



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 794 T2** 2006.07.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 970 183 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 794.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/05693**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 911 965.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/041609**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12M 1/26** (2006.01)

C12M 1/22 (2006.01)

C12M 1/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

826429 20.03.1997 US

(73) Patentinhaber:

Barnes, Allen C., Newport Beach, Calif., US;
Barnes, Janice S., Newport Beach, Calif., US

(74) Vertreter:

Fiener, J., Pat.-Anw., 87719 Mindelheim

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

Barnes, Allen C., Newport Beach, US; Barnes,
Janice S., Newport Beach, US

(54) Bezeichnung: **MIKROPATHOLOGISCHER ABDRUCK EINES PATIENTEN AUF BASIS VON UNVERFÄLSCHTEM VOLLBLUT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der mikrobiologischen Pathologie und ist insbesondere auf ein neuartiges mikrobiologisches Kultivierungsverfahren und begleitende Vorrichtungen gerichtet, die von Patientenvollblut Gebrauch machen.

2. Beschreibung des verwandten Fachgebiets

[0002] Dem Lehrbuch der Mikrobiologie *Biology of Microorganisms* von Madigan, Martinko und Parker ist zu entnehmen, dass "die wichtigste Tätigkeit des Mikrobiologen in der Medizin die Isolierung und Identifizierung der Wirkstoffe ist, die Infektionskrankheiten verursachen". Man nennt dies die Reinkulturmethode der gängigen Praxis, wobei so vorgegangen wird, dass eine Probe oder Blut des Patienten kultiviert wird, wodurch Pathogene isoliert und identifiziert werden, und das resultierende Inokulum zur Herstellung einer Reinkultur verwendet wird, die dann auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika oder anderen Arzneistoffen getestet werden kann.

[0003] Obwohl man viel aus dieser klassischen Methode gelernt hat, weist sie große Einschränkungen auf. Die komplexe Wechselbeziehung aller unterschiedlichen Mikroben in einem Patienten mit allen hilfreichen und schädlichen Elementen in diesem Wirt werden nicht als Teil eines Ganzen angesehen. In der Forschung ist das Studium von Teilen von Nutzen, aber zur wirksamen Behandlung eines individuellen Patienten muss die ganze Person zum Zeitpunkt der Untersuchung betrachtet werden. Wir müssen erkennen, dass der Mensch eine Mischkultur ist und dass Reinkulturen Ärzten nicht die notwendigen Informationen zur Behandlung von Patienten geben. Dies ist lebenswichtig zu einer Zeit, wie wir sie jetzt erleben, wo Pathogene resistent gegen Antibiotika sowie virulenter werden.

[0004] Dieses Problem wurde in der Mikrobiologie schon lange erkannt, aber Nährlösungskulturen und Mischkulturen wurden für zu komplex und zu schwer zu behandeln gehalten, um damit zu arbeiten. Der Einsatz von Agarkulturmedien ist schwierig, und der Umgang mit Blutkuchen ist schwierig, so dass in der Regel Antikoagulanzen benutzt werden. Da Laboratorien ferner weit weg sind, sind Konservierungsmittel und Kühlung notwendig. So sind wir durch unnatürliche Bedingungen, das Verlangen nach Bequemlichkeit und das Vertrauen auf Reinkulturen unvermögender geblieben, wirksam auf die Pestilenz unseres Zeitalters zu reagieren.

[0005] Das hierin beschriebene Verfahren berück-

sichtigt den ganzen Menschen, verwendet Vollblut und Probe – nicht Inokulum – und geht direkt zur Heilung über, wobei es sich nicht mit der Identifizierung oder Isolierung von Pathogenen aufhält. Das Verfahren ist eine grundlegende Vereinfachung der Mikrobiologie/Pathologie (Mikropathologie). Die hierin beschriebenen Vorrichtungen erlauben eine geeignete Verwendung des Verfahrens und schützen das Personal vor dem potentiell gefährlichen Blut des Patienten. Die Verfügbarkeit eines Verfahrens, das tatsächlich bestimmen kann, ob ein Patient ein Antibiotikum benötigt, und welches, kann die Verfahrensweise verändern, wie Antibiotika und andere Arzneistoffe verschrieben werden.

Das Problem

[0006] Die Menschen werden krank durch Pathogene, Mikroben wie z. B. Bakterien, Viren, Protozoen, Pilze, Hefepilze etc. Heilende Wirkstoffe, z. B. chemische Wirkstoffe und Antibiotika, beispielsweise Penicillin, werden verwendet, um das Wachstum von Pathogen(en) zu unterdrücken oder sie abzutöten. Die bekannte Empfindlichkeit eines übertragenen Krankheitserregers gegen ein spezifisches Antibiotikum(-ka) erlaubt es, den Patienten mit diesem Antibiotikum oder einer Kombination daraus mit hoher Heilungswahrscheinlichkeit zu behandeln. Das Dilemma des Arztes besteht darin zu bestimmen, welches Antibiotikum oder welche Medikation wohl wirksam ist. Aber noch vor der Überlegung, welches Antibiotikum, muss der Arzt bestimmen, ob überhaupt ein Antibiotikum angezeigt ist. Viren und Allergien können bakteriellen Infektionen ähneln, werden aber nicht durch Antibiotika gelindert, die den Zustand tatsächlich verschlimmern können. Zudem ist das unnötige Verschreiben von Antibiotika Teil der Ursache für die Resistenzentwicklung von Pathogenen.

[0007] Gegenwärtig wird ein Patient mit typischen Symptomen mit dem Antibiotikum behandelt, das in der Vergangenheit wirksam gewesen ist. Jedoch sind viele Pathogene resistent gegen Antibiotika geworden, die früher wirksam waren. Da die gängige Verfahrenstechnik dem Arzt kein praktisches Mittel bei der Aufgabe gibt zu bestimmen, ob ein Antibiotikum angezeigt ist oder welches der vielen alten oder neuen Antibiotika wirksam wäre, trifft der Arzt gewöhnlich eine fundierte Annahme und pickt einfach eines heraus, in der Hoffnung, dass es hilft. Der Patient wird zur Wirksamkeitsprüfschale. Immer öfter ist heute ein früher wirksames Antibiotikum für Patienten unwirksam. Alternativ kann der Arzt dem Patienten Blut oder eine Probe entnehmen – aus dem Urin, Kot, Rachenabstrich, Sputum, Liquor cerebrospinalis, oder Eiter – und zur Kultur und Bestimmung der Empfindlichkeit irgendwelcher entdeckter Pathogene gegenüber Antibiotika an das Labor schicken. Oder der Arzt kann den Patienten zu einem Laborsammelzentrum schicken, um eine geeignete Probe beizubringen.

[0008] Laboratorien sind jetzt hochautomatisiert. Maschinenteknologie und Fachpersonal sind sehr teuer, woraus ein Zentrallabor mit vielen peripheren Sammelzentren resultiert. Folglich ist das tatsächliche Labor oft weit weg vom Arzt oder Patienten, und der Transport der Proben nimmt beträchtliche Zeit in Anspruch. Folglich werden Blut und Proben gewöhnlich bis zum Erhalt und Prüfbeginn gekühlt. Gewöhnlich werden auch Blutzusatzstoffe wie z. B. Antikoagulanzen, Konservierungsmittel etc. verwendet. Die Entfernung des Labors erlaubt es nicht, frisch abgenommenes, unverfälschtes Vollblut und frische Proben bei Körpertemperatur, natürlichen menschlichen Bedingungen, bei der Kultur und Empfindlichkeitsprüfung zu verwenden.

[0009] Gegenwärtig wird im Labor die Probe, anders als Blut, in einem sterilen Nährmedium platziert, gewöhnlich Agar in einer Schale, um das (die) die Krankheit verursachende(n) Pathogene zu vermehren. Verdächtige Kolonien von Pathogenen werden identifiziert und dem Arzt Bericht erstattet, der dann basierend auf der bekannten bisherigen Empfindlichkeit dieses Mikrobentyps Arzneistoffe verschreiben kann. Die Studie kann weiter getrieben werden. Kolonien können isoliert und Inokulum auf eine sterile Agarschale übertragen und erneut kultiviert werden und dann diese Reinkultur auf ihre Empfindlichkeit gegen spezifische Antibiotika getestet werden. Leider nehmen die notwendigen Schritte zum Bekommen einer Reinkultur beträchtliche Extrazeit in Anspruch.

[0010] Wenn Blut kultiviert wird, werden flüssige Wachstumsmedien oder Nährlösung verwendet, um ein vollständiges Vermischen von Blut und Medium zu gestatten. Aber der flüssige Zustand erlegt seine eigenen Einschränkungen auf. Das Blut ist über das ganze Medium hinweg vermischt und nicht innerhalb eines Raumes enthalten, wo Pathogenkolonien leichter nachweisbar sind. Auch gibt es bei Nährlösung keine feste Oberfläche, wie sie von Agar bereitgestellt wird, um sie mit der Probe des Patienten zu bestreichen. Auch können einige Mikroben wachsen, wenn die Probe zu Nährlösung und Blut gegeben wird, aber Pathogene, die Luft zum Wachstum brauchen, können unterdrückt werden, und können infolgedessen nicht entdeckt werden, außer es werden spezielle Schritte unternommen, um die Nährlösung zu belüften. Auch enthalten die meisten im Handel erhältlichen flüssigen Blutnährmedien Antikoagulanzen, um zu verhindern, dass Blut gerinnt und klumpt. Folglich würde das Nährmedium den natürlichen Zustand verändern, selbst wenn Vollblut ohne gerinnungshemmendes Mittel an das Labor geliefert würde, und den Versuch vereiteln, einen Ersatzwirt ohne künstliche Additive zu erzeugen. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird durch die natürliche Gerinnung nicht gestört.

[0011] Gegenwärtig werden Pathogene, die ausgehend von Nährlösung vermehrt werden, identifiziert, isoliert und auf Sammelgefäße übertragen, wo Kolonien von Mikroben unter kontrollierten Bedingungen manipuliert werden können, einschließlich des Testens auf Antibiotikaempfindlichkeit. Es sind viele Schritte und viel Zeit, Mühe und Erfahrung erforderlich. Deshalb wird diese Methode wenig verwendet, außer bei den überaus ernst erkrankten, gewöhnlich im Krankenhaus befindlichen Patienten.

[0012] Gegenwärtig wird das Verfahren des Mischens des unverfälschten Vollbluts eines Patienten mit Nährmedium, wie z. B. Agar, und Zusetzen einer Probe für das Wachstum von Pathogenen und Antibiotikaempfindlichkeit nicht verwendet. Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die direkte Zugabe von Blut zu Nährmedium abschwächen. Es ist schwierig, mit Agar zu arbeiten; bei Temperaturänderungen wird es entweder hart oder flüssig. Falls Erhitzen erforderlich ist, werden viele Pathogene im Blut abgetötet und können später nicht entdeckt werden. Zur Herstellung einer Gießplatte zum Untersuchen der Empfindlichkeit gegen Antibiotika wird Inokulum dem Agar bei +45°C zugefügt, der tiefsten Temperatur, bei der Agar flüssig ist. Diese Temperatur ist unnatürlich für den menschlichen Körper, so dass viele Pathogene, die bei normaler Körpertemperatur, 35–37°C, gut gedeihen, abgetötet werden. Empfindliche anaerobe Pathogene und einige Viren sterben bei Kontakt mit Luft ab. Andere empfindliche Mikroben sterben beim Anfärben eines Objektträgers. Demnach ist die gängige Verfahrenstechnik nicht in der Lage, viele empfindliche Pathogene ohne Weiteres zu kultivieren und nachzuweisen.

[0013] Der Umgang mit menschlichem Blut ist in diesem Zeitalter tödlicher Pathogene wie z. B. Hepatitis B, AIDS (HIV) u. a. nicht ohne Risiko. Wenn die Oberfläche von Agar mit einer Probe eines Patienten bestrichen und das Blut des Patienten unter Verwendung gebräuchlicher Mittel, z. B. einer Spritze/Nadel, mit dem Agar vermischt würde, wäre das Personal der Gefahr eines Nadelstichs und den Pathogenen des Patienten ausgesetzt. Hierin werden Vorrichtungen beschrieben, die dieses Risiko vermeiden oder verringern.

[0014] Gegenwärtig können kleine Papierscheiben, die mit unterschiedlichen Antibiotika in verschiedenen Stärken getränkt sind, einzeln von Hand auf der Oberfläche von Agar platziert werden, wo sich Pathogene vermehren. Falls der spezielle Krankheitserreger gegen das Antibiotikum auf der Scheibe empfindlich ist, erscheint dann überall auf der Scheibe eine deutliche "Hemmzone", da der Krankheitserreger abgetötet oder unterdrückt wird. Dies ist keine praktische Methode in der Praxis des Arztes, und folglich wird derzeit wenig Gebrauch davon gemacht. Im Labor können viele Scheiben gleichzeitig mit einem

Spezialapparat auf der Oberfläche von Agar platziert werden. Aber im Labor sind Blut und Proben eben nicht frisch und wimmeln von Mikroben. Hierin werden einfache Vorrichtungen beschrieben, die die Antibiotikumbestimmung in der Praxis des Arztes erleichtern, wo Vollblut und Proben frisch sind, was die Kultivierung empfindlicher Organismen erlaubt.

[0015] Das US-Patent 4,421,849 von Breuker beschreibt ein Verfahren zum Screenen oder Identifizieren von Mikroorganismen durch Vorsehen von zwei Schichten Nährmedium, die einander berühren, aber durch ein Membranfilter getrennt sind, so dass wenn Organismen in eine Schicht implantiert werden, Produkte ihrer Vermehrung zur Detektion in die andere Schicht diffundieren. Diese Entgegenhaltung zeigt keine Diskontinuität auf, in die Blut oder Zellen über einen Zugang oder andere Eintragsapparaturen injiziert werden. Das US-Patent Nr. 2,144,255 von Carpenter und das französische Patent Nr. 2 639 957 von Labarthe zeigen eine solche Eintragsapparatur auf, aber die Einrichtung ist nicht mit einer Diskontinuität verbunden.

[0016] Die US 3,692,493 von Terasaki offenbart einen in Kammern eingeteilten Misch- und Versandbeutel mit separaten, hintereinander geschalteten Behältnissen, mit dem das Separieren von Blutbestandteilen erreicht wird. Hierin ist eine etwas ähnliche Vorrichtung aufgezeigt, die die Form eines Beutel-in-Beutels annehmen könnte, aber allgemeiner ein Behältnis in einem Behältnis umfasst. Diese Vorrichtung ist dazu gedacht, Patientenzellen und/oder Blut mit Nährmedium und anderen Additiven zu verbinden, um Blut oder Zellen während des Versandes zur weiteren Verwendung zu präparieren.

[0017] Das US-Patent Nr. 4,187,861 von Heffernan zeigt ein biegsames Blutröhrchen mit einem einzigen Stopfen. Dies ist einem von der vorliegenden Anmeldung aufgezeigten biegsamen Blutröhrchen ein wenig ähnlich, zeigt aber nicht die Ventilanordnungen der vorliegenden Anmeldung.

Nachteile der gebräuchlichen Verfahrenstechnik

(a) Die gebräuchliche mikrobiologische Verfahrenstechnik gibt dem Arzt kein praktisches Mittel zu bestimmen, ob ein Antibiotikum angezeigt ist und wenn ja, welches. Folglich werden Patienten Antibiotika gegeben, die wirksam waren, oft in der Hoffnung, eine Infektion zu kurieren, die sich als Virusinfektion herausstellt oder wenigstens eine mögliche bakterielle Sekundärinfektion zu verhindern. Der wahllose Einsatz von Antibiotika und ähnlichen Wirkstoffen bewirkt jedoch allmählich, dass Patienten allergisch gegen diese Wirkstoffe werden, während die Mikroben resistent werden. Es gibt zwei gefährliche Folgen: der Patient wird nicht von der Infektion geheilt, und der Patient

wird ein Wirt, der unwissentlich ein Träger sein und resistente Pathogene übertragen kann. Das Verfahren der Verwendung natürlich vermehrter Medien zum Herstellen einer Patientenreplika erlaubt die Bestimmung des richtigen Wirkstoffs (d. h. Antibiotikaempfindlichkeit) zum Einsatz bei individuellen Patienten, weil sowohl bekannte als auch unbekannte Faktoren im Blut des Patienten, die beeinflussen, wie ein Krankheitserreger auf ein verabreichtes Antibiotikum reagiert, in diesem neuartigen Verfahren zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit automatisch berücksichtigt werden.

(b) Mit dem unverfälschten Vollblut eines Patienten lässt sich schwer arbeiten, weil es koaguliert und sich schnell zersetzt. Folglich werden gegenwärtig Additive, z. B. Antikoagulanzen und Konservierungsmittel, und Kühlung verwendet, aber dies verändert den natürlichen Zustand des Bluts und schränkt dessen Kultivierungsmöglichkeit ein. Das hierin beschriebene Verfahren mit den begleitenden Vorrichtungen weist diesen Nachteil nicht auf.

(c) Proben werden in der Regel zur Analyse zu Laboratorien transportiert, aber viele Pathogene sind empfindlich und überstehen die Fahrt nicht. Substanzproben werden von der Praxis des Arztes abgeholt und in sterilen Behältnissen zum Labor transportiert, aber nicht unter natürlichen Bedingungen. Viel Zeit kann vergehen, bevor mit dem Kultivierungsprozess begonnen wird. Pathogene, die nicht robust genug sind, unter diesen anomalen Bedingungen zu überleben und sich zu replizieren, können nicht identifiziert werden.

(d) Viele Pathogene vermehren sich nicht in den Nährmedien, die derzeit üblicherweise verwendet werden. Beispielsweise wird Schafsblut, das erwärmt wurde, um Eisen freizusetzen, mit Nährmedien vermischt, was als Schokoladenagar bezeichnet wird, um das Wachstum bestimmter Pathogene zu erleichtern. Die Sterilität kann aufrechterhalten werden. Steriles abgetötetes Schafsblut repliziert jedoch frisch abgenommenes unverfälschtes menschliches Vollblut bei Körpertemperatur nicht, insbesondere all die unterschiedlichen Elemente im Blut eines bestimmten Patienten zu dem Zeitpunkt, wo der Patient gerade eine spezielle Krankheit durchmacht.

Ferner ist flüssigen Wachstumsmedien, Nährlösung, normalerweise ein gerinnungshemmendes Mittel zugesetzt, wodurch der komplexe natürliche Zustand des Bluts verändert wird. Es ist bekannt, dass das gerinnungshemmende Mittel einen bestimmten Prozentsatz einiger Mikroben in der Nährlösung abtötet. So können gängige Nährlösungsmethoden die Blutkultivierung anspruchsvoller Organismen verhindern.

Andere Agartypen verwenden ebenfalls Blut als einen ihrer Bestandteile. Das Blut ist jedoch nicht das Blut des Patienten, enthält nicht alle natürli-

chen Elemente, wurde erwärmt und ist steril und kann infolgedessen kein Abdruck dieses bestimmten Patienten zu diesem speziellen Zeitpunkt der Krankheit sein. Bei der Standard-Gießplattenmethode wird das Inokulum 45°C-Agar zugefügt, wodurch viele empfindliche Mikroben abgetötet werden, die außerhalb des Körpertemperaturbereiches, 35–40,5°C, nicht überleben können. Wenn das Blut des Patienten über ca. 40,5°C erhitzt wird, beginnt das Blut, sich zu zersetzen, wird dabei auch steril und vereitelt so den Versuch, Pathogene zu kultivieren.

(e) Pathogene, die sich im Labor vermehren, reagieren im Patienten nicht immer gleich, wie die allgemeine Erfahrung der Vergangenheit anzeigt. Wie oben erwähnt, weist ein kranker Patient eine einzigartige Mischung von Elementen auf, von denen die meisten dem Arzt unbekannt sind. Ein Antibiotikum, das bei den meisten Menschen wirksam sein kann, kann bei anderen nicht wirksam sein, und die gängige Verfahrenstechnik bietet keinen Weg an, dies zu bestimmen, außer durch Behandeln des Patienten. Aber die Patienten, die sofort wirksamer Antibiotika am meisten bedürfen, sind am wenigsten in der Lage, diesen Prozess des Experimentierens auszuhalten.

(f) Selbst wenn sie erfolgreich ist, erfordert die gängige Verfahrenstechnik der Reinkultur, d. h. spezifische Identifizierung und Isolierung, viel Zeit, um zu bestimmen, welches Antibiotikum wirksam sein wird. Für einige Patienten kann ein geretteter Tag ein gerettetes Leben sein. Für viele mit chronischen Krankheiten, wie z. B. AIDS, kann die Sterblichkeit durch wirksame Behandlung einer Sekundärinfektion herabgesetzt werden. Für alle ist eine um einen Tag frühere Einleitung eines wirksamen Antibiotikums bzw. Medikation ein Tag, an dem sich ihre Krankheit nicht verschlimmert; die Aufnahme in ein Krankenhaus mit ihren Begleitkosten und -risiken kann vermieden werden. Allerwenigstens können die Patienten ihr aktives Leben früher wieder aufnehmen, einschließlich der Rückkehr an den Arbeitsplatz. Die Verzögerung einer wirksamen Behandlung ist sehr teuer, sowohl für den Einzelnen als auch für den Staat.

(g) Gegenwärtig werden viele Patienten getestet, nachdem sie bereits Antibiotika, Arzneien etc. nehmen. Dies wird als ein Problem angesehen, weil die gegenwärtig genommenen Arzneien die Pathogene unterdrücken und deren Isolierung in Reinkultur schwierig oder unmöglich machen können. Bei den hierin beschriebenen Verfahren und Vorrichtungen ist der aktuelle natürliche Zustand des Patienten erwünscht, einschließlich irgendwelcher genommener Arzneien. Der Erhalt von Reinkulturen ist kein unerlässliches Ziel mehr; jedoch können die herkömmliche Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung unter Verwendung der vorliegenden Erfindung weiterhin in zwei Schritten durchgeführt werden.

(h) Wenn Tumoren gegenwärtig aus dem Körper entfernt werden, werden sie gewöhnlich ein Stück weit verfälscht, bevor sie untersucht oder kultiviert werden, z. B. durch Einfrieren, Kühlen, Konservierungslösungen etc. Folglich sind Untersuchungen der Tumorzellen oder der Zellen des Patienten oder anderer Faktoren ungenau oder unvollständig. Die hierin beschriebenen Verfahren und Vorrichtungen verwenden Proben im natürlichen Zustand und unter natürlichen Bedingungen und eliminieren infolgedessen diese Einschränkungen. Beispielsweise kann eine Beutel-in-Beutel-Vorrichtung als Transportvorrichtung verwendet werden, um Tumoren unter natürlichen Bedingungen unter Verwendung des Blutes des Patienten zum Labor zu schaffen. Ferner kann der Forschungsprozess im Krebslabor im Beutel mit Additiven beginnen, wie z. B. Collagenase, um Krebszellen zu separieren. Eine derartige Vorrichtung erlaubt jedem Krebspatienten den Zugang zur Erfahrung eines Krebsforschungszentrums, selbst wenn dieses Zentrum fern sein mag.

(i) Es besteht die Gefahr einer lebensbedrohlichen Infektion für das Gesundheits- oder Laborpersonal, das mit menschlichem Blut umgeht, insbesondere wenn Nadeln verwendet werden. Unter Verwendung der gängigen Verfahrenstechnik wären die aus dem Verfahren dieser Anmeldung erhaltenen Resultate wohl nur das Produkt von Experten in Laboratorien, nicht von Ärzten in ihren Praxen, wo Blut und Proben frisch, unverfälscht, intakt und mit Körpertemperatur vorliegen. Ohne die vorliegende Erfindung wären diese in einem Zeitalter zunehmend resistenter und virulenter Pathogene so wertvollen Ergebnisse unerreichbar.

j) Die Platzierung von Antibiotikascheiben auf Nährmedien einzeln und von Hand ist zeit- und arbeitsaufwendig und erhöht gleichzeitig die Infektionsgefahr, so dass der Arzt für die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung fast immer das Labor benötigt. So beschränken die gängigen Methoden den Arzt auf den Einsatz eines Labors, selbst wenn ideale Bedingungen von Blut und Probe in seiner Praxis verfügbar sind.

(k) Alle Antibiotika und Arzneistoffe sind nicht ohne Weiteres auf Scheiben verfügbar, und selbst wenn dies so ist, sind sie relativ teuer. Eine hierin beschriebene Vorrichtung kann Flüssigkeiten zum Prüfen der Empfindlichkeit verwenden, einschließlich Pillen und Kapseln nach deren Auflösung.

DIESER ANMELDUNG ENTSPRECHENDE DEFINITIONEN

Nährmedium – ein Medium zum Vermehren lebender Organismen, z. B. menschliche Zellen oder Mikroben, wie z. B. Bakterien, Viren etc., welches die Voraussetzungen für Wachstum bereitstellt. Es können

Substanzen zugefügt werden, um das Medium erstarren zu lassen oder das Wachstum zu verstärken oder zu unterdrücken oder für jeden anderen Zweck. Typischerweise ist das Nährmedium erstarrter Agar (Agarose), dem verschiedene Nährstoffe und Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden. Irgendeine andere Art Trägermedium, wie z. B. Gelatine, Acrylamid, Cellulose, Kohlenhydratgummis etc., kann ebenfalls verwendet werden.

Vollblut – Blut im natürlichen Zustand, das alle hilfreichen und schädlichen Elemente enthält, ob bekannt oder unbekannt, wie z. B. Gerinnungsfaktoren, Pathogene, Antikörper etc.

Replika – ein exaktes Modell eines Originals in allen wesentlichen Aspekten.

Mikropathologischer Abdruck – ein Nährmedium, das Blut eines Patienten enthält und alle Elemente einschließt, die von Natur aus im Blut dieser Person vorhanden sind, auf natürlichen menschlichen Standards gehalten, aseptisch und ein Versuchsmodell zum Studium bereitstellend; in der vorliegenden Erfindung wird eine mikropathologische Patientenreplika unter Verwendung intakten Patientenblutes gebildet, das als Surrogat für die verschiedenen Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Pathogene und anderen Elemente dient, die in dem gerade replizierten Patienten vorhanden sind.

Blutzusatzstoffe – Antikoagulanzen, Konservierungsmittel und andere Substanzen, die einem Patienten entnommenem Blut zugefügt werden, um dieses Blut zur späteren Analyse oder Behandlung stabil zu machen.

Antikoagulans – eine Substanz, die verhindert, dass Blut gerinnt, wie z. B. Heparin, Oxalat, Citrat, Ethylen-diaminessigsäure (EDTA) oder Natriumpolyanetholsulfonat (SPS).

Aseptisch – sterile Bedingungen, z. B. Bedingungen, bei denen keine Fremdorganismen, wie z. B. Bakterien, zugesetzt sind.

Probe – jegliche Substanzprobe von Körpergewebe außer Blut, z. B. Urin, Stuhl, Rachenabstrich, Sputum, Liquor cerebrospinalis, Eiter, Krebszellen etc.; zur Klarheit wird in dieser Patentanmeldung Blut von Probe besonders unterschieden.

Inokulum – Mikroben, die ausgehend von einer Probe oder Patientenblut vermehrt werden (d. h. die ursprünglich in der Probe oder dem Blut vorhanden waren), die unter Verwendung der gängigen Methoden der Mikrobiologie oder des Patientenreplikaverfahrens der vorliegenden Erfindung identifiziert und isoliert werden.

Pathogene – Mikroben wie z. B. Bakterien, Viren, Protozoen, Pilze, Hefepilze etc., die Krankheit verursachen.

Resistenz – die Fähigkeit eines Krankheitserregers, sich zu verändern, so dass er nicht mehr anfällig für (ein) spezielles Antibiotikum(-ka) oder ähnliches infektionshemmendes Mittel ist.

Gießplatte – ein Kulturgefäß, wo Agarkulturmedien (oder ähnliche erstarrungsfähige Medien) und Inoku-

lum vermischt worden sind, typischerweise bei 45°C oder darüber.

Mikrobe – ein mikroskopischer Organismus, allgemein pathogen im Kontext der vorliegenden Erfindung, einschließlich Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren.

AUFGABEN UND WESEN DER ERFINDUNG

[0018] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer verbesserten Art, Mikroben direkt aus dem Blut eines Patienten zu vermehren, mit oder ohne eine zusätzliche Probe, und dadurch zu bestimmen, ob eine Medikation, z. B. ein Antibiotikum, angezeigt ist, und wenn dies angezeigt ist, zu bestimmen, welches Antibiotikum(-ka) für einen bestimmten Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt mit größerer Geschwindigkeit und Empfindlichkeit wirksam sein wird als die gängige Verfahrenstechnik.

[0019] Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist das Testen von Arzneistoffen, Antibiotika etc., um die kleinste wirksame Dosis für einen bestimmten Patienten zu bestimmen, indem der spezifischen Chemie des bestimmten Patienten, wie sie durch das eigene Blut des Patienten symbolisiert ist, erlaubt wird, den Test zu beeinflussen oder Arzneistoffe, Antibiotika etc. zu testen, um durch Mitteln der Ergebnisse einer Vielzahl von Patienten eine Standarddosis zur allgemeinen Verwendung zu bestimmen.

[0020] Noch eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Vermehrung von Krebszellen und/oder weißen Blutkörperchen etc., wie sie durch die eigene individuelle Chemie des Patienten beeinflusst wird, indem Zellen aus einem Tumor oder Blut eines Patienten für vielfältige Zwecke eingesetzt werden. Beispielsweise können die Krebszellen durch Verwenden einer Patientenreplika zur Behandlung von Krebs verwendet werden, um das Ansprechen dieses Patienten auf die Behandlung zu bestimmen oder einen Impfstoff zu erzeugen; und diese und weitere Aufgaben werden gelöst durch ein geschichtetes Nährmedium, wo festes Nährmedium so gebildet wird, dass eine Diskontinuität zwischen den Schichten vorhanden ist. In Übereinstimmung mit der Diskontinuität wird ein Infusionszugang bereitgestellt, so dass eine frische, unverfälschte Substanzprobe von Patientenblut in die Diskontinuität infundiert werden kann, um eine dünne Schicht Blut zwischen den Schichten von Nährmedium zu bilden. Die dünne Blutschicht macht die Forderung nach einem gerinnungshemmenden Mittel überflüssig, weil sie eine Kultivierung im Blut beförderter Pathogene ohne Verwendung einer Nährlösung ohne Weiteres zulässt. Ferner können Antibiotika oder andere Wirkstoffproben auf der Oberfläche des Nährmediums über der Blutschicht platziert werden, so dass das Antibiotikum sich durch das Nährmedium ausbreiten und die

Empfindlichkeit der im Blut beförderten Pathogene enthüllen kann.

[0021] Andere Substanzproben von Pathogenen oder Geweben können auf der Oberfläche des Nährmediums platziert werden. Ein Verfahren zur Auffrischung einer Schicht mit einer periodischen Seruminfusion und dadurch Replizieren eines Abschnitts des lymphatischen Systems ist ebenfalls beschrieben. Das Resultat ist, dass Auswirkungen von im Blut des Patienten vorhandenen Wirkstoffen oder Wachstumsfaktoren beobachtet werden können und dadurch der eingeschlossenen Blutschicht/Wachstumsmedium/Serumschicht/Probe ermöglicht wird, als biologische Replika des Patienten zu wirken.

[0022] Die vorliegende Erfindung stillt das lange empfundene Verlangen, einen In-vitro-Labortest zu besitzen, der die Bedingungen in einem bestimmten Patienten exakt widerspiegelt. Dementsprechend liefert eine Antibiotikabestimmung unter Verwendung dieser Erfindung schneller mehr Informationen. Nicht nur dass Empfindlichkeit und Resistenz sichtbar sind, einige Mikroben haben doch tatsächlich gelernt, in Anwesenheit mancher Antibiotika gut zu gedeihen, wahrscheinlich weil das Antibiotikum andere harmlose Mikroben unterdrückt, die mit der übertragenen pathogenen Mikrobe konkurrieren. Dieser Effekt, der nur bei den durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten Mischkulturbedingungen zu sehen ist, setzt den Patienten einer ungeheuren Gefahr aus, weil die "Therapie" in Wirklichkeit das Pathogen begünstigt.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0023] Die Aufgaben und Merkmale der vorliegenden Erfindung, die für neuartig gehalten werden, sind in aller Einzelheit in den angehängten Ansprüchen dargelegt. In den folgenden Zeichnungen sind gleiche Strukturen durch gleiche Zeichen angedeutet.

[0024] [Fig. 1](#) zeigt eine Spritze mit Nadel, die dazu verwendet wird, Blut eines Patienten in das Nährmedium zu injizieren, und zeigt einen Tropfen des Blutes in das Medium eingebettet;

[0025] [Fig. 2](#) zeigt einen Rechen zum Aufbrechen der Oberfläche von Gelkulturmedien zum Einmischen von Blut, Probe oder einer anderen Substanz in die Nährmedien;

[0026] [Fig. 3](#) zeigt einen Hohlrechen, der an eine Bluttransportvorrichtung angeschlossen ist (wie z. B. die in [Fig. 8](#)–[Fig. 10](#) gezeigten) oder mit einer Punktionsspritze oder Spritze verbunden ist;

[0027] [Fig. 4](#) zeigt eine Draufsicht eines rechteckigen Kulturgefäßes mit Rundecken, das mit Mitteln zum Infundieren von Blut in die Schale ausgestattet ist;

[0028] [Fig. 5](#) zeigt eine Seitenansicht der Schale gemäß [Fig. 4](#) mit einem lose aufliegenden Oberteil ausgestattet;

[0029] [Fig. 6](#) veranschaulicht eine Draufsicht einer Schale mit geschichtetem Nährmedium, wobei ein Röhrchen Blut in die Schale einleitet, um es zwischen den Schichten davon zu verteilen;

[0030] [Fig. 7](#) ist eine Draufsicht einer Schale und zeigt eine Punktionsspritze beim Einspritzen von Blut in ein langgestrecktes Röhrchen, das mit einer Vielzahl von Löchern ausgeführt ist, um Blut zwischen die Nährmedienschichten zu leiten;

[0031] [Fig. 8](#) zeigt eine Vorrichtung für den Transport von Patientenblut zur Verwendung in dem geschichteten Nährmedium gemäß [Fig. 6](#);

[0032] [Fig. 9](#) zeigt eine Abwandlung der Vorrichtung gemäß [Fig. 8](#);

[0033] [Fig. 10](#) zeigt eine andere Vorrichtung zum Befördern von Patientenblut zur Verwendung in dem geschichteten Nährmedium gemäß [Fig. 6](#);

[0034] [Fig. 11](#) zeigt noch eine andere Bluttransportvorrichtung, die so gestaltet ist, dass sie direkt an die geschichteten Nährmedien der vorliegenden Erfindung anschließbar ist;

[0035] [Fig. 12](#) zeigt eine Beutel-in-Beutel-Vorrichtung zur Verwendung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung;

[0036] [Fig. 13](#) zeigt ein Gitter, das auf das geschichtete Kulturgefäß der vorliegenden Erfindung passend hergestellt und dazu gedacht ist, eine Vielzahl von antibiotikumgetränkten Scheiben oder andere Wirkstoffproben in gleichmäßigen Abständen auf der Mediumoberfläche zu platzieren;

[0037] [Fig. 14](#) zeigt den Gitterscheibenhalter gemäß [Fig. 13](#) in größerer Einzelheit;

[0038] [Fig. 15](#) ist eine Seitenansicht des Scheibenhalters gemäß [Fig. 14](#) und zeigt eine Dornspitze, die unter der Mitte jeder gehaltenen Scheibe in die Nährmedien hinein vorsteht, wodurch Blut innerhalb der Diskontinuität jede Antibiotikumprobe kontaktieren kann;

[0039] [Fig. 16](#) zeigt eine Nadel und Spritze mit Blut, die zum Platzieren eines Tropfens Blut auf einer Antibiotikumscheibe oder einer anderen Substanzprobe verwendet wird;

[0040] [Fig. 17](#) zeigt ein Gitter mit Kreuzelementen, die die Oberfläche eines geschichteten Nährmediums der vorliegenden Erfindung in Abschnitte einteilen;

len, um Zonen für die Wirkstoffprobenaufbringung auf der Oberfläche abzugrenzen;

[0041] [Fig. 18](#) zeigt ein Röhrchen mit Gummistopfen an beiden Enden zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung;

[0042] [Fig. 19](#) ist das Pendant zu der in [Fig. 10](#) gezeigten Vorrichtung, nur dass das zweifach zugestöpselte Blutentnahmeröhrchen gemäß [Fig. 18](#) verwendet ist;

[0043] [Fig. 20](#) zeigt eine Vorrichtung ähnlich der in [Fig. 11](#) gezeigten, mit Hinzufügung eines zweifach zugestöpselten Röhrchens und einer Vakuumröhrchen-Blutentnahmevorrichtung;

[0044] [Fig. 21](#) zeigt eine Vorrichtung ähnlich der in [Fig. 19](#) gezeigten, ohne Halteröhrchen;

[0045] [Fig. 22](#) zeigt ein biegsames Röhrchen für die Blutentnahme, mit einem einzigen Stopfen und einem fakultativen Ventil;

[0046] [Fig. 23](#) zeigt ein biegsames Blutentnahmeröhrchen ähnlich dem gemäß [Fig. 22](#), verbunden mit einem Blutverteilerrechen ähnlich demjenigen gemäß [Fig. 3](#);

[0047] [Fig. 24](#) zeigt einen Reif oder Doppelreif, dessen Boden mit einem Sieb bedeckt ist, so dass Nährmedium darauf geschüttet werden kann;

[0048] [Fig. 25](#) zeigt eine Querschnittansicht eines Kulturgefäßes, das einen Doppelreif wie in [Fig. 24](#) enthält, in das eine Schicht Nährmedium geschüttet worden ist;

[0049] [Fig. 26](#) zeigt einen Ring aus elastischem Material (d. h. einen O-Ring), der an eine Gitterschicht angeformt ist, um anstelle des Reifs gemäß [Fig. 24](#) verwendet zu werden;

[0050] [Fig. 27](#) zeigt ein Kulturgefäß, das mit einer Innennut zur Aufnahme des Ringes gemäß [Fig. 26](#) modifiziert ist;

[0051] [Fig. 28](#) zeigt ein Kulturgefäß, das mit einer Leiste um die Außenkanten des Bodens modifiziert ist, so dass Nährmedium bis zu der Leiste, aber nicht darüber hinaus geschüttet werden kann;

[0052] [Fig. 29](#) zeigt eine Schale mit einer Innennut, die von der zweiten Schicht Nährmedium besetzt ist, um das Durchsickern von Blut an den Innenseitenflächen der Schale nach oben zu verhindern;

[0053] [Fig. 30](#) zeigt eine Schale mit einer Innenauskrabung, die mit dem Boden verbunden ist, um das Durchsickern von Blut zu verhindern;

[0054] [Fig. 31](#) zeigt eine andere Ausführungsform der Schale gemäß [Fig. 30](#);

[0055] [Fig. 32](#) zeigt eine Draufsicht eines Labors in einem Beutel und zeigt ein geschichtetes Kulturgefäß, ein Prüfgitter und andere Bestandteile des Systems;

[0056] [Fig. 33](#) zeigt eine Vorrichtung zur leichten Einbringung von Frischblut-Substanzproben in eine Vielzahl von Schalen der aktuellen Erfindung;

[0057] [Fig. 34](#) zeigt einen Querschnitt eines versiegelten Kulturgefäßes der vorliegenden Erfindung, das ein Prüfgitter enthält, das ohne Öffnen der Schale mit dem Nährmedium in Kontakt gebracht werden kann;

[0058] [Fig. 35](#) zeigt eine Draufsicht eines Schalendeckels mit einer Vielzahl von Einspritzöffnungen, der die Injektion von Wirkstoffproben auf die Oberfläche der obersten Nährmediumschicht erlaubt; und

[0059] [Fig. 36](#) zeigt einen Querschnitt einer schalenartigen Vorrichtung der vorliegenden Erfindung, die zwei Deckel und eine Innennut zur Aufnahme eines Ringes aufweist, der zwei Membranschichten mit einer Einrichtung zum Infundieren von Flüssigkeit in den versiegelten Raum zwischen den Membranen festhält.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0060] Die folgende Beschreibung wird bereitgestellt, um jedem Fachmann auf diesem Gebiet die Durchführung und Verwendung der Erfindung zu ermöglichen und legt die Methoden dar, die von den Erfindern als am besten zur Ausführung ihrer Erfindung betrachtet werden. Verschiedene Modifikationen werden für den Fachmann jedoch ohne Weiteres sichtbar sein, weil die Hauptwesensmerkmale der vorliegenden Erfindung hierin speziell zur Bereitstellung eines verbesserten Kultivierungsverfahrens und zugehöriger Vorrichtungen definiert wurden, um ohne Weiteres Pathogene aus unverfälschtem Vollblut zwischen Schichten von festem Nährmedium zu kultivieren. Beispielsweise kann eine Beutel-in-Beutel-Vorrichtung zum Transportieren und Bearbeiten von Tumormproben für das Krebsforschungslabor verwendet werden, wo die geschichtete Vorrichtung dann dazu verwendet wird, Krebszellen eines Patienten mit den durch das Blut des Patienten angereicherten Medien zu vermehren und dadurch den mikropathologischen Abdruck eines Patienten bereitzustellen. In ähnlicher Weise können die Vorrichtungen zum Kultivieren oder Aktivieren der Leukozyten eines Patienten verwendet werden oder zum Transportieren von Patientenblut zu einer Forschungsstätte verwendet werden.

ERZEUGUNG EINER PATIENTENREPLIKA

[0061] Das Ausgangsverfahren, das hierin beschrieben wird, ist die Erzeugung eines Versuchsabdrucks eines Patienten durch Verwenden von frisch abgenommenem, unverfälschtem Vollblut des Patienten als einen Bestandteil eines Nährmediums und somit Bereitstellen sämtlicher Gerinnungsfaktoren, Mikroben, Antikörper, pH und nützlicher oder schädlicher Elemente, die tatsächlich in dem bestimmten Patienten vorhanden sind. Die Patientenreplika kann für vielfältige Zwecke verwendet werden, wie z. B. Vermehren von Krebszellen zur Erzeugung eines Impfstoffs gegen diesen Krebs oder zur Bestimmung anderer Informationen über den Krebs. Der Abdruck ist auch von Nutzen zum Vermehren von Mikroben in einer Probe von dem Patienten und Bestimmen der Empfindlichkeit der Mikroben gegenüber einem Heilmittel, wie z. B. ein Antibiotikum. Andere mögliche Verwendungen einer Patientenreplika sind die Diagnostizierung einer Krankheit, die Behandlung einer Krankheit, die Bestimmung des Stadiums einer Krankheit, die Bestimmung des Zustands eines Patienten während des Verlaufs einer Krankheit oder während des Therapieverlaufs etc.

[0062] Beispielsweise wird Vollblut von einem Patienten frisch abgenommen mit Körpertemperatur unverfälscht, z. B. ohne Additiv wie z. B. gerinnungshemmendes Mittel oder Konservierungsmittel etc. Nährmedien aseptisch zugefügt, bevor sich das Blut zersetzt. Dieses Gemisch wird dann bei Körpertemperatur, bevorzugt 35 bis 37°C inkubiert. Zudem kann eine Probe von dem Patienten verwendet werden oder nicht und das Gemisch periodisch mit dem Serum des Patienten aufgefrischt werden. Organismen, die in dieser natürlichen Mischung und Temperatur wachsen, sei es von Blut oder Probe, können dann mit beliebigen Mitteln für einen beliebigen Zweck untersucht werden. So kann bestimmt werden, dass ein Antibiotikum nicht wirksam sein wird. Alternativ kann die Wirksamkeit eines Antibiotikums in der einzigartigen Mischung biologischer Elemente eines individuellen Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmt werden. Dies vermeidet das nur zu alltägliche Problem, wo ein spezielles Antibiotikum gegen eine Reinkultur eines Krankheitserregers wirksam ist, aber bei Verabreichung an einen Patienten wegen einer gewissen Eigenheit der individuellen Chemie des Patienten unwirksam ist. Auch enthalten Patienten keine Reinkulturen. Das Ziel ist, die Wirkstoffempfindlichkeit vor dem Hintergrund der Chemie des Patienten und mit den Wechselwirkungen der ganzen Vielfalt gutartiger und schädlicher Mikroben zu untersuchen, die in dem Patienten vorhanden sein können.

[0063] Gemäß der gegenwärtigen Verfahrenstechnik bestimmen Laboranten bei der Untersuchung einer Probe auf Pathogene, welche Art Krankheitserre-

ger aus der Probe sich vermehrt hat und geben ihn dann an. Ärzte nehmen an, dass Wirkstoffe, die diese spezielle Art Krankheitserreger schon früher abgetötet haben, ihn wieder abtöten. Resistente Pathogene machen dieses System zunichte. Untersuchungen, bei denen so verfahren wird, dass eine Reinkultur von Pathogenen aus dem Inokulum isoliert und dann die Reinkultur auf ihre Wirkstoffempfindlichkeit getestet wird, brauchen mehr Zeit. Das hierin beschriebene Verfahren geht direkt zur Behandlung über, wobei der Krankheitserreger weder isoliert noch identifiziert wird, sondern nur identifiziert wird, was ihn abtötet. Das Verfahren befürwortet den Einsatz einer Mischkultur und stellt auf diese Weise eine neue Methode in der Mikrobiologie dar. Nichtsdestoweniger können Pathogene zu Forschungszwecken auch auf die herkömmliche Art und Weise identifiziert und auf ihre Empfindlichkeit getestet werden, indem sie aus einer Patientenreplika der vorliegenden Erfindung subkultiviert werden.

[0064] Wie oben erörtert, ist es hinlänglich bekannt, dass Vollblut des Patienten oft Pathogene enthält, die sich von einem Infektionsherd aus im Blut vermehren oder in das zirkulierende Blut geschwemmt werden können. In einem Versuch, diese Pathogene zu isolieren, wird Vollblut deshalb oft kultiviert. Ferner enthält Vollblut Unmengen irgendwelcher Wirkstoffe, die dem Patienten verabreicht werden sowie einen ganzen Wirt aus natürlichen Wachstumsfaktoren und anderen Substanzen, die das einzigartige biochemische Profil des Patienten ausmachen. In der Theorie sollten diese Faktoren zur Bestimmung der Existenz von Pathogenen und ihrer Wirkstoffempfindlichkeit nützlich sein. Herkömmliche Methoden zur Kultivierung von Pathogenen aus Blut bauen auf eine flüssige Nährlösungskultur. Dies erfordert die Zugabe von Antikoagulanzen zur Vermeidung von Klümpchenbildung in der Nährlösung. Da das Vollblut ferner in der Nährlösung verdünnt wird, können empfindliche Pathogene abgetötet oder unterdrückt werden. Der Einsatz von Konservierungsmitteln und Kühlung kann die Ergebnisse zusätzlich verdrehen. Auch gibt es keinen geeigneten Weg, dass natürliche im Vollblut vorhandene Patientenfaktoren genutzt werden können, um das Wachstum von Pathogenen aus einer Patientenprobe zu beeinflussen. Ein erstes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die Kultivierung von Pathogenen aus unverfälschtem Vollblut zu erlauben. Ein zweites Ziel ist es, in dem unverfälschten Vollblut vorhandene Faktoren auf die Kultivierung von Pathogenen aus einer Patientenprobe einwirken zu lassen. Ein drittes Ziel liegt in der Krebstherapie/-forschung, wo die Erfindung unter Verwendung der geschichteten Kulturgefäße zur Vermehrung von Krebszellen und/oder weißen Blutkörperchen verwendet werden kann.

[0065] Die einfachste Vorrichtung zum Erreichen des ersten Ziels ist ein Sammelgefäß, wie z. B. eine

Schale, in der frisch abgenommenes, unverfälschtes Vollblut mit einem Nährmedium mit oder ohne Additiv vermischt ist (nicht gezeigt). Die Nährmedien können von beliebiger Art sein, z. B. Pulver oder Körnchen zum Mischen mit einer wässrigen Lösung. Das resultierende Gemisch kann dann als Einzelschicht verwendet werden, oder das Gemisch kann in ein Sammelgefäß, wie z. B. eine Kulturschale, auf eine bereits eingegossene Nährmedienschicht geschüttet werden. Eine Patientenprobe kann auf die Oberseite der ersten Schicht, zwischen die erste und zweite Schicht oder in das Gemisch zugefügt werden oder nicht.

[0066] Ein Problem ist, dass Gelagar, das gebräuchlichste Nährmedium, dem Mischen entgegenwirkt, so dass es sehr schwierig ist, das Vollblut direkt in normales Medium zu mischen. Wenn der Agar durch Erwärmen geschmolzen wird, besteht erhebliche Gefahr, dass empfindliche Pathogene beschädigt oder abgetötet werden. Deshalb ist es notwendig, eine Art Instrument oder Vorrichtung zu haben, um das Mischen des Agar mit dem Medium zu unterstützen. Ein Beispiel eines derartigen Instruments ist eine Nadel-/Spritzenkombination, die dazu verwendet worden sein kann, dem Patienten das Blut tatsächlich abzunehmen. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, kann die Punktionsspritze **10** einfach kleine Tropfen Blut in die Oberfläche des Agar injizieren. In [Fig. 1](#) wird Blut **14** in einer Spritze **12** durch eine Nadel **16** in ein festes Nährmedium **18** injiziert, das in einer Schale **22** enthalten ist, wodurch Tropfen **24** von Blut abgesetzt werden, das dann mit derselben Nadel **16** in den Agar eingemischt werden kann. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass es aufgrund der Verteilung des Blutes in dem Medium möglich ist, auf Antikoagulanzen zu verzichten, von denen bekannt ist, dass sie das Wachstum von Pathogenen verändern und oft unterdrücken. Das heißt, das verteilte Blut ist nicht in der Lage, signifikante Klümpchen zu bilden (z. B. große Klümpchen, bei denen es eine Trennung zwischen Klümpchen und Serum gibt). Jedoch ist die ohne Weiteres auf diese Weise eingebrachte Gesamtblutmenge relativ klein. Andere Methoden sind notwendig, wenn größere Gesamtmengen Blut verwendet werden sollen. Im Klartext, wenn die gesuchten Pathogene in niedriger Konzentration vorhanden sind, sind die Chancen, das Pathogen zu finden, um so größer, je größer die verwendete Blutmenge ist.

[0067] [Fig. 2](#) zeigt einen Minirechen **27** mit einem Griff **26** und Zinken **28**, die das Gel aufbrechen und das durch ein beliebiges geeignetes Mittel eingebrachte Blut mischen. Der Rechen kann aus jedem Material hergestellt sein, das leicht zu sterilisieren ist. Jedoch sollten die Zinken **28** ausreichend stumpf sein, um ein versehentliches Durchstechen der Haut zu vermeiden. Zur Sicherheit sowie Wirtschaftlichkeit ist es klug, den Rechen **27** aus einer Art weichem Kunststoff/biegsamem Material wie Polyurethan zu

fertigen, obwohl andere Stoffe, wie z. B. Glas oder Metall, ebenfalls verwendet werden können. Ein anderes Beispiel ist ein Hohlrechen **32**, [Fig. 3](#), der zwei Funktionen kombiniert, d. h. Aufbrechen des Gels bei gleichzeitiger Verteilung des Blutes, das in das Gel eingemischt werden soll. Dieser Hohlrechen **32** kann durch ein Verbindungsstück **34** direkt an einem Ende des Griffs **26**, einer Nadel/Spritzenkombination, einer Spritze oder einem dünnen Röhrchen angebracht sein, wie in anderen Zeichnungen hierin gezeigt. Fakultativ kann ein Ventil verwendet werden, um den Durchfluss zu steuern. So wird das Blut durch den hohlen Griff **26** getrieben und fließt aus Öffnungen **36** im Querelement **38** und wird durch die stumpfen Zinken **28** vermischt. Dieser Rechen bietet nicht nur Einfachheit und Bequemlichkeit, sondern ist sicherer für Leute, die mit Blut umgehen, als Nadeln und die damit verbundene Gefahr von Nadelstichen.

[0068] Obwohl die gerade beschriebenen Rechen zur Verteilung von Blut in ein halbfestes Nährmedium hinein verwendet werden können, kann es sein, dass das Blut nicht gleichmäßig verteilt wird und noch die Möglichkeit von Klümpchenbildung besteht. Die bevorzugte Art, das unverfälschte Blut zu verteilen, besteht in der Verwendung eines geschichteten Kulturgefäßes, wie in [Fig. 4-Fig. 6](#) gezeigt. In [Fig. 4](#) ist eine Schale **22** mit oder ohne Deckel **23** mit einem Zugang **42** ausgeführt, um Blut durch eine oder mehr Seite(n) und zwischen Schichten von Nährmedien darin zu leiten. Eine rechteckige Schale mit runden Ecken wird bevorzugt, weil die Schalen effektiver zusammengepackt werden können und einen vergrößerten Oberflächenbereich für das Wachstum von Mikroben bieten, aber eine runde Standard-Petrischale oder jede andere Gestaltung mit oder ohne Runddecken geht genauso. Dieses Kulturgefäß kann in einer Reihe von unterschiedlichen Arten verwendet werden.

Beispiel #1: Verwendung eines geschichteten Kulturgefäßes

[0069] In [Fig. 5](#) wird ein härteres Nährmedium wie Agar, allgemein mit solchen Additiven, wie sie für das Wachstum von Pathogenen notwendig sind, in eine Schale **22** geschüttet und dann gekühlt, so dass daraus eine Gelschicht **44** wird. Dann wird eine zusätzliche Schicht Nährmedium auf die erste Schicht geschüttet, wodurch eine zweite Schicht Nährmedium **46** geschaffen wird, und auf den Gelzustand gekühlt. Auf diese Weise hergestellt, verbinden sich die zwei Schichten Nährmedium nicht und erzeugen dadurch einen potentiellen Raum bzw. eine potentielle Diskontinuität **47** zwischen sich. Die jetzt zwei Schichten Nährmedium enthaltende Schale **22** kann gelagert werden, bis sie benötigt wird. Wenn die unverfälschte Blutprobe durch den Zugang **42** injiziert wird, breitet sie sich zu einer ebenen Blutschicht aus, die zwischen die zwei Schichten **44**, **46** von Medien ge-

zwängt wird. Obwohl Mikroklümpchen auftreten können, weil die Blutschicht dünn und eben ist, bilden sich keine großen Klümpchen. Wegen des engen Kontaktes mit den Nährmedien wird irgendwelchen Mikroben im Blut ein ausgezeichnetes Milieu zur Verfügung gestellt, in dem sie sich vermehren können, während eine Oberseite **48** blutfrei bleibt. Kolonien von Pathogenen sind in der dünnen Blutschicht ganz leicht zu beobachten. Ferner diffundieren Wachstumsfaktoren oder Inhibitoren etc. in der Blutprobe des Patienten in die Nährmedien und können das Wachstum von Organismen beeinflussen, die in Kontakt mit den Medien platziert sind. Aus diesem Grund ist die zweite Schicht **46** vorzugsweise ganz dünn, um die Geschwindigkeit dieser Diffusion zu maximieren. Obwohl auf die obere Schicht **46** als "geschüttet" Bezug genommen wurde, könnte sie auch als Membran oder Plasmagitterschicht, wie sie gegenwärtig zur Behandlung von Verbrennungen verwendet wird, aufgesprüht oder aufgelegt werden. Die geschichtete Struktur lässt die Oberseite **48** blutfrei bleiben, so dass die Oberseite **48** der Nährmedien mit einer Probe des Patienten, Sputum etc., bestrichen werden kann, ohne dass die Gefahr besteht, dass irgendwelche dort wachsenden Mikroben aus dem Patientenblut stammen. Eine blutfreie Oberfläche kann auch dadurch erhalten werden, dass eine Schale auf den Kopf gestellt wird, um das Nährmedium freizugeben, was den unberührten Boden des Mediums als blutfreie Oberfläche bereitstellt. Alternativ kann keine Patientenprobe verwendet werden und die Analyse sich nur auf das Blut des Patienten konzentrieren. [Fig. 6](#) zeigt die geschichtete Schale **22**, wobei der Injektionszugang **42** mit einem kurzen Verteilungsröhrchen **43** ausgestattet ist, um das Blut **14** zwischen den Schichten weiterzuverteilen oder periodisch frisches Serum zu verteilen.

[0070] Um den Einsatz des geschichteten Kulturgefäßes kurz zu wiederholen: dem Patienten wird Blut abgenommen und ohne Additive sofort aseptisch mit beliebigen Mitteln zu dem an der Schale **22** angeordneten Infusionszugang **42** übertragen. Der Infusionszugang **22** kann mit einem Ventil ausgestattet sein, um einen Rückfluss der Blutprobe zu verhindern, oder nicht. Beispiele von Vorrichtungen, die zur Blutübertragung verwendet werden können, sind in [Fig. 7–Fig. 11](#) gezeigt. In [Fig. 7](#) ist der Injektionszugang **42** mit einem relativ langen Verteilungsröhrchen **43** ausgestattet (verglichen mit [Fig. 6](#)), das eine Vielzahl von Verteilungslöchern **46** zum Ausbreiten des Blutes **14** zwischen den Schichten aufweist. Das Blut des Patienten wird durch eine solche Vorrichtung durch eine oder mehr Seite(n) davon in die Schale **22** übertragen und in den potentiellen Raum **47** infundiert, der aus einer Diskontinuität zwischen den Schichten von Nährmedien darin gebildet ist und so die Schichten trennt. Die geschichteten Medien können vorab in einem Inkubator bei Körpertemperatur gelagert werden, so dass empfindliche Pathogene

keinen Temperaturschock davontragen, wenn eine Blutprobe in die Schale eingebracht wird. Das Ergebnis ist eine Schicht aus Vollblut mit Körpertemperatur zwischen zwei Schichten Kulturmedium, mit einer auf der blutfreien Oberfläche **48** der oberen Schicht **46** platzierten Probe oder ohne. Es ist wichtig, dass Patientenblut nicht entlang der Seitenwände der Schale entweicht und auf diese Weise die Oberseite **48** erreicht. Dieses Entweichen kann durch spezielle, nachstehend erörterte Strukturen oder den Einsatz von Mediumformeln oder Anschwemmfiltrationen auf der Schale verhindert werden, welche die Anbindung der Nährmedien an die Schale verbessern. Wie für den Fachmann wohl selbstverständlich ist, sollte die Schale **22** mit einem Deckel **23** verschlossen sein, um die Sterilität zu erhalten. Vorzugsweise ist der Deckel **23** optisch klar, um die Beobachtung des Krankheitserregerwachstums zuzulassen. Es ist von erheblichem Vorteil, den Deckel **23** mit einer Dichtung, einem O-Ring, Klebstoff oder anderen Befestigungsmitteln an seinem Platz zu "verriegeln". Dies verhindert unabsichtliches Öffnen der Schale **22** und ermöglicht ferner die Luftdichtigkeit der Vorrichtung hinsichtlich der Kultivierung anaerober Organismen. Zur aeroben Kultur wird in dem Deckel ein Filter installiert, der Luft durchlässt, nicht aber Mikroben. Ferner kann die Schale **22** ziemlich groß ausgeführt sein, um eine relativ große Blutprobe entgegenzunehmen und mehrere Untersuchungen gleichzeitig zu gestatten, wie bei einer Forschungseinrichtung. Die Schale kann auch einen Deckel aufweisen, [Fig. 35](#), mit einer Vielzahl von Einspritzöffnungen, die eine manuelle oder automatisierte Applikation von Wirkstoffen zu Prüfzwecken erleichtern.

[0071] Die resultierende Schale mit Blutschicht/Gemisch wird bei Körpertemperatur inkubiert, ca. 35–37°C, bei welcher Temperatur einige der Blutfaktoren in beide Nährmedienschichten diffundieren. Vermehrungsfähige Pathogene, egal ob aus der Probe oder dem Blut, vermehren sich dann auf oder in dieser Blut/Nährmedium-Mischung. Die Antibiotikaempfindlichkeit kann direkt durch Platzieren von Antibiotikaproben auf der Oberfläche **48** getestet werden, wodurch ein Antibiotikaempfindlichkeitstest an einem Abdruck des aktuellen Patienten entweder in den zwei Standardschritten Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung oder in einem einzigen Schritt unter Verwendung einer Mischkultur bereitgestellt wird. Ferner kann periodisch Serum infundiert werden. Das System wird als Abdruck angesehen, weil es Wachstumsfaktoren und Inhibitoren aus dem Blut des Patienten enthält, die auf den einzigartigen biochemischen Status dieses bestimmten Patienten hindeuten.

[0072] In [Fig. 8](#) wird ein typisches Vakuumröhrchen **53** gefüllt mit Blut **14** verwendet, um frisch abgenommenes Blut in das geschichtete Kulturgefäß **22** zu verbringen. Ein biegsames Abfüllröhrchen **59** ist mit

dem Infusionszugang **42** und dem Blutröhrchen **53** mittels einer Nadel **56** verbunden, die durch den Stopfen (Serumkappe) **54** des Blutröhrchens **53** eingeführt wird. Eine Spritze **12** mit einer angebrachten Nadel **16** wird zum Injizieren von Luft **13** in das auf dem Kopf stehende Blutröhrchen **53** verwendet, wodurch das Blut **14** durch das Abfüllröhrchen **59** und zwischen die Schichten von Nährmedien in der Schale **22** getrieben wird. [Fig. 9](#) zeigt eine im Wesentlichen ähnliche Anordnung, außer dass ein spezielles Halteröhrchen **58** verwendet wird, das mit Nadeln **16** und **56** (und fakultativ dem Abfüllröhrchen **59**) fertig bestückt ist. In dieser Anordnung wird die Spritze (und das Abfüllröhrchen **59**, falls nicht bereits angebracht) mit dem Halteröhrchen **58** verbunden und das Blutröhrchen **53** dann in das Halteröhrchen **58** eingeführt und auf die Nadeln **16**, **56** heruntergedrückt, so dass sie den Stopfen **54** durchstechen. Diese Anordnung macht es unmöglich, dass sich das Personal versehentlich selbst mit den Nadeln sticht, da die Nadeln von dem Halteröhrchen **58** vollständig umschlossen sind. [Fig. 10](#) zeigt eine ähnliche Anordnung, wo das Abfüllröhrchen **59** mit einer stumpfen Nadel **60** ausgestattet ist, die ideal zur Injektion von Blut durch den Infusionszugang **42** ist. Die stumpfe Nadel **60** ist nicht in der Lage, einen Nadelstich zu verursachen (d. h. die menschliche Haut zu durchdringen), so dass sie im Gebrauch sicher ist. [Fig. 11](#) zeigt eine spezielle Spritze/Halteröhrchen-Kombination **57**, die mit einer stumpfen rechtwinkligen Nadel **62** ausgestattet ist, die zur Einführung in den Infusionszugang **42** ausgelegt ist.

[0073] Es gibt viele mögliche Abwandlungen. Die zweite Schicht Nährmedium kann aus einem anderen Material hergestellt sein als die erste Schicht. Die zwei Schichten können unterschiedliche Arten von Wachstumsmedien sein, von denen die untere Schicht **44** Bestandteile enthält, die insbesondere wachstumsfördernd für im Blut beförderte Pathogene sind, während die obere Schicht **46** Nährstoffe enthält, die wachstumsfördernd für in der Probe des Patienten vermutete Pathogene sind, die anschließend auf der Oberseite **48** platziert wird. Um das Separieren von Schichten oder Adhäsion an den Seiten der Schale zu fördern, kann der Anteil an Gelbildner (z. B. Agar) an den Nährmedien vergrößert und/oder andere Additive verwendet werden. Auch Membranen können verwendet werden. Doppelmembranen in einer "Schale" mit zwei Deckeln, [Fig. 36](#), ermöglichen die Infusion von Blut zwischen die Membranen und beide Außenflächen der Membranen, die für die Aufbringung einer Probe oder von Krebszellen verfügbar sind, und die Auffrischung der Kultur mit Serum auf der anderen Oberfläche oder einen anderen Zweck.

[0074] Das Inokulum kann auf der Oberseite platziert werden. Periodisch kann frisches Serum zur Auffrischung der Oberfläche oder des in die Diskontinuität infundierten Zellmaterials zugefügt werden.

Dann können verschiedene Chemikalien oder andere Substanzen für einen beliebigen Zweck eingebracht werden, wie z. B. Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung, wie es auf diesem Fachgebiet hinlänglich bekannt und in anderen Experimenten hierin beschrieben ist. Wie auf diesem Fachgebiet hinlänglich bekannt ist, können Untersuchungen dieser Art automatisiert sein.

Beispiel #2: Verfahren zur Herstellung nicht anhaftender Schichten

[0075] Wenn man, wie zuvor erläutert, eine erste Schicht geschmolzenes Medium (z. B. Agar) einschüttet und gelieren lässt, wird eine anschließend auf die Oberseite dieser Schicht geschüttete zweite Schicht i. A. nicht daran anhaften. Es gibt jedoch mehrere Strategien, die Nichtadhäsion der Schichten sicherzustellen; das Folgende ist eine Beschreibung eines Weges zur Herstellung eines funktionierenden Zweischicht-Kulturgefäßes der vorliegenden Erfindung. Der erste Schritt ist, in die Seite einer 150-mm-Kunststoff-Petrischale ein Loch zu bohren, das als Eingussöffnung fungiert. Dieses Loch wird dann mit einem Gummiseptumteil oder Gummistopfen von geeigneter Größe zugestöpselt. 60 ml Mueller-Hinton (oder anderes geeignetes Nährstoffmedium) werden unter sterilen Bedingungen in die Schale geschüttet und gelieren gelassen.

[0076] Als Nächstes (siehe [Fig. 24](#)) wird ein eng sitzender Doppelreif **116** beinahe wie ein Stickrahmen so ausgeführt, dass er eng in die modifizierte Schale passt. Eine Methode, jeden der zwei Reife zu formen, ist die Verbindung der Enden eines Polycarbonatstreifens von geeigneter Größe mit einem Lösungsmittelzement wie z. B. PS Weld-On 3. Eine Seite der Reife kann so eingekerbt sein, dass sie über den Infusionszugang passt (nicht gezeigt). Formaldehydfreies Nylongewebe (Siebfeinheit: $\frac{1}{8}$ Zoll) wird straff in einen großen Stickrahmen gespannt. Das gespannte Netzgewebe wird dann zwischen den oben beschriebenen Doppelreifen festgehalten und eine Rasierklinge oder ähnliches Werkzeug verwendet, um den Doppelreif mit seinem eingeschlossenen Netzgewebe zurechtzuschneiden, so dass sich die in [Fig. 24](#) gezeigte Struktur ergibt. Die Reife **116** und das umschlossene Netzgewebe **114** werden durch allgemein benutzte Verfahren wie Radiation oder Ethylenoxid sterilisiert. Die Reife werden mit der Netzgewebeseite nach unten in einer sterilen Petrischale von geeigneter Größe platziert und ungefähr 45 ml steriler Mueller-Hinton-Agar (bei ca. 48°C) in die Reife hineingeschüttet und härten gelassen. Dann wird die eine Agarschicht einschließende Reifanordnung oben auf die Agarschicht in der ersten Schale gesetzt (wobei die Nut die Eingussöffnung aufnimmt).

[0077] Wie in [Fig. 25](#) gezeigt, stellt dies ein Zwei-

schicht-Kulturgefäß **22** bereit, bei dem die zwei Schichten **44**, **46** körperlich getrennt sind und so eine perfekte Diskontinuität für die Injektion von unverfälschtem Patientenblut liefern. Für diesen Zweck kann eine breite Vielfalt unterschiedlicher Siebfeinheiten, Siebe, Membranen oder Netzgewebe verwendet werden. Diese Stoffe stellen im Wesentlichen eine Diskontinuität zwischen den Mediensichten bereit und wirken dabei als Strukturverstärkung (wie die Armierung in Beton) zur Stabilisierung der oberen Mediumschicht. Die Blutinjektion kann durch Einführen einer Nadel von $19\text{ g} \times \frac{7}{8}"$ durch die Eingussöffnung ganz einfach durchgeführt werden; die auf diese Weise vorbereitete 150-mm-Schale nimmt dann wenigstens 3 ml Blut auf. Im Anschluss an die Injektion kann das Kulturgefäß bei Körpertemperatur inkubiert werden (ungefähr 37°C). Die Schalen können mit einem sauerstoffabsorbierenden Stoff in einem anaeroben Inkubator oder in einem Plastikbeutel platziert werden, um das Wachstum anaerober Organismen zu erleichtern. Nach geeigneter Inkubation (z. B. 24 Std.) werden die Schalen auf Krankheitserregewachstum untersucht. Für die Antibiotikaempfindlichkeitsuntersuchung können Kolonien isoliert, auf eine andere Schale übertragen und dann "Kirby Bower"-Scheiben (die ein Antibiotikum enthalten) auf den obersten Flächen des Mediums platziert und weitere 24 Std. inkubiert werden. Die Antibiotikascheiben können zu Beginn der Inkubation platziert werden und dadurch das Gesamtverfahren erheblich verkürzen. Dies ist insbesondere wirksam, wenn es eine große Anzahl im Blut beförderter Pathogene gibt, wie bei Sepsis.

[0078] Obwohl eine Reihe unterschiedlicher Netzgewebe für dieses Verfahren geeignet ist, werden die von Tetko hergestellten Präzisionssiebe besonders bevorzugt. Dieses Gewebe weist äußerst präzise Öffnungen mit einem großen Prozentsatz von offenen Flächen auf (d. h. die Stränge, die das Sieb bilden, sind sehr dünn). Beispielsweise enthält ein bevorzugtes Gewebe 52% offene Fläche bei einer Porengröße von $105\text{ }\mu\text{m}$. Das Kulturgefäß kann ganz leicht zusammengesetzt werden, so dass der Infusionszugang die Blutprobe an der Unterseite des Siebes verteilt. Durch Auswählen viel kleinerer Porengrößen ist es möglich, die Blutzellen auf die Unterseite des Siebes zu beschränken, während Serum und Plättchen frei durch die Sieboberseite hindurch passieren können. Es ist ebenfalls möglich, die zwei diskontinuierlichen Mediensichten zu gießen, indem eine entsprechend bemessene Gewebescheibe oben auf einer abgebundenen ersten Schicht platziert wird, einige Tropfen Pufferlösung zugegeben werden, um die Sieböffnungen mit Fluid zu füllen, und dann eine zweite Mediumschicht auf die oberste Fläche des Gewebesiebes geschüttet wird. Dies macht den Doppelreif überflüssig, erfordert aber erhebliche Sorgfalt, um zu vermeiden, dass die Gewebescheibe frei schwimmt.

[0079] Wie oben erwähnt, ist es ein signifikantes Ziel der vorliegenden Vorrichtung zu verhindern, dass Blut durch Durchsickern entlang der Schalenwand die Oberseite **48** erreicht. Die Reife verhindern das Durchsickern von Blut. Es ist auch möglich, einen O-Ring oder eine ähnliche Dichtung zu verwenden, um das Durchsickern von Blut zu verhindern. Zu diesem Zweck kann die Schale mit einer Nut zur Lagerung des O-Rings versehen sein. Vorzugsweise ist der O-Ring **112** an den Außenrand einer Gewebescheibe **114** angeformt (siehe [Fig. 26](#), [Fig. 27](#)). Der O-Ring wirkt wie die Reife, um das Gewebe straff zu halten und verhindert das Entweichen von Blut die Schalenwände hinauf, solange das Blut entlang der Unterseite des Gewebes infundiert wird. Der O-Ring kann einen Draht oder Kunststoffreif umschließen, um weiter sicherzustellen, dass das Gewebe ausreichend straff gehalten wird. Andere Gewebe (z. B. Faserservies) oder sogar semidurchlässige Membranen können zur Teilung der zwei Kulturschichten verwendet werden. Mit einer semidurchlässigen Membran sind die Blutzellen und viele der Pathogene nicht in der Lage, zum Zeitpunkt der Infusion durch die Membran zu dringen. Die Pathogene durchdringen während der Vermehrung beide Schichten, aber ein Entweichen zur obersten Fläche zum Zeitpunkt der Infusion muss vermieden werden, weil dies eine auf der obersten Fläche platzierte Probe beeinträchtigt. Wie erwähnt, kann eine Membrandoppelschicht durch einen O-Ring verbunden sein, der an einer Innennut einer Schale befestigt sein kann. Diese Vorrichtung ist insbesondere bei einer "Schale" mit zwei Deckeln von Nutzen, [Fig. 36](#), worin ein Zugang zu den Außenflächen beider Seiten der Doppelmembran verfügbar ist. Wenn eine derartige Membran Nährmedien enthält, ist kein festes Nährmedium notwendig.

[0080] Der wesentliche Punkt ist, dass zwischen den zwei Mediensichten eine Diskontinuität zur Aufnahme der Blutinjektion ausgebildet ist und dass eine gewisse Struktur enthalten ist, um das Durchsickern von Blut entlang der senkrechten Wände der Schale zu verhindern. [Fig. 28](#) zeigt eine Schale **22** mit einer Randleiste **122** am Boden. Durch Gießen der Bodenschicht des Nährmediums **44** genau bis zur Oberkante der Leiste **122** überzieht die obere Mediumschicht **46** die Leiste und verhindert dadurch die Leckage von Blut die inneren Seitenwände der Schale **22** hinauf. [Fig. 29](#), [Fig. 30](#) und [Fig. 31](#) zeigen andere Strukturen zum Verhindern von Leckage. [Fig. 30](#) und [Fig. 31](#) zeigen Randvorsprünge **128**, **129**, die wie die Leiste **122** wirken, mit dem zusätzlichen Merkmal, dass ein Teil **46'** der oberen Mediumschicht **46** sich tatsächlich hinter den Rändern der unteren Schicht **44** "kräuselt". In [Fig. 29](#) ist eine Umfangsnut **124** mit Medium der oberen Schicht **46** gefüllt, wodurch eine seitliche Leckage verhindert wird.

[0081] Die Schichten sind als gegossenes Agarmedium beschrieben worden. Es gibt jedoch eine Reihe

von Technologien zum Züchten von Mikroorganismen auf verschiedenen anderen Nährstoffsubstraten; oft Karten aus einem klaren oder durchsichtigen kunststoffartigen Material (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5,232,838 von Nelson et al.). Diese Medien können dehydratisiert sein, was die Zufuhr von Wasser erfordert, oder hydratisiert und zweckgerecht sein. Die diskontinuierlichen Schichten der vorliegenden Erfindung können auch durch Stapeln von Scheiben dieser oder ähnlicher Nährmedien erstellt werden.

Beispiel #4: Behältnis in einem Behältnis. z. B. Beutel-in-Beutel

[0082] Eine Schicht aus Nährmedien wird in eine Schale geschüttet und gelagert. Wie in [Fig. 12](#) gezeigt, ist ein Beutel in einem Beutel **91** so ausgeführt, dass ein Außenbeutel **92** eine wässrige Lösung enthält, z. B. isotope Kochsalzlösung oder steriles Wasser etc. mit oder ohne andere Additive. Ein Innenbeutel **94** enthält trockene Nährmedien, z. B. Pulver, Körnchen etc. mit oder ohne andere Additive. Bei Bedarf können die Beutel auf Raumtemperatur oder bevorzugt 35–37°C, aber nicht über 40,5°C gebracht werden. Das frisch abgenommene und unverfälschte Vollblut eines Patienten wird von einer mit Blut gefüllten Spritze oder einer beliebigen der hierin dargestellten und beschriebenen verwandten Vorrichtungen durch Injektion durch einen Infusionszugang **42** hindurch der wässrigen Lösung in dem Außenbeutel zugefügt. Dann werden das Blut und die wässrige Lösung vermischt, woraufhin der Innenbeutel gesprengt wird und das Pulver in den Außenbeutel freisetzt, das dann mit der wässrigen Blutlösung darin vermischt wird. Es können Mehrfach-Innenbeutel vorgesehen sein, die jeweils unterschiedliche Substanzen beinhalten, so dass unterschiedliche Stoffe zu unterschiedlichen Zeiten nach Bedarf in die Lösung freigesetzt werden können.

[0083] Das jetzt flüssige Blut/Nährmedien-Gemisch wird ausgequetscht oder auf andere Weise dazu gebracht, durch eine Auslassöffnung **96** in ein Sammelgefäß oder auf die Oberfläche der ersten Nährmedienschicht in einem konventionellen Kulturgefäß zu fließen. Das Blut/Nährmedien-Gemisch geliert dann und bildet eine zweite Schicht ähnlich derjenigen im Experiment #2 oben. Alternativ kann das Gemisch zwischen zwei Schichten von Nährmedien infundiert werden, wie im Experiment #1 oben beschrieben. Dies erlaubt das Einschließen jeglicher im Blut beförderter Pathogene in einem speziellen Nährmedium, was zur Kultivierung einiger "wählerischer" Mikroben von Nutzen sein kann. Eine Patientenprobe kann zur ersten Nährmedienschicht, zum Inhalt des Beutels oder zur Oberfläche der zweiten Schicht hinzugefügt werden oder nicht. Dann wird die Vorrichtung für aerobe oder anaerobe (z. B. mit Stickstoff geklärte) Inkubation eingerichtet, wie oben beschrieben.

[0084] Viele andere Abwandlungen sind möglich. Im Innenbeutel können steriles Gelatinepulver und Additive statt pulverisierter Nährmedien verwendet werden. Zur Durchführung dieses Verfahrens kann Nährmediengranulat oder steriles Gelatinegranulat verwendet werden. Alternativ können Schaumbildner verwendet werden, um einen halbfesten Schaum als Nährmedium zu erzeugen. Der Beutel kann so ausgeführt sein, dass die Gefahr von Nadelstichen beim Personal bei der Übertragung von Blut in den Beutel vermieden wird (z. B. kann der Infusionszugang **42** mit einem ringförmigen Schutz umgeben sein, um ein versehentliches Durchstoßen der intakten Vorrichtung mit der Nadel zu verhindern). Ferner kann die Beutel-in-Beutel-Vorrichtung als Transportvorrichtung für Patientenblut verwendet werden. Zu diesem Zweck kann mehr Flüssigkeit hinzugefügt werden, um die Medien davon abzuhalten, in dem Beutel zu gelieren, was die Übertragung auf die zuvor beschriebene geschichtete Vorrichtung bei Ankunft im Labor erleichtert. Andererseits können flüssige Medien verwendet werden, die nicht gelieren. Mit dem Beutel kann eine Probe geschickt werden, um später in der geschichteten Kulturvorrichtung verwendet zu werden. Auf diese Weise können natürliche Temperaturbedingungen, 35–37°C, ohne Einsatz von Antikoagulanzen oder Konservierungsmittel aufrechterhalten werden.

[0085] Der Beutel-im-Beutel kann bei der Krebsdiagnose, Behandlung und Forschung für unterschiedliche Zwecke verwendet werden, z. B. als Transportvorrichtung für einen chirurgisch exziierten Tumor oder Teil des Tumors. Der Beutel kann Gewebekulturbedien, Antibiotika, Wasser oder Kochsalzlösung etc. enthalten. Ein Tumor kann mit einem Skalpell in Stücke geschnitten und dann ein Gewebezerkleinerer verwendet werden, um die Tumorstücke auf eine Größe weiter zu verkleinern, die es erlaubt, Tumorgewebe durch einen Infusionszugang in den Beutel hineinzuinjizieren. Die weitere Präparation der Tumorzellen kann in dem Beutel auf dem Weg zum Krebslabor durch Zufügen eines Enzyms wie Collagenase zum Separieren der Krebszellen vom Stützgewebe oder durch Verwendung anderer Additive durchgeführt werden. Durch Zufügen von Blut des Patienten, Wachstumsmedien etc. in den Beutel, periodisches Auffrischen des Beutels mit dem Serum des Patienten nach Bedarf und Halten der Temperatur auf 35–37°C können die natürlichen Bedingungen des Patientenreplikaverfahrens erreicht und dadurch ein maximales Überleben und Wachstum von Krebszellen für spätere Laborbestimmungen erleichtert werden.

[0086] Zwei Beutel-im-Beutel können ebenfalls verwendet werden, einer für zwischen die Nährmedienschichten zu infundierendes Patientenblut und ein zweiter Beutel, der die Tumorzellen enthält, die dann auf der blutfreien obersten Schicht **48** platziert oder

zwischen die Schichten infundiert werden, abhängig vom Tumortyp etc. Ein zusätzlicher Beutel kann zum Transport separierter weißer Blutkörperchen verwendet werden, die beispielsweise mit Interleukin II aktiviert werden sollen, oder für andere Diagnose- oder Behandlungszwecke. Wieder kann der Beutel abhängig von der gegebenen Anwendung Mehrfachkammern und/oder Mehrfach-Innenbeutel aufweisen.

[0087] Der/die Beutel sollten so verpackt sein, dass sie auf 35–37°C gehalten werden, und durch einen Über-Nacht-Dienst zu einem beliebigen Krebslabor im Land transportiert werden, wo sie in einem Zustand ankommen, der die Zellen und Chemie des Patienten überaus genau repliziert, und eventuell teilweise zur Analyse vorbereitet (z. B. durch Enzymbehandlung), was einen Labortag einspart und den Beginn der spezifischen Behandlung einen Tag früher ermöglicht.

[0088] Nach Ankunft im Labor können die separierten Krebszellen auf die oberste Nährmedienschicht in einer geschichteten Schale infundiert werden, wobei das Blut des Patienten zwischen Nährmedienschichten der Schale infundiert/injiziert wird, wodurch ein mikropathologischer Abdruck eines Patienten erstellt wird. Alternativ kann die Krebszellen/Blut/Nährmedien/Wasser-Kombination zwischen Nährmedienschichten in der Schale infundiert werden und die Schale in verschiedenen Ausführungsformen verwendet werden, um Krebszellen mit Chemotherapeutika zu testen, die richtige Dosis des/der wirksamsten Mittels zu bestimmen oder weiße Blutkörperchen des Patienten (T-Zellen oder B-Zellen) zu züchten, weiße Blutkörperchen mit Additiven zu behandeln, wie z. B. Aktivatoren (beispielsweise Interleukin II), einen Impfstoff zu erzeugen oder für irgendeinen anderen Zweck. Abhängig vom speziellen Ziel kann die Diskontinuität zwischen Schichten oder die Oberfläche der Nährmedien verwendet werden. Zum Auffrischen der Krebszellen mit der einzigartigen Chemie des Patienten und Nährstoffen kann periodisch frisches Blut abgenommen, Serum separiert und oben auf die wachsenden Krebszellen, zwischen die Schichten, in eine Nährlösung etc. infundiert werden. Patientenreplikabedingungen ohne schädliche Additive und die Aufrechterhaltung einer Temperatur zwischen 35–37°C werden empfohlen.

[0089] Jedes Behältnis in einem Behältnis kann zur Durchführung dieses Verfahrens verwendet werden, wie z. B. ein Röhrchen in einem Röhrchen oder eine Box in einer Box oder eine beliebige Kombination separater Abteilungen, die das Mischen der einzelnen Elemente auf Wunsch erlauben. Beutel werden bevorzugt, weil ihre Elastizität das Mischen der Nährmedien und der Blutprobe erleichtern. Trockenmittel, Desikkantien, können dem Innenbeutel (Behältnis) ggf. zugefügt werden, aber solche Austrocknungsmittel sind in einem separaten wasserdampfdurchlässigen,

aber flüssigkeitsundurchlässigen Beutel (Behältnis) abgeschirmt und sicher eingeschlossen, wodurch gewährleistet wird, dass keinerlei Austrocknungsmittel in das Blutgemisch freigesetzt wird, wenn das Trockenpulver oder Körnchen freigesetzt werden.

[0090] Es gibt viele Orte auf der Welt, wo unsaubere Lebensbedingungen Teil der Ursache für Epidemien sind. Unter solchen Bedingungen Pathogene zu züchten und ein heilendes Antibiotikum zu bestimmen, würde ein modernes Labor und sehr gut ausgebildetes Personal erfordern, und das ist dort selten verfügbar. Selbst wenn es woanders verfügbar wäre, verbietet die Quarantäne oft ein Hinausschicken der Patientenproben. Und wenn sie hinausgeschickt werden, sind die Substanzproben gekühlt, konserviert etc., nicht in ihrem natürlichen Zustand. Patientenreplikaverfahren und -Vorrichtungen können als "Koffeinelabor" angesehen werden, ein ganz eigenständiges System, leicht transportabel, preiswert, das die Bestimmung der Ursache/Heilung einer ansteckenden Krankheit selbst dort ermöglicht, wo die Luft nicht sauber ist, ob im Herzen von Afrika, einem Labor in den Vereinigten Staaten oder einer Arztpraxis. Wie in [Fig. 32](#) gezeigt, ist ein geschichtetes Kulturgefäß **22** der vorliegenden Erfindung im Innern eines sterilen "Taschenlabors" **102** zusammen mit einer Reihe von sterilen Einweginstrumenten **104** gezeigt. Der Laborbeutel **102** ist versiegelt und steril und mit einem Injektionszugang **42** ausgestattet, durch den eine Spritzennadel eingeführt werden kann, beispielsweise um Blut in die geschichtete Schale **22** zu injizieren oder eine Probe vermischt mit sterilem Wasser oder flüssigem Medium zu injizieren. Zur Erleichterung der Handhabung der Schale **22** oder der Instrumente **104** kann der Laborbeutel **102** mit einem eingeförmten Daumen- und Fingerteil **106** ausgestattet sein. Der Laborbeutel wird zum aeroben Gebrauch mit einem Mikrobenfilter belüftet und zum anaeroben Gebrauch versiegelt, fakultativ unter Zugabe von Stickstoff.

Beispiel #5: Zweifach zugestöpseltes Röhrchen

[0091] Durch die Standard-Venenpunktion unter Verwendung eines Vakuum enthaltenden Röhrchens kann Blut in ein zweifach zugestöpseltes Röhrchen eingezogen werden, wie in [Fig. 18](#) gezeigt, und dann mit einer Vorrichtung wie in [Fig. 19–Fig. 21](#) oder jeder anderen geeigneten Vorrichtung zu einem Kulturgefäß übertragen werden. Ein zweifach zugestöpseltes Röhrchen **52** besteht aus einem mehr oder weniger zylindrischen Röhrchen, vorzugsweise aus Glas oder irgendeiner optisch transparenten Substanz, mit einer Öffnung an jedem der beiden Enden. Die Öffnungen sind durch elastische Gummistopfen **54** verschlossen. Diese Stopfen können Serumkappen sein, die mit einer Nadel ohne Weiteres durchstoßen werden können, wie auf diesem Fachgebiet hinlänglich bekannt ist. In einer Ausführungsform enthält das Röhrchen **52** ein Vakuum, so dass es bei Anbringung

an einer Standard-Venenpunktionsanordnung Blut "einsaugt". Wie in [Fig. 19](#) gezeigt, kann das Doppelstopfenröhrchen **52** auch mit einer Anordnung aus Spritze und Nadel verwendet werden (ähnlich [Fig. 10](#), die Ausführungsform mit einfach zugestöpseltem Röhrchen). [Fig. 21](#) ist ebenfalls ähnlich, außer dass das spezielle Halteröhrchen **58** weggelassen ist. Das zweifach zugestöpselte Röhrchen macht die Gestaltung vieler Vorrichtungen möglich, die für vielfältige Zwecke verwendet werden, z. B. um den Umgang mit Blut zu vereinfachen und so die Sicherheit zu erhöhen. [Fig. 20](#) zeigt eine Spritze/Halteröhrchen-Kombination, wie in [Fig. 11](#) verwendet. Hier jedoch gestattet das zweifach zugestöpselte Röhrchen ohne Weiteres den Einsatz einer Vakuumröhrchen-Blutentnahmevorrichtung **64** mit einteiliger Nadel **16**. Die Vorrichtung **64** wird in eine Vene eingeführt, wie auf diesem Fachgebiet hinlänglich bekannt ist, dann wird ein Vakuumröhrchen **52** in die Vorrichtung **64** eingeführt, wobei ein Ende der Nadel **16** durch den Gummistopfen **54'** sticht. Nachdem sich das Röhrchen **52** mit Blut füllt, wird es in die spezielle Halteröhrchen/Spritze **57** eingeführt und das Blut direkt in das geschichtete Kulturgefäß injiziert. Dies kann in rascher Folge geschehen, so dass Blut im Wesentlichen ohne Zeitverzug in die Kultur eingebracht wird.

Beispiel #6: Biegsames Blutentnahmeröhrchen

[0092] In ein biegsames Röhrchen **72**, [Fig. 22](#), das bereits an ein Kulturgefäß angeschlossen ist, kann mittels einer Verteilungsspitze **76**, die den Infusionszugang (nicht gezeigt) durchdringt, Blut eingezogen werden. Dieses biegsame Röhrchen erlaubt das sofortige Herausdrücken des Blutes in das angeschlossene Kulturgefäß auf ähnliche Art und Weise wie in [Fig. 4–Fig. 9](#) und [Fig. 11](#), wodurch die Exposition von Personal und Infektion der Medien oder des Blutes ausgeschaltet werden. Das Blut wird mittels Vakuum auf ähnliche Art und Weise in das biegsame Röhrchen **72** eingezogen wie mit den bereits erörterten normalen Vakuumblutröhrchen. Jedoch ist das Röhrchen **72** aus einem biegsamen Kunststoffmaterial hergestellt, so dass durch Zusammendrücken des Röhrchens Blut abgegeben wird. Ein fakultatives integriertes Ventil **74** ist aus elastischen Klappen fast wie eine Herzklappe ausgeführt und verhindert ein unabsichtliches Tropfen des Blutes. In [Fig. 23](#) ist das biegsame Röhrchen **72** mit dem Hohlrechen **32** gemäß [Fig. 3](#) verbunden.

Beispiel #7: Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung in der Praxis des Arztes

[0093] In allen früheren Beispielen kann ein Gitter, [Fig. 13](#) und [Fig. 17](#), verwendet werden, um viele Antibiotikum- oder andere chemische Substanzproben direkt auf der Kultur zu platzieren. Die chemischen Substanzproben können in flüssiger Form oder aus-

gehend von Pulver oder Pille nach deren Auflösung oder auf Scheiben aufgebracht werden, wie es gegenwärtig auf diesem Fachgebiet üblich ist. [Fig. 13](#) zeigt eine Gesamtansicht eines Gitters **82**, das Antibiotikumtestscheiben in einem zweischichtigen Kulturgefäß der vorliegenden Erfindung stützen soll. Das Gitter ist so ausgeführt, dass es für das Kulturgefäß passt, und an jedem Schnittpunkt der Gitterkreuzelemente **83** ist ein Halter **84**, der so bemessen ist, dass er eine im Handel erhältliche Antibiotikatestscheibe enthält. Wie in [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#) gezeigt, steht ein konusförmiger Vorsprung **88** von dem Halter **86** nach unten ab. Der Vorsprung **88** weist Öffnungen **86** darin auf, um das Antibiotikum von den Scheiben in das Nährmedium diffundieren zu lassen. Der konusförmige Vorsprung **88** durchdringt die oberste Schicht und kann eine direktere Wechselwirkung zwischen der Antibiotikumprobe und dem Blut in der Diskontinuität ermöglichen, falls nötig. Um wirksame Antibiotikatscheiben herum entwickelt sich eine Hemmzone, wie auf diesem Fachgebiet hinlänglich bekannt ist. In einigen Fällen können vorteilhafte Ergebnisse erhalten werden, indem ein frischer Tropfen Patientenblut direkt auf eine Antibiotikumscheibe **87** gegeben wird (siehe [Fig. 16](#)). Dies ist insbesondere bei bestimmten aeroben Pathogenen wirksam, die sich eventuell nicht so wirksam vermehren, wenn sie zwischen den Agarschichten eingezwängt sind.

[0094] Das Gitter **82** kann mit bereits eingesetzten Testscheiben vorgepackt kommen, oder es können leere Halter verwendet werden, um die Hinzufügung von Kundenscheiben zu erlauben. Eine besonders vorteilhafte Anordnung ([Fig. 34](#)) für die Praxis des Arztes umfasst ein geschichtetes Kulturgefäß **22** mit einem versiegelten Deckel (z. B. mit einer Dichtung oder einem O-Ring **107** oder Paraffin etc. befestigt, um die Schale gasdicht zu machen und sie nicht ohne Weiteres zu öffnen ist). Die Schale **22** ist mit einem Probenzugang **108** (baugleich mit dem Infusionszugang **42**) und einem Prüfgitter **82** ausgestattet, das mit einer Platte mit Antibiotikumtestscheiben vorbeladen ist. Der Probenzugang **108** kann auch als Luftschleuse wirken, um die Schale **22** bei anaerober Kultur etc. zu spülen. Bei aerober Kultur ist der Deckel mit einem Filter versehen, der Luft zulässt, aber Mikroben ausschließt. Das Gitter **82** ist im Deckelteil **23** der Schale **22** eingehängt, so dass es die Nährmedienschichten **46** nicht berührt. Die Vorrichtung wird verwendet, indem eine frische Substanzprobe Patientenblut durch den Infusionszugang **42** hindurch infundiert wird. Entweder vor oder nach dieser Infusion kann eine flüssige Patientenprobe (z. B. ein in sterilem Wasser verwirbelter Rachenabstrich) durch den Probenzugang **108** hindurch injiziert und über die Oberseite **48** der Nährmedien verteilt werden. Diese Injektion findet durch die offenen Gitterquadrate des hängend angeordneten Prüfgitters **82** statt. Zur richtigen Zeit wird die Schale **22** so manipuliert, dass sie das Gitter **82** freigibt, so dass es mit

dem Nährmedium **44** in Kontakt geht. Im Falle eines runden Kulturgefäßes kann das Gitter mit Vorsprüngen hängend angeordnet sein, die in Nuten für Bayonett-scheibenbefestigung passen. Durch einfaches Verdrehen des Schalendeckels **23** kann das Gitter **82** gelöst werden. Oder das Gitter **82** kann permanent am Schalendeckel **23** befestigt sein, der durch einen O-Ring **107** zwischen dem Deckel **23** und der Schale **22** an seinem Platz gehalten wird. Wenn man auf den Deckel **23** drückt (Pfeil in [Fig. 34](#)), gleitet dieser herunter und bringt das Gitter **82** in Kontakt mit dem Nährmedium. Zudem kann eine derartige Vorrichtung in einem sterilen Labor in einem Beutel **102** eingeschlossen sein (siehe [Fig. 32](#)), so dass die Schale **22** steril geöffnet werden kann, um das Einsetzen oder Anpassen des Gitters **82** zu ermöglichen. Zur Segmentierung der Oberfläche des Nährmediums und Abgrenzung der Wirkstoffaufbringungsfläche kann ein einfaches Gitter verwendet werden, [Fig. 17](#).

Zusammenfassung des sicheren Verfahrens

[0095] Die vorliegende Erfindung eignet sich für Untersuchungsverfahren, wo im Wesentlichen keine Gefahr besteht, dass das Personal unabsichtlich potentiellen Pathogenen ausgesetzt ist. Dies ist unerlässlich für die Akzeptanz seitens praktischer Ärzte und Zulassung durch staatliche Stellen.

1. Mit einem Testbesteck ausgestattet nimmt der Arzt eine Probe (z. B. Rachenabstrich), gibt sie in ein Röhrchen mit sterilem Wasser und schüttelt es, um irgendwelche vorhandenen Mikroben zu suspendieren. Der Arzt deponiert diese flüssige Substanzprobe dann auf der Oberseite der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung (vorzugsweise durch Injektion durch einen Probenzugang hindurch, so dass die Schale nicht geöffnet werden muss).
2. Ein Skalpvenset (wie in [Fig. 33](#) gezeigt) oder eine ähnliche Vorrichtung wird verwendet, um eine Patientenblutprobe mit der kleinstmöglichen Gefahr einer versehentlichen Exposition zu erhalten. Eine Reihe von Nadeln **16**, die an miteinander in Verbindung stehenden Längen des Schlauchsystems **59** angebracht sind, werden zuerst mit einer Reihe von Kulturgefäßen **22** der vorliegenden Erfindung verbunden. Vorzugsweise werden wenigstens zwei Schalen **22** benutzt (eine für aerobe und eine für anaerobe Kulturbedingungen). Eine Spritze **12** wird angebracht und das Schlauchsystem **59** durch eine Reihe von Ventilen **116** kontrolliert. Schließlich wird eine der Nadeln **16** in eine Vene im Arm **114** eines Patienten gesetzt. Die richtigen Ventile **116** werden geöffnet und Blut in die Spritze **12** eingezogen. Dann werden die Ventile **116** umgeschaltet und gestatten die Injektion/Infusion von ca. 3 ml Frischblut in jede der Schalen **22**.
3. Die Blutsammelvorrichtung wird in einem Behälter für biologisch gefährlichen Abfall sorgfältig

entsorgt.

4. Auf Wunsch werden die Schalen entsprechend behandelt, um ein Antibiotikumtestgitter mit dem Nährmedium in Kontakt zu bringen (siehe begleitende Erörterung zu [Fig. 34](#)).

5. Die Schalen werden gekippt, um das Blut zu verteilen, falls notwendig, und in geeigneten Inkubatoren platziert. Für die anaerobe Schale können entweder anaerobe Inkubatoren verwendet werden, oder die Schale kann im Innern eines anaeroben Beutels in einem normalen Inkubator platziert werden, wie auf diesem Fachgebiet hinlänglich bekannt ist. Substanzproben-Luftschleusen (wie oben erwähnt) können verwendet werden, um die anaerobe Schale zu reinigen, falls erwünscht. Versiegelte aerobe Schalen werden durch einen Mikrobenfilter hindurch belüftet.

6. Nach der Vermehrung der Pathogene (8–24 Std.) werden die Ergebnisse interpretiert, ohne die Schale jemals zu öffnen, wodurch die Gefahr einer Krankheitserregereexposition beseitigt wird. Dann werden die Schalen auf sichere Art und Weise entsorgt (z. B. vor der Entsorgung autoklaviert). Falls eine detailliertere Diagnose erwünscht ist, kann die gesamte versiegelte Schale zur Subkultivierung an ein Labor geschickt werden, wo sie dann unter vollkommen sicheren Bedingungen geöffnet wird. So erlaubt die vorliegende Erfindung eine schnelle und hochentwickelte Analyse in der Praxis des Arztes, ohne jegliche Gefahr, sich den kultivierten Pathogenen auszusetzen.

[0096] Das oben beschriebene Verfahren der Mischkultur und Vorrichtungen ermöglicht es einem Arzt oder anderem Personal zu bestimmen, ob ein Antibiotikum etc. angezeigt ist, und falls ja, welches) wirksam sein wird/werden, während die sachverständigen, mühevollen und zeitraubenden Schritte der Pathogen-Identifizierung und -Isolierung unter Verwendung der gängigen Verfahrensmethode der Erzeugung einer Reinkultur eliminiert werden. Bei vielen Patienten wird die Erfindung zeigen, dass das vorgeschlagene Antibiotikum nicht hilfreich ist (oder tatsächlich schädlich sein kann, indem es das Wachstum eines Pathogens stimuliert), so dass der Arzt in einer Entscheidung, nicht zu verschreiben, unterstützt wird. In ähnlicher Weise wird der Patient darin bestärkt, kein nutzloses oder schädliches Antibiotikum zu verlangen. Die Gesamtpatientenzahl profitiert von den Kosteneinsparungen und der Verlangsamung der Geschwindigkeit, mit der Pathogene wegen des exzessiven Verschreibens von Antibiotika resistent werden.

[0097] Die in dieser Spezifikation verwendeten Worte zur Beschreibung der Erfindung und ihrer verschiedenen Ausführungsformen sind nicht nur im Sinne ihrer allgemein definierten Bedeutung zu verstehen, sondern sollen auch die spezielle Definition in dieser Beschreibung einschließen. Die dargestellte Ausführ-

rungsform ist nur zu Beispielszwecken dargelegt worden, und dies sollte nicht als Einschränkung der Erfindung genommen werden.

Patentansprüche

1. Vorrichtung der Art, wie sie zum Kultivieren von Pathogenen in einem sterilen Behältnis verwendet wird, das Schichten von festem Nährmedium mit einer nach außen weisenden Oberfläche in Kontakt mit der Atmosphäre innerhalb des Behältnisses enthält, wobei die Vorrichtung auch Mittel zum Infundieren von Patientenblut und/oder -zellen aufweist, wobei durch das Unvermögen einer ersten Schicht des festen Nährmediums, an einer zweiten Schicht des festen Nährmediums anzuhaften, eine Diskontinuität gebildet ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Mittel zum Infundieren auf die Diskontinuität abgestimmt ist, so dass eine Schicht Patientenblut und/oder Patientenzellen in die Diskontinuität eingespritzt werden kann und dabei die nach außen weisende Oberfläche blut- oder zellfrei bleibt, um eine Patientenprobe aufzunehmen.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das sterile Behältnis luftdicht ist und ferner einen Zugang enthält, der mit der Atmosphäre über der nach außen weisenden Oberfläche in Verbindung steht.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei der Zugang als Luftschleuse wirkt, um die Zufuhr oder Entziehung von Gasen zu gestatten.

4. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei der Zugang zur Injektion einer Probe verwendet wird.

5. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei das sterile Behältnis einen Deckel aufweist, der einen Mikrobenluftfilter enthält.

6. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei ein Deckel des sterilen Behältnisses eine Vielzahl von Einspritzöffnungen aufweist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Diskontinuität durch eine Gewebeschicht gebildet ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Diskontinuität durch eine semipermeable Membranschicht gebildet ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7, wobei das sterile Behältnis eine Innennut zur Aufnahme der Gewebeschicht oder zur Aufnahme eines das Gewebe haltenden Ringes aufweist.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8, wobei das sterile Behältnis eine Innennut zur Aufnahme der semipermeablen Membranschicht oder zur Aufnahme eines die Membran haltenden Ringes aufweist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 1, die ferner ein zweites steriles Behältnis umfasst, welches das sterile Behältnis umgibt.

12. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das Mittel zum Infundieren ein Röhrchen einschließt, um infundierte Blut- und/oder Patientenzellen zu einem Mittelbereich der Diskontinuität zu bringen.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, wobei das Röhrchen in einer Wand davon eine Vielzahl von Löchern aufweist, um die Verteilung infundierter Blut- und/oder Patientenzellen zu erleichtern.

14. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das sterile Behältnis eine durchgehende Seitenwand und zwei Deckel umfasst und wobei die Diskontinuität durch Membran- oder Gewebeschichten gebildet ist, die innerhalb eines Ringes gehalten sind, der sich in eine Innennut auf einer Innenfläche der Seitenwand einpasst, wobei die Seitenwand auf die Diskontinuität abgestimmte Mittel zum Infundieren aufweist, und wobei die Seitenwand jedes Ende davon verschließende Deckel aufweist, die Zugang zu beiden Seiten der darin gehaltenen Schichten gestatten.

15. Verfahren zur Kultivierung von Pathogenen oder Zellen in einer ein Doppel individueller Patientenfaktoren bildenden Umgebung, das die Schritte umfasst:

- Bereitstellen eines Sterilkulturgefäßes, das wenigstens zwei Schichten festes Nährmedium enthält, das eine nach außen weisende Oberfläche in Kontakt mit der Atmosphäre innerhalb der Schale und eine Diskontinuität zwischen den Schichten aufweist;
- Einspritzen von unverfälschtem Patientenblut und/oder Patientenzellen in die Diskontinuität durch einen darauf abgestimmten Zugang, wodurch eine Schicht Blut- und/oder Patientenzellen gebildet wird und die nach außen weisende Oberfläche frei von injizierten Blut- und/oder Patientenzellen bleibt;
- Inkubieren der Schale unter günstigen Bedingungen für Krankheitserreger- und/oder Zellwachstum; und
- Untersuchen der Schicht Blut- und/oder Patientenzellen auf Anzeichen von Krankheitserreger- und/oder Zellwachstum.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei eine Substanzprobe eines Tumors eines Patienten auf der nach außen weisenden Oberfläche platziert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei eine Substanzprobe eines Tumors eines Patienten vor Verwendung in dem Verfahren in einer Behältnis-in-Behältnis-Vorrichtung transportiert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 15, wobei eine Substanzprobe eines Tumors eines Patienten mit Aditiven vermischt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 15, wobei Zellen aus einem Tumor eines Patienten in die Diskontinuität eingespritzt werden.

20. Verfahren nach Anspruch 15, wobei eine Patientenprobe auf der nach außen weisenden Oberfläche platziert wird, so dass sich von der Schicht in die Diskontinuität ausbreitende Stoffe das Wachstum in der Probe beeinflussen können.

21. Verfahren nach Anspruch 15, wobei eine Substanzprobenmischung auf der nach außen weisenden Oberfläche platziert wird, so dass sich von der Substanzprobenmischung ausbreitendes Material das Krankheitserreger- oder Zellwachstum beeinflussen kann.

22. Verfahren nach Anspruch 15, wobei ein Gitter auf der Oberseite platziert wird, um Zonen darauf zu begrenzen und einzuteilen.

23. Verfahren nach Anspruch 15, wobei auf der Oberseite eine Gittervorrichtung platziert wird und auf der Gittervorrichtung Substanzprobenmischungen platziert werden, so dass sich von den Mischungen ausbreitendes Material das Krankheitserreger- oder Zellwachstum in der Schicht in der Diskontinuität beeinflussen kann.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das sich von einer Wirkstoffprobe ausbreitende Material durch Löcher hindurchtritt, die auf eine Vielzahl von Spitzen bezogen sind, die unter der Gittervorrichtung zu der Diskontinuität hin verlaufen.

25. Verfahren nach Anspruch 15, das ferner einen Schritt Auf-den-Kopf-Stellen des Behältnisses umfasst, um das feste Nährmedium aus dem Behältnis zu lösen, wodurch ein unberührter Boden des festen Nährmediums freigelegt wird, der eine blutfreie Oberfläche bereitstellt.

26. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Schritte Bereitstellen eines Sterilkulturgefäßes, Injizieren von Blut- und/oder Patientenzellen, Inkubieren der Schale und Untersuchen des Inhalts automatisiert sind.

27. Ausrüstung zur Kultivierung von Pathogenen bei gleichzeitiger Minimierung der Exposition des medizinischen Personals, die umfasst:

- ein Blutentnahmebesteck bestehend aus:
- einer Vielzahl von Hohlnadeln, die mit einem miteinander in Verbindung stehenden Schlauchsystem verbunden sind;
- Ventilmitteln zur Steuerung des Blutflusses durch das Schlauchsystem;
- einer Spritze zum Herausziehen oder Hineindrücken von Blut durch das Schlauchsystem; und
- eine Kultivierungsvorrichtung bestehend aus:

– einem sterilen Behältnis;

– wenigstens zwei Schichten festes Nährmedium mit einer nach außen weisenden Oberfläche in Kontakt mit der Atmosphäre innerhalb des Behältnisses und mit einer Diskontinuität zwischen den Schichten; und

– Mitteln zum Infundieren, die durch ein Schlauchsystem an die Spritze angeschlossen und auf die Diskontinuität abgestimmt sind, so dass Blut in die Diskontinuität eingespritzt werden kann, ohne die nach außen weisende Oberfläche mit Blut zu verunreinigen; und

– Mittel zum Platzieren einer Patientenprobe auf der nach außen weisenden Oberfläche des festen Nährmediums.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

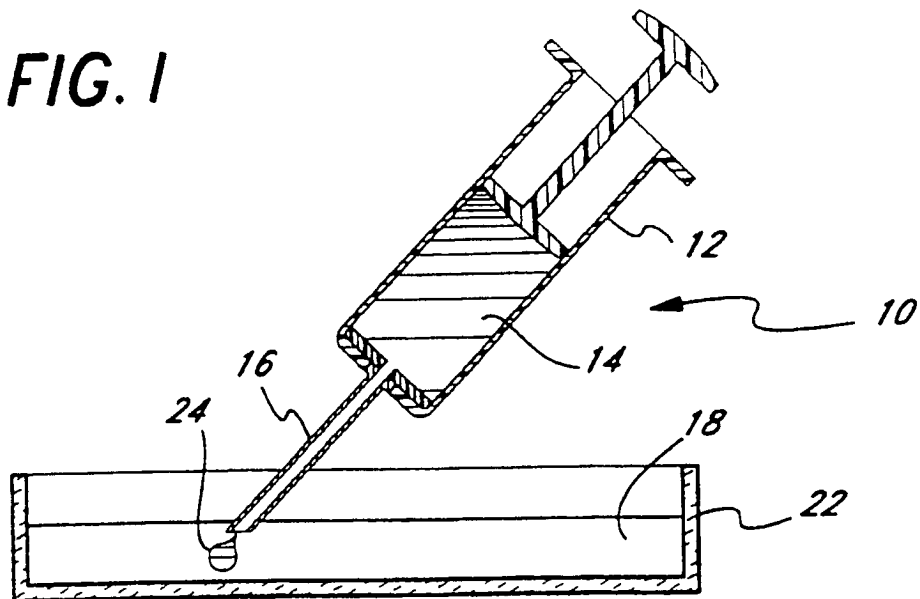


FIG. 2

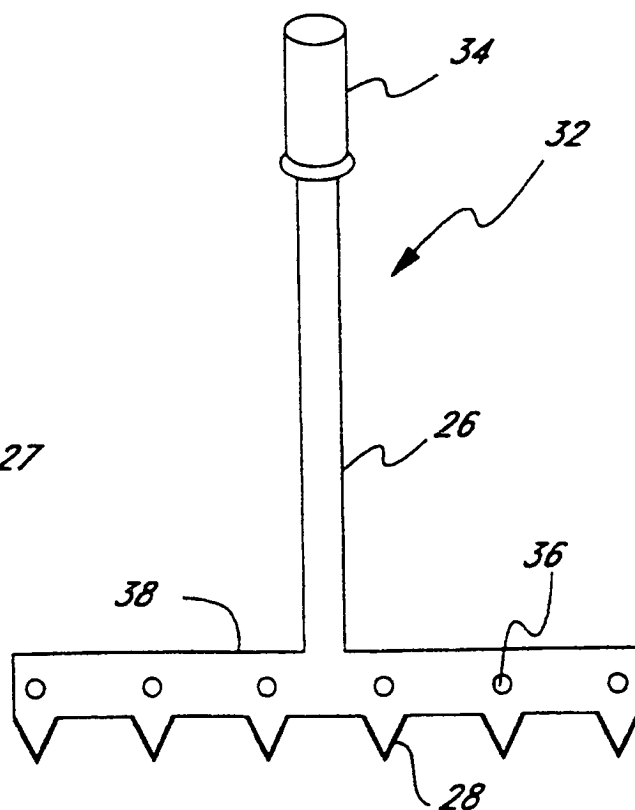
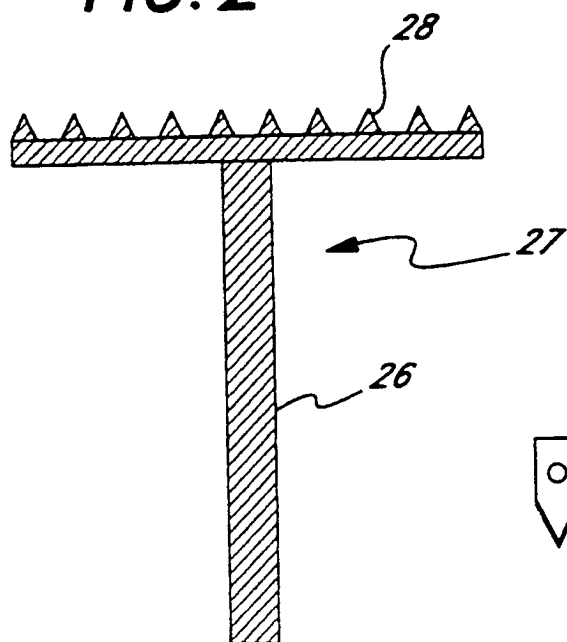


FIG. 3

FIG. 4

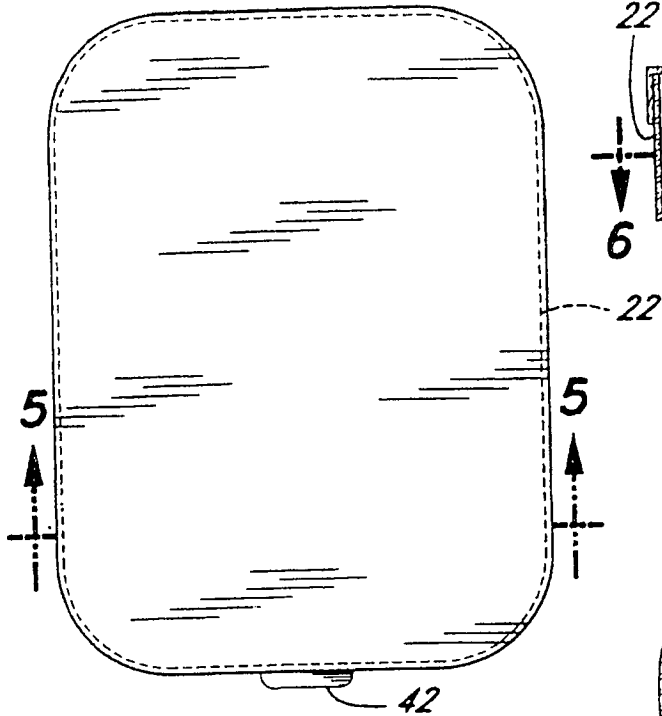


FIG. 5

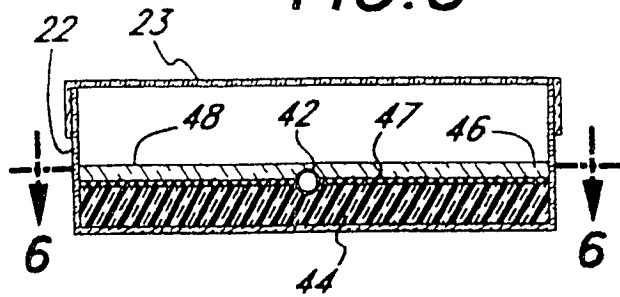


FIG. 7

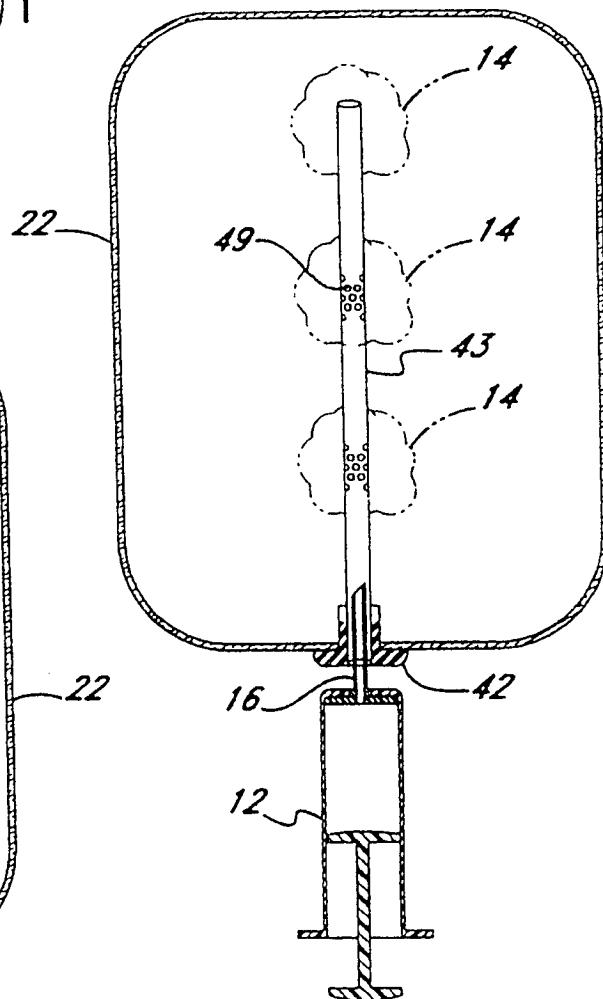
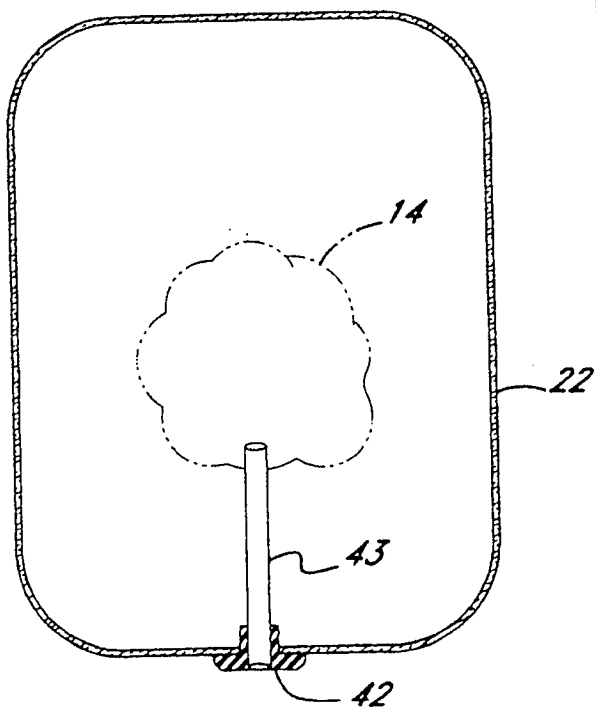
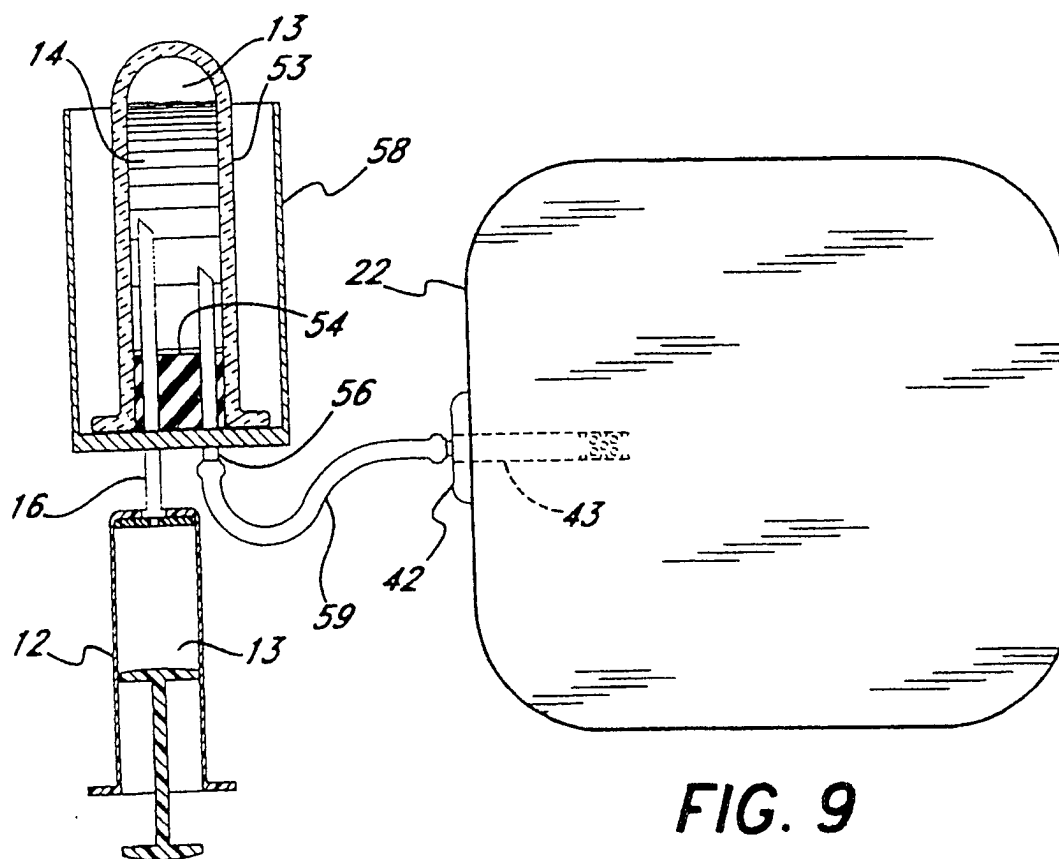
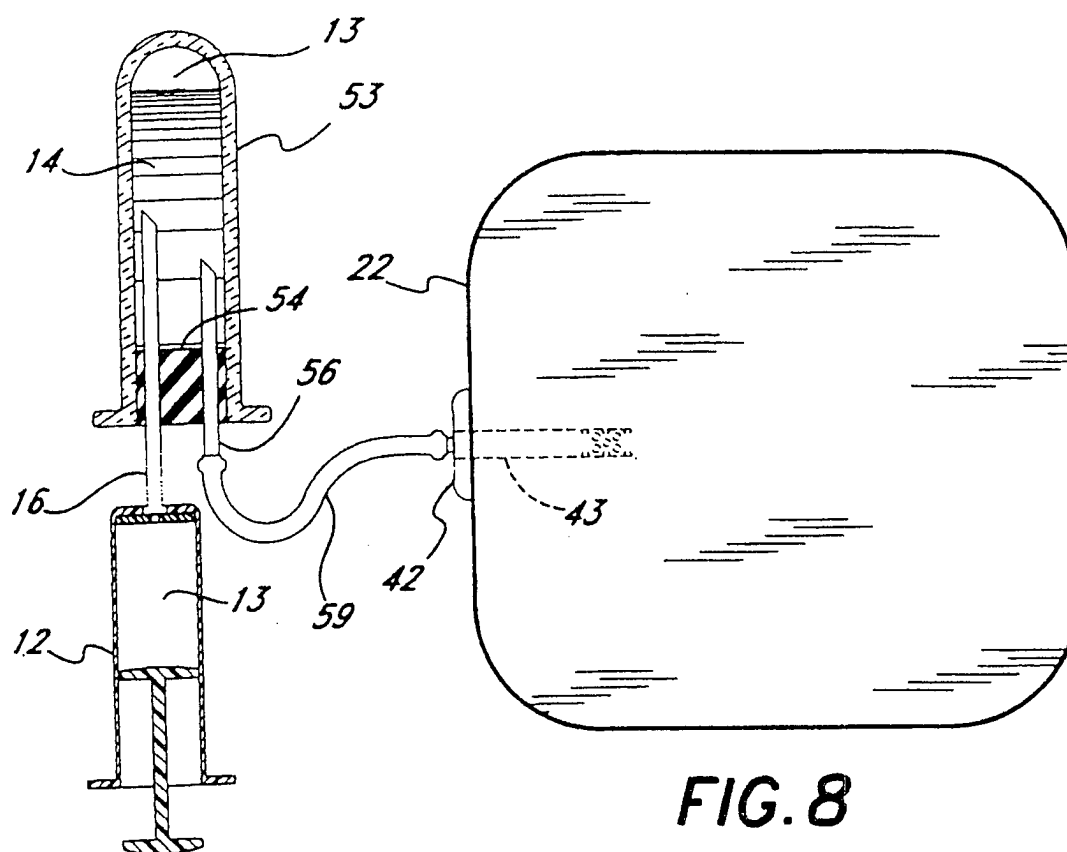


FIG. 6





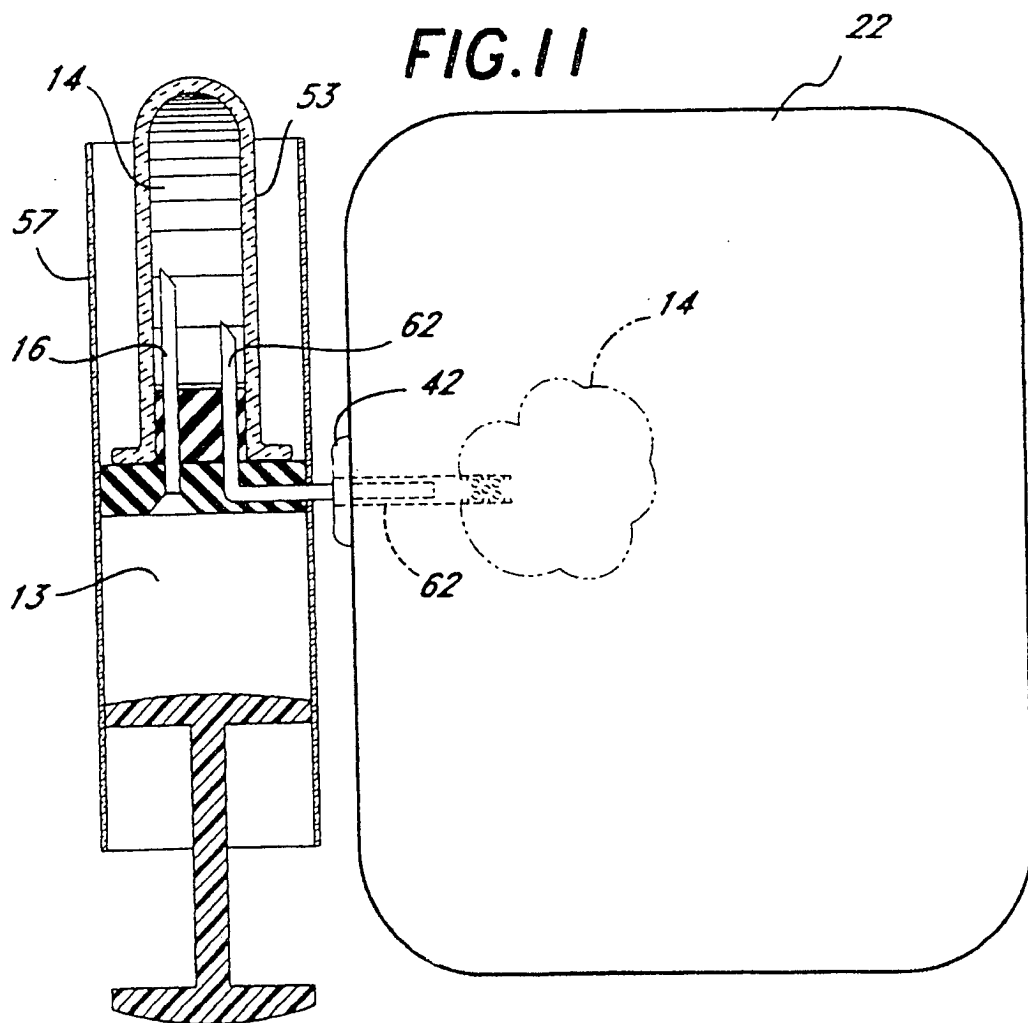
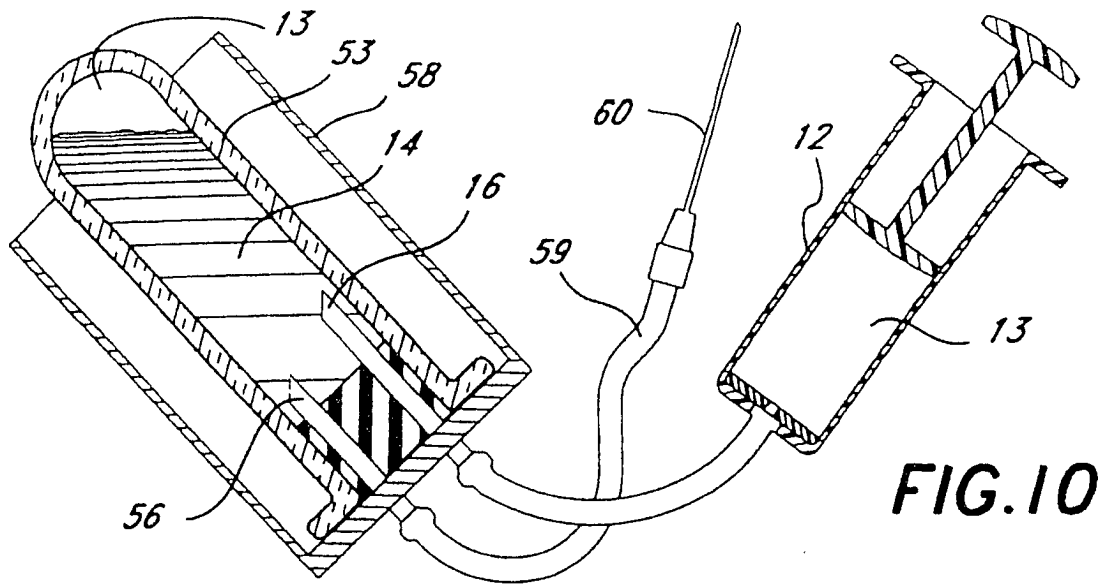


FIG.12

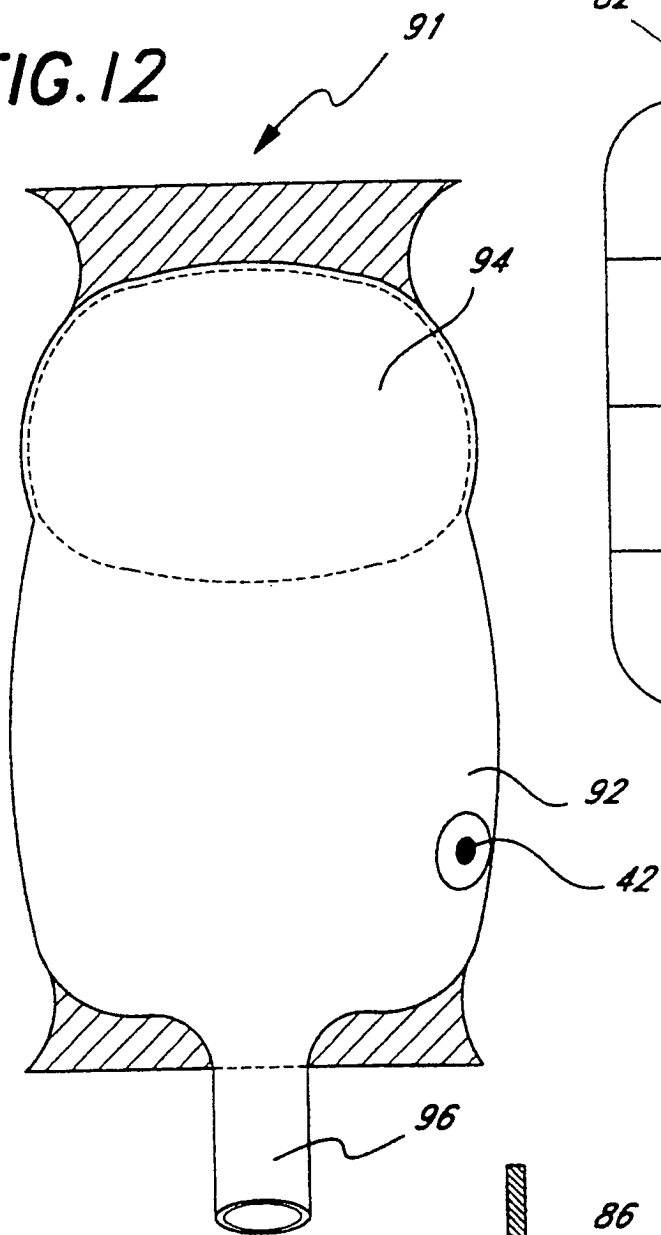


FIG.13

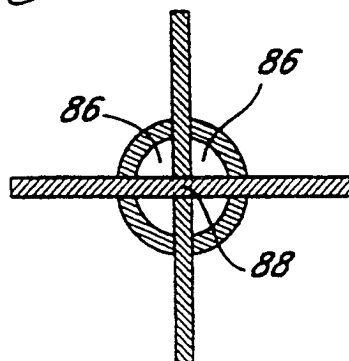
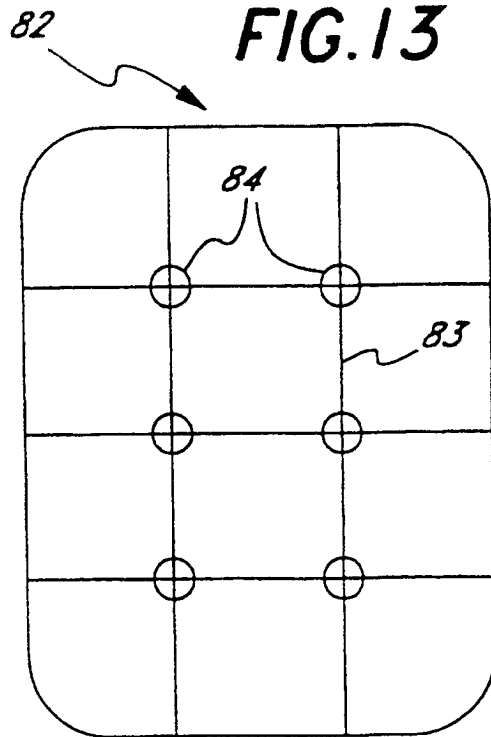


FIG.14

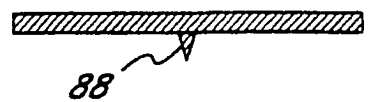
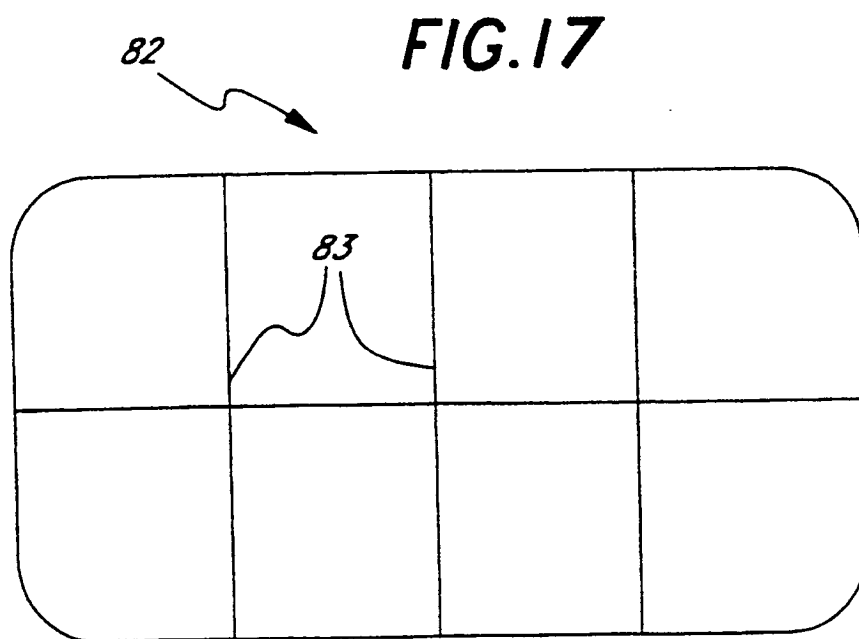
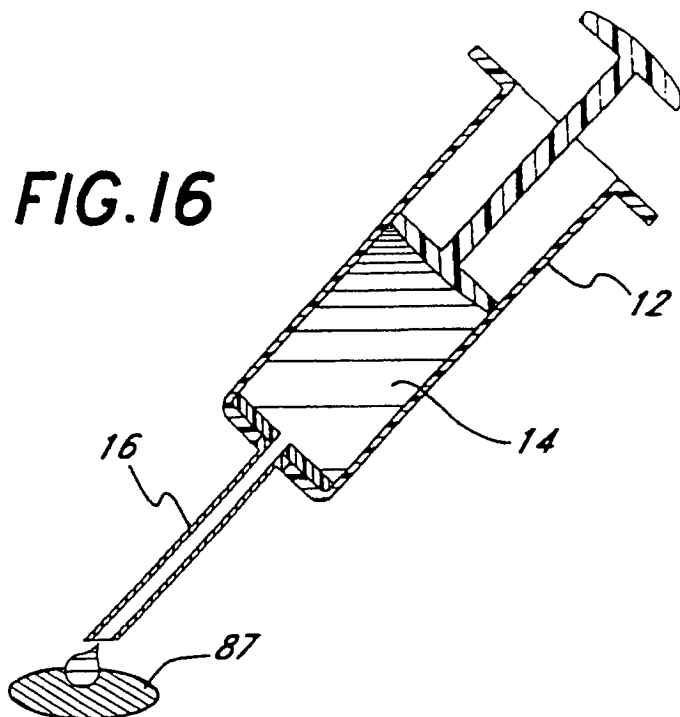


FIG.15



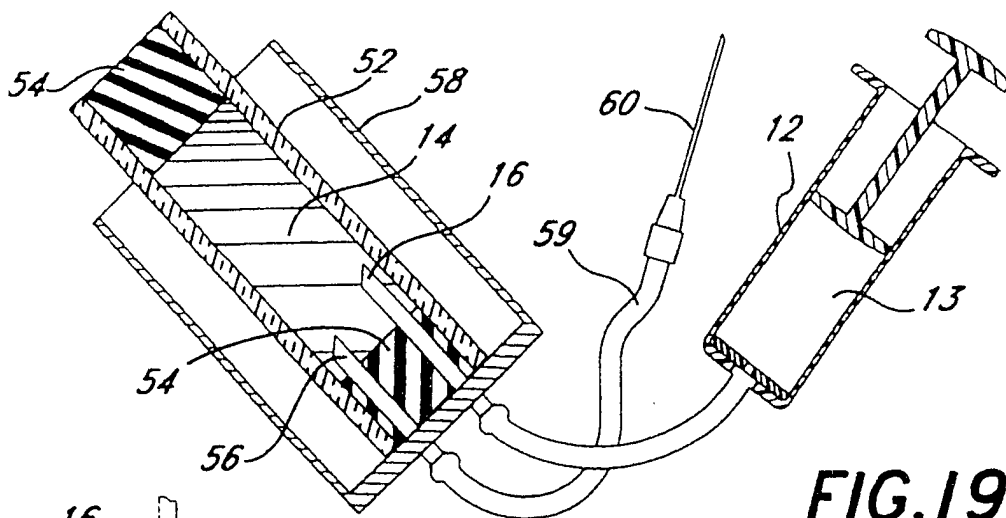


FIG.19

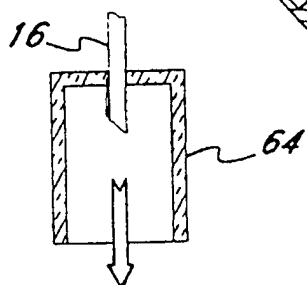


FIG. 20

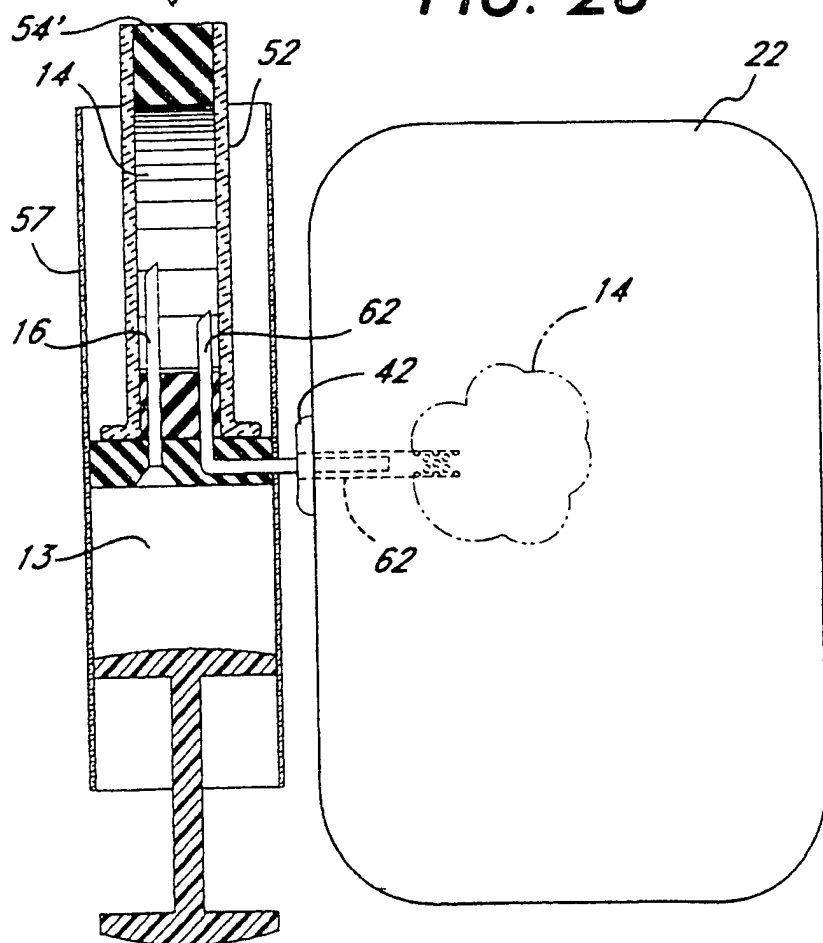
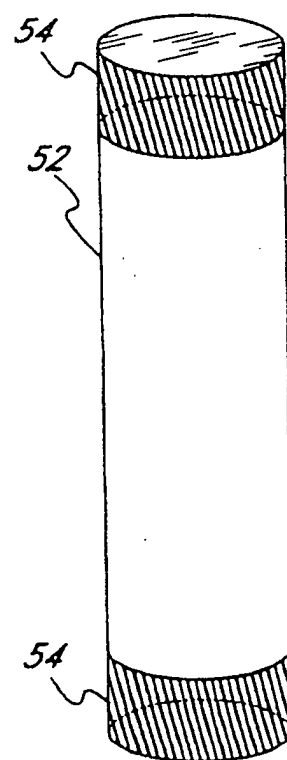


FIG. 18



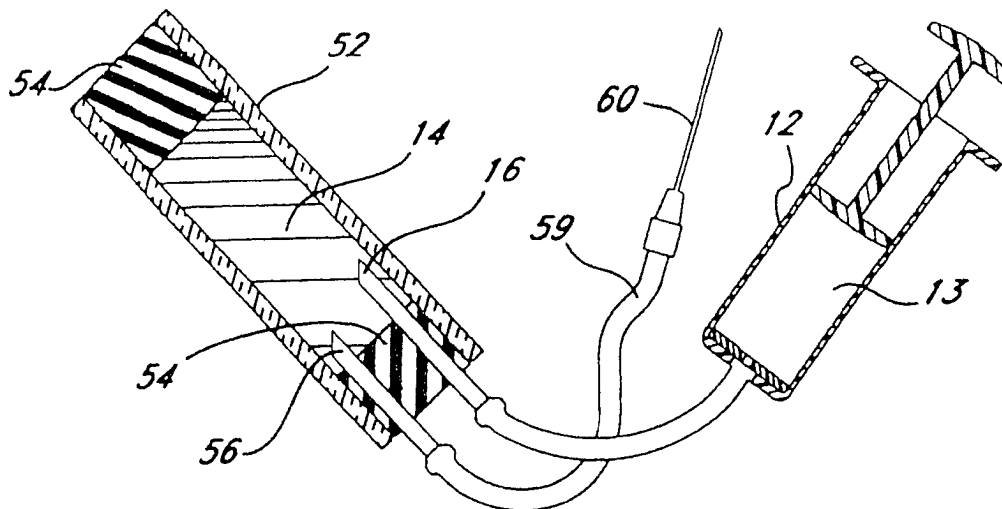


FIG. 21

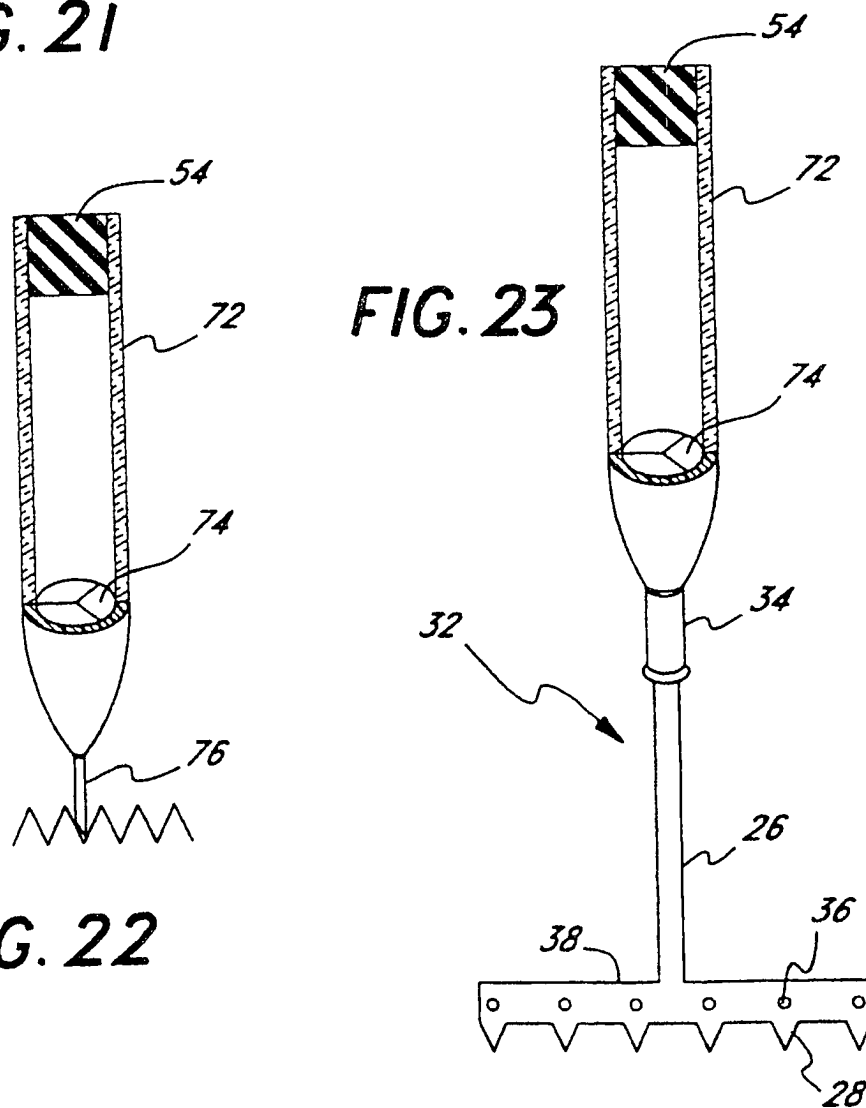


FIG. 22

FIG. 23

FIG. 24

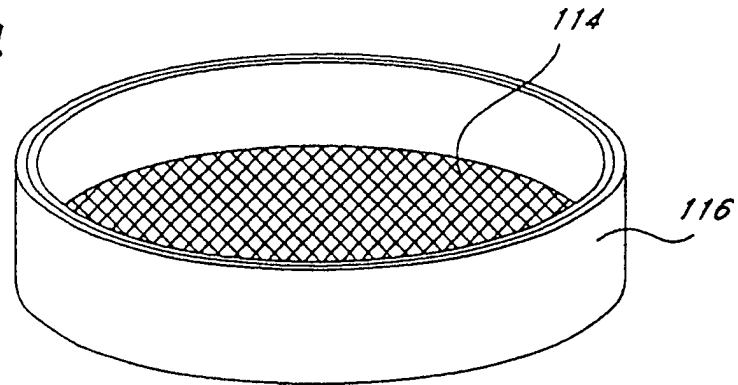


FIG. 25

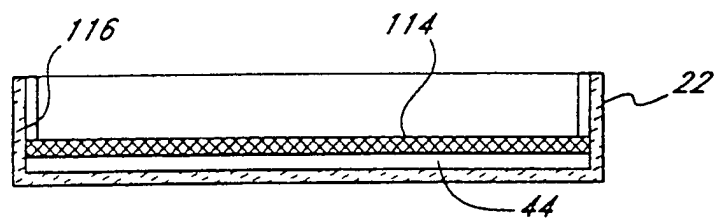


FIG. 26

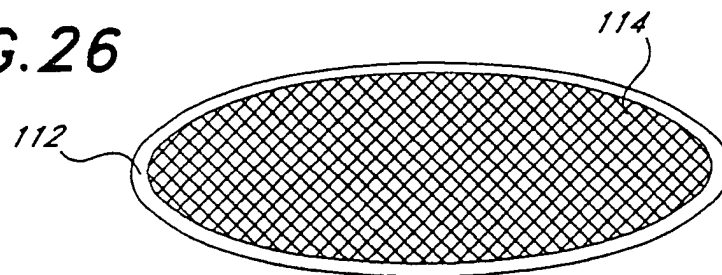


FIG. 27

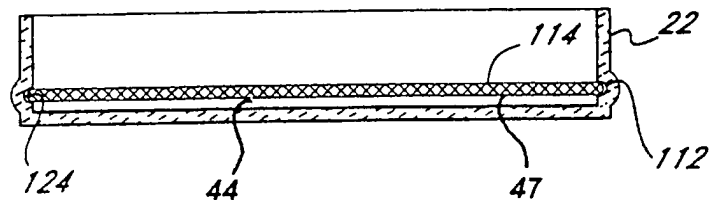


FIG. 28

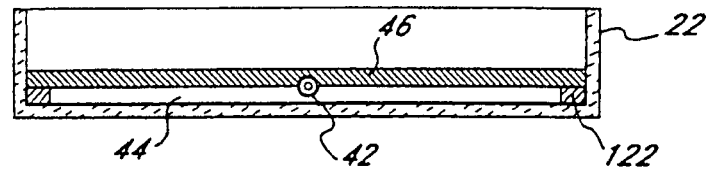


FIG. 29

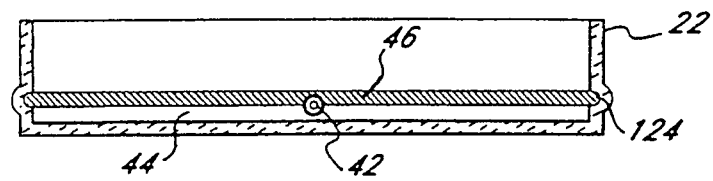


FIG. 30

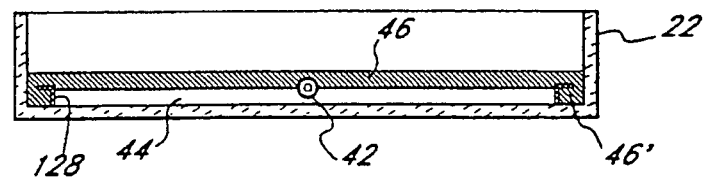


FIG. 31

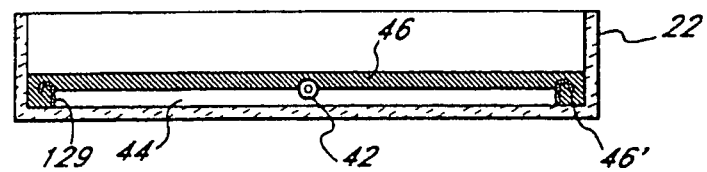


FIG. 32

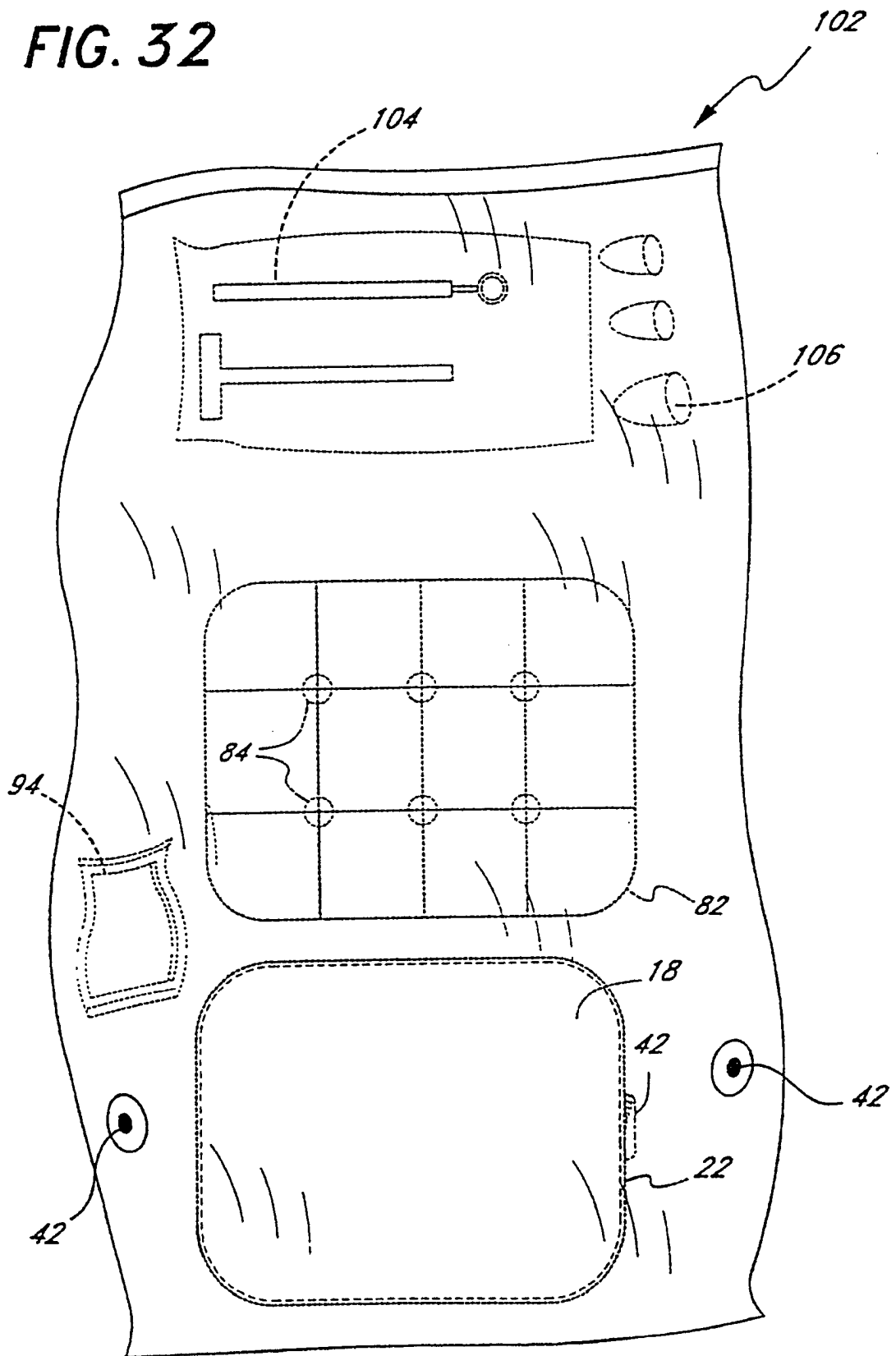


FIG. 33

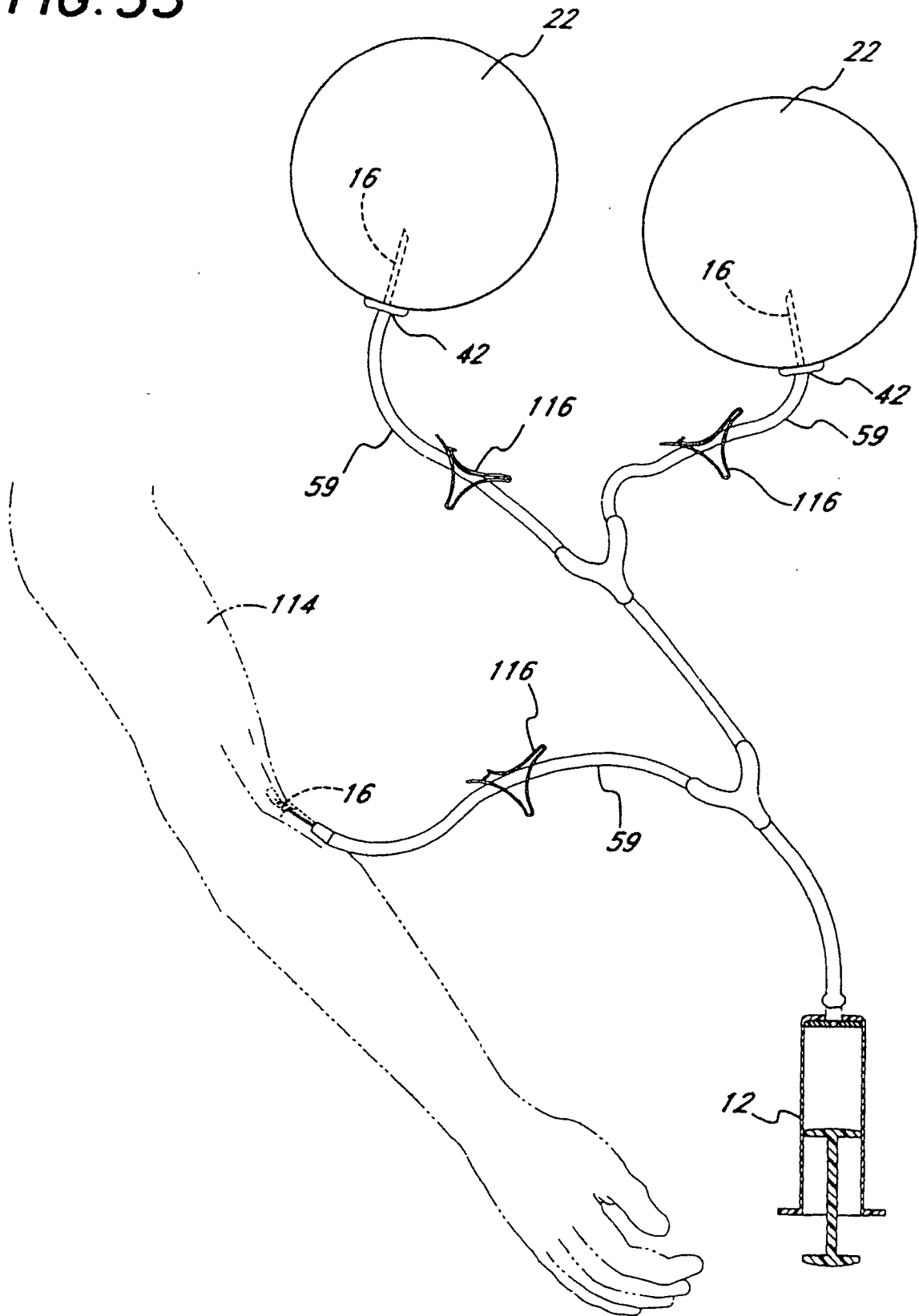


FIG. 34

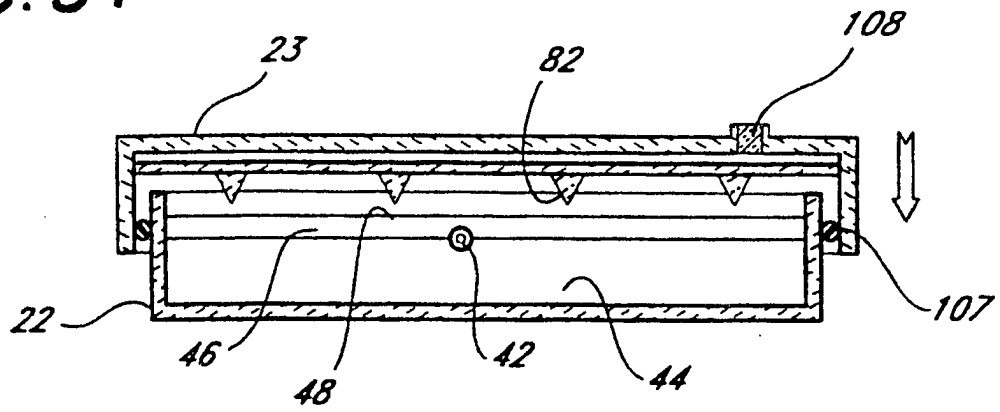


FIG. 35

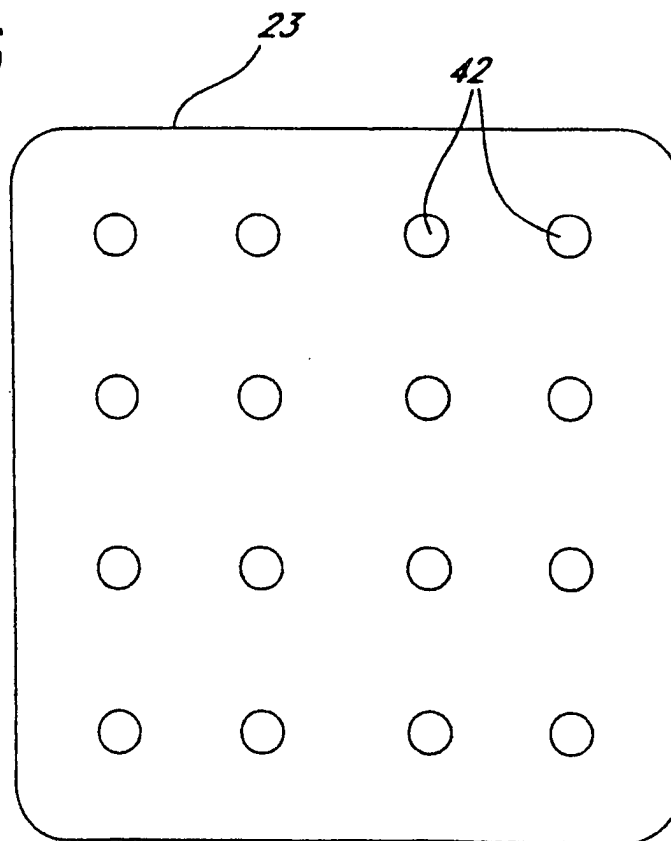


FIG. 36

