

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 232**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2009 PCT/US2009/054545**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10022288**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2009 E 09745166 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2313774**

54 Título: **Sistema de alto rendimiento para ensayo de CFU mediante el uso de imagen digital de alta resolución, tinción diferencial y sistema de laboratorio automatizado**

30 Prioridad:

20.08.2008 US 90491 P

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

23.03.2017

73 Titular/es:

**NEW YORK BLOOD CENTER, INC. (100.0%)
310 East 67 Street
New York, NY 10065**

72 Inventor/es:

**ALBANO, MARIA, S.;
ROTHMAN, WILLIAM y
RUBINSTEIN, PABLO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 606 232 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

Sistema de alto rendimiento para ensayo de CFU mediante el uso de imagen digital de alta resolución, tinción diferencial y sistema de laboratorio automatizado

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a sistemas de alto rendimiento para la determinación objetiva, estandarizada de unidades formadoras de colonias en poblaciones de células hematopoyéticas usando un sistema de detección celular y análisis de imagen de alta resolución.

Antecedentes de la invención

- 10 La sangre de cordón umbilical (CB) es una fuente de injerto cada vez más aceptada para pacientes que carecen de donantes relacionados. Las características del injerto usadas actualmente como determinantes de calidad y potencial de injerto de las unidades de CB incluyen la enumeración de células nucleadas totales (TNC), células CD34+ y unidades formadoras de colonias (CFU). El número de CFU antes y después de congelación/descongelación de especímenes es un gran predictor independiente del injerto celular de CB. Actualmente, el día 14 del ensayo de CFU es el único método que determina el estado funcional así como la capacidad de repoblación y el número de células progenitoras hematopoyéticas. La evaluación del crecimiento de CFU como se lleva a cabo por microscopía óptica y es larga, subjetiva y difícil de estandarizar. Además, los métodos actuales no permiten el recuento o la visualización de una muestra después de que se ha completado el ensayo, ya que las placas de muestra se desechan al final del día 14 de ensayo.

- 20 Por lo tanto, sería deseable un sistema de alto rendimiento para evaluar el número de CFU, crecimiento e identificación de diferentes tipos de colonias que sea objetivo y estandarizado. Además, sería muy deseable un sistema que proporcione la identificación positiva de una muestra y el almacenamiento de una imagen de la muestra y los resultados de ensayo para futura referencia.

Costa GF *et al Experimental Hematology* 2007, 35, 1-12 describe una metodología para contar colonias de unidades formadoras de colonias de granulocitos macrófagos (CFU-GM) *in vitro* por fusión de datos.

- 25 EP 1 865 315 describe un aparato que incluye una unidad de adquisición de imagen para capturar una multitud de imágenes celulares bajo diferentes condiciones de adquisición de imagen junto con una unidad de análisis para extraer una posición celular y al menos una característica de acuerdo con la multitud de imágenes celulares y para llevar a cabo análisis estadístico con las características extraídas que sirven como parámetros.

- 30 Bernard R *et al Phys Med Biol* 2001, 46, 3061-3072 describe un método de segmentación de imágenes basado en modelos, que emplea conocimientos anteriores a cerca de la forma de una colonia celular con el objetivo de detectar automáticamente colonias celulares aisladas, en contacto y solapantes de varios tamaños e intensidades.

Compendio de la invención

Según la presente invención, se proporciona un método para la determinación del número de células precursoras hematopoyéticas en una muestra que comprende:

- 35 cultivar células hematopoyéticas obtenidas a partir de una muestra de un tejido o fluido que contiene células hematopoyéticas en una capa de medio de cultivo semi-sólido que apoya el crecimiento de colonias celulares precursoras hematopoyéticas;
- teñir las colonias en una única etapa con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) sin lavar;
- 40 tomar imágenes de las colonias en ausencia de un microscopio; y
- contar células precursoras de colonias eritroides (unidad formadora de colonia eritroide), multilínea (unidad formadora de colonia multilínea), y granulocito-macrófago (unidad formadora de colonia granulocito-macrófago), y combinaciones de las mismas, en la muestra,
- 45 en donde dicho ensayo se lleva a cabo con un sistema de detección de imagen y cuantificación que comprende:
 - una cámara de alta resolución;
 - unos alineamientos de luz apropiados;
 - una lámpara de destellos de amplio espectro; y
 - una identificación de muestra positiva.

La presente descripción proporciona un sistema de alto rendimiento para la determinación objetiva, estandarizada de unidades formadoras de colonias en poblaciones de células hematopoyéticas usando un sistema de detección celular y un análisis de imagen de alta resolución.

5 En una realización de la descripción, se proporciona un ensayo estandarizado de unidades formadoras de colonias. El ensayo comprende las etapas de obtención de una muestra de un tejido o fluido que contiene células hematopoyéticas; tinción de las colonias; toma de imágenes de las colonias; recuento de las colonias para cada tipo de célula precursora; y en ciertas realizaciones, determinación del estado funcional y el potencial de injerto de las colonias según el número de células precursoras y el tamaño de las colonias en la muestra.

10 En aún otra realización, se proporciona una identificación de muestra positiva, que comprende una muestra y una identificación. La muestra es una unidad de sangre de cordón y la identificación identifica una unidad específica de sangre de cordón e información relacionada con la misma.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es una imagen de un pocillo de 35 mm de diámetro que comprende CFU (unidades formadoras de colonias) sin teñir (A) y teñidas (B) después de 14 días de cultivo celular. Se identifican las CFU por los siguientes símbolos: ○ indica la presencia de CFU-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos); ◇ indica la presencia de CFU-E (unidades formadoras de colonias eritroides); y □ indica la presencia de CFU-GM/E (unidades formadoras de colonias multilínea). La identificación positiva se proporciona en los pocillos, e incluye información de fecha/hora de prueba, ID de la muestra de CBU, ID de la placa, identificación del operador, y campana extractora.

20 Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona un sistema de alto rendimiento para la determinación objetiva, estandarizada de unidades formadoras de colonias (CFU) en poblaciones de células hematopoyéticas usando tinción de colonias y toma de imagen digital de alta resolución. Un sistema informático de gestión de la información de laboratorio apoya el ensayo de CFU de alto rendimiento.

25 En una realización de la descripción, se proporciona un ensayo estandarizado de unidades formadoras de colonias. El ensayo comprende las etapas de obtener una muestra de un tejido o fluido que contiene células hematopoyéticas; cultivar las células en un medio que apoya el crecimiento de las colonias celulares precursoras hematopoyéticas; teñir las colonias; tomar imágenes de las colonias; recuento de las colonias para cada tipo de células precursoras; y en ciertas realizaciones, determinar el estado funcional y el potencial de injerto de las colonias según el número de células precursoras y el tamaño de las colonias en la muestra.

30 Las células hematopoyéticas se pueden obtener a partir de una fuente apropiada, como sangre (periférica, sangre de cordón umbilical), médula ósea, placenta, etc. En una realización, la muestra es sangre de cordón umbilical. Las células obtenidas se pueden cultivar en medio estándar que mantiene las colonias de células precursoras hematopoyéticas durante un periodo de tiempo, como aproximadamente 1-21 días, aproximadamente 5-14 días, o aproximadamente 10-14 días. En una realización, las células se cultivan durante 14 días. Ejemplos de medios adecuados incluyen, pero no se limitan a AMBION® (Invitrogen), STEMLINE® (Sigma), y STEMSPAN®, ALDEFLUOR®, METHOCULT®, y ALDECOUNT® (Stem Cell Technologies). En una realización, es posible estimular selectivamente la proliferación de líneas celulares discretas usando los factores de crecimiento apropiados. Ejemplos de factores de crecimiento apropiados para la selección de líneas celulares particulares incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina para células rojas sanguíneas, trombopoyetina para megacariocitos, factor estimulante de granulocitos (G-CSF) para granulocitos, y factor estimulante de granulocitos macrófagos (GM-CSF) para la estimulación de granulocitos y macrófagos. Además, se pueden usar también, IL-3, IL-6, factor de células madre. Estos factores de crecimiento se pueden usar solos en varias combinaciones (esto es, cócteles). La estimación del número de células después de la incubación de un número determinado de células de un tipo dado en muestras celulares separadas y no separadas proporciona un método alternativo de estimación de la capacidad proliferativa de la línea celular correspondiente en la muestra. Así, la adquisición de imágenes de colonias de todas las placas de cultivo se puede ampliar para permitir estimación numérica de números de células y por lo tanto, de la propagación celular real por comparación con el número de células sembradas. En ciertas realizaciones, se puede aislar una subpoblación de células CD34+ o células enriquecidas de densidad ligera o un producto de aféresis antes de la etapa de cultivo.

45 Se toman imágenes de las colonias. Usando el sistema descrito, se pueden visualizar, diferenciar y contar objetivamente las CFU y se pueden almacenar las imágenes digitales para revisión futura y/o reclasificación. El sistema proporciona información informatizada sobre parámetros de ensayo ópticos. Una combinación de toma de imágenes de alta resolución, tinción en una etapa opcional, y el ensayo de CFU tradicional supera los retos técnicos del ensayo convencional. El sistema apoya la estandarización, clasificación, y reproducibilidad y alto rendimiento del recuento. La detección de imagen y sistema de cuantificación comprende una cámara de alta resolución, alineamientos de luces adecuados, una lámpara de destellos de amplio espectro, e identificación de muestra positiva.

En una realización, un sistema de detección apoya el ensayo de unidades formadoras de colonias. En una realización del sistema de detección, se proporciona un sistema de adquisición de imagen que comprende una superficie de imagen de alta velocidad a todo color (por ejemplo, 1/125 s) de tamaño comparable a la muestra (diámetro de placa de 35 mm). El sistema de imagen tiene un detector ccd (por ejemplo, aproximadamente 39 Megapixel o mayor) y da como resultado una resolución de imagen del orden de aproximadamente 7 micras por pixel. Luego éste se acopla con lentes de macro enfoque 1:1 libres de alta distorsión y una etapa diseñada a medida que minimiza dispersión luminosa, proporciona posicionamiento reproducible entre muestras y permite la incorporación de identificación humana y legible por máquina (esto es, código de barras) impresa directamente en cada imagen. La excitación consiste en una lámpara de destellos uniforme e intensos de amplio espectro (aproximadamente 1/500 s). Luego se adquiere una única imagen libre de vibración mediante un ordenador de alto rendimiento para el análisis de imagen detallado posterior, almacenamiento y estudios retrospectivos. En una realización, el sistema de imagen es una Cámara SLR fabricada por Hasselblad y la fuente de luz fabricada por Broncolor. Sin embargo, se puede usar cualquier cámara adecuada y fuente de luz. El sistema de detección de imagen permite la adquisición de una imagen de la placa de cultivo de ensayo de CFU en donde se pueden ver claramente con un fondo claro las CFU crecidas en el cultivo. Una ventaja adicional de este sistema es que permite ser visualizada una única muestra en múltiples días en exactamente la misma posición física debido a los alineamientos proporcionados en el sistema descrito. El alineamiento de forma reproducible de la muestra para la toma de imagen permite que se visualice una placa de pocillos entera o incluso una única colonia repetidamente durante un periodo de tiempo. Se puede rastrear el crecimiento de la colonia o colonias a lo largo del tiempo por comparación de las imágenes tomadas en días diferentes. Por ejemplo, se puede comparar una imagen de una muestra en el día 1, día 5 y día 14. De esta forma, se puede monitorizar el crecimiento de una colonia de interés o múltiples colonias de interés.

El cultivo se tiñe. El cultivo se tiñe en una única etapa. Las células se tiñen en una única etapa con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) sin ninguna etapa de lavado, lo que permite una definición aún mejor de las unidades formadoras de colonias multilínea (CFU-GM/E), unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), y unidades formadoras de colonias de granulocito-macrófagos (CFU-GM) otorgando un color específico para cada tipo (violeta oscuro, rojo, y violeta claro, respectivamente) frente a un fondo uniformemente claro. Los colores específicos se generan después de un tiempo de incubación y dilución de MTT específicos. Por ejemplo, en una realización, el tiempo de incubación puede ser aproximadamente 10-45 min. En otra realización, el tiempo de incubación es aproximadamente 15-40 min. En aún otra realización, el tiempo de incubación es aproximadamente 30-40 min. La dilución del colorante puede variar según la tinción deseada. Cuando se usa MTT, se puede usar una dilución de MTT de 1/2 a aproximadamente 1/10. En una realización, se usa una dilución de MTT de 1/5. En una realización, se puede obtener la tinción con 30 min de incubación a 37°C seguido de 10 min a temperatura ambiente, con una dilución de MTT de 1/5.

Se pueden tomar las imágenes antes y/o después de la tinción de las placas de cultivo. En una realización se toma imagen del cultivo antes y después de la tinción. En esta realización, se pueden clasificar y enumerar fácilmente los cultivos por comparación de células y colonias no teñidas y teñidas si se desea (Véase la Figura 1).

En una realización, se usa un sistema de información informatizada de laboratorio (LIMS) para monitorizar y documentar cada etapa del sistema de ensayo de CFU. En una realización, LIMS proporciona el almacenamiento de las imágenes de las placas de cultivo que están ligadas por ID de código de barras único que etiqueta una unidad CB específica. Esto proporciona identificación positiva de la muestra ligada a una unidad CB específica y almacena información adicional como localización de la incubadora, fechas de plaqueo y recuento, ID del técnico, así como información detallada de la colonia (Véase la Figura 1).

Una ventaja adicional del LIMS es la portabilidad de la información almacenada en relación a la unidad CB. Es decir, se pueden enviar fácilmente imágenes y datos asociados con una muestra dada antes de, o con, el envío de una unidad CB que se pide para un receptor de trasplante. De este modo, el médico del receptor puede ver imágenes de la muestra y ensayar, y evaluar la calidad y potencial de injerto de la muestra de CB allí mismo. La información almacenada se puede enviar por correo, por fax, y/o electrónicamente. Se logra una mayor portabilidad cuando se envía electrónicamente la información almacenada.

En una realización, el número y el estado funcional de las colonias se puede comparar con y usar para estimar el potencial de injerto de las células en la muestra (se puede determinar). Esto se logra usando métodos estadísticos estándar, estándar en el análisis de resultados clínicos, como el estimador de probabilidad Kaplan Meyer (Kaplan, E.L. & Meier, P. (1958). "Nonparametric estimation from incomplete observations", *JOURNAL OF THE AMERICAN STATISTICAL ASSOCIATION* 53: 457-481) o el análisis de incidencia acumulativa (Gray RJ (1988) A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of competing risk, *ANNALS OF STATISTICS*, 16:1141-1154).

Hasta la fecha, el ensayo de CFU del día 14 es el único ensayo que determina el estado funcional así como el número y capacidad de repoblación de células progenitoras hematopoyéticas y se lleva a cabo rutinariamente en los laboratorios. La evaluación del crecimiento de CFU se lleva a cabo manualmente mediante microscopía óptica de contraste de fase y las colonias de CFU se tienen que clasificar como CFU-GM/E, CFU-E o CFU-GM basándose en la morfología, color y tamaño y después, contadas manualmente. De este modo, el ensayo de CFU actual es largo, subjetivo, difícil de estandarizar y no práctico cuando se tienen que ensayar diariamente un gran número de

muestras. Además, las placas de cultivo muestra no se pueden almacenar y por eso, se deben analizar todas las muestras al final del cultivo (día 14) y no hay posibilidad de revisión, discusión, recuento y/o reclasificación de colonias si se necesita antes de que se desechen las placas.

5 Por el contrario, el sistema de cuantificación y detección de imagen, ensayo, y métodos descritos añaden la ventaja del procesamiento de un gran número de muestras/día. Se pueden almacenar las imágenes para una revisión y/o re-
clasificación futura de colonias. Ya que el color específico que cada una de las colonias adquiere después de teñir, la clasificación es objetiva y se puede lograr rápidamente la enumeración de una placa entera. Más importante, el nuevo sistema de detección apoya la identificación de muestra positiva, estandarización y da alta reproducibilidad al
10 ensayo que se puede implementar fácilmente en laboratorios donde se necesitan ensayar grandes números de muestras diariamente.

Además, el ensayo de CFU tradicional necesita el uso de un microscopio óptico de fase invertida para clasificar y enumerar las CFU crecidas en una placa, que es subjetivo, y largo, y no práctico para la enumeración de un número grande de placas de cultivo. Utilizando el sistema descrito en la presente memoria, no hay necesidad de un
15 microscopio. La clara definición de los diferentes tipos de colonias permite una clasificación y enumeración de colonias rápida y por lo tanto, ayuda a aumentar la productividad. Se pueden captar las imágenes de las colonias usando una variedad de técnicas espectroscópicas, como pero no se limitan a, absorción y fluorescencia. De este modo, se puede estandarizar el recuento y clasificación de colonias entre diferentes laboratorios ya que da como resultado mayor reproducibilidad que los métodos convencionales de clasificación/enumeración. Se pueden almacenar electrónicamente las imágenes para futura revisión y recuento por los médicos. La enumeración de
20 colonias se puede automatizar usando imágenes coloreadas. Además, las imágenes se pueden recuperar fácilmente a través del ID de código de barras que las liga a una muestra específica.

Un procedimiento informatizado permite la revisión del proceso del ensayo completo de CFU (fecha y hora de carga de la muestra, fecha y hora de plaqueo de muestra, fecha y hora de toma de imagen de la muestra). Se pueden
25 identificar los tecnólogos que llevaron a cabo cada etapa mediante etiquetas con ID de código de barras en la imagen asegura la identificación de muestra positiva y se liga a una muestra específica. Además, el ensayo, método y sistema descritos permiten el procesamiento de un gran número de muestras/día, haciendo a éste un sistema de alto rendimiento. En una realización, se pueden teñir y tomar imágenes de aproximadamente 100 placas en aproximadamente 2 horas. En otra realización, se pueden teñir y tomar imágenes de aproximadamente 80 placas en menos de aproximadamente 2 horas. En aún otra realización, se pueden teñir y tomar imagen de aproximadamente
30 60 placas en aproximadamente 70 minutos.

En otra realización, se proporciona en esta memoria un programa de recuento informatizado basado en métodos de análisis de imagen actuales para la identificación de objetos en el campo de visión. En una realización, se derivan y mejoran los límites de la colonia y se logra la diferenciación. Esto permite un recuento de colonia más preciso y área total de cada tipo de colonia presente, que se puede correlacionar con otros parámetros, como marcadores de
35 antígeno p. ej., CD34, CD38, CD79, número de células, características demográficas del donante, y resultado del trasplante, toxicidad del medicamento, evaluación de nuevos factores de crecimiento, etc. Además, el ensayo, método y sistema de detección e imagen proporcionados en esta memoria puede resolver los problemas actuales de recuento experimental debido a colonias que emergen o aquellas que han estallado en múltiples colonias.

En una realización, se puede expandir el análisis localizando los límites en 2 dimensiones de una colonia en el campo de visión, lo que permite la resolución de distintas colonias creciendo en estrecha proximidad y el cálculo del área ocupada por cada colonia. La definición del borde de la colonia también lleva, además, a un cálculo del número total de colonias en una placa. Cuando se acopla con tinción discriminatoria y/o marcadores celulares que definen los tipos celulares en las colonias, esta aproximación puede proporcionar una estimación numérica directa 2- o 3-
45 dimensional (área o volumen) de la capacidad de proliferación de células hematopoyéticas de sangre de cordón y/u otras muestras, que es de una mayor precisión que depender únicamente del número de colonias. Más específicamente, en ciertas realizaciones, obteniendo estimaciones de la tercera dimensión (profundidad promedio) usando mediciones de profundidad de campo de alta resolución o asumiendo aproximadamente que la profundidad promedio es una función del área visible y el grosor de la capa de medio de crecimiento semi-sólido, se permite la estimación de volumen. El volumen de una colonia da un número de células aproximado y por adición permite la
50 estimación del número total de células en todas las colonias en una placa o concretamente en todas las colonias de un tipo celular definido.

Además, dependiendo de los componentes mecánicos usados en la etapa y vías ópticas, la detección, y resolución espectroscópica puede detectar colonias creciendo a niveles dimensionales diferentes. En ciertas realizaciones, el alineamiento informático de imágenes no teñidas y teñidas de un cultivo individual se puede usar para una
55 comparación dependiente del tiempo entre colonias durante el procedimiento de ensayo de día 14.

Las imágenes fotográficas obtenidas usando el ensayo descrito y el sistema de detección y cuantificación de imagen permiten el almacenamiento informatizado de resultados del ensayo como parte de una base de datos y son útiles para apoyar aplicaciones clínicas, incluyendo el lanzamiento de unidades de sangre de cordón para trasplante hematopoyético.

Ejemplo 1

Después de 14 días de cultivo de CB (ensayo de CFU, Stem Cell Technologies), se capturó una imagen de una placa de 35 mm usando un sistema de imágenes digitales basado en cámara fotográfica de alta resolución que logra una resolución de 7,6 μm por pixel y permite además una visión clara de todas las colonias en la placa con sus identificaciones de código de barras. Un protocolo corto de tinción en un solo paso con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) permite la definición de CFU-GM/E y CFU-E (violeta oscuro/rojo) y CFU-GM (violeta claro) representando cada tipo celular en un color específico frente a un fondo claro uniforme (Véase la Figura 1). Se observó una buena correlación tras comparación de la nueva estrategia frente a la enumeración tradicional usando el microscopio (R^2 lineal = 0,95; n = 122 placas de cultivo evaluadas). Se observó baja variación después de se clasificaran y enumeraran independientemente 151 cultivos por tres operadores diferentes (%CV (coeficiente de variación) = 8,9%; intervalo 1-27%) (microscopio). El plaqueo de la muestra introdujo variación en el ensayo de CFU, en un experimento en donde se evaluaron nueve muestras por plaqueo múltiple (% CV intra-ensayo = 21,9%; intervalo 3,4-34,5% y % CV intra-ensayo = 23,3%; intervalo 12,6-35%).

En otra realización, se proporciona un sistema de gestión de la información de laboratorio basado en ordenador (LIMS) para almacenar los datos relacionados con una placa de cultivo que está ligada por una identificación (ID) de código de barras única etiquetada a una unidad CB específica. Información adicional que se puede ligar a la unidad CB a través del ID de código de barras incluye la imagen de CB, localización del incubador, fechas de plaqueo y recuento, así como enumeración de colonia detallada. Este sistema se ha ensayado en más de 8.000 unidades de CB por duplicado. La coloración específica de las colonias CFU permite una clasificación y enumeración más rápida y de este modo, permite un análisis más preciso de colonias CFU y permite una determinación mejor de sus relaciones con marcadores de superficie de antígeno como contenido celular de CD34+, toxicidad del medicamento e injerto del trasplante.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades como peso molecular, condiciones de reacción, y demás usados en los requisitos y reivindicaciones debe entenderse como modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la especificación y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener por la presente invención. Por lo menos, y no como un intento de limitar la aplicación del canon de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe construirse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros expuestos al amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se informan tan precisamente como sea posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores resultantes necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo.

Los términos "un", "una", "el/la" y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben construir para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en esta memoria o que se contradiga claramente por el contexto. La enumeración de intervalos de valores en esta memoria tiene por objeto servir como un método abreviado de referencia para cada valor por separado que caiga dentro del intervalo. A no ser que se indique lo contrario en esta memoria, cada valor individual se incorpora dentro de la especificación como si fuera enumerado individualmente en esta memoria. Todos los métodos que se describen en esta memoria se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado a no ser que se indique lo contrario en esta memoria o claramente se contradiga de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (p. ej., "como") proporcionado en esta memoria está meramente destinado a iluminar mejor la invención y no representa una limitación al alcance de la invención reivindicado de otra manera. No se debe construir ningún lenguaje en la especificación como indicando cualquier elemento esencial no reivindicado para la práctica de la invención.

Realizaciones específicas descritas en esta memoria se pueden limitar además en las reivindicaciones usando el lenguaje "que consiste en" o "consistente esencialmente en". Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea presentada o añadida para enmienda, el término de transición "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa, o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. El término de transición "consistente esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales especificados o etapas y aquellas que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s).

Además, se han hecho numerosas referencias a patentes y publicaciones impresas a lo largo de esta especificación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el número de células precursoras hematopoyéticas en una muestra que comprende:
cultivar células hematopoyéticas obtenidas a partir de una muestra de un tejido o fluido que contiene células hematopoyéticas en un medio que apoya el crecimiento de colonias de células precursoras hematopoyéticas;
- 5 teñir las colonias en una única etapa con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) sin lavar;
tomar imágenes de las colonias en ausencia de un microscopio; y
contar células precursoras de colonias eritroides (unidad formadora de colonia eritroide), multilínea (unidad formadora de colonia multilínea), y granulocito-macrófago (unidad formadora de colonia granulocito-macrófago), y combinaciones de las mismas, en la muestra,
- 10 en donde la determinación del número de células precursoras hematopoyéticas se lleva a cabo con un sistema de detección de imagen y cuantificación que comprende:
una cámara de alta resolución;
unos alineamientos de luz apropiados;
una lámpara de destellos de amplio espectro; y
- 15 una identificación de muestra positiva.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además aislar una o más seleccionada del grupo que consiste en una subpoblación de células CD34+, células enriquecidas de densidad ligera, un producto de aféresis, y una combinación de los mismos, antes de la etapa de cultivo.
- 20 3. El método según la reivindicación 1, en donde los diferentes tipos de células precursoras se tiñen de diferentes colores.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además una identificación de muestra positiva que comprende la muestra y una identificación, en donde la identificación identifica una muestra específica e información relacionada con la misma.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en donde se identifica la muestra con una etiqueta de identificación que identifica una muestra específica e información relacionada con la misma.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de toma de imágenes de las colonias antes de teñir.

Figura 1

