

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO PARA COLETA E PREPARAÇÃO DE MICRO AMOSTRAS PARA CITOMETRIA

V. S. Rosa Filho* e H. J.Q. Oliveira*

*Núcleo de Pesquisas Tecnológicas - Universidade de Mogi de Cruzes, Mogi das Cruzes, Brasil.
e-mail: valter.srf@terra.com.br

Resumo: O hemograma identifica e quantifica os constituintes celulares do sangue. Ele é realizado em citômetros automáticos ou manualmente por um especialista, sendo este último considerado o padrão ouro. No entanto, não há dispositivos que realizem a automatização do padrão ouro. Então foi proposta uma câmara (EasyCells) que coleta, prepara e disponibiliza para leitura micro amostras de sangue, em menos de um minuto. Ela é composta de lancetador, capilar de coleta, reagentes e corantes, área de homogeneização e de leitura. Seus aparatos permitem realizar todas as etapas, da coleta à disponibilização das células para leitura numa etapa. Para validar a EasyCells foi avaliada a precisão e exatidão do volume coletado e também os resultados das contagens de células, que foram comparados com as contagens em citômetro automático e no padrão ouro. O volume de sangue coletado é de $5,1\mu\text{l} \pm 0,1\mu\text{l}$. Foram contadas as células de 10 amostras de sangue com a EasyCells, com um citômetro comercial e no padrão ouro. A análise estatística com o teste ANOVA, resultou em $F=0,0495$ e $p=0,952$, mostrando que não há diferenças relevantes entre as contagens num intervalo de confiança de 95%. A câmara foi operada por um biomédico experiente em hematologia que reduziu significativamente o tempo do exame.

Palavras-chave: Hemograma; Contagem de células, micro amostras, Citômetro.

Abstract: The hemogram identifies and quantifies the cellular components the blood. It is carried out in automatic cytometers or manually by a specialist, this last one being considered as the gold standard. However, there are no devices that perform automation of the gold standard. So we has proposed a camera (EasyCells) that collects, prepares and makes available for reading the blood's micro-samples, in less than a minute. It is composed of a lancet, capillary of collection, reagents and colorings, an area of homogenization and of reading display. Those components allow it to perform out all the stages, from the collection until indicate number of cells at the reading display in a single step. To validate the EasyCells were valued the precision and exactness of the collected volume and also the results of the counting of cells numbers, which were compared with a counting done in automatic cytometer and in the gold standard. The volume of blood collected was of $5,1\mu\text{l} \pm 0,1\mu\text{l}$. The cells of 10 samples of blood were counted in the EasyCells in a automatic cytometer and in gold

standard. The statistical analysis with the test ANOVA, resulted in $F=0,0495$ and $p=0,952$, showing that there are not relevant differences between the counting in an interval of confidence of 95%. The camera was operated by an experienced biomedical in hematology that reduced significantly the time of the examination.

Keywords: Hemogram, Count cells, Micro samples, Cytometer.

Introdução

O hemograma é a técnica de contagem e avaliação morfológica das células do sangue mais utilizada [1]. Ele é realizado de forma automática, com citômetros de fluxo ou de forma manual, por um especialista, com o auxílio da câmara de Neubauer e esfregação em lâmina de vidro [2]. Em ambas as técnicas são necessárias ferramentas como agulhas, seringas, tubos, garrotes para coletar uma amostra de sangue com 4ml [3-5]. O citômetro automático recebe a amostra de sangue, dosa e realiza as leituras internamente. A contagem manual é considerada padrão ouro, pois em caso de dúvidas nas contagens automáticas ela é utilizada como forma de esclarecimento definitivo. Para realizar a contagem no padrão ouro são necessários dosadores de precisão e muita atenção do especialista no preparo das amostras de sangue, para que os erros de contagem das células sejam mínimos. Esta etapa é trabalhosa e demorada, o que eleva os custos do exame [3-5].

Automatizar o padrão ouro traz vantagens como agilidade na obtenção dos resultados, possibilidade de verificação dos resultados, redução do nível de especialização profissional para a realização do exame e redução de custos. No entanto, até o momento não há dispositivos que realizem tal automatização.

Uma forma de automatiza-lo é realizar a coleta e a preparação do sangue num dispositivo que integre todos os aparatos necessários no exame manual. Esse dispositivo deve garantir o volume da amostra, o volume dos reagentes e o volume da solução de contagem, para manter a exatidão e a precisão dos resultados. Existem muitos dispositivos para coleta de micro amostras de sangue, mas nenhum que realize as etapas de preparação e disponibilização para leitura do hemograma e uma etapa [6,7].

O objetivo deste trabalho é propor uma câmara (EasyCells) que realize a coleta de micro amostras de sangue, faz preparação das células, corando-as e colocando-as numa área de leitura para serem fotografadas ou observadas ao microscópio, de forma

ágil e sem comprometer os resultados do exame. A câmera garante os volumes utilizados no processo, traz agilidade na contagem convencional com microscópio e viabiliza a contagem automática das células por processamento digital de imagens.

Materiais e métodos

A preparação automatizada das amostras de sangue para o hemograma necessita de um dispositivo que realize a punção da área de coleta, a coleta exata da amostra, o armazenamento dos reagentes químicos, a diluição e homogeneização da amostra no reagente e o posicionamento da amostra preparada em uma área de leitura. Além disso, o dispositivo deve garantir exatidão dos volumes da amostra coletada, dos reagentes armazenados e da solução utilizada na leitura.

Dentre estes requisitos, o mais crítico é garantir a exatidão do volume da amostra utilizada no exame. No estado atual a exatidão não depende somente de projeto e da construção do dispositivo. A exatidão depende dos procedimentos operacionais adotados durante a coleta. Para minimizar a dependência dos procedimentos operacionais, a solução foi utilizar um tubo capilar dosador, incorporado a uma válvula rotativa. A válvula realiza a limpeza das extremidades do capilar, conforme descrito no subitem: Operação da EasyCells. Os demais requisitos são garantidos em projeto e no processo produtivo.

A EasyCells foi projetada e simulada no software de projetos mecânicos *Autodesk Inventor 2014*, cuja vista explodida é apresentada na Figura 1. Durante o projeto foram simulados os esforços e pressões dos fluidos nos canais e reservatórios da câmara. Assim chegou-se em desenhos e tolerâncias necessários para evitar vazamentos.

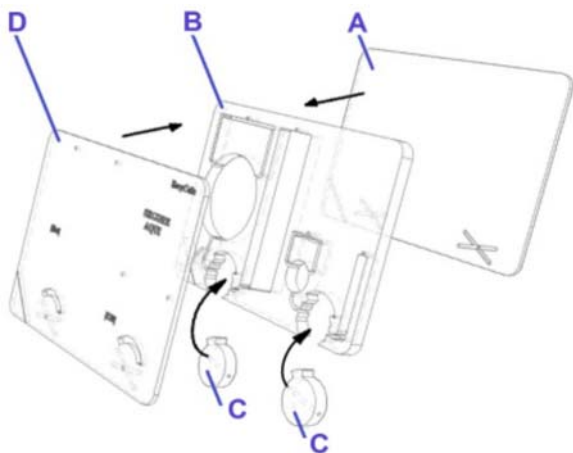


Figura 1: Vista explodida das placas acrílicas que compõe a EasyCells. (A) Placa traseira; (B) Placa núcleo; (C) Válvulas rotativas de coleta; (D) Placa superior (D).

Construção da EasyCells - A montagem da câmara EasyCells se dá pela sobreposição de peças acrílicas transparentes, conforme detalhado na vista explodida do projeto (Figura 1). As peças foram confeccionadas por corte a laser de chapas de acrílico cristal. Os cortes a

laser apresentam qualidade no acabamento das peças e as tolerâncias micrométricas exigidas.

Todo o conjunto é colado com cola acrílica bicomponente e posteriormente vedado com silicone. Na Figura 2 são detalhadas as partes da EasyCells já montada e preparada para uso. Após montada testa-se a estanqueidade dos reservatórios. Se aprovadas, os reservatórios são abastecidos com os reagentes e selados. Então, a EasyCells é esterilizada e armazenada em embalagem selada, ficando pronta para uso. O conjunto B, D, F e G é utilizado para preparação e contagem da série vermelha e plaquetas, que requer diluição de 1:200. O reservatório D armazena 995µl de diluente hematológico. O conjunto A, C, E e H é utilizado para preparação e contagem da série branca, que requer diluição de 1:20. O reservatório C armazena 95µl de corante/hemolisante para preparação e coloração dos leucócitos. O corante/hemolisante para meio líquido e de fase única, usado na EasyCells, foi desenvolvido, num projeto paralelo, cujos dados estão em fase de publicação. Trata-se de um corante baseado nos componentes: Verde-Metil, Pironina Y e Fluoresceína, preparados em solução única, que cora as estruturas dos leucócitos em três grupos distintos de cores (azul- esverdeado, róseo e amarelo-alaranjado).

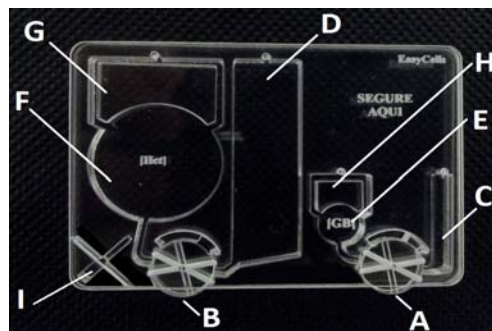


Figura 2: Imagem da EasyCells mostrando as duas válvulas rotativas de coleta (A e B). Duas áreas de leitura (G e H). Duas áreas de mistura (E e F). Dois reservatórios de reagentes (C e D). Uma haste de punção (I).

Utilização da EasyCells prevista para humanos –

Após assepsia da área de coleta (dedo) utiliza-se a haste de punção (I) para perfurá-la e obter a amostra de sangue. Aproximando as válvulas (A e B) coletam-se, por meio dos capilares, as amostras de sangue, conforme ilustrado na Figura 3(A). As válvulas rotativas da EasyCells possuem capilares dimensionados para coletar um volume nominal de 5µl de sangue. Depois de preencher os tubos capilares as válvulas são giradas para unir as amostras com os reservatórios de reagentes e com as áreas de mistura, conforme ilustrado na Figura 3(B). Com o giro das válvulas o excesso de sangue nas extremidades dos capilares fica retido nas paredes externas da câmara, garantindo precisão do volume.

Após o giro os selos dos reservatórios são rompidos para que seja aplicada uma pressão positiva. Assim o reagente é transferido para a área de mistura, arrastando

e diluindo a amostra de sangue. A diluição é feita por agitação leve, com a câmara ainda na vertical.

Por fim, colocando a câmara na horizontal a solução é transferida para a área de leitura também por capilaridade. Esta área possui altura de 100 μm , que é mesma altura da lamínula na câmara de Neubauer. Após poucos minutos de repouso as células sedimentam no fundo da área de leitura, possibilitando as contagens.

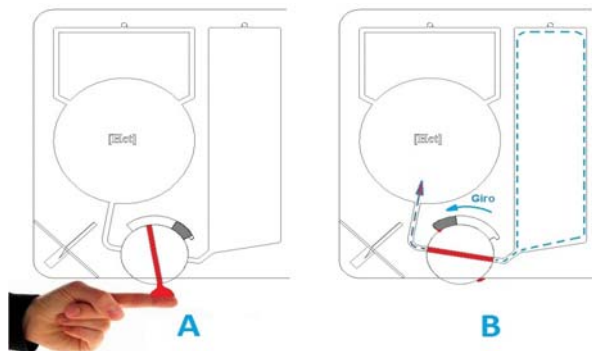


Figura 3: Operação de coleta e homogeneização das amostras de sangue. (A) operação de coleta da amostra de sangue; (B) Giro para limpeza das extremidades do capilar e posicionamento da amostra no fluxo do reagente, para mistura e homogeneização.

Validação dos volumes coletados – Cada válvula rotativa da EasyCells possui um furo capilar com 0,8mm de diâmetro e 10mm de comprimento, gerando um volume nominal de 5,03 μl . Os furos foram banhados com o anticoagulante heparina, para tornar a superfície interna hidrofílica, facilitando o efeito capilar. Para avaliar a precisão, a exatidão e a reprodutibilidade dos volumes coletados foram testadas 10 válvulas. Cada válvula foi avaliada cinco vezes, com higienização entre as avaliações. Esta avaliação foi realizada por pesagem individual das válvulas, em balança analítica. As válvulas foram pesadas vazias e depois com os capilares preenchidos. Para isso utilizou-se o padrão de hemoglobina comercial da Labtest Ref. 47 lote 1004, que apresenta viscosidade e cor muito similares às do sangue. A densidade de 1,050g/cm³ do padrão permitiu calcular o volume da amostra a partir do peso. Foram calculados os desvios nos volumes coletados.

Validação das contagens – Os resultados das contagens das células são apresentados em quantidade de células por mm³. Os volumes das amostras coletadas pelas válvulas rotativas e dos reagentes nos reservatórios são conhecidos. O volume da solução na área de leitura também é conhecido, pois a geometria de todas as partes está bem determinada. Portanto, a quantidade de absoluta de células é obtida da mesma forma que no padrão ouro.

Para validar a contagem foram utilizadas 10 amostras de sangue canino. As coletas foram autorizadas pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade de Mogi das Cruzes - CEMEA-UMC 045/07. As 10 amostras são de cães saudáveis, sem raça definida e foram coletadas por

médicos veterinários pelos métodos usuais. Cada amostra foi fracionada em três partes, para que as contagens fossem realizadas por três técnicas distintas. Então, foram realizadas dez contagens de células em dez EasyCells descartáveis. Dez contagens em câmara de Neubauer, por um biomédico com mais de 10 anos de experiência e dez em um citômetro comercial *Mindray BC-2800VET*. Para realizar a coleta das subamostras com a EasyCells, foi pipetado 100 μl de sangue sobre uma lâmina de vidro, assim a coleta ocorre da mesma forma que na ilustração da Figura 3(A). As contagens com a EasyCells foram realizadas pelo mesmo biomédico que realizou as contagens em Neubauer, porém lendo imagens digitais.

O lancetador, que é incorporado à câmara, foi o único elemento não testado, pois não foi necessário puncionar os animais. Os resultados das contagens foram avaliados estatisticamente com teste ANOVA para $\alpha=0,05$.

Resultados

O volume coletado pelas válvulas rotativas foi considerado o ponto mais sensível do dispositivo proposto. A precisão e a reprodutibilidade deste volume define a viabilidade do dispositivo. A Figura 4 representa os resultados obtidos para os volumes de 10 válvulas, que foram avaliadas em cinco repetições cada uma. O volume médio das válvulas apresenta variação de 2%, ou seja, desvio padrão de 0,1 μl . Para a natureza do hemograma esta variação é irrelevante quando considerada isoladamente. Os resultados apresentados na Figura 4 redefinem o volume nominal das válvulas rotativas para 5,1 $\mu\text{l} \pm 0,1\mu\text{l}$. Portanto, este valor foi utilizado para calcular as contagens das células. A ausência de desvios, sistemáticos ou aleatórios, que ultrapassem as tolerâncias aceitáveis, dos valores medidos em comparação com o valor nominal permite conferir exatidão adequada ao volume coletado.

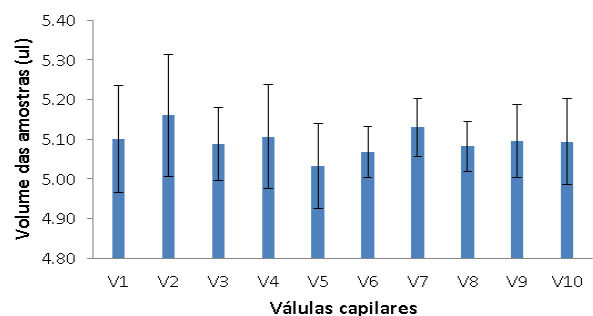


Figura 4: Variação e desvio padrão do volume das amostras coletadas em 10 válvulas capilares com cinco repetições para cada uma.

Os desvios padrão das repetições permitem analisar a influência do procedimento de limpeza das extremidades dos capilares no controle do volume. Individualmente não ocorreram desvios superiores a 2,3% em relação ao volume médio de cada capilar. Esta

variação também não é significativa para as exigências do hemograma, ou seja, a precisão de coleta está dentro de valores aceitáveis. Isto permite afirmar que a solução adotada é adequada para resolver o problema no procedimento da coleta. O projeto em conjunto com o procedimento não introduzem variações que possam comprometer a viabilidade do dispositivo. A avaliação dos resultados dos volumes coletados indica que há precisão, exatidão e reprodutibilidade adequadas aos requisitos do exame.

Para validar a EasyCells com relação às contagens de células foram utilizados os valores de referência para hemácias de um cão adulto saudável. De acordo com Weiss (2010) [4] a normalidade encontra-se no intervalo de 5,5 e 8,5 milhões de células vermelhas por mm^3 . As variações das contagens são apresentadas na Figura 5. Aplicando a análise estatística com o teste ANOVA, obteve-se $F=0,0495$ e $p=0,952$, mostrando que não há diferenças relevantes entre as contagens num intervalo de confiança de 95%. Isso indica que a EasyCells tem exatidão de contagens compatível com as técnicas utilizadas regularmente na realização do hemograma.

Utilizando o sangue depositado na lâmina de vidro o tempo total de coleta, preparação e disponibilização de uma amostra de sangue para leitura não ultrapassa dois minutos.

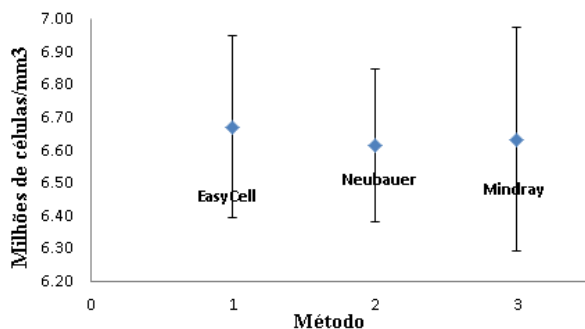


Figura 5: Resultados das contagens das 10 amostras de sangue e desvio padrão para as três técnicas: EasyCells, Neubauer (padrão ouro) e citômetro automático Mindray.

A qualidade das imagens capturadas na área de leitura da EasyCells se apresentou tão boa quanto àquelas adquiridas convencionalmente em câmaras de Neubauer ou lâminas com esfregaço. O que permite realizar as contagens por processamento digital de imagens.

Discussão

A coleta e a preparação do sangue com a EasyCells se mostraram práticas e ágeis se comparadas com a metodologia usual, que necessitam de vários aparatos auxiliares e consome de 30 a 60 minutos de trabalho [2,5]. Os resultados indicam que a precisão, a exatidão e a reprodutibilidade do volume de amostra coletado e das contagens de células são mantidas dentro de valores aceitáveis se comparados com metodologias

consagradas [2-5]. Os dispositivos que lidam com micro amostras de sangue são complexos e atendem a demandas específicas. Eles não realizam todas as etapas necessárias à coleta e preparação do sangue para a realização do hemograma [6,7]. Por outro lado a EasyCells incorpora todos os aparatos necessários à coleta e preparação das amostras de sangue. O protocolo completo é executado numa única etapa que dura de dois a três minutos, sem a necessidade de aparatos adicionais.

Somado a isso a EasyCells tem grande potencial para minimizar erros de procedimento aos quais a contagem manual (padrão ouro) está sujeita. Pois todo o protocolo é executado em uma única etapa, que tem pouca dependência operacional do profissional [2].

Conclusão

Os volumes coletados e as contagens das células apresentaram precisão, reprodutibilidade e exatidão compatíveis com as exigências do hemograma. A coleta e a preparação das amostras de sangue, para hemograma, realizadas com a EasyCells, foram otimizadas em relação aos procedimentos de preparação e ao tempo de execução se comparados com as técnicas consagradas do padrão ouro. O protocolo que antes consumia até uma hora, com a EasyCells pode ser feito em menos de dois minutos. O fato de não serem exigidos aparatos adicionais para a coleta e preparação constitui uma vantagem operacional.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado. À FAPESP pelo apoio financeiro no projeto PIPE.

Referências

- [1] Capilheira MF, Santos IS. Epidemiologia da solicitação de exames complementares em consultas médicas. *Rev. Saúde Pública*. 2006; 40(2): 289-297.
- [2] Bain BJ. Células Sanguíneas – Um guia prático. *Artmed*. 4ª Ed. Porto Alegre; 2007.
- [3] Dacie JV, Lewis SM. *Practical Hematology*. Churchill Livingstone. New York; 1975.
- [4] Weiss DJ, Wardrop JK. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6ª ed. Ames-USA: Wiley-Blackwell Publication; 2010.
- [5] Oliveira RAG. *Hemograma: Como fazer e Interpretar*. Livraria Médica Paulista: São Paulo; 2007. p. 100-104.
- [6] Goch TA. *Microsample blood collecting device*. Patent number 1987/4.356.511. United States Patent; 1987.
- [7] Zheng Y, Nguyen J, Wang C, Sun Y. Electrical measurement of red blood cell deformability on a microfluidic device. *Lab on a Chip*. ed. RSC Publishing. 2013; 13:3275-83.