



(21) PI 9004897 A

(22) Data de Depósito: 01/10/90

(43) Data de Publicação 07/04/92 (RPI 1114)

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Justiça
Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(54) Título Medição do tempo coagulação sanguínea utilizando microesferas agitadas por ultra-som

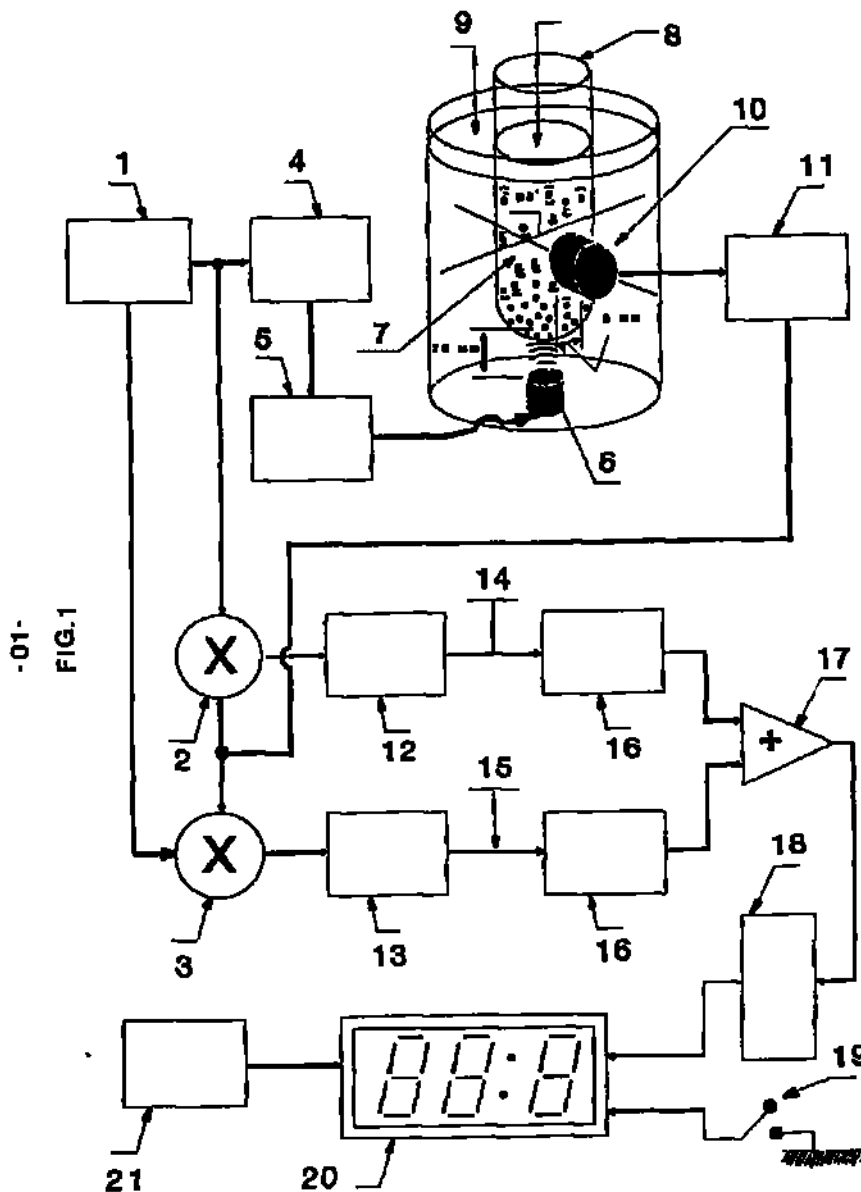
(71) Depositante(s) Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

(72) Inventor(es) João Carlos Machado

(74) Procurador: Maurício Guedes Pereira

(57) Resumo: Patente da invenção "Processo p/ medição do tempo de coagulação sanguínea utilizando microesferas agitadas por ultra-som". Patente da invenção de uma metodologia que utiliza partículas esféricas de material rígido adicionadas a uma amostra

de plasma ou sangue para se medir tempo de coagulação sanguínea. Essas partículas são agitadas por meio de uma onda ultra-sônica (27 Mhz) que incide no meio em teste. O movimento delas é detectado através da análise da onda ultra-sônica por elas espalhadas quando forma-se o coágulo então essas partículas ficam impedidas de se movimentar e isto se traduz numa informação que é utilizada para parar um cronômetro, indicando-se assim o tempo decorrido desde o instante em que um agente coagulante foi adicionado ao material em teste. Este método permite que a medição do tempo de coagulação possa ser realizada de forma automática.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção "PROCESSO PARA A MEDIÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA UTILIZANDO MICROESFERAS AGITADAS POR ULTRA-SOM"

5 Refere-se o presente invento a um novo método que possibilita a medição do tempo de coagulação sanguínea, como por exemplo o Tempo de Protrombina ou o Tempo de Trobomplastina Parcial Ativada, cuja utilização se dá em hematologia.

10 Diversos métodos são atualmente empregados em equipamentos que medem o tempo de coagulação. Um deles baseia-se no princípio de que a fibrina, que é um dos produtos finais na formação do coágulo, possui uma condutividade elétrica diferente daquela do fibrinogênio - a proteína que gera a fibrina. Desta
15 forma mede-se a variação da resistência elétrica entre dois eletrodos inseridos numa amostra de plasma sanguíneo durante o seu processo de coagulação. Já um outro método baseia-se no princípio de que a fibrina possui o coeficiente de absorção óptica maior do que o
20 fibrinogênio. Com isto procura-se medir a variação da atenuação que ocorre num feixe colimado de luz que atravessa uma amostra de plasma sanguíneo durante o processo de coagulação.

25 Com a utilização de ultra-som foi apresentado por Rubens A. Sigelmann em 1977 um método que consiste na medição de tempo de coagulação do plasma ou do sangue total utilizando-se o ultra-som. Este método, patenteado nos Estados Unidos do Norte da América sob o título ULTRASONIC COAGULATION TIMER e com o número

9004897

PI9004897

- 2 -

4014650 baseia-se na monitoração das flutuações que ocorrem na onda ultra-sônica retroespalhada de uma amostra de plasma ou sangue quando a mesma está sob o processo de coagulação. Ao se adicionar o agente
5 coagulante a amostra para dar início à coagulação a turbulência desse meio na amostra ocasiona flutuações de amplitude na onda por ela retroespalhada que tendem a desaparecer quando o coágulo se forma. O intervalo de tempo compreendido entre o instante de
10 adição do agente coagulante e aquele em que cessam as flutuações de amplitude da onda retroespalhada pelo meio corresponde ao tempo de coagulação da amostra de plasma ou sangue. No entanto, os resultados obtidos com a metodologia empregada na patente citada dependem
15 muito da maneira como o agente coagulante é adicionado ao meio, de forma a se processarem as turbulências mencionadas. Cabe ressaltar que a agitação provocada no meio hospedeiro pela adição de coagulante não se constitui numa ação bastante controlada, o que diminui
20 a precisão do método uma vez que o seu funcionamento está todo ele baseado nesta agitação e por conseguinte na onda ultra-sônica retroespalhada por estas turbulências.

A presente patente tem por finalidade acrescentar
25 maior precisão ao método ultra-sônico utilizado na medição do tempo de coagulação. Para tanto são adicionadas pequenas partículas esféricas ao meio do qual se deseja medir o tempo de coagulação. Essas partículas, que funcionam como traçadores, são
30 colocadas em movimento aleatório pela ação de uma onda ultra-sônica que nelas incide. Ao mesmo tempo em que essas partículas se movem elas espalham, em diversas direções, a onda ultra-sônica que nelas incidente. Um transdutor ultra-sônico receptor capta parte destas

ondas espalhadas e gera por sua vez um sinal elétrico cujas flutuações de fase e amplitude são devidas ao movimento das partículas dentro do meio hospedeiro-plasma ou sangue. Ao se iniciar a medição do tempo de coagulação as partículas esféricas estão se movendo quase que livremente no meio hospedeiro. Entretanto, à medida que a coagulação se processa as características reológicas deste meio se alteram e isto introduz modificações na movimentação das partículas. Com a formação do coágulo a rede de fibrina impede que as partículas se movimentem e isto se traduz imediatamente no desaparecimento das flutuações de fase e amplitude no sinal elétrico gerado pelo transdutor receptor. Assim, o tempo de coagulação pode ser medido pela detecção das oscilações contidas neste sinal elétrico, entre o instante em que o agente coagulante é adicionado ao meio em teste e aquele instante em que essas oscilações desaparecem, o que corresponde nesse caso ao instante em que as partículas pararam de se mover e portanto o coágulo se formou.

A agitação das partículas dentro do meio hospedeiro traz ainda a vantagem de homogeneizar a mistura formada por esse meio com o agente coagulante.

Com o objetivo de se testar o método apresentado nesta patente foi desenvolvido e construído todo um sistema ultra-sônico cuja descrição é dada a seguir, baseando-se para tanto no diagrama de blocos apresentado na Fig. 1. Um oscilador eletrônico (1) gera um sinal contínuo em 2.7 MHz do qual se obtêm duas componentes defasadas de 90° e que alimentam cada uma, a entrada de um dos multiplicadores analógicos (2) ou (3). Uma outra saída do oscilador (1) passa por um amplificador de alta frequência (4) e por meio de um

circuito casador de impedâncias (5) alimenta o transdutor ultra-sônico (6) que serve de transmissor. Este transdutor (6) funciona no modo contínuo emitindo uma onda ultra-sônica em 2.7 MHz cuja intensidade máxima, na região onde se encontram as partículas (7) dentro do tubo de ensaio (8), é da ordem de 800 mW/cm^2 . Este tubo de ensaio (8) contém o meio em teste-plasma ou sangue, e está inserido dentro de um banho maria (9) cuja temperatura é controlada e mantida em $37^{\circ} \pm 0.2^{\circ} \text{ C}$. As partículas esféricas (7) podem ser de vidro ou outro material rígido mais denso do que a água e possuem um diâmetro de 200 μm . Elas se movem preferencialmente na vertical devido a ação da onda ultra-sônica que nelas incide. Ao mesmo tempo elas espalham esta onda incidente e parte da onda espalhada é recebida pelo transdutor ultra-sônico receptor (10). O sinal elétrico na saída deste transdutor passa por um amplificador (11) e é dirigido a entrada de cada um dos multiplicadores analógicos (2) e (3). Os sinais da saída de cada multiplicador passam, cada um, por um filtro analógico passa baixa (12) e (13) com frequência de corte em 1 KHz e cujas saídas fornecem as componentes EM FASE (14) e EM QUADRATURA (15) da onda recebida pelo transdutor (10). Esses sinais (14) e (15) passam por um retificador de onda completa de dois canais (16) e as saídas deste retificador são adicionadas no somador (17). Enquanto as partículas estiverem em movimento a saída do somador apresenta um sinal cujas flutuações são aleatórias. Cessando o movimento destas partículas então a saída do somador passa a ser um sinal constante. O sinal gerado pelo somador (17) passa por um processador de sinais (18) cuja função consiste em gerar um sinal do tipo janela que passa do nível ZERO ao nível UM quando uma pipeta

(19) adiciona o agente coagulante no meio em teste. Havendo oscilações no sinal gerado (17) então o sinal que sai de (18) mantém-se em nível UM. Quando as partículas param de se movimentar então a saída de (18) volta ao nível ZERO. Este sinal janelado funciona de comando a um circuito contador de 3 dígitos (20) que é alimentado por um oscilador (21) na frequência de 10 Hz. Com isto, este contador possui precisão de 0.1 do segundo.

A contagem fornecida por (21) fornece portanto o intervalo de tempo decorrido desde o instante em que se deu início a coagulação do meio em teste até a formação do coágulo.

Com este sistema ultra-sônico descrito foram realizados alguns testes para se medir o tempo de protrombina (TP). Nesse caso a cada amostra de 0.1 ml de plasma foi adicionada uma quantidade de cerca de 2500 partículas. Estas ocupam, dentro da amostra, um volume de cerca de 0.01 ml. O conjunto plasma e partículas ficou colocado dentro de um tubo plástico (8) de polietileno e posicionado dentro do banho maria. A essa amostra adicionou-se 0.2 ml de tromboplastina cálcica que é o agente coagulante para se medir TP. Este tipo de teste foi repetido 16 vezes a cada dia e durante 3 dias. Ao mesmo tempo em que se utilizava o sistema ultra-sônico, um outro conjunto de 16 testes foi realizado em cada dia pelo método manual. Nesse caso foram utilizados plasma e agente coagulante em mesmas quantidades e dos mesmos lotes daqueles utilizados no método ultra-sônico. O método manual consiste em se colocar o plasma em um tubo de ensaio de vidro e adicionar a tromboplastina cálcica. Neste instante aciona-se um cronômetro e procura-se detectar visualmente o instante de tempo em que o tubo pode ser

invertido de cerca de 120° em relação à vertical, sem que haja derramamento de material. A formação do coágulo impede que haja esse derramamento.

5 A Fig. 2 apresenta os resultados conseguidos com esses dois métodos para uma série de 16 testes para cada método e em 3 dias diferentes. Esses resultados são apresentados em forma da média e do desvio padrão para cada conjunto de 16 testes. As barras pretas verticais indicam um desvio padrão para cada lado do
10 valor médio.

O plasma utilizado refere-se ao caso de plasma normal, sendo que o valor esperado para TP situa-se na faixa de 11 a 15 segundos.

3004897

PI9004897

REIVINDICAÇÕES

1-"PROCESSO PARA A MEDIÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUINEA UTILIZANDO MICROESFERAS AGITADAS POR ULTRA-SOM" caracterizado pela utilização de partículas
5 esféricas de material rígido adicionadas ao meio hospedeiro (sangue ou plasma) e sistema ultra-sônico para a emissão e detecção de ondas ultra-sônicas.

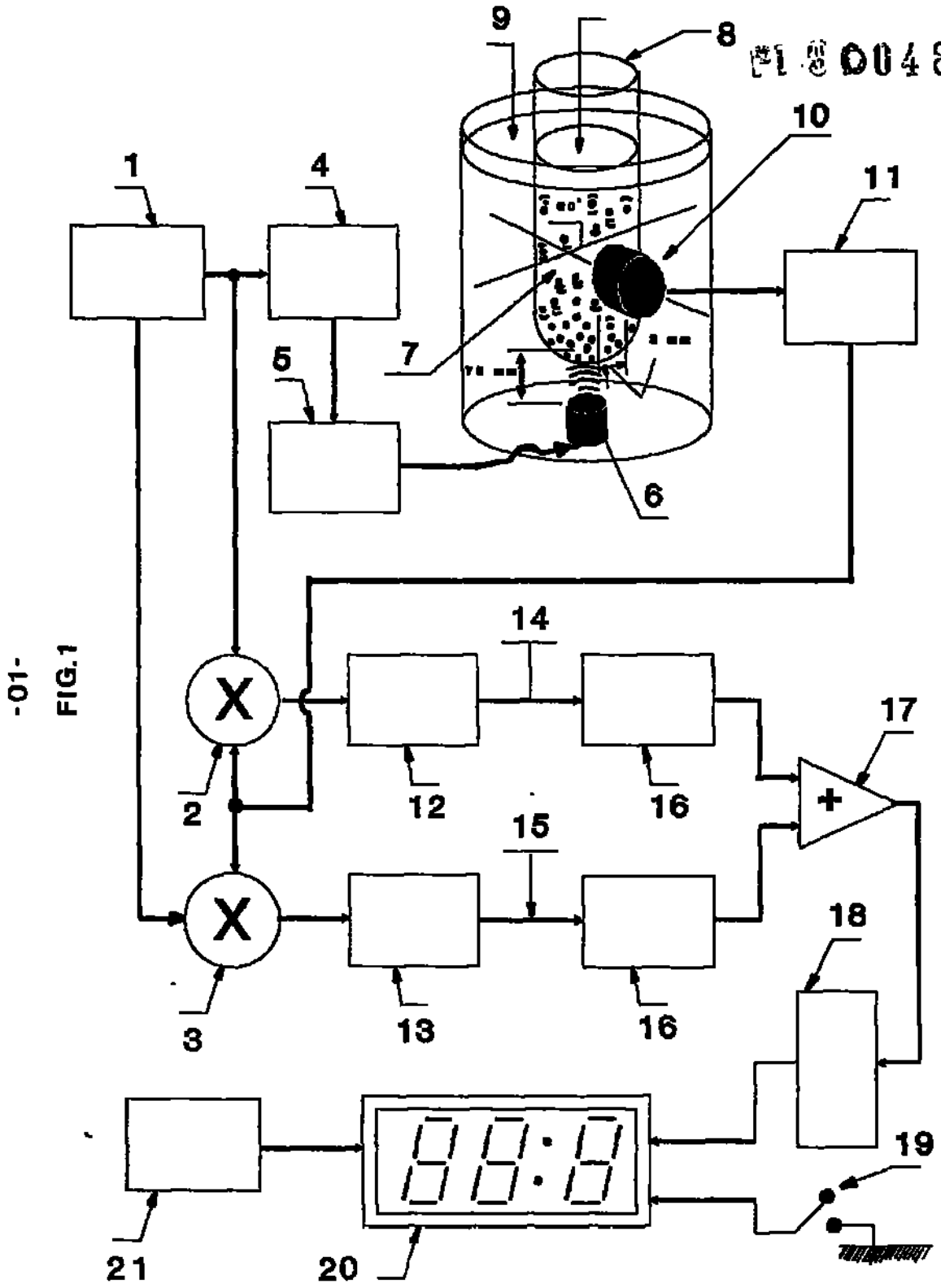
2-"PROCESSO PARA A MEDIÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUINEA UTILIZANDO MICROESFERAS AGITADAS POR ULTRA-SOM", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
10 pelo fato das ditas esferas moverem-se aleatoriamente dentro do meio hospedeiro pela ação das ondas ultra-sônicas, movimento esse que desaparece quando o meio hospedeiro está coagulado.

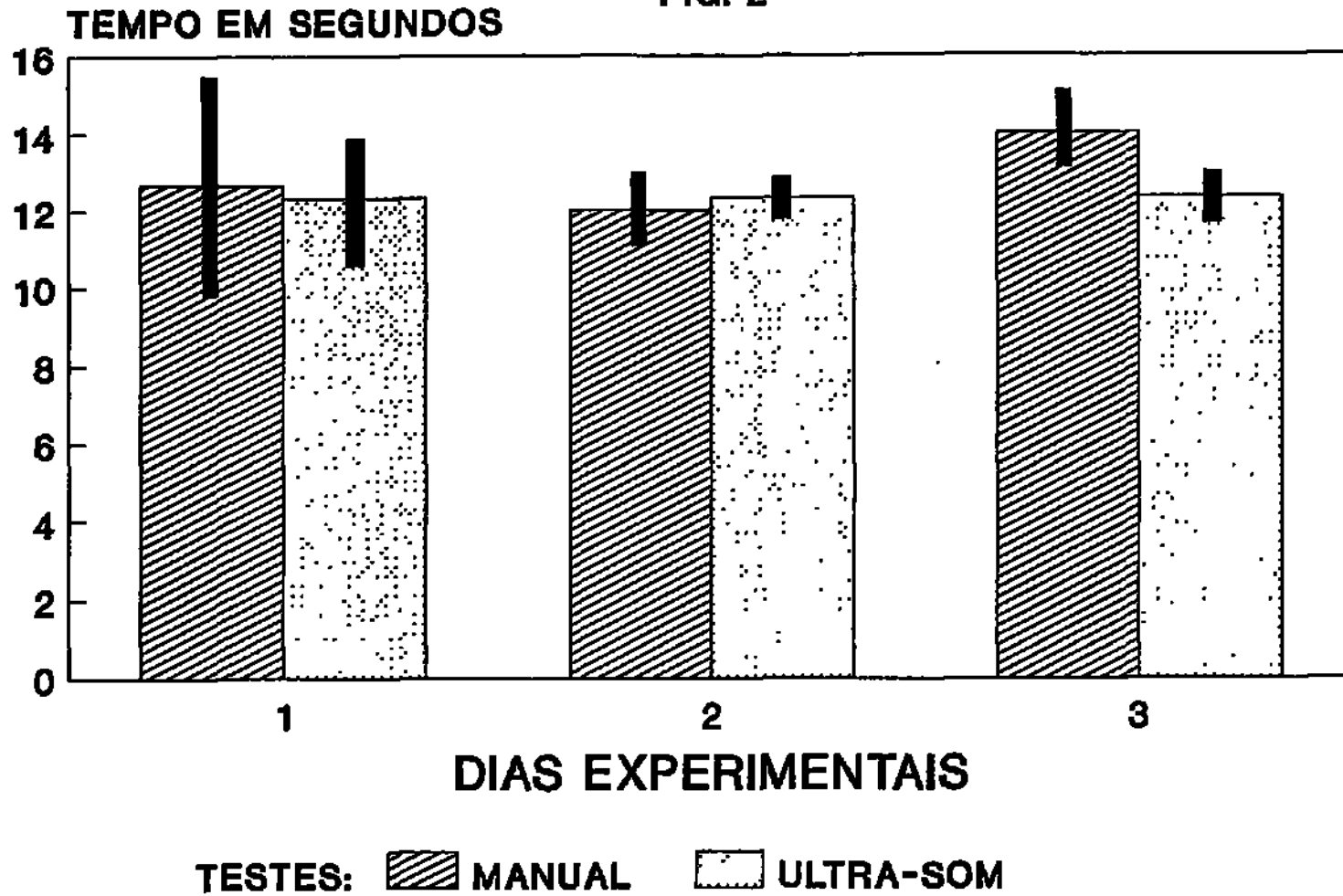
3-"PROCESSO PARA A MEDIÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUINEA UTILIZANDO MICROESFERAS AGITADAS POR ULTRA-SOM", de acordo com as reivindicações 1 e 2,
15 caracterizado por as ditas esferas refletirem a onda ultra-sônica, a qual, captada por um transdutor ultra-sônico gera um sinal aleatório cujas oscilações
20 desaparecem quando o meio hospedeiro está coagulado.

4-"PROCESSO PARA A MEDIÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUINEA UTILIZANDO MICROESFERAS AGITADAS POR ULTRA-SOM", de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3,
25 caracterizado pelo fato do dito sistema ultra-sônico monitorar a cessação das referidas oscilações, medindo assim o tempo de coagulação.

2004897

004897





P19004897

5004897

2004897

PI 004897

RESUMO DA INVENÇÃO

Patente de Invenção: "PROCESSO PARA A MEDIÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA UTILIZANDO MICROESFERAS AGITADAS POR ULTRA-SOM".

5 Patente de Invenção de uma metodologia que utiliza partículas esféricas de material rígido adicionadas a uma amostra de plasma ou sangue para se medir tempo de coagulação sanguínea. Essas partículas são agitadas por meio de uma onda ultra-sônica (2.7 MHz) que incide no
10 meio em teste. O movimento delas é detectado, através da análise da onda ultra-sônica por elas espalhadas. Quando forma-se o coágulo então essas partículas ficam impedidas de se movimentar e isto se traduz numa informação que é utilizada para parar um cronômetro,
15 indicando-se assim o tempo decorrido desde o instante em que um agente coagulante foi adicionado ao material em teste. Este método permite que a medição do tempo de coagulação possa ser realizada de forma automática.