

DESENVOLVIMENTO DE AUTOMAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Felipe Gonçalves PILTA¹, Ricardo Augusto de ALMEIDA¹ & Flávio Buratti GONÇALVES^{1*}

¹ Universidade Paulista. Ciências da saúde. São Paulo, Brasil.

*Autor para correspondência: flavioburatti@hotmail.com

RESUMO

O Desenvolvimento de automação para identificação macroscópica de fungos filamentosos trata-se de um equipamento cujo objetivo é automatizar o processo de identificação de imagens de forma eficiente, auxiliando desta forma a área de Biomedicina. O sistema foi alimentado com até seis plaquetas que conterão as amostras coletadas a serem analisadas. Estas amostras estarão em um magazine com movimento vertical por meio de um atuador acionado por um sensor indutivo na presença de uma plaqueta. O atuador desliza a plaqueta do magazine até a esteira aonde é tirada uma fotografia, e posteriormente é feita uma análise comparando-se com um banco de dados de imagens pré-selecionadas. Em seguida, a plaqueta avança sendo depositada em um reservatório. Este trabalho tem aplicação em laboratórios de bioanálise: aumentando a qualidade das análises, melhorando sua precisão, diminuindo o tempo e erros das análises e obtendo assim uma maior credibilidade dentro do mercado da biomedicina.

Palavras chave: microbiologia, automação laboratorial, fungos filamentosos.

ABSTRACT

The Development of automation for macroscopic identification of filamentous fungi is a device whose goal is to automate the process of identifying images efficiently, thus supporting the area of biomedicine. The system was powered with up to six plates that contain the samples to be analyzed. These samples will be in a magazine with vertical movement by an actuator driven by an inductive sensor in the presence of a plates. The actuator slides the magazine nameplate to the mat where a picture is taken, and then is analyzed by comparing it with a database os pre-selected images. Thereafter, the plate moves being deposited in a reservoir. This work has application in bio analysis laboratories: enhancing the quality os the analysis, improving accuracy, reducing time and errors of analysis and thus obtaining greater credibility within the market of biomedicine.

Keywords: microbiology, laboratory automation, filamentous fungi.

1 Introdução

São estimadas cerca de 250 mil espécies de fungos sendo que menos de 150 foram descritas como patógenos aos seres humanos (ANVISA, 2010) dentre estes se destacam os dermatófitos, fungos queratinofílicos, capazes de invadir tecidos queratinizados de humanos e animais, causando infecções denominadas dermatofitoses, sendo classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, considerados cosmopolitas, e dependentes de fatores como: adaptação ao meio ambiente, convívio com animais domésticos, saneamento básico, sexo, idade e imunidade do hospedeiro influenciando assim na epidemiologia destes (DIEGO, 2011; WEITZMAN; SANTOS, 1997).

As infecções causadas pelos dermatófitos atingem cerca de 40% da população mundial e representam 30% de todas as infecções micóticas cutâneas (PINTO, 2008). Estudos epidemiológicos no Brasil têm mostrado o predomínio de *Trichophyton rubrum* seguido de outras espécies que variam, de região para região, como evidenciado em levantamentos feitos em São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Goiânia, Fortaleza e Pernambuco tendo esse fato grande importância epidemiológica e terapêutica (SOUZA, et al. 2007; COSTA, et al. 2002; DAMÁZIO, et al. 2007; WILLE, et al. 2007; ARRUDA, 2004), sendo o *T. tonsurans* e *T. rubrum* os agentes mais frequentes, esses podem ser transmitidos de pessoa para pessoa; (CDC, 2013; AQUINO, 2007; LACAZ, 2002) outro dermatófito importante e o *Microsporum canis*, transmitido para pessoas por meio de animais domésticos. Preferindo viver em áreas úmidas como dobras da pele, e em componentes domésticos, como roupas, toalhas e roupas de cama sua infecção tem como consequência: prurido, vermelhidão, descamação, fissuras na pele ou erupção, o pelo pode cair e unhas tornam-se descoloridos, e podem sofrer descamação, em casos mais graves podem ocorrer abscessos na pele (DAWSON, 2012).

A identificação de fungos filamentosos se baseia na análise microscópica através das características de hifa classificando-as como hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos e por características macromorfológicas das colônias, como cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, e a velocidade de crescimento fatores estes que configuram de extrema relevância para a identificação, com essas informações pode-se chegar a nível de gênero mais nem sempre a caracterização permite identificar a espécie, pelo grau de dificuldade e complexidade desses microrganismos (ANVISA, 2010).

O presente estudo se baseia na necessidade premente de um diagnóstico preciso e ao mesmo tempo rápido das principais infecções causadas por fungos filamentosos, sobretudo da classe dos dermatófitos, e a necessidade do desenvolvimento de uma automação para análise macroscópica das culturas. Entende-se que toda automação traz ao diagnóstico laboratorial uma maior reprodutibilidade e indubitavelmente uma maior confiabilidade dos resultados, através de uma diminuição dos prazos para a entrega dos laudos e uma maior sensibilidade e especificidade dos resultados. Desta forma o desenvolvimento de uma automação afim de possibilitar a avaliação macroscópica das culturas de fungos filamentosos isolados a partir de dermatofitoses em diferentes momentos de um processo de cultura poderia facilitar o processo de diagnóstico bem como o tratamento precoce, consciente e racional das infecções fúngicas nas populações humanas

2 Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento da automação o mesmo se utilizou dos seguintes componentes: fuso de esferas; motor de passo; sensor capacitivo; esteira transportadora; câmera e CLP (Controlador Logico Programável).

Sumariamente o fuso de esferas configura-se como um sistema de acionamento de alta eficiência, no qual a esfera realiza um movimento helicoidal entre o eixo do fuso e a castanha. A utilidade do fuso de esfera é ter uma precisão no deslocamento do magazine, pois necessita de um ponto exato de parada para alimentação da esteira.

Os motores de passo são: dispositivos eletromecânicos que convertem pulsos elétricos em movimentos mecânicos que geram variações angulares discretas. O rotor ou eixo de um motor de passo é rotacionado em pequenos incrementos angulares, denominados “passos”, quando pulsos elétricos são aplicados em uma determinada sequência nos terminais deste. A rotação de tais motores é diretamente relacionada aos impulsos elétricos que são recebidos, em como a sequência a qual tais pulsos são aplicados reflete diretamente na direção a qual o motor gira. A velocidade que o rotor gira é dada pela frequência de pulsos recebidos e o tamanho do ângulo rotacionado é diretamente relacionado com o número de pulsos aplicados.

Em relação aos primeiros motores o motor de passo apresenta evidentes vantagens, como tamanho e custo reduzidos, total adaptação à lógica digital o que permite o controle preciso da velocidade direção e distância, características de bloqueio, pouco desgaste e dispensa realimentação. Motor de passo no equipamento definirá cada etapa do processo, pois as paradas dos dispositivos são de extrema importância, controlando as rotações e velocidades e através do drive tem como programá-lo.

Sensores capacitivos detectam qualquer tipo de massa. Seu funcionamento se dá por meio de incidência de um campo elétrico que é gerado por cargas elétricas em sua face, formando assim um capacitor.

É característica de todo capacitor o aumento de sua capacitância quando colocamos algum tipo de massa dielétrica (isolante) entre seus eletrodos (os eletrodos são onde são armazenadas as cargas), sendo assim, quando aproxima qualquer material líquido ou sólido à face do sensor, ele atuará como massa dielétrica aumentando a capacitância. Por fim, o circuito eletrônico do sensor detecta essa variação de capacitância e atua sua saída, que pode ser um contato NA ou NF para corrente alternada ou contínua, um transistor ou ainda um sinal variável de tensão ou corrente (saída analógica).

Os sensores capacitivos têm uma ampla gama de aplicações que, de acordo com os modelos fornecidos pelos fabricantes, podem partir de uma simples detecção de qualquer material, por exemplo, para contagem em substituição as chaves fim de curso, até detector de líquidos.

O identificador de fungos por ter como amostra peças plásticas e sólidas, utilizou sensores capacitivos com precisão de atuação variando de 10 mm a 15 mm, assim garantindo o envio de sinal de entrada no CLP.

Uma esteira transportadora consiste em duas ou mais polias que movimentam uma superfície em que determinados materiais ou objetos são transportados. Sua utilidade se dá para o transporte de amostras nas etapas do processo de identificação (alimentação, coleta de imagem e descarte).

A câmera de vídeo é responsável por capturar as imagens dos fungos e transferi-las para um computador, onde o software ira fazer a análise através do método macroscópico.

O CLP é um aparelho eletrônico digital que utiliza uma memória programável para o armazenamento interno de instruções para implementações específicas, tais como lógica,

sequenciamento, temporização, contagem e aritmética, para controlar, através de módulos de entradas e saídas, vários tipos de máquinas ou processos. O controlador lógico programável define a lógica de funcionamento das etapas do processo da máquina.

3 Resultados

O equipamento contém um magazine com capacidade para dez unidades (placas de petris de tamanho médio) a serem analisadas, três motores sendo um do atuador, um do fuso do magazine e outro da esteira (Figura 1).

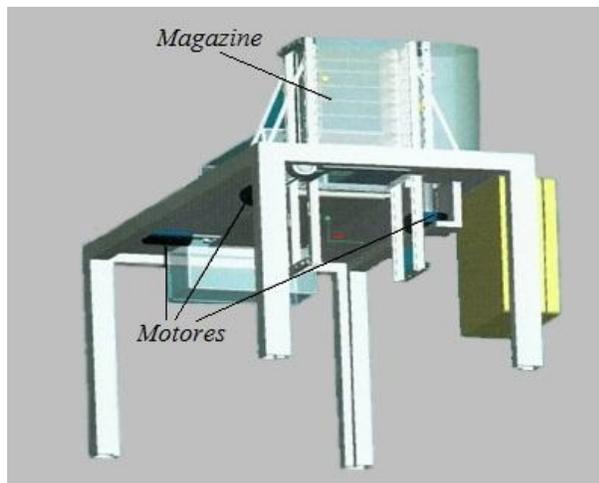


Figura 1 - Ilustração 3D do protótipo do equipamento (Vista Lateral)

Uma proteção de policarbonato para a proteção de interferências externas, duas barras roscadas para a movimentação do magazine e do atuador, um suporte de aço para sustentar toda estrutura do protótipo, um painel elétrico para controlar toda a parte elétrica, descarte da amostra analisada. (Figura 2).

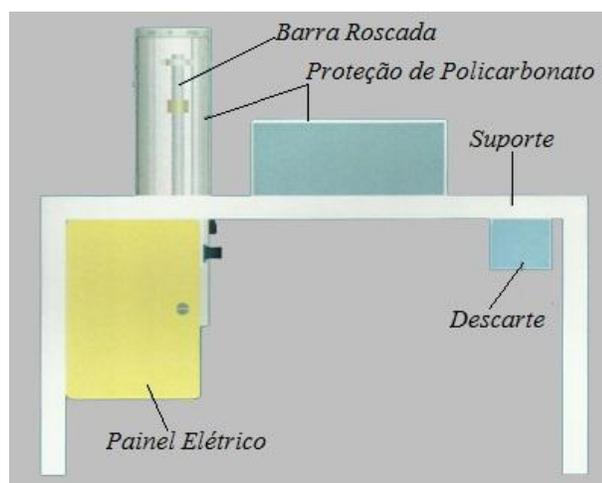


Figura 2: Ilustração 3D do protótipo do equipamento (Vista frontal).

O atuador apontado (Figura 3) é utilizado para expulsar a amostra a ser analisada do magazine, uma esteira transportadora.

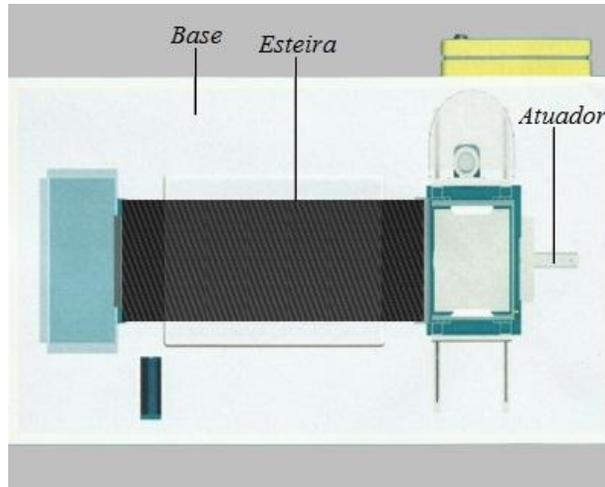


Figura 3. Ilustração 3D do protótipo do equipamento (Vista Superior).

A utilização do aparelho e o devido processamento das amostras seguem conforme fluxograma (Figura 4), resumidamente o responsável pelo processamento das amostras (de diferentes pacientes) introduz as culturas em um sistema de alimentação por magazine, a amostra selecionada sai do magazine e através de um atuador para uma esteira transportadora, passa até parar no ponto de captura do sensor o qual detecta a placa na posição correta, a partir da qual a câmera captura a imagem transmitindo-a para um computador, cujo software (o qual possui um amplo banco de dados para análise de colônias), faz a análise através das características macroscópicas, finalizado este processo a esteira continua seu percurso até o descarte do material em um reservatório específico.

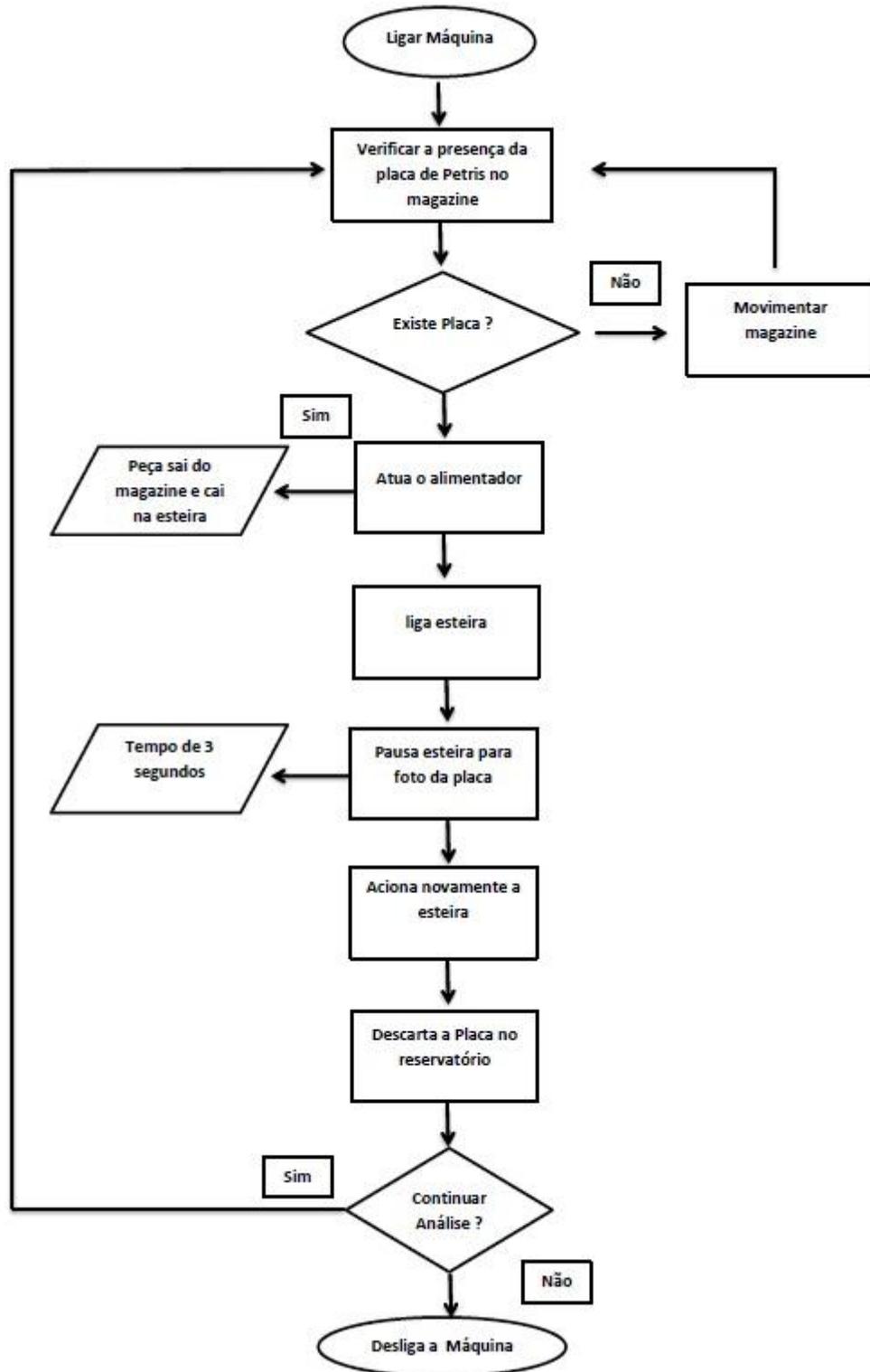


Figura 4. Fluxograma de funcionamento do equipamento.

4 Discussão

Ao longo das últimas décadas, a automação fez algumas incursões em laboratórios de microbiologia clínica, trazendo consigo um aumento da demanda para a realização de exames não só de alta qualidade, eficiência, rapidez, mas com custo de serviços acessíveis e atrativos.

Setores como os de bioquímica, imunologia, hormônios e hematologia, por exemplo, já dispõem de equipamentos para auxiliar no processo diagnóstico, enquanto que em microbiologia a automação é bastante restrita e de elevado custo o que acaba por inviabilizar sua utilização por laboratórios de pequeno e médio porte, acarretando a estes um trabalho exaustivo e minucioso dependente de um profissional qualificado para a condução dos ensaios e análise dos resultados, sem mencionar que há automação existente destina-se quase que exclusivamente ao isolamento e identificação bacteriana excluindo os fungos deste contexto.

A automação pode resultar em eficiência e redução de custos operacionais, redução de lesões por esforços repetitivos e, ainda permite a padronização na forma de como a tarefa é realizada o que melhora a qualidade e a reprodutibilidade dos ensaios.

Diferentes fatores serviram de motivadores para a rápida evolução da automação na medicina laboratorial: fatores externos de mercado, necessidade de melhor assistência à saúde e fatores internos de operação e do ambiente financeiro econômico das instituições. Em termos de mercado, os fatores motivadores são traduzidos pela exigência de altos padrões de qualidade e pelas expectativas do cliente referentes aos serviços prestados. No âmbito assistencial, a segurança do paciente por meio da minimização de erros e a redução dos prazos de resultados são fatores de impacto positivo no manejo dos pacientes e, conseqüentemente, na economia da saúde. Ressaltamos que a imensa pressão exercida na redução dos custos e a busca por mais produtividade, viabilizando empresas a permanecerem no mercado, são dois dos principais motivos da procura por automação de processos.

A necessidade constante da busca pela otimização dos custos nos laboratórios clínicos tem sua base na redução dos valores médios dos exames. Nos EUA, por exemplo, a receita média por exame em 1990 era de US\$ 24; em 1995, US\$ 16; em 2005, próximo a US\$ 10. Nesse contexto, a distribuição dos custos técnicos sofreu uma mudança importante. Em 1991, os gastos foram representados por 43% em quadro pessoal, 35% em equipamentos e reagentes e 22% de despesas gerais; enquanto em 1999 essa distribuição foi de 65%, 15% e 20%, respectivamente. Essa tentativa de diminuir os valores gastos junto às indústrias de diagnóstico *in vitro* demonstra a pressão por reduções de custos sendo transmitida por toda a cadeia.

Nos EUA, 32% dos laboratórios possuem algum tipo de automação, sendo que 17% deles optaram por um modelo de automação total (TLA) (MELANSON, et al. 2007). Sendo os benefícios gerados na introdução da automação bastante distintos e significativos. A redução de custos operacionais gerada demonstra um retorno sobre o investimento realizado variando de 2,5 a 4,9 anos, outro fator notável e a minimização de erros significativo na assistência à saúde, nos EUA houve uma redução de 58% no número de amostras desaparecidas após a implementação do processo de automação, além de redução significativa no TAT (HAWKER, et al. 2002).

A automação laboratorial pode ser visualizada como *Laboratory Automation System* (LAS). Este sistema engloba as atividades de gerenciamento de processos envolvidos no controle de equipamentos e instrumentos laboratoriais, controle de amostras e processos analíticos (BLICK, 1997). A automação por si só altera o ambiente laboratorial, tornando-o mais produtivo, mais eficiente, mais controlado. O reconhecimento de que processos extra-analíticos são importantes na prevenção de erros laboratoriais foi o ponto principal que mais influenciou o desenvolvimento de

sistemas e equipamentos para processamento de amostras. A natureza do trabalho laboratorial intensivo, repetitivo, associada a um alto risco e a uma baixa satisfação torna este um passo crítico no processo de análise laboratorial. Portanto se faz necessário uma mudança de atitude dos sistemas de saúde, no sentido de acompanhar outros setores da sociedade, que por décadas vêm aperfeiçoando seus processos, reduzindo erros resultantes de falhas humanas ou de sistemas.

5 Conclusão

Os resultados do presente estudo apresentam uma perspectiva favorável para a utilização da automação em questão no diagnóstico laboratorial de infecções por fungos filamentosos de maneira especial os dermatófitos. A automação dos procedimentos ora manuais busca uma maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos resultados e indubitavelmente uma diminuição dos prazos para a entrega dos laudos, sem contar as vantagens em termos operacionais de custo. Desta forma o desenvolvimento da automação apresentada, visa facilitar o processo de diagnóstico conduzindo a um tratamento precoce, consciente e racional das infecções fúngicas. O estudo segue para a validação da automação pela comparação do método de identificação por técnicas manuais em comparação ao método automatizado.

6 Referências

- ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde detecção e identificação dos fungos de importância médica: 1º edição 2010
- AQUINO, V. R; CONSTANTE, C. C; BAKOS. L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. **An Bras Dermatol**. 2007; 82(3):239-44.
- ARAUJO, A. J. G; BASTOS, O. M. P; SOUZA, M. A. J. et al. Onychomycosis caused by emerging fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. **An Bras Dermatol** 2003; 78(4):445–55
- ARRUDA, C. M. Frequency of onychomycosis etiological agents in leprosy patients. MSc. Thesis. São Paulo (Brazil): Universidade de Sao Paulo; 2004.
- BRILHANTE, R. S. N; PAIXÃO, G.C; SALVINO, L. K; DIÓGENES, M. J. N; BANDEIRA, S. P; ROCHA, M. F. G; SANTOS, J. B. F. dos; SIDRIM, J. J. C. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Fortaleza, CE. 2000.
- BLICK, K. E. Decision-making laboratory computer system as essential tools for achievement of total quality. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 908-12, 1997
- CAFARCHIA, C; IATTA, R; LATROFA, M. S; GRÄSER, Y; OTRANTO, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. **Infection, Genetics and Evolution**, Volume 20, Berlin, Germany

CAREY-ANN, D. B. Automation and Emerging Technology in Clinical Microbiology. **Clinics in Laboratory Medicine**, Volume 33, Issue 3, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Dermatophytes. EUA, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal/dermatophytes>> Acesso em: 23 de outubro de 2013.

CHINELLI, P. A. V; SOFIATTI, A. de A; NUNES, R. S. & MARTINS, J. E. da C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002, São Paulo, 2003.

DAMÁZIO, P. M. R.de B. C; LACERDA, H. R; FILHO, A. M. L; MAGALHÃES, O. M. C; NEVES, R. P. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2007.

DAWSON, A.L.; DELLAVALLE, R. P.; ELSTON, D. M. Infectious Skin Diseases: A Review and Needs Assessment, **Dermatologic Clinics**, Volume 30, Issue 1, January 2012.

GOIANIA, C; PASSOS, M; SOUZA, X. S. L; MIRANDA.K. H; LEMOS, A. T. B; JÚNIOR, J.de A; SILVA, M.do R. R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2002.

HAWKER , C. D. *et al.* Automated transport and sorting system in a large reference laboratory: part 2. Implementation of the system and performance measures over three years. **Clin Chem**, v. 48, n. 10, p. 1761-7, 2002

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9 ed. São Paulo – SP: **Sarvier**, 2002, 1104p.

MELANSON, S. E. F. *et al.* Selecting automation for the clinical chemistry laboratory. **Arch Pathol Lab Med**, v. 131, p. 1063-9, 2007.

PINTO, M. W. R.; ULIANO, M. M. L. Epidemiologia das micoses superficiais em Rio grande e Bagé, Rio Grande e Bagé, dezembro de 2008.

SANTOS, J. I.; NEGRI, C. M.; WAGNER, D. C.; PHILIPI, R.; NAPPI, B. P.; COELHO, M. P. Some Aspects of Dermatophytoses Seen at University Hospital in Florianopolis, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop**, 39:137-140, 1997.

SOUZA, E. A. F.; ALMEIDA, L. M. M.; GUILHERMETTI, E. *et al.* Frequência de onicomioses por leveduras em Maringa, Parana, Brasil. **An Bras Dermatol** 2007;82(2): 151–6.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, 8:240-259, 1995.

WILLE, M. P.; ARANTES, T. D.; SILVA, J. L. M. da. Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de Araraquara - SP, **Rev Bras Clin Med**, Araraquara, SP. 2009.