

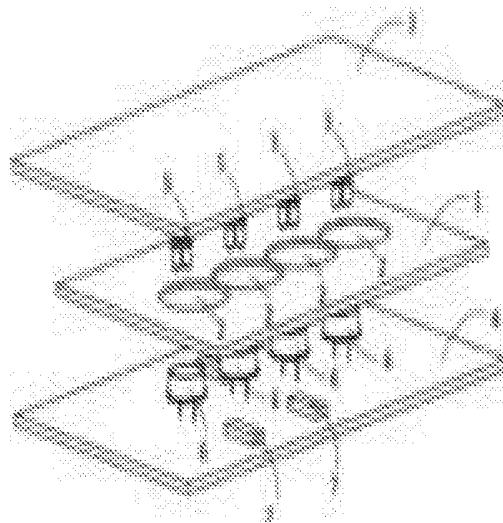
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2012.06.06	(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DO MINHO	
(30) Prioridade(s): 2013.06.06 PT 6260W	LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA	PT
(43) Data de publicação do pedido: 2013.12.06	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.08.07 153/2014	GRAÇA MARIA HENRIQUES MINAS	PT
	FILOMENA MARIA DA ROCHA MENEZES DE OLIVEIRA	PT
	SOARES	PT
	SARA FILOMENA RIBEIRO PIMENTA	PT
	(74) Mandatário:	

(54) Epígrafe: **SISTEMA PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO SANGUÍNEO DE HUMANOS E RESPECTIVO MÉTODO DE UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO ESTÁ RELACIONADA COM UM SISTEMA E RESPECTIVO MÉTODO DE FUNCIONAMENTO, PARA ANÁLISES CLÍNICAS E CONSISTE NUMA SOLUÇÃO PORTÁTIL, REUTILIZÁVEL E DE BAIXO CUSTO QUE PERMITE A DETERMINAÇÃO DOS TIPOS SANGUÍNEOS ABO-RH DE UMA FORMA SIMPLES, RÁPIDA, SEGURA E EM QUALQUER LOCAL. O MÉTODO DE FUNCIONAMENTO BASEIA-SE NA PREPARAÇÃO DE QUATRO AMOSTRAS, RECORRENDO AO PROTOCOLO CONVENCIONAL EM LÂMINA, EM QUE SÃO UTILIZADAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL E SOLUÇÕES COMERCIAIS DE ANTICORPOS TIPO A, E, AB E D. O SISTEMA RECORRE À ESPETROFOTOMETRIA PARA DETETAR A REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO E ASSIM REALIZAR A ANÁLISE E É COMPOSTO POR UM ECRÃ, UMA LÂMINA INTERMÉDIA (1) COM QUATRO CAVIDADES DE REGIÕES DE TESTE (2) ONDE SE COLOCAM AS AMOSTRAS A ANALISAR E OS RESPECTIVOS REAGENTES; COMPONENTES OPTOELETRÓNICOS, CONCRETAMENTE, CONJUNTOS DE LEDS (5) E A SUA ELETRÓNICA DE CONTROLO, E FOTODÍODOS (6) E A SUA ELETRÓNICA DE LEITURA (7). ESTA INVENÇÃO CARATERIZA-SE POR RECORRER À MEDIÇÃO DE TRÊS VALORES DE DENSIDADE ÓTICA, POR CADA REGIÃO DE TESTE DA LÂMINA, EM COMPRIMENTOS DE ONDA ESPECÍFICOS. ESTES VALORES DE DENSIDADE ÓTICA SÃO OBTIDOS ATRAVÉS DO SISTEMA DE ILUMINAÇÃO COM LEDS OU COM LUZ BRANCA.



RESUMO

"SISTEMA PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO SANGUÍNEO DE HUMANOS E RESPECTIVO MÉTODO DE UTILIZAÇÃO"

A presente invenção está relacionada com um sistema e respetivo método de funcionamento, para análises clínicas e consiste numa solução portátil, reutilizável e de baixo custo que permite a determinação dos tipos sanguíneos ABO-Rh de uma forma simples, rápida, segura e em qualquer local. O método de funcionamento baseia-se na preparação de quatro amostras, recorrendo ao protocolo convencional em lâmina, em que são utilizadas amostras de sangue total e soluções comerciais de anticorpos tipo A, B, AB e D.

O sistema recorre à espectrofotometria para detetar a reação de aglutinação e assim realizar a análise e é composto por um ecrã, uma lâmina intermédia (1) com quatro cavidades de regiões de teste (2) onde se colocam as amostras a analisar e os respetivos reagentes; componentes optoeletrónicos, concretamente, conjuntos de LEDs (5) e a sua eletrónica de controlo, e fotodíodos (6) e a sua eletrónica de leitura (7). Esta invenção caracteriza-se por recorrer à medição de três valores de densidade ótica, por cada região de teste da lâmina, em comprimentos de onda específicos. Estes valores de densidade ótica são obtidos através do sistema de iluminação com LEDs ou com luz branca.

DESCRIÇÃO

"SISTEMA PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO SANGUÍNEO DE HUMANOS E RESPECTIVO MÉTODO DE UTILIZAÇÃO"

Domínio da Invenção

A presente invenção insere-se no domínio das análises clínicas, consistindo num sistema para determinação do tipo sanguíneo ABO-Rh de humanos por deteção da aglutinação do sangue total com os respetivos anticorpos, através de espectrofotometria e respetivo método de deteção.

Antecedentes da Invenção

O sangue é constituído por diversos componentes. Em termos gerais, é formado por um fluido principal, o plasma sanguíneo, e por componentes celulares. Destes, são os eritrócitos os mais relevantes, no que diz respeito à determinação dos tipos sanguíneos, uma vez que são os antigénios presentes na superfície destas células que definem o tipo sanguíneo de um indivíduo.

Quando se pretende classificar o tipo de sangue num indivíduo recorre-se usualmente a dois sistemas sanguíneos, ABO e Rh.

O sistema sanguíneo ABO é definido pela existência de antigénios na superfície dos eritrócitos do tipo A (sangue do tipo A), do tipo B (sangue do tipo B) ou ambos os tipos (sangue do tipo AB). Podem ainda existir eritrócitos que não têm antigénios A nem B (sangue do tipo O). No que diz respeito ao plasma sanguíneo, um indivíduo com sangue do tipo A contém anticorpos do tipo B que atacam os antigénios tipo B. Seguindo a mesma lógica, o plasma sanguíneo de um indivíduo com sangue tipo B contém anticorpos tipo A. Portanto, o plasma de um dado tipo sanguíneo contém o isoanticorpo natural (anticorpo A e/ou anticorpo B) que

corresponde ao antigénio que não está presente na superfície dos seus eritrócitos. Por essa razão o tipo sanguíneo AB não contém nenhum anticorpo no seu plasma, e o sangue do tipo O contém os anticorpos A e B.

O sistema sanguíneo Rh é bastante complexo, com vários antigénios. Contudo, o termo Rh positivo é usualmente utilizado quando um indivíduo tem um antigénio Rh específico na superfície dos seus eritrócitos, o antigénio D. Pelo contrário, se o antigénio D está ausente diz-se que o indivíduo é Rh negativo.

Portanto, a existência de grupos sanguíneos distintos faz com que um paciente não possa receber qualquer tipo de sangue no seu organismo, uma vez que este pode conter anticorpos que podem atacar os antigénios fornecidos.

A determinação do tipo de sangue é assim um teste essencial que antecede o processo de transfusão sanguínea. Este pode ser crítico, especialmente em situações de emergência, uma vez que o estado do doente é preocupante e o tempo para a determinação do seu tipo de sangue é escasso. Para além disso, uma transfusão de um tipo sanguíneo errado pode acarretar riscos elevados para o paciente, ou até mesmo a sua morte.

Os processos existentes para a determinação do tipo sanguíneo dividem-se em dois grandes grupos: os testes manuais e os sistemas automáticos. Os métodos manuais são caracterizados por produzirem resultados muito rapidamente, adequando-se a situações de emergência. No entanto, a decisão final do teste depende do técnico que o realiza. Para além disso, são testes propícios à ocorrência de erro humano, já que todas as etapas até à decisão final estão dependentes do técnico analista. Relativamente aos sistemas automáticos, estes reduzem alguma subjetividade, através da automação dos procedimentos e/ou decisão de teste. Para além disso, são bastante precisos e fiáveis. Contudo, são

complexos, de grandes dimensões, o que inviabiliza a sua portabilidade, economicamente dispendiosos e não conseguem produzir resultados tão rapidamente como no caso dos testes manuais. Tal facto pode ser crítico, especialmente em situações de emergência.

Assim, a presente invenção surge como uma solução às limitações descritas, já que se trata de um dispositivo que automatiza o processo de determinação do tipo de sangue, que produz resultados rapidamente, que pode atuar próximo do paciente, devido à sua portabilidade, sendo assim adequado em situações de emergência e é economicamente competitivo.

A determinação dos grupos sanguíneos pode ser baseada em vários princípios, tais como: a utilização de marcadores de fluorescência, o uso de membranas porosas seletivas a células aglutinadas, o conhecimento da informação genética do indivíduo, ou ainda, a medição da transmitância ótica ou densidade ótica das amostras.

Os documentos de patente WO9821593A1, US6955889B1, US5776711A e EP1059534A2 descrevem a utilização de anticorpos marcadores de fluorescência (tipos A, B e D) que se ligam aos correspondentes antigénios na superfície das células vermelhas do sangue. Estes são depois identificados pela técnica de citometria de fluxo, permitindo assim a determinação do tipo sanguíneo em análise. Esta tecnologia permite ainda a identificação de anticorpos no correspondente plasma sanguíneo.

O documento de patente US7718420 descreve um biochip microfluídico portátil para a determinação dos grupos sanguíneos baseado na deteção da reação de aglutinação. O dispositivo contém um microcanal para a inserção da amostra de sangue, um sistema de microcanais para a entrada dos reagentes, um sistema de micromisturadores para facilitar a mistura entre os reagentes e a amostra, uma microcâmara de

reação e, ainda, um microfiltro de forma a reter as células aglutinadas que possam ter resultado da reação entre a amostra e o respetivo reagente e assim determinar o tipo de sangue.

O documento de patente US4851210 descreve a utilização de uma membrana de afinidade a regiões específicas das células sanguíneas, para a distinção dos grupos sanguíneos. Esta membrana pode ser acoplada a uma amostra de sangue de forma a constituir um dispositivo para classificação do tipo sanguíneo.

O documento de patente US20060105402 apresenta um dispositivo que utiliza um filtro poroso, especificamente construído para permitir a passagem de células não aglutinadas na direção perpendicular à superfície, permitindo assim a classificação dos grupos sanguíneos.

O documento de patente US2009264318A1 descreve a realização de testes genéticos a um organismo como a forma de marcação inequívoca do mesmo, tornando assim possível a identificação dos antígenos na superfície dos eritrócitos, e assim determinar o tipo de sangue, a partir da informação genética do indivíduo.

O documento de patente US6330058B1 descreve o uso da espectrofotometria para a determinação dos tipos sanguíneos. Neste, o espectro de densidade ótica de uma amostra de sangue diluída na presença de um reagente também sujeito a diluição é medido num intervalo de comprimentos de onda entre 200 nm a 1000 nm. Para além disso, o espectro de referência de uma amostra de controlo (respetiva amostra de sangue diluída em solução salina) é também obtido. Os reagentes utilizados são soluções comerciais de anticorpos (Anti-A, Anti-B e Anti-D), que permitem a classificação dos grupos sanguíneos ABO e Rh. As soluções são preparadas em cuvetes, e os espectros de densidade ótica são obtidos num espectrofotómetro comercial. Para cada um dos espectros é

calculado um indicador numérico de aglutinação, que é obtido dividindo o declive da reta na região linear do espectro pelo declive da reta na região linear do espectro de referência. O valor resultante é depois multiplicado por 100. O índice de aglutinação (IA) é obtido subtraindo o resultado a 100. Um valor elevado de IA significa que se está perante uma amostra aglutinada (interação anticorpo-antigénio); pelo contrário, um valor baixo de IA, significa que não existiu interação entre o anticorpo e o antigénio presente na amostra, ou seja, a amostra é não aglutinada. Esta distinção entre os dois tipos de amostras permite aferir o tipo sanguíneo em análise. Neste tipo de procedimento, é necessário um espectrofotómetro, equipamento de grandes dimensões, o que invalida a portabilidade e a possibilidade de se realizar a análise em qualquer local, principalmente em situações de emergência. Para além disso, é necessário a preparação de uma amostra de controlo e de amostras envolvendo quantidades de reagentes superiores a 100 μL ; é necessário efetuar um conjunto de diluições, quer das amostras de sangue, quer dos reagentes; é necessário esperar cerca de 1 minuto para se obter a reação antes de se poder proceder às medições espectrofotométricas; e são necessárias condições específicas para essas reações ocorrerem, como a utilização de incubadoras com temperatura controlada.

O documento de patente US5169601A refere-se a um sistema não portátil para deteção da reação de aglutinação imunológica (deteção de anticorpos, antigénios, proteínas, entre outros). A reação de aglutinação é detetada por utilização de um LED, sendo baseada no padrão de transmissão da luz emitida pelo LED através de uma amostra. Este sistema possui sensores CCD, como detetores de luz, lentes convexas, um CPU, uma placa com poços de fundo cónico, para reservatório de várias amostras, e ainda

motores para movimento dessas placas. A determinação do tipo sanguíneo é baseada na utilização de células eritrocitárias que são colocadas na placa com poços em conjunto com reagentes anticorpos. Posteriormente, a transmitância ótica da amostra é analisada, tendo em conta a utilização do conjunto LED/lente convexa/sensor CCD.

O documento de patente WO9417212A1 apresenta um sistema portátil para detetar e monitorizar uma reação de aglutinação à medida que esta vai ocorrendo, permitindo assim a deteção de hormonas, anticorpos, antigénios, entre outros. Este sistema é constituído por um conjunto de capilares, para fluxo da amostra ao longo dos vários estágios de aglutinação. Em cada um dos capilares, existe um conjunto LED/fotodíodo para análise da amostra, sendo que o sistema monitoriza a aglutinação das partículas (nos 3 capilares) com base nas propriedades de dispersão de luz das mesmas, ou seja, as alterações ao nível da densidade ótica da amostra são monitorizadas ao longo do tempo. A deteção da reação de aglutinação é baseada na diferença da densidade ótica que é medida em cada capilar à medida que a amostra chega aos respetivos capilares. É uma medição sequencial ao longo do tempo, ou seja, cada amostra é medida 3 vezes em 3 instantes de tempo diferentes e em 3 capilares diferentes. Assim, o objetivo do sistema é detetar a presença da reação de aglutinação e ainda o seu tipo (forte ou fraca).

Contrariamente a todos os sistemas, dispositivos e métodos conhecidos e apresentados até agora, apresenta-se uma tecnologia que consiste num sistema automático, portátil, para a determinação dos grupos sanguíneos baseado num protocolo simples de teste em lâmina e na medição discreta de três valores de densidade ótica por amostra, em comprimentos de onda diferentes, recorrendo a um sistema de Díodos Emissores de Luz (LEDs), ou em alternativa na

utilização de apenas uma luz branca e filtros óticos para o sistema de iluminação.

Assim, a preparação das amostras é rápida, simples, sem necessidade de diluição de reagentes e envolve a utilização de uma reduzida quantidade de reagentes de anticorpos, contrariamente à patente US6330058B1, levando assim a uma diminuição do tempo de análise e à redução dos custos com o gasto de reagentes.

Adicionalmente, na determinação do tipo sanguíneo, a presente invenção utiliza sangue total, e não células eritrocitárias como descrito em US5169601A.

Descrição geral da invenção

A presente invenção consiste num novo sistema e respetivo método de determinação do tipo sanguíneo ABO-Rh de humanos, baseado em espectrofotometria. Com este novo sistema não é necessário existirem amostras de controlo, é rápido, elimina a subjetividade associada à interpretação dos resultados por parte dos técnicos e é simples, uma vez que os reagentes e as amostras de sangue total não necessitam de ser sujeitas a diluições, centrifugação ou incubação a temperatura controlada. O protocolo de teste aplicado é baseado no procedimento em lâmina utilizado no teste manual convencional, utilizando-se por isso, uma lâmina que possui quatro regiões de teste, onde serão colocados o sangue total e em cada região um tipo de reagente anticorpo que consiste em soluções comerciais de anticorpos tipo A (Anti-A), tipo B (Anti-B), tipo AB (Anti-AB) e tipo D (Anti-D).

O sistema é composto por quatro conjuntos de Díodos Emissores de Luz (LEDs) (5) a uma distância horizontal

equivalente à distância entre as regiões da lâmina. Cada conjunto de LEDs irá compreender 3 LEDs que emitem uma gama de comprimentos de onda de 400 nm - 430 nm, 530 nm - 575 nm e maior que 750 nm, respetivamente. A vantagem de cada conjunto compreender 3 LEDs deve-se a uma análise precisa da amostra, em 3 comprimentos de onda relevantes para a classificação da amostra em aglutinada ou não aglutinada. Os feixes de luz irão incidir perpendicularmente sobre as amostras e, irão ser detetados pelos fotodíodos (6), sendo o sistema controlado por um microcontrolador que define qual o LED em funcionamento e por conversores corrente-tensão (7), de forma a produzir um valor de tensão proporcional à corrente gerada pelos fotodíodos, e que possa ser adquirido pelo ADC (Conversor Analógico Digital) do microcontrolador.

A escolha da gama de comprimentos de onda de análise das amostras foi selecionada tendo em conta as propriedades óticas das células sanguíneas - picos de absorção da hemoglobina e ainda a alteração das propriedades óticas do sangue total com o estado da aglutinação do sangue total com os reagentes anticorpos. Após a realização de testes experimentais com um sistema espectralfotométrico comercial e aplicando o método de deteção descrito, foi possível aferir as 3 gamas de comprimentos de onda selecionadas, como as mais adequadas para a distinção dos dois tipos de amostras: aglutinadas ou não aglutinadas. Assim, para cada comprimento de onda, a intensidade de luz detetada pelo fotodíodo (7) dependente das características da amostra: amostra aglutinada ou não aglutinada, o que se traduz pelo facto de ter ocorrido ou não interação entre o antigénio presente no sangue e o anticorpo reagente, respetivamente. De preferência, os picos de emissão nos comprimentos de onda deverão rondar os 406 nm, 566 nm e 956 nm, que são os

comprimentos de onda, dentro da gama referida, que permitem a correta e eficiente distinção entre amostras aglutinadas e não aglutinadas e, como consequência, a determinação dos tipos sanguíneos ABO-Rh, segundo os testes experimentais realizados.

O microcontrolador recebe os três valores de tensão para cada uma das quatro cavidades das regiões de teste (2) da lâmina (1), e tendo por base valores de tensão de referência, isto é valores obtidos apenas com os reagentes numa fase de calibração do sistema, calcula os três valores discretos de densidade ótica, por aplicação da lei de Lambert-Beer.

Após o cálculo dos valores de densidade ótica, o microcontrolador executa um conjunto de algoritmos, de forma a classificar cada uma das amostras em aglutinada ou não aglutinada. Os algoritmos de classificação das amostras baseiam-se na variação existente entre os três valores de densidade ótica obtidos pelos três LEDs de um mesmo conjunto de LEDs, ou seja, para uma dada região de amostra. A variação existente entre esses 3 valores de densidade ótica é distinta consoante o tipo de amostra analisada, aglutinada ou não aglutinada, permitindo assim classificar cada uma das amostras presentes na cavidade das regiões de teste. No final, tendo a classificação das quatro amostras, pode aferir-se o tipo de sangue em análise uma vez que cada tipo é caracterizado por aglutinar com um grupo específico de anticorpos.

Mais concretamente, após a determinação dos três valores calculados de densidade ótica, para uma dada amostra e para os comprimentos de onda de 406 nm, 566 nm e 956 nm, são executados os algoritmos de classificação e decisão,

recorrendo à seguinte sequência, introduzida no microcontrolador:

São calculadas as diferenças entre os 3 valores de densidade ótica (DO), para uma dada amostra, através das expressões:

$$\text{diferença_1} = \sqrt{(\text{DO}[566 \text{ nm}] - \text{DO}[406 \text{ nm}]) * (\text{DO}[566 \text{ nm}] - \text{DO}[406 \text{ nm}])};$$
$$\text{diferença_2} = \sqrt{(\text{DO}[956 \text{ nm}] - \text{DO}[566 \text{ nm}]) * (\text{DO}[956 \text{ nm}] - \text{DO}[566 \text{ nm}])};$$

Se o valor determinado em diferença_1 for menor que o valor de uma variável determinada previamente e experimentalmente (limite_maior) e se o valor da diferença_2 for menor que uma segunda variável também determinada previamente e experimentalmente (limite_menor), então a amostra é aglutinada, sendo atribuída à variável amostra o valor de 1. Se as duas condições anteriores não se verificarem então a amostra é não aglutinada sendo atribuída à variável amostra o valor de 0.

Os valores das variáveis limite_maior e limite_menor são ajustados de acordo com os valores obtidos pelos testes experimentais, realizados com amostras de sangue padronizadas. Nos testes experimentais efetuados, utilizando apenas os 3 comprimentos de onda selecionados, é possível verificar os valores limite, das variáveis limite_maior e limite_menor, que permitiram uma distinção precisa entre amostras aglutinadas e não aglutinadas, isto baseado no conhecimento do tipo sanguíneo testado e no tipo de amostras. Assim, para os dois tipos de amostras aglutinadas e não aglutinadas, verificou-se quais os valores médios obtidos para as variáveis diferença_1 e diferença_2, e com base nesses valores médios definiu-se valores limite para a distinção das amostras - limite_maior

e limite_menor, sendo estes valores classificados como valores limites de referência. O valor limite maior rondará o 1.0 e o limite menor ronda o 0.2.

Por fim, é executado o algoritmo de decisão, com base na tabela 1, de forma a concluir-se o tipo sanguíneo em análise.

Tabela 1 - Algoritmo de decisão do dispositivo (X - aglutinação).

Tipo Sanguíneo	Reação com:			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
A positivo	X		X	X
A negativo	X		X	
B positivo		X	X	X
B negativo		X	X	
AB positivo	X	X	X	X
AB negativo	X	X	X	
O positivo				X
O negativo				

O resultado de teste é apresentado no ecrã (display) do microcontrolador, fornecendo assim a informação ao utilizador, ecrã que pode ser tátil ou não, e o resultado de teste pode ser armazenado num cartão de memória (tipo micro SD) e/ou transmitido para um computador por USB e/ou comunicação sem fios.

Os LEDs deverão ser circulares com um diâmetro na gama dos 5 mm - 30 mm, gama esta adequada ao tamanho do feixe de luz dos LEDs.

Em termos de eficácia, verifica-se que a quantidade ideal dos reagentes para a correta deteção da aglutinação é 20 µL

a 50 μ L e $\frac{1}{4}$ desse volume de sangue total. Isto é, se numa região da lâmina se coloca 20 μ L a 50 μ L do reagente anti-A e $\frac{1}{4}$ de sangue total, numa outra região deverá ser colocado 20 μ L a 50 μ L do reagente anti-B e $\frac{1}{4}$ de sangue total, numa outra 20 μ L a 50 μ L do reagente anti-AB e $\frac{1}{4}$ de sangue total e na última 20 μ L a 50 μ L do reagente anti-D e $\frac{1}{4}$ de sangue total.

O material da lâmina utilizada deverá ser transparente, podendo ser vidro, poliestireno, entre outros, para possibilitar a passagem de luz. As cavidades das regiões de teste necessitam de ter um fundo plano para não afetar a medição ótica, mas podem ter qualquer formato, desde que possibilite que os feixes de luz dos 3 LEDs de cada conjunto fiquem confinados nessa região.

Durante o processamento, é necessário garantir o alinhamento entre o feixe de luz, a amostra e os fotodíodos, de forma a que o feixe atravesse perpendicularmente as regiões de teste, que contêm as amostras.

Verifica-se que o sistema apresentado permite a distinção das amostras aglutinada e não aglutinada através da variação da grandeza de três valores de densidade ótica recolhidos para cada região de teste, sem a necessidade de preparação de uma amostra de controlo; e permitindo uma maior fiabilidade dos resultados uma vez que não se baseia apenas na transmissão de luz através de um capilar/poço de uma amostra.

A presente tecnologia para além de permitir a determinação rápida do tipo de sangue, adequando-se a situações de emergência médica na determinação do tipo sanguíneo humano, caracteriza-se pela sua especificidade e simplicidade: utilização de apenas uma lâmina de teste descartável. A

lâmina de teste poderá ter qualquer formato mas terá de ter, obrigatoriamente, um fundo plano, de forma a permitir uma correta transmissão dos feixes de luz emitidos pelos LEDs.

Numa realização preferencial, o dispositivo de utilização é um dispositivo portátil, constituído por circuitos numa placa PCB superior (3) (Printed Circuit Board) com os quatro conjuntos compostos por três LEDs cada (5) e circuitos eletrónicos para controlar qual o LED em funcionamento em cada momento, alinhada paralelamente com a lâmina de teste e uma outra placa PCB inferior, constituindo a parte de leitura eletrónica do dispositivo (4) formada pelos fotodíodos (6) e por conversores corrente-tensão (7). A disposição dos PCBs e da lâmina de teste é paralela, sendo viável a configuração reversa (sistema de leitura na parte superior). Em qualquer configuração é necessário garantir o alinhamento entre o feixe de luz, a amostra e os fotodíodos, de forma a que o feixe atravessasse perpendicularmente as regiões de teste.

Numa outra realização, cada um dos sistemas de LEDs referido pode ser substituído por uma luz branca convencional com três filtros óticos passa-banda, centrados nos comprimentos de onda de 406 nm, 566 nm e 956 nm, com cerca de 20 nm a 30 nm de banda passante. Esses filtros óticos podem ser colocados por cima ou por baixo da lâmina de teste.

Breve descrição das figuras

A figura 1 representa uma lâmina (1) com quatro cavidades de regiões de teste (2), utilizada para a colocação das amostras no sistema.

A figura 2 representa a disposição dos componentes eletrônicos em que (3) corresponde ao sistema de iluminação, (4) sistema de leitura em relação à lâmina de teste (1), (5) conjuntos de LEDs, (6) os fotodíodos e (7) os blocos de conversão corrente-tensão.

A figura 3 apresenta um resultado de teste para uma amostra de sangue tipo A negativo, isto é, os valores de densidade ótica discretos para cada um dos comprimentos de onda considerados na análise das amostras.

A figura 4 apresenta um segundo resultado de teste para uma amostra de sangue tipo B negativo.

A figura 5 representa um exemplo de um dispositivo final, em que (8) corresponde à embalagem com tampa (10), de cor preta para um melhor isolamento da luz, (9) o suporte para a lâmina de teste.

A figura 6 apresenta a tampa do dispositivo (10) caso seja utilizada a luz branca convencional com os filtros óticos, com quatro aberturas (11), de forma a permitir a entrada do feixe de luz.

Descrição Detalhada

O presente exemplo é demonstrativo, não se pretendendo limitar o âmbito da proteção.

Inicialmente será preparada a amostra que consiste nos seguintes passos:

1. Adicionar numa das cavidades de região de teste (2) de uma lâmina (1) 20 μ L a 50 μ L de reagente Anti-A, numa

outra cavidade (2) adicionar 20 μL a 50 μL de reagente Anti-B, numa outra cavidade colocar 20 μL a 50 μL de reagente Anti-AB e numa outra cavidade colocar 20 μL a 50 μL de reagente Anti-D.

2. Adicionar sangue total com cerca de um quarto da quantidade de reagente, em cada uma das cavidades das regiões de teste da lâmina;

3. Misturar o sangue e o reagente anticorpo uniformemente, durante cerca de 5 segundos.

Após a amostra se encontrar preparada, e após se calibrar o sistema, ou seja, obter os valores de tensão com a utilização de apenas reagentes anticorpos na lâmina, procede-se então à análise das amostras. Os passos são:

1. Inserir a lâmina no sistema exatamente no local e posição para o efeito, o que faz com que os conjuntos de LEDs e fotodíodos fiquem alinhados paralelamente com as regiões de teste;

2. O conjunto de LEDs (5) e respectivos circuitos eletrónicos entram em funcionamento, sendo que cada um dos LEDs acende alternadamente e é adquirido um valor de tensão para cada um deles. Esse valor é diretamente proporcional à quantidade de luz recebida pelo fotodíodo (6) em cada medição, gerando uma corrente elétrica que é depois convertida numa tensão pelo bloco de conversão (7);

3. Adquiridos os valores de tensão por parte do microcontrolador, são calculadas as densidades óticas para cada comprimento de onda, através do conhecimento dos respetivos valores de tensão aquando da calibração e pela aplicação da lei de Lambert-Beer;

4. Com base nos valores de densidade ótica calculados, o microcontrolador efetua a determinação do tipo sanguíneo,

tendo como base a execução dos algoritmos de classificação de cada amostra de região de teste e respetiva decisão;

5. O resultado de teste é indicado num ecrã, informando o utilizador do tipo sanguíneo em análise.

A Figura 2 demonstra onde deverão estar localizados os conjuntos de LEDs (5); a lâmina de teste (1) e os fotodíodos (7).

A figura 3 apresenta o resultado obtido, para uma amostra de sangue tipo A negativo. Como pode ser observado, uma amostra não aglutinada (tipo sanguíneo A negativo na presença de anticorpos tipo B e tipo D) tem valores de densidade ótica mais elevados e com uma maior variação ao longo dos comprimentos de onda considerados. Pelo contrário, amostras aglutinadas (tipo sanguíneo A negativo na presença de anticorpos tipo A e tipo AB) têm um espectro com valores reduzidos de densidade ótica e aproximadamente constantes entre eles. Tais factos estão de acordo com o teoricamente esperado e são explicados pela teoria de dispersão de Mie associada com as células aglutinadas, que leva a uma existência de grandes quantidades de luz dispersa por parte destas e consequentemente a uma menor densidade ótica no espectro obtido.

A figura 4 apresenta o resultado obtido para uma amostra de sangue tipo B negativo. Neste caso, apesar dos valores de densidade ótica para os dois tipos de amostras serem menores, o que pode estar relacionado com uma menor concentração de hemoglobina na amostra de sangue testada, pode mais uma vez aferir-se que as diferenças entre os valores de densidade ótica, dentro da mesma amostra, são distintas para o caso em que se tenha uma amostra aglutinada e não aglutinada. Assim, o facto da análise

efetuada pelo sistema integrar a medição de 3 valores de densidade ótica por amostra, e efetuar-se a classificação baseado nas diferenças entre esses três valores, e não apenas na grandeza dos mesmos, é uma característica que permite garantir a precisão do resultado obtido.

A figura 5 representa a configuração de um dispositivo final, sendo as dimensões ajustáveis de acordo com o tamanho da lâmina de teste (1). O dispositivo é constituído por um suporte que fica na região central (9) de forma a fixar a lâmina com as amostras. As placas PCB (3) e (4) ficam na parte superior e inferior do suporte, consoante a configuração desejada. Na parte superior do dispositivo ficam acoplados o microcontrolador e as baterias. O dispositivo tem ainda uma tampa (10) que encaixa na base (8) de forma a isolar a luz externa para que esta não afete as medições óticas.

A Figura 6 demonstra um dispositivo para se usar com iluminação por luz branca e filtros óticos, que podem ser posicionados por cima ou por baixo da lâmina de teste, a tampa deve ter 4 aberturas (11) posicionadas na zona das amostras.

Braga, 04 de setembro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de deteção da reação de aglutinação para determinação do tipo sanguíneo de humanos que compreende componentes optoelectrónicos posicionados na zona superior e inferior do sistema, circuitos eletrónicos de controlo, microcontrolador para controlo dos componentes optoelectrónicos e para execução dos métodos de análise e interpretação dos valores obtidos pelos fotodíodos e um meio passível de leitura, caracterizado por:

- na zona superior estarem quatro conjuntos de LEDs (5), sendo que cada conjunto compreende três LEDs com gamas de comprimentos de onda de 400 nm - 430 nm, 530 nm - 575 nm e maior que 750 nm que incidem sobre cada região de amostra, , e na zona inferior estarem quatro fotodíodos (6), cada um orientado para um conjunto de LEDs e conversores de corrente-tensão (7);

- uma lâmina de teste (1) colocada entre o conjunto de LEDs e os fotodíodos (6), em que as regiões de teste (2) encontram-se alinhadas paralelamente com os conjuntos de LEDs e os fotodíodos de modo a que os feixes de luz transmitidos pelos LEDs incidam sobre as regiões de teste.

2. Sistema, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por os conjuntos de LEDs e circuitos eletrónicos de controlo estarem numa placa PCB.

3. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os fotodíodos e os conversores corrente-tensão estarem numa outra placa PCB.

4. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por compreender um ecrã e/ou cartão de memória e/ou ligação USB e/ou ligação sem fios.

5. Método de detecção de aglutinação para determinação do tipo sanguíneo de humanos, conforme sistema descrito nas reivindicações 1 a 4, caracterizado por compreender os seguintes passos:

a) calibrar o sistema colocando em cada região de teste da lâmina um reagente e ativar o sistema de forma a que cada conjunto dos três LEDs emitam o feixe de luz que será recolhido pelos fotodíodos e convertido num valor de tensão, que será lido pelo microcontrolador;

b) colocar a lâmina da amostra com sangue total e reagentes, ficando as regiões de teste paralelas ao conjunto LEDs/fotodíodos;

c) ativar o sistema de modo a que os quatro conjuntos de três LEDs emitam um feixe de luz, sendo esse feixe alternado por entre os três LEDs, feixe esse que atravessa a amostra até aos fotodíodos;

d) geração de uma corrente elétrica por parte do fotodíodo que é convertida numa tensão pelo bloco de conversão (7);

e) obter os valores de tensão através do microcontrolador e calcular as densidades óticas para cada um dos comprimentos de onda dos três LEDs de cada amostra de região de teste, através da obtenção dos respetivos valores de tensão no passo de calibração;

f) calcular as diferenças entre os três valores de densidade ótica, para cada amostra de região de teste, de modo a se obter dois resultados e comparar com valores limites pré definidos como valores de referência;

g) executar a classificação das amostras e a decisão do tipo de sangue, por parte do microcontrolador;

h) transmissão dos resultados obtidos.

6. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por nos passos a) e c) cada um dos LEDs existentes em cada conjunto de LEDs, emitirem, alternadamente

um feixe de luz de comprimentos de onda entre 400 nm - 430 nm, entre 530 nm - 575 nm e maior que 750 nm, e incida perpendicularmente sobre a região de teste.

7. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por preferencialmente, os picos de emissão serem para cada um dos LEDS de cada conjunto 406nm, 566nm e 956 nm.

8. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por cada um dos fotodíodos captar a intensidade de luz que atravessa a região de teste e gerar uma corrente elétrica que é proporcional à quantidade de luz recebida e a transmitir para o bloco de conversão corrente-tensão.

9. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por no passo b) a preparação da amostra consistir em colocar numa região de teste da lâmina 20 µL a 50 µL de reagente Anti-A e $\frac{1}{4}$ desse valor de sangue total; numa outra região de teste 20 µL a 50 µL de reagente Anti-B e $\frac{1}{4}$ desse valor de sangue total; numa outra 20 µL a 50 µL de reagente Anti-AB e $\frac{1}{4}$ desse valor de sangue total e, na última região de teste 20 µL a 50 µL de reagente Anti-D e $\frac{1}{4}$ desse valor de sangue total.

10. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por se misturarem manualmente as soluções por um período de 5 segundos.

11. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por no passo d) o fotodíodo gerar três valores de corrente elétrica, cada um para cada um dos 3 comprimentos de onda dos LEDS, que são diretamente proporcionais à quantidade de luz que atravessa a região de teste, e cujo valor é dependente da reação ocorrida entre o sangue e o reagente.

12. Método, de acordo com a reivindicação 5 , caracterizado por no passo f), os valores limites pré-definidos como valores de referência consistirem em o limite maior rondar preferencialmente o 1.0 e o limite menor rondar preferencialmente os 0.2.

13. Método, de acordo com as reivindicações 5 e 12, caracterizado por se o cálculo das duas diferenças dos três valores óticos for inferior aos limites de referência, a amostra é classificada como aglutinada.

14. Método, de acordo com as reivindicações 5 e 12, caracterizado por se os resultados das duas diferenças dos três valores óticos forem superiores aos limites de referência, a amostra é classificada como não aglutinada.

Braga, 11 de julho 2014

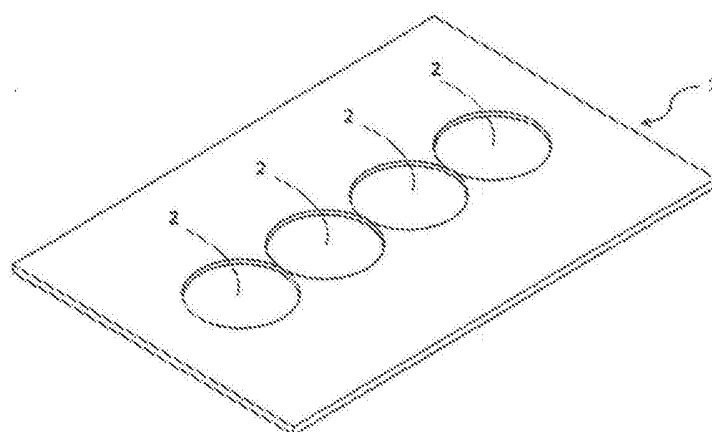
DESENHOS

Figura 1

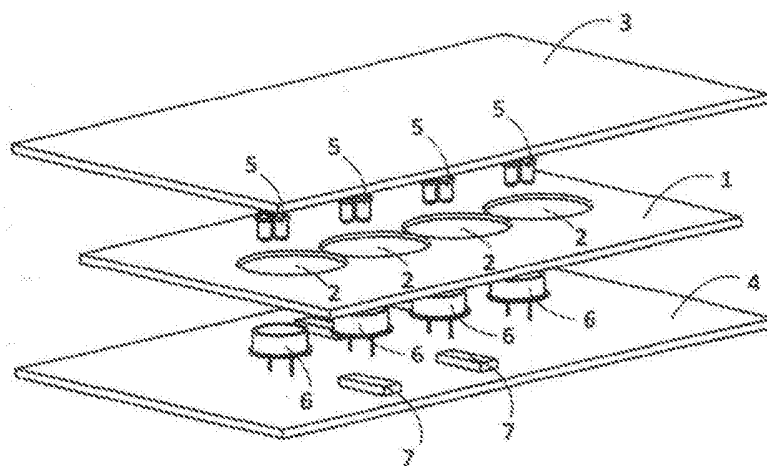


Figura 2

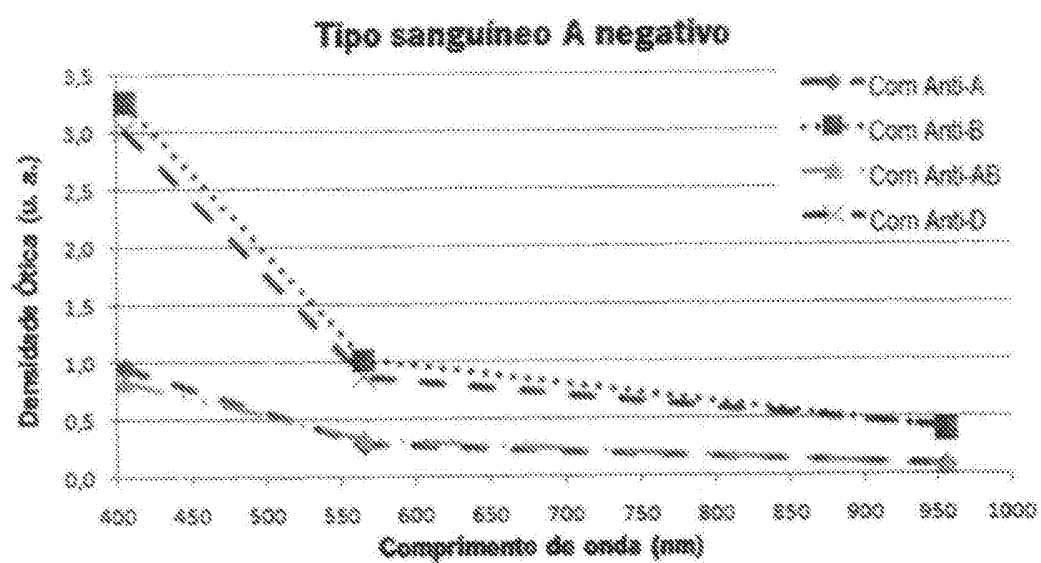


Figura 3

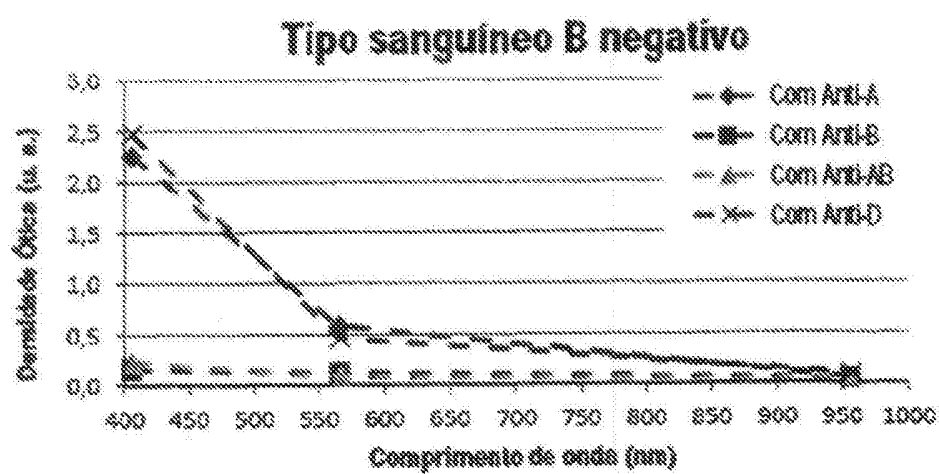


Figura 4

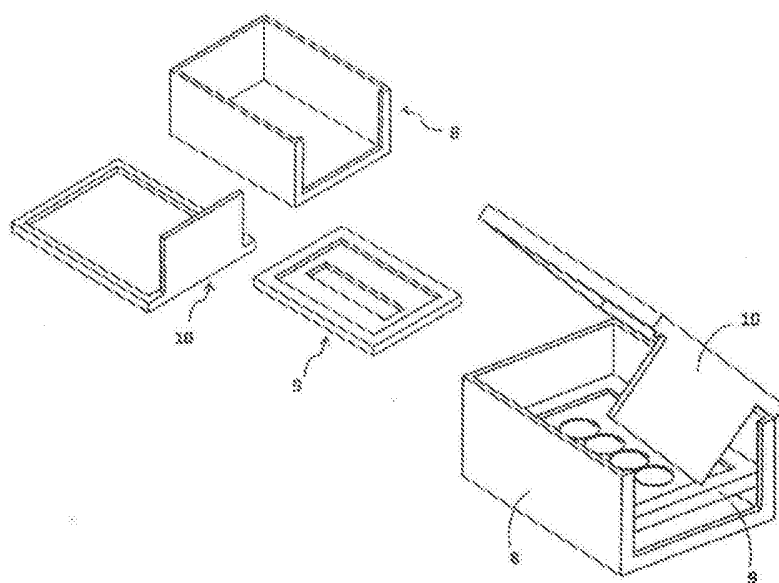


Figura 5

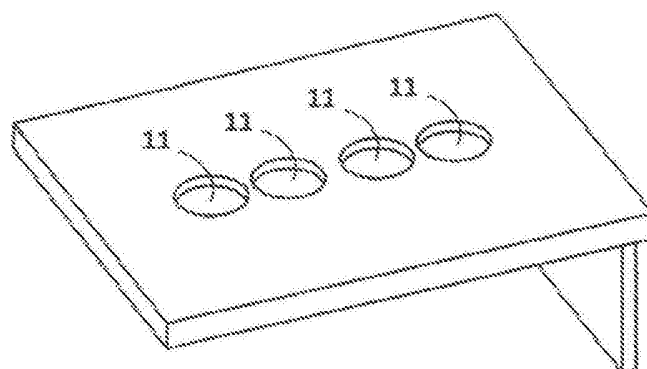


Figura 6