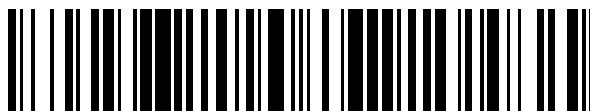


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 338**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013** **PCT/EP2013/053510**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13139554**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013** **E 13705765 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 2828397**

54 Título: **Procedimiento de tinción de Gram con decoloración mejorada del complejo violeta cristal-yodo de bacterias gramnegativas**

30 Prioridad:

19.03.2012 US 201261612520 P

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

08.10.2018

73 Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US

72 Inventor/es:

WEIDNER, CHARLES y
CONNOLLY, CYNTHIA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 685 338 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

Procedimiento de tinción de Gram con decoloración mejorada del complejo violeta cristal-yodo de bacterias gramnegativas

CAMPO

La presente divulgación se refiere a procedimientos de tinción de material biológico con el fin de detectar, y también identificar, microorganismos. Más en particular, la presente divulgación se refiere a procedimientos, uso de composiciones y kits para realizar tinción de Gram automatizada en portaobjetos de microscopio.

ANTECEDENTES

La tinción de Gram es una técnica microbiológica comúnmente usada y bien conocida para la detección, clasificación e identificación de microorganismos, especialmente bacterias. El procedimiento más común de tinción de Gram implica cuatro etapas: tinción, retención, decoloración y contratinción. Se sabe que la tinción de Gram comúnmente usada en laboratorios de histología carece de uniformidad, en particular, como resultado de la variabilidad en la etapa de decoloración. Las variables que afectan la etapa de decoloración incluyen la fuerza del disolvente, la concentración, el volumen y la duración de la exposición. Durante los procedimientos manuales de tinción de Gram, la etapa de decoloración habitualmente usa alcohol o acetona, y la etapa solo tarda unos cuantos segundos.

El documento EP 2 022 858 A1 divulga un procedimiento de tinción de Gram en dos etapas en el que se usa alcohol etílico en una etapa de decoloración rápida que tarda 15 o 30 segundos.

El documento CN 1 392 266 A divulga procedimientos de tinción de Gram en los que se usan mezclas de acetona y etanol como agentes decolorantes.

El documento JP 58 020198 A divulga un procedimiento de tinción de Gram alternativo que usa azul de parosanilina como tinción y una solución alcohólica de ácido pícrico para la decoloración. Se divulga que el procedimiento se realiza manualmente en un objetivo con microorganismos fijados.

Sin embargo, para procedimientos de tinción automatizados, este procedimiento de decoloración se produce demasiado rápido. Esta divulgación aborda los problemas de decoloración de la tinción de Gram en una plataforma de tinción automatizada.

SUMARIO

En el presente documento se proporcionan procedimientos, uso de composiciones y kits que permiten la automatización de la tinción de Gram. Los inventores han identificado composiciones que prolongan la etapa de decoloración de la tinción de Gram, que permite la automatización de la tinción de Gram, por ejemplo, usando un equipo de tinción automatizado y/o ejecutado por ordenador.

Se proporcionan procedimientos para la tinción de Gram de una muestra, tal como una muestra en un portaobjetos de microscopio. Dichos procedimientos se pueden usar para detectar y distinguir bacterias grampositivas y gramnegativas. Los procedimientos de tinción de Gram divulgados también se pueden usar para detectar microorganismos no bacterianos, tales como levadura (por ejemplo, *Candida* y *Cryptococcus*).

En ejemplos particulares, los procedimientos inducen poner en contacto la muestra con una formulación decolorante de acción lenta (tal como una que incluye 1,2-propanodiol o etilenglicol) en condiciones suficientes para eliminar significativamente un complejo de tinción primaria-agente de retención de bacterias gramnegativas, pero no de bacterias grampositivas. La muestra es una que se puso en contacto previamente con una tinción primaria (tal como violeta cristal) y un agente de retención (tal como yodo). En ejemplos particulares, los procedimientos incluyen una o más etapas adicionales del procedimiento de tinción de Gram, tales como poner en contacto la muestra con la tinción primaria en condiciones suficientes para teñir la pared celular y la membrana celular de bacterias grampositivas y gramnegativas; poner en contacto la muestra con un agente de retención en condiciones suficientes para formar un complejo de tinción primaria-agente de retención; poner en contacto la muestra con una contratinción en condiciones suficientes para teñir bacterias gramnegativas decoloradas, o combinaciones de las mismas.

También se proporcionan composiciones que pueden actuar como una formulación decolorante de acción lenta. En un ejemplo, la composición incluye al menos un 80 % de un agente decolorante de acción lenta (tal como 1,2-propanodiol o etilenglicol) y no más de un 20 % de un agente decolorante de acción rápida (tal como de un 0,1 a un 20 % de un agente decolorante de acción rápida, por ejemplo, alcohol etílico o acetona). Se pueden usar dichas composiciones como la formulación decolorante de acción lenta en una tinción de Gram automatizada.

También se proporcionan kits para la tinción de Gram automatizada. En un ejemplo, el kit incluye una formulación

decolorante de acción lenta en un recipiente, tal como una formulación que incluye al menos un 80 % o al menos un 90 % de un agente decolorante de acción lenta (tal como 1,2-propanodiol o etilenglicol) y no más de un 20 % de un agente decolorante de acción rápida (tal como de un 0,1 a un 20 % o de un 1 a un 10 % de un agente decolorante de acción rápida, por ejemplo, alcohol etílico o acetona). Los kits pueden incluir adicionalmente otros componentes, tales como uno o más de una tinción primaria en un recipiente, un agente de retención en un recipiente, una contratinción en un recipiente, portaobjetos de microscopio, cubreobjetos, otras tinciones y portaobjetos de control. En ejemplos particulares, el recipiente se configura para usarse con una plataforma de tinción de Gram automatizada.

- 10 Los anteriores y otros objetivos y características de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a la figura adjunta.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

- 15 La FIG. 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento ejemplar para la tinción de Gram automatizada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 20 Las siguientes explicaciones de términos y procedimientos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Las formas singulares "un", "uno", "una" y "el", "la" se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "que comprende un espécimen" incluye especímenes individuales o plurales y se considera equivalente a la frase "que comprende al menos un espécimen". El término "o" se refiere a un elemento individual de elementos alternativos comentados o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Como se usa en el presente documento, "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende A o B", significa "que incluye A, B o A y B", sin excluir elementos adicionales.

- 30 A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por parte de un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos, tendrá preferencia. La explicación de los términos y procedimientos comunes en microbiología se puede encontrar en Wistreich y Lechtman, *Laboratory Exercises in Microbiology*, 6.^a edición, 1988, y Boyd, *General Microbiology*, 2.^a edición, 1988.

- 35 Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para la práctica o prueba de la tecnología divulgada, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

- 40 Para facilitar la revisión de los diversos modos de realización de la presente divulgación se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

- 45 **Anticuerpo (Ab):** un polipéptido que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada y que se une específicamente a un epítipo de un antígeno (tal como un agente diana). Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos polidionales o fragmentos de anticuerpos, así como otros conocidos en la técnica. Un anticuerpo es específico para una diana, tal como una bacteria particular o tipo de bacteria, y por tanto se puede usar en un ensayo complementario con los procedimientos de tinción de Gram proporcionados en el presente documento.

- 50 Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominadas la región variable pesada (VH) y la región variable ligera (VL). En conjunto, la región VH y la región VL son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo. Esto incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de ellas bien conocidas en la técnica, tales como fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), y proteínas Fv estabilizadas con puentes disulfuro ("dsFv"). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un conector, mientras que en las dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, *Immunology*, 3.^a Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

- 60 Un "anticuerpo monodonal" es un anticuerpo producido por un único don de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de la cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, preparando las células formadoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunitarias. Estas células fusionadas y su progenie se denominan "hibridomas". Los anticuerpos monoclonales incluyen

anticuerpos monoclonales humanizados.

Bacterias: organismos procariotas que en algunos ejemplos provocan enfermedades (bacterias patógenas). Las bacterias se pueden clasificar en función de las características estructurales de sus paredes celulares. Por ejemplo, las capas gruesas de peptidoglucano en la pared celular "grampositiva" se tiñen de color púrpura, mientras que la pared celular delgada "gramnegativa" aparece de color rosa. Combinando la morfología y la tinción de Gram, la mayoría de las bacterias se pueden clasificar como pertenecientes a uno de cuatro grupos (cocos grampositivos, bacilos grampositivos, cocos gramnegativos y bacilos gramnegativos).

Los ejemplos de bacterias que se pueden detectar con los procedimientos de tinción de Gram divulgados incluyen sin limitación: *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus* sp., *Actinomycetes*, *Actinomyces* sp. (tales como *Actinomyces israelii* y *Actinomyces naeslundii*), *Aeromonas* sp. (tales como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* (*Aeromonas sobria*) y *Aeromonas caviae*), *Anaplasma phagocytophilum*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacillus* sp. (tales como *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus stearothermophilus*), *Bacteroides* sp. (tal como *Bacteroides fragilis*), *Bartonella* sp. (tales como *Bartonella bacilliformis* y *Bartonella henselae*), *Bifidobacterium* sp., *Bordetella* sp. (tales como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*), *Borrelia* sp. (tales como *Borrelia recurrentis* y *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* sp. (tales como *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melintensis* y *Brucella suis*), *Burkholderia* sp. (tales como *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia cepacia*), *Campylobacter* sp. (tales como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter fetus*), *Capnocytophaga* sp., *Cardiobacterium hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Citrobacter* sp., *Coxiella burnetii*, *Corynebacterium* sp. (tales como, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeum* y *Corynebacterium*), *Clostridium* sp. (tales como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*), *Eikenella corrodens*, *Enterobacter* sp. (tales como *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*, incluyendo *Escherichia coli* oportunista, tales como *E. coli* enterotoxinógena, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregante y *E. coli* uropatógena), *Enterococcus* sp. (tales como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*), *Ehrlichia* sp. (tales como *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium* sp., *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Haemophilus* sp. (tales como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus parahaemolyticus*), *Helicobacter* sp. (tales como *Helicobacter pylori*, *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*), *Kingella kingii*, *Klebsiella* sp. (tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella granulomatis* y *Klebsiella oxytoca*), *Lactobacillus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Peptostreptococcus* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella* sp., *Mobiluncus* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. (tales como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium marinum*), *Mycoplasma* sp. (tales como *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma genitalium*), *Nocardia* sp. (tales como *Nocardia asteroides*, *Nocardia cyriacigeorgica* y *Nocardia brasiliensis*), *Neisseria* sp. (tales como *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*), *Pasteurella multocida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Prevotella* sp., *Porphyromonas* sp., *Prevotella melaninogenica*, *Proteus* sp. (tales como *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*), *Providencia* sp. (tales como *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri* y *Providencia stuartii*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, *Rhodococcus equi*, *Rickettsia* sp. (tales como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia akari* y *Rickettsia prowazekii*, *Orientia tsutsugamushi* (anteriormente: *Rickettsia tsutsugamushi*) y *Rickettsia typhi*), *Rhodococcus* sp., *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella* sp. (tales como *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*), *Serratia* sp. (tales como *Serratia marcescens* y *Serratia liquifaciens*), *Shigella* sp. (tales como *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), *Staphylococcus* sp. (tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* sp. (tales como *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 resistente a dorianfenicol, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B resistente a espectinomicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 9V resistente a estreptomicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a eritromicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a optoquina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C resistente a rifampicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a tetraciclina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a penicilina y *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F resistente a trimetoprima, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 resistente a cloranfenicol, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B resistente a espectinomicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 9V resistente a estreptomicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a optoquina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C resistente a rifampicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a penicilina o *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F resistente a trimetoprima), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del grupo A, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del grupo B, *Streptococcus agalactiae*, estreptococos del grupo C, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus equismilis*, estreptococos del grupo D, *Streptococcus bovis*, estreptococos del grupo F y *Streptococcus anginosus*, estreptococos del grupo G), *Spirillum minus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema* sp. (tales como *Treponema carateum*, *Treponema petenue*, *Treponema pallidum* y *Treponema endemicum*), *Tropheryma whippelii*, *Ureaplasma urealyticum*, *Veillonella* sp., *Vibrio* sp. (tales como *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio metchnikovii*, *Vibrio damsela* y *Vibrio furnisii*), *Yersinia* sp. (tales como

Yersinia enterocolitica, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*) y *Xanthomonas maltophilia* entre otras.

Poner en contacto: colocación en asociación física directa; incluye tanto en forma sólida como líquida. Por ejemplo, el contacto se puede producir *in vitro* entre un reactivo (tal como un componente de una tinción de Gram) y una muestra que está en solución o bien en una superficie (por ejemplo, en un portaobjetos de microscopio).

Agente decolorante: un agente que puede eliminar sustancialmente un complejo de tinción primaria (por ejemplo, violeta cristal) y agente de retención (por ejemplo, yodo) de una muestra (por ejemplo, una muestra teñida con una tinción primaria y agente de retención), tal como la eliminación sustancial del complejo de la pared celular de bacterias gramnegativas, pero no de bacterias grampositivas. En un ejemplo, dicho complejo se denomina complejo de violeta cristal-yodo (VC-I). En ejemplos particulares, el agente decolorante se incubaba con la muestra que contiene complejos de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, complejos VC-I) durante un período de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente los complejos (y por tanto la tinción primaria) de las células gramnegativas (tal como al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de eliminación de complejo), pero no sustancialmente de células grampositivas.

Formulación decolorante: una composición que incluye uno o más agentes decolorantes. Una **formulación o agente decolorante de acción lenta** es aquella que requiere mayores períodos de tiempo para eliminar los complejos de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, VC-I) (y por tanto la tinción primaria, por ejemplo, violeta cristal) de las células gramnegativas, por ejemplo, un período de tiempo que permite que el equipo automatizado finalice la etapa de decoloración, manteniendo por tanto el equipo automatizado la capacidad de controlar la finalización de la etapa de decoloración antes de que se produzca más decoloración de la deseable (tal como decoloración de bacterias grampositivas). Una formulación decolorante de acción lenta puede tardar al menos 30 segundos, al menos 60 segundos, al menos 120 segundos o al menos 220 segundos, por ejemplo de 1 a 4 minutos, en eliminar los complejos de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, VC-I) de bacterias gramnegativas. Los ejemplos incluyen 1,2-propanodiol y etilenglicol. Un **agente decolorante de acción rápida** es aquel que requiere solo un corto período de tiempo para eliminar los complejos de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, VC-I) (y por tanto la tinción primaria, por ejemplo, violeta cristal) de las células gramnegativas, tal como menos de 20 segundos, menos de 15 segundos, menos de 10 segundos o menos de 5 segundos, por ejemplo de 1 a 2 segundos, de 1 a 5 segundos, de 1 a 10 segundos o de 1 a 20 segundos. Los ejemplos incluyen alcohol etílico, acetona, éter dietílico, éter metílico, mezclas de alcohol etílico y acetona, y mezclas de alcohol etílico con otros alcoholes tales como metanol o 2-propanol.

Detectar: determinar si un agente (tal como una señal u organismo particular, tal como una bacteria grampositiva o gramnegativa) está presente o ausente, por ejemplo, una bacteria particular. Esto puede incluir además la cuantificación. Por ejemplo, el uso de los procedimientos y reactivos divulgados en ejemplos particulares permite informar de señales más fuertes y más débiles.

Bacterias grampositivas: las bacterias que se tiñen de color azul oscuro o violeta durante la tinción de Gram, y tienen una capa gruesa de peptidoglucano. Las bacterias grampositivas ejemplares incluyen:

<i>Actinobacteria</i>	<i>Enterococo</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Lactobacillales</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Listeria</i>
<i>Bacillales</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Bacilo</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Clostridium aerotolerans</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>Clostridium argentinense</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Clostridium baratii</i>	<i>Solobacterium moorei</i>
<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Estafilococo</i>
<i>Clostridium bifementans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Staphylococcus caprae</i>
<i>Clostridium cadaveris</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>

<i>Clostridium colicanis</i>	<i>Staphylococcus muscae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
<i>Clostridium estertheticum</i>	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>
<i>Clostridium fallax</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Clostridium formicaceticum</i>	<i>Staphylococcus succinus</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Clostridium inocuum</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Strangles</i>
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	<i>Streptococo</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Clostridium phytofermentans</i>	<i>Streptococcus canis</i>
<i>Clostridium piliforme</i>	<i>Streptococcus iniae</i>
<i>Clostridium ragsdalei</i>	<i>Streptococcus lactarius</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
<i>Clostridium sticklandii</i>	<i>Streptococcus peroris</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Clostridium tetani</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	<i>Streptococcus rattus</i>
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Corynebacterium granulosum</i>	<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>
<i>Corynebacterium renale</i>	<i>Streptococcus viridans</i>

Bacterias gramnegativas: las bacterias que pierden o no conservan la tinción de color azul oscuro o violeta durante la tinción de Gram, pero en su lugar se colorean por una contratinción, tal como la safranina, y aparecen de color rosa o rojo. Las bacterias gramnegativas tienen una capa delgada de peptidoglucano. Las bacterias gramnegativas ejemplares incluyen:

5

<i>Bacterias de ácido acético</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Fusobacterium polymorphum</i>
<i>Anaerobiospirillum</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>Bdellovibrio</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Brachyspira</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i>	<i>Legionella</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Cyanobacterias</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>Cytophaga</i>	<i>Megamonas</i>
<i>Dialister</i>	<i>Megasphaera</i>

<i>Enterobacter</i>	<i>Moraxela</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Moraxella bovis</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Morganella morganii</i>
Base de datos del genoma de <i>Pseudomonas</i>	<i>Negativicutes</i>
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Salmonella enterica enterica</i>	<i>Pectinatus</i>
<i>Selenomonadales</i>	<i>Propionispora</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Shigella</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Spirochaeta</i>	<i>Proteus penneri</i>
<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Sporomusa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Stenotrophomonas</i>	
<i>Streptococcus gordonii</i>	
<i>Vampirococcus</i>	
<i>Verminephrobacter</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>	
<i>Wolbachia</i>	
<i>Zymophilus</i>	

Tinción primaria: en la tinción de Gram, es el primer tinte aplicado a una muestra. Un ejemplo de una tinción primaria es el tinte violeta cristal.

- 5 **Cuantificación:** determinar o medir una cantidad (tal como una cantidad relativa) de una diana, tal como la cantidad de una bacteria diana presente en una muestra.

- 10 **Valor de referencia:** un número o intervalo de números que representa una condición particular. Se puede comparar un valor experimental con el valor de referencia, por ejemplo, para hacer un diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, un valor de referencia puede ser una cantidad (o intervalo) relativa o absoluta, máxima o mínima de color que se espera que defina un resultado positivo o negativo, tal como grampositivo o gramnegativo.

- 15 **Portaobjetos:** tradicionalmente, un sustrato usado para preparar o sujetar una muestra para microscopía, que es típica pero no necesariamente transparente a la luz. Se pueden tratar las muestras antes y/o después de la preparación sobre un portaobjetos. Un portaobjetos puede ser más o menos transparente u opaco y estar hecho de vidrio, sílice, cuarzo o cualquier otro material susceptible de tinción de Gram. Se puede configurar un portaobjetos para alojar uno o más especímenes de uno o más sujetos. Un portaobjetos como se usa en el presente documento también incluye sustratos no tradicionales tales como una cinta, un disco, una placa, o cualquier otra superficie o forma plana, curva, rectangular o redonda susceptible de presentar una muestra para tinción de Gram.

- 20 **Sujeto:** organismos pluricelulares vivos o fallecidos, una categoría que incluye vegetales, así como animales humanos y no humanos, tales como sujetos veterinarios (por ejemplo, aves, gatos, perros, vacas, cerdos, caballos y roedores). En un ejemplo, se sabe o se sospecha que un sujeto tiene una infección bacteriana.

- 25 **Agente de retención:** un agente que forma un complejo con un tinte y luego reduce o ralentiza el grado en que el tinte se puede aclarar de la muestra o sustrato. En un protocolo de tinción de Gram, el yodo es un agente de retención de ejemplo. El agente de retención se denomina a veces mordiente pero es más exactamente un agente de retención. Un mordiente se une más firmemente al sustrato y no se aclara fácilmente, y en la tinción de Gram se requiere cierta capacidad de eliminación a través del aclarado para evitar falsos positivos. Un mordiente forma un complejo con un tinte que luego se une adicionalmente a un sustrato, tal como una tela, y luego previene fuertemente la eliminación del tinte a través del aclarado. Un agente de retención también forma un complejo con un tinte, pero ese complejo solo impide la eliminación del tinte durante el aclarado. El mecanismo de acción de retención es a menudo desconocido, pero se puede deber a un retraso beneficioso de difusión o a impedimentos estéricos. Es probable que los agentes de retención no actúen a través de un enlace fuerte con un sustrato, y

típicamente todavía se puede eliminar un tinte en complejo con un agente de retención en las condiciones adecuadas, tal como mediante una aplicación suficientemente larga de un agente decolorante suficientemente fuerte, como en la tinción de Gram.

En condiciones suficientes para: una frase que se usa para describir cualquier entorno que permita la actividad deseada. Esto incluye poner en contacto un reactivo con una muestra en condiciones que permitan que el reactivo interactúe física o químicamente o reaccione con, difunda a través de, o desplace otros componentes de la muestra. En un ejemplo específico, esto incluye poner en contacto una muestra (tal como una que se sabe o se sospecha que contiene una bacteria) con uno o más reactivos o componentes de la tinción de Gram, para permitir la detección exacta de bacterias gramnegativas o grampositivas en la muestra.

Visión de conjunto

La tinción de Gram es una técnica microbiológica comúnmente usada y bien conocida para la detección, clasificación e identificación de microorganismos, especialmente bacterias, tales como la diferenciación de bacterias en dos clases generales en función de sus estructuras de membrana celular: grampositivas y gramnegativas. La diferencia principal entre bacterias grampositivas y gramnegativas es que en las bacterias grampositivas, los reactivos de tinción primaria se absorben dentro de la estructura celular completa, mientras que en las bacterias gramnegativas, la tinción se produce solo superficialmente. En consecuencia, cuando la muestra se trata posteriormente con un agente decolorante, las bacterias gramnegativas tienden a perder su color, mientras que las bacterias grampositivas normalmente permanecen teñidas de color azul o violeta.

La tinción de Gram es propensa a resultados faltos de uniformidad y variables. En particular, la etapa de decoloración puede ser problemática con respecto a lograr la cantidad correcta de decoloración de las bacterias. Si no hay suficiente decoloración, las bacterias gramnegativas retienen la tinción primaria (por ejemplo, violeta cristal), mientras que si hay demasiada decoloración, tanto las bacterias grampositivas como gramnegativas quedan sin teñir. La falta de uniformidad en la decoloración se puede atribuir a la afinidad del complejo de tinción primaria-agente de retención por el disolvente decolorante, la cantidad de disolvente decolorante aplicado, la fuerza solubilizante relativa del disolvente decolorante, así como el período de tiempo que el disolvente decolorante está en contacto con la muestra.

En los procedimientos manuales tradicionales de tinción de Gram, la etapa de decoloración requiere solo un pequeño volumen (tal como 2-3 gotas) y solo tarda unos segundos en decolorar las bacterias gramnegativas. Las tinciones de Gram se preparan de forma convencional y se analizan manualmente. Sin embargo, esto es demasiado rápido para procedimientos automatizados, que, debido a limitaciones de la instrumentación, pueden requerir minutos en esta etapa. Como resultado, cuando se usan agentes decolorantes tradicionales en un sistema automatizado, se produce una cantidad inaceptable de decoloración. Por tanto, en el presente documento se proporcionan nuevos agentes decolorantes de acción más lenta y formulaciones que prolongan la etapa de decoloración y permiten que la tinción de Gram sea automatizada.

Procedimientos de tinción de Gram

La tinción de Gram incluye tradicionalmente cuatro etapas, cada una de las cuales aplica a la muestra uno de los siguientes reactivos: una tinción primaria, comúnmente tinte violeta cristal; un agente de retención (a veces denominado mordiente), comúnmente yodo; un agente decolorante, comúnmente etanol o etanol/acetona; y una contratinción, que normalmente contiene safranina O, fucsina u otro tinte rojo. La presente divulgación proporciona procedimientos para mejorar los procedimientos manuales anteriores de tinción de Gram que incluían una etapa de decoloración muy rápida (por ejemplo, 1-5 segundos). Los procedimientos divulgados para la tinción de Gram se pueden usar en procedimientos automatizados, ya que se han identificado agentes decolorantes de acción lenta que prolongan la etapa de decoloración (por ejemplo, la decoloración tarda al menos 30 segundos o al menos 60 segundos).

La divulgación proporciona procedimientos de tinción de Gram de una muestra. Dichos procedimientos se pueden usar para detectar y distinguir bacterias grampositivas y gramnegativas presentes en la muestra. En ejemplos particulares, el procedimiento incluye poner en contacto una muestra (o una pluralidad de muestras) con una formulación decolorante de acción lenta en condiciones suficientes para eliminar un complejo de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, complejo VC-I) de bacterias gramnegativas pero no bacterias grampositivas, en los que la muestra se puso en contacto previamente con una tinción primaria y un agente de retención.

Se apreciará que el procedimiento puede incluir además una o más etapas adicionales de tinción de Gram. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir además uno o más de: poner en contacto la muestra con una tinción primaria en condiciones suficientes para teñir la pared celular (que incluye peptidoglucano) (y en algunos ejemplos la membrana celular) de bacterias grampositivas y gramnegativas, poner en contacto la muestra con un agente de retención en condiciones suficientes para formar un complejo de tinción primaria-agente de retención, que puede prevenir la eliminación de la tinción primaria de las bacterias grampositivas pero no de las bacterias gramnegativas, y poner en contacto la muestra con una contratinción en condiciones suficientes para teñir la pared celular (que

incluye peptidoglucano) (y en algunos ejemplos, la membrana celular) de bacterias gramnegativas decoloradas.

Poner en contacto la muestra con una tinción primaria puede incluir poner en contacto o incubar la muestra con una formulación que incluya violeta cristal (VC) o violeta de genciana. En un ejemplo, la formulación de tinción primaria incluye VC o violeta de genciana a una concentración de al menos 0,5 g/l, al menos 0,75 g/l, al menos 1 g/l, al menos 2 g/l, al menos 3 g/l, al menos 4 g/l, o al menos 5 g/l, tal como de 1 a 4 g/l, por ejemplo 3 g/l. El VC o violeta de genciana puede estar presente en una solución que contiene isopropanol, etanol/metanol y agua, tal como 50 ml de isopropanol, 50 ml de etanol/metanol y 900 ml de agua. La solución de VC o violeta de genciana puede contener además oxalato de amonio para potenciar la estabilidad.

Poner en contacto la muestra con un agente de retención puede incluir poner en contacto o incubar la muestra con una formulación que incluya yodo, tal como solución de yodo de Gram o polivinilpirrolidona-yodo (PVP-yodo). El yodo de Gram es una mezcla que puede incluir al menos un 0,1 % de yodo (por ejemplo, al menos un 0,2 %, al menos un 0,5 % o al menos un 1 %, tal como aproximadamente un 0,1 %-1 % de yodo) y al menos un 0,1 % de yoduro potásico (por ejemplo, al menos un 0,2 %, al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 % o al menos un 2 %, tal como aproximadamente un 0,1 %-2 % de yoduro potásico), por ejemplo en agua o mezclas de alcoholes. PVP-yodo incluye al menos un 1 % de polivinilpirrolidona (por ejemplo, al menos un 2 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 % o al menos un 35 %, tal como aproximadamente un 1-35 % de polivinilpirrolidona) y al menos un 1 % de yodo (por ejemplo, al menos un 2 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 % o al menos un 35 %, tal como aproximadamente un 1 %-35 % de yodo) en agua (por ejemplo, véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 2.739.922 y 3.898.326).

Poner en contacto la muestra con una contratinción puede incluir poner en contacto o incubar la muestra con una formulación que incluya fucsina (tal como fucsina básica o carbol fucsina), rojo neutro y/o safranina O. En un ejemplo, la formulación de contratinción incluye fucsina a una concentración de al menos un 0,01 %, al menos un 0,02 %, al menos un 0,03 %, al menos un 0,05 %, al menos un 0,1 %, al menos un 0,2 %, al menos un 0,3 %, al menos un 0,4 %, o al menos un 0,5 %, tal como de un 0,02 % a un 0,5 %. En un ejemplo, la formulación de contratinción incluye rojo neutro a una concentración de al menos un 0,01 %, al menos un 0,02 %, al menos un 0,03 %, al menos un 0,05 %, al menos un 0,1 %, al menos un 0,2 %, al menos un 0,3 %, al menos un 0,4 % o al menos un 0,5 %, tal como de un 0,02 % a un 1 %. En un ejemplo, la formulación de contratinción incluye safranina O a una concentración de al menos un 0,1 %, tal como al menos un 0,2 %, al menos un 0,3 %, al menos un 0,4 %, al menos un 0,5 %, al menos un 0,6 %, al menos un 0,7 %, o al menos un 0,8 %, tal como de un 0,1 % a un 1 % o de un 0,1 % a un 0,8 % de safranina O. La contratinción se puede formular en agua, pero puede incluir un 1 %-20 % de etanol o metanol.

En un modo de realización, la muestra se incuba con la formulación decolorante de acción lenta y la contratinción al mismo tiempo. La concentración de formulación decolorante de acción lenta en una formulación decolorante de acción lenta/formulación de contratinción combinada puede variar de aproximadamente un 75 % a un 99 %, tal como al menos un 75 % de formulación decolorante de acción lenta, al menos un 80 % de formulación decolorante de acción lenta, al menos un 90 % de formulación decolorante de acción lenta, o al menos un 95 % de formulación decolorante de acción lenta. En otro modo de realización, la muestra se incuba en primer lugar con la formulación decolorante de acción lenta seguido de la contratinción.

Un experto en la técnica apreciará que cada etapa de contacto del procedimiento de tinción de Gram puede incluir o ir seguida de una etapa de aclarado, antes de la siguiente etapa de contacto. El aclarado se puede llevar a cabo usando cualquier formulación posterior que puede lavar una formulación previa sin una reacción indeseable. Por ejemplo, la formulación posterior puede ser una de las siguientes formulaciones de tinción de Gram, que se puso en contacto con la muestra en cantidad en exceso y se dejó drenar, en este caso el aclarado se combina eficazmente con el contacto de una muestra con la siguiente formulación de tinción de Gram (por ejemplo, en el orden mostrado en la FIG. 1). En otro ejemplo, se añaden etapas de aclarado separadas después o como parte de las etapas de contacto (por ejemplo, las mostradas en la FIG. 1). En este ejemplo, el aclarado se produce cuando una muestra se pone en contacto con una formulación inactiva (por ejemplo, agua o tampón), y luego se deja drenar.

El período de tiempo en que la muestra se pone en contacto o se incuba con la formulación decolorante de acción lenta es más largo que la tinción de Gram manual tradicional. Por ejemplo, el uso de una formulación decolorante de acción lenta requiere mayores períodos de tiempo para eliminar los complejos de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, VC-I) (y por tanto la tinción primaria, por ejemplo, violeta cristal) de las células gramnegativas. La muestra se puede poner en contacto o incubar con la formulación decolorante de acción lenta al menos 30 segundos, al menos 45 segundos, al menos 60 segundos, al menos 120 segundos o al menos 220 segundos, por ejemplo de 30 segundos a 4 minutos, de 1 a 5 minutos, o de 2 a 4 minutos. Períodos más largos de decoloración permiten que el equipo automatizado finalice la etapa de decoloración, manteniendo por tanto el equipo automatizado la capacidad de controlar la finalización de la etapa de decoloración antes de que se produzca más decoloración de la deseable (tal como la decoloración de bacterias grampositivas). Por tanto, se puede diseñar el tiempo entre o en una o más etapas para ajustarse a la automatización, tal como la automatización de la tinción de Gram por una parte de equipo particular.

En un ejemplo, se incuba o se pone en contacto la muestra con la tinción primaria, el agente de retención o la contratinción durante al menos 30 segundos, al menos 40 segundos, al menos 50 segundos, al menos 60 segundos, al menos 70 segundos, al menos 80 segundos, al menos 90 segundos, al menos 100 segundos, al menos 120 segundos, al menos 150 segundos, al menos 180 segundos, al menos 210 segundos, al menos 220 segundos, al menos 240 segundos, al menos 270 segundos o al menos 300 segundos. Además, después de poner en contacto una muestra con cualquiera o cada una de las formulaciones de tinción de Gram (tinción primaria, agente de retención, formulación decolorante de acción lenta y contratinción), se puede producir el contacto posterior de la muestra con una formulación de aclarar o con cualquier formulación de tinción de Gram posterior, en algunos ejemplos, después de que hayan transcurrido al menos aproximadamente 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 60 segundos, 70 segundos, 80 segundos, 90 segundos, 100 segundos, 120 segundos, 150 segundos, 180 segundos, 210 segundos, 240 segundos, 270 segundos o 300 segundos. Por tanto, por ejemplo, después de poner en contacto la muestra con una tinción primaria, se puede producir contacto con el agente de retención al menos 10 segundos más tarde, tal como al menos 30 segundos o al menos 1 minuto más tarde. En ejemplos en los que se incluyen etapas de aclarar separadas usando formulaciones inactivas, posteriormente a esa etapa de aclarar, se puede producir contacto con la siguiente formulación de tinción de Gram después de que hayan transcurrido al menos aproximadamente 0,5 segundos, 1 segundo, 2 segundos, 4 segundos, 6 segundos, 8 segundos, 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 60 segundos, 70 segundos, 80 segundos, 90 segundos, 100 segundos, 120 segundos, 150 segundos, 180 segundos, 210 segundos, 240 segundos, 270 segundos o 300 segundos.

La temperatura de los reactivos usados en los procedimientos de tinción de Gram puede ser ambiental o estar controlada por equipo automatizado e instalaciones locales para que sea la misma para cada formulación o para que varíe para una o más formulaciones. En un ejemplo, las formulaciones de aclarar inactivas son relativamente más frías que la temperatura del aire ambiente. Las formulaciones de aclarar inactivas pueden estar en el intervalo de 5° a 50 °C inmediatamente antes de ponerse en contacto con una muestra. Una o más de las formulaciones de tinción de Gram (tinción primaria, agente de retención, formulación decolorante de acción lenta y contratinción) pueden estar a de 10° a 60 °C inmediatamente antes de ponerse en contacto con una muestra.

El pH de una formulación de tinción de Gram se puede ajustar y puede incluir ácidos, bases y agentes tamponantes. Una o más de las formulaciones de tinción de Gram (tinción primaria, agente de retención, formulación decolorante de acción lenta y contratinción) pueden estar a de pH=3 a pH=8, por ejemplo para lograr una mejor tinción y para distinguir las células bacterianas de las células no bacterianas después de la tinción de Gram.

El procedimiento puede incluir además detectar bacterias grampositivas o gramnegativas en la muestra, por ejemplo con un microscopio u otro equipo similar. En un modo de realización, el procedimiento puede incluir determinar si la muestra analizada contiene bacterias grampositivas y/o gramnegativas.

Los procedimientos divulgados se ejemplifican en la FIG. 1, que muestra un procedimiento de tinción automatizado ejemplar, 100, que incluye un procedimiento de tinción de Gram 101. El procedimiento de tinción de Gram 101 mostrado en la FIG. 1 tiene etapas que incluyen: poner en contacto la muestra con una formulación de tinción primaria 107, poner en contacto la muestra con la formulación de retención 108, poner en contacto la muestra con una formulación decolorante de acción lenta 109, poner en contacto una muestra con una formulación de contratinción 110, y clasificar la muestra 111 como grampositiva, gramnegativa o indeterminada. Por tanto, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con la formulación decolorante de acción lenta, 109. La FIG. 1 muestra que el contacto de la muestra con la formulación decolorante de acción lenta 109 se produce después de que la muestra se ha puesto en contacto con la formulación de tinción primaria 107 y mediante la formulación de retención 108, pero antes de poner en contacto la muestra con la formulación de contratinción 110. Como se analiza anteriormente, cada etapa de contacto 107, 108, 109 y 110 puede incluir o ir seguida de etapas de aclarado adicionales, antes de la siguiente etapa de contacto. Por ejemplo, después de que la muestra se pone en contacto con la formulación de tinción primaria 107, se puede aclarar antes o durante el contacto de la muestra con la formulación de retención 108. El procedimiento también puede incluir la etapa 111 de clasificar o determinar si las bacterias en la muestra son gramnegativas, grampositivas, o si no es posible hacer dicha determinación.

Por tanto, después de poner en contacto una muestra con cualquiera o cada una de las formulaciones de tinción de Gram de la FIG. 1 (107, 108, 109 y/o 110), se puede producir el posterior contacto con una formulación de aclarar o con la formulación de tinción de Gram posterior después de que hayan transcurrido al menos aproximadamente 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 60 segundos, 70 segundos, 80 segundos, 90 segundos, 100 segundos, 120 segundos, 150 segundos, 180 segundos, 210 segundos, 215 segundos, 220 segundos, 240 segundos, 270 segundos o 300 segundos. En ejemplos en los que se incluyen etapas de aclarar separadas que usan formulaciones inactivas, posteriormente a esa etapa de aclarar, se puede producir el contacto con la siguiente formulación de tinción de Gram de la FIG. 1 (107, 108, 109 y/o 110) después de que hayan transcurrido al menos aproximadamente 0,5 segundos, 1 segundo, 2 segundos, 4 segundos, 6 segundos, 8 segundos, 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 60 segundos, 70 segundos, 80 segundos, 90 segundos, 100 segundos, 120 segundos, 150 segundos, 180 segundos, 210 segundos, 240 segundos, 270 segundos o 300 segundos.

Como se muestra en la FIG. 1, en un procedimiento para la tinción de Gram automatizada 100, el procedimiento puede incluir etapas para obtener una muestra 102 y cargar la muestra 103 en el equipo automatizado. El equipo automatizado puede realizar ensayos en paralelo 105 o en serie que preceden 104, o que siguen 106, a las etapas de tinción de Gram 101. Los ensayos en serie que preceden 104 y siguen 106 se pueden realizar en la misma muestra, pero, por ejemplo, en portaobjetos diferentes. Los ejemplos de los ensayos en serie que preceden 104 y siguen 106 incluyen inmunoensayos y ensayos microbiológicos adicionales.

Automatización

Se puede producir una o más de las etapas de tinción de Gram (por ejemplo, poner en contacto una muestra con una formulación de tinción primaria, formulación de agente de retención, formulación de agente decolorante de acción lenta y/o formulación de contratinción) usando un equipo de tinción automático. Por ejemplo, se pueden usar los procedimientos divulgados con los equipos de Ventana Medical Systems, Inc., tales como los sistemas de teñidor especial Ventana NexES, teñidor especial BenchMark, Benchmark XT, Benchmark Ultra y Discovery. Los sistemas ejemplares se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 6.352.861, la patente de EE. UU. n.º 5.654.200, la patente de EE. UU. n.º 6.582.962, la patente de EE. UU. n.º 6.296.809 y la patente de EE. UU. n.º 5.595.707, y también se puede encontrar información adicional con respecto a sistemas y procedimientos automatizados en el documento PCT/US2009/067042.

En un modo de realización, el procedimiento para tinción de Gram automatizada es un procedimiento ejecutado por ordenador en el que un algoritmo, un ordenador dentro del equipo automatizado, un ordenador separado y/o un sistema y/o red informática distribuida contribuyen a la ejecución de cualquiera o todas las etapas de tinción de Gram (por ejemplo, una o más de las etapas en la FIG. 1, tales como las etapas 107, 108, 109, 110 y 111 de la FIG. 1) por medio de instrucciones ejecutables por ordenador en uno o más medios legibles por ordenador. Por ejemplo, la ejecución por ordenador del procedimiento de tinción de Gram divulgado (por ejemplo, como se muestra en la FIG. 1) puede contribuir al seguimiento de muestras, selección y/o programación de ensayos y/o etapas de ensayos, control de equipos, adquisición y/o análisis de resultados, retención de datos, presentación de informes e interacción con sistemas médicos u otros sistemas de información, toma de decisiones, cambios en el flujo de muestras, y/o notificaciones a operadores y otro personal.

En los procedimientos de tinción de Gram automatizados, el equipo automatizado puede requerir más tiempo para tratar múltiples muestras y continuar que los procedimientos de tinción de Gram manuales tradicionales, tal como minutos en lugar de segundos. Por ejemplo, se puede ajustar la etapa de decoloración en términos de duración, así como de volumen y fuerza de solvatación, para eliminar adecuadamente el complejo de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, complejo VC-I) solo de las bacterias gramnegativas. Sin embargo, para sistemas automatizados, como los sistemas de teñidor especial NexES, teñidor especial BenchMark, Benchmark XT, Benchmark Ultra o Discovery de Ventana Medical Systems, Inc., en los que el tiempo entre la distribución/aplicación y el aclarado/eliminación se fija al valor mínimo preciso, el control de la etapa de decoloración está restringido a cambiar el volumen o bien la fuerza de solvatación de la formulación decolorante. Si el volumen es demasiado pequeño, se puede producir decoloración con falta de uniformidad, y puede no ser posible alterar la fuerza de solvatación del etanol para permitir la decoloración selectiva del complejo de tinción primaria-agente de retención (por ejemplo, complejo VC-I) solo de las bacterias gramnegativas. Por ejemplo, el teñidor especial Ventana BenchMark funciona dentro de una etapa simultánea invariable, definida entre los dos procedimientos de distribución y eliminación, y se muestra en el presente documento que las formulaciones decolorantes de acción lenta, tales como las que incluyen 1,2-propandiol, decoloran eficaz y selectivamente las bacterias gramnegativas dentro de este margen de tiempo.

El equipo de tinción automático puede funcionar en parte mediante el uso de aire comprimido. Por tanto, cuando la muestra se pone en contacto con una formulación de tinción primaria, formulación de agente de retención, formulación de agente decolorante de acción lenta y/o formulación de contratinción, se usa aire comprimido para administrar la formulación de tinción primaria, formulación de agente de retención, formulación de agente decolorante de acción lenta y/o formulación de contratinción, a la muestra.

En un modo de realización, el procedimiento incluye cargar la muestra que se va a analizar para determinar la presencia de bacterias en el equipo de tinción automático.

En un modo de realización particular, se proporciona un procedimiento para tinción de Gram de bacterias en un portaobjetos usando un equipo de tinción automático. El equipo de tinción automático puede incluir un medio de carrusel para sostener una pluralidad de portaobjetos, en el que cada portaobjetos tiene sobre el mismo una muestra que se va a teñir, tal como una muestra que se sabe o se sospecha que contiene bacterias. El equipo de tinción automático también puede incluir un medio para hacer girar el medio de carrusel a velocidades predeterminadas y un medio para dirigir y controlar la aplicación de reactivos (tales como reactivos de tinción de Gram u otras tinciones) sobre los portaobjetos y muestras durante el giro del medio de carrusel. Dicho procedimiento puede incluir dirigir un reactivo de tinción primaria (tal como uno que contiene violeta cristal) sobre los portaobjetos en el carrusel para poner en contacto las bacterias en los portaobjetos con el reactivo de tinción primaria; dirigir agua, una mezcla de agua-tensioactivo o tampón sobre los portaobjetos en el carrusel para aclarar el reactivo de tinción primaria de los

portaobjetos, por ejemplo en condiciones que permitan la eliminación del exceso de tinción; dirigir un reactivo de retención (tal como uno que contenga yodo) sobre los portaobjetos en el carrusel para poner en contacto a las bacterias en los portaobjetos con el reactivo de retención, por ejemplo en condiciones que permitan la formación de un complejo de tinción primaria-agente de retención en las bacterias grampositivas en la muestra, dirigir agua u otro tampón sobre los portaobjetos en el carrusel para aclarar el exceso de reactivo de retención de los portaobjetos; dirigir una formulación decolorante de acción lenta y una contratinción, por separado o bien en conjunto, sobre los portaobjetos en el carrusel, por ejemplo en condiciones que permitan la eliminación de la tinción primaria en las bacterias gramnegativas en la muestra; y dirigir agua o tampón sobre los portaobjetos en el carrusel para adarar el exceso de formulación decolorante de acción lenta y/o contratinción de los portaobjetos (si la formulación decolorante de acción lenta y la contratinción se añaden por separado, el procedimiento puede incluir una etapa de lavado en medio). El procedimiento puede incluir además detectar bacterias grampositivas o gramnegativas en el portaobjetos.

Formulaciones decolorantes de acción lenta

La formulación decolorante de acción lenta usada en los procedimientos divulgados se basa en la identificación de agentes decolorantes de acción lenta tales como 1,2-propanodiol y etilenglicol. En el presente documento, se muestra que el agente decolorante 1,2-propanodiol o propilenglicol (PG) como se denomina comúnmente, puede decolorar eficazmente el complejo VC-I de las bacterias gramnegativas dentro de la etapa simultánea sincronizada (4 minutos) de un teñidor automatizado, por ejemplo, el teñidor especial BenchMark. PG es más lento para disolver la capa de liposacárido de bacterias gramnegativas y permitir la difusión del complejo VC-I desde la membrana celular bacteriana (peptidoglucano) que otros decolorantes, lo que permite de este modo que se produzca la decoloración selectiva solo de las células gramnegativas a una tasa más lenta. Por tanto, PG permite que se realice una tinción de Gram mediante un sistema de tinción automatizado que tiene un tiempo establecido entre la aplicación y la eliminación del decolorante que es sustancialmente más largo que el usado con los decolorantes tradicionales.

Se puede usar uno o más de estos y cualquier otro agente decolorante de acción lenta en forma pura, diluirse con agua o un tampón, o mezclarse con agentes de acción rápida a fin de crear formulaciones decolorantes de tasa de decoloración deseable. En un ejemplo, una formulación decolorante de acción lenta incluye un agente decolorante de acción lenta, tal como 1,2-propanodiol, etilenglicol o combinaciones de los mismos. En un ejemplo específico, la formulación decolorante de acción lenta es o consiste en 1,2-propanodiol o etilenglicol. Se puede incluir agua en la formulación decolorante de acción lenta, por ejemplo a concentraciones que varían de aproximadamente un 0 % a un 25 %, tal como de un 0,5 % a un 25 %, de un 1 % a un 20 %, de un 5 % a un 10 %, tal como aproximadamente un 10 %.

La formulación decolorante de acción lenta puede incluir una mezcla de un agente decolorante de acción lenta y un agente decolorante de acción rápida, tal como al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,9 % de un agente decolorante de acción lenta (por ejemplo, 1,2-propanodiol, etilenglicol, o combinaciones de los mismos), tal como de un 80 % a un 99,99 %, de un 80 % a un 95 %, de un 80 % a un 90 %, de un 90 % a un 95 %, de un 90 % a un 99 %, o de un 90 % a un 95 % de un agente decolorante de acción lenta, y no más de un 20 %, no más de un 19 %, no más de un 18 %, no más de un 17 %, no más de un 16 %, no más de un 15 %, no más de un 14 %, no más de un 13 %, no más de un 12 %, no más de un 11 %, no más de un 10 %, no más de un 9 %, no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 6 %, no más de un 5 %, no más de un 4 %, no más de un 3 %, no más de un 2 %, no más de un 1 %, no más de un 0,5 %, o no más de un 0,01 % de un agente decolorante de acción rápida tal como de un 0,01 % a un 20 %, de un 1 % a un 20 %, de un 1 % a un 10 % o de un 1 % a un 5 % de un agente decolorante de acción rápida. Los ejemplos de agentes decolorantes de acción rápida incluyen éter metílico de propilenglicol, éter dietílico, etanol, acetona, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol o combinaciones de los mismos, tales como mezclas de alcohol etílico y acetona y mezclas de alcohol etílico con otros alcoholes tales como metanol o 2-propanol.

Muestras

Una muestra puede ser cualquier material que se va a analizar para detectar la presencia de bacterias. Una muestra puede ser biológica o no biológica y se puede obtener de un sujeto, un entomo, un sistema o un procedimiento. Por tanto, el procedimiento puede incluir obtener la muestra. Por ejemplo, se puede obtener la muestra de un sujeto que se sabe o se sospecha que tiene una infección bacteriana, o de una fuente que se sabe o se sospecha que está contaminada por bacterias.

En un ejemplo, la muestra se obtiene de un sujeto, tal como un sujeto humano. Dicha muestra puede ser cualquier muestra sólida o líquida obtenida de, excretada por o segregada por el sujeto, tal como células, lisados celulares, sangre periférica (o una fracción de la misma tal como suero o plasma), orina, bilis, ascitis, saliva, frotis bucal, biopsia de tejido (tal como biopsia de tumor o biopsia de ganglio linfático), pieza quirúrgica, médula ósea, muestras de amniocentesis, biopsia aspirativa, muestras del cuello uterino (por ejemplo, una prueba de Papanicoláu, células

de hocico de tenca o endocérvix), líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, un trasudado, un exudado (por ejemplo, líquido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), líquido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad, tal como artritis reumatoide, artrosis, gota o artritis infecciosa) y material de autopsia.

En un ejemplo, la muestra se obtiene del entorno, tal como de una masa de agua, aire, sedimento, polvo, suelo o del interior o superficie de un objeto animado o inanimado en un entorno natural o uno residencial, comercial, industrial, médico, académico, agrícola u otro artificial (por ejemplo, instalaciones de transformación, producción y consumo de alimentos y entornos de eliminación), y se puede obtener de una fuente industrial, tal como una granja, una corriente de desechos o una fuente de agua. Por tanto, las muestras pueden ser las obtenidas de cualquier entorno que se sabe o se sospecha que alberga bacterias, microorganismos o material pluricelular en general.

En un ejemplo, la muestra es una muestra de alimento (tal como una muestra de carne, fruta, productos lácteos o vegetales) o una muestra obtenida de una fábrica de transformación de alimentos.

La muestra también puede ser un líquido recogido, un raspado, un filtrado o un cultivo. En un ejemplo, la muestra es una muestra de citología. Se pueden usar las muestras directamente (por ejemplo, frescas o congeladas) o se pueden manipular antes de su uso, por ejemplo, por concentración, dilución, fijación (por ejemplo, usando formol o calor) y/o inclusión en cera (tal como muestras incluidas en parafina fijadas con formol (FFPE)). En un ejemplo, la muestra se fija con calor a un portaobjetos de microscopio.

Ensayos adicionales

Los procedimientos divulgados pueden incluir realizar ensayos adicionales en la muestra, por ejemplo para determinar o identificar las bacterias particulares en la muestra. Se pueden realizar los ensayos adicionales antes o después de la tinción de Gram, o incluso simultánea o contemporáneamente con la tinción de Gram. Dichos ensayos adicionales se realizan normalmente en un portaobjetos separado. Por ejemplo, se puede aplicar una muestra a una pluralidad de portaobjetos (por ejemplo, diferentes cortes o secciones de una muestra FFPE), en los que cada portaobjetos se somete a un ensayo particular. Por tanto, se pueden realizar múltiples ensayos en paralelo y/o en serie en el mismo portaobjetos de muestra, y/o secciones múltiples tomadas de la misma muestra y preparadas en portaobjetos separados, y/o en diferentes muestras del mismo sujeto y/o diferentes sujetos preparadas en el mismo portaobjetos y/o portaobjetos separados.

En un ejemplo, se somete la muestra a un inmunoensayo, por ejemplo por incubación con uno o más anticuerpos específicos para una bacteria diana particular, y se detecta usando un marcador (tal como un marcador en el anticuerpo o por medio del uso de un anticuerpo secundario marcado). Los marcadores detectables ejemplares incluyen fluoróforos, haptenos, enzimas, radiomarcadores, puntos cuánticos y otros conocidos en la técnica.

En otro ejemplo, la muestra se somete a ensayos microbiológicos adicionales. Por ejemplo, se puede poner en contacto la muestra con uno o más de otros tintes, tales como una o más de las siguientes tinciones: bacilos resistentes al alcohol ácido (AFB) III, azul alciano, azul alciano para ácido peryódico de Schiff (PAS), amarillo alciano, rojo Congo, amilasa α , fibras elásticas, Giemsa, tinción de plata metanamina de Grocott (GMS) II, hierro, verde claro Jones, verde claro Jones para PAS, mucicamina PAS, retículo, Steiner II, azul tricrómico y verde tricrómico. En un ejemplo, la muestra se pone en contacto con tinción de Ziehl-Neelsen o tinciones similares, por ejemplo para detectar micobacterias o *Nocardia*, que muestran resistencia al alcohol ácido pero que a veces son difíciles de identificar con la tinción de Gram.

Kits

Los kits que se pueden usar con los procedimientos divulgados se proporcionan en el presente documento. Se pueden usar dichos kits con un procedimiento de tinción de Gram automatizado que tiene una etapa de decoloración más larga (tal como una etapa de decoloración que tarda al menos 30 segundos, al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, al menos 3 minutos, al menos 4 minutos o al menos 5 minutos en finalizar).

Los kits divulgados pueden incluir una formulación decolorante de acción lenta en un recipiente (por ejemplo, una ampolla o frasco). Los kits también pueden incluir reactivos para realizar una o más de las otras etapas del procedimiento de tinción de Gram. Por ejemplo, los kits pueden incluir además una formulación de tinción primaria, una formulación de agente de retención y/o una formulación de contratinción, por ejemplo, en los que cada formulación está en un recipiente separado.

En un ejemplo, el recipiente de la formulación decolorante de acción lenta incluye uno o más agentes decolorantes de acción lenta, tales como 1,2-propanodiol, etilenglicol o combinaciones de los mismos. En un ejemplo específico, la formulación decolorante de acción lenta es o consiste en 1,2-propanodiol o etilenglicol. La formulación decolorante de acción lenta puede incluir una mezcla de agente(s) decolorante(s) de acción lenta y agente(s) decolorante(s) de acción rápida, tal como al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un

90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,9 % de uno o más agentes decolorantes de acción lenta (por ejemplo, 1,2-propanodiol, etilglicol, o combinaciones de los mismos), tal como de un 80 % a un 99,99 %, de un 80 % a un 99 %, de un 80 % a un 90 %, de un 90 % a un 99,9 %, o de un 90 % a un 98 %, de un agente decolorante de acción lenta, y no más de un 20 %, no más de un 19 %, no más de un 18 %, no más de un 17 %, no más de un 16 %, no más de un 15 %, no más de un 14 %, no más de un 13 %, no más de un 12 %, no más de un 11 %, no más de un 10 %, no más de un 9 %, no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 6 %, no más de un 5 %, no más de un 4 %, no más de un 3 %, no más de un 2 %, no más de un 1 %, no más de un 0,5 %, o no más de un 0,01 % de uno o más agentes decolorantes de acción rápida (por ejemplo, éter metílico de propilenglicol, éter dietílico, etanol, acetona, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol o combinaciones de los mismos, tales como mezclas de alcohol etílico y acetona y mezclas de alcohol etílico con otros alcoholes tales como metanol o 2-propanol), tal como de un 0,01 % a un 20 %, de un 0,1 % a un 20 %, de un 0,1 % a un 10 %, de un 1 % a un 20 %, o de un 1 % a un 10 %, de un agente decolorante de acción rápida.

En un ejemplo, el recipiente de la formulación de tinción primaria incluye violeta cristal (VC) o violeta de genciana. En un ejemplo, la formulación de tinción primaria incluye violeta cristal a una concentración de al menos 0,5 g/l, al menos 0,75 g/l, al menos 1 g/l, al menos 2 g/l, al menos 3 g/l, al menos 4 g/l, o al menos 5 g/l, tal como de 1 a 4 g/l, por ejemplo 3 g/l. El VC puede estar presente en una solución que contiene isopropanol, etanol/metanol y agua, tal como 50 ml de isopropanol, 50 ml de etanol/metanol y 900 ml de agua. La solución de VC o violeta de genciana puede contener oxalato de amonio para potenciar la estabilidad.

En un modo de realización, el recipiente de la formulación de agente de retención incluye yodo, tal como solución de yodo de Gram o de polivinilpirrolidona-yodo (PVP-yodo). El yodo de Gram puede induir al menos un 0,1 % de yodo (por ejemplo, al menos un 0,2 %, al menos un 0,5 % o al menos un 1 %, tal como aproximadamente un 0,1 %-1 % de yodo) y al menos un 0,1 % de yoduro potásico (por ejemplo, al menos un 0,2 %, al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 % o al menos un 2 %, tal como aproximadamente un 0,1 %-2 % de yoduro potásico), por ejemplo en agua o mezclas de alcoholes. PVP-yodo puede induir al menos un 1 % de polivinilpirrolidona (por ejemplo, al menos un 2 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 % o al menos un 35 %, tal como aproximadamente un 1-35 % de polivinilpirrolidona) y al menos un 1 % de yodo (por ejemplo, al menos un 2 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 % o al menos un 35 %, tal como aproximadamente un 1 %-35 % de yodo) en agua (por ejemplo, véanse las patentes de EE. UU. n.º 2.739.922 y 3.898.326).

En un ejemplo, el recipiente de la formulación de contratinción incluye fucsina (tal como carbol fucsina o fucsina básica), rojo neutro y/o safranina O. En un ejemplo, la formulación acuosa de contratinción incluye fucsina a una concentración de al menos un 0,01 %, al menos un 0,02 %, al menos un 0,03 %, al menos un 0,05 %, al menos un 0,1 %, al menos un 0,2 %, al menos un 0,3 %, al menos un 0,4 % o al menos un 0,5 %, tal como de un 0,02 % a un 0,50 %. En un ejemplo, la formulación de contratinción incluye rojo neutro a una concentración de al menos un 0,01 %, al menos un 0,02 %, al menos un 0,03 %, al menos un 0,05 %, al menos un 0,1 %, al menos un 0,2 %, al menos un 0,3 %, al menos un 0,4 % o al menos un 0,5 %, tal como de un 0,02 % a un 1 %. En un ejemplo, la formulación de contratinción incluye safranina O a una concentración de al menos un 0,1 %, tal como al menos un 0,2 %, al menos un 0,3 %, al menos un 0,4 %, al menos un 0,5 %, al menos un 0,6 %, al menos un 0,7 % o al menos un 0,8 %, tal como de un 0,1 % a un 1 % o de un 0,1 % a un 0,8 % de safranina O. La contratinción se puede formular en agua, pero puede incluir un 1 %-20 % de etanol o metanol.

Se pueden configurar o conformar los recipientes o frascos que incluyen la formulación de tinción primaria, la formulación de agente de retención, la formulación de agente de decoloración de acción lenta y/o la formulación de contratinción para cargarse en el equipo de tinción automático. Por ejemplo, se pueden configurar los recipientes para usarse con equipos de Ventana Medical Systems, Inc., tal como el teñidor especial NexES o un teñidor especial Ventana BenchMark. Se pueden configurar los recipientes para usarse con los sistemas Benchmark XT, Benchmark Ultra o Discovery, tales como los divulgados en la patente de EE. UU. n.º 6.352.861, patente de EE. UU. n.º 5.654.200, patente de EE. UU. n.º 6.582.962, patente de EE. UU. n.º 6.296.809 y patente de EE. UU. n.º 5.595.707. También se puede encontrar información adicional con respecto a sistemas y procedimientos automatizados en el documento PCT/US2009/067042. El recipiente puede ser una ampolla de polipropileno/polietileno químicamente resistente, tal como un aparato distribuidor Ventana BenchMark.

Los kits también pueden induir uno o más portaobjetos de microscopio, tales como un portaobjetos adecuado para preparar y para fijar una muestra, así como cubreobjetos, pipetas o combinaciones de los mismos.

El kit también puede incluir opcionalmente portaobjetos de control para verificar los reactivos y la correcta ejecución del protocolo de tinción de Gram. Por ejemplo, un juego de portaobjetos de control puede incluir bacterias grampositivas, tales como *Staphylococcus aureus* (o cualquiera de las enumeradas en el presente documento), y otro juego de portaobjetos de control puede induir bacterias gramnegativas, tales como *Escherichia coli* (o cualquiera de las enumeradas en el presente documento). Un portaobjetos de control en el kit también puede no incluir bacterias.

El kit puede incluir además opcionalmente reactivos adicionales para realizar ensayos adicionales. Por ejemplo, el kit puede incluir uno o más frascos o recipientes que contienen otros tintes o tinciones, tales como recipientes que incluyen una o más de las siguientes tinciones: bacilos resistentes al alcohol ácido (AFB) III, azul alciano, azul alciano para ácido peryódico de Schiff (PAS), amarillo alciano, rojo Congo, amilasa, fibras elásticas, Giemsa, tinción de plata metanamina de Grocott (GMS) II, hierro, verde claro Jones, verde claro Jones para PAS, mucicamina PAS, retículo, Steiner II, azul tricrómico y verde tricrómico. El kit puede incluir un frasco o recipiente que contenga anticuerpos específicos de bacterias. El kit también puede incluir un frasco o recipiente que contenga anticuerpos secundarios marcados (por ejemplo, marcados con un fluoróforo o punto cuántico).

10 Composiciones decolorantes de acción lenta

La divulgación también proporciona formulaciones decolorantes de acción lenta que se pueden usar en los kits y procedimientos proporcionados en el presente documento. En un ejemplo, la formulación decolorante de acción lenta incluye una mezcla de tanto un agente decolorante de acción lenta como un agente decolorante de acción rápida, tal como uno o más agentes decolorantes de acción lenta y uno o más agentes decolorantes de acción rápida.

En un ejemplo, la formulación decolorante de acción lenta incluye uno o más agentes decolorantes de acción lenta, tal como al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,9 % de uno o más agentes decolorantes de acción lenta (por ejemplo, 1,2-propanodiol, etilenglicol o combinaciones de los mismos), tal como de un 80 % a un 99,99 % de uno o más agentes decolorantes de acción lenta. En un ejemplo, la formulación decolorante de acción lenta incluye uno o más agentes decolorantes de acción rápida, tal como no más de un 20 %, no más de un 19 %, no más de un 18 %, no más de un 17 %, no más de un 16 %, no más de un 15 %, no más de un 14 %, no más de un 13 %, no más de un 12 %, no más de un 11 %, no más de un 10 %, no más de un 9 %, no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 6 %, no más de un 5 %, no más de un 4 %, no más de un 3 %, no más de un 2 %, no más de un 1 %, no más de un 0,5 % o no más de un 0,01 % de uno o más agentes decolorantes de acción rápida (por ejemplo, éter metílico de propilenglicol, éter dietílico, etanol, acetona, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol o combinaciones de los mismos, tales como mezclas de alcohol etílico y acetona y mezclas de alcohol etílico con otros alcoholes tales como metanol o 2-propanol), tal como de un 0,01 % a un 20 %, de un 0,1 % a un 20 %, de un 0,1 % a un 10 %, de un 1 % a un 20 %, o de un 1 % a un 10 %, de un agente decolorante de acción rápida.

35 Ejemplo 1

Comparación de agentes decolorantes de tinción de Gram

Este ejemplo describe procedimientos usados para comparar agentes decolorantes en la tinción de Gram a fin de optimizar la tasa de decoloración. Se prepararon el violeta cristal y el yodo de Gram de acuerdo con el procedimiento de Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3.^a edición, pp. 231-233. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.

Se desparafinaron las secciones histológicas incluidas en parafina de los controles grampositivos usando técnicas histológicas estándar. Estas se tiñeron luego en un prototipo de teñidor automatizado en el que se distribuyó el violeta cristal gota a gota (~90 µl por gota) en la sección histológica colocada horizontalmente, se dejó incubar durante aproximadamente 4 minutos, y luego se aclaró con una solución acuosa de tensioactivo. Luego se aplicó yodo de Gram gota a gota a la sección y esto se incubó durante aproximadamente 4 minutos seguido de aclarado. En este punto, se añadió el disolvente decolorante manualmente a la sección histológica usando una pipeta calibrada, seguido de un aclarado manual con la solución acuosa de tensioactivo en períodos de tiempo especificados. Luego se aplicó manualmente una contratinción de carbol fucsina y tartracina (incubaciones de 90 y 15 segundos, respectivamente). Luego se deshidrataron los portaobjetos y se aclararon con xilenos, seguido de colocación de cubreobjetos con medios de preparación permanente. El examen al microscopio (20-200x) permitió evaluar la selectividad del disolvente para decolorar las bacterias gram (-). Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

Disolvente	Tipo	Tiempo de incubación	Resultado*
1,2-propanodiol (PG)	invención	210 s	+/0
1,2-propanodiol (PG)	invención	60 s	+
1,2-propanodiol (PG)	invención	30 s	+
50 % PG/50 % éter metílico de propilenglicol	invención	57 s	0
50 % PG/50 % éter metílico de propilenglicol	invención	74 s	0
80 % PG/20 % éter metílico de propilenglicol	invención	74 s	+
2-propanol	comparativo	20 s	-

*
 + = gram (-) son rojas, gram (+) son azules;
 0 = decoloración escasa de gram (+);
 - = bacterias gram (+) decoloradas

REVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tinción de Gram de una muestra, que comprende:
5 cargar la muestra en el equipo de tinción automático;

poner en contacto la muestra con una tinción primaria en condiciones suficientes para teñir la pared celular de bacterias grampositivas y gramnegativas;
10 poner en contacto la muestra con un agente de retención en condiciones suficientes para formar un complejo de tinción primaria-agente de retención;

poner en contacto la muestra con una formulación decolorante de acción lenta que comprende 1,2-propanodiol, etilenglicol o mezclas de los mismos durante al menos 30 segundos;
15 poner en contacto la muestra con una contratinción en condiciones suficientes para teñir las bacterias gramnegativas decoloradas.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra se pone en contacto con la formulación decolorante de acción lenta durante al menos 60 segundos.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el contacto de la muestra con la formulación decolorante de acción lenta se lleva a cabo usando aire comprimido.
- 25 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la formulación decolorante de acción lenta comprende un agente decolorante de acción lenta que comprende 1,2-propanodiol, etilenglicol o mezclas de los mismos y un agente decolorante de acción rápida seleccionado del grupo que consiste en alcohol etílico, acetona, éter dietílico, éter metílico, mezclas de alcohol etílico y acetona, y mezclas de alcohol etílico con otros alcoholes, opcionalmente en las que los otros alcoholes son metanol o propanol.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la formulación decolorante de acción lenta comprende al menos un 80 % del agente decolorante de acción lenta y no más de un 20 % del agente decolorante de acción rápida.
- 35 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el procedimiento comprende además detectar bacterias grampositivas o gramnegativas.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la tinción primaria es un reactivo de violeta cristal y el agente de retención es un reactivo de yodo.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el equipo de tinción automático comprende:

medios de carrusel para sostener una pluralidad de portaobjetos, teniendo cada uno sobre ellos una muestra que se va a teñir;
45 medios para hacer girar los medios de carrusel a velocidades predeterminadas; y

medios para dirigir y controlar la aplicación de reactivos sobre los portaobjetos y las muestras durante el giro del medio de carrusel,
50 y en el que el procedimiento comprende:

dirigir el reactivo de violeta cristal sobre los portaobjetos en el carrusel para poner en contacto las bacterias en los portaobjetos con el reactivo de violeta cristal;
55 dirigir agua, tampón acuoso o detergente acuoso, sobre los portaobjetos en el carrusel para aclarar el reactivo de violeta cristal de los portaobjetos;

60 dirigir el reactivo de yodo sobre los portaobjetos en el carrusel para poner en contacto las bacterias en los portaobjetos con el reactivo de yodo;

dirigir agua, tampón acuoso o detergente acuoso, sobre los portaobjetos en el carrusel para aclarar el reactivo de yodo de los portaobjetos;
65 dirigir la formulación decolorante de acción lenta y la contratinción, simultáneamente o por separado, sobre

los portaobjetos en el carrusel; y

dirigir agua, tampón acuoso o detergente acuoso, sobre los portaobjetos en el carrusel para aclarar el reactivo de mezcla de los portaobjetos.

5

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la formulación decolorante de acción lenta tarda al menos 60 segundos en eliminar el reactivo de violeta cristal y el reactivo de yodo de una bacteria gramnegativa.

10

10. Uso de una composición para tinción de Gram automatizada que comprende al menos un 80 % de uno o más agentes decolorantes de acción lenta que comprenden 1,2-propanodiol, etilenglicol o mezclas de los mismos y no más de un 20 % de uno o más agentes decolorantes de acción rápida, en la que el uno o más agentes decolorantes de acción rápida se seleccionan del grupo que consiste en éter metílico de propilenglicol, éter dietílico, etanol, acetona, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, mezclas de alcohol etílico y acetona, y mezclas de alcohol etílico con otros alcoholes, opcionalmente en las que los otros alcoholes son metanol o 2-propanol.

15

11. Un kit para tinción de Gram automatizada que comprende:

20

una formulación decolorante de acción lenta en un primer recipiente, en el que la formulación decolorante de acción lenta comprende 1,2-propanodiol, etilenglicol o mezclas de los mismos;

una formulación de tinción primaria en un segundo recipiente

25

una formulación de agente de retención en un tercer recipiente; y

una formulación de contratinción en un cuarto recipiente.

30

12. El kit de la reivindicación 11, en el que los recipientes están configurados para cargarse en un equipo de tinción automatizado.

13. El kit de la reivindicación 11 o 12, que comprende además uno o más portaobjetos de microscopio, que comprende además opcionalmente uno o más portaobjetos de control.

