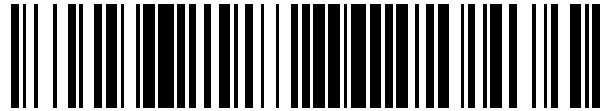


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 535**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008 E 08731103 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2122323**

54 Título: **Método y aparato para la tinción automatizada de materiales biológicos**

30 Prioridad:

02.03.2007 US 892736 P

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

20.12.2013

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive, Mail Code 110 Franklin Lakes
New Jersey 07417 , US**

72 Inventor/es:

BERNDT, KLAUS, W.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 435 535 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

Método y aparato para la tinción automatizada de materiales biológicos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención presente trata de métodos y aparatos para la tinción de material biológico con el propósito de detectar e identificar microorganismos que causan enfermedades. Más en particular, la invención presente trata de métodos y aparatos para realizar la tinción Gram automatizada en portaobjetos de microscopios.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La tinción de Gram es uno de los procedimientos realizados con más frecuencia en los laboratorios de microbiología modernos. Tales procedimientos se utilizan ampliamente para clasificar las bacterias como "Gram positivas" o "Gram negativas". Tras fijar una muestra que contiene bacterias en un portaobjetos de microscopio, la muestra se trata utilizando agentes de tinción como por ejemplo cristal de violeta en combinación con el yodado de Gram. El primer paso tiñe todas las bacterias de un azul oscuro o violeta. La diferencia principal entre las bacterias "Gram positivas" o "Gram negativas" es que en las muestras "Gram positivas", los agentes de tinción se absorben dentro de la estructura celular completamente, mientras que en las muestras "Gram negativas" la tinción ocurre únicamente superficialmente. En consecuencia, cuando la muestra es tratada a continuación con un agente decolorante (como por ejemplo alcohol ácido), las bacterias Gram negativas tienden a perder su color, mientras que las bacterias Gram positivas continúan teñidas de azul o violeta.

La tinción Gram se prepara convencionalmente y se analiza manualmente. La tinción Gram manual es intensiva en mano de obra, requiere personal adiestrado, y puede fallar al conseguir unas características de tinción óptimas en la muestra preparada. Una tinción no óptima puede producir falsos Gram positivos así como falsos Gram negativos.

Ha habido diferentes intentos para automatizar el procedimiento de tinción Gram. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos número 4,029,470 de Wilkins et al. ("Wilkins"). De manera similar, el Aerospray Slide Stainer, suministrado comercialmente por Wescor, Inc. de Logan, Utah, es un aparato para la tinción automatizada rudimentario. Otros dispositivos de tinción incluyen el Midas III Slide Stainer, suministrado comercialmente por Merck KGaA de Darmstadt, Alemania; el Poli Stainer, que es suministrado comercialmente por IUL Instruments GmbH de Koenigswinter, Alemania; y el Automated Gram Stainer, suministrado comercialmente por GG&B Company de Wichita Falls, Texas y descrito de manera general en el documento de Patente de los Estados Unidos número 6,468,764 de Gibbs et al. Ninguno de estos instrumentos o técnicas, sin embargo, permiten la capacidad de aplicar tinte y / o agentes decolorantes antes, durante y / o después del examen y / o del procesamiento de la imagen de la muestra en el portaobjetos.

En consecuencia, existe una necesidad para un método y un sistema de tinción automatizada mejorada.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

la invención presente, en varias realizaciones, proporciona un método y un sistema que soluciona muchos problemas técnicos en relación con la optimización de los procedimientos de tinción (como por ejemplo la tinción Gram) de muestras biológicas. El método de la invención comprende generar una imagen diferencial basada al menos en parte en una comparación de las imágenes de la muestra grabadas antes y después de la aplicación del agente de tinción y del agente decolorante a la muestra, y en la corrección de la aplicación del agente de tinción y del agente decolorante en base al menos en parte a la imagen diferencial. El método comprende además aplicar de nuevo al menos uno de los agentes de tinción y de so agentes decolorantes de acuerdo con el paso de corrección y generar una imagen final de la muestra de manera que se diferencia al menos un objeto de interés en la muestra que puede ser hallado discernible por el paso de reaplicación.

Algunas realizaciones proporcionan además un método para realizar un procedimiento de tinción de una muestra que comprende los pasos para grabar una primera imagen de la muestra y aplicar un agente de tinción a la muestra de manera que se prepare una muestra teñida que comprende una pluralidad de entidades teñidas. Algunas realizaciones del método comprenden además los pasos de lavar la muestra con una solución de limpieza antes de grabar la primera imagen de la muestra para asegurar que cada muestra es lavada para establecer un nivel "cero" de tinción antes de grabar la primera imagen (lo que proporciona una base de comparación con las imágenes grabadas de la muestra tras la aplicación de al menos uno de los agentes de tinción o de los agentes decolorantes).

La pluralidad de entidades teñidas puede incluir al menos una de las pluralidades de entidades teñidas o de la pluralidad de entidades teñidas superficialmente. En algunas de tales realizaciones, el agente de tinción puede comprender un tinte Gram de manera que las entidades teñidas superficialmente, si están presentes, comprendan una pluralidad de entidades Gram negativas, de manera que las entidades teñidas, si están presentes, comprendan una pluralidad de entidades Gram positivas. El método puede comprender además grabar una segunda imagen de la muestra teñida y generar una primera imagen diferencial comparando la segunda imagen con la primera imagen de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas en la superficie.

- 5 El método puede comprender además aplicar un agente decolorante a la muestra teñida de manera que se prepare una muestra parcialmente decolorada en la que al menos una parte del agente de tinción es eliminado de las entidades teñidas superficialmente, y grabar una tercera imagen de la muestra parcialmente decolorada. El método puede comprender también generar una segunda imagen diferencial comparando la tercera imagen con la segunda imagen de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente sobre la superficie. Finalmente, el método puede comprender analizar la segunda imagen diferencial para determinar un tiempo de exposición durante el cual el agente decolorante podría ser aplicado a la muestra parcialmente decolorada para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas.
- 10 En algunas realizaciones, el método puede comprender también aplicar el agente decolorante a a muestra parcialmente decolorada para determinar el tiempo de exposición de manera que se prepare una muestra sustancialmente decolorada mientras las entidades teñidas superficialmente son decoloradas sustancialmente y en la que las entidades tintadas no son decoloradas sustancialmente. En algunas de dichas realizaciones, el método puede comprender además: (1) grabar una cuarta imagen de la muestra sustancialmente decolorada; (2) generar una tercera imagen diferencial comparando la cuarta con la segunda imagen, en el que la tercera imagen diferencial muestra la posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente en la superficie; y (3) generar una cuarta imagen diferencial comparando la cuarta imagen con la primera imagen, en el que la cuarta imagen diferencial muestra una posición de al menos una de las entidades teñidas sobre la superficie. En realizaciones del método en la que las posiciones de las entidades teñidas y de las entidades teñida superficialmente son discernibles al menos parcialmente en al menos una de la tercera o de la cuarta imagen diferencial, el método puede comprender también analizar una morfología de las entidades teñidas y / o de las entidades teñidas superficialmente.
- 15 20 25 El sistema de la invención presente comprende una cámara de flujo que define un canal en comunicación fluida con un suministro de un agente de tinción y un suministro de un agente decolorante. Además, en algunas de tales realizaciones, la cámara de flujo puede comprender una superficie configurada para engranar operativamente la muestra con ella. El sistema comprende también un sistema de fluidos en comunicación fluida con la cámara de flujo, el suministro de agente de tinción, y / o el suministro de agente decolorante. Además, el sistema de fluidos de la invención (en cooperación con la cámara de flujo, por ejemplo) está configurado para aplicar el agente de tinción a la muestra de manera que se prepare una mezcla teñida comprendiendo una pluralidad de entidades teñidas, en el que la pluralidad de entidades teñidas puede incluir al menos una de una pluralidad de entidades teñidas y de una pluralidad de entidades teñidas superficialmente. Como se ha descrito anteriormente con respecto a varios realizaciones del método de la invención presente, el agente de tinción puede comprender un tinte Gram de manera que las entidades teñidas superficialmente, si están presentes, comprenda una pluralidad de entidades Gram negativas, y de manera que las entidades teñidas, si están presentes, comprenda una pluralidad de entidades Gram positivas. El sistema de fluidos de la invención (en cooperación con la cámara de flujo, por ejemplo) está configurado además para aplicar un agente decolorante a la muestra teñida de manera que se prepare una muestra parcialmente decolorada en la que al menos una parte del tinte se retire de las entidades teñidas superficialmente.
- 30 35 40 El sistema de la invención comprende un sistema de imagen dispuesto adyacente a la cámara de flujo de manera que la muestra se coloque dentro del campo de visión del sistema de imagen. En tales realizaciones del sistema, el sistema de imagen puede estar configurado para monitorizar una aplicación de al menos uno de los agentes de tinción o de los agentes decolorantes a través de la cámara de flujo. Además, el sistema de imagen está configurado para generar una imagen diferencial comparando al menos una imagen de la muestra obtenida antes de la primera aplicación del agente decolorante y al menos una imagen de la muestra obtenida tras la primera aplicación del agente decolorante. El sistema de imagen puede estar configurado también para ser capaz de determinar un tiempo de exposición para una segunda aplicación del agente decolorante en base al menos en parte en la imagen diferencial de manera que se decoloren sustancialmente las entidades teñidas superficialmente sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas de manera que las entidades teñidas puedan ser distinguidas más fácilmente de las entidades teñidas superficialmente.
- 45 50 Además, el sistema de la invención comprende un dispositivo controlador en comunicación con el sistema de imagen y con el sistema de fluidos. El dispositivo de control está configurado además para controlar la aplicación de al menos uno de los agentes de tinción o de los agentes decolorantes en base al menos en parte en las imágenes y / o en las imágenes diferenciales generadas por el sistema de imagen. En varias realizaciones del sistema, la cámara de flujo puede estar adaptada para recibir un portaobjetos que define la superficie para interactuar operativamente con la muestra en ella. De acuerdo con tales realizaciones, la cámara de flujo puede comprender además un alojamiento del canal de flujo que define una abertura del portaobjetos configurado para recibir el portaobjetos de manera que la muestra esté dispuesta sustancialmente entre el portaobjetos y el alojamiento del canal de flujo cuando el portaobjetos esté dispuesto en la abertura del portaobjetos. Además, el alojamiento del canal de flujo puede comprender un material sustancialmente traslúcido de manera que el sistema de imagen sea capaz de grabar imágenes de la muestra mientras la muestra está dispuesta entre el portaobjetos y el alojamiento del canal de flujo.
- 55 60 65 En algunas realizaciones del sistema, el sistema de imagen puede comprender un dispositivo de cámara configurado para ser capaz de granar imágenes de la muestra mientras la muestra esta dispuesta en la cámara de

- flujo (como por ejemplo entre el portaobjetos y el alojamiento del canal de flujo). De acuerdo con algunas de tales realizaciones, el sistema de imagen puede comprender también un dispositivo actuador que interactúa operativamente con el dispositivo de cámara y que está configurado para ajustar una posición del dispositivo de cámara en relación con la cámara de flujo. Además, en algunas realizaciones del sistema, el sistema de imagen puede comprender también una computadora de procesamiento de imagen configurada para generar una imagen diferencial. En algunas de tales realizaciones, la computadora de procesamiento de imagen puede estar configurada para generar la imagen diferencial usando procesos que pueden incluir, pero no estar limitados a: sustracción de imagen; adición de imagen; cálculo del ratio de imagen; y combinaciones de tales procesos.
- Tal como se describe aquí en general con respecto a varias realizaciones del método, el sistema de imagen puede estar configurado para grabar una primera imagen de la muestra y grabar a continuación una segunda imagen de la muestra teñida tras aplicar el agente de tinción a la muestra utilizando el sistema de fluidos en cooperación con la cámara de flujo. El sistema de imagen puede estar configurado además para generar una primera imagen diferencial comparando la segunda imagen con la primera imagen de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas (esto es de las entidades "Gram positivas", en algunas realizaciones) sobre la superficie. Además, el sistema de imagen puede estar configurado además para grabar una tercera imagen de la muestra parcialmente decolorada tras aplicar el agente decolorante utilizando la cámara de flujo, y a continuación generar una segunda imagen diferencial comparando la tercera imagen con la segunda imagen de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente (esto es de las entidades "Gram negativas", en algunas realizaciones). El sistema de imagen puede ser configurado además para analizar la segunda imagen diferencial para determinar un tiempo de exposición durante el cual el agente decolorante debe ser aplicado a la muestra parcialmente decolorada para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas. Tal como se describe aquí, en algunas de dichas realizaciones del sistema, la cámara de flujo puede ser configurada además para aplicar el agente decolorante a la muestra parcialmente decolorada para determinar el tiempo de exposición de manera que se prepare una muestra sustancialmente decolorada en la que las entidades teñidas superficialmente, si están presentes, sean decoloradas sustancialmente y en el que la entidades teñidas, si están presentes, no sean sustancialmente decoloradas.
- En algunas de tales realizaciones del sistema, el sistema de imagen puede estar configurado además para grabar una cuarta imagen de la muestra sustancialmente decolorada y a continuación generar una tercera imagen diferencial comparando la cuarta imagen con la segunda imagen. La tercera imagen diferencial puede describir la posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente. El sistema de imagen puede ser configurado también para generar una cuarta imagen diferencial comparando la cuarta imagen con la primera imagen, en la que la cuarta diferencial describe una posición de al menos una de las entidades teñidas.
- BREVE DESCRIPCION DE LAS DIFERENTES VISTAS DE LOS DIBUJOS**
Habiendo descrito así la invención en términos generales, será hecha ahora referencia a los dibujos que se acompañan, que no están dibujados necesariamente a escala, y en los que:
- Las Figuras 1 a 10 muestran unas series de imágenes de "línea sencilla" grabadas de una muestra que contiene tanto entidades teñidas (esto es Gram positivas, por ejemplo) como superficialmente teñidas (esto es Gram negativas, por ejemplo).
La Figura 1 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de una muestra no teñida, que corresponde a una primera imagen.
La Figura 2 muestra un esquema no limitativo de una "línea sencilla" de una muestra, mostrando las posiciones de las entidades teñidas (esto es entidades Gram positivas) en la muestra.
La Figura 3 muestra un esquema no limitativo de una "línea sencilla" de una muestra, mostrando las posiciones de entidades teñidas superficialmente (esto es entidades Gram negativas) en la muestra.
La Figura 4 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de una muestra teñida, que corresponde a una segunda imagen.
La Figura 5 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de la muestra, que corresponde a una primera imagen diferencial, que destaca las posiciones de las entidades teñidas y teñidas superficialmente de la muestra;
La Figura 6 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de la muestra, que corresponde a una tercera imagen, producida tras una decoloración del 35 % de la muestra;
La Figura 7 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de la muestra, que corresponde a una segunda imagen diferencial, que destaca el efecto de la decoloración del 35 % en las entidades teñidas superficialmente de la muestra;
La Figura 8 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de la muestra, que corresponde a una cuarta imagen, producida tras una decoloración del 100 % de la muestra;
La Figura 9 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de la muestra, que corresponde a una tercera imagen diferencial, que destaca las posiciones de las entidades teñidas superficialmente (esto es Gram negativas, por ejemplo) de la muestra;
La Figura 10 muestra una representación no limitativa de una imagen de "línea sencilla" de la muestra, que corresponde a una cuarta imagen diferencial, que destaca las posiciones de las entidades teñidas (esto es Gram positivas, por ejemplo) en la muestra;

Las Figuras 11 a 19 muestran una serie de imágenes de “línea sencilla” grabadas de una mezcla que contiene únicamente entidades teñidas (esto es Gram positivas, por ejemplo), de acuerdo con una realización de la invención presente;

5 La Figura 11 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra no teñida, que corresponde a una primera imagen, producida de acuerdo con una realización de la invención presente;

La Figura 12 muestra un esquema no limitativo de la “línea sencilla” de la muestra, mostrando las posiciones de las entidades teñidas (esto es entidades Gram positivas) de la muestra, de acuerdo con una realización de la invención presente;

10 La Figura 13 muestra un esquema no limitativo de una “línea sencilla” de la muestra, mostrando la ausencia de entidades teñidas superficialmente (esto es entidades Gram negativas) en la muestra, de acuerdo con una realización de la invención presente;

La Figura 14 muestra una descripción no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra teñida que corresponde a una segunda imagen, producida de acuerdo con una realización de la invención presente;

15 La Figura 15 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra, que corresponde a una primera imagen diferencial, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, destacando las posiciones de las entidades teñidas de la muestra;

La Figura 16 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de la muestra, que corresponde a una tercera imagen, producida de acuerdo con una realización de la invención presente tras una decoloración del 35 % de la muestra;

20 La Figura 17 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de la muestra, que corresponde a una segunda imagen diferencial, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, describiendo además la ausencia de entidades teñidas superficiales en la muestra;

25 La Figura 18 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de la muestra, que corresponde a una tercera imagen diferencial, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, destacando la ausencia de entidades teñidas superficialmente (esto es Gram negativas, por ejemplo) en la muestra;

La Figura 19 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra, que corresponde a una cuarta imagen diferencial, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, destacando las posiciones de las entidades teñidas (esto es Gram positivas, por ejemplo) de la muestra;

30 Las Figuras 20 a 29 muestran una serie de imágenes de “línea sencilla” grabadas de una muestra que contiene únicamente entidades teñidas superficialmente (esto es Gram negativas, por ejemplo), de acuerdo con una realización de la invención presente;

La Figura 20 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra no teñida, que corresponde a una primera imagen, producida de acuerdo con una realización de la invención presente;

35 la Figura 21 muestra un esquema no limitativo de una “línea sencilla” de una muestra, que muestra la ausencia de entidades teñidas (esto es entidades Gram positivas) en la muestra, de acuerdo con una realización de la invención presente;

La Figura 22 muestra un esquema no limitativo de una “línea sencilla” de una muestra, mostrando la posición de las entidades teñidas superficialmente (esto es entidades Gram negativas) en la muestra, de acuerdo con una realización de la invención presente;

40 La Figura 23 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra teñida, que corresponde a una segunda imagen, producida de acuerdo con una realización de la invención presente;

La Figura 24 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra, que se corresponde con una primera imagen diferencial, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, que destaca la posición de las entidades teñidas superficialmente en la muestra;

45 La Figura 25 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra, que corresponde a una tercera imagen, producida de acuerdo con una realización de la invención presente tras una decoloración del 35 % de la muestra;

50 La Figura 26 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de una muestra, que corresponde a una segunda imagen diferencia, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, destacando el efecto de la decoloración del 35 % en las entidades teñidas superficialmente de la muestra;

La Figura 27 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de la muestra, que corresponde a una cuarta imagen, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, tras una decoloración del 100 % de la muestra;

55 La Figura 28 muestra una representación no limitativa de una imagen de “línea sencilla” de la muestra, que corresponde a una tercera imagen diferencial, producida de acuerdo a una realización de la invención presente, destacando la posición de las entidades teñidas superficialmente (esto es Gram negativas, por ejemplo) en la muestra;

60 La Figura 29 muestra una representación no imitativa de una imagen de “línea sencilla” de la muestra, correspondiente a una cuarta imagen diferencial, producida de acuerdo con una realización de la invención presente, destacando la ausencia de entidades teñidas (esto es Gram positivas, por ejemplo) en la muestra;

La Figura 30 muestra un diagrama de flujo no limitativo que resume los pasos del método para realizar un procedimiento de tinción para una muestra, de acuerdo con una realización de la invención presente;

65 La Figura 31 es una representación esquemática no limitativa de un sistema mostrando un sistema de imagen dispuesto adyacente a una cámara de flujo configurada para aplicar un agente de tinción y / o un agente decolorante a una muestra;

La Figura 32 es una representación esquemática no limitativa de un sistema de acuerdo con una realización de la invención presente, incluyendo un canal de flujo y un sistema de imagen que incluye un dispositivo de cámara, un dispositivo actuador, una computadora de procesamiento de imagen, y un controlador del sistema;

La Figura 33 muestra varias vistas no imitativas de una cámara de flujo, incluyendo la cámara de flujo un portaobjetos que define la superficie para interactuar de manera operativa la muestra en la misma y un alojamiento del canal de flujo que define una apertura de portaobjetos configurado para recibir el portaobjetos;

La Figura 34 muestra varias vistas no limitativas de una cámara de flujo, mostrando los pasos para interactuar operativamente un portaobjetos con un alojamiento del canal de flujo de la cámara de flujo;

La Figura 35 muestra un esquema no limitativo de una cámara de flujo y de un sistema de imagen dispuesto adyacente a la cámara de flujo; y

La Figura 36 muestra un diagrama de flujo no limitativo que resume los pasos del método para un método para teñir óptimamente una muestra, de acuerdo con la invención presente.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención presente será descrita ahora más completamente mediante referencia a los dibujos que la acompañan, en los que se muestra algunas, pero no todas, las realizaciones de la invención. A lo largo de ella los números de referencia iguales indican elementos iguales.

Aunque las diferentes realizaciones del método y del sistema descritas aquí están explicadas en el contexto de un procedimiento de tinto Gram, se debe comprender que las diferentes realizaciones del método y del sistema descritas aquí pueden ser aplicadas también a otros muchos procedimientos de tinto que puede causar cambios ópticos y / o colorimétricos en una muestra.

Se debe considerar también que los términos "imágenes grabadas" tal como se usa aquí no se limita a la captura de imágenes analógicas mediante una cámara, por ejemplo. En particular, en algunas realizaciones "grabado de imágenes" se puede referir a la captura de datos que es indicativa de una imagen y / o se corresponde con una imagen. Por ejemplo, "grabando imágenes" puede comprender, en alguna realizaciones, recoger datos digitales que corresponden al color y / o a la intensidad de luz en uno o más puntos de una superficie.

Se debe comprender que varias realizaciones del método y del sistema de la invención presente toman ventaja del hecho de que el proceso de tinción (como por ejemplo el proceso de tinción Gram) puede producir cambios ópticos distinguibles y / o detectables en la muestra. Monitorizando tales cambios durante el proceso de tinción directamente en una superficie (como por ejemplo el portaobjetos de un microscopio) con la que la muestra está relacionada operativamente, los pasos de tinción y decoloración posterior pueden ser controlados y optimizados. Este aspecto de la invención presente puede ser aplicado, en particular, a los pasos de decoloración. Por ejemplo, se conoce que en un proceso de tinción Gram, una decoloración demasiado suave puede conducir a falsos Gram positivos, y que una decoloración demasiado intensa puede conducir a falsos Gram negativos. Tal como se describe aquí, varias realizaciones de la invención presente pueden ayudar a mejorar el grado de decoloración en una variedad de procesos de tinción (incluyendo, por ejemplo, el proceso de tinto Gram).

Se debe comprender también que varias realizaciones de la invención presente pueden utilizar también diferentes imágenes (véase, por ejemplo, las Figuras 5, 7, 9, 10) para destacar cambios ópticos discernibles y / o detectables que pueden ocurrir de manera diferente para entidades Gram positivas y entidades Gram negativas en la muestra, permitiendo la clasificación de estas entidades (que pueden incluir, pero no se limitan a, entidades bacterianas Gram teñidas). Tal como se describe aquí, varias realizaciones del sistema y el método de la invención presente pueden permitir la determinación precisa de las posiciones específicas de bacterias Gram positivas, si están presentes, y / o bacterias Gram negativas en la superficie con la cual la muestra está relacionada operativamente (como por ejemplo el típico portaobjetos de un microscopio) analizando, por ejemplo, varias imágenes diferentes generadas comparando imágenes del portaobjetos tomadas antes y después del paso de decoloración parcial (véase el paso 107, de la Figura 30, por ejemplo) y / o antes y después de un paso de decoloración completa (véase el paso 112, Figura 30, por ejemplo).

Tal como se muestra en general en la Figura 30, se pueden utilizar varios métodos para realizar un procedimiento de tinto (como por ejemplo un procedimiento de tinto Gram) para una muestra (véase, por ejemplo, el elemento 32 de las Figuras 34 y 35). En una realización, el método comprende el paso 103 para grabar una primera imagen de la muestra 32. La Figura 1 muestra una primera imagen de ejemplo de la muestra 32 generada en una realización del método utilizada para optimizar un proceso de tinto Gram en el que están presentes tanto bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas en una muestra no teñida 32 que está fijada sobre una superficie 30 (definida por un portaobjeto de un microscopio, tal como se muestra en la Figura 34, por ejemplo). De acuerdo con varias realizaciones, que no están de acuerdo con la invención presente, el paso 103 puede comprender grabar una serie de primeras imágenes en diferentes campos de la muestra no teñida 32. Se debe comprender que la Figura 1 muestra una línea sencilla de ejemplo a través de una primera imagen. Debido a que otros pasos del método par aplicar un agente de tinción (véase el paso 104, Figura 30, por ejemplo) puede comprender colorear las entidades en la muestra con un color esencialmente azul, la primera imagen mostrada en general en la Figura 1 puede ser grabada en el paso 103 utilizando un filtro de color azul dispuesto entre la muestra 32 y un dispositivo de cámara (como por ejemplo una cámara CCD (véanse los elementos 5 y 8 de la Figura 32, por ejemplo)).

La primera imagen de la Figura 1 puede servir como imagen "inicial" a partir de la cual se puede producir una primera imagen diferencial (véase la Figura 5, por ejemplo) (por comparación con una segunda imagen de la mezcla teñida (Figura 4) con respecto a la primera imagen (Figura 1)). Se debe comprender que para los propósitos de este ejemplo las Figuras 2 y 3 muestran las posiciones de las entidades teñidas y teñidas superficialmente dentro de la muestra (correspondientes, por ejemplo, a bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente, presentes en la muestra). Por ejemplo, la Figura 2 es una ilustración simbólica que indica la posición de las bacterias Gram positivas presentes en la muestra a lo largo del campo de imagen de una línea sencilla descrita anteriormente con respecto a la Figura 1. La Palabra "presente" en el eje Y significa en el contexto del Figura 2 que un detector funcional (como por ejemplo un sistema de imagen y / o de un dispositivo de cámara 8, por ejemplo) para detectar bacterias Gram positivas con una resolución espacial produciría una señal en las posiciones X indicadas en el eje X de la Figura 2. Además, la Figura 3 es una ilustración simbólica que indica las posiciones de las bacterias Gram negativas presentes en la mezcla a lo largo del campo de imagen de línea sencilla descrito anteriormente con respecto a la Figura 1. La palabra "presencia" en el eje Y significa en el contexto de la Figura 3 que un detector funcional (como por ejemplo un sistema de imagen) para detectar bacterias Gram negativas con una resolución espacial producirá una señal en las posiciones X indicadas en el eje X de la Figura 3.

Como se muestra en general en la Figura 30 varios pasos de preparación de la muestra deben ser realizados antes el paso 103 para grabar una o más imágenes iniciales tal como se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, algunas realizaciones del método pueden comprender el paso 101 para aplicar la muestra o el espécimen a una superficie (como un portaobjetos de microscopio) y fijar la muestra al mismo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra 32 (véase la Figura 34, por ejemplo) puede estar dispuesta y fijada térmicamente (a través de la aplicación de una fuente de calor, por ejemplo) sobre el portaobjeto del microscopio 30 que define una superficie dentro de un área 31 de fijación de la muestra típica. La Figura 34B es una vista lateral de ejemplo del portaobjeto 30 con una muestra 32 fijada.

Tal como se describe aquí, el portaobjetos preparado 30 puede ser a continuación "sumergido" en un alojamiento de un canal de flujo (véase en general las Figuras 34B y 34C) que define una abertura del portaobjetos configurada para recibir el portaobjetos 30 de manera que la muestra 32 sea colocada sustancialmente entre el portaobjetos 30 y el alojamiento del canal de flujo cuando el portaobjetos es colocado en la abertura del portaobjetos. Como se describirá más en detalle aquí, el alojamiento del canal de flujo puede comprender un material sustancialmente translúcido de manera que el sistema de imagen 5 (véase la Figura 35, por ejemplo) pueda ser capaz de grabar imágenes de la muestra mientras la muestra está dispuesta entre el portaobjetos 30 y el alojamiento del canal de flujo. El alojamiento del canal de flujo puede comprender un cuerpo desechable estructurado de manera que el portaobjetos de microscopio 30 sumergido y una cuberita de cristal, que puede estar integrada en el cuerpo, puedan formar una celda de conducción de flujo para la aplicación de soluciones de lavado (véase el paso 102, por ejemplo), agentes decolorantes (véase los pasos 107 y 112, por ejemplo) y / o la aplicación de agentes colorantes (véase el paso 104, por ejemplo). La celda de conducción de flujo resultante (o canal de flujo, como se describirá a continuación aquí) puede comprender un puerto de entrada y un puerto de salida para los agentes de lavado, decolorantes y colorantes. Un ejemplo de canal de flujo desechable completo se muestra en general en la Figura 34D, y es mostrado orientado para ser colocado en un escenario de sistema de imagen (como por ejemplo un escenario de un microscopio, por ejemplo) en la Figura 34E.

Se debe comprender que los varios pasos del método para lavar (paso 102), aplicar un agente colorante (paso 104), y aplicar un agente decolorante (pasos 107 y 112, por ejemplo) pueden ser realizados mediante una variedad de lavados y / o técnicas de aplicación de fluido diferentes de aquellas descritas aquí con respecto a las realizaciones de sistema de cámara de flujo descritas, por ejemplo, en las Figuras 34D y 34E. Por ejemplo, la aplicación de soluciones de lavado, agentes de tinción, y / o agentes decolorantes puede ser realizada mediante una variedad de procedimiento de laboratorio conocidos, incluyendo, pero no limitador por: pipeteado; aspiración; mezcla; centrifugado; y combinaciones de tales procesos.

Además, como se muestra en general en la Figura 30, algunas realizaciones del método pueden comprender además el paso 102 para lavar la muestra con una solución de lavado antes de grabar la primera imagen de la muestra. Por ejemplo, el paso 102 puede comprender introducir una solución de lavado sustancialmente incolora en un canal de flujo o en otro espacio definido entre la superficie sobre la que la muestra 32 está relacionada operativamente y una cubierta deslizante (y / o un alojamiento del canal de flujo configurado para recibir un portaobjetos de microscopio que define la superficie). La solución de lavado puede ser rociada a través del canal de flujo al objeto de "acondicionar" o "dar una imprimación" a la muestra, poniéndola en contacto con un líquido (así como a las entidades biológicas que constituyen la muestra). El paso de lavado 102 puede ser importante para los pasos posteriores de comparar las diferentes imágenes entre si, (esto es cuando se generan imágenes diferenciales) porque el paso 102 puede asegurar que las diferentes entidades dentro de la muestra absorben de manera adecuada y característica o absorben superficialmente de manera adecuada y característica el agente de tinción que puede ser aplicado, por ejemplo, en el paso 104 (tal como se describirá más adelante aquí). Además, el paso de lavado 102 puede también rellenar ventajosamente el espacio entre la muestra y la cubierta deslizante (o alojamiento del canal de flujo) con el fluido de lavado sustancialmente incoloro que puede, a su vez, proporcionar

también unas condiciones de imagen mejoradas cuando se graban las imágenes (véase el paso 103, por ejemplo) de la muestra.

5 Como es conocido para las personas versadas en la técnica de la tinción Gram, cada paso de tinto y cada paso de decoloración comprende un paso parcial de lavar la muestra con una solución de lavado como por ejemplo agua para retirar cualquier exceso de la solución de tinción o del agente decolorante. Por simplicidad, no mencionamos estos pasos parciales y los consideramos como si fueran una parte integral del paso de tinción y / o el paso de decoloración. El paso de lavado 102, que se aplica antes de cualquier paso de tinción o decoloración, es la única excepción, como se ha mencionado antes.

10 En referencia de nuevo a la Figura 30, después de que sea grabada una primera imagen inicial (véase la Figura 1, por ejemplo) de una muestra no teñida (en el paso 103, por ejemplo) varias realizaciones del método de la invención presente pueden comprender además el paso 104 para aplicar un agente de tinción a la muestra de manera que se prepare una muestra teñida que comprende una pluralidad de entidades teñidas. La pluralidad de entidades teñidas puede incluir al menos una de la pluralidad de entidades teñidas (en la que el agente de tinción es absorbido por la entidad (esto es bacterias Gram positivas, por ejemplo)) y de la pluralidad de entidades teñidas superficialmente (en la que el agente de tinción está presente únicamente en una superficie exterior de la entidad (esto es bacterias Gram negativas, por ejemplo)). Tal como se describe aquí con relación a las varias realizaciones del sistema de la invención presente, el paso 104 para aplicar el agente de tinción puede ser realizado rociando el agente de tinción a través de un canal de flujo (definido en parte por una superficie sobre la que la muestra puede estar unida operativamente) al objeto de teñir la muestra. Además, tal como se describe aquí, el agente de tinción aplicado en el paso 104 puede comprender un tinte Gram. De acuerdo con tales realizaciones, las entidades teñidas superficialmente pueden comprender una pluralidad de entidades Gram negativas, y las entidades teñidas pueden comprender una pluralidad de entidades Gram positivas. Adicionalmente, se debe comprender que el agente de tinción aplicado en el paso 104 puede comprender una variedad de agentes de tinción que pueden ser apropiados para preparar una muestra para un proceso de análisis posterior y para un examen morfológico. Por ejemplo, el agente de tinción puede incluir, pero no se limita a, un agente que contiene violeta de cristal e iodina de Gram.

30 Una vez que el agente de tinción es aplicado a la muestra (en el paso 104, por ejemplo), las realizaciones del método comprenden además el paso 105 para grabar una segunda imagen de la muestra teñida. Se muestra una segunda imagen de ejemplo a lo largo del mismo campo de imagen de línea sencilla descrito anteriormente con respecto a la Figura 1, por ejemplo, en la Figura 4. La Figura 4 muestra las posiciones de todas las entidades bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas, por ejemplo) que están presentes a lo largo de la línea sencilla. Dependiendo de las características detalladas de la primera imagen mostrada en la Figura 1, la "visibilidad" de las entidades de la Figura 4 pueden ser más o menos óptimas dependiendo de la señal de fondo estructurada que pueda estar presente.

40 En referencia de nuevo a la Figura 30, el método puede comprender además el paso 106 para generara una primera imagen diferencial (véase la Figura 5) por comparación con la segunda imagen (véase la Figura 4, por ejemplo) con la primera imagen (véase la Figura 1, por ejemplo) para determinar una posición de al menos una de las entidades teñidas (si están presentes) sobre la superficie del portaobjetos. La primera imagen diferencial generada en el paso 106 (y mostrada, por ejemplo, en la Figura 5), muestra que la visibilidad de la bacteria u otras entidades presentes en la muestra puede ser mejorada significativamente de acuerdo a varias realizaciones de la invención presente generando una primera imagen diferencial. La primera imagen diferencial puede ser producida en el paso 106 mediante una computadora de procesamiento de imagen 18 en comunicación con un sistema de imagen que comprende una cámara 8 (véase la Figura 32, por ejemplo). Por ejemplo, el paso 106 puede ser realizado mediante una computadora de procesamiento de imagen 18 que realiza un paso de procesamiento de imagen (por ejemplo una sustracción de imagen) entre la segunda imagen (véase la Figura 4, por ejemplo) y la primera imagen (véase la Figura 1, por ejemplo). Realizando tal paso de procesamiento de imagen (como por ejemplo una sustracción de imagen), muchas de las características de la imagen que no están influenciadas por un paso de tinto Gram pueden ser eliminadas de la primera imagen diferencial (tal como se muestra en la Figura 5, por ejemplo). Tal como se describe aquí en varias realizaciones del sistema una señal de imagen diferencial (S) puede ser generada utilizando un algoritmo de procesamiento de imagen en la forma: $S = (J1 - J2) / (J1 + J2)$; en donde J1 y J2 hacen referencia a las intensidades de la señal en las imágenes primaria y secundaria, respectivamente.

55 Por lo tanto, únicamente las características relacionadas con las entidades presentes (como por ejemplo bacterias), y que responden al proceso de tinto, se muestra la primera imagen diferencial de la Figura 5, mientras que la señal de fondo estructural (visible en general en la primera imagen de la Figura 1) es retirada. La primera imagen diferencial (Figura 5, por ejemplo) ilustra un efecto técnico ya que destaca y mejora la visualización de las posiciones de las entidades teñidas y / o teñidas superficialmente (como por ejemplo las bacterias Gram positivas y Gram negativas) sobre un portaobjetos. Este efecto de resaltar es particularmente valioso para la inspección visual posterior posible de las imágenes (como por ejemplo un análisis de morfología (véase el paso 116, por ejemplo)).

65 Varios métodos pueden comprender también el paso 107 para aplicar un agente decolorante a la muestra teñida de manera que se prepare una muestra parcialmente decolorada en la que al menos una parte del agente de tinto es retirada de las entidades teñidas superficialmente. De acuerdo con una realización de ejemplo, la Figura 6 muestra

una tercera imagen que ha sido grabada tras realizar una decoloración parcial (véase el paso 107, por ejemplo) de la muestra, en este caso una decoloración de aproximadamente del 35 % de la decoloración total. De acuerdo con varias realizaciones, el paso 107 puede comprender también controlar el grado de decoloración que puede ser realizado, por ejemplo cronometrando la duración del rociado del espacio entre el portaobjetos 2 y la cubierta deslizante 3 (véase la Figura 31, por ejemplo) con un agente decolorante como por ejemplo alcohol ácido. Como se puede ver a partir del gráfico de la Figura 6, las señales correspondientes a las entidades teñidas superficialmente (que comprende bacterias Gram negativas, por ejemplo) en las posiciones X 50 y 80 pueden ser reducidas de alguna manera por la adición del agente decolorante en el paso 107. Un cierto porcentaje de decoloración puede ser también apreciado para las entidades teñidas (que corresponden a las bacterias Gram positivas, por ejemplo) que también pueden estar presentes en la muestra, pero la decoloración de las entidades teñidas es en general mucho menos pronunciada, en comparación con la decoloración de las entidades teñidas superficialmente (que se corresponden a bacterias Gram negativas, por ejemplo). La Figura 30 muestra también el paso 108 para grabar una tercera imagen de la muestra decolorada parcialmente. El paso 108 en general resulta en una tercera imagen, mostrada por ejemplo en la Figura 6.

Algunas realizaciones del método, tal como se muestra en general en la Figura 30, comprenden además el paso 109 para generar una segunda imagen diferencial (véase la Figura 7, por ejemplo) comparando la tercera imagen (véase la Figura 6, por ejemplo) con la segunda imagen (véase la Figura 4, por ejemplo) de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente en la superficie del portaobjetos 2 (véase la Figura 31, por ejemplo). La Figura 7 describe tal segunda imagen diferencial de ejemplo que muestra únicamente señales relacionadas con entidades teñidas superficialmente (que corresponden a bacterias Gram negativas, por ejemplo). Tal como se describe aquí además con respecto a varias realizaciones del sistema de la invención presente, la segunda imagen diferencial mostrada en la Figura 7 puede ser generada mediante una computadora de procesamiento de imagen 18 (en comunicación con una cámara CCD 8, por ejemplo). Por ejemplo, la computadora de procesamiento de imagen 18 puede estar configurada para generar la segunda imagen diferencial (la Figura 7, por ejemplo) ejecutando un paso de sustracción de imagen (sustrayendo la tercera imagen (la Figura 6) de la segunda imagen (la Figura 4, por ejemplo) para destacar aquellas entidades dentro de la muestra que han sido más afectadas (esto es decoloradas) por la adición del agente decolorante en el paso 107). En realizaciones de tizado Gram, el paso 109 puede revelar y / o destacar las posiciones de las bacterias Gram negativas, que responden en mayor medida al procedimiento de decoloración. El paso 109 para generar la segunda imagen diferencial también proporciona el efecto técnico de permitir al usuario (y / o a la computadora de procesamiento de imagen 18) comparar cuantitativa y / o cualitativamente las señales para las entidades teñidas superficialmente (esto es bacterias Gram negativas) en los gráficos de la Figura 4 y de la Figura 6 y realizar el paso 110 para determinar el grado actual de decoloración conseguido durante el paso de decoloración parcial (el paso 107, por ejemplo).

Así, tal como de muestra en la Figura 30, el paso 109 para generar la segunda imagen diferencial provee también una base de comparación que permite para la realización del paso 111 la estimación de la necesidad de tiempo de decoloración adicional para obtener una decoloración de la muestra óptima. Más en particular, en algunas realizaciones del método, el paso 111 puede comprender analizar la segunda imagen diferencial (véase la Figura 7, por ejemplo) para determinar un tiempo de exposición durante el cual el agente decolorante debe ser aplicado a la muestra parcialmente decolorada para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente (esto es bacterias Gram negativas, por ejemplo) sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas (esto es las bacterias Gram positivas, por ejemplo). El paso 111 puede comprender la estimación cuantitativa del tiempo de exposición para el paso 112 siguiente para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente realizando un cálculo del ratio basado al menos en parte en el tiempo de exposición que resulta en el nivel de decoloración en las entidades teñidas superficialmente que resulta aparente del examen visual de la "intensidad de azul" de la segunda imagen diferencial mostrada, por ejemplo, en la Figura 7.

Algunas realizaciones del método pueden comprender además el paso 112 para aplicar el agente decolorante (como por ejemplo el alcohol ácido) a la muestra parcialmente decolorada (para el tiempo de exposición determinado en el paso 111) de manera que se prepare una muestra decolorada sustancialmente en la que las entidades teñidas superficialmente (esto es las bacterias Gram negativas, por ejemplo) están sustancialmente decoloradas y en la que las entidades teñidas (bacterias Gram positivas, por ejemplo) no están sustancialmente decoloradas. Como se muestra en la Figura 30, el método puede comprender también el paso 113 para grabar una cuarta imagen (véase la Figura 8, por ejemplo) de la muestra sustancialmente decolorada. La Figura 8 muestra una cuarta imagen obtenida, por ejemplo, tras aplicar el paso de decoloración final (paso 112). Como se muestra en la Figura 8, solamente las señales correspondientes a las entidades teñidas (esto es bacterias Gram positivas) permanecen detectables en las X posiciones 30 y 90 de la superficie del portaobjetos.

En referencia de nuevo a la Figura 30, varias realizaciones del método pueden comprender también el paso 114 para generar una tercera imagen diferencial (véase la Figura 9, por ejemplo, mostrando una tercera imagen diferencial de ejemplo producida por una computadora de procesamiento de imagen 18 (véase la Figura 32)). La tercera imagen diferencial puede ser producida por comparación de la cuarta imagen (véase la Figura 8) con la segunda imagen (véase la Figura 4, por ejemplo). En algunas realizaciones, la tercera imagen diferencial de la Figura 9 puede ser producida realizando un procedimiento de sustracción de imagen para "sustraer" las señales detectadas en la cuarta imagen (Figura 8) de aquellas detectadas en la segunda imagen (Figura 4). Como se

muestra en la Figura 9, la tercera imagen diferencial puede describir claramente las posiciones de al menos una de las entidades teñidas superficialmente (esto es bacterias Gram negativas, por ejemplo) sobre la superficie. En el gráfico de ejemplo de la tercera imagen diferencial mostrada en la Figura 9, las posiciones de las bacterias Gram negativas están descritas en las posiciones 40 y 80 de la superficie del portaobjetos.

Al objeto de confirmar las posiciones (esto es, X posiciones, por ejemplo) de las entidades teñidas (esto es bacterias Gram positivas) en la superficie del portaobjetos, algunas realizaciones del método pueden comprender también el paso 115 para generar una cuarta imagen diferencial (véase la Figura 10) por comparación de la cuarta imagen (Figura 8) con la primera imagen (Figura 1). Como se muestra en la Figura 10, la cuarta diferencial puede describir una posición de al menos una de las entidades teñidas sobre la superficie del portaobjetos. En algunas realizaciones, el paso 115 puede ser realizado por una computadora de procesamiento de imagen 18 en comunicación con una cámara CCD 8 (u otro componente del sistema de imagen) para sustraer el trazado de la señal de la Figura 1 del trazado de la señal de la Figura 8. La imagen diferencial (Figura 10, por ejemplo) muestra las señales (y las posiciones correspondientes) de las bacterias Gram positivas.

En algunas realizaciones del método, la tercera y cuarta imágenes diferenciales (Figura 9 y 10, respectivamente) pueden ser utilizadas para realizar un análisis morfológico más detallado (véase el paso 116) con el propósito de clasificar adicionalmente todas las entidades (esto es las bacterias Gram positivas y Gram negativas, por ejemplo) encontradas en la muestra 32. El paso 116 puede ser realizado, por ejemplo, utilizando una computadora de procesamiento de imagen 18 que tiene un dispositivo de memoria integrado (no mostrado) configurado para almacenar una librería de entidades conocidas, al objeto de ayudar al usuario en la clasificación de varias entidades (esto es bacterias Gram negativas y Gram positivas, por ejemplo) cuyas posiciones han sido determinadas y / o confirmadas por los varios pasos del método mostrados, por ejemplo, en los pasos 101 – 115 de la Figura 30. Por ejemplo, el paso 116 puede comprender analizar una morfología de las entidades teñidas superficialmente (esto es bacterias Gram negativas). Además, en algunas realizaciones, el paso 116 puede comprender también analizar una morfología de las entidades teñidas (esto es bacterias Gram positivas).

Las Figura 11 – 19 muestran varias imágenes generada de acuerdo a los varios pasos del método de la invención presente (véase Figuras 30 y 36, en general) en un caso de ejemplo en el que únicamente hay presentes bacterias Gram positivas en la muestra 32. Específicamente, las Figura 11 – 13 se corresponden totalmente con las Figuras 1 – 3, respectivamente, mostrando la primera imagen, las posiciones de las bacterias Gram positivas (en las posiciones X 30 y 90 sobre la superficie del portaobjetos, por ejemplo) y las posiciones de las bacterias Gram negativas (ninguna). Además, la Figura 14 describe una segunda imagen tomada tras la aplicación de un agente de tinción (véase el paso 104, por ejemplo), mostrando únicamente señales correspondientes a bacterias Gram positivas.

La Figura 15 muestra una primera imagen diferencial con señales libres de fondo (obtenidas, por ejemplo, sustrayendo la señal de “fondo” de la Figura 11 de la imagen posterior al tinción de la Figura 14) al objeto de destacar las posiciones de las bacterias Gram positivas. Además, la Figura 16 muestra una tercera imagen obtenida tras la aplicación de un agente decolorante para obtener una decoloración parcial de la muestra. La Figura 17 es una segunda imagen diferencial, que podría, en algunos casos, mostrar las señales de las bacterias Gram negativas. Tal como se espera en este caso (por los datos conocidos mostrados en la Figura 13) no hay señales presentes. Este resultado muestra que la aplicación formal de los pasos del método de la invención presente (véase las Figuras 30 y 36, por ejemplo) puede proveer información correcta acerca de la presencia o ausencia de las bacterias Gram negativas sin una entrada significativa de un operador. La Figura 18 es una tercera imagen diferencial, que indicaría también la presencia de bacterias Gram negativas, si estuvieran presentes. Finalmente, la Figura 19 muestra una cuarta imagen diferencial mostrando las señales y posiciones de las bacterias Gram positivas en un contraste excelente de manera que se permite un análisis morfológico más completo de las bacterias Gram positivas (véase el paso 116, Figura 30, por ejemplo).

Las Figuras 20 – 29 muestran varias imágenes generadas de acuerdo con los varios pasos del método de la invención presente (véase Figuras 30 y 36, en general) en un caso de ejemplo en el que solamente están presentes entidades teñidas superficialmente (esto es bacterias Gram negativas) en la muestra 32. Específicamente, las Figuras 20 – 22 se corresponden totalmente con las Figuras 1 – 3, respectivamente, mostrando la primera imagen, las posiciones de las bacterias Gram positivas (ninguna), y las posiciones de las bacterias Gram negativas (en las X posiciones 50 y 80 sobre la superficie del portaobjetos, por ejemplo).

La Figura 23 muestra una segunda imagen, mostrando únicamente señales de las bacterias Gram negativas tras la aplicación de un agente de tinción. La Figura 24 muestra una primera imagen diferencial con señales libres de fondo, ilustrando claramente las posiciones de las bacterias Gram negativas en las X posiciones 50 y 80. Tal como se describe aquí con respecto a varias realizaciones del método y del sistema, cada una de las imágenes diferenciales (Figuras 24, 26, 28 y 29, por ejemplo) puede ser generada por una computadora de procesamiento de imagen 18 (véase la Figura 32) configurada para ejecutar un proceso de sustracción de imagen utilizando las diferentes imágenes provistas por una cámara CCD 8 u otro componente del sistema de imágenes. La Figura 25 muestra una tercera imagen obtenida tras una decoloración parcial de la muestra, que puede ser conseguida a través de la aplicación de un agente decolorante (véase el paso 107, de la Figura 30, por ejemplo).

5 La Figura 26 muestra una segunda imagen diferencial, que podría mostrar las señales de las bacterias Gram negativas. Tal como se esperaba en este caso, hay señales presentes. Este resultado muestra de nuevo que la aplicación formal de los pasos del método de acuerdo con varias realizaciones de la invención presente, consigue el efecto técnico de proporcionar una información correcta acerca de la presencia o ausencia de bacterias Gram negativas en una muestra 32 sin la necesidad de una aportación sustancial de un operador. La Figura 27 es una cuarta imagen obtenida tras la decoloración final. Tal como se esperaba no se detectan en esta imagen señales de las bacterias Gram negativas teñidas superficialmente. La Figura 28 es una tercera imagen diferencial, mostrando la presencia y situación claramente de bacterias Gram negativas en la superficie del portaobjetos. Finalmente, la Figura 29 es una cuarta imagen diferencial, que indicaría la presencia de bacterias Gram positivas si están presentes en la muestra. Tal como se esperaba en este caso (véase la Figura 21), no se detectan señales de bacterias Gram positivas.

15 La Figura 36 muestra un diagrama de flujo esquemático de un método, de acuerdo con una realización alternativa de la invención presente para teñir una muestra. El método comprende en primer lugar el paso 201 para relacionar operativamente una muestra con un expositor de muestra 1 en un sistema de imagen (véase en general la Figura 35). El paso 201 puede ser realizado, en algunas realizaciones, tal como se muestra en general en la Figura 34. Por ejemplo, la Figura 34 es una ilustración del procedimiento de instalación de la muestra que puede ser utilizado en una realización de la invención presente. En la Figura 34A, la muestra 32 está colocada y fijada térmicamente sobre un portaobjetos de microscopio ordinario 30 dentro de una típica área de fijación de la muestra 31. La Figura 34B es una vista lateral del portaobjetos 30 con una muestra 32 fijada. El portaobjetos preparado 30 es a continuación "encajado" en un cuerpo desechable con la superficie que tiene la muestra 32 relacionada operativamente con el mismo (véase en general la Figura 34C). El cuerpo desechable está estructurado de manera que el portaobjetos del microscopio encajado y una cubierta de vidrio, que está integrada con el cuerpo, forman una cámara de flujo 20 par aplicar al menos uno de los agentes de tinción o de decoloración a la muestra 32. Tal como se muestra en la Figura 25 35, la cámara de flujo 20 puede definir una entrada de agente 22, una salida de agente 23 para "lavar" los agentes de decoloración y tinción a través de la cámara de flujo 20 y más allá de la muestra 32. Una realización de una cámara de flujo completamente desechable se muestra en la Figura 34D. La cámara de flujo 20 puede ser invertida para colocar en un expositor de microscopio 1 (véase la Figura 34E y 35).

30 Como se muestra en la Figura 36, las diferentes realizaciones del método pueden comprender también el paso 202 para grabar imágenes de la muestra utilizando el sistema de imagen antes y después de la aplicación un agente de tinción y de un agente de colorante a la muestra. Por ejemplo, el paso 202 puede comprender grabar imágenes de la muestra en varias etapas de los procesos de tinción y / o decoloración descritos aquí. Las imágenes grabadas en el paso 202 pueden incluir, pero no se limitan a: una imagen de la muestra no teñida (véase la Figura 1, por ejemplo); una imagen de la muestra teñida (véase la Figura 4, por ejemplo); y una imagen de una muestra parcialmente decolorada (véase la Figura 6, por ejemplo).

40 El método puede comprender el paso 203 para generar una imagen diferencial basada al menos en parte en una comparación de las imágenes de la muestra grabadas antes y después de la aplicación del agente de tinción y del agente decolorante a la muestra. Por ejemplo, el paso 203 puede comprender, en algunas realizaciones, generar una segunda imagen diferencial (véase la Figura 7, por ejemplo) sustrayendo las señales de la imagen de la imagen de la muestra parcialmente decolorada (véase la Figura 6, por ejemplo) de las señales de imagen presentes en la imagen de la muestra teñida (véase la Figura 4, por ejemplo).

45 En referencia de nuevo a la Figura 36, varias realizaciones del método de la invención presente pueden comprender también el paso 204 para corregir la aplicación del agente de tinción y / o del agente de decoloración en base al menos en parte a la imagen diferencial generada en el paso 203. Por ejemplo, el paso 204 puede comprender determinar cuantitativamente el grado de decoloración aparente en la muestra (y / o en las entidades teñidas superficialmente incluidas en la misma) para analizar la imagen diferencial del paso 203. Por ejemplo, la "intensidad de azul" medible de la Figura 7 indica en general la cantidad cuantitativa de decoloración conseguida durante la aplicación del agente decolorante. Dada una exposición conocida y / o un tiempo de "rociado", el paso 204 puede comprender determinar el tiempo corregido y / o de exposición adicional que será esperable para retirar el agente de tinción restante de las entidades teñidas superficialmente presentes en la muestra. El método puede comprender además el paso 205 para aplicar de nuevo al menos uno del agente de tinción o del agente decolorante de acuerdo con los diferentes parámetros (como por ejemplo la exposición y / o el tiempo de rociado) calculado en el paso de corrección 204. Finalmente, como se muestra en la Figura 36, tales realizaciones del método pueden comprender además generar una imagen final (véase la Figura 8, por ejemplo) de la muestra de manera que se distinga al menos un objeto de interés (esto es entidades Gram positivas) en la muestra que puedan ser consideradas discernibles por el paso de aplicación 205.

60 Varias realizaciones de la invención presente pueden proporcionar también realizaciones del sistema y / o de los aparatos para realizar un procedimiento de tinción optimizado (por ejemplo un procedimiento de tinción Gram) para una muestra 32. Por ejemplo una realización del sistema, mostrada en general en las Figuras 32 y 35 comprende una cámara de flujo 20 que define un canal en comunicación fluida con un suministro de agente de tinción 11 y un suministro de agente decolorante 12, en el que la cámara de flujo comprende una superficie 31 configurada para

relacionarse operativamente con la muestra 32 colocada en la misma (véase las Figura 34A - 34B, por ejemplo). En algunas realizaciones del sistema, la cámara de flujo puede estar definida entre un portaobjetos 2 y una cubierta de cristal 3 que tiene un separador 4 relacionados operativamente entre ellos (como se muestra de manera general en la Figura 31 y como se describirá más ampliamente a continuación).

Como se muestra en general en las Figuras 34 y 35, la cámara de flujo 20 puede comprender un portaobjetos 30 que define la superficie 31 para relacionarse operativamente con la muestra 32 colocada en la misma. La cámara de flujo 20 puede comprender también un alojamiento de cámara de flujo que define una abertura para el portaobjetos adaptada para recibir un portaobjetos estándar (véase las Figuras 34B - 34C mostrando el portaobjetos estando relacionado operativamente con el alojamiento de la cámara de flujo) de manera que la muestra 32 está dispuesta sustancialmente entre el portaobjetos 30 y el alojamiento del canal de flujo cuando el portaobjetos está dispuesto en la abertura del portaobjetos. Además, el alojamiento de la cámara de flujo puede comprender un material sustancialmente traslúcido (como por ejemplo un cristal integrado y / o una cubierta transparente de policarbonato 21) de manera que el sistema de imagen (y / o una lente 5 del mismo) pueda ser capaz de grabar imágenes de la muestra 32 mientras la muestra 32 está colocada entre el portaobjetos 30 y el alojamiento de la cámara de flujo.

La cámara de flujo 20 (y / o un controlador del sistema 19 que es parte del sistema en comunicación con el mismo) puede cooperar con el sistema de fluidos (que comprende, por ejemplo, varias bombas adecuadas 14, válvulas 15, y una o más combinaciones de válvulas 16, tal como se muestra en la Figura 32, por ejemplo) que está configurado para aplicar el agente de tinción a la muestra 32 (a través de la entrada de agente 22, por ejemplo) de manera que se pueda preparar una muestra teñida que comprende una pluralidad de entidades teñidas. Tal como se describe aquí con respecto a varias realizaciones del método, la pluralidad de entidades teñidas puede incluir al menos una de una pluralidad de entidades teñidas (entidades Gram positivas, por ejemplo) y una pluralidad de entidades teñidas superficialmente (entidades Gram negativas, por ejemplo). Los sistemas de fluidos 14, 15, 16 (en cooperación con la cámara de flujo 20) pueden estar configurados además para aplicar el agente decolorante a la muestra teñida (a través de la entrada de agente 22, por ejemplo) de manera que se pueda preparar una muestra parcialmente decolorada en la que al menos una parte del tinte es eliminado de las entidades teñidas superficialmente. En algunas realizaciones del sistema y / o aparato, los sistemas de fluido 14, 15, 16 (en cooperación con la cámara de flujo 20 y / o un controlador del sistema 19) puede estar configurado además para aplicar el agente decolorante 12 a una muestra parcialmente decolorada durante un tiempo de exposición determinado (calculado, por ejemplo, en el paso 111 de la Figura 30) de manera que se pueda preparar una muestra sustancialmente decolorada en la que las entidades teñidas superficialmente están sustancialmente decoloradas y en la que las entidades teñidas no están sustancialmente decoloradas por la aplicación del agente decolorante. Además, tal como se muestra en general en la Figura 32, varias realizaciones del sistema pueden comprender depósitos 10, 11, 12 y 13, que contiene solución de lavado, agentes de tinción, agentes decolorantes, y neutralizador del agente de tinción, respectivamente. El controlador del sistema 19 puede estar configurado para dirigir estos agentes hacia la entrada de agente 6 hacia la cámara de circulación desechable (esto es, la cámara de flujo 20) gracias a las bombas apropiadas 14, válvulas 15, y una o más combinaciones del válvulas 16. Los agentes que son pulverizados a través de la cámara de flujo 20 pueden ser recogidos en un depósito de desecho 17 provisto en algunas de estas realizaciones del sistema.

Las realizaciones del sistema y del aparato de la invención presente pueden comprender también un sistema de imagen (y / o una lente objetivo 5 de la misma) dispuesta adyacente a la cámara de flujo 20 de manera que la muestra 32 esté colocada dentro del campo de visión del sistema de imagen. Como se muestra en la Figura 32, el sistema de imagen puede comprender: una lente de objetivo 5; un receptor de imagen o dispositivo de cámara 8 como por ejemplo una cámara CCD configurada para ser capaz de grabar imágenes de la muestra mientras la muestra 32 está dispuesta entre el portaobjetos 30 y el alojamiento del canal de flujo 20; y un dispositivo actuador (como por ejemplo un mecanismo de traslación XYZ 9, por ejemplo) relacionado operativamente con el dispositivo de cámara 8 y configurado para ajustar una posición del dispositivo de cámara 8 en relación con la cámara de flujo 20. Se debe comprender que, en realizaciones del sistema alternativas, el sistema puede comprender un mecanismo actuador (como por ejemplo un mecanismo de traslación XYZ) relacionado operativamente con el paso 1 (véase la Figura 32) y configurado para ajustar una posición de la cámara de flujo 20 en relación con el dispositivo de cámara 8. En algunas realizaciones, el dispositivo de cámara 8 puede estar en comunicación con una computadora de procesamiento de imagen 8 (tal como se describe con más detalle a continuación), que debe estar en comunicación con un controlador del sistema 19. Además, el controlador del sistema 19 puede estar en comunicación también con una entrada de control del mecanismos de traslación XYZ 9 para mover las lentes del objetivo 5 a diferentes campos de interés de la muestra 32, y para realizar las operaciones de autofocus en relación con la muestra 32.

Debido a que el portaobjetos 30 y / o la cámara de flujo 20 están relacionadas operativamente con un paso 1 del sistema de imagen, los componentes del sistema de imagen (como por ejemplo el receptor de imagen 8) puede estar configurado para vigilar la muestra 32 (en tiempo real), antes, después, y / o durante una aplicación de al menos uno de los agentes de tinción a agentes decolorantes. El sistema de imagen (y / o la computadora de procesamiento de imagen 18 del mismo) puede estar configurado además para generar una imagen diferencial (véase la Figura 7, por ejemplo) comparando al menos una imagen e la muestra 32 obtenida antes de una primera

aplicación del agente decolorante (véase la Figura 4, por ejemplo) y al menos una imagen de la muestra obtenida después de la primera aplicación del agente decolorante (véase la Figura 6, por ejemplo).

5 El sistema de imagen (y / o la computadora de procesamiento de imagen 18 incluida en el mismo) puede ser configurada además, en algunas realizaciones, para determinar el tiempo de exposición (véase el paso 111, de la Figura 30, por ejemplo) para una segunda aplicación del agente decolorante en base al menos en parte en la imagen diferencial (Figura 7) para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas de manera que las entidades teñidas puedan ser discernidas más fácilmente de las entidades teñidas superficialmente. En varias realizaciones del sistema pueden comprender también un
10 dispositivo de control (como por ejemplo un controlador del sistema 19, mostrado en la Figura 32, por ejemplo) en comunicación con el sistema de imagen 8, 9, 18 y el sistema de fluidos 14, 15, 16. El dispositivo de control puede estar configurado para controlar la aplicación de al menos uno de los agentes de tinción y de los agentes decolorantes en base al menos en parte a las imágenes generadas por el sistema de imagen (comprendiendo, por ejemplo, un dispositivo de cámara 8).

15 En algunas realizaciones del sistema, el sistema de imagen (y / o los componentes del mismo (como por ejemplo la computadora de procesamiento de imagen 18)) puede estar configurado para realizar uno o más de los pasos del método descritos en general en las Figura 30 y 36. Por ejemplo, en una realización, el sistema de imagen (y / o un dispositivo de cámara 8 del mismo) puede estar configurado para realizar el paso 103 para grabar una primera imagen (véase la Figura 1) de la muestra 32. El sistema de imagen puede estar configurado además para grabar una segunda imagen (véase la Figura 4) de la muestra teñida tras aplicar el agente de tinción a la muestra utilizando la
20 cámara de flujo 20.

25 Además, el sistema de imagen (y / o una computadora de procesamiento de imagen 18 incluida en el mismo) puede estar configurado además para generar una primera imagen diferencial (véase la Figura 5, por ejemplo) comparando la segunda imagen (Figura 4) con la primera imagen (Figura 1) de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas sobre la superficie 31 del portaobjetos 30. El sistema de imagen (y / o el dispositivo de cámara 8 del mismo) puede estar configurado además para grabar una tercera imagen (la Figura 6 por ejemplo) de la muestra parcialmente decolorada tras aplicar el agente decolorante (véase el paso 107, Figura 30) utilizando la cámara de flujo 20. El sistema de imagen (y / o la computadora de procesamiento de imagen 18) puede estar configurada además para generar una segunda imagen diferencial (véase la Figura 7) por comparación de la tercera imagen (Figura 6) con la segunda imagen (Figura 4) de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente. Finalmente, en algunas realizaciones del sistema, el sistema de imagen (y / o la computadora de procesamiento de imagen 18 en cooperación con el controlador de sistemas 19) puede estar configurado además para realizar el paso 111 para analizar la segunda imagen diferencial (Figura 7) para determinar un tiempo de exposición durante el cual el agente decolorante se aplica a la muestra parcialmente decolorada para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas.

40 De acuerdo con varias realizaciones del sistema de la invención presente, el sistema de imagen (incluyendo los componentes de varias computadoras de procesamiento de imagen 18 y / o dispositivos de cámara 8) pueden estar configurado además para realizar varios pasos del método que incluyen, pero no se limitan a: el paso 113 para grabar una cuarta imagen de la muestra sustancialmente decolorada (véase la Figura 8, por ejemplo); el paso 114 para generar una tercera imagen diferencial (Figura 9) comparando la cuarta imagen con la segunda imagen; y el
45 paso 115 para generar una cuarta imagen diferencial (Figura 10) comparando la cuarta imagen con la primera imagen. Tal como se ha descrito aquí con respecto a varias realizaciones del método de la invención presente, la tercera imagen diferencial (véase la Figura 9, por ejemplo) puede describir la posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente (esto es entidades Gram negativas, por ejemplo). Además, la cuarta imagen diferencial (véase la Figura 10, por ejemplo) puede describir una posición de al menos una de las entidades teñidas
50 (esto es entidades Gram positivas, por ejemplo).

Como se muestra en la Figura 32, el sistema de imagen provisto en varias realizaciones del sistema de la invención presente puede comprender una computadora de procesamiento de imagen 18 configurada para generar imágenes diferenciales que pueden incluir, pero no se limitan a: la primera imagen diferencial (véase la Figura 5, por ejemplo),
55 la segunda imagen diferencial (Figura 7, por ejemplo), la tercera imagen diferencial (Figura 9, por ejemplo), y la cuarta imagen diferencial (Figura 10, por ejemplo). En tales realizaciones del sistema, la computadora de procesamiento de imagen 18 puede estar configurada para generar una o más de las varias imágenes diferenciales utilizando procesos que pueden incluir, pero no se limitan a: sustracción de imagen; adición de imagen; cálculo del ratio de imagen; y combinaciones de tales rutinas de procesamiento de imagen. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la computadora de procesamiento de imagen 18 (y / o el controlador del sistema 19, en algunas realizaciones) puede estar configurada para generar una señal de imagen diferencial (S) utilizando un algoritmo de procesamiento de imagen en la forma: $S = (J1 - J2) / (J1 + J2)$; en donde J1 y J2 se refieren a las intensidades de señal en las imágenes primaria y secundaria, respectivamente.

65 La Figura 31 es una descripción esquemática de un sistema de acuerdo con una realización de la invención presente. La muestra biológica es dispuesta y fijada sobre un portaobjetos de microscopio 2, que puede ser

colocado en la etapa XY 1 de un microscopio y es visualizado a través de las lentes del objetivo del microscopio 5 hacia un receptor de imagen como por ejemplo una cámara CCD (u otro dispositivo de cámara 8 (véase la Figura 32)). Una cubierta de cristal 3 se mantiene a una distancia seleccionada del portaobjetos de microscopio 2 por medio de un separador 4 que tiene un grosor adecuado. El separador 4 puede formar un canal de flujo entre el portaobjetos 2 y la cubierta de cristal 3 con una entrada de agente 6 en un lateral y una salida de agente 7 en el otro lateral. El separador 4 puede comprender una sustancia elastómera configurada para proporcionar una unión sustancialmente estanca a los fluidos entre el separador 4 y el portaobjetos 2 así como entre el separador 4 y la cubierta de cristal 3 de manera que se forme una cámara de flujo paralela. El grosor efectivo del separador 4 puede ser seleccionado de manera que se puedan obtener imágenes nítidas de la muestra biológica del portaobjetos de microscopio 2 mediante el dispositivo de cámara 8 (u otro componente del sistema de imagen) incluso si las lentes del objetivo 5 tienen un aumento de 100X.

La Figura 33 muestra un ejemplo de una cámara de circulación del tipo ajustable por presión desechable adecuada para la práctica de varios métodos y / o realizaciones del sistema de la invención presente. La Figura 33A muestra el desechable tal como se ve desde arriba, esto es desde donde la lente objetivo 5 mostrada en las Figuras 31 y 32 estaría situada. En otras realizaciones, la lente objetivo 5 puede estar situada por debajo del desechable. En tales realizaciones, la Figura 33A representaría una vista desde "abajo". La Figura 33A muestra el cuerpo desechable preformado 20, que en este ejemplo tiene una cuberita de cristal 21 integrada en la misma. Se muestra también una entrada de agente 22 así como una salida de agente 23 que puede estar en comunicación fluida con los depósitos 10, 11, 12, 13 mostrados en la Figura 32, por ejemplo. La Figura 33B muestra una vista lateral del desechable mostrando un cuerpo desechable preformado 20, una cubierta de cristal integrada 21, una entrada de agente 22, y una salida de agente 23. Tras relacionar operativamente el portaobjetos de microscopio 30 preparado con el cuerpo 20, se forma una cámara de flujo 28 con los canales conectores 26 y 27 con la entrada 22 y la salida 23, respectivamente. En algunas realizaciones, el cuerpo desechable 20 puede comprender una característica de "labio" de esquina 25, que puede permitir que el portaobjetos 24 sea "encajado" de manera liberable con el cuerpo desechable para formar la cámara de flujo 28 entre el portaobjetos 30 y el cuerpo 20. La Figura 33C muestra una vista trasera del desechable describiendo, en particular, una realización de ejemplo de los canales de conexión 26 y 27 que pueden estar definidos entre la cámara de flujo 28 y al menos una de las entradas de agente 22 o salida de agente 23.

La Figura 34 ilustra un procedimiento de ejemplo para relacionar operativamente una muestra 32 con una superficie (como por ejemplo una zona de fijación de la muestra 31 de un portaobjetos de microscopio convencional 30). En la Figura 34A, la muestra 32 que va a ser evaluada puede estar colocada y fijada térmicamente sobre un portaobjetos de microscopio ordinario 30 dentro de una zona de fijación de la muestra 31 típica. La Figura 34B es una vista lateral de un portaobjetos 30 con una muestra 32 fijada. El portaobjetos preparado es una continuación "encajado" en el cuerpo desechable con un lado soportando la muestra 32 (véase la Figura 34C). El cuerpo desechable está estructurado de manera que el portaobjetos de microscopio encajado y la cubierta de cristal, (que está integrado en el cuerpo) puede formar un canal de flujo para los diferentes lavados, tinciones, decolorantes, y / o agentes neutralizadores de colorante que se pueden utilizar en varias realizaciones de la invención presente: Tal como se describe aquí, la cámara de flujo puede comprender un puerto de entrada de agente y un puerto de salida de agente para hacer circular los agentes entrando y saliendo de la cámara de flujo. El desechable completo se muestra en la Figura 34D, y está finalmente dado la vuelta para ser colocado en un expositor de microscopio (véase la Figura 34E).

La Figura 35 muestra un desechable completo, colocado en un microscopio y conectado con un sistema de manipulación de líquidos para realizar los varios lavados (véase el paso 102), tinciones (véase el paso 104), y / o procedimientos de decoloración (véase los pasos 107 y 112) de acuerdo con varias realizaciones de la invención presente. En algunas realizaciones, la comunicación fluida entre la cámara de flujo y un sistema de manipulación de líquidos (véanse los elementos 14, 15 y 16 de la Figura 32, por ejemplo) puede ser establecido mediante las tuberías de conexión 33 y 34 que pueden estar configuradas para mantener la cámara de flujo desechable 20 en su lugar en relación con el sistema de imagen (y / o las lentes del objetivo 5 del mismo) y para proporcionar una conexión sustancialmente estanca para la entrada del agente 22 y para la salida del agente 23 gracias a los conectores de presión 35 y 36, respectivamente. Las tuberías de conexión 33, 34 pueden, en algunas relaciones, comprender una sustancia polimérica sustancialmente rígida configurada para presionar la cámara de flujo desechable 20 generalmente hacia abajo y hacia la unión con la etapa 1 del sistema de imagen.

Se debe comprender que las diferentes realizaciones del sistema descritas aquí con respecto a las Figuras 31 - 35 pueden estar configuradas para realizar los diferentes pasos del método que han sido descritos en conexión con las diferentes imágenes mostradas en las Figuras 1 - 29 y que está resumidas en las Figuras 30 y 36. Por ejemplo, en referencia a la realización del sistema mostrada en La Figura 32, el controlador del sistema 29 puede estar configurado para controlar el proceso de tinción automático (véase el paso 10, por ejemplo) y el proceso de decoloración automático (véase los pasos 107 y 112). El controlador del sistema 19 puede estar configurado también para comunicarse con la computadora de procesamiento de imagen 18 y con el dispositivo actuador 9 (que comprende un mecanismo de traslación XYZ, por ejemplo) para determinar cuándo se debe realizar una operación de autofocus, cuando se debe grabar una imagen, cuándo se debe mover a un nuevo campo de interés, y cuándo los pasos de procesamiento de imagen (como la sustracción de imagen, por ejemplo) debe ser realizada para generar

5 varias imágenes diferenciales. En algunas realizaciones la computadora de procesamiento de imagen 18 puede producir automáticamente imágenes optimizadas que muestran tanto bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas. Tales imágenes pueden ser grabadas por la computadora de procesamiento de imagen 18 (en un dispositivo de memoria integrado en la misma, por ejemplo) y estar disponibles para un técnico de laboratorio, microbiólogo, u otro usuario de manera que se permita al usuario realizar un análisis morfológico manual y / o identificar varias entidades que pueden estar presentes en una muestra dada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la computadora de procesamiento de imagen 18 puede comprender una interfase de usuario (como una pantalla de alta resolución (no mostrada)) configurada para generar una descripción visual de las imágenes optimizadas de bacterias Gram positivas o bacterias Gram negativas dentro de la mezcla de manera que un usuario pueda realizar el paso 116 para analizar una morfología de las entidades de la muestra sin la necesidad de retirar la muestra de la etapa de microscopio 1 u otro análisis de campo relativo a un sistema de imagen. En otras realizaciones, en la computadora de procesamiento de imagen 18 puede comprender un dispositivo de memoria que contiene una base de datos de imágenes incluyendo una variedad de microorganismos conocidos (y de las imágenes de tinción característicos correspondientes a las mismas). La computadora de procesamiento de imagen 18 puede ejecutar entonces un procedimiento de identificación de bacterias automático, y subsecuentemente ofrecer el resultado al usuario a través de la interfase de usuario. El usuario puede entonces aceptar la salida de identificación automatizada, o utilizar el resultado automático como punto de partida para un seguimiento manual de confirmación. En estas varias realizaciones del sistema, la muestra 32 puede permanecer en la etapa de muestra 1 del sistema de imagen, de manera que el usuario pueda comparar las diferentes de imágenes diferenciales generadas por la computadora de procesamiento de imagen 18 con la imagen actual no procesada de la muestra teñida óptimamente.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para realizar un procedimiento de tinción para una muestra biológica, comprendiendo el método:

5 grabar una primera imagen de la muestra;
 aplicar un agente de tinción a la muestra de manera que se prepare una muestra teñida que comprenda una pluralidad de entidades teñidas, incluyendo la pluralidad de entidades teñidas al menos una de una pluralidad de entidades teñidas y de una pluralidad de entidades teñidas superficialmente;
 grabar una segunda imagen de la muestra teñida;
 10 generar una primera imagen diferencial comparando la segunda imagen con la primera imagen de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas sobre la superficie;
 aplicar un agente decolorante a la muestra teñida de manera que se prepare una muestra parcialmente decolorada en la que al menos una parte del agente de tinción ha sido retirado de las entidades teñidas superficialmente;
 15 grabar una tercera imagen de la muestra decolorada parcialmente;
 generar una segunda imagen diferencial comparando la tercera imagen con la segunda imagen de manera que se determine una posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente sobre la superficie;
 y
 20 analizar la segunda imagen diferencial para determinar un tiempo de exposición durante el cual el agente decolorante puede ser aplicado a la muestra decolorada parcialmente para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas;
 y corregir la aplicación del agente de tinción y / o del agente decolorante en base al menos en parte en al menos una imagen diferencial.

25 2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además aplicar el agente decolorante a la muestra parcialmente decolorada para el tiempo de exposición determinado de manera que se prepare una muestra sustancialmente decolorada en la que las entidades teñidas superficialmente estén sustancialmente decoloradas y en la que las entidades teñidas no estén sustancialmente decoloradas.

30 3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además:
 grabar una cuarta imagen de la muestra sustancialmente decolorada;
 generar una tercera imagen diferencial comparando la cuarta imagen con la segunda imagen, describiendo la tercera imagen diferencial la posición de al menos una de las entidades teñidas superficialmente sobre la superficie y
 35 generar una cuarta imagen diferencial comparando la cuarta imagen con la primera imagen, describiendo la cuarta imagen diferencial una posición de al menos una de las entidades teñidas sobre la superficie.

40 4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además analizar una morfología de la menos una de las entidades teñidas superficialmente, o de las entidades teñidas.

5.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de tinción comprende un tinte Gram y en el que las entidades teñidas superficialmente comprenden una pluralidad de bacterias Gram negativas, y en el que las entidades teñidas comprenden una pluralidad de bacterias Gram positivas.

45 6.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además:
 aplicar el agente de tinción y / o el agente decolorante de acuerdo con el paso de corrección; y
 50 generar una imagen final de la muestra de manera que se diferencie al menos un objeto de interés en la muestra que se convierta en discernible por la aplicación de nuevo del paso.

7.- Un sistema para realizar un procedimiento de tinción de una muestra biológica, comprendiendo el método:

55 una cámara de flujo que define un canal en comunicación fluida con un suministro de agente de tinción y con un suministro de agente decolorante, comprendiendo la cámara de flujo una superficie configurada para relacionarse operativamente con la muestra que está en ella;
 un sistema de fluidos en comunicación fluida con la cámara de flujo, el suministro de agente de tinción, y el suministro del agente decolorante;
 el sistema de fluidos configurado para aplicar el agente de tinción a la muestra de manera que se prepare una muestra teñida que comprende una pluralidad de entidades teñidas y / o una pluralidad de entidades teñidas superficialmente;
 60 el sistema de fluido configurado además para aplicar el agente decolorante a la muestra teñida de manera que se prepare una muestra parcialmente decolorada en la que al menos una parte del tinción es retirado de las entidades teñidas superficialmente;
 65 un sistema de imagen dispuesto adyacente a la cámara de flujo y configurado para grabar al menos una imagen de la muestra antes, durante, y / o tras la aplicación del agente de tinción y del agente decolorante,

- estando configurado además el sistema de imagen para generar al menos una imagen diferencial basada al menos en parte en una comparación de imágenes de la muestra grabadas antes y después de la aplicación del agente de tinción y tras la aplicación del agente decolorante a la muestra; y
5 un dispositivo controlador en comunicación con el sistema de imagen y con el sistema de fluidos, estando configurado el dispositivo controlador para controlar la aplicación del agente de tinción y / o del agente decolorante en base al menos en parte en al menos una imagen diferencial.
- 8.- Un sistema de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la cámara de flujo está adaptado para recibir un portaobjetos que define la superficie para relacionarse operativamente con la muestra que se encuentra en la misma
10 y en la que la cámara de flujo comprende un alojamiento del canal de flujo que define una abertura del portaobjetos configurada para recibir el portaobjetos de manera que la muestra esté dispuesta sustancialmente entre el portaobjetos y el alojamiento del canal de flujo en el que se deposita el portaobjetos en la abertura del portaobjetos, comprendiendo el alojamiento del canal de flujo un material sustancialmente transparente de manera que el sistema
15 de imagen es capaz de grabar la al menos una imagen de la muestra mientras la muestra está dispuesta entre el portaobjetos y el alojamiento del canal de flujo.
- 9.- Un sistema de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sistema de imagen comprende:
- 20 un dispositivo de cámara configurado para grabar la al menos una imagen de la muestra mientras la muestra está dispuesta entre el portaobjetos y el canal de la cámara de flujo; y
un dispositivo actuador relacionado operativamente con el dispositivo de cámara y configurado para ajustar una posición del dispositivo de cámara en relación con la cámara de flujo.
- 10.- Un sistema de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sistema de imagen está configurado además para
25 analizar la segunda imagen diferencial para determinar un tiempo de exposición durante el cual el agente decolorante puede ser aplicado a la muestra parcialmente decolorada para decolorar sustancialmente las entidades teñidas superficialmente, si están presentes, sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas, si están presentes.
- 11.- Un sistema de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los sistemas de fluidos están configurados además
30 para cooperar con la cámara de flujo para aplicar el agente decolorante a la muestra parcialmente decolorada durante el tiempo de exposición determinado de manera que se prepare una muestra sustancialmente decolorada en la que las entidades teñidas superficialmente estén sustancialmente decoloradas, si están presentes, y en la que las entidades teñidas no estén sustancialmente decoloradas, si están presentes.
- 12.- Un sistema de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sistema de imagen comprende una computadora de
35 procesamiento de imagen configurada para analizar la al menos una imagen diferencial y generar la al menos una imagen diferencial utilizando procedimientos seleccionados del grupo compuesto por:
- 40 sustracción de imagen;
adición de imagen;
cálculo del ratio de imagen; y
combinaciones de los mismos.
- 13.- Un sistema de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el agente de tinción comprende un tinte Gram y en el
45 que las entidades teñidas superficialmente comprende una pluralidad de bacterias Gram negativas, si están presentes, y en el que las entidades teñidas comprenden una pluralidad de bacterias Gram positivas, si están presentes.



Fig. 1

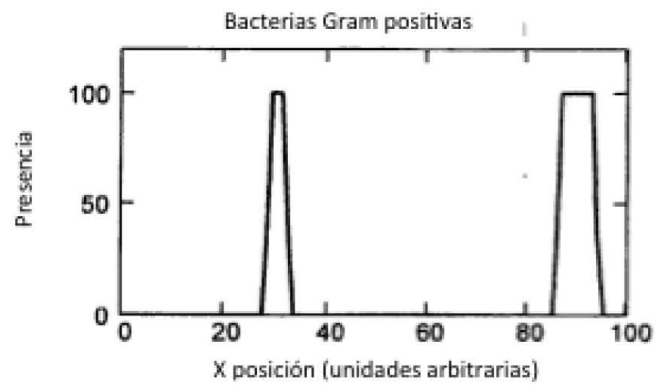


Fig. 2

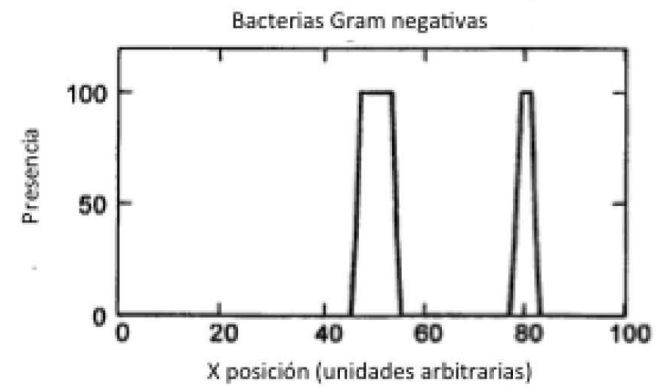


Fig. 3

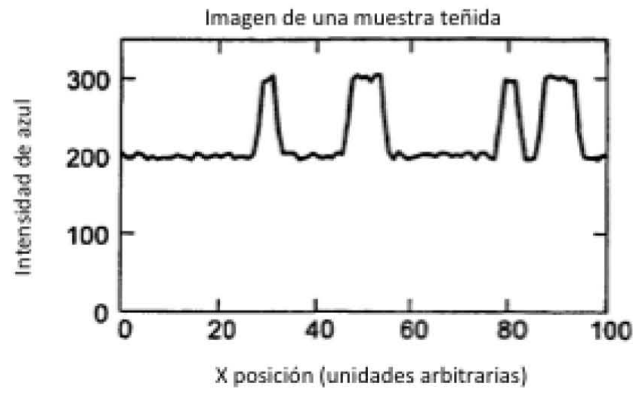


Fig. 4

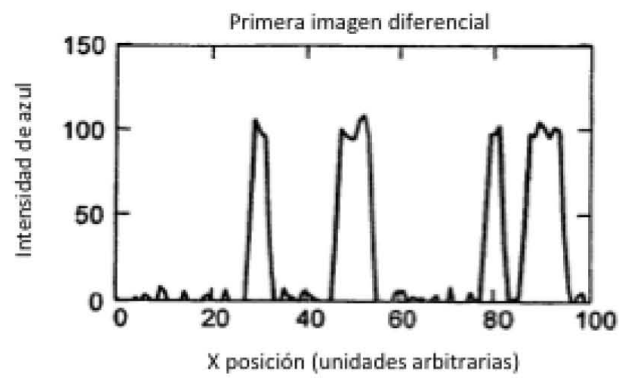


Fig. 5

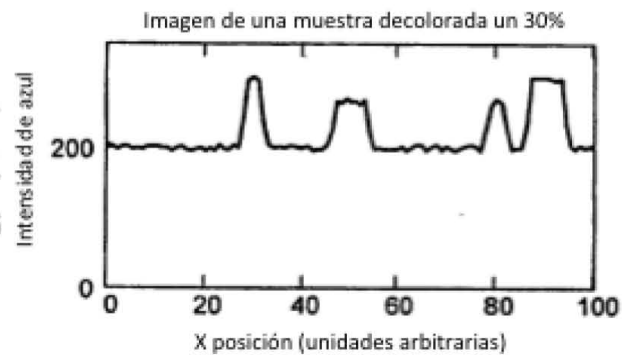


Fig. 6

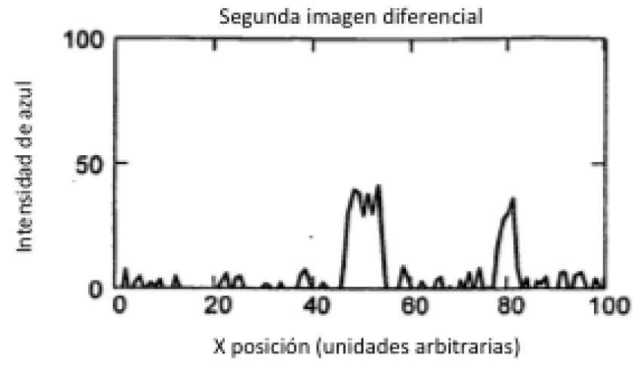


Fig. 7

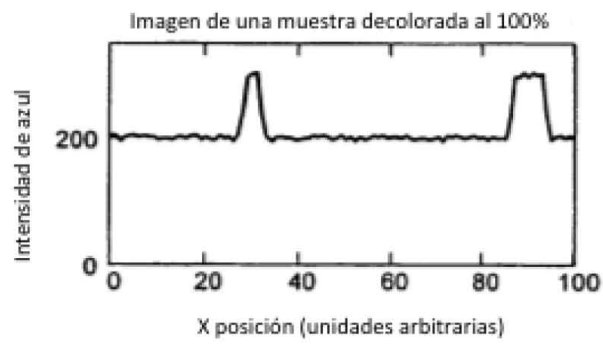


Fig. 8

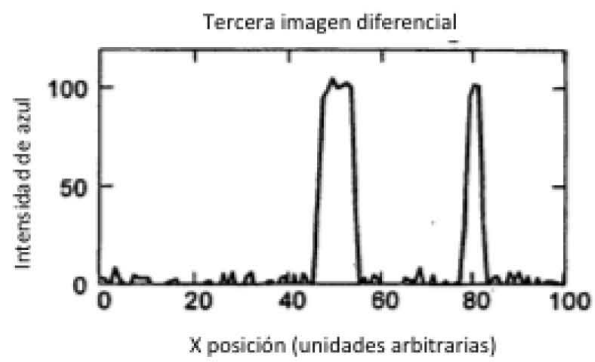


Fig. 9

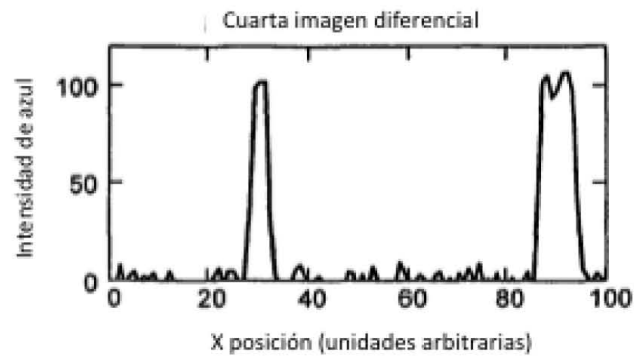


Fig. 10

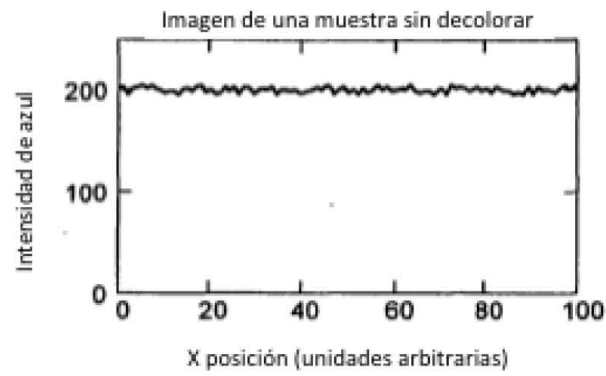


Fig. 11

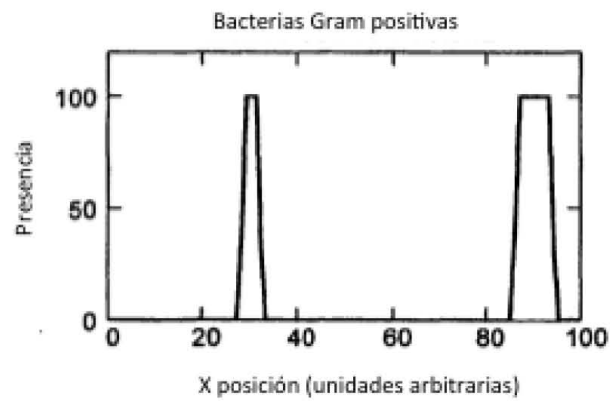


Fig. 12

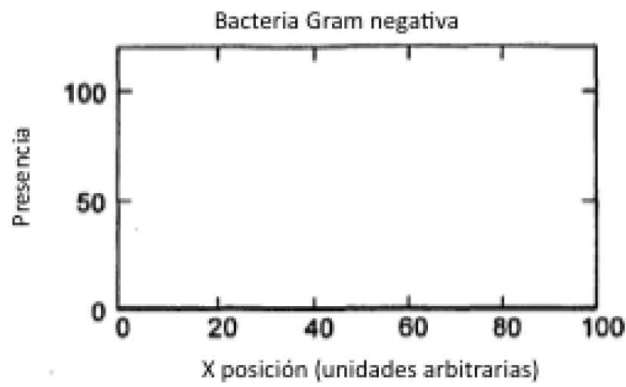


Fig. 13

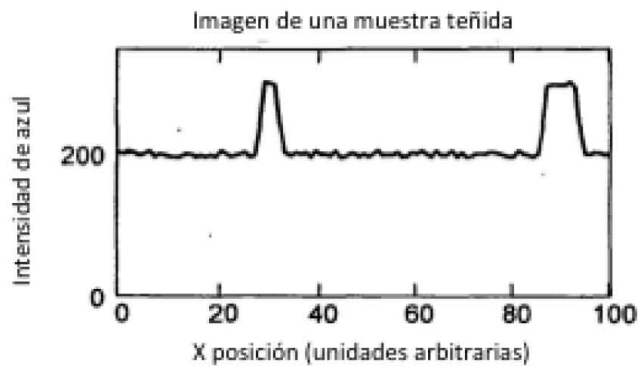


Fig. 14

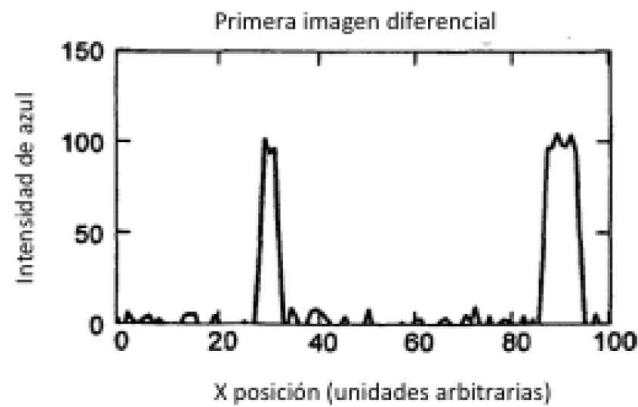


Fig. 15

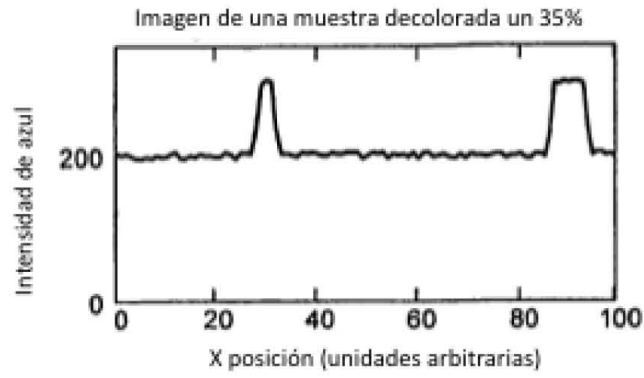


Fig. 16

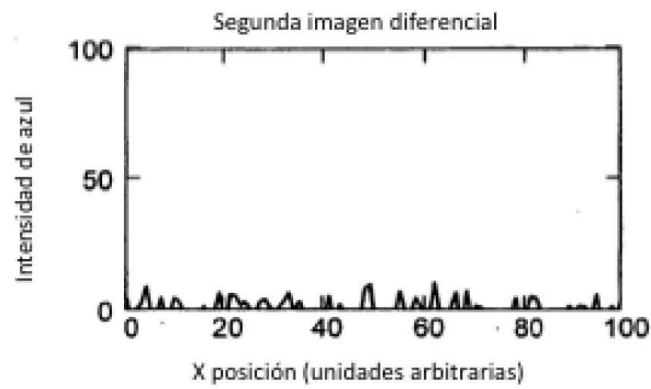


Fig. 17

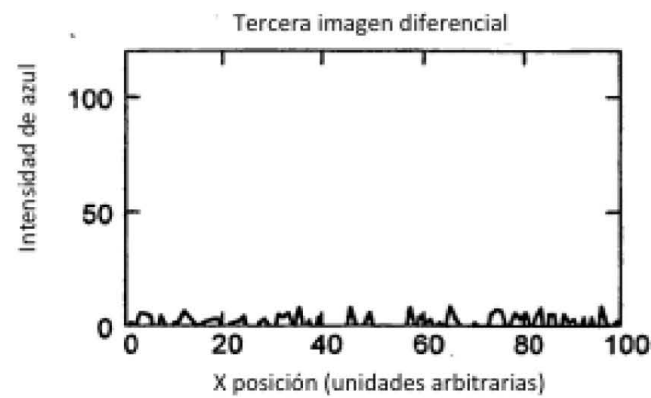


Fig. 18

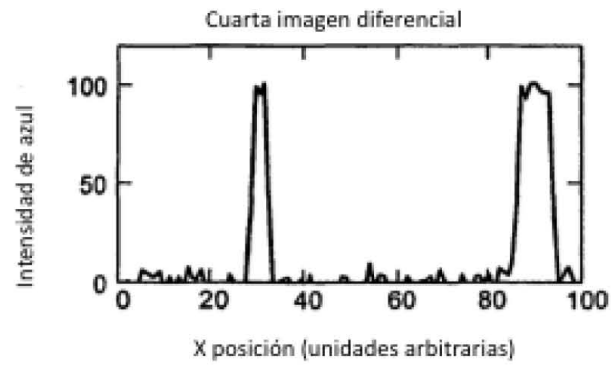


Fig. 19

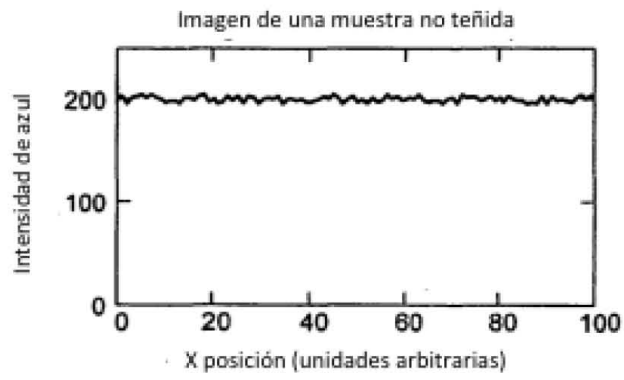


Fig. 20

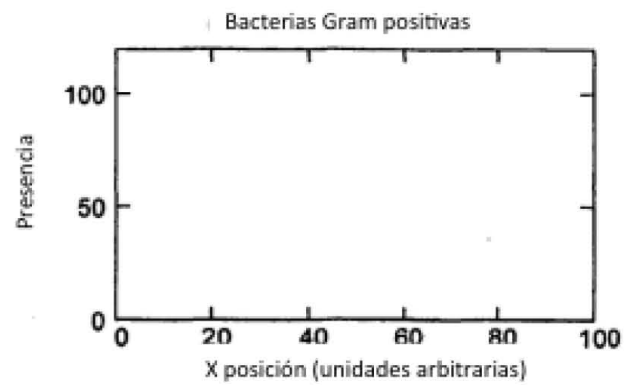


Fig. 21

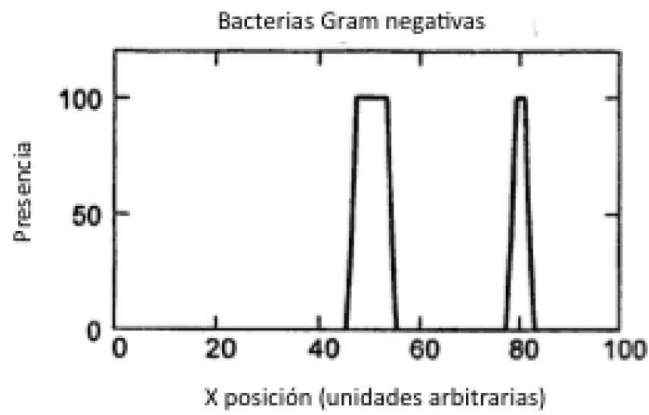


Fig. 22

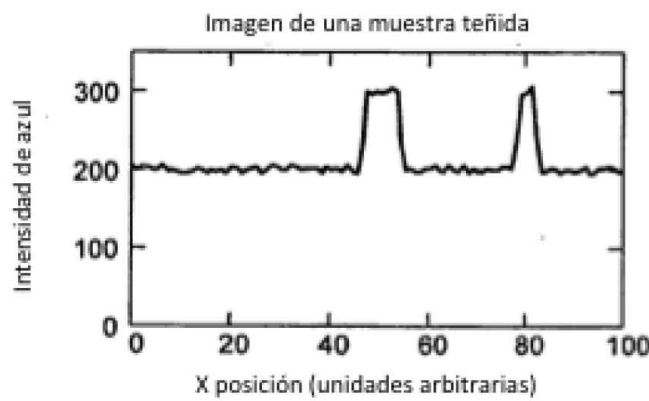


Fig. 23

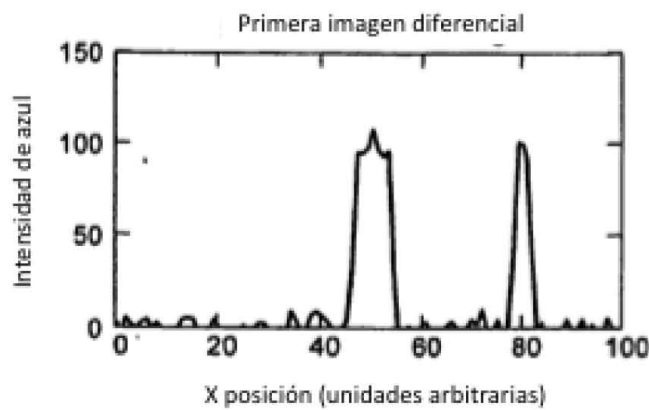


Fig. 24

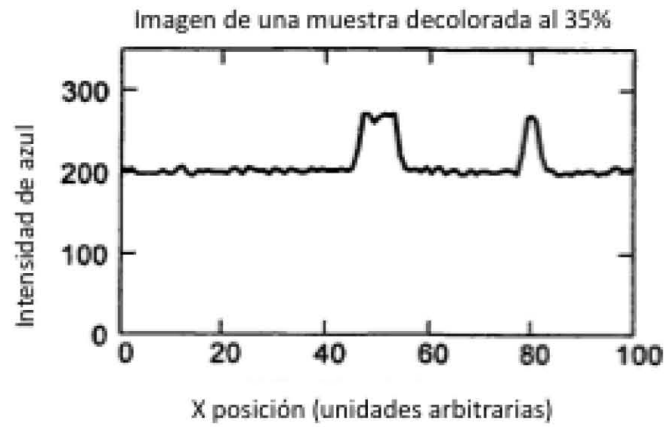


Fig. 25

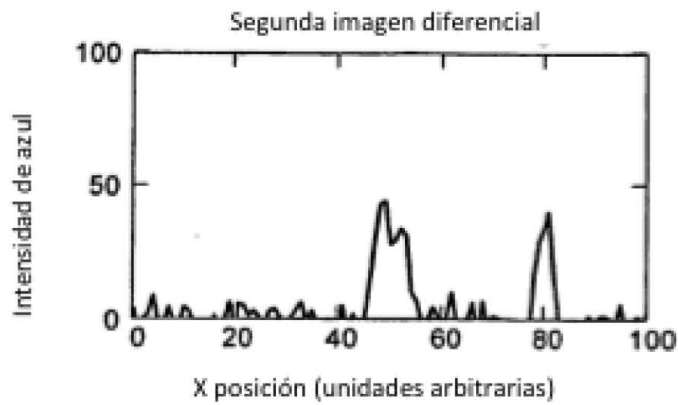


Fig. 26

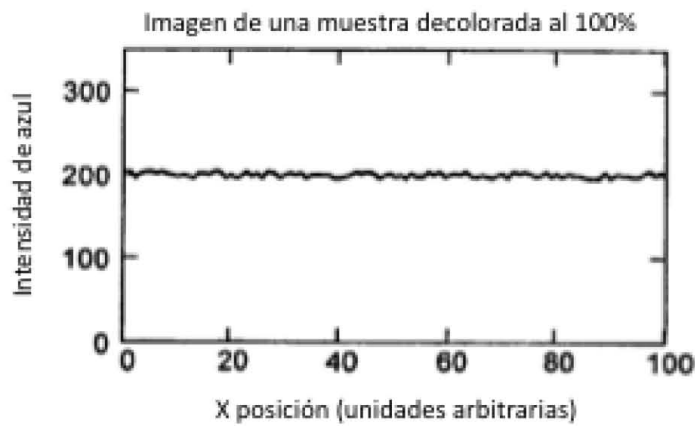


Fig. 27

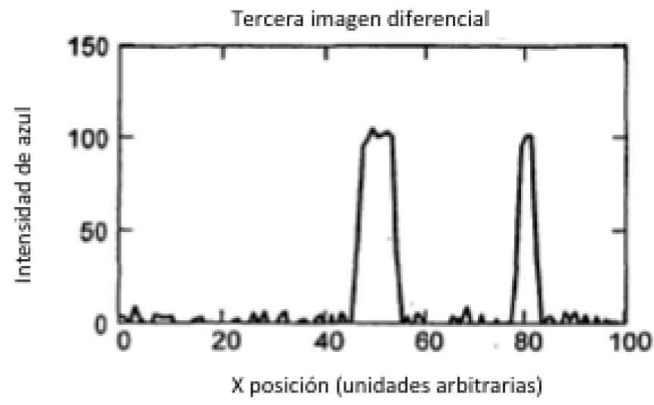


Fig. 28

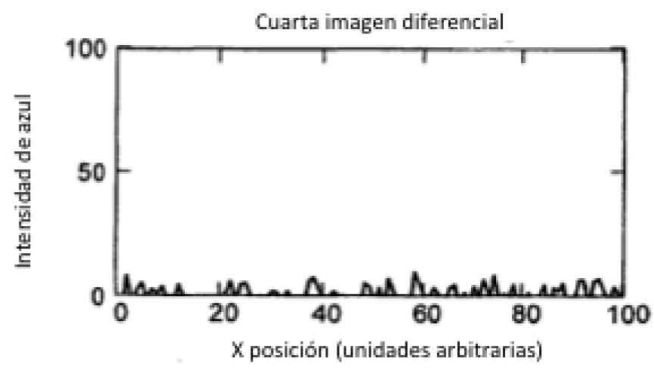


Fig. 29

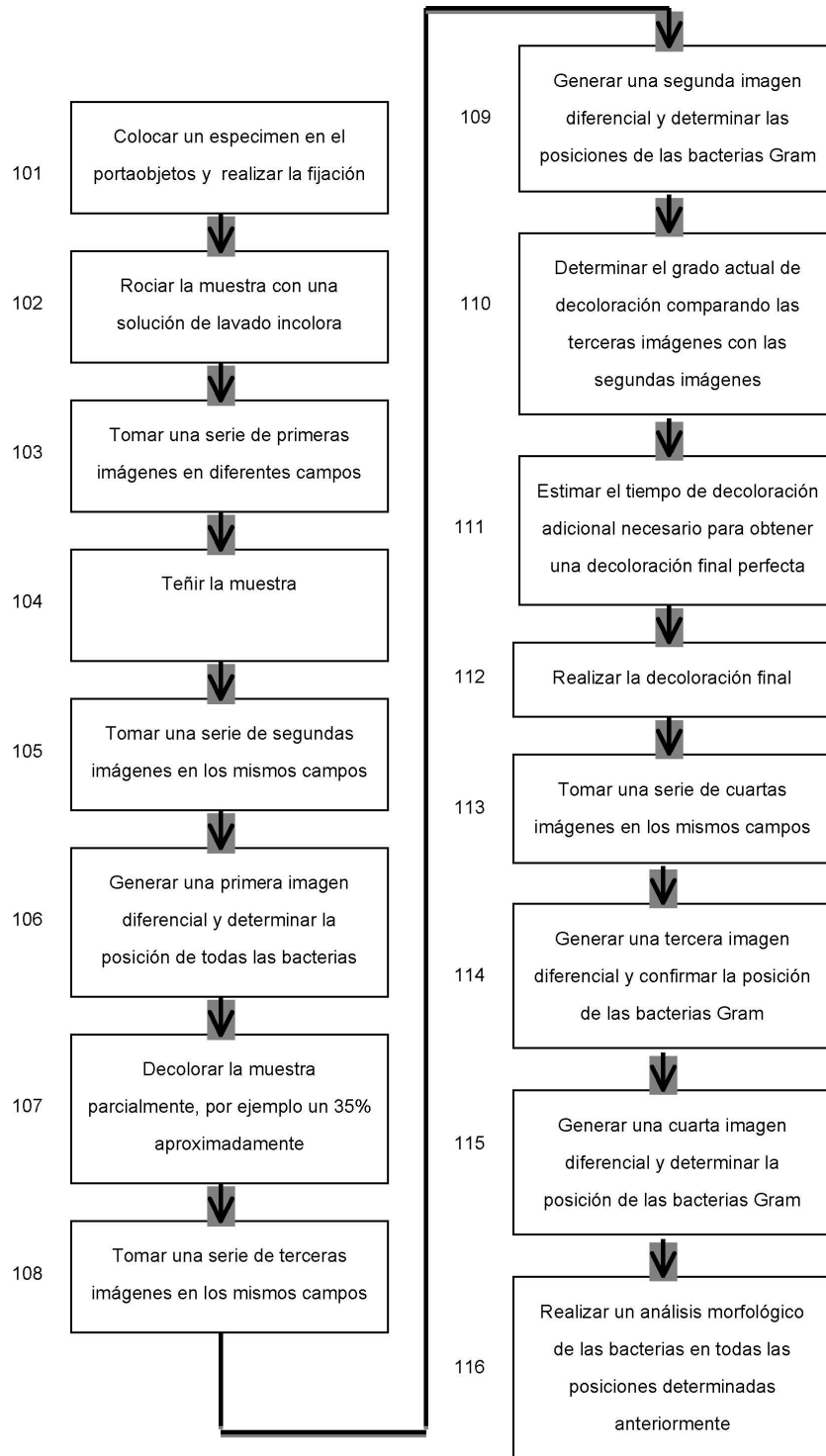


Fig. 30

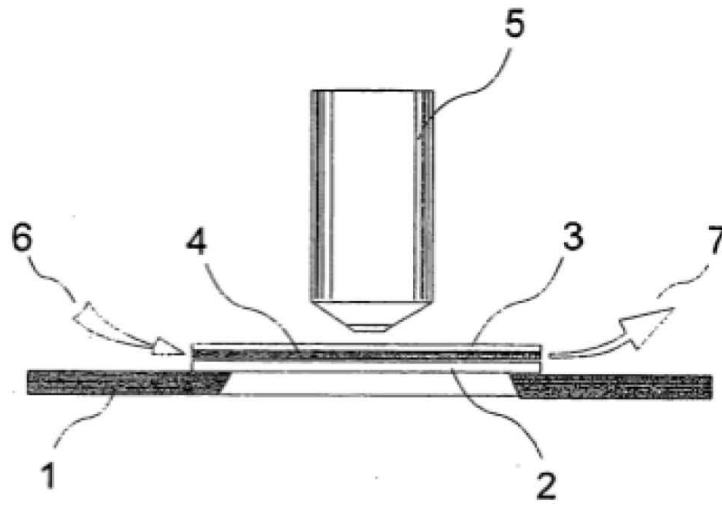


Fig. 31

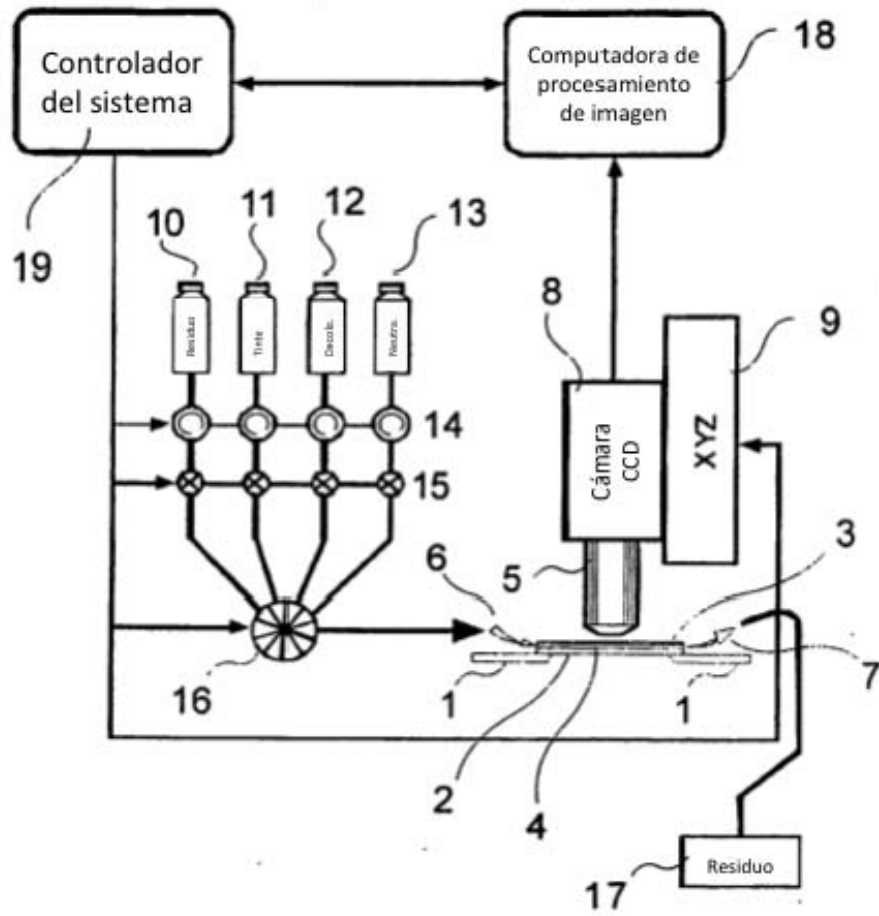


Fig. 32

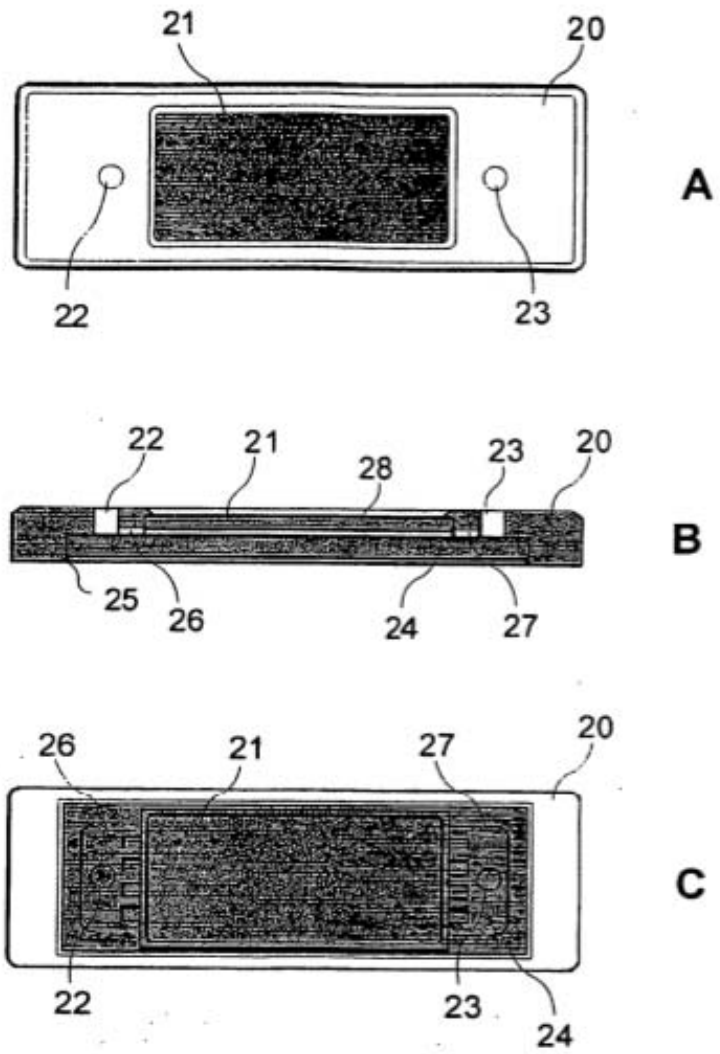


Fig. 33

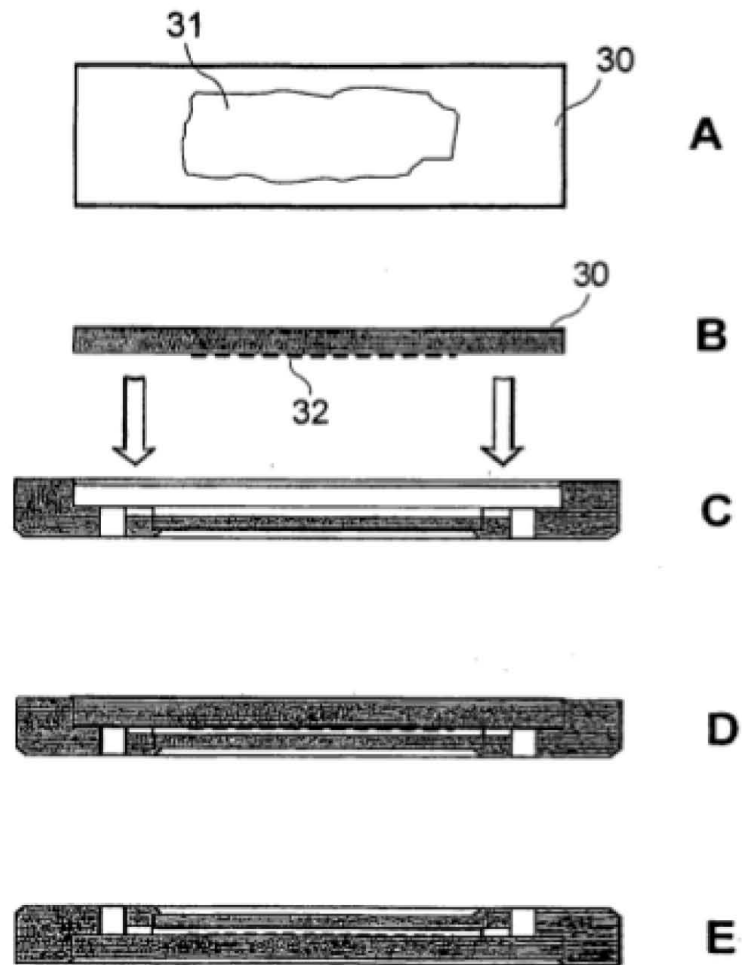


Fig. 34

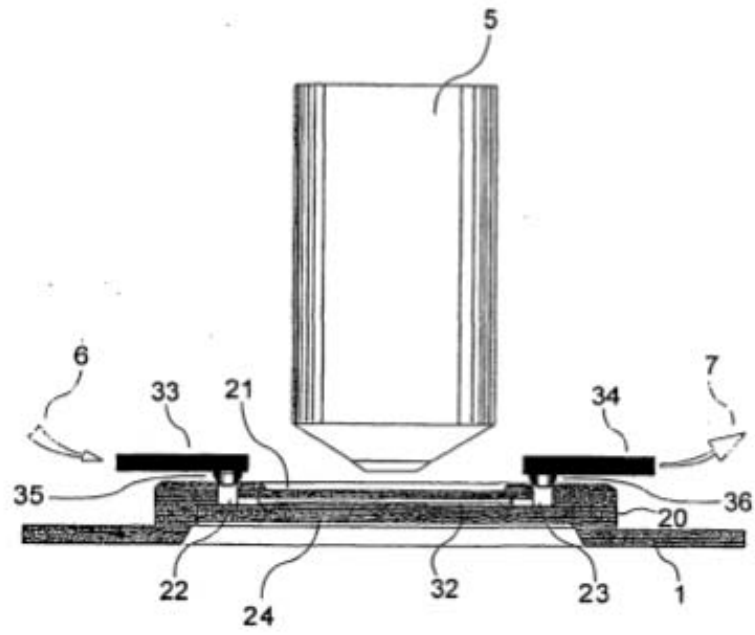


Fig. 35

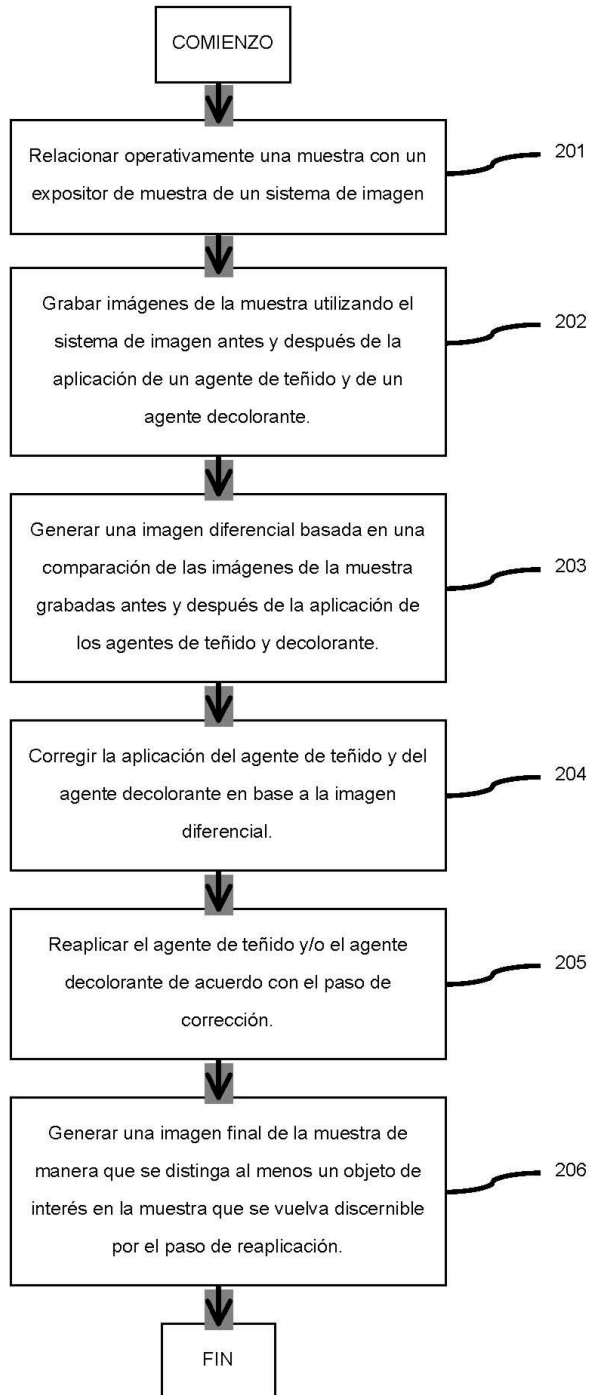


Fig. 36