

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 542**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 1/31 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008** **E 13172592 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 2642271**

54 Título: **Método para la tinción 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:

26.05.2015

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

BERNDT, KLAUS W.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 536 542 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 para la tinción de materiales biológicos

5 La presente invención se refiere a un método para la tinción de materiales biológicos con el propósito de detectar e identificar microorganismos que causan enfermedades. Más en particular, la presente invención se refiere a un método para realizar la tinción Gram automatizada en portaobjetos de microscopios.

10 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.

20 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.

25 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.

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

SUMARIO DE LA INVENCION

40 El método de la presente invención está definido en la reivindicación 1. El método de la invención comprende un paso 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.

45 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 de la invención 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.

50 El método de la invención 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, grabando una tercera imagen de la muestra parcialmente decolorada y generando 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 de la invención comprende 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.

60 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.

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), de acuerdo con una realización de la presente invención;

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 producida de acuerdo con una realización de la presente invención;

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, de acuerdo con una realización de la presente invención;

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, de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 4 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 presente invención;

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

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 presente invención;

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 presente invención;

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 presente invención;

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 presente invención;

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 presente invención, 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 presente invención tras una decoloración del 35 % de la muestra;

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 presente invención, describiendo además la ausencia de entidades teñidas superficiales en la muestra;

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 presente invención, 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 presente invención, destacando las posiciones de las entidades teñidas (esto es Gram positivas, por ejemplo) de la muestra;

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 presente invención;

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 presente invención;

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 presente invención;

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 presente invención;

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 presente invención;

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 presente invención, que destaca la posición de las entidades teñidas superficialmente en la muestra;

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 presente invención tras una decoloración del 35 % de la muestra;

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 presente invención, 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 presente invención, tras una decoloración del 100 % de la muestra;

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 presente invención, destacando la posición de las entidades teñidas superficialmente (esto es Gram negativas, por ejemplo) en la muestra;

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 presente invención, 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 presente invención;

La Figura 31 muestra un diagrama de flujo no limitativo que resume los pasos del método para un método para teñir óptimamente una muestra, de acuerdo con una realización de la presente invención.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención será descrita ahora más completamente mediante referencia a los dibujos que la acompañan.

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. Además, se debería enfatizar que las imágenes ejemplares mostradas en las Figuras 1 a 29 representan solamente una línea de una imagen bidimensional. A fin de reducir las diversas realizaciones del método y del sistema de la presente invención para practicar uno de ellos, se puede tratar con muchas de esas líneas, combinadas en imágenes bidimensionales de una muestra acoplada operativamente con un portaobjetos, por ejemplo. También, como se describe además aquí, en algunas realizaciones, un usuario puede utilizar el sistema de formación de imágenes (y/o un dispositivo de cámara incluido en él) para grabar imágenes en más de un campo en el portaobjetos de la muestra para localizar y clasificar múltiples bacterias u otras entidades teñidas o superficialmente teñidas de la muestra.

5 Se debe comprender que varias realizaciones del método y del sistema de la presente invención 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 presente invención 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 presente invención pueden ayudar a mejorar el grado de decoloración en una variedad de procesos de tinción (incluyendo, por ejemplo, el proceso de tinción Gram).

10 Se debe comprender también que varias realizaciones de la presente invención 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 presente invención 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).

15 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 tinción 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). De acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, el paso 103 puede comprender grabar una serie de primeras imágenes en diferentes campos de la muestra no teñida. 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 para 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 y un dispositivo de cámara.

20 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, 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.

25 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 de fijación de la muestra típica.

30 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. Por ejemplo, la aplicación de soluciones de lavado, agentes de tinción, y / o agentes decolorantes puede ser realizada mediante una variedad de procedimientos de laboratorio conocidos, incluyendo, pero no limitados a: pipeteado; aspiración; mezcla; centrifugado; y combinaciones de tales procesos.

65

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 sí, (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.

Como es conocido para las personas versadas en la técnica de la tinción Gram, cada paso de tinteado 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.

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 presente invención 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 presente invención, 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.

Una vez que el agente de tinción es aplicado a la muestra (en el paso 104, por ejemplo), algunas realizaciones del método pueden comprender 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.

En referencia de nuevo a la Figura 30, el método puede comprender además el paso 106 para generar 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 presente invención 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.

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 tinteado Gram pueden ser eliminadas de la primera imagen

diferencial (tal como se muestra en la Figura 5, por ejemplo). Tal como se describe aquí con respecto a varias realizaciones del sistema de la presente invención, 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.

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 de una realización del método de la presente invención 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)).

Varias realizaciones del método 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 deslizable 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, pueden comprender 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. 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 presente invención, 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 tinto 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) 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). 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. 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 presente invención (véase Figuras 30 y 36, en general) en un caso de ejemplo en el que únicamente hay presentes bacterias Gram positivas en la muestra. 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 presente invención (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).

5 Las Figuras 20 – 29 muestran varias imágenes generadas de acuerdo con los varios pasos del método de la presente invención (véase Figuras 30 y 31, en general) en un caso de ejemplo en el que solamente están presentes entidades teñidas superficialmente (esto es bacterias Gram negativas) en la muestra. 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).

10 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).

20 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 presente invención, 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.

30 La Figura 31 muestra un diagrama de flujo esquemático de un método, de acuerdo con una realización de la presente invención para teñir una muestra.

35 Como se muestra en la Figura 31, el método comprende un 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 además 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 31, el método de la invención comprende 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

65

REIVINDICACIONES

1.- Un método para realizar un procedimiento de tinción para una muestra biológica con el propósito de detectar e identificar microorganismos que causan enfermedades, 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, y/o una pluralidad de entidades teñidas superficialmente;
- 10 grabar una segunda imagen de la muestra teñida;
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 muestra teñida, si se da el caso;
- 15 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, si se da el caso;
- 20 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 muestra teñida, si se da el caso; y
- 25 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, si se da el caso, sin decolorar sustancialmente las entidades teñidas, si se da el caso; 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.

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.

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además:

- 35 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
- 40 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.

4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además analizar una morfología de al 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.

6.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además:

- 50 reaplicar el agente de tinción y / o el agente decolorante de acuerdo con el paso de corrección; y
- 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.

55

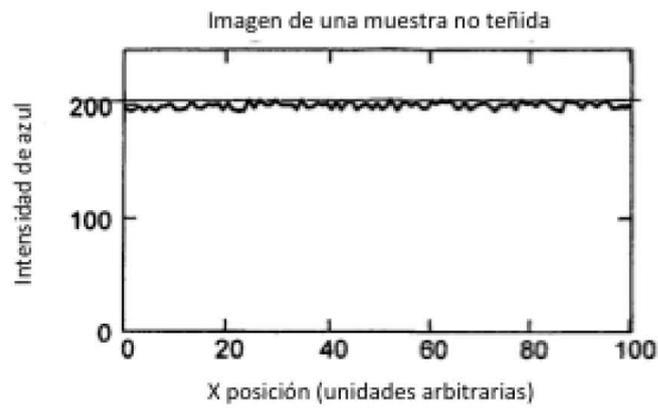


Fig. 1

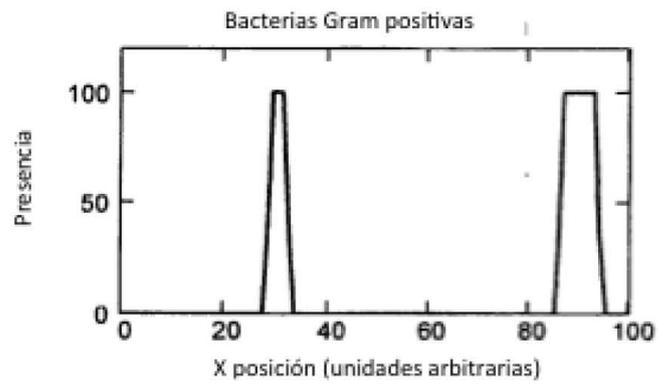


Fig. 2

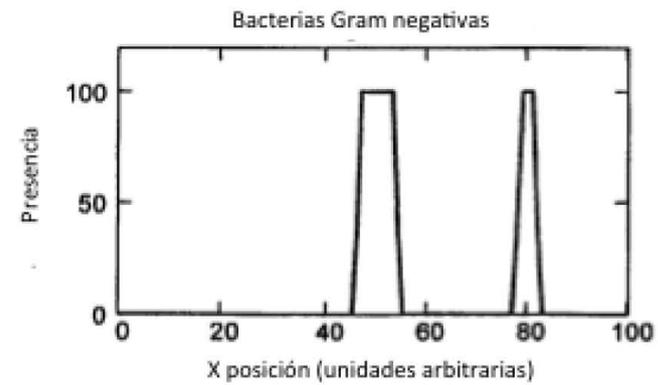


Fig. 3

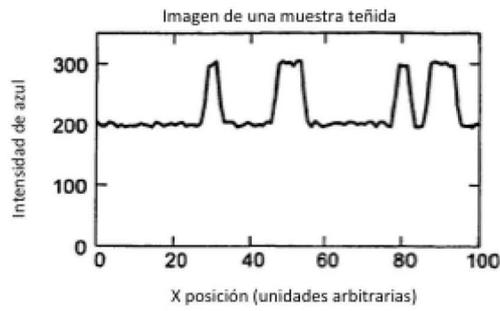


Fig. 4

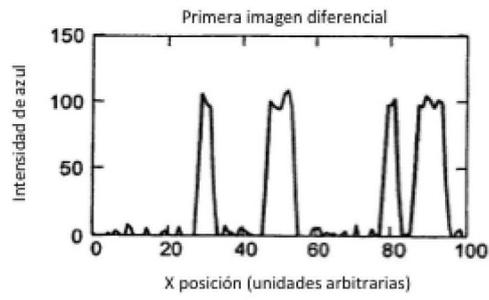


Fig. 5

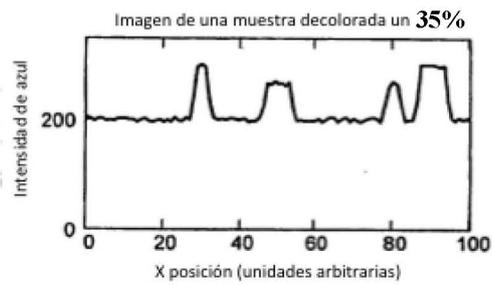


Fig. 6

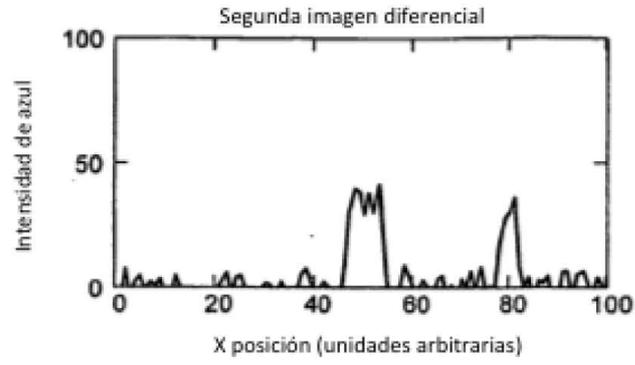


Fig. 7

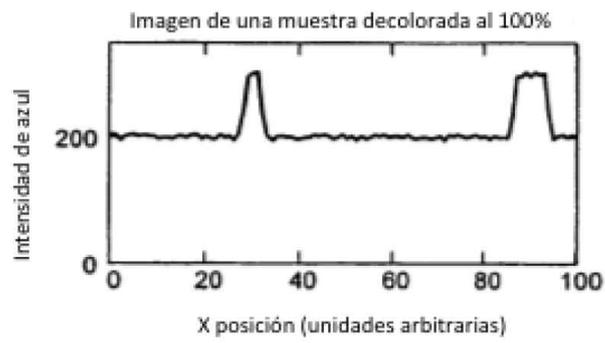


Fig. 8

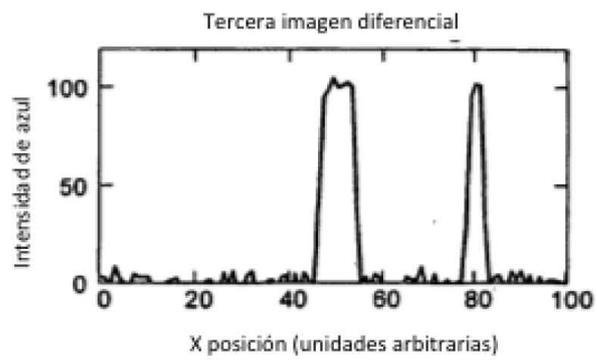


Fig. 9

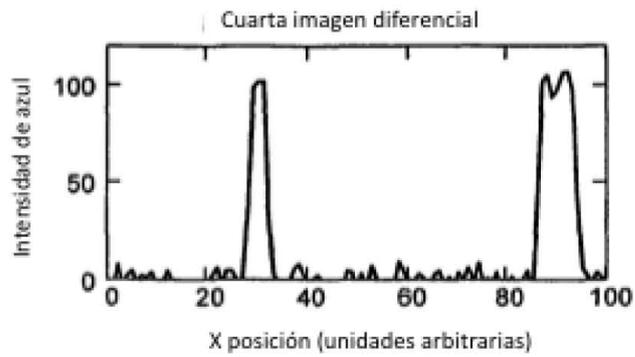


Fig. 10

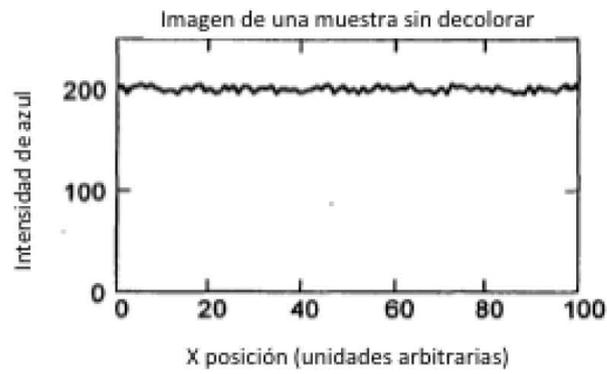


Fig. 11

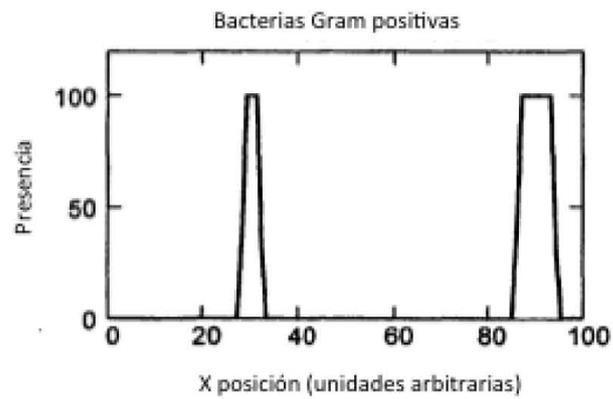


Fig. 12

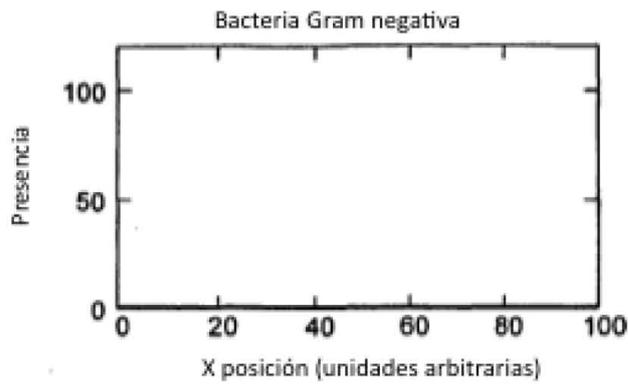


Fig. 13

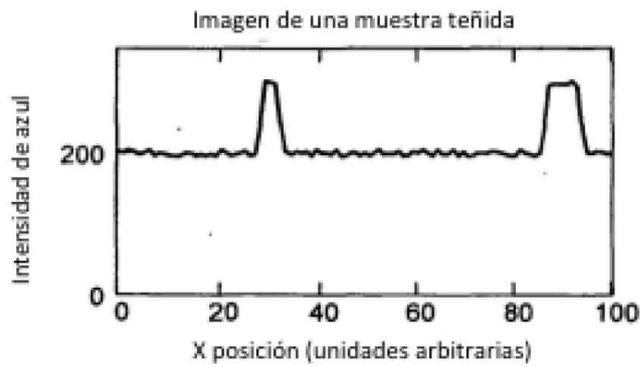


Fig. 14

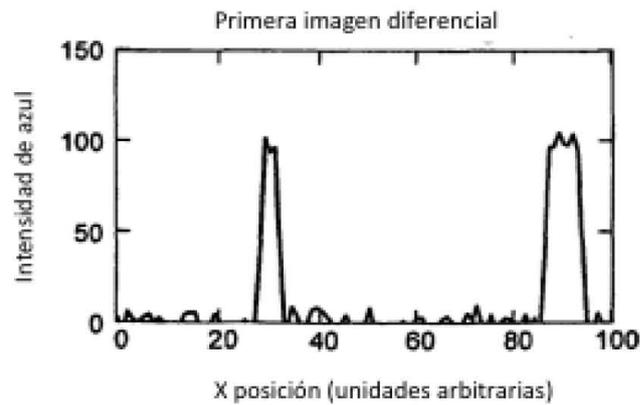


Fig. 15

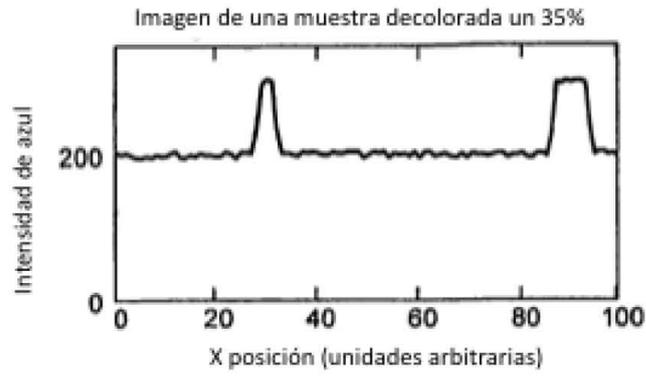


Fig. 16

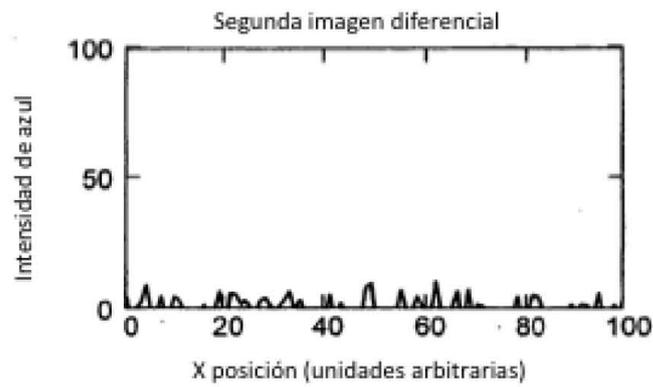


Fig. 17

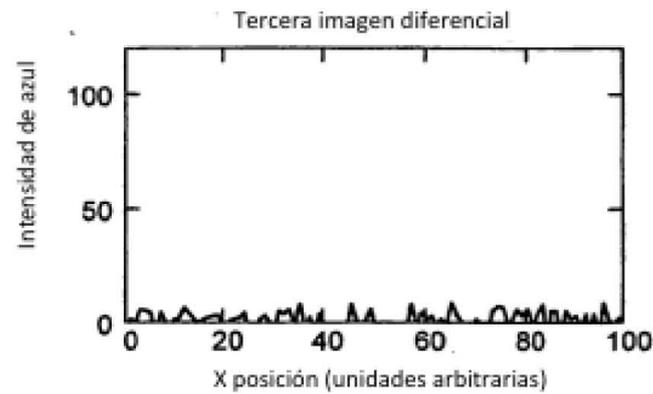


Fig. 18

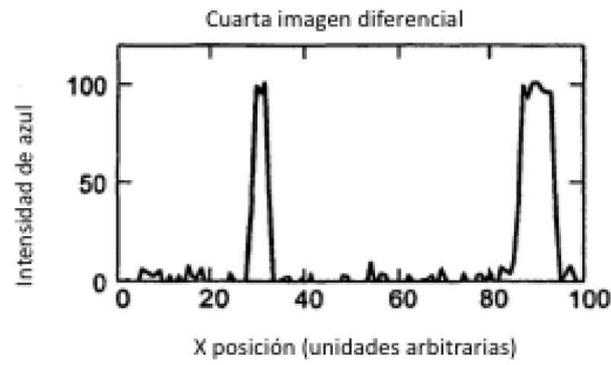


Fig. 19

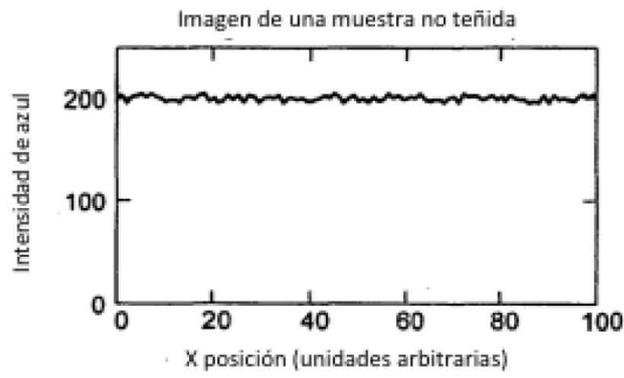


Fig. 20

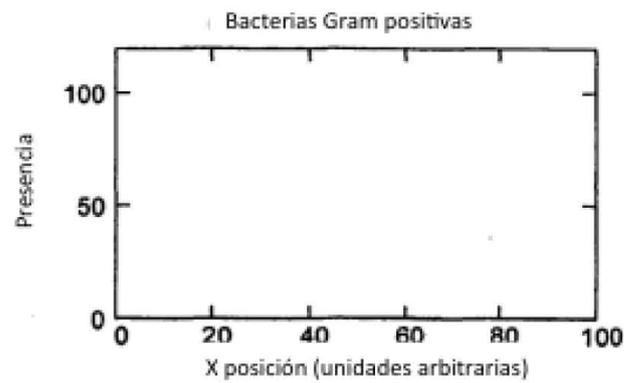


Fig. 21

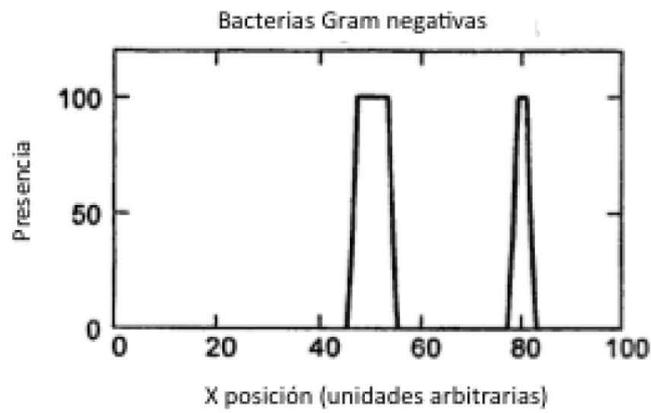


Fig. 22

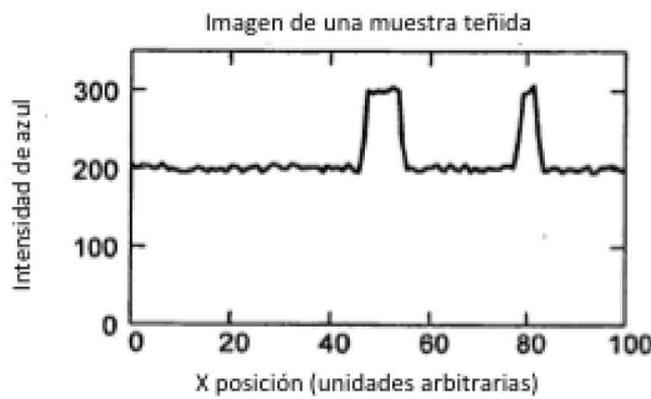


Fig. 23

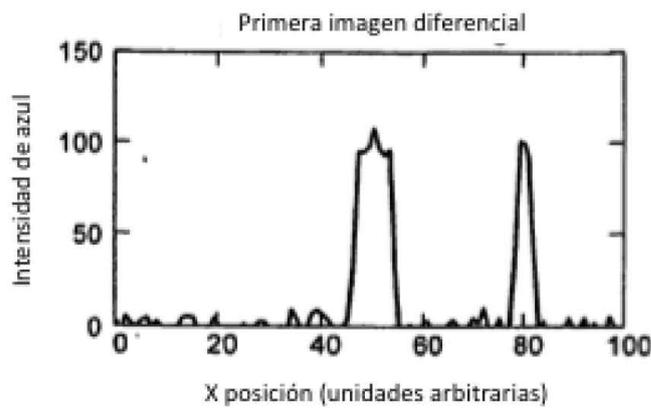


Fig. 24

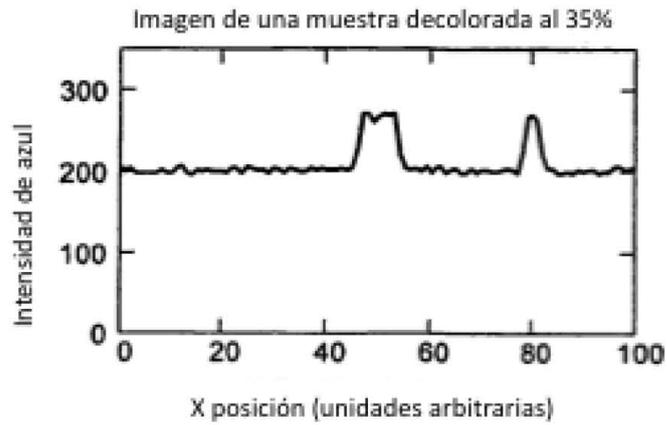


Fig. 25

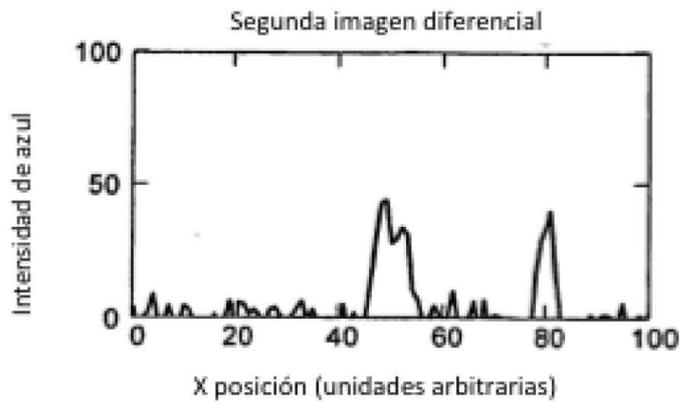


Fig. 26

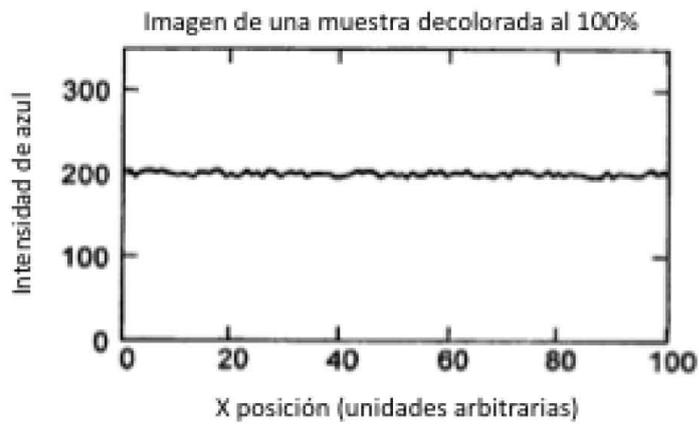


Fig. 27

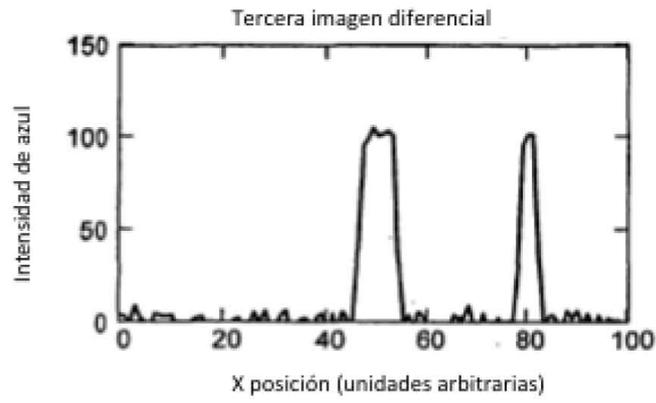


Fig. 28

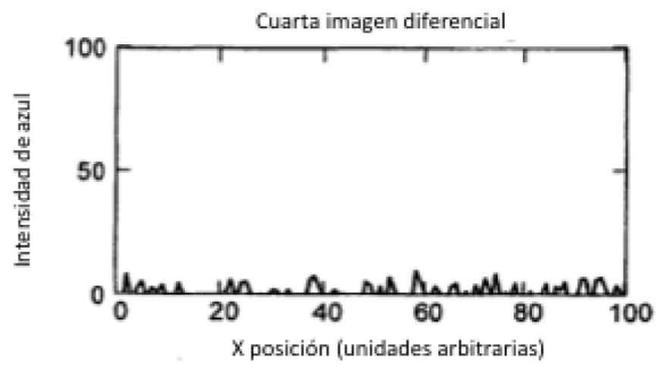


Fig. 29

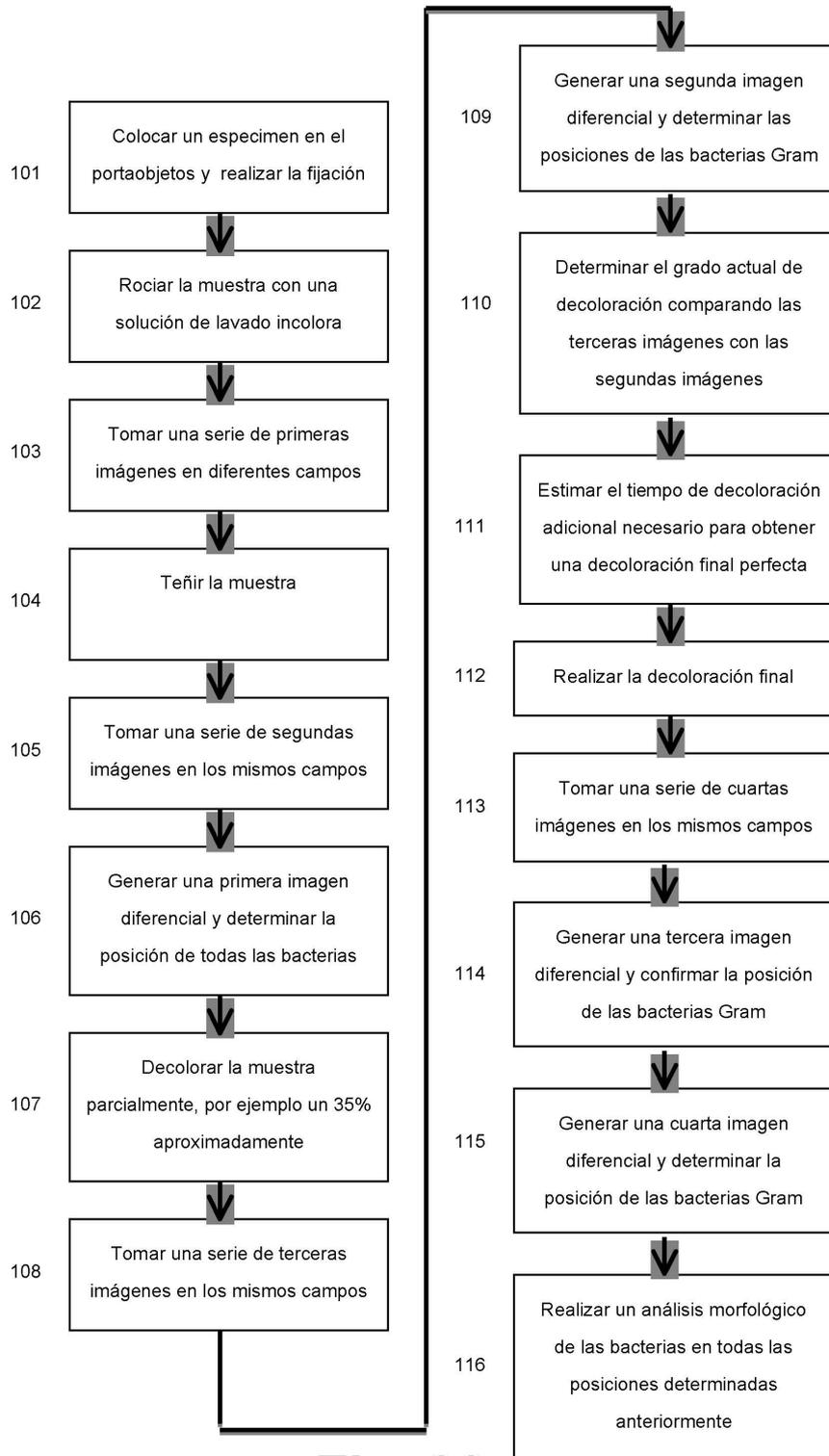


Fig. 30

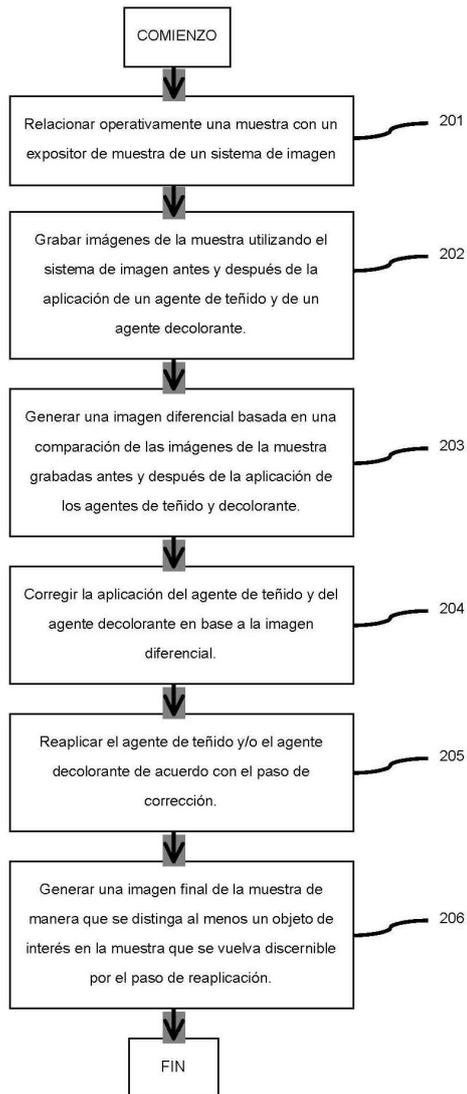


Fig. 31