

Aus dem Laboratorium des Städtischen Krankenhauses im IV. Bezirk;
Kinderkrankenhaus „Heim Pál“ und Árpád-Krankenhaus, Budapest, Ungarn.

WERTBARKEIT DES DURCH STORCK-HOIGNÉ GESCHILDERTES THROMBOCYTOPENIE-TESTS BEI VERSUCHSTIEREN

Von

György Dóbiás, László Király und Teréz Bertalan

Bei immunbiologischen Untersuchungen wird es oft nötig, den Verlauf der in Versuchstieren hervorgerufenen Überempfindlichkeit zu verfolgen. Ideal für solche Prüfungen wäre ein Verfahren, das den Eintritt bzw. die Änderung der Sensibilisation verlässlich anzeigt, einfach und schnell durchführbar ist und keine besondere Belastung für die Versuchstiere darstellt. Die bis zur Zeit gebräuchlichen Verfahren vermochten diesen Anforderungen nicht in allen Belangen zu genügen. Der anaphylaktische Shock ist ein roher Eingriff und richtet die Tiere meist zugrunde. Die Hautproben sind selbst beim Menschen nicht genügend spezifisch und empfindlich; das Enthaairen der tierischen Haut macht sich dann als weitere Fehlerquelle geltend. Zwar besitzen verschiedene serologische Tests eine grosse Empfindlichkeit, ihre Durchführung ist jedoch meist kompliziert (passive Hämagglutination, Komplementbindung usw.), bzw. erfordert sie besondere Ausrüstung (z.B. der nephelometrische Versuch nach Hoigné); ihr Grundfehler liegt aber darin, nur die zirkulierenden Antikörper nachzuweisen, wogegen an den Überempfindlichkeitsreaktionen vor allem die zellengebundenen Antikörper teilnehmen.

Storck, Hoigné und Koller haben 1951 ein neues Verfahren zum Nachweis des für allergische Vorgänge verantwortlichen spezifischen Antigens entwickelt, dessen Grundsatz darin be-

steht, dass nach Einführung des sensibilisierenden Antigens in den Organismus die Thrombozytenzahl im periphärischen Blut signifikant (unter 80-85 % des Ausgangswertes) fällt.

Die Grundlagen zur Erarbeitung des Verfahrens boten folgende Beobachtungen: 1.) Die Verminderung der Thrombozytenzahl im anaphylaktischen Shock ging eng parallel mit dessen Schwere einher (11, 18). 2.) Nach aspezifischer, nicht immunologischer Verminderung der Blutplättchenzahl bei Kaninchen und Affen stand die Auslösbarkeit der Anaphylaxie bzw. der Schwartzman- und Arthus-Phänomene in umgekehrtem Verhältnis zu der Verminderung der Thrombozytenzahl (1, 5, 6, 7). 3.) Für Schwartzman- und Arthus-Phänomene ist die Bildung von Leukozyten- und Blutplättchen-Thromben viel bezeichnender als Hämorrhagie (1, 3, 16, 17). 4.) Untersuchungen über die Verminderung der Thrombozytenzahl nach Reinjektion des Antigens bei Versuchstieren zeigten, dass dieser Rückgang eines am stärksten konstanten Kennzeichen des allergischen Zustand ist (15).

Der Thrombozytopenie-Test (TPT) wurde anfangs bei Heilmittel-, Nahrungsmittel- und inhalativen Allergien, später mit Erfolg auch bei bakteriellen und mykogenen Sensibilisationen angewendet, wobei zu seiner Auslösung Bakterientoxine, komplette Vakzinen, Bakteriumkörperextrakte, Tuberkulin und Pilzstoffwechselprodukte verwendet wurden (2, 8-10, 12-14, 19, 20). Bei menschlichen staphylogenen Sensibilisationen zeigte sich der Test – unter Verwendung von Staphylokokkus-Anatoxin als Antigen – viel spezifischer und empfindlicher als die verschiedenen Intrakutan-, Kutan- und Epikutanproben (8-10).

Auf Grund der Erfahrungen bei menschlichen allergischen Erkrankungen erscheint der TPT als ein Verfahren, durch das die Nachteile der in Tierexperimenten bislang gebräuchlichen Verfahren vermieden werden können. Im uns vorliegenden Schrifttum fanden wir keine Angaben für Gesetzmässigkeiten, nach welchen die Thrombozytopenie-Reaktion nach Storck und Hoigne bei Versuchstieren abläuft. Darum begannen wir Untersuchungen an Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten,

zur Ermittlung der Bedingungen der Auslösbarkeit der Reaktion, ihrer Empfindlichkeit und Spezifität.

VERSUCHSMATERIALEN UND METHODEN

Antigene. Zu den Untersuchungen dienten natives Hühnereiweiss bzw. Humanserum – in verschiedenen Verdünnungen – und natives Staphylokokkus-Anatoxin (SA). Das SA wurde aus im Fermentor produziertem Staphylokokkus-

¹
Toxin bereitet (21), der DHM-Wert des Toxins betrug 2000 E/ml, die Detoxifizierung erfolgte einen Monat lang bei 37° C mittels 0,3 % Formalins. Der Bindungswert des Anatoxins betrug 1,6 AE/ml, sein Gesamtproteingehalt 700 µg/ml.

Zur *Thrombozytenzählung* diente das Kammervverfahren nach Hegedüs (4), in folgender Weise. Ein Blutprobe von 0,1 ml wurde in die Hagedornsche Pipette aufgezogen und, durch Spülen, einer 0,9-mel-Menge 3,8 %iger Natriumzitratlösung zugesetzt. Nach zweistündigem Stehen wurde aus der kristallklaren, über den abgesetzten Erythrozyten schwimmenden Flüssigkeitsschicht die Thrombozytenzählung in der Bürker'schen Kammer vorgenommen. (Es sei bemerkt, dass die Blutproben vor und nach Verabreichung des Antigens mit der gleichen Pipette abgenommen wurden, wobei diese zwischen beiden Probenahmen mit physiologischer Kochsalzlösung, Alkohol und Äther gespült und getrocknet wurde). Der TPT galt als positiv, wenn der Rückgang der Trombozytenzahl grösser als 20 % des Ausgangswertes vor der Antigenezufuhr war.

Blutentnahmen. Bei Verwendung von SA als Antigen wurde das Blut eine und zwei Stunden nach Einspritzen der sensibilisierenden und auslösenden Antigen Dosen, bei Proteinantigenen (Humanserum, Hühnereiweiss) nur in der zweiten Stunde abgenommen. (Korossy hat bei Impfungen von Menschen mit SA die günstigsten Resultate eine Stunde nach der Antigenezufuhr erhalten (8). Von Meerschweinchen wurden die Blutproben durch Herzpunktion, von Kaninchen aus der Ohrvene, von Ratten aus dem Schwanz entnommen.

Versuchstiere. Zu den Untersuchungen wurden 250–400 g schwere Meerschweinchen, 2000–3000 bzw. 4500–5000 g schwere Kaninchen und 120–160 g schwere Ratten verwende.

ERGEBNISSE

In der ersten Versuchsreihe registrierten wir den zeitlichen Verlauf der Thrombozytenzahl (Bild 1). Wurde zur Sensibilisierung humanes oder animales Protein verwendet, so konnte bei den verschiedenen Arten der Versuchstiere die sicher wertbare 20-%ige Verminderung, *unabhängig vom angewendeten*

ZEITLICHEN ABLAUF DER VERMINDERUNG
DER THROMBOZYTENZAHLE BEI VERSCHIEDENEN TIERARTEN

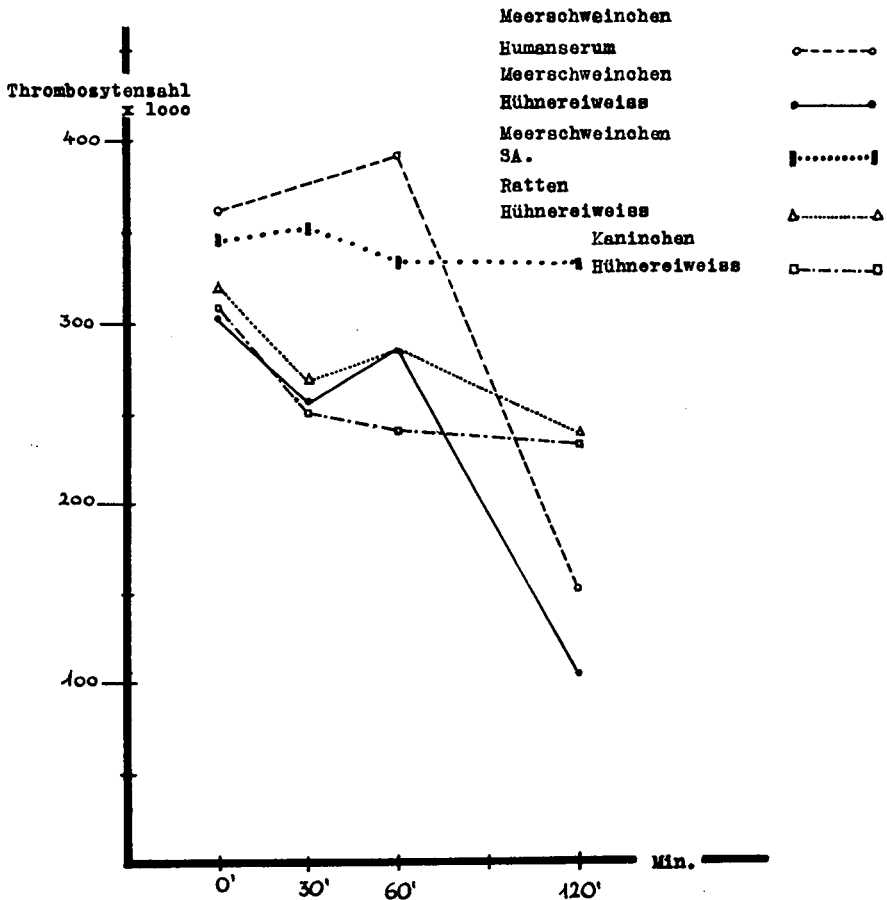


Abb. I.

Antigen, meist nach anderthalb bis zwei Stunden erhalten werden. Dem nach 30 Minuten feststellbaren Rückgang der Thrombozytenzahl folgte ein vorübergehender Anstieg, der wahrscheinlich der Gegenregelungsfunktion des Organismus zuzuschreiben ist. Wurde hingegen die Immunisierung mit SA

vorgenommen, so erhielten wir während der 2-stündigen Beobachtungszeit keine positiv bewertbaren Verminderung der Thrombozytenzahl.

TABELLE 1

Empfindlichkeit des TPT für verschiedene Antigene bei 250–400 g. schweren Meerschweinchen.

Antigen	Immunisierung			Auslösende Dosis* (µg)	Anzahl der Tiere	TPT nach 2 Stunden	
	Gesamtproteinmenge je Impfung (µg)	Zahl der Impfung	Intervallum /Tag/			Pos.	Neg.
Hühnereiweiss	150	1	—	100	6	6	0
	150	5	2	100	4	4	0
Human Serum	35	1	—	350	3	3	0
	10.000	1	—	35	3	3	0
Zusammen:					16	16	0
Natives Staphylokokkus Anatoxin	350	2	6	350	6	1	5
	180	6	1	350	8	0	8
Zusammen:					14	1	13

* 7 Tage nach der letzten sensibilisierenden Impfung.

TABELLE 2

Spezifizität des TPT bei 250–400 g schweren Meerschweinchen

Immunisierende		Auslösende*		Anzahl der Tiere	TPT nach 2 Stunden	
Antigen	Dosis: µg protein	Antigen	Dosis: µg protein		Pos.	Neg.
Hühnereiweiss	10.000	Human Serum	200	7	0	7
Human Serum	10.000	Hühnereiweiss	200	5	0	5
Staphylokokkus-	700	Human Serum	200	4	0	4
Anatoxin	700	Hühnereiweiss	200	4	0	4
Hühnereiweiss	1.000	—	—	4	0	4
Human Serum	1.000	—	—	5	0	5
Staphylokokkus						
Anatoxin	1.000	—	—	4	0	4
Hühnereiweiss	300.000	—	—	3	1	2
Human Serum	70.000	—	—	4	2†	2

* 7 Tage nach der letzten sensibilisierenden Impfung.

† Schwerer Shock.

In weiteren Versuchen untersuchten wir an Meerschweinchen den Zusammenhang zwischen Verminderung der Thrombozytenzahl, angewendetem Antigen und dessen Dosis (Tabelle 1). Wie ersichtlich, war die Probe, mit humanem und animalelem Protein ausgelöst, selbst bei verhältnismässig geringen Antigenmengen und einmaliger immunisierender Impfung ausnahmslos positiv.

Bei Verwendung von SA wurde in der Gruppe der zweimal geimpften Tiere ein einziger Fall positiver Reaktion, in jener der öfter immunisierten keine solche beobachtet. Hierzu sei bemerkt, dass vor der Immunisierung der Staphylokokkus- α -Antitoxintiter bei 13 von 14 Tieren weniger als 0,05 AE/ml betragen und nur jenes Individuum einen Titer von 0,80 AE/ml gezeigt hatte, bei dem dann auch der TPT positiv ausfiel. Zum Schluss der Immunisierung betrug das geometrische Mittel des Staphylokokkus- α -Antitoxintiters für die zweimal geimpften Tiere 0,35 AE/ml für die sechsmal immunisierten 2,05 AE/ml.

TABELLE
Auslösbarkeit des TPT mit Hühnereiveiss

Meerschweinchen						Kanin		
No.	Gewicht /g/	Immunisierende	Auslösende	Intervallum /Tag/	Verminderung der TZ* nach 2 Stunden (in % des Ausgangswertes)	Gewicht /g/	Immunisierende	Auslösende
		Dosis (µg protein)					Dosis (µg protein)	
1	250-450	150 SC.	150 SC.	7	— 66	3000	300000 SC.	1500 SC.
2		„	„	7	— 94	2800	„	„
3		„	„	7	— 56	2500	„	„
8		„	„	7	— 50	3000	„	„
9		„	„	7	— 32	2700	„	„
4		„	„	7	— 57	2200	„	15.000 SC.
5		„	„	7	— 60	2900	„	„
6		„	„	7	— 50	3000	„	„
7		„	„	7	— 61	2500	„	„
10		„	„	7	— 77	4950	„	„
11		„	„	7	— 22	4500	„	„
12		„	„	7	— 30	4800	„	„

* Thrombozytenzahl.

In Tabelle 2 ist die Spezifität des TPT veranschaulicht. Zu diesen Versuchen dienten Meerschweinchen. Nach einmaliger Immunisierung mit verhältnismässig hoher Antigendosis wurde in keinem der Fälle Kreuzsensibilisation beobachtet. Auch bei Injizierung von Antigenmengen zu 1000 μg ohne Vorsensibilisation wurde keine positive Reaktion erhalten. Bei grossen Antigendosen (300 000 μg Eiweissprotein, 70 000 μg Humanserum) kann jedoch bei Meerschweinchen auch ohne Vorsensibilisation eine Verminderung der Thrombozytenzahl von über 20 % vorkommen, wahrscheinlich als Folge des durch das Fremdprotein verursachten primären toxischen Effekts. Bei Kaninchen und Ratten führte die gleiche Dosis in keinen der Fälle positive Reaktion herbei.

In Tabelle 3 sind für Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten die zur Sensibilisierung bzw. zur Auslösung eines positiven TPT erforderlichen Antigenmengen verglichen. Die angeführten Angaben unterrichten über Dauer der Inkubationszeit bei den einzelnen Versuchstierarten, sowie Bedeutung des

3

als Antigen bei verschiedenen Tierarten.

chen		Ratten				
Intervallum /Tag/	Verminderung der TZ.* nach 2 Stunden (in % des Ausgangs- wertes)	Gewicht /g/	Immu- nisi- erende	Auslösende	Intervallum /Tag/	Verminderung der TZ.* nach 2 Stunden (in % des Ausgangs- wertes)
			Dosis (µg protein)			
7	— 5	120-160	60000 sc.	60000 sc.	10	— 27
7	+ 13		”	”	10	— 50
7	— 3		”	”	10	— 56
7	+ 14		”	”	10	— 22
7	— 17		”	”	10	— 31
7	+ 61		”	”	10	— 24
14	— 31		”	” iv.	10	— 15
14	— 21		”	”	10	+ 11
14	— 26		”	”	10	+ 1
14	— 19		”	”	10	+ 5
14	+ 1		”	”	10	— 22
14	+ 10		”	”	10	+ 14

Gewichts und Alters der Tiere und der Zuführungsweise der auslösenden Dosis.

Wurden Kaninchen mit dem 2000 fachen der zur Sensibilisierung von Meerschweinchen nötigen Proteinmenge immunisiert, so konnte nach 7 Tagen selbst mit dem 10 fachen der bei Meerschweinchen wirksamen auslösenden Dosis keine positive Reaktion erhalten werden. Selbst nach 14 Tagen lieferten erst 15 000 μg schwachpositive Reaktionen. Bei älteren Kaninchen blieben positive TPT selbst nach solchen Mengen aus. Bei Ratten, unter subkutaner Injizierung der auslösenden Dosis, war der TPT nach 2 Stunden in jedem Fall positiv, während nach intravenöser Verabreichung die Thrombozytenzahl nach 2 Stunden eher angestiegen war, wahrscheinlich weil nach intravenöser Injektion die Reaktion sehr rasch abläuft und nach 2 Stunden bereits wieder die normalen Verhältnisse zu beobachten sind.

BESPRECHUNG

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse darf festgestellt werden, dass der TPT geeignet zur Prüfung der Überempfindlichkeit von Versuchstieren ist, die Bedingungen seiner Auslösbarkeit jedoch von zahlreichen Umständen abhängig sind. Die Ergebnisse werden beeinflusst durch Art, Gewicht und Alter des Versuchstieres, Quantität und Qualität des angewendeten Antigens, die zwischen sensibilisierender und auslösender Injektion verlaufene Inkubationszeit, Zuführungsart der Injektion (subkutan, intravenös) usw.

Unter gleichbleibenden Umständen ist der Test spezifisch und liefert auch nach mit verhältnismässig geringen Antigenmengen vorgenommener Sensibilisierung positive Ergebnisse, selbst wenn nach Reinjektion des Antigens an den Tieren äusserliche pathologische Symptome (Dyspnoe, Nasenkratzen, Niessen, Unruhe usw.) nicht zu beobachten waren. Im Falle von Änderungen eines der angeführten Faktoren müssen die, für die neuen Bedingungen geltenden optimalen Versuchsbedingungen in Modellversuchen ermittelt werden.

Im Gegensatz zu den menschlichen und tierischen Proteinen,

konnte mit SA bei zweimal bzw. sechsmal immunisierten Meerschweinchen unter 14 Individuen nur bei jenem Tier ein positiver TPT erhalten werden, das schon vor den Impfungen einen mittleren Antitoxintiter hatte. Dieses abweichende Verhalten kann unseres Erachtens folgenderweise erklärt werden. In einer früheren Arbeit (10) berichteten wir darüber, dass bei verschiedenerweise hergestellten SA-Präparaten das gegenseitige Verhältnis der Teilantigene von der Herstellungsmethode des Anatoxins abhängig ist. Die für die Positivität der Überempfindlichkeitsreaktionen verantwortlichen Antigene werden in stärkeren Mengen bei der 4- bis 5-tägigen statischen Züchtung produziert, während ihre Bildung im Verlauf der 6- bis 10-stündigen Fermentorzüchtung unzureichend bleibt, im Gegensatz z.B. zum unter die Immunantikörper gehörenden α -Toxin, das letzterem Falle die höchsten Titer liefert. Das verwendete SA produzierten wir im Fermentor, so dass die sensibilisierenden Antigene wahrscheinlich in minderen Mengen gegenwärtig waren. Die für die Positivität der Überempfindlichkeitsreaktionen (und des TPT) verantwortlichen Antikörper erreichten, obwohl infolge der Immunisierung der α -Antitoxintiter der Blutseren angestiegen war, nicht den zur Auslösung nötigen Schwellenwert, mit Ausnahme jenes Tieres, das schon vor Beginn der Immunisierung α -Antitoxin hatte. Dieses Meerschweinchen hatte während seines Lebenslaufes wahrscheinlich eine Staphylokokkus-Infektion (Sensibilisation?) überstanden, sodass hier die Immunisierung als "Secundärstimulus" wirkte. Es ist anzunehmen, dass durch länger dauernde Immunisierung auch bei den übrigen Tieren positive Reaktionen auslösbar gewesen wären.

Wir wollen erwähnen, dass Korossy (8) bei kokkogenen Ekzematikern, unter Anwendung von SA zur Auslösung, 77 % positive TPT, hingegen bei staphylogenen, meist mit keiner Sensibilisation verbundenen Infektionen (primäre Furunkel, Hydradenitis usw.) nur je 8 % positive TPT verzeichnet hat, obwohl der Organismus auch in letzterem Fall von Antigenreizen betroffen war.

Aus Vorgesagtem folgen die Schlüsse: 1.) Der Antigen

Antikörper-Reaktion in vivo folgt nur dann eine Verminderung der Thrombozytenzahl, bzw. ist zur Auslösung eines positiven TPT nur jenes Antigen fähig, gegenüber welchem zugleich eine Überempfindlichkeit vorgebildet ist. 2.) Das zu positivem TPT führende Antigen zeigt enge Verbindung zu den für die Sensibilisation verantwortlichen Antigenen. 3.) Der TPT ist ein verlässlicher Indikator der Sensibilisation.

Zur Klärung der Verhältnisse führen wir Versuche fort.

ZUSAMMENFASSUNG

Verfasser untersuchten die Bedingungen der Auslösbarkeit des von Storck und Hoigne beschriebenen Thrombozytopenie-Tests an Kaninschen, Meerschweinchen und Ratten. Angaben über Empfindlichkeit und Spezifität der Reaktion für die verschiedenen Versuchstierarten werden mitgeteilt. Auf Grund ihrer Ergebnisse gelangen Verfasser zu dem Schluss, dass der Thrombozytopenie-Test zur Verfolgung der in Versuchstieren entstehenden Überempfindlichkeit geeigneter als die bisher üblichen Verfahren sei.

LITERATUR

1. *Becker, R. M.*: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 247, 69, 1948.
2. *Bergquist, G. & Nilzen, A.*: Acta derm.-Venereol., 58, 40, 1960.
3. *Ebert, R. H., Barclay, W. R. & Ahern, J. J.*: J. Lab. and Clin. Med., 1596, 34, 1949.
4. *Bálint, P. & Hegedüs*: Klinikai Laboratoriumi Diagnosztika, 159 (Művelt Nép, Budapest, 1955).
5. *Humphrey, J. H.*: Brit. J. Exper. Path., 268, 36, 1955.
6. *Kinsell, L. W., Kopeloff, L. M., Zwemer, R. L. & Kopeloff, N. J.*: J. Immunol. 35, 42, 1941.
7. *Kopeloff, N. & Kopeloff, L. M.*: J. Immunol., 471, 40, 1941.
8. *Korossy, S. & Gózon, M.*: Acta Allerg. XIII. 286, 1959: Börnygy. és Venereol. Szemle., 34, 179, 1958.
9. *Korossy, S., Dóbiás, Gy., Backhaus, R. & Gózon, M.*: Acta Allerg. XIII. 295, 1959: Orvosi Hetilap, 100, 134, 1959.
10. *Korossy, S., Gózon, M., Backhaus, R. & Dóbiás, Gy.*: Acta Allerg. XVII, 409-423, 1962; Börnygy. és Venereol. Szemle, 154, 1962.
11. *Miescher, P. et al.*: J. Immunol., 40, 42, 1941.

12. *Nilzen, A.*: Acta derm.-Venereol., 456, 33, 1953.
13. *Nilzen, A.*: Acta derm.-Venereol., 112, 38, 1958.
14. *Nilzen, A.*: Acta derm.-Venereol., 333, 39, 1959.
15. *Rocha e Silva, M.*: Ann. New-York Acad. Sc., 1045, 50, 1950.
16. *Stetson, C. A.*: J. Exper. Med., 489, 93, 1951.
17. *Stetson, C. A.*: J. Exper. Med., 347, 94, 1951.
18. *Storck, H., Hoigné, R. & Koller, F.*: Schw. med. Wschr., 195, 81, 1951.
19. *Storck, H., Hoigné, R. & Koller, F.*: C. r. I. Congr. internat. Zürich 1951, Karger, Basel 1952.
20. *Storck, H. & Hoigné, R.*: Dermatologica, 401, 112, 1956.
21. *Zalay, L., Kiss, Iren, Füvész, J. & Dóbid, Gy.*: Zbl. Bakt. I. 183, 160, 1961.

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.