



DETECÇÃO DE DISCOS DE ANTIBIÓTICOS EM IMAGENS DE TESTE DE DISCO-DIFUSÃO (KIRBY-BAUER) UTILIZANDO REDES NEURAI CONVOLUCIONAIS

Nascimento, V. D.¹, Borges, J.P.N.¹, Galvão Filho, A.R.¹², Gomes, R.P.³,
Carneiro, L.C.³, Coelho, C.J.¹²

¹ Laboratório de Computação Científica - Escola de Ciências Exatas e da Computação
Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Goiânia-Goiás-Brasil

² Mestrado em Engenharia de Produção e Sistemas
Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Goiânia-Goiás-Brasil

³ Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Universidade Federal de Goiás
Goiânia-Goiás-Brasil

RESUMO: O antibiograma ou teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) é um teste de sensibilidade *in vitro*, no qual indica qual antimicrobiano testado possui maior eficiente de controle perante a bactéria isolada. A metodologia é baseada e interpretada os resultados pelo diâmetro de halos formados entre o disco de antibiótico e o crescimento bacteriano. Este procedimento é um método semi-quantitativo baseado em difusão do antibiótico em ágar, conhecido também como método Kirby-Bauer ou disco de fusão. Tal metodologia utiliza métodos manuais de aferição dos resultados, tornando o método demorado e suscetível a erros. No intuito de auxiliar neste procedimento, este trabalho propõe criar uma estratégia utilizando redes neurais convolucionais, para detectar os disco de antibióticos nas imagens dos TSA. A metodologia deste estudo foi baseada na utilização de transferência de aprendizado para a rede neural pré-treinada Alexnet, para detecção do texto em imagens dos discos de antibióticos. Para validar a estratégia proposta, foi utilizada uma base de 50 imagens dos 2 discos de antibióticos, para treino foram separadas 40 imagens e o restante para teste. A estratégia proposta aqui neste estudo mostrou acurácia de 80% na detecção dos discos de antibióticos para as imagens teste.

Palavras-chave: Redes Neurais Convolucionais, Transferência de aprendizado, Teste de disco-difusão

ABSTRACT: The antibiogram or antimicrobial susceptibility test (TSA) is an *in vitro* susceptibility test, which indicates which antimicrobial tested has the most effective control against the isolated bacterium. The methodology is based and interpreted the results by the diameter of halos formed between the antibiotic disc and the bacterial growth. This procedure is a semi-quantitative method based on agar antibiotic diffusion, also known as the Kirby-Bauer or fusion disc method. This methodology uses manual methods of measuring results, making the method time consuming and susceptible to errors. In order to assist in this procedure, this work proposes to create a strategy using convolutional neural networks to detect antibiotic discs in TSA images. The methodology of this study was based on the use of transfer learning to the pre-trained Alexnet neural network to detect text on antibiotic disc images. To validate the proposed strategy, a base of 50 images of the 2 antibiotic discs was used, for training 40

images were separated and the rest for testing. The strategy proposed here in this study showed 80% accuracy in detecting antibiotic discs for test images.

Keywords: Convolutional Neural Networks, Transfer learning, Disk diffusion test.

1. Introdução

A causa predominante de enfermidades e morte em seres humanos são doenças infecciosas. Uma doença infecciosa pode ser definida como qualquer doença que seja resultada por infecção em decorrência da presença e multiplicação de agentes biológicos [1,2]. Dessa forma existe a necessidade de verificação de qual o antibiótico mais adequado para a terapia da doença infecciosa do paciente. Diferentes métodos para tal verificação têm sido empregados em laboratórios para determinar a susceptibilidade de microrganismos aos agentes antimicrobianos como por exemplo, microdiluição em caldos ou o ETest[®] [13,14].

Um dos métodos comumente utilizados é chamado de método de disco de difusão ou Kirby-Bauer, no qual consiste em cultivar o bactérias de forma apropriada sob as condições adequadas para seu crescimento [16]. Após o crescimento bacteriano, a quantidade de bactéria é padronizada de acordo com a escala de McFarland. Com o auxílio de um swab a quantidade padronizada de bactérias é espalhada por toda placa de Petri contendo meio ágar Muller-Hilton. Após vários discos de papel contendo concentrações conhecidas de antimicrobianos, devidamente identificados, são espalhados pela superfície do ágar, de maneira equidistante [4]. Depois de 16 - 24 horas de incubação das placas em temperatura controlada, ocorre o crescimento bacteriano e o resultado do teste é alcançado, por meio da reação produzida do antibiótico diante a cepa bacteriana testada [4]. Este resultado é interpretado pela formação de áreas circulares de distâncias diferentes do crescimento bacteriano em torno do antibiótico. A avaliação e medição destas áreas, chamadas de halos de inibição (*Inhibition Halos*, IH) são medidas manualmente nos laboratórios com utilização de uma régua ou paquímetro[5,4].

A técnica de diluição, usando meio de caldo e ágar, é usada para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos em termos de suscetibilidade e resistência por bactérias [6,7]. Os resultados obtidos pelo teste de diluição da CIM, Concentração Inibitória Mínima, indicam qual a menor concentração dos agentes antimicrobianos necessários para inibir o crescimento ou matar o microrganismo testado. [9]. A utilização de técnicas que automatizam o processo de

aferição dos resultados pode contribuir com a redução do tempo gasto na geração dos resultados e aumento da acurácia do teste [17]. Desta forma, abre-se possibilidades para novos projetos de automação desse processo [10].

As RNA, Redes Neurais Artificiais, é um modelo matemático baseado na estrutura de aprendizado natural dos seres humanos, utilizando um grande conjuntos de exemplos classificar-se objetos, pessoas ou algum tipo de som [17]. Desta forma os modelos de RNA tem possui uma determinada regra de treinamento para que o modelo tenha seu peso ajustado pelo sinal de treinamento logo entrada tem-se um processo de multiplicação da entrada da camada por este peso, em seguida uma soma ponderada para produzir um nível de atividade para um sinal de saída, o número de camadas internas muda de acordo a arquitetura, mas são constituídas por camadas de entrada, intermediárias ou escondidas onde se tem todo o processamento e de saída onde o resultado é apresentado [18].

Uma rede neural convolucional (CNN ou ConvNet) é um tipo de rede neural de múltiplas camadas, projetada para reconhecer padrões nas imagens a partir de convoluções [11]. Visando contribuir no processo de automação da geração dos resultados do teste de antibiograma, este trabalho propôs a utilização de RNC, Redes Neurais Convolucionais, utilizando transferência de aprendizagem, em inglês *transfer learning*, com os dados alvo, a fim de obter uma nova RNC que detecte os identificadores textuais gravados nos discos de antibióticos de papel utilizados no teste de antibiograma, para auxiliar no processo de geração de resultados da Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).

2. Materiais e Métodos

2.1. O modelo proposto

A AlexNet é uma rede neural convolucional treinada com mais de um milhão de imagens do banco de dados ImageNet, que possui 8 camadas de internas, classifica imagens em 1000 categorias de objetos, como teclado, mouse, lápis e muitos animais.

O *transfer learning* utilizado na arquitetura da AlexNet, foi usado como método visando identificar os antibióticos cloranfenicol na concentração de 30 µg (CLO30) e gentamicina na concentração de 10 µg (GEN10) nas imagens dos TSA para automatizar o processo de TSA.

2.2. Estudo de caso

Para detectar os antibióticos foi utilizado a técnica comumente usada em soluções que usam aprendizado profundo, a transferência de aprendizado, que consiste em utilizar a arquitetura de uma RNC pronta, como a AlexNet, para ser o ponto inicial para aprender uma nova tarefa, com os pesos estão previamente balanceados se torna mais rápido e fácil uma solução do que uma rede toda inicializada como pesos nulos[12]. Utilizando a AlexNet foi realizado a transferência de aprendizado para que as saídas sejam a área detectada correspondentes aos antibióticos CLO30 e GEN10.

2.3. Avaliação dos resultados

A base de dados foi criada com uma foto de cada disco de antibiótico, rotacionada 18°, 20 vezes assim gerando 20 imagens por disco de antibiótico e 5 imagens rotacionadas arbitrariamente de cada disco de antibiótico para ser realizado os testes por antibiótico, assim totalizando 40 imagens para treino e 10 para teste. Para validar o modelo proposto foi testado em 9 imagens do TSA com os halos de inibição e os discos de antibióticos

A figura 1 mostra um exemplo da imagem antes da rotação no banco de imagens usado para treino da AlexNet.



Figura 1: Imagem Original Do Disco De Antibiótico.

A figura 2 mostra um exemplo de imagem rotacionada no banco de imagens usado para treino e teste da Alexnet.



Figura 2: Imagem usada para treinamento e teste.

A figura 3 demonstra um exemplo de imagem do TSA onde mostra os halos de inibição e os discos de antibióticos.

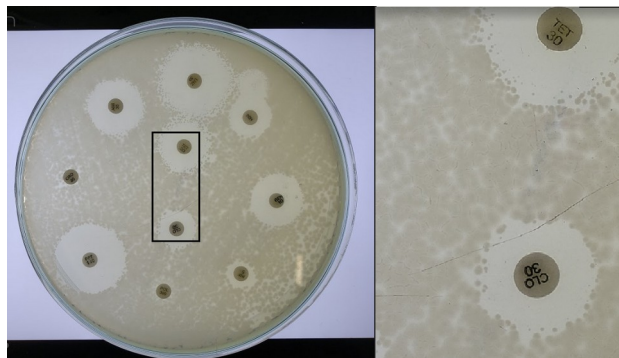


Figura 3: (a) Imagem do antibiograma, exemplo os disco de antibióticos e os halos de inibição da bactéria testada. (b) Imagem recortada e ampliada 32 vezes de acordo o quadrado na imagem 3(a).

3. Resultados e Discussão

Os resultados foram obtidos com rede neural proposta treinada para as classes GEN10 e CLO30, a validação da utilizando o conjunto de imagens de teste. A tabela 1 mostra a matriz de confusão contendo o resultado de tal validação nos TSA e a tabela 2 mostra a matriz de confusão contendo o resultado no conjunto de imagens rotacionadas com apenas um antibiótico por imagem.

Tabela 1: Matriz de confusão dos resultados para o conjunto de imagens teste do TSA

		Resultados:	
		CLO30	GEN10
Classe Esperada:	CLO30	55%	22%
	GEN10	33%	55%

Conforme tabela 1 é possível observar que a quantidade total de imagens onde foi detectado corretamente à área dos antibióticos nas 9 imagens do TSA foi de 55% de acurácia dos verdadeiros-positivos para as duas classes, acertando em 5 imagens.

Tabela 2: Matriz de confusão dos resultados para o conjunto de imagens rotacionadas com apenas um antibiótico por imagem.

		Resultados:	
		CLO30	GEN10
Classe Esperada:	CLO30	80%	10%
	GEN10	0%	80%

Conforme tabela 2 é possível observar que a quantidade total de imagens onde foi detectado corretamente à área dos antibióticos nas 5 imagens dos antibióticos foi de 80% de acurácia dos verdadeiros-positivos para as duas classes, acertando 4 imagens. A figura 4 mostra um exemplo de verdadeiro-positivo. O modelo proposto foi capaz de detectar os antibióticos GEN10 e CLO30.

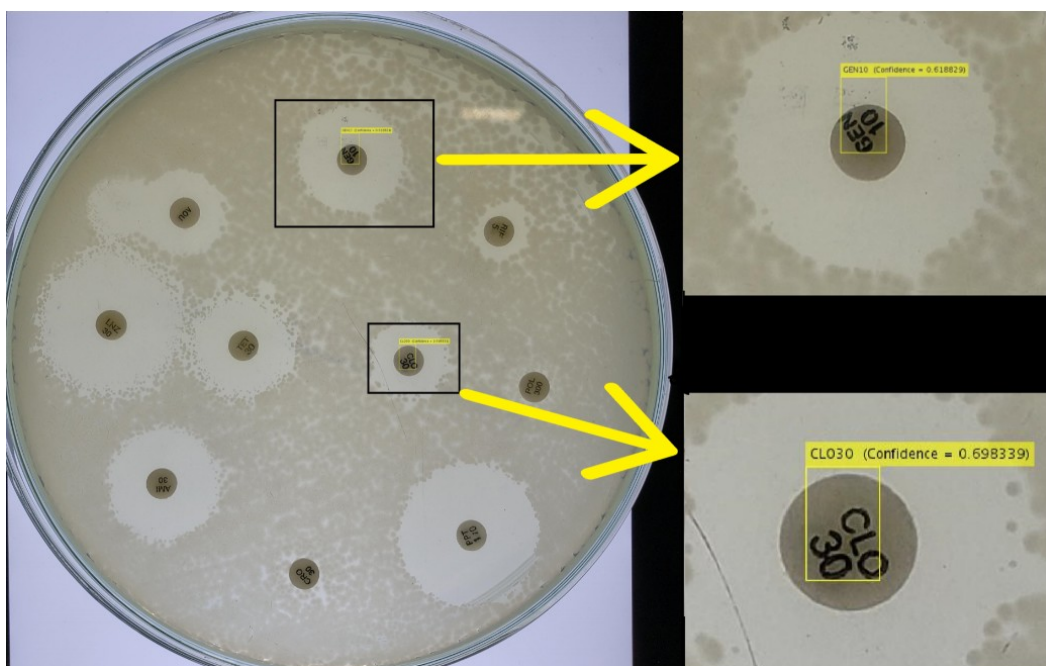


Figura 4: a) Imagem referente aos acertos da RNC treinada e testada no TSA que detectou os antibióticos. (b,c) Imagem recortada e ampliada 32 vezes de acordo os quadrados na imagem 4(a)

A figura 5 apresenta um exemplo de erro, em que o modelo proposto classifica antibióticos das classes TET30 e POL300 como sendo GEN30 e CLO30 respectivamente.

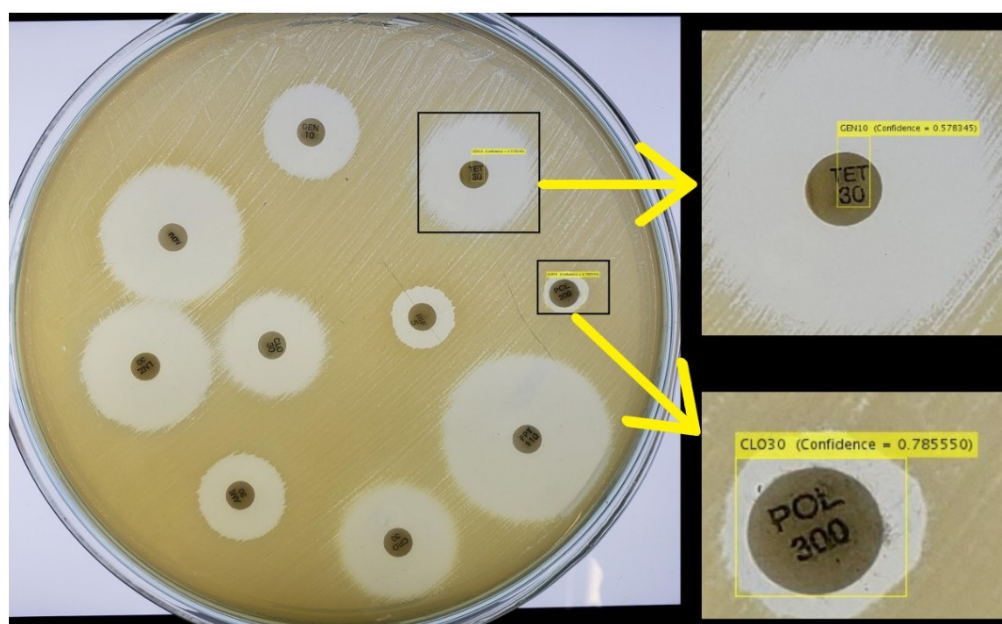


Figura 5: a) Imagem exemplo de um resultado incorreto pois não detectou os dois antibióticos para qual foi treinada..(b,c) Imagem recortada e ampliada 32 vezes de acordo os quadrados na imagem 4(a)

Com a conclusão do *transfer learning*, a AlexNet foi treinada para detectar os antibióticos CLO30 e GEN10, foi aplicado a RNC em 9 imagens do TSA, em 4

imagens a RNC não encontrou os antibióticos corretos, conforme exibido na figura 5 e em 5 imagens encontrou gerando a acurácia de 55%. Esse resultado incorreto é obtido a partir da carência de imagens diferentes dos discos de antibióticos e quantidade pequena de imagens.

4. Conclusão

Pode-se concluir com o modelo proposto que as redes neurais convolucionais possibilitam capacidade de detecção automática de imagens de disco de antibióticos para o uso teste de sensibilidade a antimicrobianos. A capacidade de detecção de discos de antibióticos foi testada em 5 imagens dos antibióticos isolados, resultando em 80% acurácia. Quanto a capacidade de classificação diretamente nas 9 imagens dos TSA, assertividade foi de 5 imagens, resultando em acurácia 55% para duas classes de interesse. A baixa assertividade nos testes de classificação do antibiótico pode ser justificada pela falta de heterogeneidade no conjunto de treinamento, não atribuindo características à rede como variações mais expressivas nos caracteres impressos, na rotação, de raio dos halos e etc.

Os dados utilizados neste trabalho são limitados, e foram usados apenas para prova de conceito. Em trabalhos futuros, pretende-se melhorar a acurácia do modelo aprimorando os dados de treinamento, utilizando técnicas de processamento digital de imagens. Tal aprimoramento aumentaria a heterogeneidade da base de imagens, proporcionando um aprendizado mais eficaz para a detecção de todos os antibióticos de interesse.

5. Referências Bibliográficas

- [1] Signore, A.: About inflammation and infection. EJNMMI research, 3(1):8, 2013.
- [2] Ramirez,A. R. G.: Automação da medição de halos de antibiogramas. PESQUISA E PRÁTICA DOCENTE NO CURSO DE ENGENHARIA DE CONTROLE E AUTOMAÇÃO–UNIVERSIDADE DO CONTESTADO, CURITIBANOS–SC, 89460:66, 2017.
- [3] Pretrained AlexNet Convolutional neural network - MATLAB Alexnet, disponível em:<https://www.mathworks.com/help/deeplearning/ref/alexnet.html#bv8vk9.mw_6dc28e13-2f10-44a4-9632-9b8d43b376fe>, acessado em 29/10/2019 às 21h.
- [4] Ruangpan, L.: Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and the environment. Aquaculture Extension Manual. SEAFDEC, Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Iloilo, Philippines, 2004.
- [5] Salgado, L., Menendez, J. M., Rendon, E., Garcia, N, Ruiz, V.: Automatic antibiograms inhibition halo determination through texture and directional filtering analysis. In Image Processing, 2001.Proceedings.2001 InternationalConferenceon,volume2,pages 629–632. IEEE, 2001.
- [6] Gavan, T. L., Gerlach, EH. Sherris, J. C.: New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. American Society for Microbiology, 1977.
- [7] Thornsberry, C., McDougal, L. K.: Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. Journal of clinical microbiology, 18(5):1084– 1091, 1983
- [8] Hadjigeorgiou, K., Kastanos, E., Alexandros,K., Pitris, C.: Raman spectroscopy for uti diagnosis and antibiogram. In Information Technology and Applications in Biomedicine, 2009. ITAB 2009. 9th International Conference on, pages 1–4. IEEE, 2009.
- [9] Costa, L.A.: Identificação automática de caracteres em antibiogramas com uso de momentos invariantes. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)—Universidade de Brasília, 2014.
- [10] CNN Architectures: LeNet, AlexNet, VGG, GoogLeNet, ResNet and more..., Siddharth Das, 2017, disponível em: <<https://medium.com/analytics-vidhya/cnns-architectures-lenet-alexnet-vgg-googlenet-resnet-and-more-666091488df5>> acessado em 29/10/2019 às 22h

[12] Transfer Learning Using AlexNet, 2018, disponível em: <<https://www.mathworks.com/help/deeplearning/examples/transfer-learning-using-alexnet.html>> acessado em 29/10/2019 às 22h..

[13]Machado, A.M.O, Gales, A.C.: Macrodiluição em caldo, disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm>, acessado em 03/11/2019 às 16h.

[14]Machado, A.M.O, Gales, A.C.: Etest, disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos4.htm>, acessado em 03/11/2019 às 16h.

[15] 8. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão: Norma Aprovada, disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>, acessado em 03/11/2019 às 17h.

[16] Machado, A.M.O, Gales, A.C.: Etest, disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos6.htm>, acessado em 03/11/2019 às 18h

[17]What is deep Learning. Disponível em: <<https://www.mathworks.com/discovery/deep-learning.html>> Acesso em: 3/11/2019 às 19h

[18] Redes Neurais Artificiais. Disponível em: <<http://conteudo.icmc.usp.br/pessoas/andre/research/neural/>> Acesso em: 3/11/2019 às 19h