível calcular o grau de pertinência de cada entrada em seus respectivos conjuntos, fuzzificando assim os valores de entrada.

5.5.3 Base de Regras

A base de regras é o centro de conhecimento de um sistema de inferência Fuzzy. Nela são armazenadas todas as regras de controle que determinarão o comportamento do sistema (KLIR, 1995). As regras Fuzzy representam o conhecimento do especialista e são condicionais do tipo SE (antecedente) ENTÃO (conseqüente). O antecedente são as variáveis de entrada que são combinadas por meio do uso de operadores E e OU. O conseqüente contém as variáveis de saída que serão afetadas pela aplicação das regras.

As informações necessárias para se obter a consistência da base de regras, e sua criação foram obtidas a partir do conhecimento do especialista. Algumas das regras criadas para o problema proposto são apresentadas no quadro 11.

Verde-Escuro	Verde-medio	Verde-Claro	Amarelo	Branco	Diagnóstico
Alto	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Negativo
Alto	Médio	Baixo	Baixo	Baixo	
Médio	Médio	Baixo	Baixo	Baixo	
Alto	Baixo	Baixo	Medio	Medio	Indeterminado
Medio	Alto	Medio	Medio	Baixo	
Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo	Positivo
Baixo	Medio	Alto	Baixo	Baixo	
Baixo	Alto	Alto	Baixo	Baixo	
Baixo	Alto	Alto	Medio	Baixo	
Baixo	Baixo	Medio	Alto	Medio	
Baixo	Alto	Alto	Medio	Medio	

Quadro 9 - Base de regras para definir a fluorescência das imagens

A figura 40 ilustra a base de regras com a aplicação de valores que resultam em um diagnóstico positivo.

Figura 40 - Base de regras

5.5.4 Variável de Saída

A variável de saída (Diagnóstico) precisa passar pelo processo de defuzzificação para ser transformada em um número real, entre 0 e 10, para assim representar o diagnóstico do exame.

O método de defuzzificação aqui proposto utiliza a técnica do Centro-de-Área (C-o-A), no tratamento da variável de saída final. A maioria dos sistemas fuzzy utiliza essa etapa porque o resultado desejado, geralmente precisa ser expresso de forma numérica. A figura 41 ilustra a variável de saída criada para indicar o diagnóstico fornecido pela máquina de inferência.

Figura 41 - Variável de saída para representar o diagnóstico

5.6 Resultados Experimentais

Para realizar a simulação foram utilizadas 107 imagens, das quais 26 representam exames positivos, 50 imagens de exames negativos e 31 de exames indeterminados.

Um diagnóstico é denominado falso negativo quando um indivíduo doente (com sífilis) é diagnosticado como com saudável, enquanto um diagnóstico é denominado falso positivo quando um indivíduo sadio é diagnosticado como doente. Estes números são apresentados na forma de matriz de confusão. As linhas desta matriz correspondem às classes reais das amostras de testes, enquanto as colunas correspondem às classes previstas pelo classificador fuzzy. Para o presente estudo a matriz de confusão possui três linhas e três colunas. Se todas as amostras forem corretamente classificadas, a matriz de confusão correspondente terá elementos não-nulos apenas ao longo da diagonal principal

O resultado da classificação do método proposto (tabela 1) aponta uma taxa de acerto entre 84 e 87%.

Tabela 1 - Resultados do método proposto

Classificado como:			
Diagnóstico	Positivo (%)	Negativo (%)	Indeterminado (%)
Positivo	84,62	0	15,38
Negativo	0	86	14
Indeterminado	3,23	9,67	87,10

Algumas considerações com relação às concentrações de *pixels* nas imagens para os três diagnósticos possíveis são apresentadas abaixo:

- Imagens que representam diagnóstico positivo: apresenta concentrações de verde claro, verde médio, amarelo e branco. As maiores concentrações de amarelo são encontradas neste tipo de exame.
- Imagens que representam o diagnóstico negativo: de uma forma geral apresentam grande concentração de *pixels* escuros (em torno de 70%), estes são classificados pela rede neural como verde escuro. Existem casos de exames negativos onde são verificados pequenos focos de fluorescência espalhados pela superfície da lâmina, algumas imagens foram criadas para simular este tipo de exame.
- Imagens que representam diagnóstico indeterminado: em geral apresenta quantidades balanceadas das concentrações de verdes (claro, médio e escuro), em alguns casos também foram verificadas grandes quantidades de amarelo.

Nós tópicos seguintes são discutidos os resultados obtidos.

5.6.1 Análise de exames positivos

Para os casos em que as imagens das bactérias apresentaram alta fluorescência a classificação correta ocorreu em 84,62% das imagens.

O fato de nenhuma imagem ter sido classificada como resultado negativo sugere que as regras criadas para identificar os exames positivos são coerentes com a habilidade do especialista em determinar o diagnóstico, visto que em todos os casos em que houve erro na classificação o resultado foi o diagnóstico indeterminado.

Em exames cujo resultado é positivo, nem todas as bactérias observadas apresentam uma intensidade elevada de fluorescência, ou seja a intensidade não é homogênea podendo ser identificadas com baixa fluorescência. Neste caso o especialista observa a fluorescência predominante no campo de visão para determinar o resultado do exame, neste caso para a imagem gerada, pois foram criadas algumas imagens para simular essa situação e submeter para a avaliação do protótipo implementado.

5.6.2 Análise de exames negativos

Para os casos em que as imagens das bactérias aparecem com fluorescência baixa ou quase inexistente a classificação correta ocorreu em 86% das imagens.

Na etapa de pré-processamento da imagem muitos *pixels* de cores escuras foram convertidos para a cor preta e foram classificados como cor de fundo quando apresentados à rede neural.

O pré-processamento da imagem contribuiu para a classificação correta para exames negativos caracterizados por baixa intensidade ou inexistência de fluorescência.

Os erros na classificação de exames negativos ocorreram em casos em que as imagens apresentaram apenas alguns pontos fluorescentes levando ao erro na classificação, pois as regras definidas para a classificação nos casos de alta concentração de *pixels* das cores em amarelo, branco e verde claro, em geral influenciam no diagnóstico positivo.

As regras fuzzy para classificar exames como negativo tem como base a predominância de pixels mais escuros, como o verde-escuro e o verde-médio. Em exames reais podem ser observadas a presença de pontos de fluorescência nas lâminas analisadas através do microscópio, porém não apresentavam a forma de

espiral, característica da bactéria causadora da sífilis que segundo o especialista pode ocorrer em alguns exames.

Foram criadas imagens de exames com as características descritas anteriormente, tais pontos fluorescentes induziram ao erro na classificação de algumas imagens, vale ressaltar que nas imagens simuladas esses pontos fluorescentes foram intensificados para aumentar o grau de dificuldade na classificação, ainda assim o resultado foi satisfatório na maioria dos testes.

5.6.3 Análise de exames indeterminados

O diagnóstico indeterminados reflete os casos em que a intensidade de fluorescência observada não é fraca o suficiente para determinar um diagnóstico negativo nem forte o suficiente para levar ao resultado positivo. A classificação correta ocorreu em 87% dos casos.

Os erros na análise desse tipo de exame ocorreram devido a dificuldade enfrentada na definição de exemplos para o conjunto de treinamento da rede neural. Diversas redes foram treinadas na tentativa de encontrar uma solução para a classificação adequada dos *pixels*.

A alta subjetividade na definição das cores e a semelhança entre as imagens de exames positivos e indeterminados levaram à criação de um conjunto de treinamento cujos valores de RGB eram similares. Apesar das imagens parecerem visualmente diferentes das imagens de exames positivos a precisão do computador evidencia a semelhança entre elas em termos de valores expressos nos canais de cores RGB.

Após análise dos resultados foi verificado um erro na rotulação de 2 imagens utilizadas na simulação, duas imagens rotuladas como negativas apresentavam alta concentração de *pixels* em verde escuro (98%), o que caracteriza um exame negativo. Quando solicitado ao especialista que rotulasse novamente essas mesmas imagens este as classificou como negativa, confirmando a análise obtida pelo *software*.

5.6.4 Treinamento da Rede Neural

Muitas redes neurais foram treinadas e testadas para que fosse encontrada uma rede que pudesse generalizar os padrões de cores necessárias para a realização desta pesquisa.

O número de neurônios utilizados na camada oculta variaram entre 3 e 30. O conjunto de treinamento foi apresentado à rede neural em ciclos de iterações, os valores utilizados foram: 2000, 4000 e 6000. Foi observado que o tempo de treinamento não se manteve praticamente constante a cada ciclo de 2000 iterações, foram observados tempos maiores de processamento à medida que se aumentava o número de neurônios na camada oculta. Uma dificuldade enfrentada na criação do conjunto de treinamento foi a definição das faixas de valores que definem as três intensidades da cor verde, essa dificuldade ficou evidenciada quando iniciaram os treinamentos das primeiras redes neurais.

Os testes revelaram que a tonalidade mais escura de verde estava sendo classificada como cor preta que caracteriza o fundo da imagem. A classificação de tonalidade escura para a cor verde favorece a análise de imagens que representam os exames negativos, porém prejudicava a análise de imagens que representam os exames positivos e indeterminados.

A tabela 2 apresenta uma amostra dos valores utilizados no conjunto de treinamento para as cores verde-escuro e preto.

Tabela 2 - Amostra de valores de pixels utilizados no conjunto de treinamento

Verde-escuro			Preto		
R	G	B	R	G	B
30	44	5	0	0	0
20	30	3	17	17	17
24	35	4	18	28	3
43	64	6	27	41	5
40	59	6	39	56	5
33	49	5	10	15	3
29	44	5	54	54	54

A similaridade nos valores apresentados na tabela justifica os erros na classificação. Para minimizar esses erros as redes foram treinadas com ciclos maiores de iterações para que fosse alcançado um valor de erro considerado aceitável.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo apresenta as considerações referentes à utilização dos métodos computacionais propostos para a pesquisa desenvolvida.

6.1 Cumprimento dos Objetivos

Nesta dissertação apresenta-se uma estratégia para analisar imagens de microscopia de fluorescência com o objetivo de auxiliar o especialista na definição do diagnóstico da sífilis. Em função deste objetivo efetuou-se um longo trabalho de pesquisa envolvendo entre outras definições os conceitos de microbiologia como a morfologia das bactérias, formas de defesa do organismo quando expostos às bactérias nocivas, formas de tratamento e tipos de microscopia utilizados para análise de exames, tudo com o objetivo de conhecer o ambiente no qual a pesquisa foi realizada com o intuito de absorver o máximo de conhecimento do especialista e propor uma solução computacional para análise de imagens de exames resultante do teste FTA-ABS.

As técnicas de inteligência computacional propostas para o problema do diagnóstico foram as redes neurais artificiais e a teoria *fuzzy*. As redes neurais artificiais por sua capacidade de aprendizado por meio de exemplos mostrou-se adequada nesta proposta de trabalho onde sua função foi a de classificar os *pixels* das imagens em classes de cores pré-definidas. A subjetividade da interpretação do diagnóstico foi modelado por meio de teoria *fuzzy* dada sua capacidade de trabalhar com incertezas.

A identificação dos padrões de fluorescência necessários para a modelagem das variáveis linguísticas foram alcançados após análises de várias imagens de exames e auxílio do especialista que acompanhou a pesquisa.

O método proposto neste trabalho pode ser avaliado por meio da construção de um protótipo onde foram criadas interfaces com diferentes propósitos, dentre as

quais destaca-se a interface implementada para que o especialista pudesse interagir fornecendo exemplos de treinamento dos padrões de cores que determinariam a fluorescência dos exames.

A metodologia adotada mostrou-se adequada, atingindo com sucesso os objetivos inicialmente propostos, porém ainda existem melhorias a serem realizadas. O resultado deste estudo foi a proposta apresentada no capítulo 5.

6.2 Considerações Gerais e Contribuições

O método computacional para auxiliar o diagnóstico da sífilis por meio de análise de imagens obtidas pelo teste FTA-ABS consiste de uma solução híbrida utilizando algoritmos de processamento de imagens, redes neurais artificiais e teoria fuzzy, apresentados ao longo do texto.

Pela abordagem proposta o diagnóstico é realizado em três etapas: a) fase de processamento de imagem; b) classificação de cores *pixel a pixel*; c) interpretação do diagnóstico.

Na etapa de processamento de imagens foram utilizados algoritmos para realce e segmentação, obteve-se um bom resultado nas imagens, porém o tempo de processamento não foi considerado satisfatório do ponto-de-vista do especialista.

Para a classificação dos *pixels* foi utilizada uma rede neural treinada com algoritmo de retropropagação do erro. O resultado final da classificação apresentou 98% de acerto, mas duas observações precisam ser feitas:

a) A solução proposta para construção do conjunto de treinamento apresentou uma desvantagem. Após um determinado tempo classificando as cores perde-se a concentração e o trabalho torna-se cansativo para quem o realiza, uma vez que para cada classe de cor era necessário informar 40 exemplos, totalizando 240 exemplos.

b) O tempo de treinamento da rede neural não é previsível, podendo em alguns casos ser muito longo.

Dada a forte subjetividade existente na análise de cores e levando-se em conta a natureza lingüística das variáveis envolvidas (verde-claro, verde-médio, verde-

escuro) um classificador fuzzy foi utilizado como uma alternativa viável. A utilização de um classificador *fuzzy* mostrou-se aderente à abordagem, visto que;

- a) Possui custo computacional pequeno, sobretudo quando comparado às RNAs.
- b) Trabalha com sistema de regras claras para a classificação.
- c) É possível saber o grau de confiança na classificação realizada.

O refinamento das regras e das funções de pertinência para uma classificação adequada, assim como a otimização dos algoritmos de processamento de imagens permanecem como trabalhos futuros para esta pesquisa, que mediante análises efetuadas mostrou-se bastante aderente à proposta de trabalho.

A solução proposta apresentou bons resultados, podendo ser considerada uma ferramenta eficiente no auxílio ao diagnóstico por meio de análise de imagens. Isto é evidenciado quando se considera o acerto de 84,62% de detecção de diagnósticos positivos.

A partir da comprovação de sua eficiência, pode-se prever, como perspectivas futuras, o aprimoramento da solução proposta com a introdução de imagens de exames reais.

Além disso, é importante ressaltar que os resultados apresentados são validados por apenas um especialista em uma base de teste elaborada para validar a solução proposta. Contudo o trabalho contribui com uma abordagem computacional para o problema da subjetividade na interpretação de imagens de fluorescência para auxiliar no diagnóstico da sífilis, uma vez que a habilidade do especialista em interpretar imagens é documentado por meio da base de regras torna-se possível a discussão da qualidade do trabalho desenvolvido no laboratório utilizado como estudo de caso, no qual busca-se a melhoria contínua dos serviços prestados à comunidade. Com uma base de imagens previamente analisadas e validadas será possível contribuir com o treinamento de novos profissionais da área da saúde.

A pesquisa deverá prosseguir com a análise de exames de pacientes e com um maior número de especialistas para que seja possível validar as regras de inferência definidas no trabalho. Isto abre a possibilidade de uma ampliação no processo de validação, além de oferecer uma análise automática de exames para

auxílio ao diagnóstico médico no atendimento cotidiano do laboratório utilizado como estudo de caso, bem como a melhoria deste atendimento.

6.3 Trabalhos Futuros

Nesta seção, apresentam-se sugestões para trabalhos futuros, visando manter uma continuidade na pesquisa.

Com base nos resultados obtidos do protótipo implementado para aplicação da abordagem proposta podem ser enumeradas as seguintes sugestões para trabalhos futuros nesta linha de pesquisa:

- a) A utilização de imagens de exames reais e não imagens simuladas como as utilizadas nesta pesquisa.
- b) Criação de uma base de dados com imagens devidamente classificadas pelos especialistas para servir de estudo para outros pesquisadores.
- c) A opinião de mais de um especialista para validar os resultados.
- d) Para o mesmo problema, realizar testes com outras funções de fuzificação.
- e) Fazer uma comparação de desempenho para diferentes métodos de defuzificação.
- f) A possibilidade de investigar as regras fuzzy que tenham maior significância é uma outra possibilidade pois assim se consegue mapear informações mais relevantes.

É recomendável que novas idéias implementadas sejam comparadas com outros métodos de classificação já existentes, utilizando a mesma base de dados. Pode-se notar que o método proposto neste trabalho não foi comparado com outros métodos de classificação, o que abre mais uma possibilidade de continuação deste trabalho. Simulações usando o método proposto permitiram testar a lógica do raciocínio empregado no desenvolvimento do protótipo. Mostraram que a solução escolhida é viável para o desenvolvimento de um Sistema de Apoio ao Diagnóstico, cujo processo atual de decisão baseia-se na experiência de um ser humano.

7. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, E.; CONCI, A. **Computação Gráfica - Teoria e Prática**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 353 p.

AZEVEDO, L. K. A. et al. Caracterização e correlação do fenômeno pró-zona com títulos de sororeatividade do VDRL e reação de imuno-fluorescência indireta em soros de pacientes com sífilis. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 3, p. 183-187, 2006.

BLACK, J. G. **Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 856 p.

BRAGA, A. P.; CARVALHO, C. P. D. L. F.; LUDEMIR, T. B. **Redes Neurais Artificiais: Teoria e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 262 p.

CAMPOS, E. A.; SILVA, H. C. Sistema Inteligente para Tomada de Decisões Utilizando Lógica Fuzzy. **Anuário da Produção Acadêmica Docente**, XII, 2008.

CASTLEMAN, K. R. **Digital Image Processing**. New Jersey: Prentice Hall, 1995. 667 p.

COSTA, M. G. F. et al. Automatic identification of mycobacterium tuberculosis with. **Engineering in Medicine and Biology Society, 2008. EMBS 2008. 30th Annual International Conference of the IEEE**, Vancouver, v. 1, p. 382-385, August 2008.

DEMANTOVA, P. H. E.; SAKAMOTO, D. G.; IOSHII, S. O. **Segmentação Automática de Bactérias para o Método DEFT**. II Latin American Congress on Biomedical Engineering. Havana: Sociedade Cubana de Bioengenharia. 2001.

DZYUBACHYK, O. et al. Advanced Level-Set-Based Cell Tracking in Time-Lapse Fluorescence Microscopy. **IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING**, v. 29, p. 852-867, march 2010.

FERNANDES, A. R. **Inteligência Artificial Noções Gerais**. 1. ed. São Paulo: Visual Books, 2003. 160 p.

FERNANDES, H. C.; BARCELOS, C. A. Z. **Remoção de Ruídos em Imagens Coloridas**. VII Encontro Interno e XII Seminário de Iniciação Científica. Uberlândia: [s.n.]. 2008. p. 1-10.

FERREIRA, A. G. et al. **Diagnóstico Sorológico do HIV - Testes Confirmatórios**. Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Brasília, p. 67. 1997.

FRASER, T.; BANKS, A. **O Guia Completo da Cor**. 1. ed. São Paulo: Senac São Paulo, v. I, 2007. 224 p.

GOMES, M. M. et al. Construção de Robôs Jogadores de Futebol Parte 4 A Visão Computacional. **Revista Mecatrônica Fácil**, São Paulo, Novembro 2006.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. C. **Digital Image Processing**. 1. ed. USA: Addison Wesley Publishing Company, 1992.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Armed, 2008. 448 p.

JAHNE, B. **Digital Image Processing**. 5. ed. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hong Kong; London; Milan; Paris; Tokyo: Springer, 2002. 585 p.

JAIN, A. K. **Fundamentals of Digital Image Processing**. [S.l.]: [s.n.], 1969.

JR, M. J. P.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, v. 1, 1997. 524 p.

JUNIOR, D. G. D. S. et al. Algoritmo para classificação de plantas de milho atacadas pela lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Smith) em imagens digitais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 3, p. 502-509, setembro 2001.

KEESE, A. **Teoria de Cores**. [S.l.]: Publishing, Desktop.

KLIR, G. J. et al. **Fuzzy Sets and Fuzzy Logic - Theory and Applications**. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 1995.

KONAR, A. **Artificial Intelligence and Soft Computing Behavioral and Cognitive Modeling of the Human Brain**. 1. ed. London: CRC Press, 2000. 816 p.

LEITE, E. P.; FILHO, C. R. D. S. Classificação Supervisionada de Imagens Texturais Utilizando Redes Neurais Artificiais. **Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Natal, 25-30 abril 2009. 7821-7828.

LIU, Y.; SRIHARI, S. N. Document Image Binarization Based on Textures Features. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 19, n. 5, 1997.

LOESCH, C.; SARI, S. T. **Redes Neurais Artificiais Fundamentos e Modelos**. 1. ed. Blumenau: Edifurb, 1996. 166 p.

Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis - DST. Coordenação Nacional de DST/AIDS. Brasília. 1999.

MARQUES, P. M. A. Diagnóstico Auxiliado por Computador na Radiologia, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 285-296, Setembro 2001.

- MEDEIROS, L. F. **Redes Neurais em Delphi**. Florianópolis: Visual Books, 2006.
- MIMS, C. A. et al. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- MITCHELL, T. M. **Machine Learning**. Boston: WCB McGraw-Hill, 1997.
- MUNAKATA, T. **Fundamentals of the new Artificial Intelligence**. 2. ed. Londres: Springer, 2008.
- NARAYANASWAMY, A. et al. Robust Adaptive 3-D Segmentation of Vessel Laminae From Fluorescence Confocal Microscope Images and Parallel GPU Implementation. **IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING**, v. 29, n. 3, p. 583-597, March 2010.
- PEDRYCZ, W. **Fuzzy Control and Fuzzy Systems, secoond (extended) edition**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- RICHETTO, M. R. S. **Sistema de Tratamento de Imagens Digitais para Auxílio a Exames Laboratoriais**. Dissertação de Mestrado apresenta à Universidade de Taubaté. Taubaté. 2007.
- SANTANA, L. R. et al. Teste VDRL para o diagnóstico da sífilis: avaliação dos resultados em uma unidade de atenção primária de saúde, v. 38, n. 2, p. 71-73, 2006.
- SANTOS, M. O. et al. Comparação de testes nao treponêmicos utilizados no diagnóstico da sífilis e interferência da inativação do soro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 39, n. 2, 2007. 135-137.
- SARTORI, L. R.; GALO, M. L. B. T.; IMAI, N. N. Mapeamento de Plantas Daninhas em Cultura de Café a partir de Imagens Multiespectrais de Escalas Grandes Usando Redes Neurais Artificiais. **Revista Brasileira de Cartografia**, 61, fevereiro 2009. 165-175.
- SIMÕES, A. S. **Segmentação de imagens por classificação de cores: uma abordagem neural**. Dissertação de mestrado apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 132. 2000.
- SIMÕES, M. G.; SHAW, I. S. **Controle e Modelagem Fuzzy**. 2. ed. São Paulo: Blusher, 2007. 186 p.
- TERANO, T. et al. **Fuzzy Systems Theory and Its Applications**. Boston: Academic Press, 1992.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 920 p.
- VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 256 p.

WELSTEAD, S. T. **Neural Network and Fuzzy Logic Applications in C/C++**. New York: John Wiley & Sons, 1994. 494 p.

XIONG, G. et al. Segmentation of Drosophila RNAi Fluorescence Images Using Level Sets. **Image Processing, 2006 IEEE International Conference on**, October 2006. 73-76.

ZADEH, L. A. Fuzzy Sets. **Information and Control**, Nova York, v. 8, n. 3, p. 338-353, 1965.

ZADEH, L. A. Outline of a New Approach to the Analysis of Complex Systems and Decision Processes. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics**, v. 3, p. 28-44, 1973.

ZERBINATTI, L.; JÚNIOR, L. A. M. Fuzzy e Bayes no Apoio à Decisão Médica. **Exacta**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 309-315, jul/dez 2006.

8. GLOSSÁRIO

Antibiótico: Um agente antimicrobiano produzido naturalmente por uma bactéria ou fungo.

Anticorpo: Uma proteína produzida pelo corpo em resposta a um antígeno e capaz de se combinar especificamente com aquele antígeno.

Antígeno: Qualquer substância que causa a formação de anticorpos e reage somente com o seu anticorpo específico; também denominado imunógeno.

Bacilo: Qualquer bactéria em forma de bastão.

Cancro: Uma lesão endurecida, cujo centro úlcera.

Coco: Uma bactéria esférica ou ovóide.

Congênito: Refere-se a uma condição existente no nascimento; pode ser herdada ou adquirida intra-uterino.

Doença latente: Uma doença caracterizada por um período sem sintomas, quando o patógeno está inativo.

ELISA (ensaio imunossorvente ligado à enzima): Um grupo de testes sorológicos que usam reações enzimáticas como indicadores.

Espiroqueta: Uma bactéria em forma de saca-rolhas com filamentos axiais.

Fímbria: Um apêndice em uma célula bacteriana, usado para fixação.

Fissão binária: Reprodução da célula procariótica por divisão em duas células filhas.

Flagelo: Um apêndice delgado da superfície da célula; usado para locomoção celular.

Fluorescência: A capacidade de uma substância de produzir luz de uma cor quando exposta à luz de outra cor.

Globulina: A classe de proteínas que inclui os anticorpos.

IgA: A classe de anticorpos encontrados em secreções.

IgD: A classe de anticorpos encontrados em células B.

IgE: A classe de anticorpos envolvidos na hipersensibilidade.

IgG: A classe mais abundante de anticorpos no soro.

IgM: A primeira classe de anticorpos a surgir após a exposição a um antígeno.

Imunoglobulina(Ig): Uma proteína (anticorpo) formada em resposta a um antígeno e pode reagir com aquele antígeno.

Imunologia: O estudo das defesas específicas do hospedeiro a um patógeno.

Microrganismo: Um organismo vivo muito pequeno para ser visto a olho nu; inclui as bactérias, fungos, protozoários e algas microscópicas; também inclui os vírus.

Parede celular: O revestimento externo da maioria das bactérias, fungos, algas e plantas; nas bactérias, consiste em peptidoglicana.

Patógeno: Um organismo causador de doença.

Plasma: A porção líquida do sangue em que os elementos formados estão suspensos.

Procarioto: Uma célula cujo material genético não está envolto em um envelope nuclear.

Reagina plasmática rápida (RPR), teste da: Um teste sorológico para sífilis.

Soro: O líquido residual após o plasma sanguíneo ter coagulado; contém anticorpos (imunoglobulinas)

Sorologia: O ramo da imunologia que estuda o soro sanguíneo e as reações antígeno-anticorpo *in vitro*.

Técnica de anticorpo fluorescente (AF): Um instrumento diagnóstico utilizando anticorpos marcados com fluorocromos e vistos por um microscópio de fluorescência; também denominado de imunofluorescência.

Teste de AF direto: Um teste de anticorpo fluorescente para detectar a presença de um antígeno.

Teste de AF indireto: Um teste de anticorpo fluorescente para detectar a presença de anticorpos específicos.

Teste FTA-Abs: Um teste indireto de anticorpo fluorescente usado para detectar sífilis.

Testes sorológicos: Técnicas para identificar um microrganismo com base em sua reação com anticorpos.

VDRL, teste: Um teste de triagem rápido para detectar a presença de anticorpos contra o *Treponema pallidum*. (VDRL significa Venereal Disease Research Laboratory).

Western blot: Uma técnica que usa anticorpos para detectar a presença de proteínas específicas separadas por eletroforese.