



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0816016-3 B1**



**(22) Data do Depósito: 26/09/2008**

**(45) Data de Concessão: 13/10/2020**

---

**(54) Título:** KIT REAGENTE PARA ANALISAR UMA AMOSTRA E MÉTODO PARA ANALISAR UMA AMOSTRA

**(51) Int.Cl.:** G01N 33/49; G01N 21/64; G01N 21/78; G01N 33/48.

**(30) Prioridade Unionista:** 24/03/2008 JP 2008-076606; 27/09/2007 JP 2007-252666.

**(73) Titular(es):** SYSMEX CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** TATSUYA NARIKAWA; TOMOHIRO TSUJI; KEIKO MORIYAMA; YUJI ITOSE; SHINICHIRO OGUNI; AYUMU YOSHIDA; SAORI SUZUKI; TOSHIHIRO MIZUKAMI.

**(86) Pedido PCT:** PCT JP2008067507 de 26/09/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/041626 de 02/04/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 24/03/2010

**(57) Resumo:** KIT REAGENTE PARA ANALISAR UMA AMOSTRA E MÉTODO PARA ANALISAR UMA AMOSTRA. A presente invenção provê um kit reagente para analisar uma amostra compreendendo um primeiro reagente contendo um surfactante catiônico, um surfactante não-iônico e um ácido carboxílico aromático e um segundo reagente que contém corante fluorescente capaz de corar o ácido nucléico, e um método para analisar uma amostra usando o referido kit.

"KIT REAGENTE PARA ANALISAR UMA AMOSTRA E MÉTODO PARA ANALISAR UMA AMOSTRA".

Campo da invenção

[0001] A presente invenção refere-se a um kit reagente e a um método para analisar as células do sangue em uma amostra biológica.

Histórico da invenção

[0002] No campo dos testes laboratoriais, a análise dos componentes do sangue em uma amostra é muito importante quando várias doenças circulatórias nos órgãos ou do gênero são diagnosticadas em indivíduos. Dependendo do tipo de doença, o número de células sanguíneas particular pode aumentar ou diminuir, ou o número de células do sangue que normalmente não deveriam estar ali podem aparecer no sangue periférico, em alguns casos.

[0003] Recentemente, vários contadores automáticos de células de sangue estão sendo comercializados, nos quais o princípio da citometria de fluxo é aplicado. Através do uso dos referidos contadores automáticos de célula do sangue, as células sanguíneas em uma amostra podem ser classificadas automaticamente e contadas.

[0004] Normalmente, os leucócitos podem ser classificados em cinco espécies, linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Dentre eles, o número de basófilos contido na amostra de sangue é pequeno. Portanto, a precisão da classificação pode ser melhorada através da medida dos basófilos nas amostras de sangue com o tratamento exclusivo pela medida dos basófilos, comparado à medida dos basófilos com o método no qual os leucócitos são classificados em cinco espécies e os basófilos são medidos em uma medida. Os

basófilos têm uma característica específica de modo que eles são menos danificados quando comparado a outros tipos de leucócitos sob uma condição ácida. Através da utilização da referida característica, a discriminação do basófilo a partir de outro tipo de leucócito com o tratamento exclusivo para basofilia é descrita na publicação do pedido de patente Japonês, não examinado No: SHO 61(1986)-88896 (Documento de patente 1) e na publicação de pedido de patente japonês não-examinado No: HEI 7(1995)-294518 (Documento de patente 2).

[0005] Uma emergência de eritrócitos nucleados algumas vezes causa problemas na medida dos leucócitos. Os eritrócitos nucleados têm nucléolos. Em uma medida de leucócitos, mesmo quando os eritrócitos são tratados para serem lisados, os nucléolos dos eritrócitos nucleados permanecem para causar o sinal similar ao dos leucócitos, resultando em um erro falso positivo na medida do número de leucócitos. De modo a eliminar este efeito e obter o número preciso de leucócitos, uma amostra de sangue é tratada através de um tratamento exclusivo para eritrócitos nucleados para medir o número de eritrócitos nucleados, o número dos leucócitos na mesma amostra de sangue é medida por um método diferente, e então o número de eritrócitos nucleados é subtraído a partir do número de leucócitos obtidos. O documento de publicação do pedido de patente japonês não examinado HEI 10(1998)-339729 (documento de patente 3) descreve a discriminação de eritrócitos nucleados a partir leucócitos por aplicação do tratamento exclusivo para eritrócitos nucleados para a amostra de sangue.

[0006] Entretanto, a necessidade dos tratamentos exclusivos para respectivas células de sangue como descrito

nos documentos de patente acima 1 a 3 para a classificação da basofilia ou eritrócitos nucleados requer uma divisão maior de tempo e aparelhos complicados para fazer medidas adicionais ou por ajustes de tamanho. Em adição, o uso de reagentes múltiplos exclusivos para as respectivas células de sangue torna-se oneroso como um custo total para o teste do sangue. Conseqüentemente, é preferível que os tratamentos, exclusivos para as células do sangue, sejam menos onerosos quanto possível.

[0007] Ambos, basófilos e eritrócitos nucleados podem ser medidos através das amostras de tratamento do sangue sob uma condição ácida. Portanto, existe uma possibilidade de que ambos os basófilos e os eritrócitos nucleados podem ser medidos em uma medida quando uma amostra de sangue for tratada sob uma condição ácida. A publicação do pedido de patente japonês não-examinado No: 2002-148261 (Documento de patente 4) descreve que os basófilos e os eritroblastos (eritrócitos nucleados) podem ser medidos por mistura de uma amostra com uma solução aquosa contendo um surfactante e um agente de lise de eritrócitos que permite aos leucócitos e células anormais ficar em um estado apropriado para coloração, adição de uma gente de coloração contendo um corante fluorescente para corar as células e a medir a intensidade de fluorescência e a intensidade de luz dispersa com uma citometria de fluxo.

#### Descrição da invenção

Problemas que a invenção deve resolver:

[0008] Entretanto, através do uso do método descrito no documento de patente número 4, os basófilos não são bem separados a partir de outros leucócitos além dos basófilos,

especialmente, em uma amostra de sangue para a qual um declínio de tempo passou após sua coleta, em alguns casos.

[0009] Assim, o objetivo da presente invenção é prover um kit reagente e um método para medir uma amostra que permite uma discriminação clara e a contagem dos eritrócitos e basófilos a partir de outros tipos de leucócitos na amostra.

[0010] Meios para resolver os problemas:

[0011] A presente invenção é um kit reagente para analisar uma amostra para medir basófilos e/ou eritrócitos nucleados na amostra compreendendo:

[0012] Um primeiro reagente contendo um surfactante catiônico, um surfactante não-iônico e um ácido carboxílico aromático, que podem lisar os eritrócitos e prejudicar a membrana celular de leucócitos de modo que um corante fluorescente possa permear através dela, e um segundo reagente contendo o corante fluorescente capaz de corar o ácido nucléico.

[0013] Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um método para analisar uma amostra compreendendo as etapas a seguir:

- lisar os eritrócitos em uma amostra e danificar uma membrana celular das células do sangue de modo que o corante fluorescente possa permear através dela, em virtude do primeiro reagente acima mencionado, e corar as células danificadas em função do segundo reagente acima,
- aplicar a luz às células coradas para obter a informação da luz difundida e a informação fluorescente, e
- classificar e contar os basófilos e/ou os eritrócitos nucleados na amostra com base na informação da luz difundida e na informação fluorescente.

Efeito da invenção:

[0014] De acordo com a presente invenção, os eritrócitos nucleados e basófilos podem ser mais claramente diferenciados a partir de outras células de sangue e podem ser contados ainda que na amostra de sangue que diminui o tempo de passagem após sua coleta, permitindo testes mais precisos e diagnósticos das doenças. Apesar da presente invenção, tornar possível contar os eritrócitos nucleados e basófilos em uma medida, pode ser que em alguns casos suficientes se tanto um eritrócito nucleado quanto o basófilo são medidos, dependendo do propósito do teste. No referido caso, a presente invenção também permite a referida medida.

Breve descrição dos desenhos

[0015] A figura 1 representa uma forma esquemática de disseminação quando uma amostra é analisada usando o reagente de análise da amostra da presente invenção;

[0016] A figura 2 representa uma forma esquemática da disseminação quando uma amostra é analisada usando o reagente de análise da amostra da presente invenção;

[0017] A figura 3 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando os reagentes de análise de amostra no Exemplo 1;

[0018] A figura 4 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 1;

[0019] A figura 5 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 2;

[0020] A figura 6 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de

amostras no Exemplo 2;

[0021] A figura 7 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 3;

[0022] A figura 8 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 3;

[0023] A figura 9 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 3;

[0024] A figura 10 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 3;

[0025] A figura 11 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 4;

[0026] A figura 12 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 4;

[0027] A figura 13 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 4;

[0028] A figura 14 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 4;

[0029] A figura 15 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 5;

[0030] A figura 16 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de

amostras no Exemplo 5;

[0031] A figura 17 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 5;

[0032] A figura 18 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 6;

[0033] A figura 19 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 6;

[0034] A figura 20 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 6;

[0035] A figura 21 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 7;

[0036] A figura 22 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 7;

[0037] A figura 23 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 8;

[0038] A figura 24 representa uma vista de um kit reagente exemplificativo da presente invenção. A figura 24A ilustra o segundo reagente; e a Figura 24B representa o primeiro reagente;

[0039] A figura 25 representa uma disseminação quando amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 9;

[0040] A figura 26 representa uma disseminação quando

amostras são analisadas usando reagentes de análise de amostras no Exemplo 9; e

[0041] As figuras 27A, 27B e 27C ilustram gráficos apresentando as correlações entre a análise de resultados de uma amostra usando reagentes de análise de amostra do Exemplo 9 e a análise de resultados da amostra usando um método convencional de análise de amostra. Na figura 27A é mostrada a correlação do número de leucócitos total; na figura 27B é mostrada a correlação da proporção de basófilos; e na figura 27C é mostrada a correlação da proporção dos eritrócitos nucleados.

#### Melhor forma de realização da invenção

[0042] Os basófilos são uma espécie de leucócitos e tem grânulos ácidos grandes que são corados com corantes básicos. Os eritrócitos nucleados também são denominados como eritroblastos normalmente e incluem proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatofilicos e eritroblastos ortocromatofilicos.

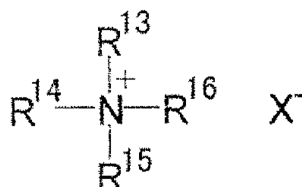
[0043] Como utilizado aqui, uma "amostra" refere-se a uma amostra de corpo-fluido tomada a partir de mamíferos, preferivelmente humanos, incluindo sangue, fluido da medula óssea, ureia, uma amostra tomada em aférese e do gênero.

[0044] Os inventores da presente invenção, em função do resultado de um estudo extensivo, descobriram que os eritrócitos nucleados e basófilos podem ser mais claramente diferenciados a partir de outros tipos de leucócitos através do uso do primeiro reagente contendo um surfactante catiônico, um surfactante não-iônico e um ácido carboxílico aromático e o segundo reagente contendo um corante fluorescente capaz de corar o ácido nucléico.

[0045] De acordo com uma concretização da presente invenção, o kit reagente para análise de amostra é o kit reagente compreendendo o primeiro reagente contendo um surfactante catiônico, um surfactante não-iônico e um ácido carboxílico aromático e o segundo reagente contendo um corante fluorescente capaz de corar o ácido nucléico. Através do tratamento da amostra com o primeiro reagente, contendo o surfactante catiônico, o surfactante não-iônico, o ácido carboxílico aromático, e os eritrócitos na amostra podem ser lisados e as membranas celulares dos leucócitos e eritrócitos nucleados podem ser danificadas na referida extensão em que o corante fluorescente pode permear as membranas. Devido a isto, os leucócitos além dos basófilos e eritrócitos nucleados são danificados na membrana celular e contraem-se ou produzem nucléolos despídos, enquanto os basófilos são menos danificados nas membranas celulares do que os leucócitos, além dos basófilos e eritrócitos nucleados. Portanto, é considerado que os basófilos contraem-se menos quando comparado aos leucócitos além dos basófilos e eritrócitos nucleados. Conseqüentemente, os basófilos podem ser diferenciados a partir dos leucócitos além dos basófilos e eritrócitos nucleados com base nas diferenças no tamanho e na forma das células. Além disso, pelo tratamento da amostra com o segundo reagente, contendo os corantes fluorescentes, capaz de corar o ácido nucléico, nos eritrócitos nucleados pode ser diferenciado a partir dos leucócitos além dos basófilos e basófilos com base nas diferenças na coloração correta com o corante fluorescente.

[0046] O surfactante catiônico pode lisar eritrócitos e danificar a membrana celular dos leucócitos e eritrócitos

nucleados. O surfactante catiônico é preferivelmente um tipo de um sal de amônio quaternário ou sal piridínico. O surfactante catiônico do sal tipo amônio quaternário é, preferivelmente, um sal de amônio quaternário tendo a fórmula geral a seguir (III):



(III)

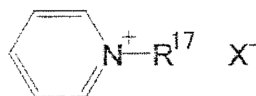
[0047] Na fórmula (III) acima,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{14}$  e  $\text{R}^{15}$  podem ser os mesmos ou diferentes, e são um átomo de hidrogênio, um grupo alquila  $\text{C}_{1-8}$  ou um grupo aralquila  $\text{C}_{6-8}$ .  $\text{R}^{16}$  é um grupo alquila  $\text{C}_{8-18}$ , um grupo alquenila  $\text{C}_{8-18}$  ou um grupo aralquila  $\text{C}_{6-18}$ .  $\text{X}^-$  é um ânion.

[0048] O grupo alquila  $\text{C}_{1-8}$  para  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{14}$  e  $\text{R}^{15}$  inclui metila, propila, butila, pentila, hexila, heptila, octila e do gênero. O grupo aralquila  $\text{C}_{6-8}$  para  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{14}$  e  $\text{R}^{15}$  inclui, benzila, fenetila e do gênero. Preferivelmente,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{14}$  e  $\text{R}^{15}$  são um grupo alquila  $\text{C}_{1-8}$  tal como metila, etila, e do gênero.

[0049] O grupo alquila  $\text{C}_{8-18}$  para  $\text{R}^{16}$  inclui octila, decila, dodecila, tetradecila e do gênero. O grupo alquenila  $\text{C}_{8-18}$  para  $\text{R}^{16}$  inclui octenila, decenila, oleila e do gênero. O grupo aralquila  $\text{C}_{6-18}$  para  $\text{R}^{16}$  inclui benzila, fenetila e do gênero. Preferivelmente,  $\text{R}^{16}$  é um grupo alquila de cadeia linear  $\text{C}_{10-18}$  tal como decila, dodecila, tetradecila e do gênero.

[0050] O ânion  $\text{X}^-$  inclui íons de halogênio tal como  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  e do gênero.

[0051] O surfactante catiônico do sal tipo piridínico é preferivelmente sal piridínico tendo a fórmula geral (IV):



(IV)

[0052] Na fórmula acima (IV),  $\text{R}^{17}$  é um grupo alquila  $\text{C}_{8-18}$ .  $\text{X}^-$  é um ânion.

[0053] O grupo alquila  $\text{C}_{8-18}$  inclui um grupo alquila de cadeia linear  $\text{C}_{10-18}$  tal como decila, dodecila, tetradecila e do gênero. O ânion  $\text{X}^-$  inclui íons halogênio tais como,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{BF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  e do gênero.

[0054] Exemplos específicos de surfactantes catiônicos incluem brometo de deciltrimetilamônio, cloreto de dodeciltrimetilamônio, brometo de octiltrimetilamônio, cloreto de octiltrimetilamônio, brometo de lauriltrimetilamônio, cloreto de lauriltrimetilamônio, brometo de miristiltrimetilamônio, cloreto de miristiltrimetilamônio, cloreto de laurilpiridínio e do gênero.

[0055] O surfactante catiônico é utilizado em uma concentração que é suficiente para lisar os eritrócitos e danificar as membranas celulares de leucócitos e eritrócitos nucleados. As referidas concentrações preferidas podem ser facilmente determinadas por, por exemplo, observando o estado das membranas celulares ou do gênero sob um microscópio óptico convencional. Especificamente, a concentração do surfactante catiônico é preferivelmente de 300 a 9000 mg/L, mais preferivelmente 400 a 8000 mg/L, e mais preferivelmente

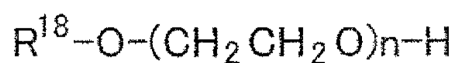
500 a 7000 mg/L. Entretanto, a concentração pode ser apropriadamente ajustado de acordo com o tipo de surfactante catiônico utilizado.

[0056] Quando a concentração do surfactante catiônico for muito baixa, a discriminação apurada entre basófilos e leucócitos além dos basófilos pode não ser possível em alguns casos. A razão para isto é considerada como sendo que os leucócitos não são suficientemente danificados quando a concentração do surfactante catiônico é muito baixa, de modo que a diferença no tamanho ou na forma entre os basófilos e leucócitos além dos basófilos é menor. Por outro lado, quando a concentração do surfactante catiônico é muito alta, a discriminação apurada entre eritrócitos nucleados e leucócitos além dos basófilos pode não ser possível em alguns casos. A razão para isto é considerada como sendo que as membranas celulares de, particularmente, eritrócitos nucleados e leucócitos além dos basófilos são excessivamente danificados quando a concentração do surfactante catiônico é muito alta, de modo que a discriminação apurada entre eritrócitos nucleados e leucócitos além dos basófilos não é possível. Consequentemente, quando a concentração está dentro da faixa acima, os eritrócitos podem ser eficientemente lisados sem danos excessivos nas membranas celulares dos leucócitos e dos eritrócitos nucleados. O poder da hemólise do surfactante catiônico depende da extensão da cadeia principal. Os surfactantes catiônicos tendo uma cadeia principal longa têm um forte poder de hemólise, provendo, assim, um efeito suficiente com uma menor quantidade comparada com aqueles tendo uma cadeia curta.

[0057] Na amostra de sangue que tiveram uma diminuição no

tempo de passagem após sua coleta, as células do sangue tal como leucócitos são responsáveis por danificar devido a sua mudança morfológica. Quando o surfactante catiônico é utilizado para a referida amostra, as membranas celulares, particularmente, eritrócitos nucleados e leucócitos além dos basófilos são excessivamente danificados, de modo que a discriminação apurada entre os eritrócitos e leucócitos além dos basófilos não seja possível em alguns casos. Em tais casos, o uso do surfactante não-iônico junto com o surfactante catiônico permite uma discriminação mais apurada entre eritrócitos nucleados e leucócitos além dos basófilos por supressão dos danos excessivos nos leucócitos e do gênero. O surfactante não-iônico é preferivelmente um éter de polioxietileno alquila, um éter de polioxietileno polioxipropileno alquila, um óleo de mamona de polioxietileno, um óleo de mamona polioxietileno hidrogenado, um esteroide polioxietileno ou um esteroide polioxietileno hidrogenado.

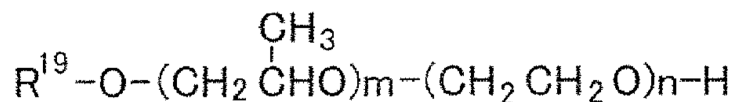
[0058] O surfactante não-iônico do tipo éter de polioxietileno alquila é, preferivelmente, um tendo a fórmula (V) a seguir:



(V)

[0059] Na fórmula acima,  $R^{18}$  é um grupo alquila  $C_{12-22}$  ou um grupo alquenila  $C_{12-22}$ .  $n$  é 10 a 30.

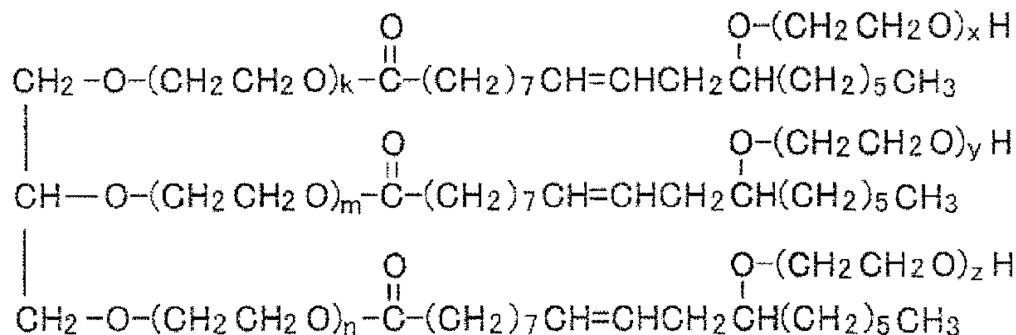
[0060] O surfactante não-iônico do tipo éter de polioxietileno polioxipropileno é, preferivelmente um tendo a fórmula (VI) a seguir:



(VI)

[0061] Na fórmula acima,  $R^{19}$  é um grupo alquila  $C_{10-30}$  ou um grupo alquenila  $C^-$ .  $m$  é 1 a 10.  $n$  é um número de 10 a 30.

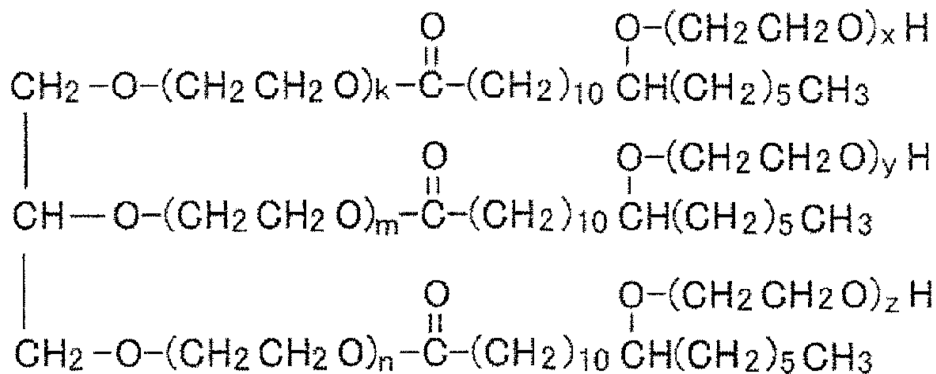
[0062] O surfactante não-iônico tipo óleo de mamona polioxietileno é preferivelmente um tendo a fórmula (VII) a seguir:



(VII)

[0063] Na fórmula acima, a soma de  $k$ ,  $n$ ,  $m$ ,  $x$ ,  $y$  e  $z$ , é 10 a 60.

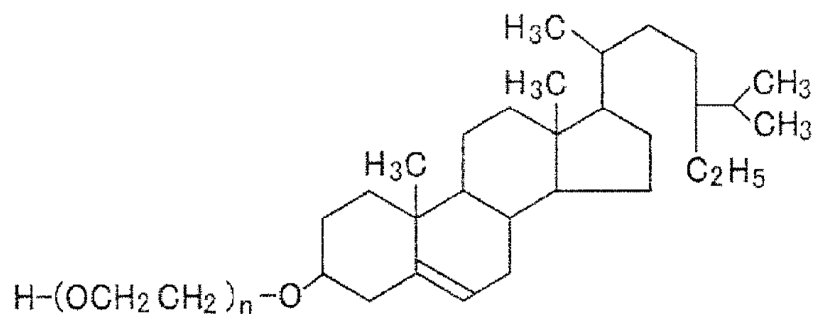
[0064] O surfactante não-iônico do tipo óleo de mamona polioxietileno hidrogenado é preferivelmente um tendo a fórmula (VIII) a seguir:



(VIII)

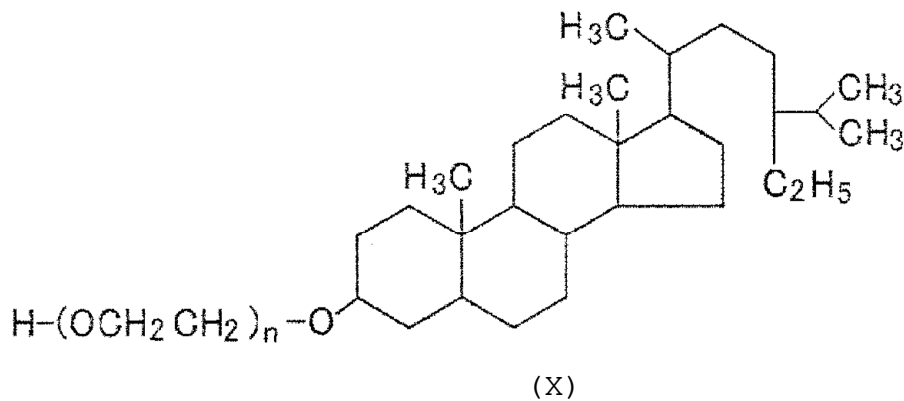
[0065] Na fórmula acima, a soma de  $k$ ,  $n$ ,  $m$ ,  $x$ ,  $y$  e  $z$ , é 10 a 60.

[0066] O surfactante não-iônico tipo eterol polioxietileno é, preferivelmente, um tendo a fórmula (IX) a seguir:

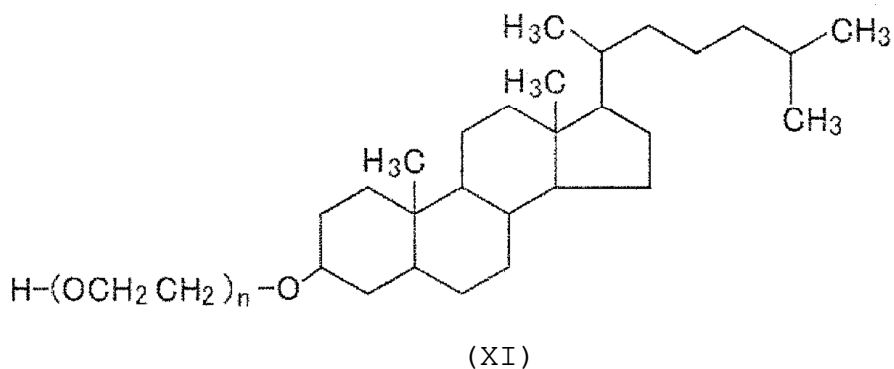


Na fórmula acima,  $n$  é 10 a 30.

[0067] O surfactante não-iônico tipo esterol polioxietileno hidrogenado é, preferivelmente, um tendo a fórmula (X) ou (XI) a seguir:



Onde  $n$  é 20 a 30.



[0068] O grupo alquila  $C_{12-22}$  inclui dodecila, hexadecila e grupos do gênero. O grupo alquenila  $C_{12-22}$  inclui oleila e grupos do gênero. Quando  $n$  na fórmula acima (V), (VI) e (IX) a (XI) é muito baixa, as membranas das células do sangue são excessivamente danificadas; e quando  $n$  é muito alto, as membranas das células do sangue não são suficientemente danificadas. Similarmente, quando a soma de  $k$ ,  $n$ ,  $m$ ,  $x$ ,  $y$  e  $z$  na fórmula acima (VII) e (VIII) é muito baixa, as membranas das células do sangue são excessivamente danificadas; e quando ela é muito alta, as membranas das células do sangue não são suficientemente danificadas.

[0069] O surfactante não-iônico especificamente inclui éter de oleila polioxietileno 16, éter polioxietileno cetila 20, éter de polioxietileno 20 polioxipropileno cetila 8, éter polioxietileno 30 polioxipropileno 6 deciltetradecila, óleo de mamona de polioxietileno 20, óleo de mamona de polioxietileno 20 hidrogenada, óleo de mamona polioxietileno 50 hidrogenado, fitostanol polioxietileno 25 e do gênero. Dentre estes, particularmente preferidos são éter de polioxietileno 16 oleila e éter de polioxietileno 20 polioxipropileno 8 cetila.

[0070] A concentração do surfactante não-iônico é preferivelmente 500 a 7000 mg/L, mais preferivelmente 800 a 6000 mg/L e, mais preferivelmente, 1000 a 5000 mg/L. Entretanto, a concentração pode ser apropriadamente ajustada de acordo com o tipo de surfactante não-iônico utilizado.

[0071] Quando a concentração de surfactante não-iônico é muito baixa, a discriminação apurada entre, particularmente, eritrócitos nucleados e outros leucócitos além dos basófilos podem não ser possível em alguns casos, devido ao dano

excessivo nas membranas celulares dos leucócitos e nos eritrócitos nucleados pelo surfactante catiônico pode não ser suprimido. Por outro lado, quando a concentração do surfactante não-iônico é muito alta, a discriminação apurada entre, particularmente, os basófilos e leucócitos além dos basófilos, pode não ser possível em alguns casos, devido ao dano pelo surfactante catiônico nas membranas celulares dos leucócitos e dos eritrócitos nucleados ser suprimido. Consequentemente, quando a concentração está dentro da faixa acima, os eritrócitos nucleados e os leucócitos além dos basófilos podem ser apuradamente diferenciados mesmo quando a amostra de sangue na qual uma diminuição de tempo passou após sua coleta.

[0072] O primeiro reagente compreende, preferivelmente, pelo menos um ácido carboxílico tendo pelo menos um anel aromático na molécula (daqui em diante relacionado como "ácido carboxílico aromático") ou um sal do mesmo. Através do uso do ácido carboxílico aromático, os eritrócitos podem efetivamente ser lisados em um tempo curto.

[0073] Quando o primeiro reagente sem o ácido carboxílico aromático for utilizado na medida, os basófilos são detectados em uma quantidade falsamente alta dependendo da amostra de sangue, em alguns casos. A razão para este valor falsamente alto não é conhecida, entretanto, ela pode ter como hipótese que as células do sangue além dos basófilos ou outros componentes nas amostras dos sangues apresentam tamanhos similares, formas ou intensidade fluorescente como os basófilos. Pelo teste das amostras do sangue com o primeiro reagente contendo o ácido carboxílico aromático, o referido fenômeno de valor falsamente alto pode ser

prevenido.

[0074] O ácido carboxílico aromático utilizado é arbitrariamente selecionado a partir dos ácidos orgânicos tendo pelo menos um anel aromático na molécula ou sais dos mesmos. O ácido carboxílico aromático preferido inclui ácido salicílico, ácido ftálico, ácido benzóico, ácido hidroxibenzóico, ácido aminobenzóico e sais dos mesmos.

[0075] A concentração do ácido carboxílico aromático ou um sal dos mesmos no primeiro reagente não é especificamente limitado enquanto o pH do primeiro reagente estiver dentro da faixa descrita acima e, preferivelmente 0,1 a 100 mM e, mais preferivelmente 0,5 a 50 mM.

[0076] Quando a concentração do ácido carboxílico aromático é muito baixa, a discriminação apurada do basófilo pode não ser possível devido ao efeito acima não ser suficientemente manifestado. Por outro lado, quando a concentração do ácido carboxílico aromático é muito alta, a discriminação apurada entre os eritrócitos nucleados e dos leucócitos além dos basófilos pode não ser possível em alguns casos. Conseqüentemente, quando a concentração estiver dentro da faixa acima, os eritrócitos nucleados e os basófilos são apuradamente diferenciados a partir de outras células do sangue.

[0077] Quando a amostra é tratada com o primeiro reagente, os eritrócitos são preferivelmente lisados, o que atrapalha a medida dos eritrócitos nucleados e dos basófilos. Geralmente, os eritrócitos são puncionados na membrana celular do mesmo em uma pressão osmótica de cerca de 150 mOsm/kg ou menor e tornar-se opticamente transparente após a ligação da hemoglobina a partir do interior de eritrócitos (hemólise).

Os eritrócitos opticamente transparentes não atrapalham substancialmente a medida usando uma citometria de fluxo. As condições com a baixa pressão osmótica e o pH baixo são, preferivelmente para lise dos eritrócitos. A pressão osmótica que satisfaz estes dois requerimentos é 20 mOsm/kg 150 mOsm/kg. Para ajuste de pressão osmótica, do primeiro reagente nesta faixa, os eritrócitos podem ser eficientemente lisados, o que atrapalha uma medida dos eritrócitos nucleados e dos basófilos.

[0078] O basófilo tem uma característica tal que eles são difíceis de serem destruídos quando comparado com outros leucócitos sob uma condição ácida. Conseqüentemente, o pH do primeiro reagente é preferivelmente de 2,0 a 4,5 mais preferivelmente, 2,0 a 3,5. Dentro desta faixa de pH, os grânulos de basófilos são estáveis. Em adição, dentro desta faixa de pH, os eritrócitos podem ser eficientemente lisados sem excessivamente afetar os leucócitos, eritrócitos nucleados e do gênero. Devido a isto, a luz disseminada e a fluorescência a partir dos eritrócitos sem núcleo podem ser baixas, de modo que os eritrócitos não afetam substancialmente a medida dos eritrócitos nucleados e dos leucócitos.

[0079] O pH do primeiro reagente pode ser ajustado com um agente de tamponamento. O agente de tamponamento preferido é um tendo um pKa dentro de  $\pm 2,0$  do pH desejado, e inclui, por exemplo, ácido málico, ácido tartárico, ácido malônico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido diglicólico e do gênero. A concentração do agente de tamponamento no primeiro reagente não é especificamente limitada tanto quanto a faixa de pH acima pode ser mantida.

[0080] Adicionalmente, é apropriado combinar o ácido carboxílico aromático e o agente de tamponamento devido ao desempenho para discriminação dos eritrócitos nucleados poder ser melhorado. A combinação do agente de tamponamento e do ácido carboxílico aromático inclui, por exemplo, ácido málico e ácido salicílico ou um sal do mesmo, ácido málico e ácido ftálico ou um sal do mesmo, ácido cítrico e ácido salicílico ou um sal do mesmo, ácido cítrico e ácido ftálico ou um sal do mesmo, ácido málico e ácido benzoico ou um sal do mesmo, ácido málico e ácido ftálico ou um sal do mesmo, e ácido benzoico ou um sal do mesmo.

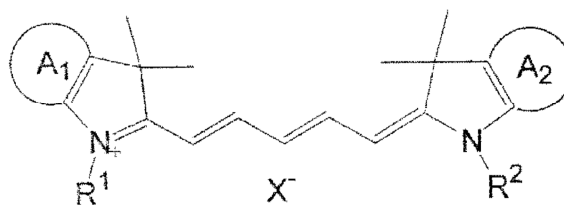
[0081] De modo a ajustar a pressão osmótica do primeiro reagente em uma faixa apropriada para a lise dos eritrócitos, um eletrólito tal como NaCl, KCl, ou um sacarídeo pode ser utilizado. A pressão osmótica pode também ser ajustada por meio da concentração do agente de tamponamento.

[0082] O primeiro reagente pode ser obtido por dissolução dos surfactantes e do ácido carboxílico aromático ou um sal do mesmo bem como do agente de tamponamento opcional em um solvente apropriado de modo que as concentrações acima possam ser obtidas e, opcionalmente ajustar pH com NaOH, HCl ou do gênero. O solvente apropriado não está tão especificamente limitado, ele pode dissolver os componentes acima, e inclui, por exemplo, água, solventes orgânicos, misturas dos mesmos e do gênero. Os solventes orgânicos incluem álcoois, etileno glicol e dimetilsulfóxidos (daqui em diante referido como "DMSO").

[0083] O segundo reagente compreende o corante fluorescente capaz de corar o ácido nucléico. Quando as células do sangue tratadas com o primeiro reagente são

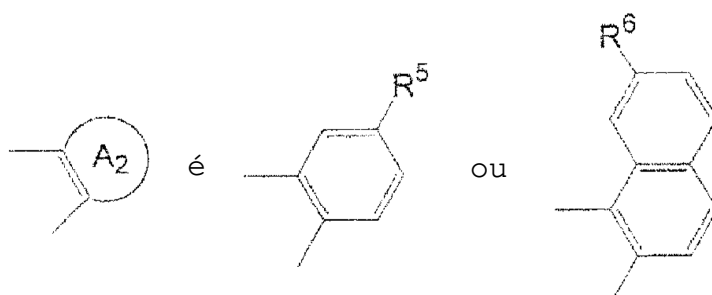
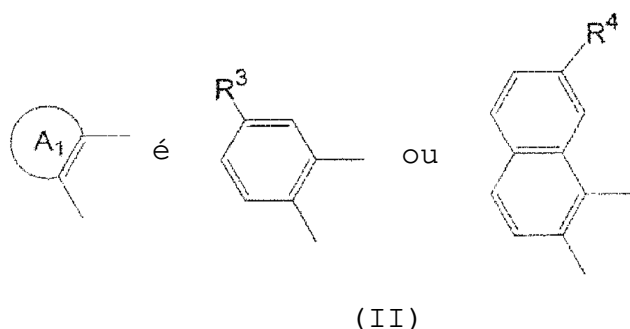
coradas com o corante fluorescente capaz de corar o ácido nucléico, os leucócitos são intensamente corados e emitem uma fluorescência intensa. Por outro lado, os eritrócitos nucleados são corados fracamente e emitem uma fluorescência fraca. Devido à diferença na tendência de ser corado com corante fluorescente, os eritrócitos nucleados podem ser diferenciados a partir dos basófilos ou leucócitos além dos basófilos. O mecanismo para a produção de diferença na intensidade de fluorescência entre leucócitos e eritrócitos nucleados não é elucidado, entretanto, ela pode ser devido à incorporação do corante dentro do núcleo celular ser inibido devido à condensação dos núcleos (DNA) dos eritrócitos nucleados.

[0084] O corante fluorescente não é especificamente limitado tanto quanto ele pode corar o ácido nucléico, e inclui um dos quais são geralmente utilizados na técnica. O corante fluorescente contido no segundo corante inclui os corantes fluorescentes da fórmula (I) e (II) a seguir:

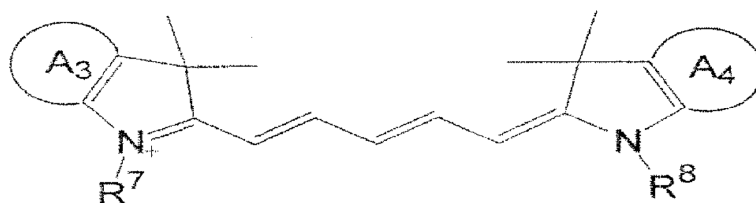


(I)

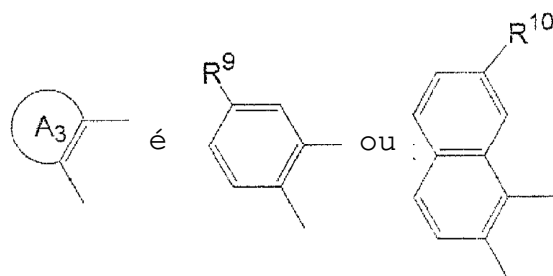
[0085] Onde R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são, o mesmo ou diferentes um do outro, um grupo alquila;

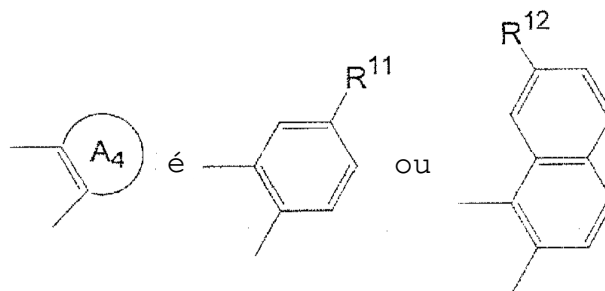


[0086]  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  e  $R^6$  são, os mesmos ou diferentes uns dos outros, um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila; e  $X^-$  é um ânion;



[0087] Onde  $R^7$  e  $R^8$  são os mesmos ou diferentes uns dos outros, um grupo alquila contendo, opcionalmente, um grupo ácido;





e R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup> são, os mesmos ou diferentes uns dos outros, um átomo de hidrogênio ou um grupo ácido provendo que um de R<sup>7</sup> a R<sup>12</sup> é/tem um grupo ácido; e que o grupo ácido que pode estar presente em R<sup>7</sup> a R<sup>12</sup> pode formar um sal, provendo que um do(s) grupo(s) ácido(s) que pode estar presente em R<sup>7</sup> a R<sup>12</sup> é um grupo obtido a partir de um próton que foi liberado.

[0088] No presente relatório, o grupo alquila na fórmula (I) e (II) acima pode ser tanto de uma cadeia linear quanto de uma cadeia ramificada. O número de átomos de carbono do grupo alquila é geralmente de 1 a 20 e, preferivelmente 1 a 10. É mais preferivelmente de 1 a 6 em vista da solubilidade aquosa do corante fluorescente. Exemplos preferidos, do grupo alquila, incluem metila, etila, propila, butila, pentila, hexila e do gênero.

[0089] X<sup>-</sup> na fórmula (I) inclui íons halogênios tais como F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> e I<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> e do gênero.

[0090] Como utilizado aqui, o grupo ácido que pode estar presente na fórmula (II) inclui tanto um grupo capaz de libertar um próton quanto um grupo capaz de liberar um próton a partir do qual o próton foi liberado. O grupo capaz de libertar um próton inclui um grupo carboxila, um grupo sulfônico, um grupo fosfórico ou um grupo do gênero e, é preferivelmente, um grupo sulfônico.

[0091] O grupo ácido pode formar um sal. O sal inclui um

sal de metal alcalino tal como um sal de sódio, de potássio ou do gênero. É preferivelmente um sal de sódio.

[0092] O corante fluorescente da fórmula (I) e (II) utilizado pode ser de uma ou mais espécies. O corante o fluorescente pode ser obtido a partir do Laboratório Hayashibara Biochemical, Inc.

[0093] A concentração do corante no reagente de análise da amostra da presente invenção pode ser apropriadamente selecionada de acordo com o tipo de corante e, geralmente é de 0,01 a 100 mg/L, preferivelmente 0,1 a 10 mg/L e mais preferivelmente 0,2 a 6,0 mg/L.

[0094] O corante fluorescente da fórmula (I) e (II) compreendido no segundo reagente cora os leucócitos intensamente porque ele tem maior afinidade em relação aos leucócitos do que para os eritrócitos nucleados. Consequentemente, com base na diferença na fluorescência emitida das células coradas com o corante fluorescente, os eritrócitos nucleados podem ser mais precisamente diferenciados a partir dos leucócitos do que dos basófilos e dos basófilos.

[0095] O segundo reagente pode ser obtido por dissolução do corante fluorescente em um solvente apropriado de modo que a concentração acima possa ser obtida. O solvente apropriado não está especificamente limitado tanto quanto ele pode dissolver o corante fluorescente, e inclui água, solventes orgânicos, a mistura dos mesmos e do gênero. Os solventes orgânicos incluem álcool, etileno glicol, DMSO e do gênero. Alguns corantes fluorescentes têm um longo período de estabilidade em soluções aquosas, e nestes casos, eles são preferivelmente dissolvidos em solventes orgânicos.

[0096] O kit reagente para análise da amostra é, preferivelmente, misturado com a amostra em uma certa quantidade que a proporção de volume do primeiro reagente: para o segundo reagente: na amostra é de 10 a 500:1 para 10:1, mais preferivelmente de 20 para 100:2 para 5:1 é obtida. Através do emprego da referida proporção para mistura do primeiro reagente, do segundo reagente e da amostra para obter uma medida da amostra, os eritrócitos são lisados facilmente e os componentes da célula do sangue são satisfatoriamente corados. A quantidade da amostra de uns poucos microlitros para 100 µl permite uma medida estável.

[0097] O método para análise da amostra de acordo com uma concretização da presente invenção compreende as etapas de:

[0098] - Lisar eritrócitos na amostra e danificar uma membrana celular das células do sangue de modo que o corante fluorescente possa permear através dela, em virtude do primeiro reagente acima, e corar as células do sangue danificadas em virtude do segundo reagente acima;

[0099] - aplicar luz às células do sangue coradas para obter a informação de luz disseminada e a informação de fluorescência; e

[0100] - classificar e contar os basófilos e/ou eritrócitos nucleados na amostra com base na informação de luz disseminada e a informação de fluorescência.

[0101] Na etapa de coragem, o primeiro reagente, o segundo reagente e a amostra são misturados. Nesta etapa, o surfactante catiônico, o surfactante não-iônico e o ácido carboxílico aromático no primeiro reagente lisam os eritrócitos na amostra e danificam as membranas celulares das células do sangue de modo que um corante fluorescente possa

permeiar através dela. Conseqüentemente, por mistura do primeiro reagente, o segundo reagente e a amostra, as células do sangue alvos podem ser coradas efetivamente com o corante fluorescente.

[0102] Na etapa de coloração, qualquer ordem pode ser empregada para a mistura do primeiro reagente, o segundo reagente e a amostra. O primeiro reagente e o segundo reagente podem ser misturados, e então esta mistura pode ser misturada com a amostra. Alternativamente, o primeiro reagente e a amostra podem ser misturados, e então esta mistura pode ser misturada com o segundo reagente. Os resultados de medidas similares podem ser obtidos em qualquer ordem.

[0103] Na etapa de coloração, a mistura do primeiro reagente, o segundo reagente e a amostra é preferivelmente reagida a 15 a 50°C, preferivelmente em 30 a 45°C durante 5 a 120 segundos, preferivelmente 5 a 30 segundos.

[0104] As células de sangue coradas na etapa de coloração podem ser analisadas por citometria de fluxo. A análise das células de sangue usando a citometria de fluxo é agora explicada. As células do sangue coradas são aplicadas com luz quando elas passam através de um fluxo de célula da citometria de fluxo, permitindo, assim, que a informação de disseminação de luz e a informação de fluorescência sejam obtidas. A informação da luz disseminada não está especificamente limitada ao quanto é mensurável a luz disseminada por citometria de fluxo comercial convencional, e inclui a largura do pulso, a intensidade e o gênero da luz disseminada tanto quanto a direção da luz disseminada (por exemplo, ângulo de recebimento da luz, de aproximadamente 0 a

20 graus), luz disseminada lateral (por exemplo, ângulo de recebimento de luz de aproximadamente 90 graus). Geralmente, a luz disseminada lateralmente reflete a informação interna de modo que os nucléolos e os grânulos das células e, a direção da luz disseminada reflete a informação do tamanho das células. No método de concretização da presente invenção, é preferível que a informação da luz disseminada inclui a intensidade da direção de luz disseminada e a intensidade da luz disseminada lateralmente.

[0105] A informação fluorescente é obtida por aplicação da luz tendo um comprimento de onda apropriado para medida da amostra e medida da fluorescência excitada. De acordo com o corante fluorescente utilizado, o recebimento apropriado do comprimento de onda pode ser selecionado. A fluorescência é emitida a partir do ácido nucléico e dos grânulos nas células nas quais são coradas com o corante fluorescente.

[0106] A fonte de luz da citometria de fluxo utilizada não está especificamente limitada, e é selecionada entre as fontes de luz que tem um comprimento de onda apropriado para excitação do corante fluorescente. Por exemplo, laser vermelho semiconductor, laser azul semiconductor, laser de argônio, laser He-Ne podem ser utilizados. Particularmente, os lasers semicondutores são acessíveis comparados aos lasers a gás e, portanto, são preferidos.

[0107] Com base nesta medida da luz disseminada e fluorescência, os eritrócitos nucleados e os basófilos possam ser diferenciados a partir de outros componentes e contados. Esta etapa compreende, preferivelmente, por exemplo, (1) obter um gráfico de disseminação tendo dois eixos da informação de fluorescência e a direção da informação da luz

disseminada; (2) obter um gráfico de disseminação tendo dois eixos da direção da informação de luz disseminada e a informação da luz disseminada lateral; e (3) analisar o respectivo gráfico de disseminação obtido com um software analítico apropriado.

[0108] No gráfico de disseminação tendo o eixo x para a intensidade de fluorescência e o eixo y para a direção da luz disseminada, como mostrado na figura 1, por exemplo, os eritrócitos nucleados, os basófilos e outros leucócitos além dos basófilos são distribuídos para formar os respectivos grupos. Nesta figura, NRBC representa o grupo de eritrócitos nucleados, BASO representa o grupo de basófilos, WBC-BASO representa o grupo de outros leucócitos além dos basófilos e WBC representa o grupo de leucócitos. No referido gráfico de disseminação, os eritrócitos nucleados parecem na região cuja intensidade de fluorescência é menor do que a dos leucócitos. Conseqüentemente, os leucócitos podem ser claramente diferenciados a partir dos eritrócitos nucleados. Adicionalmente, os basófilos aparecem na região cujo tamanho é maior, ou seja, cuja intensidade de fluorescência é maior do que dos outros leucócitos além dos basófilos. Conseqüentemente, os basófilos podem ser diferenciados a partir dos outros leucócitos além dos basófilos. Quando as amostras de sangue contendo altas quantidades de leucócitos ou amostras de sangue para as quais um período de tempo interrompido passou após sua coleta são medidas, basófilos e leucócitos outros além dos basófilos podem não ser precisamente diferenciado no gráfico de disseminação empregando intensidade de fluorescência e a direção da intensidade de luz disseminada. Nestes casos, a informação da

direção da luz disseminada e a informação da luz disseminada lateralmente podem ser utilizadas. No gráfico de disseminação tendo o eixo x para a intensidade de luz disseminada e o eixo y para a direção da intensidade de luz disseminada, como mostrado na figura 2, por exemplo, os basófilos e outros leucócitos além dos basófilos são distribuídos para formar os respectivos grupos. Nesta figura, BASO representa o grupo de basófilos e WBC-BASO representam o grupo de outros leucócitos além dos basófilos. No referido gráfico de disseminação, os basófilos aparecem na região cuja intensidade de luz disseminada lateral e a direção da intensidade disseminada são maiores do que aquelas dos outros leucócitos. Consequentemente, os basófilos podem ser diferenciados a partir de outros leucócitos. Além disso, como descrito acima, os eritrócitos nucleados podem ser diferenciados a partir de outros leucócitos de acordo com a figura 1. Portanto, as células que estão incluídas em ambas as regiões nas figuras 1 e 2 podem ser calculadas como basófilos, de modo que medidas mais precisas de basófilos possam ser realizadas.

[0109] As posições dos grupos para cada célula sanguínea aparecem no gráfico de disseminação podem ser identificadas através às amostras de tratamento contendo, respectivamente cada célula de sangue com o kit reagente da presente concretização e realização das medidas.

[0110] O número e a proporção dos eritrócitos nucleados e basófilos podem ser calculados por análise dos grupos nos gráficos de disseminação com um software analítico apropriado. Especialmente, quando um grupo de células é identificado em um gráfico de disseminação em uma posição

onde se supõem que determinadas células deveriam aparecer, o centro deste grupo é identificado. A borda deste grupo de célula pode ser identificada como uma área que está entre o centro e uma área na qual outro grupo de célula aparece e vai até uma parte na qual se relaciona a presença de determinado grupo de célula. As células aparecendo nesta área identificada podem ser contadas como determinadas células relacionadas.

[0111] Em adição, através da contagem de outros leucócitos além dos basófilos, a proporção dos basófilos para os leucócitos totais (basófilos/leucócitos totais; daqui em diante relacionados como "a proporção de basófilos") e a proporção de eritrócitos nucleados para os leucócitos totais (eritrócitos nucleados/leucócitos totais; daqui em diante relacionado como "a proporção dos eritrócitos nucleados") pode ser calculada. A proporção dos eritrócitos nucleados é geralmente representada como uma porcentagem dos eritrócitos nucleados que aparecem por 100 leucócitos, e explicado com a unidade "células/100 WBCs".

[0112] Pelo uso do kit reagente e do método para análise de amostra de acordo com a presente concretização, os grupos formados através dos eritrócitos nucleados e basófilos, respectivamente, são claramente separados a partir dos grupos formados por outras células do sangue, de modo que uma contagem mais precisa possa ser realizada.

[0113] A presente invenção é explicada ainda pelos exemplos a seguir. Entretanto, deve ser reconhecido que várias alterações e modificações podem ser efetuadas na presente invenção e o escopo da mesma não está limitado aos exemplos que se segue.

[0114] Exemplos:

[0115] Os surfactantes catiônicos utilizados nos exemplos a seguir brometo de deciltrimetilamônio (DTAB) e cloreto de dodeciltrimetilamônio (LTAC).

[0116] Os surfactantes não-iônicos, utilizados nos exemplos a seguir, são como segue:

[0117] Éter de polioxietileno 16 oleila (nome do produto: NIKKOL BO-16);

[0118] Éter de polioxietileno 20 cetila (nome do produto: NIKKOL BC-20TX);

[0119] Éter de polioxietileno 20 polioxipropileno 8 cetila (nome do produto: NIKKOL PBC-44);

[0120] Éter de polioxietileno 30 polioxipropileno 6 deciltetradecil (nome do produto: NIKKOL PEN-4630);

[0121] Óleo de amônia de polioxietileno 20 (nome do produto: NIKKOL CO-20TX);

[0122] Óleo de amônia de polioxietileno 20 hidrogenados (nome do produto: NIKKOL HCO-20);

[0123] Óleo de amônia de polioxietileno 50 hidrogenados (nome do produto: NIKKOL HCO-50);

[0124] Fitostanol de polioxietileno 25 (nome do produto: NIKKOL BPSH-25).

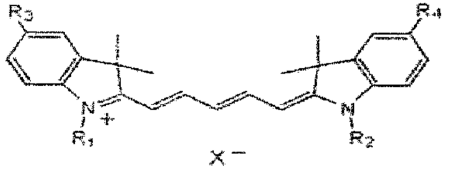
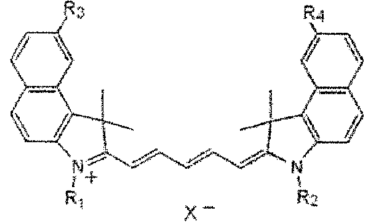
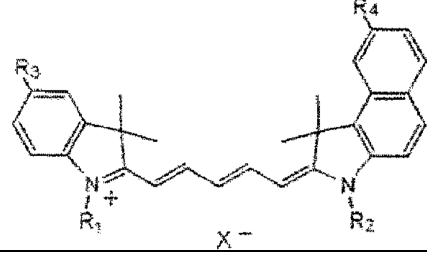
[0125] Todos os exemplos acima podem ser obtidos da Nikko Chemicals Co., Ltd.

[0126] Os ácidos carboxílicos aromáticos utilizados nos exemplos a seguir são ácido salicílico, ácido ftálico, ácido benzóico, ácido hidroxibenzóico e ácido aminobenzóico.

[0127] Os corantes fluorescentes utilizados nos exemplos a seguir são NK-529, NK-2670, NK-3750, NK-3383, NK-1840, NK-9003, NK-2929, NK-3375, NK-5056, NK-3266 e NK-3620. Todos

estes podem ser obtidos no Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.. As fórmulas químicas destes corantes são apresentadas na tabela 1.

TABELA 1

Fórmula Geral	Nome do corante	Estrutura				
		R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	X
	NK-529	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	I <sup>-</sup>
	NK-2670	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
	NK-3750	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>
	NK-2383	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	H	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
	NK-1840	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na	H	H	-
	NK-9001	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na	H	H	-
	NK-9003	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	SO <sub>3</sub> Na	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-
	NK2929	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N(H)(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>	H	H	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
	NK3375	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	I <sup>-</sup>
	NK-5056	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>		H	H	-
	NK-3266	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
	NK-3620	CH <sub>3</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	H	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>

Exemplo comparativo 1:

[0128] Neste exemplo comparativo, as amostras de sangue que cerca de 8 horas passadas após sua coleta foram analisadas através do uso de um método convencional.

[0129] As amostras de sangue tomadas respectivamente a partir de três indivíduos foram medidas em um contador automático de célula de sangue XE-2100 (Sysmex Corporation: equipado com laser vermelho semiconductor (633 nm)) para contar o número de leucócitos total e o número de basófilos. Com base nestes resultados de contagem, a proporção de basófilos foi calculada. O "Stromatolyser-FBII" (Sysmex Corporation) foi utilizado como reagente. A amostra de sangue, após cerca de 8 horas de sua coleta foi medida.

[0130] Como resultado, foi confirmado que o conteúdo de basófilo nestas amostras foi acima do valor normal (daqui em diante estas amostras são referidas como amostras BASO 1, 2, e 3, respectivamente). A proporção de basófilos nas amostras BASO 1, 2 e 3 foram 0,8%, 3,4% e 1,6%, respectivamente. Estes resultados foram utilizados como referências para os exemplos 1 e 2.

[0131] Os eritrócitos nucleados, contidos nas amostras de sangue, foram tomados de três indivíduos diferentes dos indivíduos acima descritos medidos com o contador de célula de sangue automático XE-2100 para contar o número de leucócitos totais e o número de eritrócitos nucleados. Com base nos resultados de contagem, a proporção dos eritrócitos nucleados foi calculada. O "Stromatolyser-NR" (Sysmex Corporation) foi utilizado como reagente. As amostras de sangue para o qual cerca de 8 horas passados após sua coleta elas foram medidas.

[0132] Como resultado, foi confirmado que os eritrócitos nucleados estavam presentes nestas amostras (daqui em diante estas amostras são referidas como amostras NRBC 1, 2 e 3, respectivamente). A proporção de eritrócitos nucleados nas amostras NRBC 1, 2, e 3 foram 4,4 células/100 WBCs, 1,9 células/100 WBCs e 1,3 células/100 WBCs, respectivamente. Estes resultados foram utilizados como referência para os exemplos 1 e 2.

Exemplo 1:

[0133] Neste exemplo, o primeiro e o segundo reagentes tendo as composições a seguir foram preparados e as amostras de sangue para a qual cerca de 8 horas passaram após sua coleta foram medidas com estes reagentes.

[0134] O pH do primeiro reagente é 3,0.

Primeiro reagente A:

[0135] É uma solução aquosa contendo 0,5 mM de salicilato de sódio, 10 mM de ácido DL-málico, 2000 ppm de LTAC, e 1000 ppm de BO-16.

Primeiro reagente B:

[0136] É uma solução aquosa contendo 0,5 mM de salicilato de sódio, 10 mM de ácido DL-málico, 1500 ppm de LTAC, e 1000 ppm de PBC-44.

Primeiro reagente C:

[0137] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 2000 ppm de LTAC, e 1000 ppm de BO-16.

Primeiro reagente D:

[0138] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1500 ppm de LTAC, e 1000 ppm de PBC-44.

Primeiro reagente E:

[0139] É uma solução aquosa contendo 0,5 mM de ftalato de

hidrogênio potássio, 10 mM de ácido DL-málico, 2000 ppm de LTAC, e 1000 ppm de BO-16.

Primeiro reagente F:

[0140] É a solução aquosa contendo 2 mM de ftalato de hidrogênio potássio, 10 mM de ácido DL-málico, 1500 ppm de LTAC, e 1000 ppm de BO-16.

Segundo reagente:

[0141] É um no qual 15 mg de NK-3383 foram dissolvidas em 100 mL de etileno glicol

[0142] O primeiro reagente (1 mL), 20 µL do segundo reagente e 20 µL da amostra de sangue (amostra BASO 1, 2 ou 3 ou amostra NRBC 1, 2 ou 3) foram misturadas completamente, e assim a mistura obtida foi deixada para reagir a 40°C durante 10 segundos para obter a medida da amostra. A amostra medida foi introduzida em uma parte de detecção da citometria de fluxo tendo uma fonte de excitação de luz com 633 nm, e uma excitação de luz foi aplicada às células na amostra em medição. O sinal de luz disseminada e o sinal de fluorescência, emitidos das células foram detectados e analisados para medir basófilos, eritrócitos nucleados e leucócitos totais na amostra em medição. Esta medida foi realizada com um contador automático de células de sangue XE-2100.

[0143] As amostras BASO 1 e 2 e as amostras NRBC 1 e 2 que passaram cerca de 8 horas após sua colheita foram examinadas.

[0144] Um primeiro gráfico de disseminação tendo dois eixos da direção da intensidade de luz disseminada e da intensidade de fluorescência e um segundo gráfico de disseminação tendo dois eixos da direção da intensidade de luz disseminada e a intensidade de luz disseminada lateral

foi obtida para a medida da amostra. A figura 3 mostra o segundo gráfico de disseminação obtido nas medidas das amostras BASO 1 e 2 cerca de 8 horas após sua coleta, e a figura 4 mostra o primeiro gráfico de disseminação obtido da medida das amostras NRBC 1 e 2, cerca de 8 horas após sua coleta.

[0145] Com base nestes gráficos de disseminação, os leucócitos totais, basófilos e eritrócitos nucleados foram contados e a proporção de basófilos e a proporção de eritrócitos nucleados foram calculadas. A tabela 2 mostra as proporções de basófilos das amostras BASO 1 e 2 cerca de 8 horas após sua coleta, as quais foram calculadas no exemplo comparativo 1 e no presente exemplo. A tabela 3 mostra as proporções dos eritrócitos nucleados das amostras NRBC 1 e 2 cerca de 8 horas após sua coleta, as quais foram calculadas no exemplo comparativo 1 e no presente exemplo 1.

TABELA 2

Amostras utilizadas	Exemplo		Proporção de basófilos no exemplo comparativo (%)
	Reagentes utilizados	Proporção de basófilos (%)	
Amostra BASO 1 (8 horas após a coleta do sangue)	Primeiro reagente A e segundo reagente	1,1	0,8
	Primeiro reagente B e segundo reagente	1,1	
	Primeiro reagente C e segundo reagente	1,2	
	Primeiro reagente D e segundo reagente	1,1	
	Primeiro reagente E e segundo reagente	1,2	
	Primeiro reagente F e segundo reagente	1,2	
Amostra BASO 2 (8 horas após a coleta do sangue)	Primeiro reagente A e segundo reagente	3,5	3,4
	Primeiro reagente B e segundo reagente	3,8	
	Primeiro reagente C e segundo reagente	3,5	
	Primeiro reagente D e segundo reagente	3,6	
	Primeiro reagente E e segundo reagente	3,7	
	Primeiro reagente F e segundo reagente	3,7	

TABELA 3

Amostras utilizadas	Exemplo		Proporção de eritrócitos nucleados no exemplo comparativo (células/100 WBCs)
	Reagentes utilizados	Proporção de Eritrócitos nucleados (células/100 WBCs)	
Amostra NRBC 1 (8 horas após a coleta do sangue)	Primeiro reagente A e segundo reagente	1,1	4,4
	Primeiro reagente B e segundo reagente	1,1	
	Primeiro reagente C e segundo reagente	1,2	
	Primeiro reagente D e segundo reagente	1,1	
	Primeiro reagente E e segundo reagente	1,2	
	Primeiro reagente F e segundo reagente	1,2	
Amostra NRBC 2 (8 horas após a coleta do sangue)	Primeiro reagente A e segundo reagente	3,5	1,9
	Primeiro reagente B e segundo reagente	3,8	
	Primeiro reagente C e segundo reagente	3,5	
	Primeiro reagente D e segundo reagente	3,6	
	Primeiro reagente E e segundo reagente	3,7	
	Primeiro reagente F e segundo reagente	3,7	

[0146] A figura 3 mostra que os basófilos são claramente

diferenciados a partir dos outros leucócitos além dos basófilos quando os reagentes de análise de amostra de acordo com a presente concretização foram utilizados. A figura 4 mostra que os eritrócitos nucleados são claramente diferenciados a partir dos basófilos e de outros leucócitos além dos basófilos quando o reagente de análise de amostra, de acordo com a presente invenção foi utilizado. Assim, devido aos basófilos e eritrócitos nucleados serem claramente diferenciados, respectivamente, o número e a proporção dos mesmos para os leucócitos totais foram precisamente obtidos por identificação das células que aparecem em determinadas áreas dos gráficos de disseminação como mostrado nas figuras 3 e 4, como os basófilos e eritrócitos nucleados.

[0147] As tabelas 2 e 3 mostram que as proporções calculadas no exemplo 1 foram análogos próximos às proporções calculadas no exemplo comparativo 1. Portanto, foi confirmado que os eritrócitos nucleados e os basófilos podem ser medidos com os reagentes de análise de amostra do presente exemplo tão precisamente quanto o caso quando outros reagentes foram utilizados para a medida.

Exemplo 2:

[0148] Neste exemplo, o primeiro e o segundo reagente do Exemplo 1 foram utilizados para mediar às amostras de sangue cerca de 50 horas após ter sido feita a coleta. O método para medir foi o mesmo que o do exemplo 1 exceto pelas amostras de sangue utilizadas. As amostras BASO 2 e 3 e as amostras NRBC 2 ou 3 as quais passaram cerca de 50 horas após sua coleta, para ser medida neste exemplo.

[0149] Dentre os primeiros reagentes A - F no exemplo 1, os primeiros reagentes A, B, E, e F foram utilizados para

medida da amostra BASO 2 e amostra NRBC 12, e os primeiros reagentes C e D foram utilizados para a medida da amostra BASO 3 e da amostra NRBC 3.

[0150] Similar ao exemplo 1, um primeiro gráfico de disseminação tendo dois eixos da direção da intensidade de luz disseminada e a intensidade de fluorescência e um segundo gráfico de disseminação tendo dois eixos da direção da intensidade de luz disseminada e da intensidade de luz disseminada lateralmente foram obtidos para a medida da amostra. A figura 5 mostra os primeiros e os segundos gráficos de disseminação obtidos através da medida das amostras BASO 2 que passaram cerca de 50 horas após sua coleta, e o primeiro gráfico de disseminação obtido através da medida das amostras NRBC 2 que passaram cerca de 50 horas após sua coleta. A figura 6 mostra o primeiro e o segundo gráfico de disseminação obtido através da medida das amostras BASO 3 que passaram cerca de 50 horas após sua coleta, e o primeiro gráfico de disseminação obtido através da medida da amostra NRBC 3 que passou cerca de 50 horas após sua coleta.

[0151] Com base nestes gráficos de disseminação, os leucócitos totais, os basófilos e os eritrócitos nucleados foram contados e a proporção de basófilos e de eritrócitos nucleados foi calculada. A tabela 4 mostra as proporções de basófilos da amostra BASO 2 e 3 que passaram cerca de 50 horas após sua coleta, os quais foram calculados neste exemplo.

[0152] A tabela 4 representa as respectivas proporções de basófilos calculados de acordo com o primeiro gráfico de disseminação (a direção da intensidade de luz disseminada e a intensidade da fluorescência) e o segundo gráfico de

disseminação (a direção da intensidade de luz disseminada e a intensidade de luz disseminada lateralmente). A tabela 5 mostra as proporções dos eritrócitos nucleados das amostras NRBC 2 e 3 que passaram cerca de 50 horas após sua coleta, que foram calculadas neste exemplo.

TABELA 4

Amostras utilizadas	Reagentes utilizados	Proporção de basófilos (%)	
		Direção da intensidade de luz disseminada/intensidade de luz disseminada lateral	Direção da intensidade de luz disseminada/intensidade de fluorescência lateral
Amostra BASO 2 (50 horas após a coleta de sangue)	Primeiro reagente A e segundo reagente	3,6	3,3
	Primeiro reagente B e segundo reagente	3,6	3,6
	Primeiro reagente E e segundo reagente	3,6	3,5
	Primeiro reagente F e segundo reagente	3,4	3,4
Amostra BASO 3 (50 horas após a coleta de sangue)	Primeiro reagente C e segundo reagente	1,6	1,6
	Primeiro reagente D e segundo reagente	1,8	1,9

TABELA 5

Amostras utilizadas	Reagentes utilizados	Proporção de eritrócitos nucleados (células/100 WBCs)
Amostra NRBC 2 (50 horas após a coleta do sangue)	Primeiro reagente A e segundo reagente	1,9
	Primeiro reagente B e segundo reagente	1,8
	Primeiro reagente E e segundo reagente	1,8
	Primeiro reagente F e segundo reagente	1,8
Amostra NRBC 3 (50 horas após a coleta de sangue)	Primeiro reagente C e segundo reagente	1,1
	Primeiro reagente D e segundo reagente	1,2

As figuras 5 e 6 mostram que basófilos nas amostras colhidas após cerca de 50 horas sejam claramente discriminadas a partir de outros leucócitos além dos basófilos quando o reagente da análise da amostra de acordo com este exemplo foi utilizado. Adicionalmente, ele mostra que eritrócitos nucleados nas amostras que foram colhidas cerca de 50 horas depois, são claramente diferenciados a partir dos basófilos e leucócitos outros além dos basófilos, quando amostras do reagente de análise, de acordo com a presente configuração são utilizadas. Assim, uma vez que os basófilos e eritrócitos nucleados são claramente diferenciados respectivamente, mesmo nas amostras para a qual um intervalo de tempo se passou após sua coleta, o número e a proporção do mesmo para o total de leucócitos foram precisamente obtidos por identificação das células que aparecem em determinada área nos gráficos de dissipação, como mostrado nas figuras 5 e 6 para os basófilos e eritrócitos nucleados.

[0153] Quando as medidas foram realizadas pelo método do exemplo comparativo 1, as proporções de basófilos das

amostras BASO 2 e 3, 8 horas após sua coleta foram de 3,4% e 1,6%, respectivamente. As proporções de eritrócitos nucleados das amostras NRBC 2 e 3, oito horas após sua coleta foram de 1,9 e 1,3 células/100 WBCs, respectivamente. Com base nestes resultados no exemplo comparativo 1 e nas tabelas 4 e 5, as proporções calculadas no exemplo 2 foram análogos próximos às proporções calculadas no Exemplo Comparativo 1. Portanto, foi confirmado que os eritrócitos nucleados e os basófilos podem ser medidos, mesmo nas amostras de sangue para as quais um intervalo de tempo se passou após sua coleta, com os reagentes de amostra do presente Exemplo, tão precisamente quanto no caso quando outro reagente for utilizado para a medida.

[0154] Adicionalmente, de acordo com os resultados da amostra BASO nas tabelas 2 e 4, a proporção de basófilo calculada para a amostra, 50 horas após sua coleta teve um análogo próximo à proporção dos basófilos calculados para a amostra, 8 horas após sua coleta. De acordo com os resultados da amostra NRBC 2 nas Tabelas 3 e 5, a proporção de eritrócitos nucleados calculados para a amostra, 50 horas após sua coleta foi um análogo próximo ao da proporção de eritrócitos nucleados calculada para a amostra, 8 horas após sua coleta.

[0155] Consequentemente, foi confirmado que medidas altamente precisas podem ser realizadas com o uso de um reagente de análise de amostra para qual um intervalo de tempo transcorreu após sua coleta.

### Exemplo 3

[0156] Neste exemplo, combinações de surfactante catiônico, DTAB, e vários surfactantes não-iônicos foram

estudados. O primeiro e o segundo reagentes foram preparados tendo as composições a seguir. O pH do primeiro reagente é 3,0.

Primeiro reagente A:

[0157] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 3000 ppm de BO-16 e 3000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente B:

[0158] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de BO-16 e 7000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente C:

[0159] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 3000 ppm de PBC-44 e 5000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente D:

[0160] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de PBC-44 e 7000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente E:

[0161] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 2000 ppm de BC-20TX e 3000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente F:

[0162] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 2000 ppm de BC-20TX e 5000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente G:

[0163] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 3000 ppm de BPSH-25 e 7000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente H:

[0164] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de BPSH-25 e 7000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente I:

[0165] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 5000 ppm de HCO-50 e 5000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente J:

[0166] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de HCO-50 e 7000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente K:

[0167] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 3000 ppm de HCO-20 e 5000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente L:

[0168] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de HCO-20 e 7000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente M:

[0169] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 3000 ppm de CO-20-TX e 5000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente N:

[0170] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de CO-20TX e 7000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente O:

[0171] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 3000 ppm de PEN-4630 e 5000 ppm de DTAB.

Primeiro reagente P:

[0172] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 5000 ppm de PEN-4630 e 7000 ppm de DTAB.

Segundo reagente:

[0173] Etileno glicol contendo 300 ppm de NK-3383.

[0174] O primeiro reagente (1 mL), 20 µL do segundo reagente e 20 µl da amostra de sangue para a qual a presença de BASO ou NRBC foi confirmada (amostra BASO 4 ou amostra NRBC 4) foram misturadas perfeitamente, e assim, a mistura obtida foi deixada para reagir a 41°C durante 10 segundos para obter a medida da amostra. Similar ao exemplo 1, os basófilos, eritrócitos nucleados e leucócitos totais na

amostra medida foram medidos usando o contador automático de células de sangue XE-2100. Foram examinadas, amostras de sangue, 8 horas após sua coleta.

[0175] Para a medida da amostra preparada a partir da amostra BASO 4, um primeiro gráfico de disseminação tendo dois eixos de sequência de intensidade de luz disseminada e intensidade de fluorescência e um segundo gráfico de disseminação tendo dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e intensidade de luz disseminada lateral, foram obtidos. Para a medida da amostra preparada a partir da amostra NRBC 4, um gráfico de disseminação tendo dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e da intensidade de fluorescência foi obtido. As figuras 7 a 10 demonstram os respectivos gráficos de disseminação.

[0176] As figuras 7 a 10 mostram que os basófilos são claramente diferenciados dos outros leucócitos além dos basófilos quando os reagentes de análise de amostra são utilizados, nos quais DTAB e surfactante não-iônico são combinados. Adicionalmente, é demonstrado que os eritrócitos nucleados são claramente diferenciados dos basófilos e de outros leucócitos além dos basófilos quando os reagentes de análise de amostra são utilizados, nos quais DTAB e o surfactante não-iônico são combinados.

[0177] Foi também demonstrado que os basófilos contidos na amostra BASO 4 utilizados neste Exemplo foram claramente diferenciados a partir de outros leucócitos além dos basófilos tanto no primeiro quanto no segundo gráfico de disseminação, que tem dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e da intensidade de luz disseminada lateralmente, e dois eixos da intensidade de luz disseminada

e da intensidade de fluorescência, respectivamente.

[0178] Assim, devido aos basófilos e eritrócitos nucleados serem facilmente diferenciados, respectivamente, o número e a proporção dos mesmos para o total de leucócitos pode ser precisamente obtido através da identificação das células que aparecem em determinadas áreas dos gráficos de disseminação, como mostrado nas figuras 7 a 10, como basófilos e eritrócitos nucleados.

#### Exemplo 4

[0179] Neste exemplo, combinações de surfactante catiônico, LTAC, e vários surfactantes não-iônicos foram estudados. O primeiro e o segundo reagentes foram preparados tendo as composições a seguir. O pH do primeiro reagente é 3,0.

Primeiro reagente A:

[0180] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1000 ppm de BO-16 e 1000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente B:

[0181] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 5000 ppm de BO-16 e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente C:

[0182] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1000 ppm de PBC-44 e 1000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente D:

[0183] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 5000 ppm de PBC-44 e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente E:

[0184] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1000 ppm de BC-20TX e 1000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente F:

[0185] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 5000 ppm de BC-20TX e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente G:

[0186] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1000 ppm de BPSH-25 e 1500 ppm de LTAC.

Primeiro reagente H:

[0187] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 5000 ppm de BPSH-25 e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente I:

[0188] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1000 ppm de HCO-50 e 1000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente J:

[0189] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de HCO-50 e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente K:

[0190] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1000 ppm de HCO-20 e 1000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente L:

[0191] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 7000 ppm de HCO-20 e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente M:

[0192] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 1000 ppm de PEN-4630 e 1000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente N:

[0193] Solução aquosa contendo 10 mM de salicilato de sódio, 5000 ppm de PEN-4630 e 1800 ppm de LTAC.

Segundo reagente:

[0194] Etileno glicol contendo 300 ppm de NK-3383.

[0195] O primeiro reagente (1 mL), 20 µL do segundo reagente e 20 µl da amostra de sangue para a qual a presença

de BASO ou NRBC foi confirmada (amostra BASO 5 ou amostra NRBC 5) foram misturadas perfeitamente, e assim, a mistura obtida foi deixada para reagir a 41°C durante 10 segundos para obter a medida da amostra. Similar ao exemplo 1, os basófilos, eritrócitos nucleados e leucócitos totais na amostra medida foram medidos usando o contador automático de células de sangue XE-2100. Foram examinadas, amostras de sangue, 8 horas após sua coleta.

[0196] Para a medida da amostra preparada a partir da amostra BASO 5, um primeiro gráfico de disseminação tendo dois eixos de sequência de intensidade de luz disseminada e intensidade de fluorescência e um segundo gráfico de disseminação tendo dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e intensidade de luz disseminada lateral, foram obtidos. Para a medida da amostra preparada a partir da amostra NRBC 5, um gráfico de disseminação tendo dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e da intensidade de fluorescência foi obtido. As figuras 11 a 14 demonstram os respectivos gráficos de disseminação.

[0197] As figuras 11 a 14 mostram que os basófilos são claramente diferenciados dos outros leucócitos além dos basófilos quando os reagentes de análise de amostra são utilizados, nos quais LTAC e surfactante não-iônico são combinados. Adicionalmente, é demonstrado que os eritrócitos nucleados são claramente diferenciados dos basófilos e de outros leucócitos além dos basófilos quando os reagentes de análise de amostra são utilizados, nos quais LTAC e o surfactante não-iônico são combinados.

[0198] Foi também demonstrado que os basófilos contidos na amostra BASO 5 utilizados neste Exemplo foram claramente

diferenciados a partir de outros leucócitos além dos basófilos tanto no primeiro quanto no segundo gráfico de disseminação, que tem dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e da intensidade de luz disseminada lateralmente, e dois eixos da intensidade de luz disseminada e da intensidade de fluorescência, respectivamente.

[0199] Assim, devido aos basófilos e eritrócitos nucleados serem facilmente diferenciados, respectivamente, o número e a proporção dos mesmos para o total de leucócitos pode ser precisamente obtido através da identificação das células que aparecem em determinadas áreas dos gráficos de disseminação, como mostrado nas figuras 11 a 14, como basófilos e eritrócitos nucleados.

[0200] Os exemplos 3 e 4 demonstram que os eritrócitos nucleados e os basófilos nas amostras de sangue podem ser claramente diferenciados dos outros leucócitos e contados através do uso de reagentes de análise de amostras, nos quais os surfactantes catiônicos e surfactantes não-iônicos são combinados.

#### Exemplo 5

[0201] Neste exemplo, combinações de ácidos carboxílicos aromáticos e agentes tampão foram estudadas. O primeiro e o segundo reagentes tendo as composições a seguir foram preparados. O pH do primeiro reagente é 3,0.

Primeiro reagente A:

[0202] Solução contendo 5 mM de hidrogênio ftalato de potássio, 0 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente B:

[0203] Solução contendo 5 mM de hidrogênio ftalato de

potássio, 5 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente C:

[0204] Solução contendo 1 mM de hidrogênio ftalato de potássio, 9 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente D:

[0205] Solução contendo 0,3 mM de hidrogênio ftalato de potássio, 9,7 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente E:

[0206] Solução contendo 5 mM de salicilato de sódio, 5 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44, e 1500 ppm de LTAC.

Primeiro reagente F:

[0207] Solução contendo 1 mM de salicilato de sódio, 9 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44, e 1500 ppm de LTAC.

Primeiro reagente G:

[0208] Solução contendo 0,22 mM de salicilato de sódio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44, e 1500 ppm de LTAC.

Primeiro reagente H:

[0209] Solução contendo 5 mM de salicilato de sódio, 5 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente I:

[0210] Solução contendo 1 mM de salicilato de sódio, 9 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, e 2000 ppm de LTAC.

Primeiro reagente J:

[0211] Solução contendo 0,24 mM de salicilato de sódio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, e 2000 ppm de LTAC.

Segundo reagente:

[0212] Etileno glicol contendo 300 ppm de NK-3383.

[0213] O primeiro reagente (1 mL), 20 µL do segundo reagente e 20 µl da amostra de sangue para a qual a presença de BASO ou NRBC foi confirmada (amostra BASO 5 ou amostra NRBC 5) foram misturadas perfeitamente, e assim, a mistura obtida foi deixada para reagir a 41°C durante 10 segundos para obter a medida da amostra. Similar ao exemplo 1, os basófilos, eritrócitos nucleados e leucócitos totais na amostra medida foram medidos usando o contador automático de células de sangue XE-2100. Foram examinadas, amostras de sangue, 8 horas após sua coleta.

[0214] Para a medida da amostra preparada a partir da amostra BASO 5, um primeiro gráfico de disseminação tendo dois eixos de sequência de intensidade de luz disseminada e intensidade de fluorescência e um segundo gráfico de disseminação tendo dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e intensidade de luz disseminada lateral, foram obtidos. Para a medida da amostra preparada a partir da amostra NRBC 5, um gráfico de disseminação tendo dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e da intensidade de fluorescência foi obtido. As figuras 11 a 14 demonstram os respectivos gráficos de disseminação.

[0215] As figuras 11 a 14 mostram que os basófilos são claramente diferenciados dos outros leucócitos além dos basófilos quando os reagentes de análise de amostra são utilizados, nos quais LTAC e surfactante não-iônico são combinados. Adicionalmente, é demonstrado que os eritrócitos nucleados são claramente diferenciados dos basófilos e de outros leucócitos além dos basófilos quando os reagentes de análise de amostra são utilizados, nos quais LTAC e o

surfactante não-iônico são combinados.

[0216] Foi também demonstrado que os basófilos contidos na amostra BASO 5 utilizados neste Exemplo foram claramente diferenciados a partir de outros leucócitos além dos basófilos tanto no primeiro quanto no segundo gráfico de disseminação, que tem dois eixos da sequência de intensidade de luz disseminada e da intensidade de luz disseminada lateralmente, e dois eixos da intensidade de luz disseminada e da intensidade de fluorescência, respectivamente.

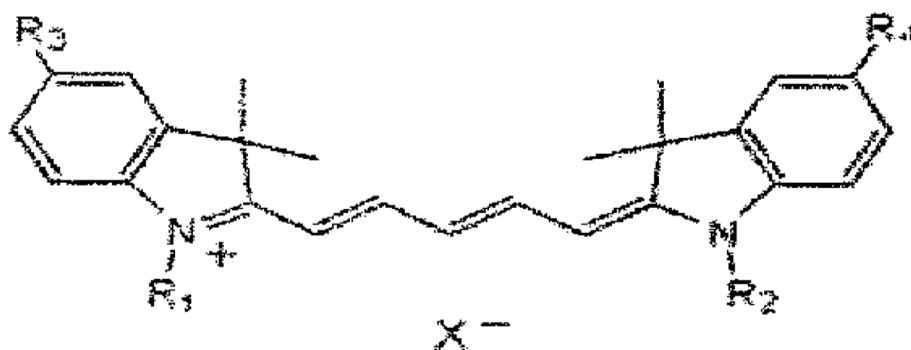
[0217] Assim, devido aos basófilos e eritrócitos nucleados serem facilmente diferenciados, respectivamente, o número e a proporção dos mesmos para o total de leucócitos pode ser precisamente obtido através da identificação das células que aparecem em determinadas áreas dos gráficos de disseminação, como mostrado nas figuras 11 a 14, como basófilos e eritrócitos nucleados.

[0218] Os exemplos 3 e 4 demonstram que os eritrócitos nucleados e os basófilos nas amostras de sangue podem ser claramente diferenciados dos outros leucócitos e contados através do uso de reagentes de análise de amostras, nos quais os surfactantes catiônicos e surfactantes não-iônicos são combinados.

REIVINDICAÇÕES

1. Kit reagente para analisar de uma amostra, para medir basófilos ou eritrócitos nucleados na amostra, caracterizado pelo fato de compreender:

- um primeiro reagente contendo um surfactante catiônico sendo selecionado dentre brometo de deciltrimetilamônio (DTAB) e cloreto de dodeciltrimetilamônio (LTAC), um surfactante não-iônico selecionado dentre éter de oleila polioxietileno 16, éter polioxietileno cetila 20, éter de polioxietileno 20 polioxipropileno cetila 8, éter polioxietileno 30 polioxipropileno 6 deciltetradecila, óleo de mamona de polioxietileno 20, óleo de mamona de polioxietileno 20 hidrogenada, óleo de mamona polioxietileno 50 hidrogenado, fitostanol polioxietileno 25 e um ácido carboxílico aromático selecionado dentre ácido salicílico, ácido ftálico, ácido benzoico, ácido hidroxibenzóico, ácido aminobenzóico, que pode lisar os eritrócitos e danificar a membrana celular dos leucócitos, de modo que um corante fluorescente possa permear através dela, e
- um segundo reagente contendo um corante fluorescente capaz de corar o ácido nucléico, onde o referido corante fluorescente é pelo menos um corante selecionado a partir do grupo consistindo de um corante florescente tendo as fórmulas gerais:



onde:

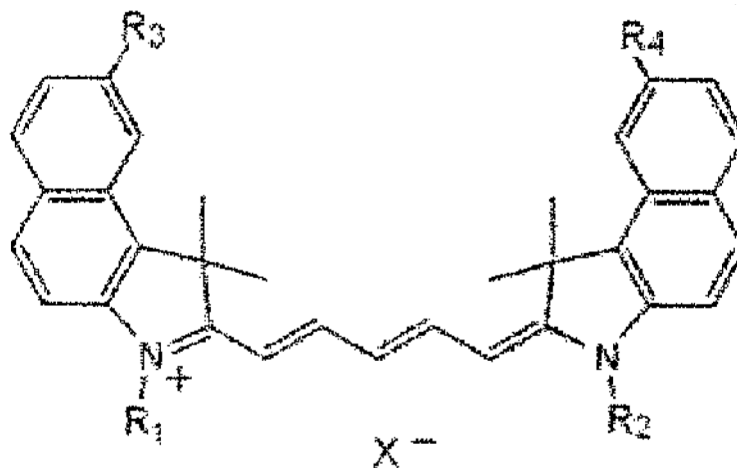
$R^1$  é  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9$  ou  $(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ ;

$R^2$  é  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9$  ou  $(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$ ;

$R^3$  é  $\text{H}$  ou  $\text{SO}_3\text{Na}$ ;

$R^4$  é  $\text{H}$  ou  $\text{SO}_3^-$ ; e

$X$  é  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  ou  $\text{BF}_4^-$ ,



onde:

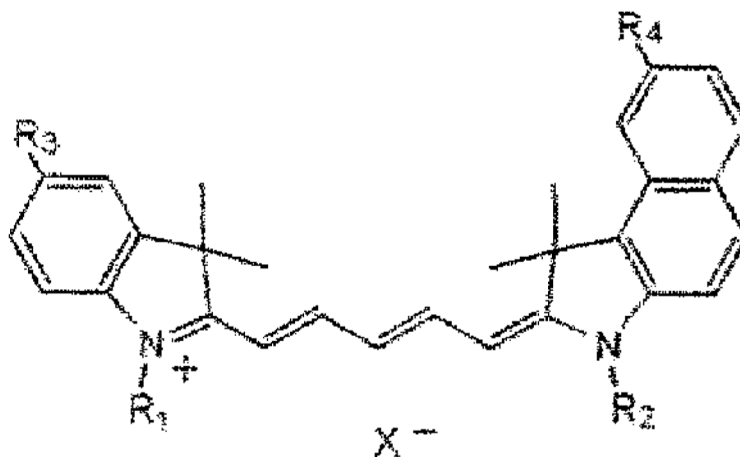
$R^1$  é  $\text{CH}_3$  ou  $\text{C}_4\text{H}_9$ ;

$R^2$  é  $(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{N}(\text{H})(\text{C}_2\text{H}_5)_3$  ou  $\text{CH}_3$ ;

$R^3$  é  $\text{H}$ ;

$R^4$  é  $\text{H}$ ; e

$X$  é  $\text{ClO}_4^-$  ou  $\text{I}^-$ ,



onde:

$R^1$  é  $\text{CH}_3$ ;

$R^2$  é  $\text{CH}_3$  ou  $\text{C}_4\text{H}_9$ ;

$R^3$  é  $\text{H}$ ;

$R^4$  é  $\text{H}$ ; e

$X$  é  $\text{ClO}_4^-$ .

2. Kit reagente, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o pH do primeiro reagente ser ácido.

3. Kit reagente, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o primeiro reagente compreender um agente de tamponamento tendo um pKa na faixa de pH de 2,0 a 4,5.

4. Kit reagente, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de o agente de tamponamento ser pelo menos um selecionado do grupo consistindo de ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido diglicólico, ácido malônico e ácido succínico.

5. Método para analisar uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- lisar os eritrócitos em uma amostra e danificar a membrana celular das células do sangue de modo que um corante

fluorescente possa permear através dela, em virtude do primeiro reagente, conforme definido na reivindicação 1; e

- corar as células danificadas em virtude do segundo reagente definido de acordo com a reivindicação 1;
- aplicar luz às células coradas para obter uma informação de luz difundida e informação fluorescente, e classificar e contar os basófilos e eritrócitos nucleados na amostra com base na informação de luz difundida e na informação de fluorescência.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de a informação de luz difundida ser uma informação de luz difundida avançada, e os eritrócitos nucleados na amostra serem contados com base na informação de luz difundida avançada e na informação fluorescente na etapa de classificação e de contagem.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo fato de a informação de luz difundida ser uma informação de luz difundida avançada, e os basófilos na amostra serem contados com base na informação de luz difundida avançada e da informação de fluorescência na etapa de classificação e de contagem.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de a informação de luz difundida ser uma informação de luz difundida avançada e uma informação de luz difundida lateral, e os basófilos na amostra serem contados com base na informação de luz difundida avançada e na informação de luz difundida lateral na etapa de classificação e de contagem.

9. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de os leucócitos na amostra serem classificados adicionalmente e contados com base na informação de luz

difundida e na informação de fluorescência da etapa de classificação e de contagem.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a informação de luz difundida avançada ser uma informação de luz difundida avançada, e os leucócitos na amostra serem classificados e contados com base na informação de luz difundida avançada e na informação de fluorescência na etapa de classificação e de contagem.

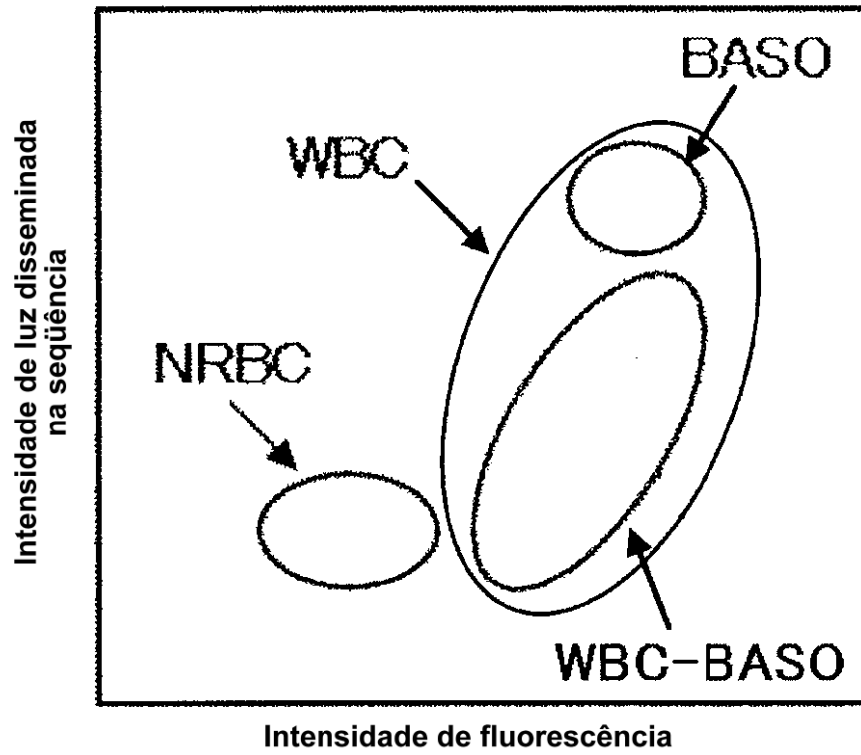


FIG.1

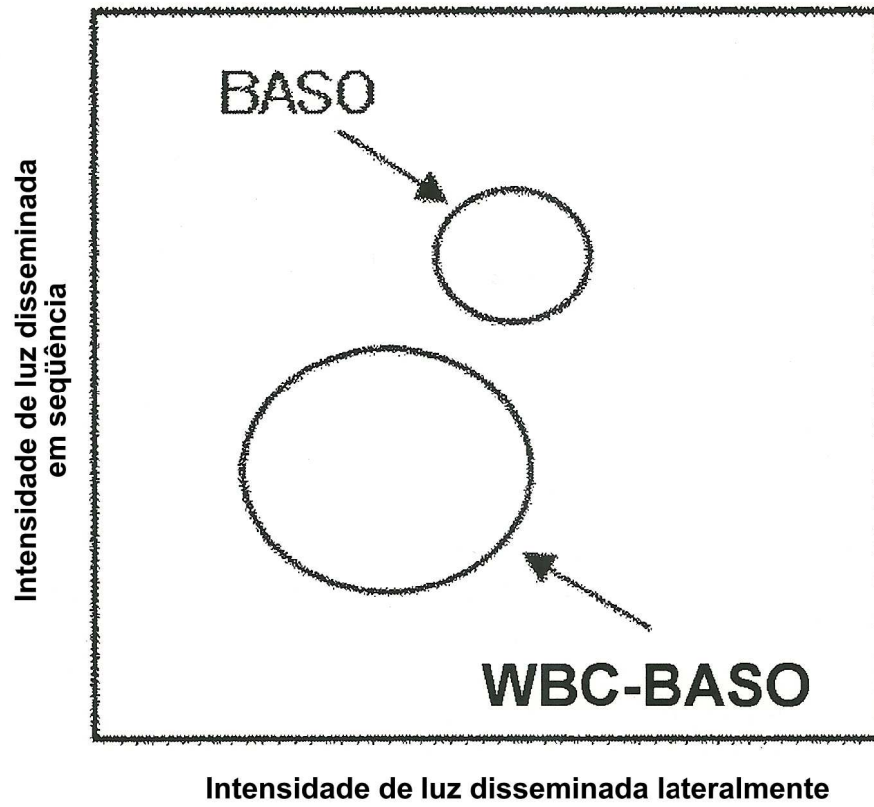


FIG.2

	Amostra BASO 1 (8 horas após a coleta de sangue)	Amostra BASO 2 (8 horas após a coleta de sangue)
<b>Primeiro reagente A</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente B</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente C</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente D</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente E</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente F</b>  <b>Segundo reagente</b>		

FIG.3

	Amostra NRBC 1 (8 horas após a coleta de sangue)	Amostra NRBC 2 (8 horas após a coleta de sangue)
<b>Primeiro reagente A</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente B</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente C</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente D</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente E</b>  <b>Segundo reagente</b>		
<b>Primeiro reagente F</b>  <b>Segundo reagente</b>		

**FIG.4**

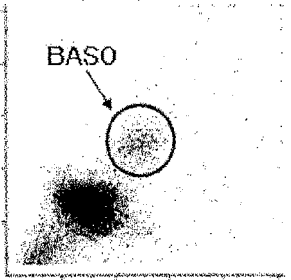
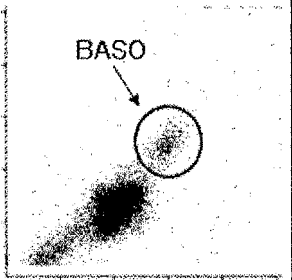
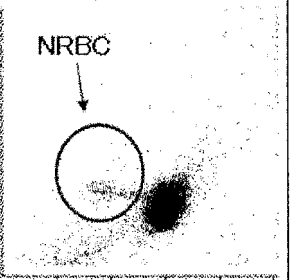
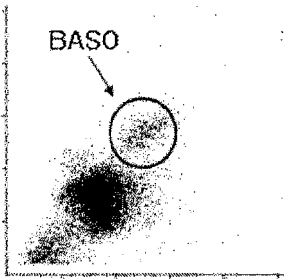
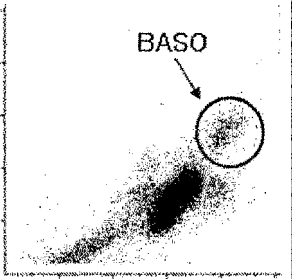
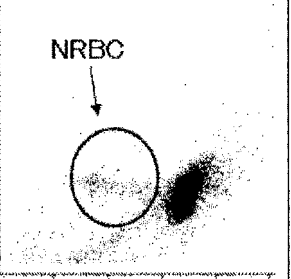
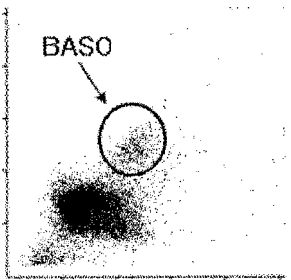
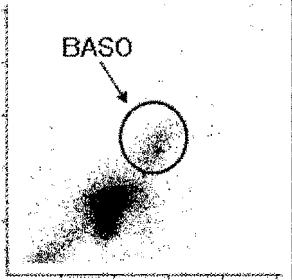
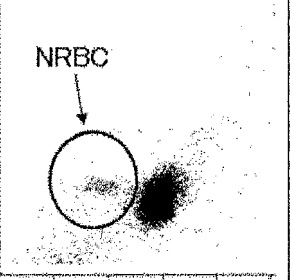
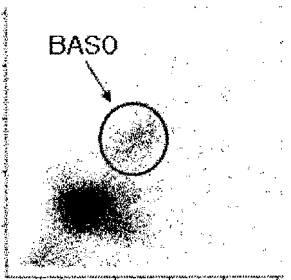
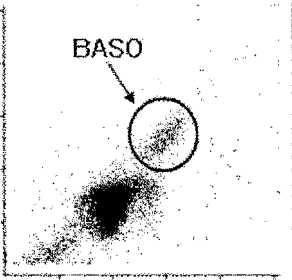
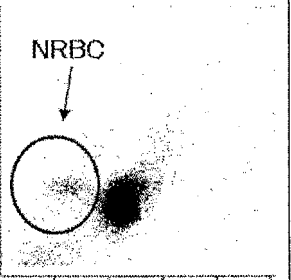
	Amostra BASO 2 (50 h após a coleta de sangue)		Amostra NRBC 2 (50 h após a coleta de sangue)
	Int. de luz dissem. em seq Int. de luz dissem. lateral.	Int. de luz dissem. em seq Int. de fluorescência	Int. de luz dissem. em seq Int. de fluorescência
Primeiro reagente A Segundo reagente			
Primeiro reagente B Segundo reagente			
Primeiro reagente E Segundo reagente			
Primeiro reagente F Segundo reagente			

FIG.5

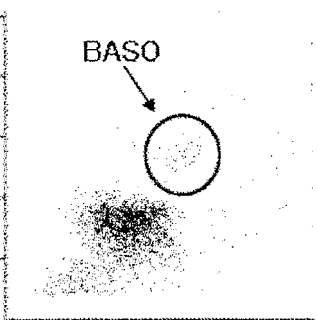
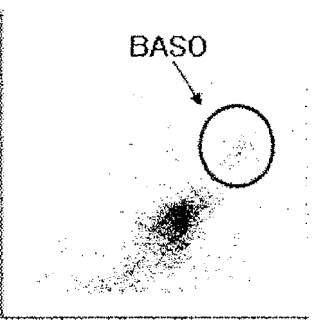
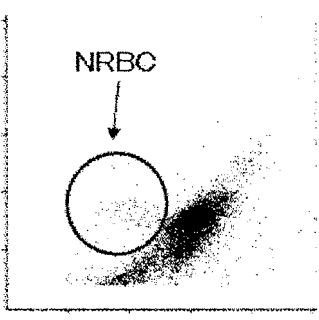
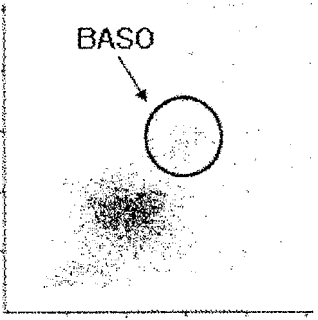
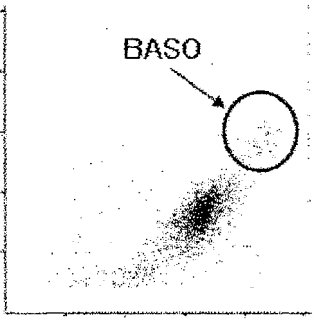
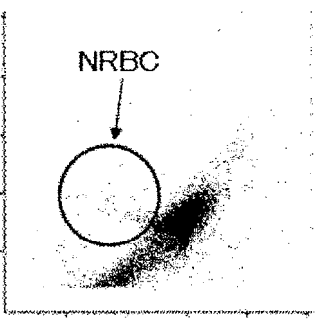
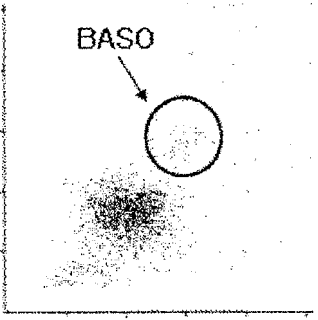
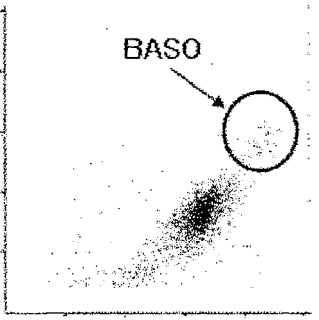
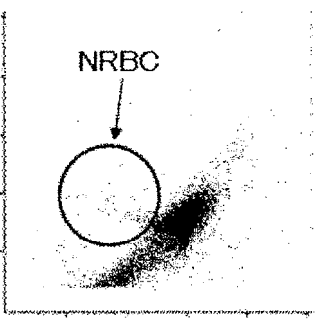
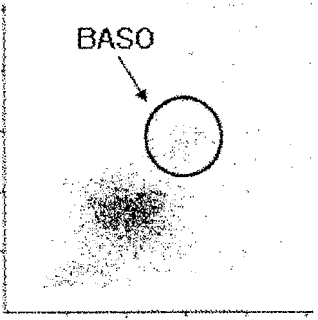
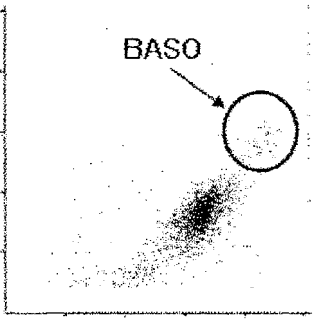
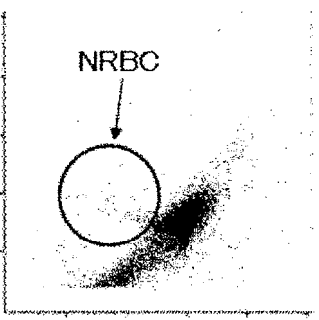
	Amostra BASO 3 (50 horas após a coleta de sangue)		Amostra NRBC 3 (50 horas após a coleta de sangue)
	Int. de luz dissem. em seq. Int. de luz dissem. lateral.	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
Primeiro reagente C			
Segundo reagente			
Primeiro reagente D			
Segundo reagente			

FIG.6

7/25

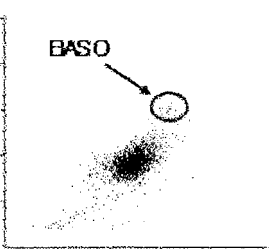
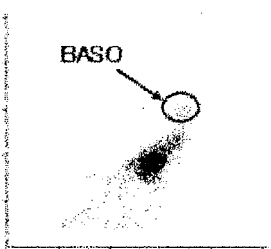
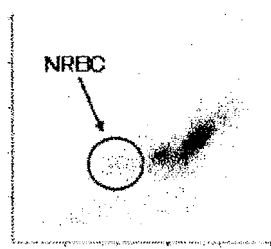
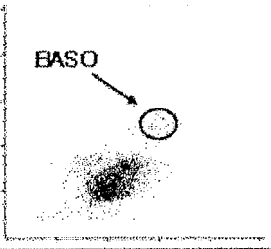
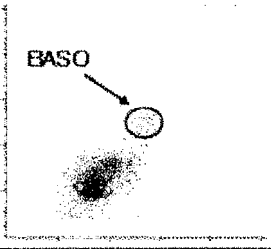
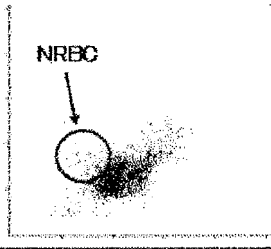
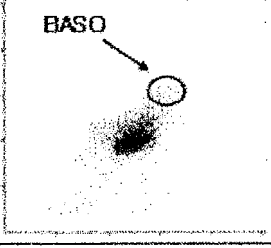
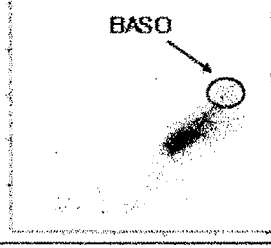
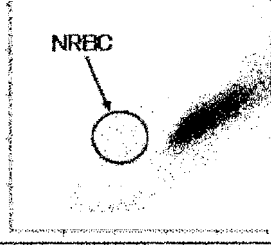
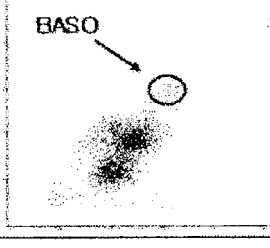
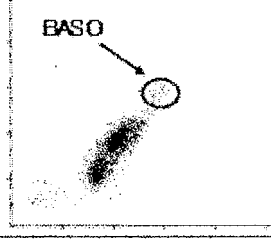
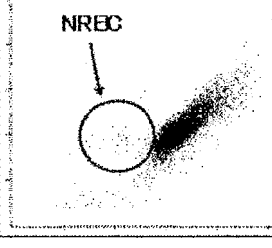
	Amostra BASO 4		Amostra NRBC 4
	Int. luz dissem. em seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(A) BO-16 3000ppm DTAB 3000ppm			
(B) BO-16 7000ppm DTAB 7000ppm			
(C) PBC-44 3000ppm DTAB 5000ppm			
(D) PBC-44 7000ppm DTAB 7000ppm			

FIG.7

8/25

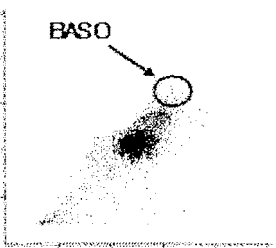
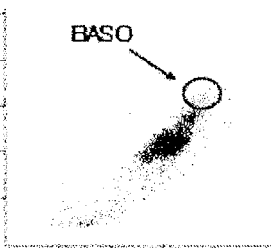
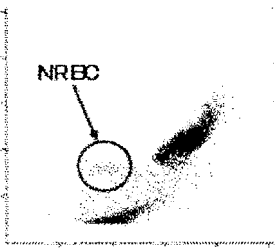
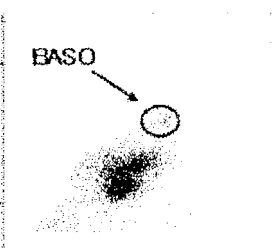
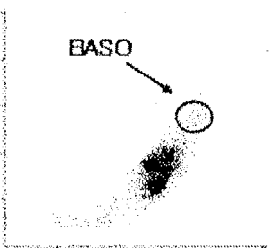
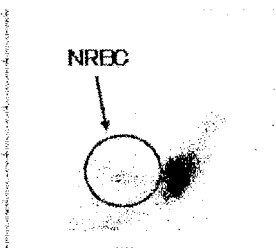
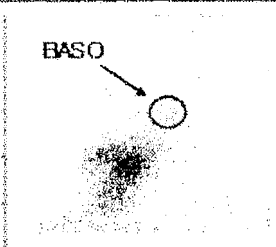
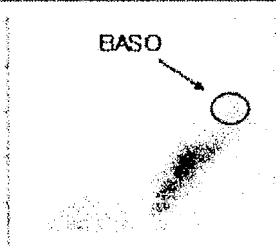
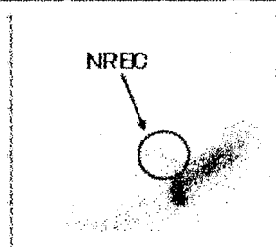
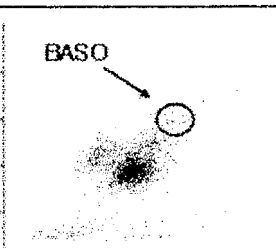
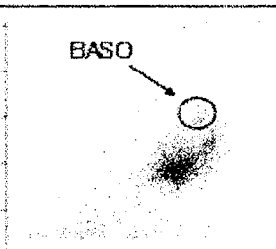
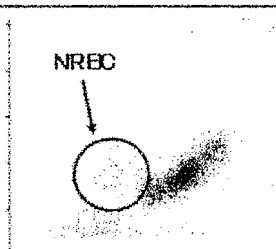
	Amostra BASO 4		Amostra NRBC 4
	Int. luz dissem. em seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(E) BC-20TX 2000ppm DTAB 3000ppm			
(F) BC-20TX 2000ppm DTAB 5000ppm			
(G) BPSH-25 3000ppm DTAB 7000ppm			
(H) BPSH-25 7000ppm DTAB 7000ppm			

FIG.8

9/25

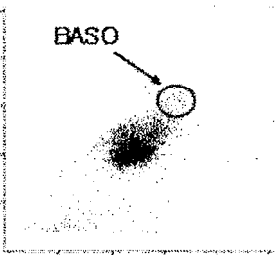
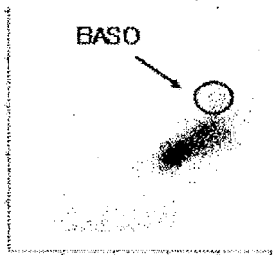
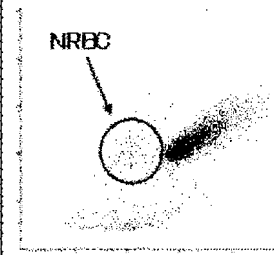
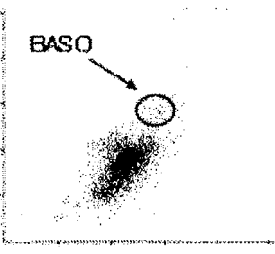
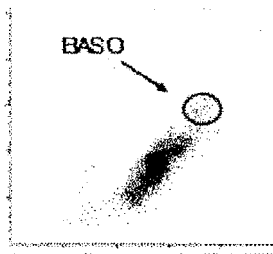
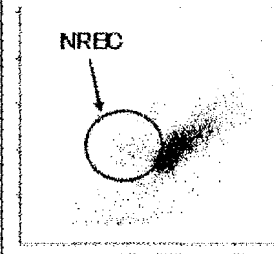
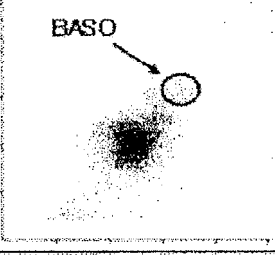
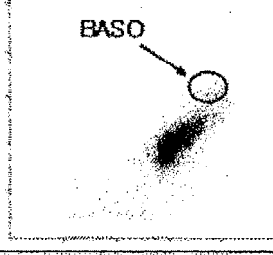
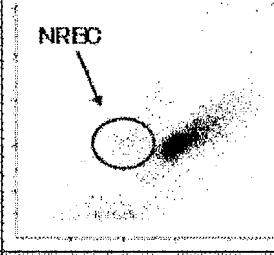
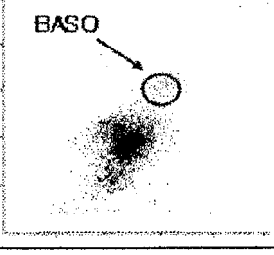
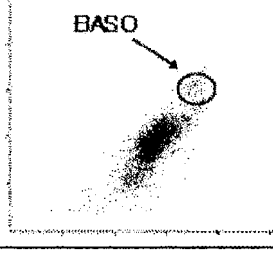
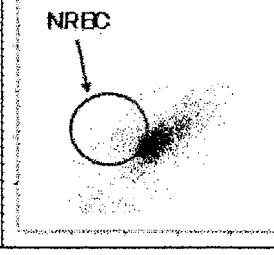
	Amostra BASO 4		Amostra NRBC 4
	Int. luz dissem. em seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(D) HCO-50 5000ppm DTAB 5000ppm			
(J) HCO-50 7000ppm DTAB 7000ppm			
(K) HCO-20 3000ppm DTAB 5000ppm			
(L) HCO-20 7000ppm DTAB 7000ppm			

FIG.9

10/25

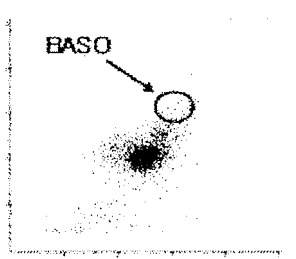
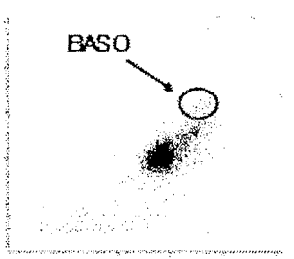
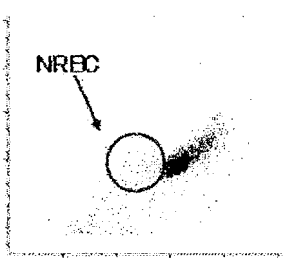
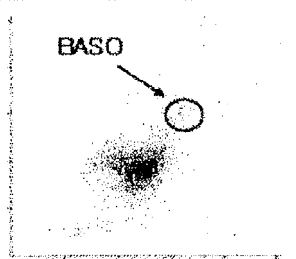
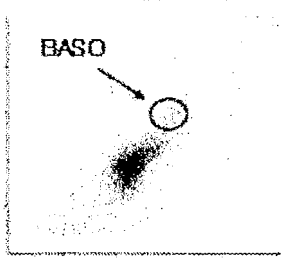
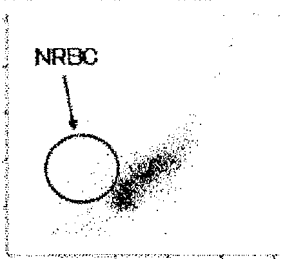
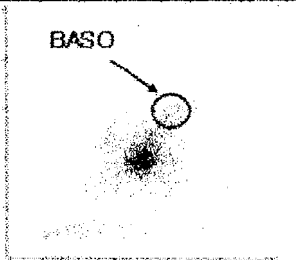
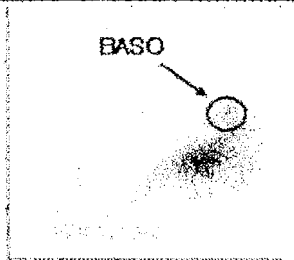
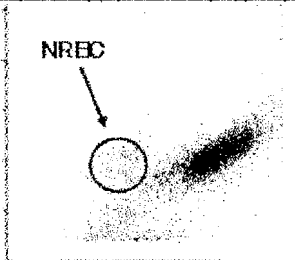
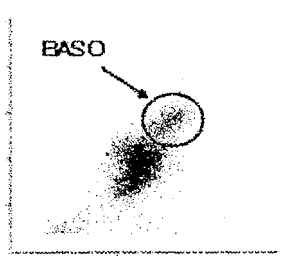
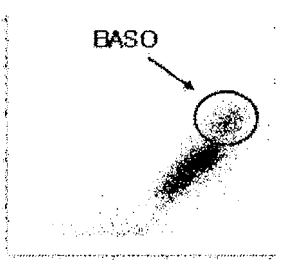
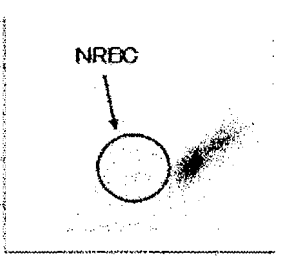
	Amostra BASO 4		Amostra NRBC 4
	Int. de luz dissem. em seq. Int. de luz dissem. lateral.	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(M) CO-20TX 3000 ppm DTAB 5000 ppm			
(N) CO-20TX 7000 ppm DTAB 7000 ppm			
(O) PEN-4630 3000 ppm DTAB 5000 ppm			
(P) PEN-4630 5000 ppm DTAB 7000 ppm			

FIG.10

11/25

	Amostra BASO 5		Amostra NRBC 5
	Int. de luz dissem. em seq. Int. de luz dissem. lateral.	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(A) BO-16 1000ppm LTAC 1000ppm			
(B) BO-16 5000ppm LTAC 2000ppm			
(C) PBC-44 1000ppm LTAC 1000ppm			
(D) PBC-44 5000ppm LTAC 2000ppm			

FIG.11

12/25

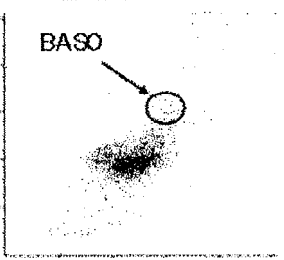
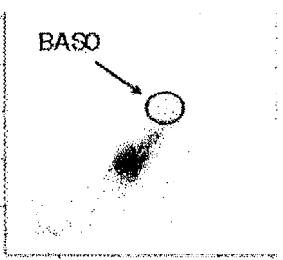
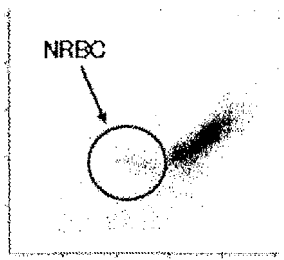
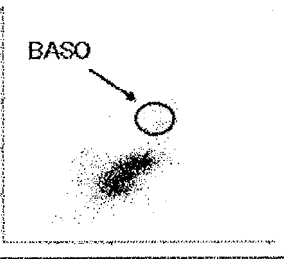
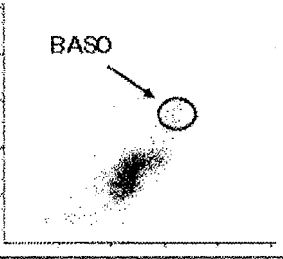
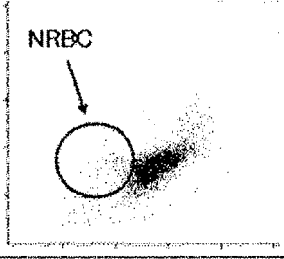
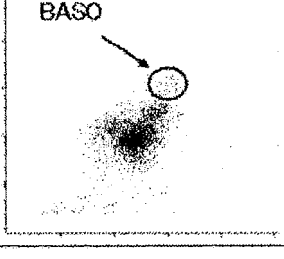
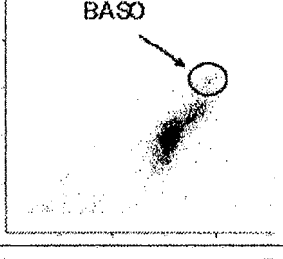
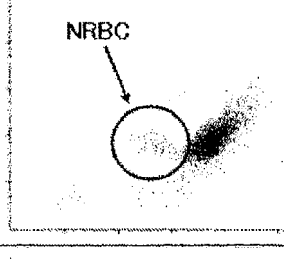
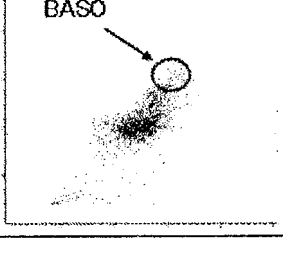
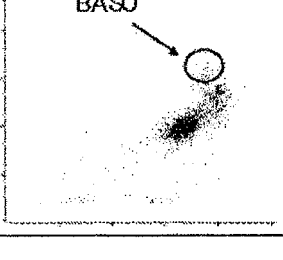
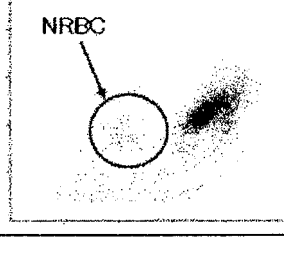
	Amostra BASO 5		Amostra NRBC 5
	Int. de luz dissem. em seq. Int. de luz dissem. lateral.	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(E) BC-20TX 1000ppm LTAC 1000ppm			
(F) BC-20TX 500ppm LTAC 2000ppm			
(G) BPSH-25 1000ppm LTAC 1500ppm			
(H) BPSH-25 5000ppm LTAC 2000ppm			

FIG.12

13/25

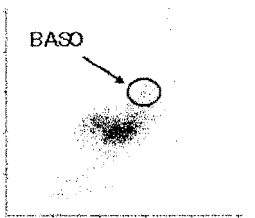
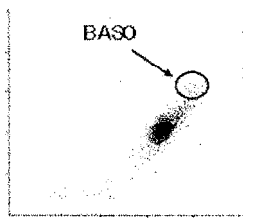
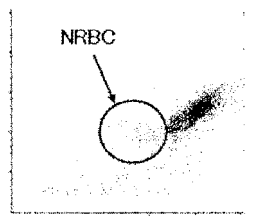
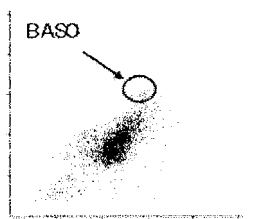
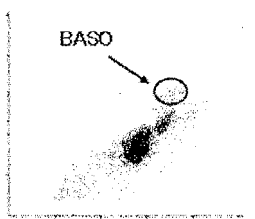
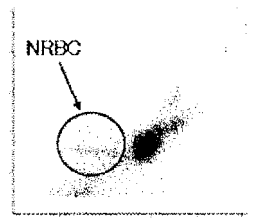
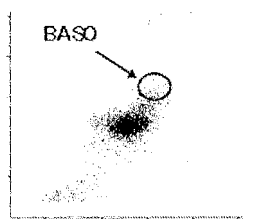
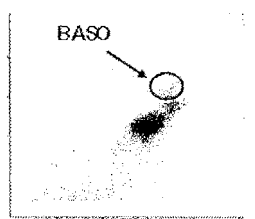
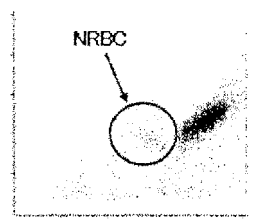
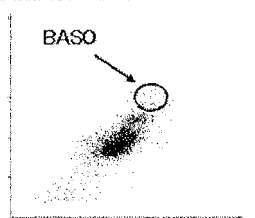
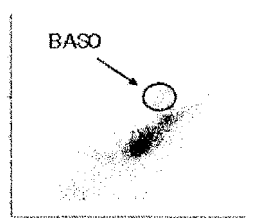
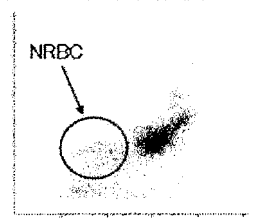
	Amostra BASO 5		Amostra NRBC 5
	Int. de luz dissem. seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(I) HCO-50 1000ppm LTAC 1000ppm			
(J) HCO-50 7000ppm LTAC 2000ppm			
(K) HCO-20 1000ppm LTAC 1000ppm			
(L) HCO-20 7000ppm LTAC 2000ppm			

FIG.13

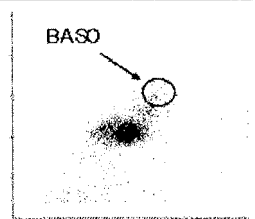
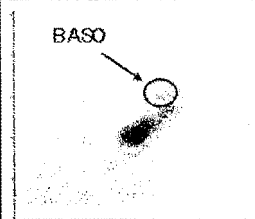
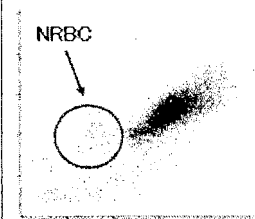
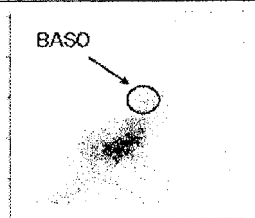
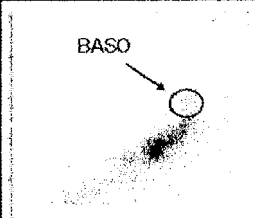
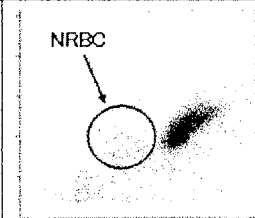
	Amostra BASO 5		Amostra NRBC 5
	Int. luz dissem. seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(M) PEN-4630 1000ppm LTAC 1000ppm			
(N) PEN-4630 5000ppm LTAC 1800ppm			

FIG.14

14/25

	Amostra BASO 6		Amostra NRBC 6
	Int. de luz dissem. em seq. Int. de luz dissem. lateral.	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. de luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(A) <b>Ácido ftálico 10mM</b> <b>Ácido málico 0mM</b> BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			
(B) <b>Ácido ftálico 5mM</b> <b>Ácido málico 5mM</b> BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			
(C) <b>Ácido ftálico 1mM</b> <b>Ácido málico 9mM</b> BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			
(D) <b>Ácido ftálico 0,3mM</b> <b>Ácido málico 9,7mM</b> BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			

FIG.15

15/25

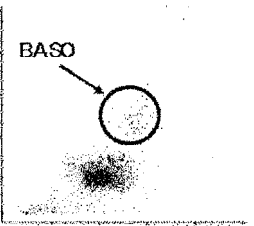
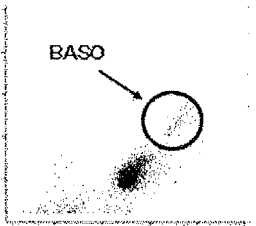
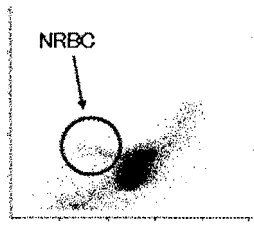
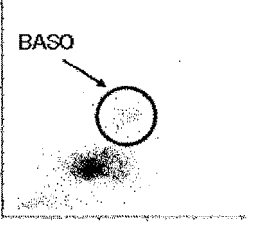
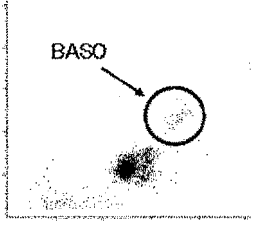
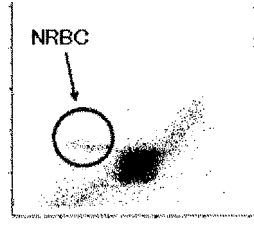
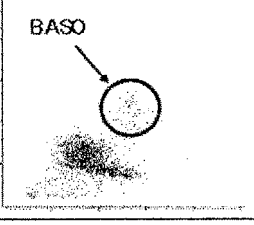
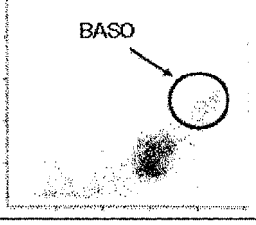
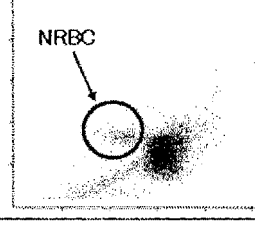
	Amostra BASO 6		Amostra NRBC 6
	Int. luz dissem. em seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. de luz dissem. seq. Int. de fluorescência	Int. de luz dissem. seq. Int. de fluorescência
(E) <b>Ácido ftálico 5mM</b> <b>Ácido málico 5mM</b> PBC-44 1000ppm LTAC 1500ppm			
(F) <b>Ácido ftálico 1mM</b> <b>Ácido málico 9mM</b> PBC-44 1000ppm LTAC 1500ppm			
(G) <b>Ácido ftálico 0,22mM</b> <b>Ácido málico 10mM</b> PBC-44 1000ppm LTAC 1500ppm			

FIG.16

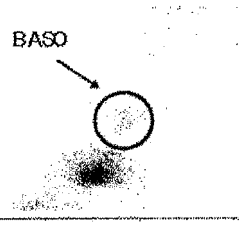
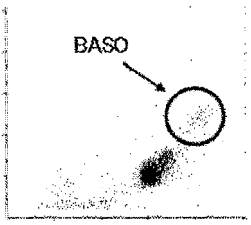
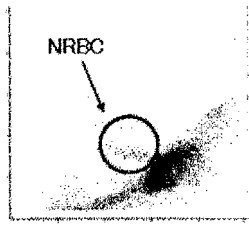
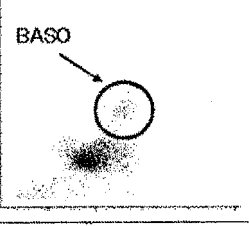
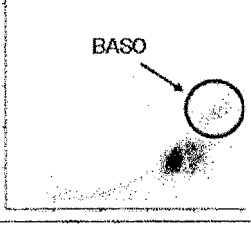
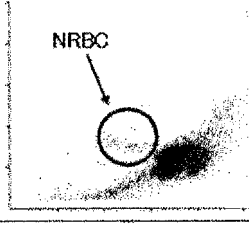
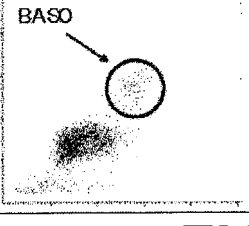
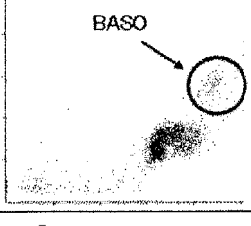
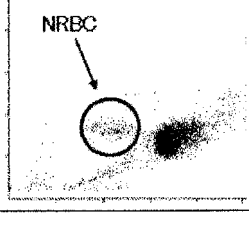
	Amostra BASO 6		Amostra NRBC 6
	Int. luz dissem. em seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência	Int. luz dissem. em seq. Int. de fluorescência
(H) <b>Ácido ftálico 5mM</b> <b>Ácido málico 5mM</b> BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			
(I) <b>Ácido ftálico 1mM</b> <b>Ácido málico 9mM</b> BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			
(J) <b>Ácido ftálico 0,24mM</b> <b>Ácido málico 10mM</b> BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			

FIG.17

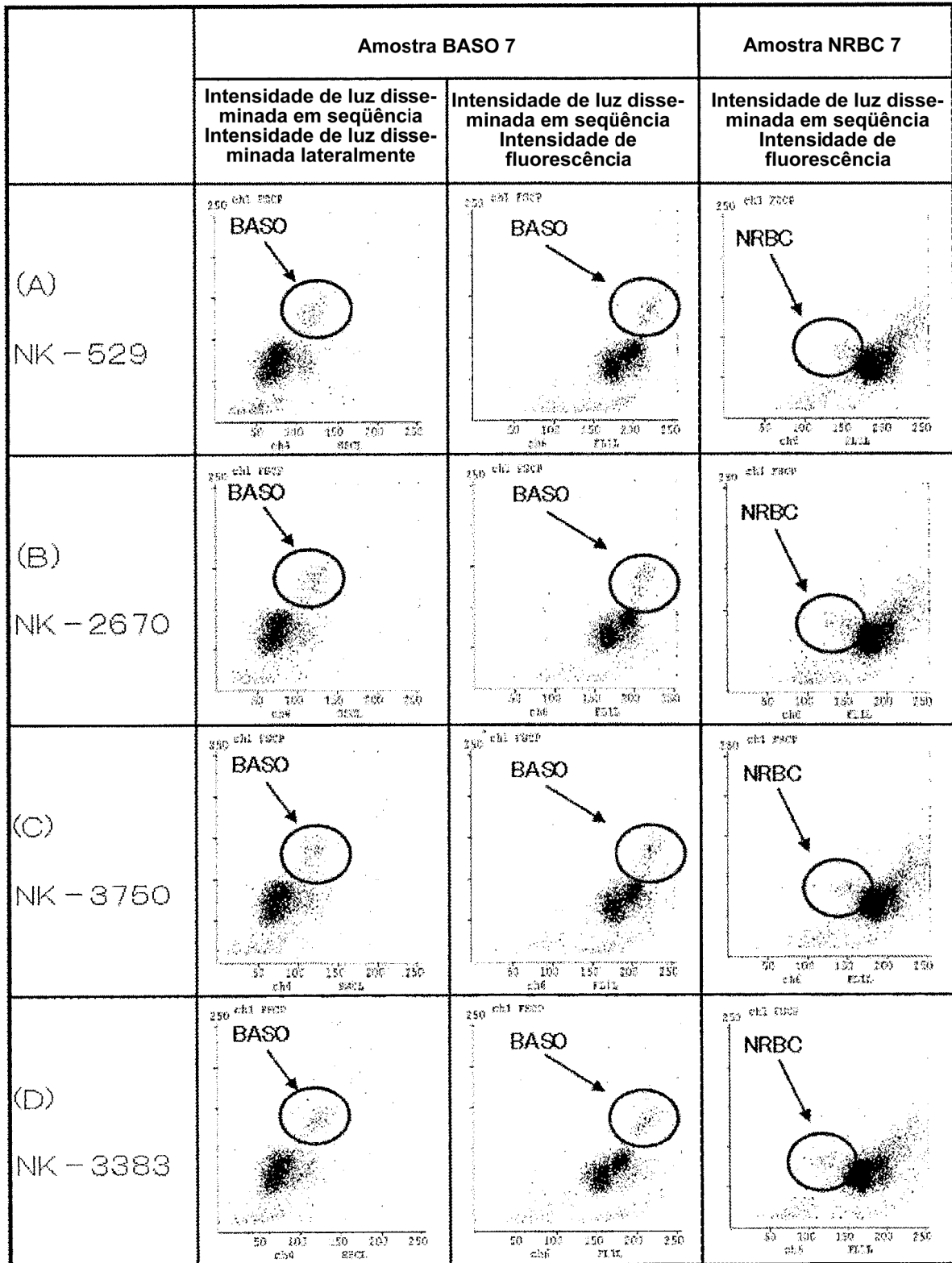


FIG.18

17/25

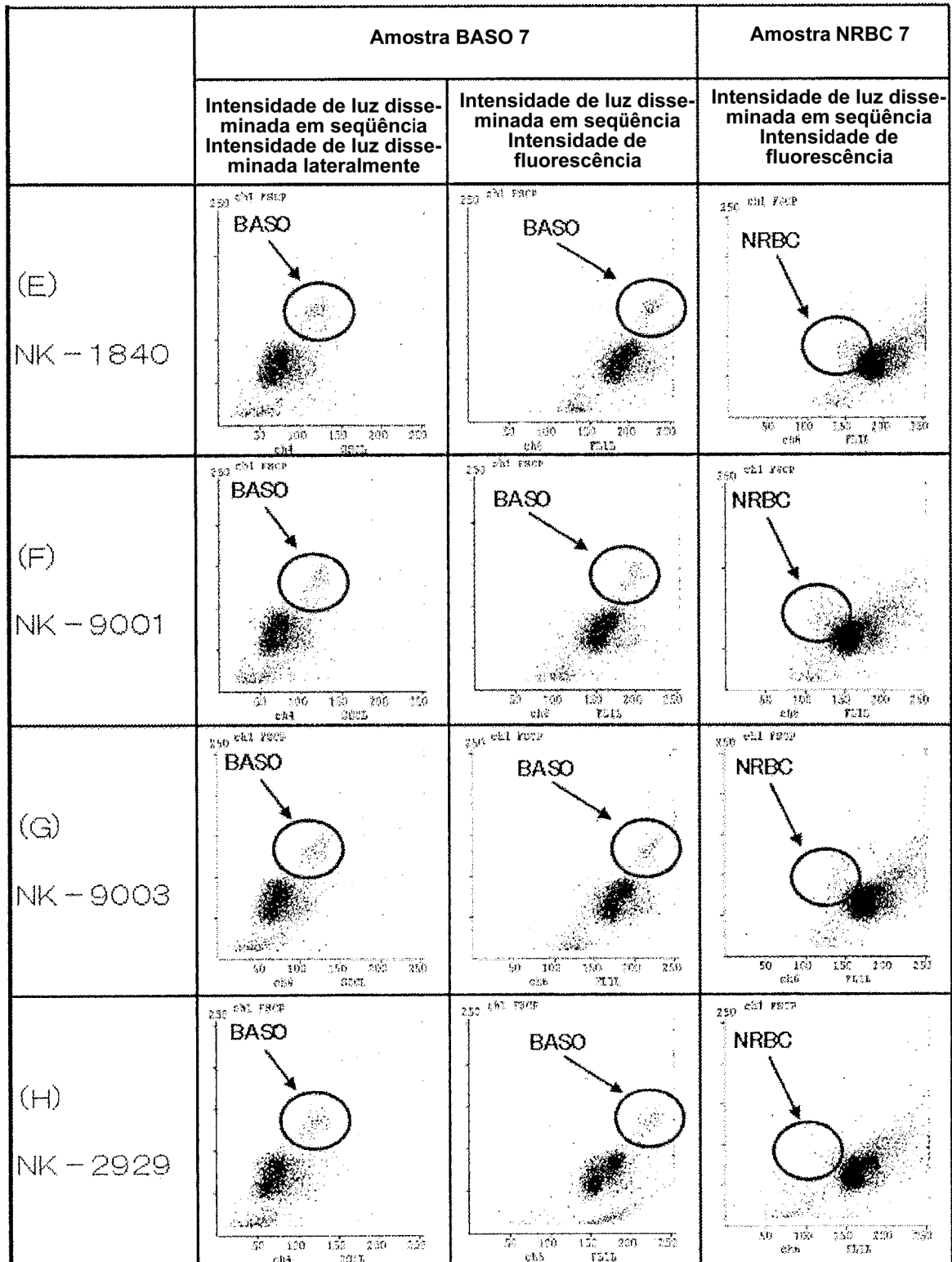


FIG.19

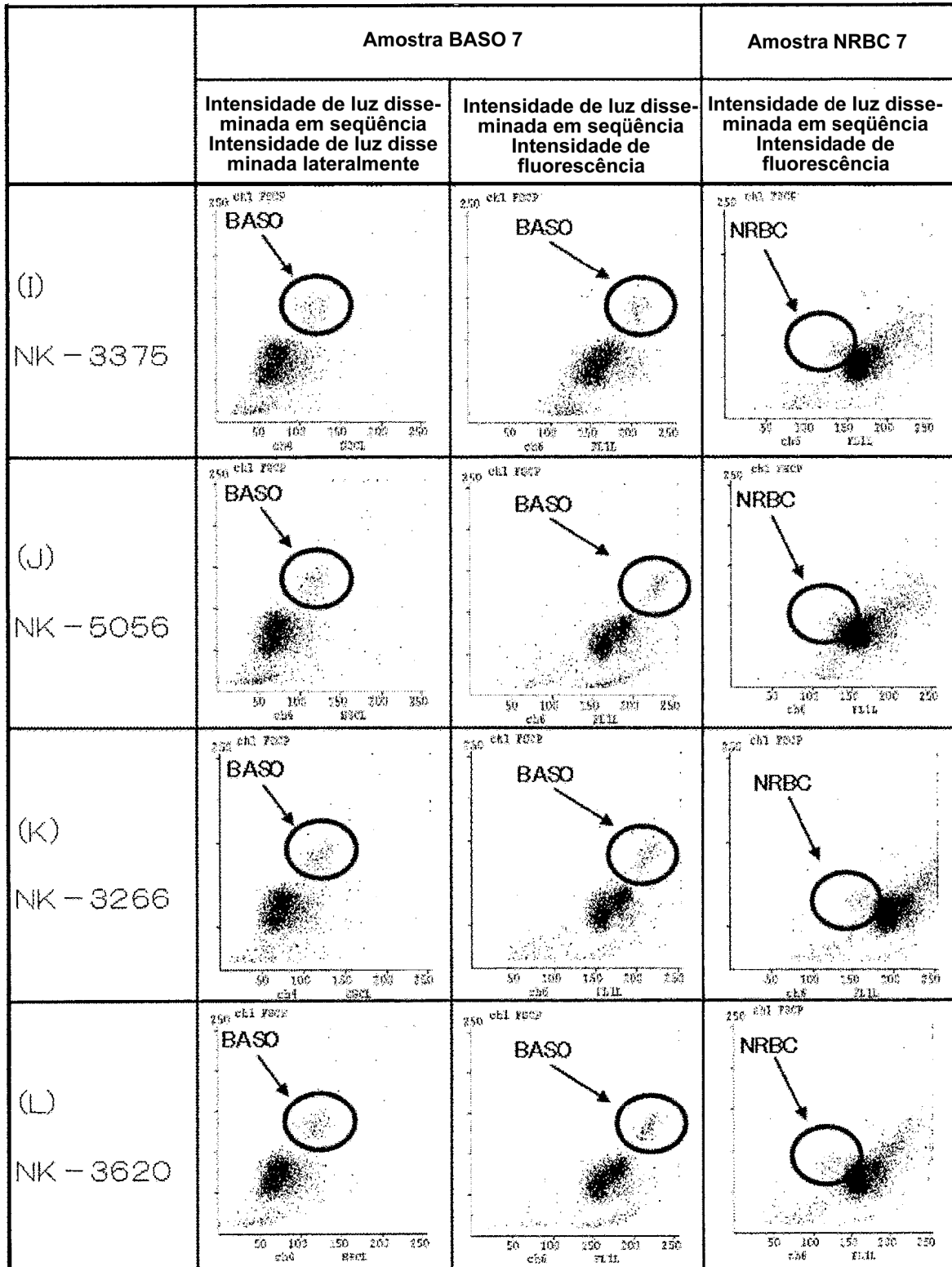


FIG.20

19/25

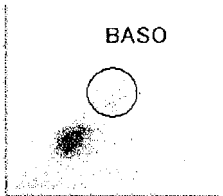
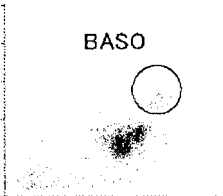
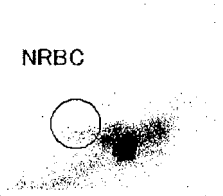
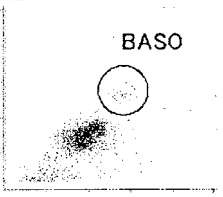
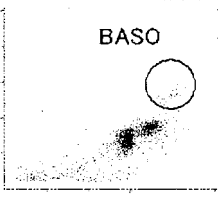
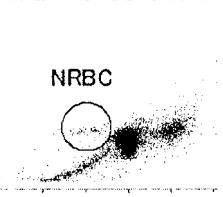
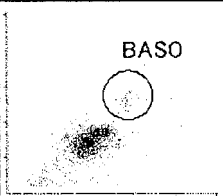
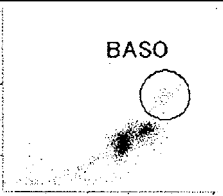
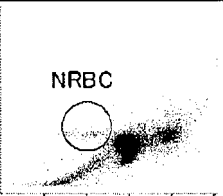
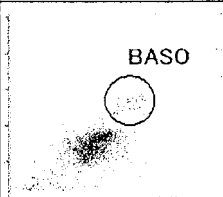
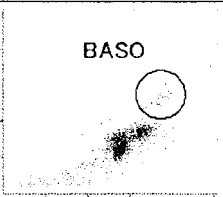
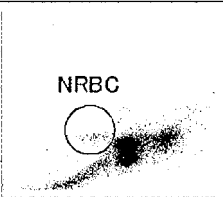
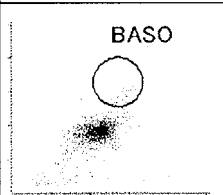
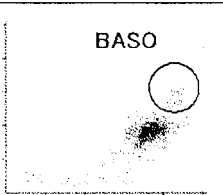
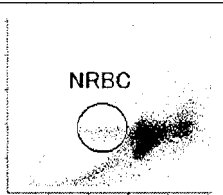
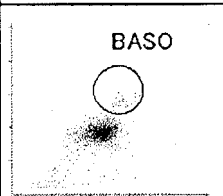
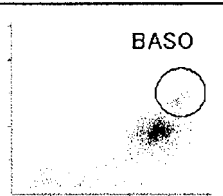
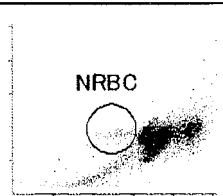
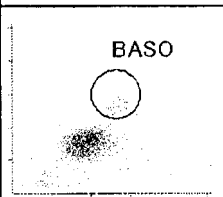
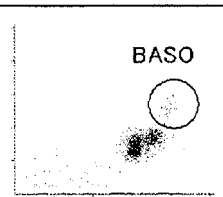
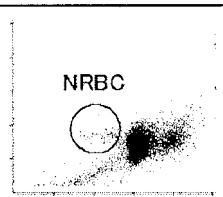
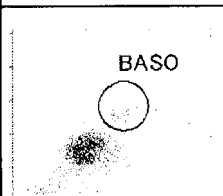
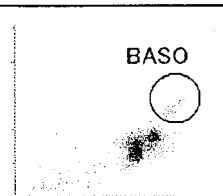
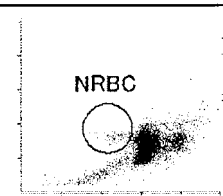
Ácido carboxílico	Amostra BASO 8		
	Int. luz dissem. seq. Int. luz dissem. lat.	Int. luz dissem. seq. Int. fluorescência	Int. luz dissem. seq. Int. fluorescência
Ref 2 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 10 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 
(A) 2 mM de Benzoato de potássio 8 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 
(B) 3 mM de Benzoato de potássio 7 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 
(C) 4 mM de Benzoato de potássio 6 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 
(D) 7 mM de 4-hidroxibenzoato de sódio 3 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 
(E) 8 mM de 4-hidroxibenzoato de sódio 2 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 
(F) 4 mM de 3-hidroxibenzoato de sódio 6 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 
(G) 5 mM de 3-hidroxibenzoato de sódio 5 mM de Ácido DL-málico	BASO 	BASO 	NRBC 

FIG.21

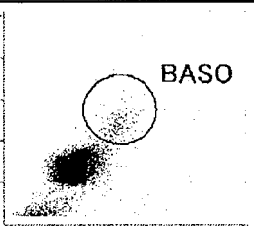
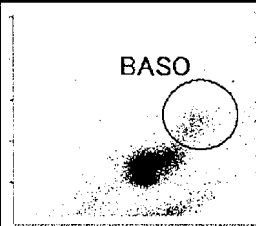
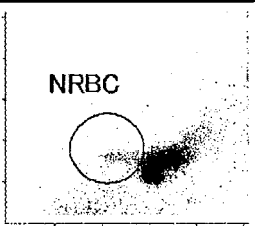
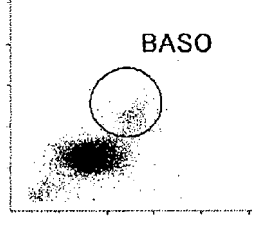
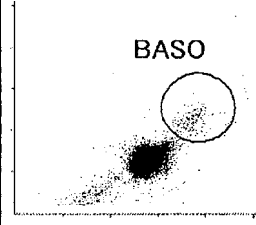
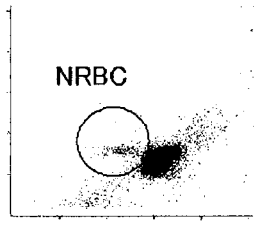
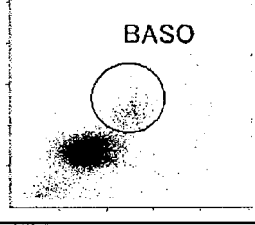
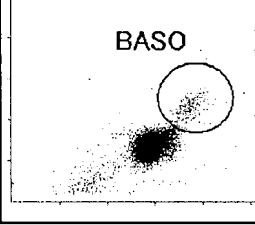
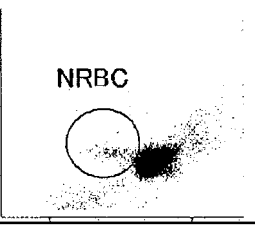
Ácido carboxílico aromático	Amostra BASO 9		Amostra NRBC 9
	Int. luz dissem. seq. Int. luz dissem. lateral.	Int. luz dissem. seq. Int. de fluorescência	Int. luz dissem. seq. Int. de fluorescência
<b>Ref.</b> 0,5mM de Fatlato de hidrogênio potássio 10 mM de Ácido DL-málico	 <p>BASO</p>	 <p>BASO</p>	 <p>NRBC</p>
<b>(H)</b> 1 mM de Benzoato de potássio 9 mM de Ácido DL-málico	 <p>BASO</p>	 <p>BASO</p>	 <p>NRBC</p>
<b>(I)</b> 1 mM de Benzoato de potássio 10 mM de Ácido DL-málico	 <p>BASO</p>	 <p>BASO</p>	 <p>NRBC</p>

FIG.22

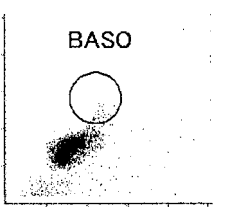
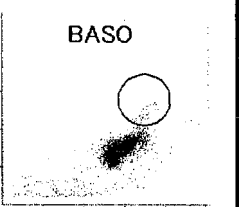
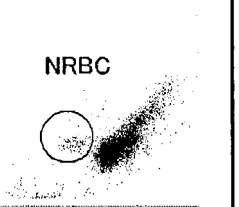
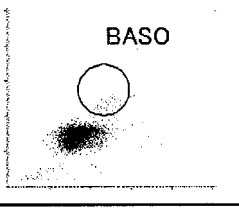
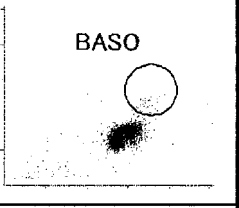
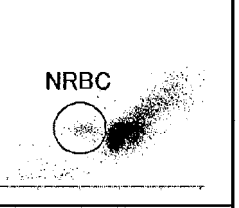
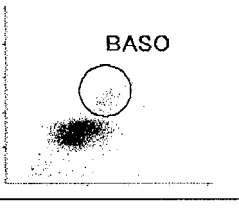
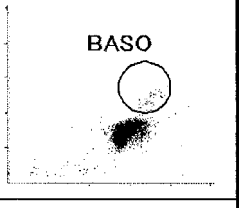
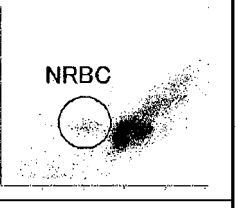
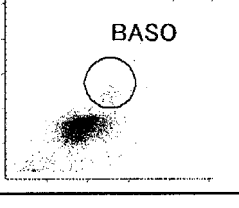
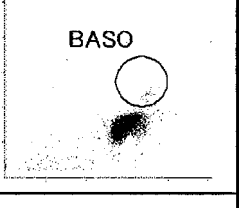
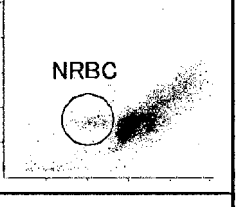
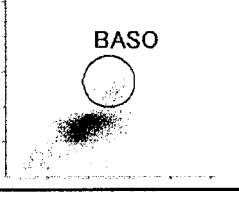
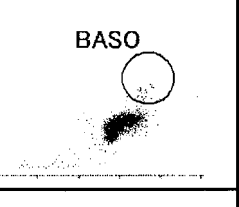
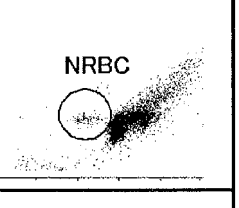
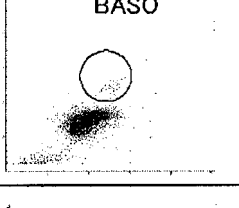
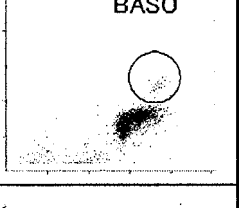
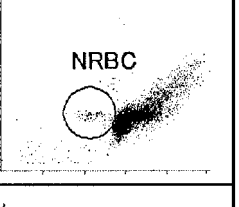
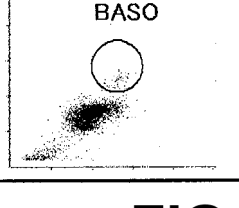
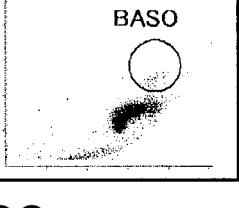
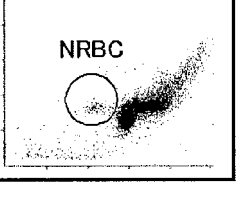
Ácido carboxílico aromático	Amostra BASO 10		NRBC10
	Int. luz dissem. seq. Int. luz dissem. lat.	Int. luz dissem. seq. Int. fluorescência	Int. luz dissem. seq. Int. fluorescência
(A) 2 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 10 mM de Ácido DL-málico			
(B) 1,5 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 0,5 mM de Ácido DL-málico			
(C) 1,33 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 0,66 mM de Ácido DL-málico			
(D) 1 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 1 mM de Ácido DL-málico			
(E) 0,66 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 1,33 mM de Ácido DL-málico			
(F) 0,5 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 1,5 mM de Ácido DL-málico			
(G) 0 mM de Fatlato de hidrogênio potássio 2 mM de Ácido DL-málico			

FIG.23

22/25

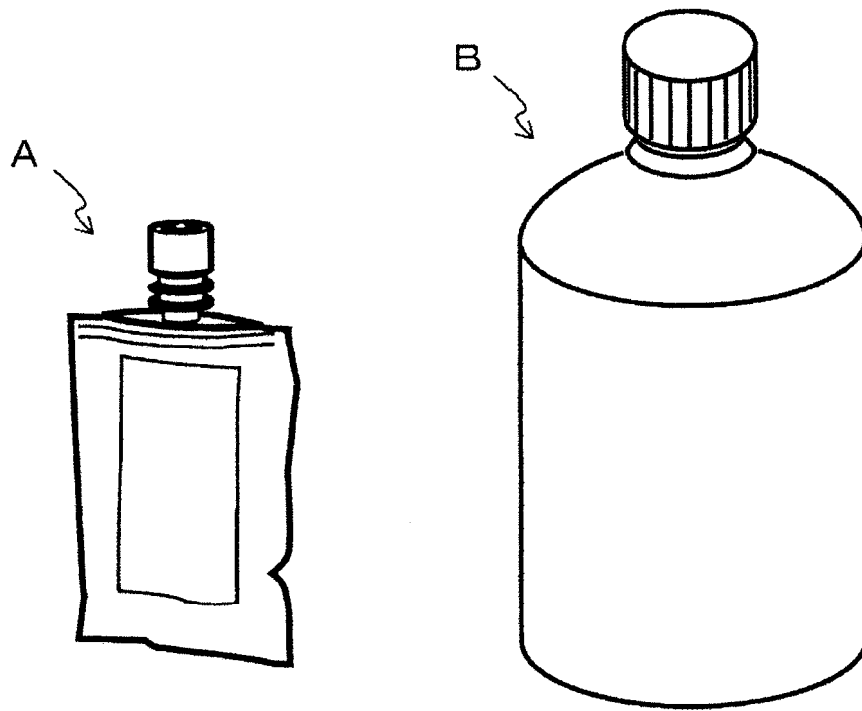


FIG.24

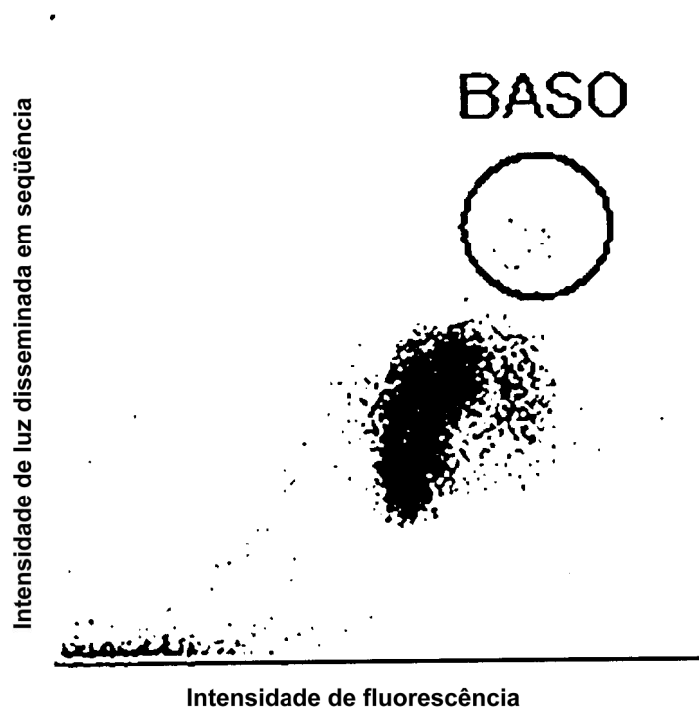
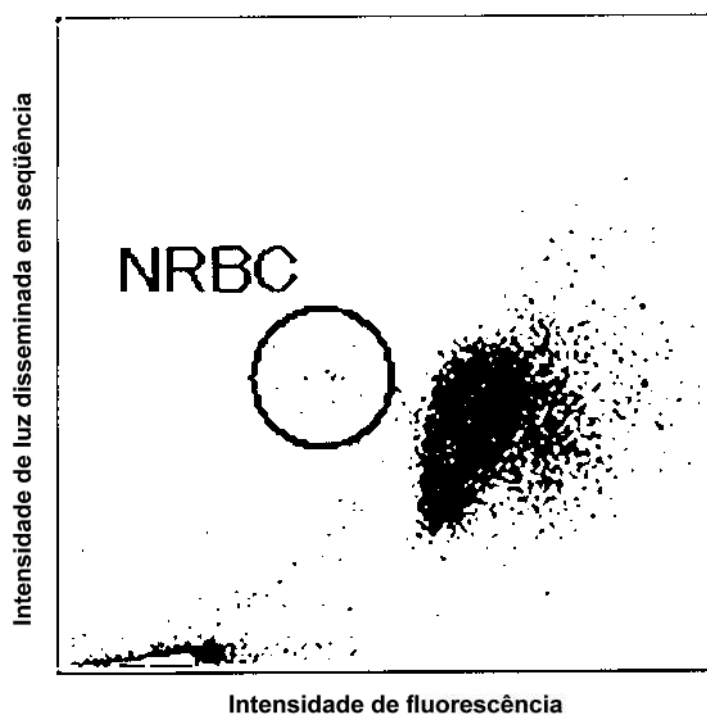


FIG.25

**23/25**



**FIG.26**

24/25

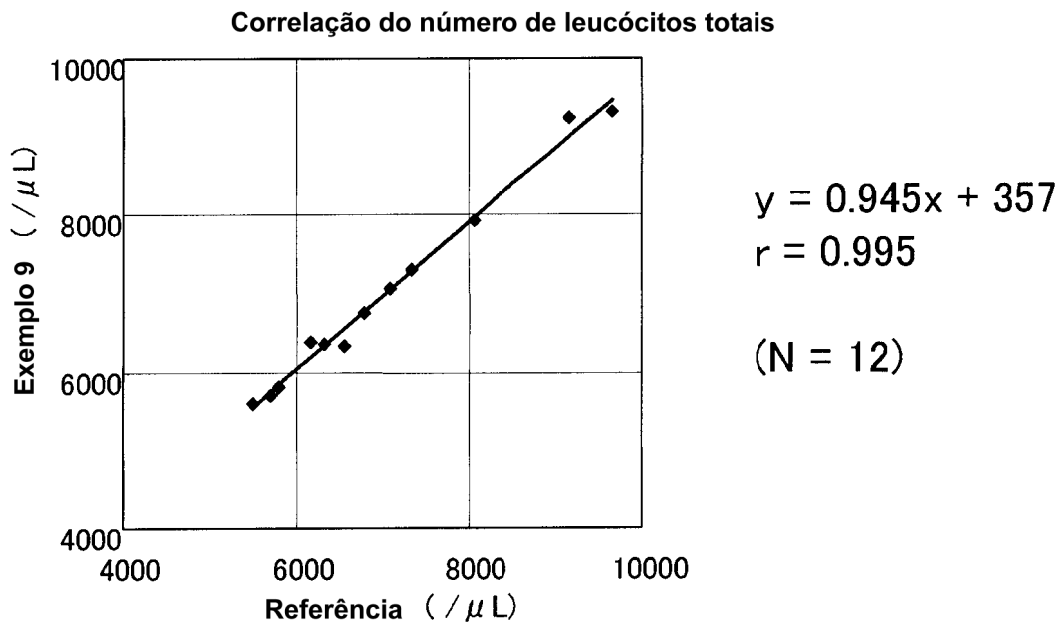


FIG.27A

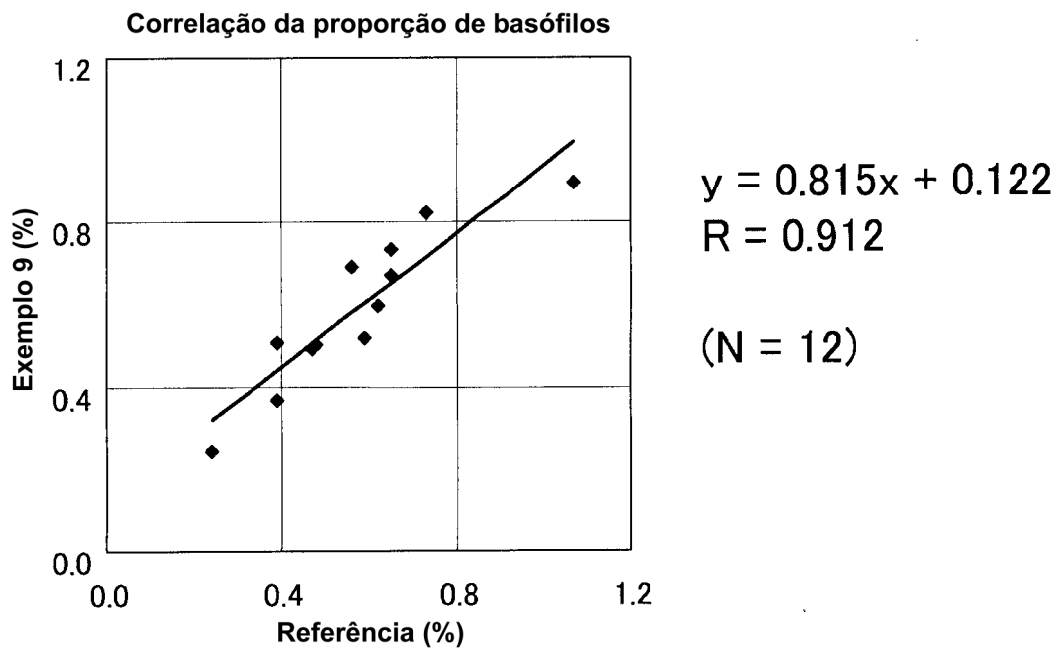
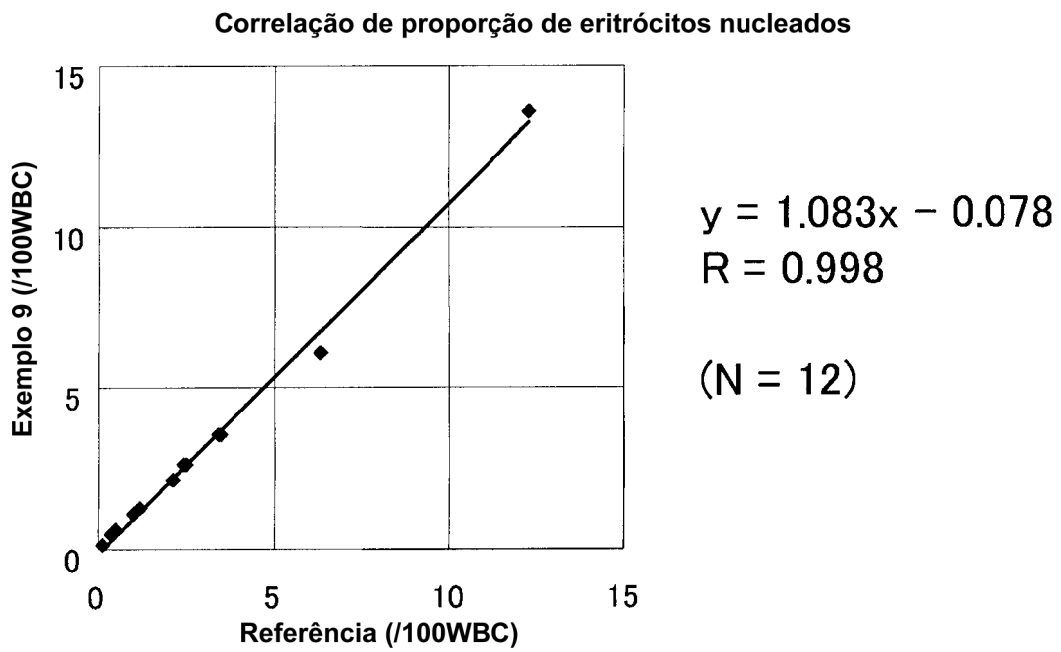


FIG.27B

**25/25**



**FIG.27C**