HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Immunodiagnose der Schwangerschaft bei Stuten
Author(s)	Watanabe, Yutaka; Shimoiizaka, Takashi; Sato, Kunitada
Citation	北海道大学農学部附属牧場研究報告, 2, 1-10
Issue Date	1966-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48868
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_1-10.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Immunodiagnose der Schwangerschaft bei Stuten

By

Yutaka WATANABE, Takashi SHIMOHZAKA
und Kunitada SATÔ

Einleitung

Der Wunsch, die bei den Schwangerschaftsuntersuchungen gebräuchlichen subjektiven, sinnlichen, klinischen Schwangerschaft-Unterschungsmethoden durch objektivere optische, biochemische oder immunologische Prüfungen zu ersetzen, die vor allem eine Aussage über sichere Schwangerschaftszeichen der Stute zulassen, hat mit dazu geführt, dass in der Veterinär—wie Humanmedizin in zunehmendem Masse der Diagnose der Schwangerschaft erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt wird. Über die Verhältnisse hierüber beim Menschen wurde ausführlich und zusammenfassend berichtet von WIDE (1962, 1963), WIDE und GEMZELL (1960).

Fussend auf dem Nachweis des Insulins nach ARQUILLA und STAVITSKY (1956 a, b) und auf dem Nachweis des menschlichen hypophysären Wachstum-Hormons nach READ und STONE (1958) arbeitete WIDE eine Methodik zu dem Nachweis des PMS-Hormons im Serum aus, nach der mit mehr oder weniger Modifikation heute im allgemeinen gearbeitet wird.

Methodik

Die Schwangerschaftsuntersuchung des Menschen wird mittels der Immunisierung nach LIEPMANN (1902, 1903 a, b) durchgeführt. Da es sich nach WIDE (1962) bei der Immunitätsreaktion in Stuten praktisch nur um PMS, Handelspräparate aus dem Serum schwangerer Stuten, handelt, kann die Hämagglutination-Inhibition-Reaktion in diesem Falle als spezeifische Schwangerschaftsdiagnose angesehen werden.

1) Künstliche Immunisierung gegen PMS

a) Antigen

Die zwei verschiedenen Arzneiwaren von Handelspräparaten aus dem Serum schwangerer Stuten sind als die Antigen für die Immunisierung gebraucht worden: "Serarumon" von TOSHIBA pharmazeutische Gesellschaft, Japan, und "Serotropin" von TEIKOKUZOUKI.

Die zwei Arzneiwaren wurden aus dem Serum der schwangeren Stuten

extrahiert, und mittels eines frierenden getrockneten Verfahrens konserviert, der Läuterungs-Prozess ist jedoch bei beiden verschieden.

Zwei Kaninchen wurden mit "Serarumon", vier Kaninchen mit "Serotropin" und zwei Meerschweinchen mit "Serarumon" immunisiert (Tabl. 1).

TABL. 1. Der Plan der Injektion für die Immunisierung gegen PMS

Symbol des Antiserums	PMS Präparat	Biologische Einheit*	Adjuvant	Injection**	Geschlecht
S_1	Serarumon	1,500	Olivenöl	1. 2. 3.	weibl.
S_2	Serarumon	750	Ramon	1. 2. 3.	weibl.
S_3	Serotropin	2,000	Ramon Physiol.-Salzlösung	1.	weibl.
S_4	Serotropin	1,500	Ramon	1. 2. 3.	männl.
S_5	Serotropin	1,000	Olivenöl	1. 2.	männl.
S_6	Serotropin	1,000	Ramon	1.	männl.
S_7†	Serarumon	1,000	Ramon	1. 2. 3.	männl.
S_8†	Serarumon	1,000	Olivenöl	1. 2. 3.	männl.

* Einheit jeder Injection I.E./ml.
** Woche nach der ersten Injektion
† Versuchstier ist Meerschweinchen

b) Adjuvants

i) RAMON's Adjuvants (RAMON, LEMETAYER, RICHOU 1935)

Mineral-Öl	48 g.
Lanolinum	16 g.
0.9%-NaCl Lösung	24 ml.

ii) Oliven-Öl

iii) Physiologische Salzlösung

Das wasserlösliche Hormon wurde direkt in 2 ml. Adjuvants für jede Injektion aufgelöst (Tabl. 2).

c) Immunisierung und Blutentnahme vom Versuchstier

Das Versuchsmaterial setzt sich aus drei männlichen und drei weiblichen Kaninchen und zwei männlichen Meerschweinchen zusammen. Die das Versuchsmaterial betreffenden Daten waren wie folgend; bei Versuchsbeginn war das Alter 5 bis 8 Monate und die Gewichte waren 1.5–2.8 kg.

Das Antigen in RAMON's Adjuvants, Oliven-Öl oder physiologischen Salzlösung wurde intramuskulär in den Glutäen injiziert. Die Injektionen bei den Versuchstieren wurden zwischen 1–3 mal im Abstand von 7 Tagen gemacht.

Sieben Tage nachdem die letzten Injektionen gemacht wurden, wurde das Blut aus der Karotis bei allen Kaninchen, mittels der Herzpunktion bei den beiden Meerschweinchen entnommen.

d) Konservierung

Zum Vergleich der Konservierung, wurden folgende Verfahren angewandt.

I Inaktivierung

a) Erwärmung auf 56°C während 30 Min.

b) Keine Behandlung

II Konservierung

a) im gefrorenem Zustand

b) im Kühlschrank (nicht gefroren)

2) **Präparat von PMS-Sensibilisierten Blutkörperchen (Im Folgendem kurz PMS-Zellen gennant)**

a) Rote Blutkörperchen

Die Versuchstiere sind Schafe und zwar weibliche und männliche Merinos. PMS-Zellen wurde in der gleichen Weise aus jeder Blutprobe gemacht.

b) Reagens

pH-6.4-Phosphatpuffersalzlösung (pH-Puffer)

0.15 M–Na_2HPO_4	0.35 Vol.
0.15 M–KH_2PO_4	0.65 Vol.
0.9% (v/v)–NaCl	1 Vol.

Nach der Mischung wurden die pH-Werte mittels Spezial-Indikator-Papier von der chemischen Fabrik KANTO awf eine Reaktion geprüft.

Formaldehyd-Lösung (Formalin)

Mit 0.1 N–NaOH wurden die Formaldehydlösung der pH-Werte zwischen 7.0–7.5 bereitet, und mit pH-Puffer auf etwa 3% (v/v) verdünnt.

i) Blutentnahme

Nach der Blutentnahme aus der Jugularvene der Schafe, wurden die Blutkörperchen vom Blut getrennt, mit der 8–10 fachen Menge der pH-Puffer vorsichtig gemischt und mit Hilfe der Zentrifugation bei 3,000–3,500 Umdrehungen/Min. während 5 Minuten 6 mal gewaschen.

ii) Sensibilisierung gegen Formalin

Die Methode richtete sich nach den Angaben von WEINBACH (1958), indem nach der Waschung eine Volumen von 8% (v/v) suspendierten Blutkörperchen in pH-Puffer mit der gleichen Menge von 3% (v/v)

Formaldehydlösung vermischt wurde, und 18–24 Uhr im Wasserbad bei 37°C erwärmt wurde. Danach wurden die suspendierten Blutkörperchen mit der 8 fachen Menge des pH-Puffers 4 mal ausgewaschen.

iii) Sensibilisierung gegen Gerbsäure
Nach der Formalisierung wurden die Blutkörperchen mit Gerbsäure unter folgenden Bedingungen behandelt: Gerbkonzentration 1 : 40,000, pH-Wert des Puffers 6.4, Inkubation während 30 Min. in Wasserbad bei 56°C.

iv) PMS Adsorption
Danach wurden die Blutkörperchen mit 5 facher Menge pH-Puffer, 2 mal ausgewaschen.

Die tannierten Blutkörperchen wurden mit PMS-Präparaten (Serarumon, Serotropin) unter folgenden Bedingungen sensibilisiert: die PMS-Konzentration 25 I.E./ml., pH-Wert des Puffers 6.4, Inkubation während 120 Min., in Wasserbad bei 56°C, und Blutkörperchenkonzentration 4% (v/v).

Danach wurden die Blutkörperchen mit 5 facher Menge pH-Puffer 2 mal gewaschen mit pH-Puffer auf 2.5% (v/v) verdünnt und bei +4°C gehalten.

3) Wertbestimmung des Anti-PMS-Serums

Nach SALK (1944), WIDE (1962) und WATANABE (1964) wurden die Hämagglutination und Hämagglutination-Hemmungs-Versuche in den Prüfungsröhrchen ausgeführt und die Wertbestimmung durchgeführt.

Bei der Hämagglutination oder Hämagglutination-Hemmungs Reaktion handelt es sich um eine fortlaufende Verdünnung des Antiserums, beginnend mit 1/2 im ersten Gläschen, fortlaufend mit verdoppeltem Nenner, endend mit 1 : 4096 im dreizehnten Gläschen.

Der Reaktionsreihe schliesse man ein Kontrollgläschen an, welches für den Versuch hergestellt wurde, um mit ihm die Ergebnisse zu vergleichen.

Nach dem Durchschütteln der Prüfungsröhrchen, kommen die Röhren genau senkrecht in das Gestell, und bleiben 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen.

Das Resultat der Seroreaktion wird nach den Beobachtungen des Bilds an der Kuppe des Reagenzröhrchens, den Mustern der PMS-Zellen, im Spiegel beuteilt (Fig. 1).

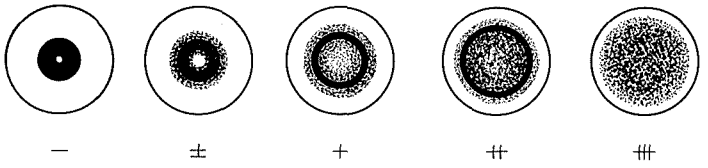

Fig. 1 Schematische verschiedene Muster, die von den Blutkörperchen an der Kuppe des Reagenzröhrchens geformt werden (nach WATANABE)

4) Anwendung für die klinische Diagnose

Die klinische Prüfung basiert auf der Hämagglutination-Hemmungs-Reak-

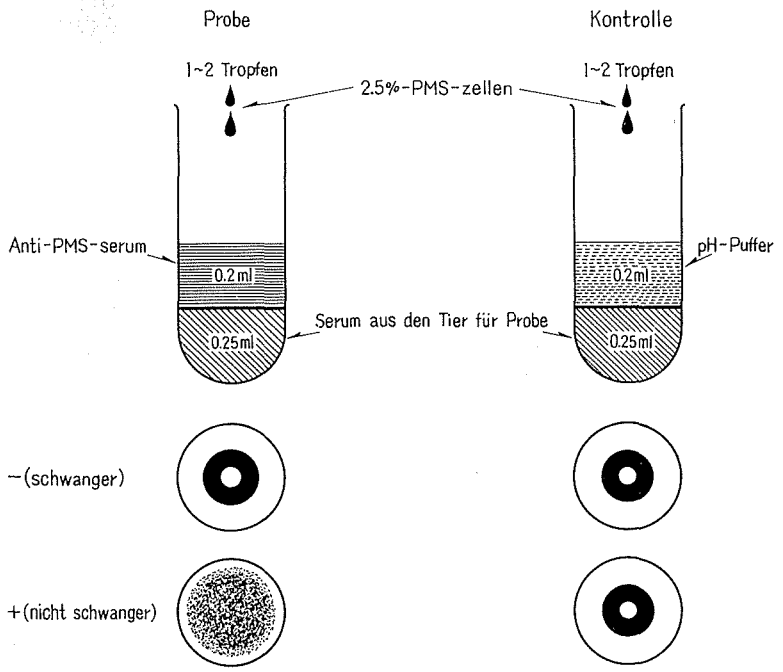

Fig. 2 Die klinische Uutersuchungsmethode der Schwangerschaft mittels Immunoreaktion (Nach dem Durchschütteln und 2 Stunden bei Zimmertemperatur belassen, wird die Reaktion beurteilt).

tion, nämlich, dass das Gemisch mit dem Anti-PMS-Serum und der PMS-Zellen die Hämagglutination Reaktion zeigte und auf die Existenz von PMS in dem Serum inhibiert wurde. Der Weg der Prüfung wird nach folgendem Beispiel getan (Fig. 2).

Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um 115 Stuten, die auf der Weide

für Tierzüchtung des Ministeriums der Land- und Forstwirtschaft, URAKAWA, und auf der Weide der landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Hokkaido, SHIZUNAI, gehalten wurden.

TABL. 2. Versuchstiere der Schwangerschaftsdiagnose.

Art	Zahl	Alter	Zahl
Leichte Rasse	4	3–5	40
Mittelgewichte Rasse	73	6–8	31
Schwere Rasse	28	9–11	18
Hokkaido Land Rasse	10	12–14	9
		15 über	17
Zusammen	115	Zusammen	115

Versuchsergebnisse

1) Immunisierung

Der immunologische Titer des Serums schwankt signifikant zwischen PMS-Dosis (die biologische Einheit jeder Injektion), Zahl der Injektion, Individuum und nicht signifikant zwischen Adjuvants und Geschlecht. Beim Meerschweinchen ist kein Titeranstieg des Serums zu bemerken.

Bei der Gefrier-Methode (s. Seite 3) war der Titer in weniger als 2 Monaten nicht erheblich abgesunken. In Bezug auf den immunologischen Titer des Serums ist das inaktivierte Serum weniger absinkend, als das nicht behandelte.

2) PMS-Zellen

In der Hämagglutination Reaktion macht es kleinen grossen Unterschied, ob das Blut aus weiblichen oder männlichen Schafen entnommen wurde.

Die PMS-Zellen wurden in dem Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Nach 6 Monaten fielen die PMS-Zellen in sich zusammen.

3) Klinischer Betrieb

Um festzustellen, ob die Unterschiede in der Verteilung der Frequenz, zwischen der Tieart, dem Jahr, dem Individuum und dem Zahlenwert der seit der letzten Begattung vergangenen Tage signifikant oder nicht sind, wurden die Ergebnisse durch Varianzanalyse geprüft.

Der Unterschied in der Verteilung der Frequenz zwischen der Tierart und dem Alter ist nicht signifikant, aber derjenige zwischen dem Individuum und dem Zahlenwert der vergangenen Tage nach der letzten Begattung ist signi-

fikant. ($P<0.05$).

Die Ergebnisse aus der Immunodiagnostik gehen, im Vergleich zu den von der Kombination mit rektaler Diagnostik und "Stamp-Smear" Methode gefundenen Zahlen gesetzt,aus der Tabelle hervor (Tabl. 3).

TABL. 3. *Immunodiagnose mit der rektalen Diagnostik.*

a) Bei Monat, zwischen Immunodiagnostik und Kombinations Diagnostik			b) Bei gleicher Zeit, zwischen zwei Diagnosen	
Schwangerschaft / Diagnostikmethode	+	−	+	−
Immunodiagnostik	38	9	11	4
Kombinationdiagnostik	42	5	9	6

* Bei Immunodiagnostik wurden die Versuchstiere ausgeschlossen, die zwischen (+) und (−) in Reaktion stehen.

Als aber die rektale Untersuchung getan wurde, war seit der Hämagglutination Reaktion schon 1 Monat verstrichen.

Die Vertrauensgrenze für die Annahme wurde nach NEYMAN berechnet. (Wahrscheinlichkeit>95%) (Tabl. 4).

TABL. 4. Grenze für die Annahme unter Bezug auf den Zahlenwert des vergangenen Tages nach der letzten Begattung.

Grenze für die Annahme	30*	50*
	68.28—36.28%	31.76—8.34%

* Der Zahlenwert des Tages nach der letzen Begattung (Fehler für erste Art, bei 95% Vertrauenskoeffizient)

Die Beziehungen zwischen Immuno- und Rektale-Diagnostik wurde durch eine mit Fisher's exact method übereinstimmende Test- Methode berechnet.

Wenn es einen Zeitraum von 1 Monat zwischen zwei Diagnostikmethoden gibt, findet sich eine zufällige Einstimmung von 10%, aber bei gleicher Zeit nur von 2%.

Die Veränderung der Hämagglutinationsreaktion nach den vergangenen Tagen wurde mit 15 Stuten versucht.

Bei den schwangeren Stuten wurde die Hämagglutination-Hemmungs -Reaktion in den ungefähr 180 Tagen seit der letzten Begattung nicht gefunden, und bei den zwei abortiven Stuten war sie 14 Tage nach dem Abort verschwunden. (Tabl. 5–6).

Um der Methode zur quantitativen Messung näherzukommen, wurde die Hämagglutination-Hemmungs-Reaktion mit fortlaufender PMS-Standardlösung bekannter Konzentration mit verdoppeltem Nenner beobachtet. Aus den Untersuchungen ergab sich, dass die Hämagglutination Reaktion bis 1 : 4096 im letzten Glase (mit einem Gehalt von 5,000 I.E./4096 per ml.) kommt.

TABL. 5. Hämagglutination Hemmungs Reaktion nach den vergangenen Tagen

Vergangene Tage (Tage)	30	60	90	120	150	180
erster Versuch	4/5	3/3	2/2	1/1		
zweiter Versuch (nach 60 Tagen)			5/5	3/3	2/2	0/1

* A/B
A : schwanger (+) mittels Hämagglutination- Hemmungs-Reaktion
B : schwanger (+) mittels Kombinationsdiagnostik

TABL. 6. Bei zwei abortiven Stuten, die Veränderung der Hämagglutination Hemmungs Reaktion

Vergangene Tage (Tag)		2	4	6	8	10	12	14	16
Individium	Nr. 1	+	+	+	+	+	±	−	−
	Nr. 2	+	+	+	±	±	−	−	−

Diskussion

Wenn die Inhibition der Hämagglutinations Reaktion entsteht, wurde die Prüfung für die Schwagerschaft als positiver Zustand betrachtet.

Bei der Hämagglutinations Reaktion mit der bekannten PMS-Konzentration, kommt die Hemmung bis 1 : 4096 in letzten Glase. Nach WIDE (1936) bietet das Serum mit einem Gehalt von 1.6 I.E./ml. PMS oder mehr eine positive Seroreaktion dar. Die Ergebnisse in den Vitroversuchen zeigen weitgehende Übereinstimmung mit den in WIDE's Beobachtungen erhaltenen.

Nach den Ergebnisse von COLE und HART (1930) wurde der Höhepunkt der PMS-Konzentration nach etwa 70 Tagen der Schwangerschaft gefunden und die Reaktion etwa 180 Tage nach der Gestation.

WIDE (1962, 1963) kommt zu dem Ergebnis, dass bei den Frauen die Treffsicherheit der Reaktion in bezug auf die Diagnostik der Schwangerschaft am 38 Tage nach dem letzten Menstruationstag 99.8% ist, und dass sie bei

den Stuten in der Zeit von 44 bis 116 Tage nach dem letzten Begattungs-Tage 100% ist.

Dass in diesem Versuch höhere Fehler betrachtet wurden, mag nicht ein Zufall, sondern in umbemerkten Effekten begründet sein. Als Grund wird angegeben, dass wenige Stuten steril werden, dass es einen Zeitunterschied zwischen den zwei Versuchs-Tagen gibt.

Aus der Beobachtung der zwei Stuten, die am 104. bzw. am 114. Schwangerschaftstage abortierten, standen zeitliche Schwankungen des PMS-Gehaltes im Serum mit Hämagglutination Hemmungs-Reaktion in einem ziemlich guten Einklang.

WIDE (1962) ist an der Hand von Menschen zu folgenden Resultaten gekommen : bei der Hysterectomia bleibt der stark positive Ausfall auch noch für 10 Tage nach der Operation bestehen, und bei der normalen Geburt klingt die Hemmung in weniger als 4 bis 10 Tagen ab.

Die Verbindung der hohen Empfindlichkeit, der annehmbaren Genauigkeit, der leichten Verrichtung und des billigen Preises wird diese sehr geeigneten Methode zu der üblichen Prüfung für die Schwangerschaftsuntersuchung machen.

Zusammenfassung

Es wird über die Methodik der Schwangerschaftsuntersuchung in den Stuten nach WIDE berichtet. Eigene Erfahrungen mit einer modifizierten Versuchsanordnung werden besprochen.

1. Anti-PMS-Kaninchenserum agglutinierten PMS-Zellen, und es wurde die Anwesenheit von PMS im Serum gehemmt.

2. Der Agglutinationstiter in Versuchstier steht mit PMS-Dosis, Zahl der Injektion in Beziehung, aber mit Adjuvants, Geschlecht, Alter in keiner Beziehung.

3. Die Grenze für die Annahme nach der Vertrauensgrenze wurde bei 30 Tagen nach der letzten Begattung mit 68.28–36.28% und bei 40 Tage mit 31.70–8.34% (p=95%) berechnet, und mittels übereinstimmenden Tests mit 2%. Aus diesem Grunde muss die Immunodiagnostik für Schwangerschaft vom 40. bis zum 180. Tage nach der letzten Begattung ausgeführt werden.

4. Bei PMS-Standardlösungen bekannter Konzentration, wurde die Hämagglutinations Reaktion bis 1 : 4096 im letzten Glase gehemmt.

5. Bei abortiven Stuten erscheint es, dass die Hemmung in weniger als etwa 10 Tagen abklingt.

Literatur

ARQULLA, E. R. & STAVITSKY, A. B. (1956 a): J. clin. Invest., **35**, 458.
ARQULLA, E. R. & STAVITSKY, A. B. (1956 b): J. clin. Invest., **35**, 467.
COLE, L. R. & FARRELL, V. R. (1955): J. exp. Med., **102**, 631.
LIEPMANN, W. (1902): Dtsch. med. Wschr., **28**, 911.
LIEPMANN, W. (1903 a): Dtsch. med. Wschr., **29**, 80.
LIEPMANN, W. (1903 b): Dtsch. med. Wschr., **29**, 383.
RAMON, G., LEMETAYER, E. & RICHOU, R. (1935): Rev. immunol., **1**, 199, [WIDE 1962].
READ, Ch. H. & STONE, D. B. (1958): J. Dis. Child., Endocr., **13**, 68.
SALK, J. E. (1944): J. Immunol., **49**, 87.
WATANABE, Y. und andere (1964): Chikusan no Kenkyu, **18**, 1969.
WEINBACH, R. (1958): Schweiz. Z. Path., **21**, 1043.
WIDE, L. (1962): Acta endocr., Supplement, **70**.
WIDE, L. & GEMZELL, C. A. (1960): Acta endocr., **35**, 261.
WIDE, L. & WIDE, M. (1963): Nature, **198**, 1017.