

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/49	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08464 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05635 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. August 1999 (04.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 35 721.4 7. August 1998 (07.08.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EDI (EXPERIMENTELLE & DIAGNOSTISCHE IMMUNOLOGIE) GMB [DE/DE]; Markwiesenstrasse 55, D-72770 Reutlingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMOLZ, Manfred [DE/DE]; Albstrasse 33, D-72810 Gomaringen (DE). (74) Anwalt: RUFF, BEIER, SCHÖNDORF UND MÜTSCHLE; Postfach 10 40 36, D-70035 Stuttgart (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE IMMUNE DEFENCES OF BLOOD, TEST KIT THEREFOR AND USE OF A SUITABLE SYSTEM FOR TAKING BLOOD SAMPLES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER IMMUNABWEHR DES BLUTES SOWIE TESTKIT HIERFÜR UND VERWENDUNG EINES GEEIGNETEN BLUTENTNAHMESYSTEMS (57) Abstract The invention relates to a method for determining the immune defence activity of blood by stimulating white blood cells in whole blood, incubating whole blood, separating supernatant from the sediment and determining said activity on the basis of the supernatant thus separated. The invention also relates to a test kit for the implementation of said method and to the use of a suitable system, especially a syringe cylinder, for taking blood samples. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Immunabwehraktivität von Blut durch Stimulation der weißen Blutzellen im Vollblut, Inkubieren des Vollblutes, Trennung von Überstand vom Sediment und Bestimmung der Aktivität aus dem abgetrennten Überstand. Die Erfindung betrifft ferner einen Testkit für die Durchführung des Verfahrens sowie die Verwendung eines geeigneten Blutentnahmesystems, insbesondere eines Spritzenzylinders, hierzu.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

BeschreibungVerfahren zur Bestimmung der Immunabwehr des Blutes
sowie Testkit hierfür und Verwendung eines geeigneten
Blutentnahmesystems

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Immunabwehraktivität des Blutes, einen Testkit zur Durchführung der Bestimmung sowie die Verwendung eines medizinischen Blutentnahmesystems für die Bestimmung.

Die Bestimmung der Immunabwehraktivität des Blutes wird vorgenommen, um festzustellen, ob blutführende Lebewesen, insbesondere Säugetiere und Menschen, eine Störung, insbesondere Schwäche des Immunsystems besitzen. Bei den bisherigen Methoden werden Blutproben nach der Entnahme aufgetrennt, wonach eine getrennte Behandlung und Untersuchung von weißen Blutkörperchen vorgenommen wird. Dabei wurde festgestellt, daß durch Lagerung und Transport, welche bis zu 24 Stunden dauern können und insbesondere im Sommer mit einer unerwünschten Wärmeeinwirkung verbunden sind, ein großer Teil der Aktivität der weißen Blutkörperchen verlorengehen kann. Untersuchungen ergaben, daß bereits innerhalb von einer Stunde manche Zellen 50 % ihrer Aktivität verlieren.

Die Trennung von weißen und roten Blutzellen wird vorgenommen, da die roten Blutzellen als Störfaktoren für die Aktivitätsbestimmung der weißen Blutzellen verantwortlich gemacht werden. Nach der Trennung werden die weißen Blutzellen in Puffermedium in Gegenwart von Nährsalzen und Vitaminen aufbewahrt. Es wurde gefunden, daß auch in einer solchen Nährlösung eine Veränderung der Aktivität möglich ist.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die Zuverlässigkeit und Handhabung solcher Aktivitätsbestimmungen zu verbessern.

Manche Blutzellen sind sofort zum Test geeignet. Die meisten Zellen müssen aber so aktiviert werden, daß ihr Stoffwechsel umgestellt wird, d.h. neue Gene aktiviert werden. Dies erfordert in der Regel mindestens 6 bis 8 Stunden. Es wurde nun gefunden, daß die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Aktivitätsbestimmung wesentlich verbessert werden kann, wenn eine Inkubierung und insbesondere Stimulierung der Blutzellen im wesentlichen unmittelbar nach der Blutentnahme vorgenommen wird, ohne daß eine Auftrennung in weiße und rote Blutzellen erfolgt. Erfindungsgemäß werden die weißen Blutkörperchen inkubiert und gegebenenfalls stimuliert, solange sie sich im Vollblut befinden. Während der Inkubation trennt sich das Blut von selbst auf, ohne daß eine Zentrifugation erforderlich ist. Im Überstand finden sich dann von den weißen Blutzellen abgegebene Botenstoffe (Cytokine), die ein Maß für die Aktivität der Zellen sind und beispielsweise durch ELISA gefunden und bestimmt werden können. Der Ausdruck Cytokine umfaßt neben den Cytokinen im engeren Sinne auch andere Botenstoffe, wie beispielsweise Histamin, Prostaglandine, Leukotriene usw..

Erfindungsgemäß ist somit ein Verfahren vorgesehen zur Bestimmung der Immunabwehraktivität des Blutes durch Inkubation des Blutes ohne vorherige Auftrennung, insbesondere in Verbindung mit einer Stimulation der weißen Blutzellen im Vollblut, Trennung des Überstandes vom Sediment und Bestimmung der Aktivität der Blutzellen aus dem abgetrennten Überstand.

Durch die Erfindung können in mehrfacher Hinsicht Fehler vermieden werden.

1. Systematische Fehler.

Zellen reagieren normalerweise auf Stimulantien, zum Beispiel Medikamente, nicht allein allergisch, sondern auf den Verbund der Stimulantien mit Proteinen (Träger-

proteinen), zum Beispiel Albumin oder Lipoprotein, oder im Verbund mit anderen Zellen, zum Beispiel Antigen-präsentierende Zellen (APC). Diese besitzen ihrerseits von Rezeptoren erkennbare Oberflächen. Die Anwesenheit von solchen costimulierenden Signalen ist zusätzlich erforderlich, um eine möglichst präzise Abbildung der natürlichen, auch in vivo zu erwartenden Aktivitäten der zu untersuchenden Zellen zu erreichen. Im Gegensatz zu Kulturen mit isolierten Leukozyten enthalten Vollblutkulturen diese Bestandteile und Signale, so daß die Reaktion der Blutzellen, solange sie sich im Vollblut befinden, den natürlichen Verhältnissen eher entspricht als in isoliertem Zustand. Es wurde auch gefunden, daß isolierte Leukozyten eine viel höhere Reaktion auf Stimulantien und Medikamente zeigen, als wenn sie im Vollblut enthalten sind, da im Vollblut die Stimulantien und Medikamente häufig an Erythrozyten und Trägerproteinen gebunden sind. Durch diese Bindung wird die Konzentration der Stimulantien und Medikamente abgepuffert, was zu einer allmählicheren Freisetzung der von den Zellen abgegebenen Botenstoffen führt.

2. Beseitigung von Handhabungsfehlern.

Wie oben dargelegt, wurde gefunden, daß die roten Blutkörperchen die Aktivierung der weißen Blutzellen (Leukozyten) entgegen den ursprünglichen Vorstellungen nicht stören, sondern eher die Verhältnisse widerspiegeln, wie sie in vivo vorliegen. Durch die Abtrennung von Überstand nach der Inkubation kann jedoch in einfacher Weise eine nachträgliche Beeinflussung des Überstandes durch die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) vermieden werden. Dies wirkt sich auch auf eine nach der Inkubation normalerweise erforderlich werdende Lagerung bzw. einen Versand günstig aus, indem durch das Einführen des Trennstempels die Sezernierung von Cytokinen in den Überstand augenblicklich unterbunden wird und dadurch

die zellulären Reaktionen zeitlich sehr definiert beendet werden können.

Durch die Erfindung lassen sich auch pharmakologische und
5 toxische Wirkungen auf das Immunsystem feststellen.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Vollblut ohne
vorherige Auftrennung extrakorporal mit einem Blutgerinnungs-
mittel und vorzugsweise mindestens einem Stimulans (Aktivie-
10 rungsmittel) zur Stimulierung von Blutzellen vermischt, das
gesamte Blut inkubiert, um die Blutzellen zu stimulieren,
eine Abtrennung von gebildetem Überstand vom Sediment vorge-
nommen und die Immunabwehraktivität aus dem Überstand be-
stimmt. Unter Blutgerinnungsmittel ist insbesondere ein Blut-
15 gerinnungsinhibitor zu verstehen, mit dessen Hilfe das Blut
während und nach der Blutentnahme an der Gerinnung gehindert
wird. Das Inkubieren erfolgt vorzugsweise in Gegenwart eines
Nährmediums. Vorzugsweise wird das Nährmedium mit dem Blutge-
rinnungsmittel, insbesondere Blutgerinnungsinhibitor, und
20 insbesondere mit dem mindestens einen Stimulans zusammenge-
bracht, bevor diese mit dem Blut vermischt werden. In der
Regel wird das Nährmedium mit dem Blut im Volumenverhältnis
5:1 bis 1:5, insbesondere 1:1 bis 1:2, vermischt. Das Nährme-
dium kann in dem Gefäß vorgelegt werden, in dem die Inkubie-
25 rung bzw. Kultivierung durchgeführt wird. Für reproduzierbare
Ergebnisse ist es wichtig, daß die Inkubierung bei konstanter
Temperatur, insbesondere bei ca. 37 °C, vorgenommen wird.
Dies kann in geeigneter Weise in einem Thermoblock geschehen,
der vorzugsweise mehrere Aufnahmeöffnungen für Inkubationsge-
30 fäße besitzt. Neben der Verwendung von Thermoblöcken werden
auch andere thermostatisch regulierbare Vorrichtungen von der
Erfindung umfaßt. So kann die Inkubierung auch in einem Was-
serbad oder beispielsweise in einem entsprechend temperier-
baren Schrank o.ä. erfolgen. Die Inkubationsdauer kann bei
35 wenigen Minuten bis etwa 60 Stunden, insbesondere zwischen 8
und 60 Stunden, liegen. Als Inkubationsdauer können zweck-

- mäßigerweise 24 oder 48 Stunden gewählt werden. Auch diese Festlegung begünstigt den Erhalt von reproduzierbaren Werten. Während der Inkubationsdauer setzen sich die roten und weißen Blutkörperchen in der Regel von selbst ab. Die Trennung des Überstandes von den Blutkörperchen wird deshalb mit Vorteil ohne vorherige Zentrifugation vorgenommen. Insbesondere bei kurzen Inkubationsdauern kann jedoch eine Zentrifugation zur Sedimentation der festen Bestandteile des Blutes vorteilhaft sein. Die Aktivitätsbestimmung kann dann am Überstand durch Bestimmung der von den Blutzellen abgeschiedenen Botenstoffe (Cytokine) vorgenommen werden. Die Durchführung der Bestimmung erfolgt insbesondere in an sich bekannter Weise durch ELISA oder andere geeignete Testverfahren.
- 15 In der Regel wird das Vollblut in Gegenwart von mindestens einem Stimulans inkubiert. Es kann aber auch ohne Stimulans gearbeitet werden, zum Beispiel wenn festgestellt werden soll, wie stark die Zellen im Körper bereits vorstimuliert waren.
- 20 In der Regel erfolgt die Aktivitätsbestimmung an einem anderen Ort als die Inkubation, oder die Aktivitätsbestimmung erfolgt aus anderen Gründen nicht unmittelbar nach Beendigung der Inkubation. Deshalb ist es erfindungsgemäß mit Vorteil vorgesehen, den Überstand bis zur Aktivitätsbestimmung gekühlt aufzubewahren, insbesondere bei Temperaturen von 0 bis 8 °C, insbesondere bei ca. 4 °C. In besonderen Fällen ist auch ein Einfrieren möglich. Da der Überstand und vorzugsweise auch die abgesetzten Blutkörperchen nach der Trennung im Inkubationsgefäß verbleiben, wird das Sediment mit den Blutkörperchen mitgekühlt. Besonders bevorzugt ist es, daß ein zur Blutentnahme verwendetes Blutentnahmesystem auch als Inkubationsgefäß verwendet wird. Als Blutentnahmesystem wird vorzugsweise ein herkömmlicher Spritzenzylinder eingesetzt.
- 30 Von der Erfindung werden jedoch auch weitere Blutentnahmesysteme umfaßt, wie beispielsweise evakuierte Glasröhrchen mit

Gummidichtung, auf welche Kanülen aufsetzbar sind. Auch die Trennung des Überstandes von den Blutkörperchen wird vorzugsweise im Blutentnahmesystem, insbesondere mit Hilfe einer zeitweise durchlässigen Trennwand vorgenommen. Besonders vorteilhaft ist hierzu ein im Blutentnahmesystem verschiebbarer Ventilkolben. Das zur Blutentnahme verwendete Blutentnahmesystem kann weiterhin mit Vorteil nach der Trennung von Überstand und Blutkörperchen auch als Kühl-, Transport- und insbesondere Versandbehälter verwendet werden. Der Versand kann in sogenannten Kühlblöcken erfolgen, die mit einem Kältespeichermedium gefüllt sind und vorzugsweise ein als Einstecköffnung dienendes Sackloch zur Aufnahme des Blutentnahmesystems, insbesondere des Spritzenzylinders, besitzen.

Als Spritzenzylinder für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eignen sich besonders im Handel unter der Bezeichnung "Monovette" (eingetragene Marke der Firma Sarstedt) befindliche Spritzenzylinder mit abbrechbarer Kolbenstange und einer den gesamten Querschnitt des Spritzenzylinders freigebenden Verschlußkappe auf der Seite der Nadel. Solche Spritzenzylinder können nach dem Abbrechen der Kolbenstange wie Reagenzgläser oder Zentrifugengläser gehandhabt werden. Nach der Inkubationszeit und dem Absetzen der Blutkörperchen kann ein dem Spritzenzylinder zugeordneter Ventilkolben bei abgenommener Kappe von oben eingeführt werden und in den Überstand hineingedrückt werden, wobei der Überstand durch den Ventilkolben hindurchfließt und bei Beendigung des Eindrückvorganges und Herausziehen eines Eindrückstabes von selbst schließt, so daß danach eine Vermischung zwischen den Blutkörperchen und dem Überstand nicht mehr möglich ist. Die im unteren Teil des Spritzenzylinders eingefangenen Blutkörperchen und der davon abgetrennte im oberen Teil befindliche Überstand werden bei der weiteren Handhabung im Spritzenzylinder belassen, bis eine Entnahme von Überstand zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung erfolgt. Es sind bereits Spritzenzylinder im Handel, die zur Blutentnahme einen Blut-

gerinnungsinhibitor, zum Beispiel Heparin, insbesondere in lyophilisierter Form enthalten. Solche Spritzenzylinder enthalten meistens auch noch Kunststoffperlen, um eine schnelle Abtrennung der roten Blutkörperchen vom Überstand zu bewirken. Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist vorzugsweise ebenfalls ein Blutgerinnungsinhibitor im Spritzenzylinder enthalten, nicht aber die normalerweise üblichen Kunststoffperlen. Mit Vorteil enthalten die Spritzenzylinder beim erfindungsgemäßen Verfahren auch schon den mindestens einen Stimulator, vorzugsweise ebenfalls in trockener, insbesondere lyophilisierter Form. Es ist aber auch möglich, den mindestens einen Stimulator getrennt aufzubewahren, zum Beispiel in Form einer stabilisierten Lösung, und ihn gesondert in dem Spritzenzylinder aufzunehmen, insbesondere kurz vor der Blutentnahme. Vor der Blutentnahme kann das gewünschte Volumen an Nährmedium in den Spritzenzylinder eingegeben werden, insbesondere durch Aufsaugen aus einer Einstechflasche. Bei der Blutentnahme erfolgt dann sofort eine Vermischung mit dem Nährmedium, in dem auch die vorgelegten Substanzen gelöst sind.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält das Blutentnahmesystem zum Zeitpunkt der Blutentnahme ausschließlich das Blutgerinnungsmittel, insbesondere den Blutgerinnungsinhibitor. Bei dieser Ausführungsform wird die Gefahr vermieden, daß durch eine versehentliche Reininjektion der vorgelegte Inhalt des Blutentnahmesystems (z.B. Stimulantien und/oder Nährmedium) in den Menschen gelangen und hier u.U. schädigend wirken kann. Nach der Blutentnahme werden bei dieser Ausführungsform die weiteren Zusätze, wie beispielsweise Stimulantien und/oder Nährmedium, dem Blut in dem Blutentnahmesystem zugesetzt. Dies kann insbesondere durch Aufsaugen aus entsprechenden Einstechflaschen erfolgen.

30

Stimulantien können für sich allein oder in Kombination zu mehreren verwendet werden. Als Stimulantien kommen vor allem in Frage: Mitogene, das sind die Zellteilung aktivierende

35

Stoffe. Hier gibt es zahlreiche verschiedene Arten. Diese dienen u.a. zur Aktivierung der verschiedenen Subtypen von Lymphozyten. Darüber hinaus gibt es auch partikuläre Aktivatoren von Granulozyten und Monozyten, wie etwa Zymosan und Bakterien. Granulozyten und Monozyten lassen sich auch durch lösliche Signalstoffe wie LPS und Muramylpeptide aktivieren. Des weiteren können Antigene und Allergene sowie Antikörper gegen Oberflächen-Strukturen der Zellen eingesetzt werden, um jeweils selektiv bestimmte Zellen bevorzugt zu stimulieren.

Th2-Lymphozyten lassen sich besonders gut kombiniert aktivieren, d.h. unter Verwendung von mehreren Stimulatoren. Hier eignen sich Mitogen und/oder Phorbol ester in Kombination mit Antikörpern, zum Beispiel Anti-CD 28. Letzteres ist ein co-stimulierender Coaktivator. Weiterhin geeignet sind Ionenkanal-bildende Ionenschleuser. Wenn die Stimulatoren konkurrierende Mediatoren, zum Beispiel Interleukin 4 und Interferon gamma aus T-Zellen freisetzen, dann werden vorzugsweise mindestens zwei verschiedene Ansätze gefahren. Dies ist besonders bei der Untersuchung von Blut von Allergikern und Atopikern, wie Neurodermitikern, wichtig, bei denen zuviel Interleukin 4 gebildet wird. Die nicht abschließende Aufzählung zeigt die Vielfalt der durchführbaren Aktivitätsbestimmungen. Es können deshalb den jeweiligen Arten der Bestimmung angepaßte Blutentnahmesysteme, insbesondere Spritzenkolben für die Blutentnahme, die die jeweiligen spezifischen Stimulanzien bereits enthalten können, vorrätig gehalten werden.

Gegenstand der Erfindung sind demgemäß auch Testkits zur Bestimmung der Immunabwehraktivität von Blutzellen. Diese Testkits umfassen

- a) ein Blutentnahmebesteck mit
- b) einem Blutentnahmesystem, insbesondere einem Spritzenzylinder zur Blutentnahme;
- c) einen Blutgerinnungsinhibitor, der vorzugsweise in lyo-

- philisierter Form im Blutentnahmesystem, insbesondere im Spritzenzylinder, vorgehalten ist;
- d) gegebenenfalls mindestens ein Stimulans zur Aktivierung der Blutzellen, das vorzugsweise in getrockneter, insbesondere lyophilisierter Form im Blutentnahmesystem, insbesondere im Spritzenzylinder, oder in einem separaten Gefäß vorgehalten ist;
- e) eine Kulturlösung für das Kultivieren des entnommenen Blutes; und
- f) einen in das Blutentnahmesystem, insbesondere in den Spritzenzylinder, passenden Ventilkolben zur Trennung von abgesetzten roten Blutkörperchen vom Überstand im Blutentnahmesystem.
- Die Kulturlösung ist vorzugsweise in einer Einstechflasche vorrätig gehalten, wobei das Volumen der Einstechflasche vorzugsweise dem für die Kultivierung geeigneten Volumen an Nährlösungen entspricht. Durch vollständiges Entleeren der Vorratsflasche vor oder nach der Blutentnahme ist dann das richtige Volumen in das Blutentnahmesystem, insbesondere in den Spritzenzylinder, überführt. Der Ventilkolben ist in der Regel außerhalb des Blutentnahmesystems vorgesehen und nach dem Absetzen der Blutkörperchen und nach Beendigung der Inkubation in das Blutentnahmesystem, insbesondere in den Spritzenzylinder, einführbar.

Zur Ausrüstung gehört dann vorzugsweise noch eine oben erwähnte thermostatisch regulierbare Vorrichtung, insbesondere ein Thermoblock, in den die Blutentnahmesysteme, insbesondere die Spritzenzylinder, einsteckbar sind und zwar beispielsweise 20 Spritzenzylinder gleichzeitig, wodurch es möglich ist, mehrere Ansätze gleichzeitig zu kultivieren. Weiterhin gehört hierzu ein geeignetes Kühlgerät und eine ausreichende Anzahl an Kühlblöcken für den Transport. Wenn erwünscht oder besondere Bestimmungen durchgeführt werden sollen, ist es auch möglich, leere oder nur einzelne Substanzen enthaltende Blut-

entnahmesysteme zu verwenden und in diesen dann die für den Spezialfall gewünschten Substanzen, wie zum Beispiel Kombinationen von Stimulatoren, zuzusetzen.

5

Beispiel

In einem Spritzenzylinder, beispielsweise einer Monovette der Firma Sarstedt, ist lyophilisiertes Heparin und opsoniertes Zymosan als mögliches Stimulans vorgelegt. Auf den Spritzen-
10 zylinder wird die zugehörige Nadel aufgesetzt, wonach aus einer Einstechflasche der gesamte Inhalt einer Kulturlösung von ca. 3 ml herausgesaugt wird. Blutgerinnungsmittel und Stimulans werden im Nährmedium aufgenommen. Es werden dann der Person, deren Blut untersucht werden soll, 2 ml Blut ent-
15 nommen, was im Rahmen von Mehrfachuntersuchungen erfolgen kann. Dabei vermischt sich das entnommene Blut mit der Kulturlösung und den darin enthaltenen Substanzen. Nach Entfernen der Spritzennadel bleibt der Spritzenkolben verschlossen, da eine an diesem vorgesehene Schraubenkappe eine selbst abdichtende Durchstechmembran aufweist. Bei nach unten gezogenem Spritzenkolben wird die Kolbenstange durch seitliches Abbiegen an einer Sollbruchstelle abgebrochen, so daß der Spritzenkolben nach Art eines Reagenzglases mit Verschuß
20 verwendbar ist. Der Spritzenkolben wird dann zusammen mit anderen Spritzenkolben, in denen ähnliche Tests durchgeführt werden, in einen Thermoblock gegeben und in diesem bei konstant 37 °C während 24 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellen zur Abgabe ihrer Botenstoffe stimuliert, die in das Serum abgegeben werden. Während der Inkubierung
30 setzen sich die Blutkörperchen unten ab, so daß ein im wesentlichen klarer Überstand zurückbleibt. Bei Beendigung der Inkubationszeit werden die Spritzenzylinder aus dem Thermoblock genommen und durch Abnahme der Kappe geöffnet. Mit Hilfe eines Stößels wird ein Ventilkolben, dessen Außendurchmesser dem Innendurchmesser des Spritzenzylinders entspricht,
35 in den Spritzenzylinder eingeführt und langsam durch den

Überstand bis kurz über die sedimentierten Blutkörperchen in die Flüssigkeit eingedrückt, wobei sich das Ventil im Ventilkolben öffnet und ein Hindurchfließen des Überstandes in einen über dem Ventilkolben gebildeten separaten Raum veranlaßt. Nach Herausnahme des hierzu verwendeten Stößels, schließt sich das Ventil im Ventilkolben automatisch, und der Spritzenzylinder kann durch Aufsetzen der Schraubenkappe wieder verschlossen werden. Die Blutkörperchen sind auf diese Weise bleibend vom Überstand getrennt, unabhängig davon, welche Erschütterungen der Spritzenkolben danach erfährt. Nach der Trennung von Blutkörperchen und Überstand werden die Spritzenkolben auf eine Temperatur von ca. +4 °C gekühlt und in Kühlblocks gesteckt, die ebenfalls auf diese Temperatur oder auf eine darunterliegende Temperatur gekühlt sind. Die Kühlkapazität dieser Kühlblocks ist so bemessen, daß sie in geeigneten Versandtaschen, zum Beispiel Luftpolstertaschen, während einer Versanddauer von mindestens 24 Stunden, ohne Gefahr eines unerwünschten Temperaturanstieges, ihre Temperatur halten können. Im Testlabor, das sich in der Regel an einem anderen Ort befindet als der Ort der Blutentnahme und der Inkubation, kann dann die Aktivitätsbestimmung, beispielsweise durch ELISA, unter Einsatz vorbestimmter Volumina des Überstandes durchgeführt werden. Parallelversuche haben gezeigt, daß bei diesem Vorgehen genaue und reproduzierbare Aktivitätswerte erhalten werden.

Die beiliegende Zeichnung zeigt eine bevorzugte Ausführungsform eines Spritzenzylinders zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Der Spritzenzylinder 1 weist einen Hohlzylinder 2 auf, in dem ein Spritzenkolben 3 mit Hilfe einer Kolbenstange 4 abdichtend verschiebbar angeordnet ist. Der Hohlzylinder 2 weist im Bereich der Kolbenstange 4 eine Verjüngung 5 auf, die als Führung für die Kolbenstange 4 dient. Die Kolbenstange 4 be-

sitzt in der Nähe des Kolbens 3 eine Sollbruchstelle 6, die bei nach hinten gezogenen Kolben im Bereich der Führung 5 zu liegen kommt und ein müheloses Abbrechen der Kolbenstange bei nach hinten geführtem Kolben ermöglicht. Das von der Kolbenstange 4 abweisende Ende 7 des Hohlzylinders ist über den gesamten Querschnitt offen und mit einer Schraubkappe 8 verschließbar, die einen Aufsteckstutzen 9 für eine Spritzennadel 10 besitzt, die mit einem Bajonettverschluß verriegelbar ist. Der Ansatzstutzen 10 weist im Innern eine durchstechbare Dichtung 11 aus Gummi auf, die beim Aufsetzen der Nadel 10 durchstoßen wird und sich beim Abnehmen der Nadel wieder verschließt. Dem Spritzenzylinder 1 ist ein Ventilkolben 12 zugeordnet, der im ungebrauchten Zustand außerhalb des Spritzenzylinders vorgesehen ist und dem ein in der Zeichnung nicht dargestellter Stößel zugeordnet ist. Der Ventilkolben ist mit Hilfe des Stößels bei abgenommener Schraubkappe 8 in den Spritzenzylinder einführbar. Diese Einführung erfolgt nach Beendigung der Inkubation des im Spritzenzylinder enthaltenen Blutes, das sich in einen Überstand 13 und ein Sediment 14 aufgetrennt hat, welches die Blutkörperchen enthält. Zur bleibenden Trennung von Überstand 13 und Sediment 14 wird der Ventilkolben bis zur Grenze zwischen Überstand und Sediment eingedrückt, wobei der Überstand durch das Ventil 15 des Ventilkolbens strömt, bis der Trennvorgang bei Erreichen der Grenze zwischen Überstand und Sediment beendet wird. Bei Beendigung des Eindrückvorganges und Herausnehmen des Stößels schließt das Ventil 15 automatisch. Der Spritzenkolben kann dann wieder durch Aufsetzen der Schraubkappe 8 dicht verschlossen und der Spritzenkolben als Aufbewahrungs-, Kühl- und Transportbehälter verwendet werden, so daß das Blut bzw. seine getrennten Teile zwischen der Blutentnahme und der eigentlichen Durchführung der Aktivitätsbestimmung nicht umgefüllt zu werden braucht. Spritzenzylinder der beschriebenen Art sind unter der Bezeichnung "Monovetten" und Ventilkolben

unter der Bezeichnung "Seraplas", jeweils von der Firma
Sarstedt, D-51588 Nymbrecht im Handel.

- - - - -

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Immunabwehraktivität von
Blut durch Stimulation der weißen Blutzellen im Voll-
5 blut, Inkubieren des Vollblutes, Trennung von Überstand
vom Sediment und Bestimmung der Aktivität aus dem abge-
trennten Überstand.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
10 das Blut ohne vorherige Abtrennung der roten Blutkörper-
chen extrakorporal mit einem Blutgerinnungsmittel, ins-
besondere einem Blutgerinnungsinhibitor, gegebenenfalls
mindestens einem Stimulans (Aktivierungsmittel) zur
Stimulierung von Blutzellen zur Abgabe von Botenstoffen
15 in Verbindung gebracht wird, das gesamte Blut inkubiert
wird, danach eine Trennung von Blutkörperchen vom
Überstand vorgenommen wird und die Immunabwehraktivität
anhand der im Überstand enthaltenen Botenstoffe bestimmt
wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeich-
net, daß das Inkubieren in Gegenwart von Nährmedium vor-
genommen wird, das vorzugsweise mit mindestens einem
Blutgerinnungsinhibitor und insbesondere auch minde-
25 stenseinem Stimulans zusammengebracht wird, bevor das
Blut zugegeben wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, daß das Inkubieren in Gegenwart
30 von Nährmedium vorgenommen wird, das vorzugsweise nach
dem Versetzen des Blutes mit mindestens einem Blutgerin-
nungsinhibitor mit dem Blut in Verbindung gebracht
wird.
- 35 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, daß das Inkubieren in Gegenwart

von mindestens einem Stimulans vorgenommen wird, das vorzugsweise nach dem Versetzen des Blutes mit mindestens einem Blutgerinnungsinhibitor mit dem Blut in Verbindung gebracht wird.

5

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubierung des Vollblutes bei ca. 37 °C, vorzugsweise in einer thermostatisch regulierbaren Vorrichtung, insbesondere einem Thermoblock, vorgenommen wird.

10

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubationsdauer wenige Minuten bis etwa 60 Stunden beträgt.

15

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung des Überstandes von den Blutkörperchen im Sediment ohne vorherige Zentrifugation vorgenommen wird.

20

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das inkubierte Blut nach der Inkubation und Trennung gekühlt wird und bis zur Aktivitätsbestimmung gekühlt gehalten wird.

25

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Blut in einem zur Blutentnahme verwendeten Blutentnahmesystem, insbesondere einem Spritzenzylinder, inkubiert wird und die Trennung des Überstandes von den Blutkörperchen im Blutentnahmesystem, insbesondere im Spritzenzylinder, vorzugsweise mit Hilfe einer zeitweise durchlässigen Trennwand, insbesondere einem verschiebbaren Ventilkolben, vorgenommen wird.

30

35

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Blutgerinnungsmittel, insbesondere der Blutgerinnungsinhibitor, und vorzugsweise auch das mindestens eine gegebenenfalls verwendete Stimulans im Blutentnahmesystem, insbesondere im Spritzenzylinder, oder in einem separaten Gefäß in trockener Form vorgelegt sind.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das aufgeteilte Blut in gekühltem Zustand, vorzugsweise in einer Kühlpackung, transportiert wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zur Blutentnahme verwendete Blutentnahmesystem, insbesondere der Spritzenzylinder, nach der Trennung von Überstand und roten Blutkörperchen als Aufbewahrungs-, insbesondere Versandbehälter, verwendet wird.
14. Testkit zur Bestimmung der Immunabwehraktivität von Blutzellen, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit
- a) einem Blutentnahmebesteck mit
 - b) einem Blutentnahmesystem, insbesondere einem Spritzenzylinder zur Blutaufnahme,
 - c) einem Blutgerinnungsinhibitor,
 - d) gegebenenfalls mindestens einem Stimulans zur Aktivierung der Blutzellen zur Abgabe von Botenstoffen,
 - e) einer Kulturlösung für das Blut, und
 - f) einem in das Blutentnahmesystem, insbesondere in den Spritzenzylinder passenden Ventilkolben zur Trennung von abgesetzten Blutkörperchen vom Überstand im Blutentnahmesystem.

15. Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Blutgerinnungsinhibitor und/oder das mindestens eine Stimulans in vorzugsweise trockener, insbesondere lyophilisierter Form, in dem Blutentnahmesystem, insbesondere in dem Spritzenzylinder, enthalten sind.
16. Kit nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Kulturlösung und/oder das mindestens eine Stimulans volumendosiert in mindestens einer Einstechflasche enthalten sind.
17. Kit nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Ventilkolben außerhalb des Blutentnahmesystems, insbesondere des Spritzenzylinders, vorgesehen und nach dem Absetzen der Blutkörperchen in das eine abnehmbare Kappe aufweisende Blutentnahmesystem einführbar ist.
18. Verwendung eines medizinischen Blutentnahmesystems, insbesondere eines Spritzenzylinders, mit verschiebbarem Spritzenkolben, mit einer zeitweise durchlässigen Trennwand zur Inkubierung von Vollblut im Blutentnahmesystem und anschließenden Trennung von überstehendem Serum von den Blutkörperchen mit Hilfe der Trennwand.
19. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennwand im Blutentnahmesystem, insbesondere im Spritzenzylinder, verschiebbar und insbesondere nach der Inkubierung in das Blutentnahmesystem, insbesondere in den Spritzenzylinder, einführbar ausgebildet ist.
20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennwand eine Ventileinrichtung aufweist, die nach der Trennung vorzugsweise selbsttätig schließt.

- - - - -

1/1

