

DISPOSITIVO DE COLETA E PREPARAÇÃO DE MICRO-AMOSTRAS DE SANGUE PARA CONTAGEM DE CÉLULAS

Valter Santiago Rosa Filho¹; Henrique Jesus Quintino de Oliveira²

Estudante do Curso de Automação Industrial; e-mail: valter.srf@terra.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail henrijqo@gmail.com²

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

Palavras-chave: Microscopia; Micro amostras; Coleta de sangue; Hemograma; Coleta de amostras por capilaridade.

INTRODUÇÃO

O hemograma é a técnica de contagem e de avaliação morfológica das células sanguíneas, mais utilizada e difundida no mundo. O hemograma é realizado em laboratórios, centrais clínicas e hospitais. Sua avaliação pode ser realizada de forma automática por meio de máquinas automatizadas ou de forma manual com o auxílio de uma câmara de Neubauer. A contagem em câmara de Neubauer é considerada o padrão ouro, pois em caso de dúvidas nas contagens automáticas se utiliza a contagem manual como forma de esclarecimento definitivo. O hemograma realizado em câmara de Neubauer requer aparatos instrumentais e procedimentais que implicam em maior custo e maior dispêndio de tempo. São necessárias ferramentas como seringas, micropipetas, tubos de ensaio e lamínulas para inserir a amostra e uniformizá-la sobre a área de leitura. O procedimento de preparação requer coleta, diluição do sangue e preenchimento da câmara de Neubauer. O resultado deste processo só apresenta um nível aceitável de confiabilidade se ele for realizado por um profissional que tenha muitas horas de treinamento. Para fazer a contagem automática usando imagens é necessário um dispositivo que realize automaticamente as etapas descritas acima. Assim, pode-se realizar a contagem automática das células por processamento digital de imagem em um processo mais rápido, confiável e onde o resultado pode ser verificado pela visualização das imagens. Visando solucionar os problemas apontados, foi proposto o projeto de uma câmara que permita coletar e preparar amostras de sangue para realizar a contagem automática das células por processamento digital de imagens.

OBJETIVOS

Desenvolver um dispositivo descartável de coleta, preparação e condicionamento de micro amostras de sangue, que permita realizar hemogramas automatizados por processamento digital de imagens. O dispositivo deve apresentar facilidade de uso operacional de modo que possa ser utilizado em um ambiente ambulatorial.

METODOLOGIA

As atividades de desenvolvimento, montagens e experimentos foram realizadas nos laboratórios da empresa SEPIA Assessoria, P&D situada na Incubadora Tecnológica de Mogi das Cruzes. A primeira etapa para realizar o desenvolvimento da nova câmara de coleta e preparação do sangue foi um estudo de viabilidade de diversas técnicas de coleta de micro amostras, que utilizam papéis absorventes e capilares. Desse estudo se chegou a três soluções potencialmente viáveis, que fazem uso de capilares. Foram realizados testes de viabilidade, mas nenhuma atendeu adequadamente as necessidades propostas para o projeto. Por isso foi desenvolvido um novo desenho, onde se projetou

uma valvular-capilar que permite fazer a coleta, a dosagem e coloca a amostra no caminho de fluxo das soluções de preparo. Na segunda etapa foi realizado o projeto tridimensional (3D) de todas as partes da câmara. Com o projeto 3D foi possível estudar, simular e analisar todos os movimentos e esforços exercidos sobre a câmara. Dessa forma chegou-se a uma modelagem mais robusta para a aplicação. Os projetos 3D foram desenvolvidos no *software Autodesk INVENTOR* que permitiram verificar todas as peças e graus de liberdade que a câmara deveria atender. Na figura 1, todas as partes da câmara são apresentadas no desenho final com as válvulas na posição inicial (PI). Esta câmara permite realizar o hemograma completo em três partes distintas: contagem das hemácias, contagem global dos glóbulos brancos e plaquetas e contagem diferencial dos glóbulos brancos.

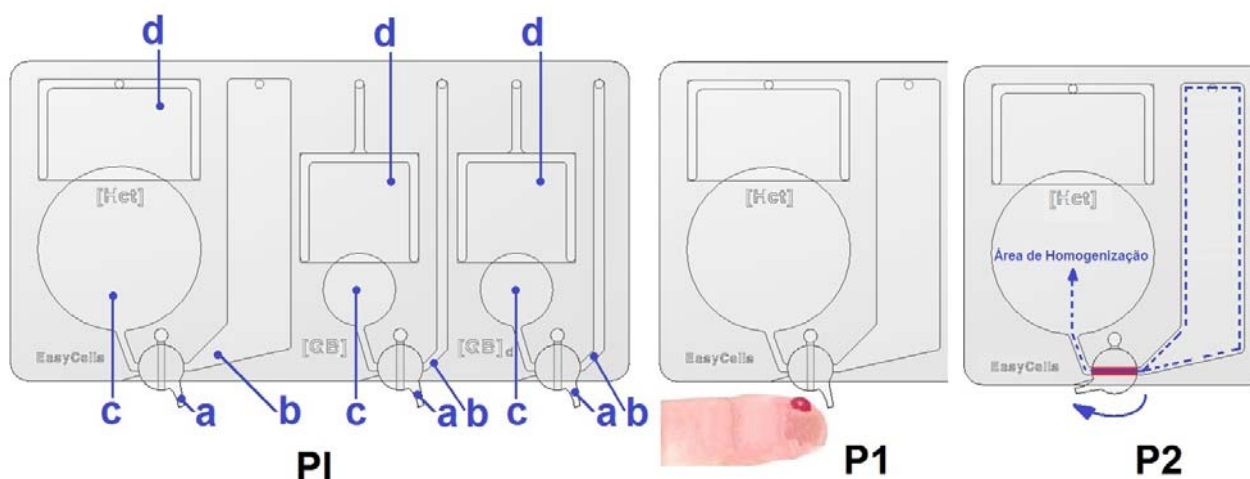


Figura 1 – Desenho final da Câmara EasyCells. (a) Válvulas rotativas com capilares de coleta; (b) Reservatórios de reagentes; (c) Áreas de homogeneização; (d) Áreas de leitura. Hct: contagem de hemácias; GB: contagem de glóbulos brancos e plaquetas; GBd: Contagem diferencial de glóbulos brancos. Em P1 tem-se o preenchimento do capilar. Em P2 tem-se a amostra na direção do fluxo de reagente.

A peça responsável por coletar a amostra de sangue é a válvula rotativa da câmara figura 1(a). Esta válvula possui um papel fundamental no sistema, pois, além de coletar a amostra ela também é responsável por ajustar a quantidade sangue e direcionar a amostra para o canal de reagente, conforme mostra o detalhe da posição 1 (P1) da figura 1. Posteriormente o reagente se mistura com a amostra na área de homogeneização e que em seguida é conduzida para a área de leitura, conforme esquematizada na figura 1 posição 2 (P2). Após projetar as peças foi disparado o processo de fabricação das novas câmaras. As peças projetadas necessitam de precisão e não podem apresentar variação dimensional maior que 5 centésimos de milímetros. Para atender este requisito de precisão a fabricação dos protótipos foi realizada por corte a laser, em placas planas de acrílico. Depois de cortadas as peças acrílicas são acopladas e coladas. A última etapa da fabricação da câmara é a realização de um furo de 0,8mm de diâmetro na válvula de coleta. Todos os componentes da câmara são fabricados em acrílico cristal e resina industrial. Ambos os materiais utilizados na fabricação são hidrofóbicos. Por este motivo aplicou-se um banho de lecitina diluída em clorofórmio na proporção de 0,2%, no capilar da câmara. Como a lecitina é anfifílica ela modifica a propriedade das superfícies da câmara para hidrofílica. Assim, pode-se adicionar heparina (anticoagulante altamente higroscópico) na superfície interna do capilar. Desse modo o sangue e os reagentes que são à base de água circular pelos capilares facilmente pelo capilar, sem encontrar resistência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro resultado é o efeito capilar da válvula. Na figura 2 (a) foi usada uma válvula sem o banho com lecitina, onde o capilar não preenche corretamente. Na figura 2(b) onde o capilar é revestido com lecitina e heparina a válvula apresenta o efeito capilar de forma muito eficiente, com preenchimento rápido e uniforme.

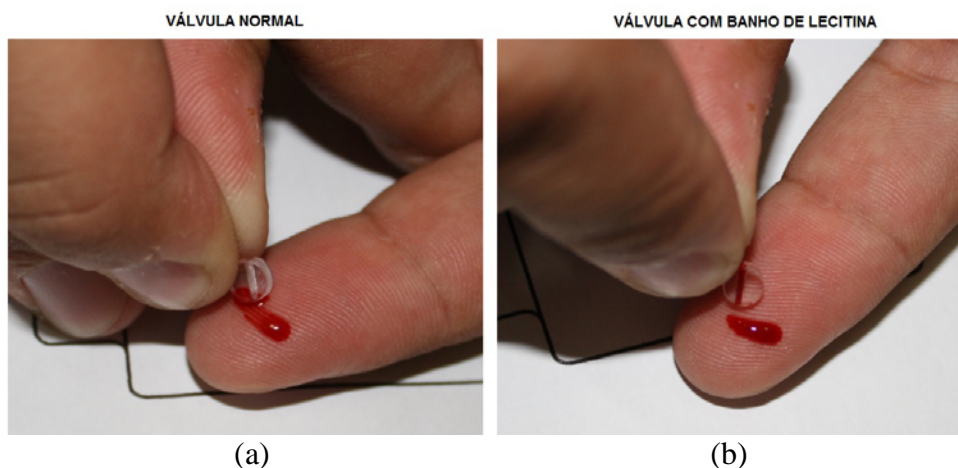


Figura 2 – Comparação do efeito capilar entre uma válvula de coleta normal (a) e outra (b) cujo capilar foi revestido internamente com lecitina.

Foram testadas 20 válvulas de coleta. Todas apresentam excelente reprodutibilidade no volume de coleta. Para verificar essa reprodutibilidade quanto ao volume de coleta das válvulas se realizou pesagens em balança analítica. O teste foi realizado da seguinte forma; Verificação do peso individual de cada amostra (válvula); Verificação do peso com a amostra coletada (Amostra: Padrão de Hemoglobina Labtest). Obteve-se um desvio padrão de 0,001g na coleta entre as câmaras.

A câmara desenvolvida é descartável, pois sua construção acrílica possibilitou alcançar valores comerciais muito inferiores aos das câmaras de Neubauer. O sistema de coleta por meio das válvulas rotativas e o processo de homogeneização interno permitem realizar hemogramas automatizados por processamento digital de imagens de forma prática e simples.

A qualidade das imagens capturadas por meio da câmara se apresentou tão boas quanto àquelas adquiridas convencionalmente com as câmaras de Neubauer.

CONCLUSÕES

As técnicas de coletas de micro amostras utilizadas nesta câmara se mostraram eficientes e propiciaram a expansão da técnica para outros equipamentos que utilizam coleta de sangue. O volume coletado apresenta uma excelente reprodutibilidade. O processo de fabricação por injeção pode melhorar ainda mais esta característica. A usabilidade da câmara EasyCells é muito mais simples que a câmara de Neubauer. Não requer nenhum aparato instrumental, além de um instrumento para punção digital. Também não é necessário treinamento técnico especializado ou demorado. Quanto aos custos, uma câmara de Neubauer é comercializada por valores em torno de R\$100,00 e seu uso requer auxílio de outras ferramentas laboratoriais. A câmara desenvolvida EasyCells pode ser fabricada em larga escala industrial e chegar ao mercado por menos R\$3,00. Além disso, possui a facilidade de coletar a amostra sem o auxílio de quaisquer outras ferramentas laboratoriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIN, B.J.; Células Sangüíneas – **Um guia prático**, *Artmed*, 4ª Ed., Porto Alegre, 2007.- CAPILHEIRA, M.F.; SANTOS, I.S. Epidemiologia da Solicitação de Exames Complementares em Consultas Médicas. **Rev. Saúde Pública**, 2006; 40(2): 289-297.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. - **Practical Haematology**. *Churchill Livingstone*, 1975. New York

FLORIANO, P.N.; CHRISTODOULIDES, N.; BALLARD, K.; McDEVITT, J.T. - **Detecting Multiple Types Of Leukocytes**, *Patent Number* 2008/0050830, United States Patent. 28 Feb.2008

GOCH, T.A.; **Microsample blood colleting device**. *Patent number* 1987/4.356.511, United States Patent, Mar. 31, 1987.

GRANGER, J.M.B.; GOSHEN, R.H.; BEND, R.H.S.; ELKHART, J.P.; BEND, F.W.S., ALL OF IND. – **Volume metering capillary gap device for applying a liquid sample onto a reactive surface**. United States Patent – Aug 2, 1988.

MASI, C.G. - **Selecting an Optical Microscope**; *Test & Measurement World*, Volume 8, No. 2, Pág. 47-67, 1988.

Oliveira, H.J.Q. – Desenvolvimento de um hemocitômetro baseado em processamento digital de imagens. Projeto FAPESP, modalidade PIPE – Fase 2, Proc. No. 2010/51228-3, 22p. 2010.

AGRADECIMENTOS

A UMC e FAEP pelo incentivo, apoio e a bolsa concedida. À empresa SEPIA que cederam os laboratórios para os experimentos. A FAPESP pelo apoio financeiro no projeto PIPE. Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Jesus Quintino de Oliveira pelo apoio e todos os conhecimentos compartilhados e ao meu amigo pesquisador Flávio Renato.