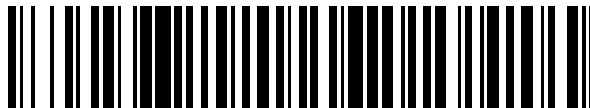


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 319**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/02** (2006.01)

**G01N 1/30** (2006.01)

**C09B 31/08** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**C09B 11/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2004 E 04726658 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1619256**

54 Título: **Agente de tinción de microorganismos y su uso**

30 Prioridad:

**25.04.2003 JP 2003121701**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.11.2013**

73 Titular/es:

**HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.  
(100.0%)  
408, Tashirodaikan-machi  
Tosu-shi, Saga 841-0017, JP**

72 Inventor/es:

**NASHIMOTO, KOJI;  
ISHIDA, KAZUYA;  
IKEDA, YASUO y  
HANAOKA, YOSHIAKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 428 319 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Agente de tinción de microorganismos y su uso

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente de tinción de microorganismos, y, de forma más específica, a un agente de tinción de microorganismos capaz de teñir microorganismos tales como bacterias y hongos más rápidamente que los métodos convencionales y a un método de detección de microorganismos que utiliza el agente de tinción de microorganismos.

### **Antecedente de la técnica**

Los métodos convencionales para detectar microorganismos tales como bacterias y hongos incluyen un método de recuento microscópico directo donde se examina microscópicamente un espécimen tras pretatarse y un método de examen del cultivo donde el espécimen se examina tras cultivar los microorganismos. El método de recuento microscópico directo se utiliza a menudo en los centros médicos debido a la comodidad.

Como métodos conocidos para el pretratamiento en el método de recuento microscópico directo, se pueden indicar un método de hidróxido de potasio, un método de dimetilsulfóxido (DMSO)-hidróxido de potasio, y el método de tinta Parker - hidróxido de potasio (Hideyo Yamaguchi y col., Report of the Standardization Committee of the Japanese Society for Medical Mycology, "Jpn. J. Med. Mycol.", 1995, Vol. 6, pp. 61- 86)

Como los métodos de hidróxido de potasio y DMSO-hidróxido de potasio no tiñen el microorganismo, existen problemas tales como la dificultad de detectar *Malassezia* y los requisitos de habilidad en la detección con microscopio. Aunque el microorganismo se tiñe con el método de tinta Parker-hidróxido de potasio, el método tiene el problema de requerir un lapso de tiempo largo para la tinción, desde algunas horas a toda la noche. Existen también problemas debidos a que el tipo de tinta que se puede usar en este método de tinción está restringido. Puesto que la propia tinta por sí está comprendida por varios componentes, la capacidad de tinción de las bacterias puede cambiar de acuerdo con la composición de la tinta.

Por tanto, para superar los problemas durante el pretratamiento en el método convencional de recuento microscópico directo, un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de tinción que puede teñir microorganismos rápidamente y un método de tinción y detección de microorganismos que utiliza el mismo.

### **Divulgación de la invención**

A la vista de estas circunstancias, los inventores han llevado a cabo una extensa investigación para conseguir el objetivo anterior y han descubierto que la tinción y detección de microorganismos se puede llevar a cabo rápidamente utilizando un agente de tinción que comprende un 15-30% de una sustancia alcalina y un colorante específico seleccionado entre Chicago Sky Blue 6B o Rodamina B, completando de esta forma la presente invención.

La presente invención proporciona también un método de detección de microorganismos caracterizado por la tinción de microorganismos añadiendo el agente de tinción a un espécimen que comprende microorganismos y detectando los microorganismos teñidos.

### **Breve descripción de los dibujos**

50 La Fig. 1 muestra una fotomicrografía (x400) de la tinción llevada a cabo utilizando el agente de tinción del Ejemplo 1.

La Fig. 2 muestra una fotomicrografía (x400) de la tinción llevada a cabo utilizando el agente de tinción del Ejemplo 7.

### 55 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

El agente de tinción de microorganismos de la presente invención (denominado a partir de ahora en el presente documento como "agente de tinción de la presente invención") comprende un 15-30% de una sustancia alcalina y un colorante, seleccionado entre Chicago Sky Blue 6B o Rodamina 6B.

60 Como ejemplos de la sustancia alcalina utilizada en el agente de tinción de la presente invención, se pueden indicar álcalis inorgánicos tales como hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de bario, y similares. De estas sustancias alcalinas, son preferibles hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, siendo particularmente preferible hidróxido de potasio.

65

Chicago Sky Blue 6B se incorpora en el agente de tinción de la presente invención en una cantidad de 0,01-2% y preferentemente 0,1-1%.

5 Rodamina B se incorpora en el agente de tinción de la presente invención en una cantidad de 0,001-1% y preferentemente 0,005-0,5%.

10 Además de los componentes anteriores, el agente de tinción de la presente invención puede comprender metanol y/o dimetilsulfóxido. El metanol se incorpora preferentemente en el agente de tinción de la presente invención en una cantidad de 0-30%, siendo particularmente preferible 0-20%. El dimetilsulfóxido se incorpora preferentemente en el agente de tinción de la presente invención en una cantidad de 0-20%, siendo particularmente preferible 0-10%.

15 Debido a que la adición del metanol y/o el dimetil sulfóxido puede controlar la capacidad de tinción de la célula sin afectar la capacidad de tinción del microorganismo, el agente de tinción que comprende el metanol y/o el dimetil sulfóxido tiñe de forma distintiva el microorganismo permitiendo de este modo una fácil detección del mismo. Además, el metanol y/o el dimetilsulfóxido son particularmente eficaces cuando se usan con los colorantes de tipo diazo y xanteno que tienen una baja solubilidad en una disolución alcalina tal como Rodamina B debido a que el metanol y/o el dimetilsulfóxido pueden aumentar la solubilidad de estos colorantes.

20 En la fabricación del agente de tinción de la presente invención, la sustancia alcalina se disuelve en agua para obtener una disolución alcalina y se añaden a la disolución el diazocolorante o el xantenocolorante y, cuando es necesario, el metanol y/o el dimetilsulfóxido, y se mezclan. El colorante que tiene una baja solubilidad en una disolución alcalina se disuelve en uno o más tipos de metanol o dimetilsulfóxido antes de la manipulación y se mezclan con la disolución alcalina.

25 El agente de tinción de la presente invención obtenido de esta manera se puede usar para la tinción de los hongos cutáneos tales como *Trichophyton*, hongos tales como *Candida*, *Malassezia*, y similares, y bacterias tales como las bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, y similares.

30 Se describirá ahora el método para detectar microorganismos que utilizan el agente de tinción de la presente invención.

35 Para detectar microorganismos que utilizan el agente de tinción de la presente invención, los microorganismos se tiñen aplicando el agente de tinción de la presente invención a una muestra tomada de una zona donde se piensa que los microorganismos están presentes y la muestra se deja reposar durante aproximadamente 20-30 minutos. Se pueden utilizar diversos tipos de muestras de acuerdo con la zona de extracción. Por ejemplo, cuando se va a detectar *Trichophyton* en el pie o el cabello, se toman muestras de queratina de la caspa, vesículas, revestimiento de vesículas, pápulas, y similares, cuando se va a detectar *Trichophyton* en las uñas, se toman muestras del sustrato de la placa de la uña, y similares, y cuando se va a detectar mentagra o kerion, se utiliza como muestra el cabello enfermo que se puede retirar fácilmente de una lesión. El agente de tinción de la presente invención se aplica usualmente a la muestra en una cantidad de aproximadamente algunas gotas.

45 Puesto que el agente de tinción de la presente invención tiene una elevada estabilidad térmica, el espécimen se puede calentar a 60-80° C durante aproximadamente 2-5 minutos utilizando una placa caliente a temperatura fija o similar después de aplicar el agente de tinción de la presente invención al espécimen con el fin de teñir el microorganismo en un corto periodo de tiempo.

50 El espécimen al cual se aplica el agente de tinción de la presente invención se coloca, por ejemplo, sobre un porta de vidrio, y se cubre con un cubre de vidrio, y la parte superior del cubre de vidrio se presiona ligeramente con una varilla de vidrio o similar a fin de diseminar la muestra en capas finas. A continuación se observa la presencia de tinción en la muestra utilizando un microscopio o similar con un aumento de 100-200x.

55 Tras confirmar la presencia de la tinción, la muestra se examina adicionalmente utilizando un microscopio con un aumento de 400x para detectar la presencia de hongos cutáneos tales como *Candida*, *Malassezia*, y similares en la muestra observando la forma parasítica de estos microorganismos. Se puede determinar la presencia de bacterias tales como bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas observando la muestra a un aumento de 1000x.

60 Mediante el uso del agente de tinción de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente, los microorganismos se pueden teñir en un periodo más corto de tiempo y detectarse de forma más correcta en comparación con los métodos convencionales de detección de microorganismos.

### Ejemplos

65 Se describirá ahora en detalle la presente invención por medio de ejemplos, que no deben tomarse como limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1

Agente de tinción (1):

- 5 Se añadió Chicago Sky Blue 6B (fabricado por Kanto Chemical Co., Inc) a una disolución de hidróxido de potasio al 20% a una concentración del 0,5%, se mezcló y se disolvió para obtener un agente de tinción.

Ejemplo 2

- 10 Tinción y detección de bacterias en una zona infectada con hongos (1)

Se utilizó como muestra tejido de una lesión (caspa) extraído de una zona sospechosa de estar infectada con epidermomicosis. La muestra se colocó sobre un porta de vidrio, se hizo gotear el agente de tinción del Ejemplo 1 sobre la muestra, y se dejó a la muestra reposar a temperatura ambiente durante 20-30 minutos a fin de ablandar la muestra. Después que la muestra se ablandó lo suficiente, se colocó un cubre de vidrio sobre la muestra, la parte superior del cubre de vidrio se presionó ligeramente con una varilla de vidrio o similar para diseminar la muestra en capas finas, y se observó la muestra utilizando un microscopio óptico.

15 Los resultados de la observación a un aumento de 100-200x confirmaron la presencia de microorganismos teñidos (azul). La observación adicional a un aumento de 400x confirmó la presencia de hongos cutáneos y una forma parasítica de *Candida* y *Malassezia*. La Fig. 1 muestra una fotomicrografía con un aumento de 400x.

Ejemplo 3

- 25 Tinción y detección de bacterias en una zona infectada con hongos (2):

Se llevaron a cabo la tinción y la observación microscópica de la misma manera que en el Ejemplo 2 excepto en que se calentó la muestra a 60-80° C durante 2-5 minutos utilizando una placa caliente a temperatura fija en vez de dejar reposar la muestra repose a temperatura ambiente.

30 Los resultados de la observación a un aumento de 100-200x confirmaron la presencia de microorganismos teñidos (azul). La observación adicional con un aumento de 400x confirmó la presencia de hongos cutáneos y una forma parasítica de *Candida* y *Malassezia*. Esto confirma que el calentamiento da lugar a que el agente de tinción de la presente invención tiña en un periodo de tiempo más corto.

Ejemplo 4

Efecto de metanol y dimetilsulfóxido sobre la detección de microorganismos (1):

- 40 Se prepararon los siguientes agentes de tinción que comprenden Chicago Sky Blue 6B y KOH a concentraciones fijas de 0,5% y 20%, respectivamente, y diversas concentraciones de metanol (MeOH) y dimetilsulfóxido (DMSO). Se evaluaron el grado de tinción celular de la muestra y de tinción de microorganismos basándose en los siguientes criterios. Las características de los agentes de tinción se evaluaron colectivamente. En la Tabla 1 se muestran los resultados.

45 (Concentración de MeOH y DMSO en el agente de tinción)

- 50 Agente de tinción A: MeOH 0% / DMSO 0%  
 Agente de tinción B: MeOH 10% / DMSO 0%  
 Agente de tinción C: MeOH 20% / DMSO 0%  
 Agente de tinción D: MeOH 30% / DMSO 0%  
 Agente de tinción E: MeOH 40% / DMSO 0%  
 Agente de tinción F: MeOH 0% / DMSO 1%  
 Agente de tinción G: MeOH 10% / DMSO 1%  
 55 Agente de tinción H: MeOH 20% / DMSO 1%  
 Agente de tinción I: MeOH 0% / DMSO 2,5%  
 Agente de tinción J: MeOH 10% / DMSO 2,5%  
 Agente de tinción K: MeOH 20% / DMSO 2,5%

- 60 Criterios de evaluación

Grado de tinción de las células de la muestra

Grado: Resultados de la evaluación  
 +++: Coloreado muy oscuro  
 ++: Coloreado oscuro

## ES 2 428 319 T3

- +: Coloreado en algún grado
- ±: Coloreado ligeramente
- : Sin colorante

Grado de tinción de los microorganismos

- Grado: Resultados de la evaluación
- +++ : Coloreado muy oscuro
  - ++ : Coloreado oscuro
  - + : Coloreado en algún grado
  - ± : Coloreado ligeramente
  - : Sin colorante

### 5 Evaluación global

- Grado: Resultados de la evaluación
- ⊙: Aplicabilidad práctica elevada como agente de tinción
  - O: Se puede usar como agente de tinción
  - Δ: Se puede usar como agente de tinción solo con problemas
  - x: No se puede usar como agente de tinción

Resultados

10

TABLA 1

Agente de tinción	Grado de tinción		Evaluación global
	Muestra de células	Microorganismos	
Agente de tinción A	± a ++	+ a +++	⊙
Agente de tinción B	- a +	++ a +++	⊙
Agente de tinción C	- a +	+++	⊙
Agente de tinción D	± a ++	++ a +++	O
Agente de tinción E	± a ++	+ a ++	Δ
Agente de tinción F	-	+ a ++	O
Agente de tinción G	±	++	⊙
Agente de tinción H	- a +	++ a +++	⊙
Agente de tinción I	-	+ a ++	O a Δ
Agente de tinción J	±	+ a ++	O
Agente de tinción K	-	++	O

Ejemplo 5

Agente de tinción (2):

15

Se añadieron Chicago Sky blue 6B y metanol a una disolución de hidróxido de sodio al 20% a una concentración del 0,5% y 20%, respectivamente, se mezclaron, y se disolvieron para obtener un agente de tinción.

Ejemplo 6

20

Agente de tinción (3):

Se mezclaron 5 mg de Rodamina B (fabricado por Aldrich) con 1 ml de dimetilsulfóxido para formar una disolución. Se añadieron 4 ml de agua a esta disolución. Esta disolución se mezcló y se disolvió con una disolución de hidróxido de potasio al 40% a una relación de 1:1 para obtener un agente de tinción.

25

Ejemplo 7

Tinción y detección de microorganismos en una zona infectada con hongos (3):

30

Se llevó a cabo la tinción y la observación microscópica de la misma manera que en el Ejemplo 2 excepto en que se utilizó el agente de tinción del Ejemplo 6. La Fig. 2 muestra una fotomicrografía a un aumento de 400x.

Los resultados de la observación a un aumento de 100-200x confirmaron la presencia de la tinción (rojo), por medio

de la cual se detectó la presencia de bacterias. Se observaron hongos cutáneos y la forma parasítica de *Candida* y *Malassezia* a un aumento mayor de 400x. La Fig. 2 muestra una microfotografía a un aumento de 400x.

Ejemplo 8

5 Efecto del metanol y del dimetilsulfóxido sobre la detección de microorganismos (2):

10 Se prepararon los agentes de tinción que comprendían Rodamina B y KOH a concentraciones fijas de 0,05% y 20%, respectivamente, y varias concentraciones de metanol (MeOH) y dimetilsulfóxido (DMSO) tal como se relaciona a continuación. Se evaluaron el grado de tinción de las células de la muestra y la tinción de los microorganismos según los criterios del Ejemplo 4. Se evaluaron las características globales de los agentes de tinción. En la Tabla 2 se muestran los resultados.

15 (Concentración de MeOH y DMSO en el agente de tinción)

- 15 Agente de tinción L: MeOH 10% / DMSO 0%
- Agente de tinción M: MeOH 25% / DMSO 0%
- Agente de tinción N: MeOH 0% / DMSO 10%
- 20 Agente de tinción O: MeOH 10% / DMSO 10%
- Agente de tinción P: MeOH 20% / DMSO 10%
- Agente de tinción Q: MeOH 30% / DMSO 10%
- Agente de tinción R: MeOH 40% / DMSO 10%
- Agente de tinción S: MeOH 0% / DMSO 25%

25 (Resultados)

TABLA 2

Agente de tinción	Grado de tinción		Evaluación global
	Muestra de células	Microorganismos	
Agente de tinción L	++	++	X a Δ
Agente de tinción M	+++	+	x
Agente de tinción N	± a +	+++	⊙
Agente de tinción O	± a +	+++	⊙
Agente de tinción P	± a ++	++ a +++	○
Agente de tinción Q	±	++	○
Agente de tinción R	-	+	Δ
Agente de tinción S	-	+	Δ

Ejemplo 9

30 Agente de tinción (4):

35 5 mg de Rodamina B se mezclaron con 1 ml de dimetilsulfóxido para formar una disolución. Se añadieron a la disolución 4 ml de agua. Esta disolución se mezcló y se disolvió con una disolución de hidróxido de sodio al 40% a una relación de 1:1 para obtener un agente de tinción.

Ejemplo Comparativo 1

40 Agente de tinción comparativo (1):

45 Se añadió Azul de Anilina (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd) a una disolución de hidróxido de potasio al 20% a una concentración del 1%, se mezcló, y se disolvió para obtener un agente de tinción comparativo. La tinción y la observación microscópica se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 2 utilizando este agente de tinción. Sin embargo, no se pudo confirmar la tinción y no se detectaron microorganismos.

Ejemplo Comparativo 2

Agente de tinción comparativo (2):

50 Se añadieron Azul Brillante R (fabricado por Sigma) y dimetilsulfóxido a una disolución de hidróxido de potasio al 20% a una concentración de 0,5% y 10%, respectivamente, se mezclaron, y se disolvieron para obtener un agente de tinción. La tinción y la observación microscópica se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 2

utilizando este agente de tinción. Sin embargo, no se pudo confirmar la tinción y no se detectaron microorganismos.

Ejemplo Comparativo 3

5 Agente de tinción comparativo (3):

10 Un cartucho de tinta de repuesto de azul-negro de Platinum (fabricado por Platinum Pen Co., Ltd) se mezcló y se disolvió con una disolución de hidróxido de sodio al 40% a una relación de 1:1 para obtener un agente de tinción comparativo. La tinción y la observación microscópica se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 2 utilizando este agente de tinción. Sin embargo, no se pudo confirmar la tinción y no se detectaron microorganismos.

Ejemplo Comparativo 4

15 Agente de tinción comparativo (4):

20 Un cartucho de tinta de repuesto azul-negro Uni-Ball Shigno UMR-85N (fabricado por Mitsubishi Pencil Co., Ltd) se mezcló y disolvió con una disolución de hidróxido de sodio al 40% a una relación de 1:1 para obtener un agente de tinción comparativo. La tinción y la observación microscópica se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 2 utilizando este agente de tinción. Sin embargo, no se pudo confirmar la tinción y no se detectaron los microorganismos.

**Aplicabilidad industrial**

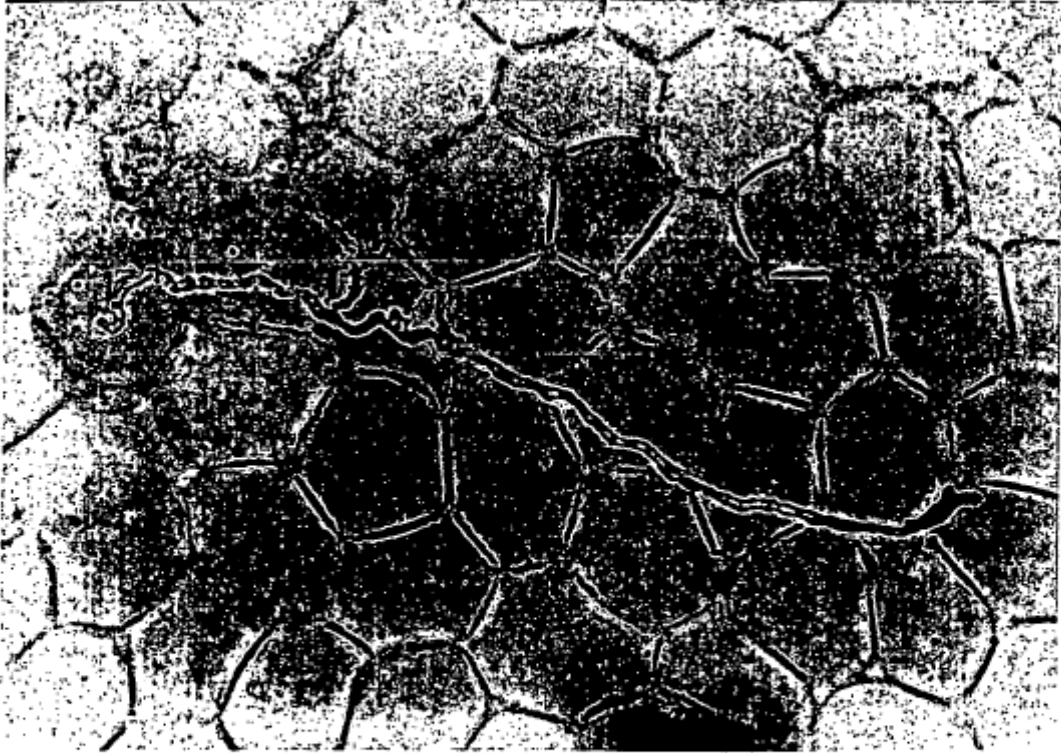
25 El agente de tinción de la presente invención se puede utilizar en una tinción y detección rápida de microorganismos tales como hongos y bacterias. El agente de tinción de la presente invención tiene una estabilidad durante el almacenamiento y una estabilidad térmica elevadas, no ocasionando por tanto problemas tales como la reducción de la capacidad de tinción resultante del almacenamiento durante un largo periodo de tiempo y el calentamiento durante la tinción.

30 Por tanto, el agente de tinción de la presente invención es muy eficaz en la tinción de microorganismos tales como hongos y bacterias.

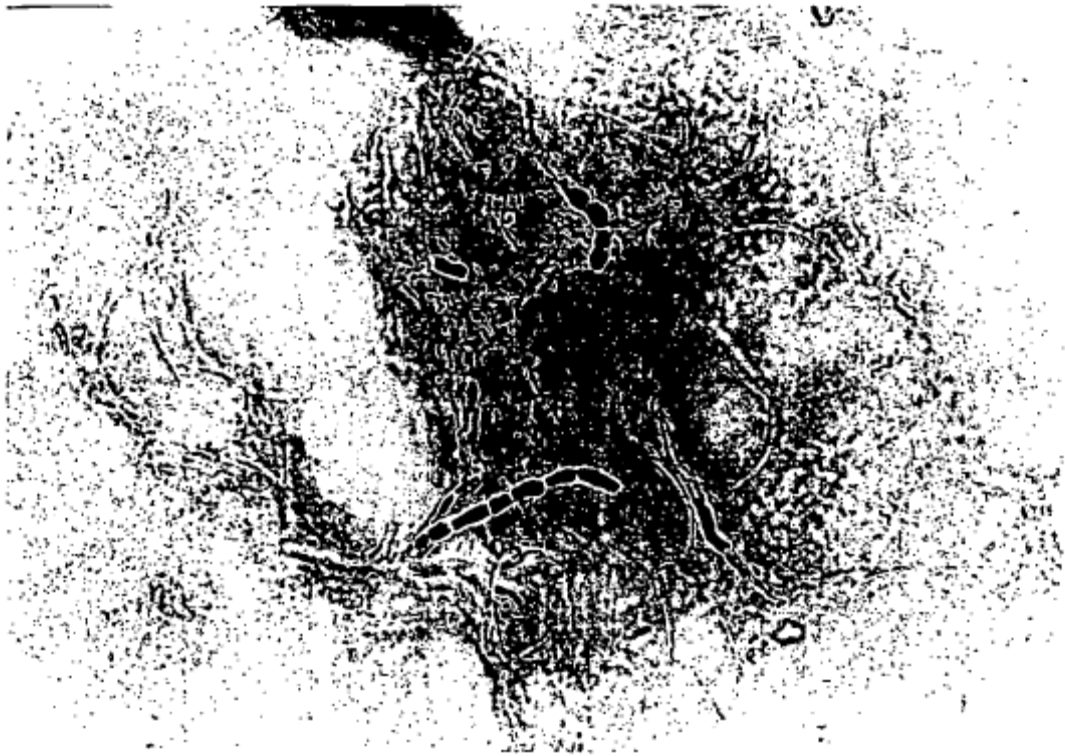
**REIVINDICACIONES**

1. Un agente de tinción de microorganismos que comprende una sustancia alcalina en una cantidad de 15-30% en masa y un colorante seleccionado entre Chicago Sky Blue 6B t Rodamina B
- 5 2. El agente de tinción de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además metanol y/o dimetilsulfóxido.
- 10 3. El agente de tinción de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el microorganismo que se va a teñir es un hongo.
4. El agente de tinción de microorganismos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el microorganismo que se va a teñir es una bacteria.
- 15 5. Un método para detectar microorganismo que comprende aplicar el agente de tinción de microorganismos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a una muestra que comprende microorganismos para teñir los microorganismos, seguido por la detección de los microorganismos teñidos.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la muestra se calienta a 60-80° C durante 2-5 minutos tras añadir el agente de tinción de microorganismos a la muestra.





***FIG. 1***



**FIG. 2**