

Über die Bildung und Bedeutung antibakterieller Antikörper nach Verbrennung

W. VOGEL, B. HEYMER, TH. B. SMITH und O. HAFERKAMP

Pathologisches Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Eingegangen am 5. September 1966

I. Versuch der Absättigung von Kaninchen-Antisera gegen autologe, wäßrige Antigen-Extrakte verbrannter Kaninchenhaut mit Bakterien aus den autologen verbrannten Hautstellen und Antigen-Extrakten

In früheren Untersuchungen konnten HAFERKAMP u. Mitarb. (1963) bei umschriebenen Hautverbrennungen an Kaninchen den Nachweis von agglutinierenden und komplementbindenden Antikörpern gegen einen wäßrigen Extrakt aus verbrannter Kaninchenhaut erbringen. Nach intradermaler Injektion dieser Extrakt-Antigene fanden HAFERKAMP u. Mitarb. (1965) bei verbrannten Kaninchen auch eine Reaktion vom verzögerten Typ. Sie konnten die Bereitschaft zu dieser verzögerten Reaktion mittels lebensfähiger lymphoider Milzzellen auf gesunde Tiere übertragen. Unklar war jedoch die Natur eines eigentlichen Verbrennungsantigens in einem solchen Extrakt, dessen Entstehung JEANJEAN und SIMONART (1962) auf eine bakterielle Infektion der Verbrennungswunde zurückführen.

Nach ALLGÖWER und SIEGRIST (1957) ist die häufigste Spättodesursache bei Verbrennungen eine Septicopyämie. Als Ursache hierfür wird aber von BURRI und ALLGÖWER (1965) die Schädigung der Antikörper bildenden Stätten in der Leber und den reticuloendothelialen Zellen durch eine Summation toxischer Faktoren angesehen.

Diese Unklarheiten veranlaßten uns, die serologischen Untersuchungen an verbrannten Kaninchen zu wiederholen und zunächst einmal zu versuchen, die Antikörper gegen den Extrakt aus verbrannter Haut mit solchen Bakterien abzusättigen, die von den verbrannten Hautstellen und aus den Antigensuspensionen (Extrakt-Antigenen) gezüchtet werden konnten. Sollten die Antisera von den verbrannten Kaninchen tatsächlich ausschließlich gegen bakterielle Antigene aus der Verbrennungswunde gerichtet sein, die auch im Extrakt-Antigen aus diesen Wunden vorliegen würden, so dürfte nach dieser Absättigung keine Reaktion zwischen den Antisera von verbrannten Kaninchen mit dem Extrakt aus verbrannter Kaninchenhaut mehr stattfinden.

Methodik

1. Verbrennung

Bei 10 Kaninchen (Tier Nr. 701—710; Zucht, Gewicht und Fütterung aller Versuchstiere wie bei HAFERKAMP u. Mitarb., 1963) wurden auf dem Rücken und an den Flanken insgesamt 15—18% der Körperoberfläche nach der 1963 von HAFERKAMP et al. angegebenen Methode verbrannt. Das histologische Bild mit den bis in die Subcutis reichenden Coagulationsnekrosen entsprach dem einer Verbrennung 3. Grades. Zur Antigenherstellung diente ein zusätzlich

am rechten Hinterlauf verbranntes und 24 Std danach operativ entferntes Hautstück. Als Kontrollantigene wurden Extrakte aus 24 Std vorher mit einer Zange bis zur Nekrose gequetschter (Tier Nr. 711—713) sowie aus normaler (Tier Nr. 714—715) Kaninchenhaut verwandt.

2. Antigenherstellung

Zuerst wurden die auf -38°C tiefgefrorenen verbrannten, gequetschten und normalen Hautstücke durch eine X-Presse (Fa. Biox, Nacka, Schweden) mit einem Druck von 15—20 atü pro cm^2 gepreßt, wodurch eine maximale Zerreißung des Gewebes und eine Eröffnung der Zellen erreicht wird. Anschließend wurde wie bei HAFFERKAMP et al. (1963) verfahren. Am Eiweißgehalt gemessen (zwischen 788 und 289 mg-%) waren die einzelnen Antigenkonzentrationen wesentlich stärker als bei den früher durchgeführten Untersuchungen.

3. Serologischer Antikörpernachweis

Serumproben der Kaninchen (Tier Nr. 701—713) wurden sowohl vor der Verbrennung bzw. Quetschung als auch am 1., 2., 4., 8., 20., 36. und 64. Tag nach der Traumatisierung entnommen und mit Hilfe der passiven Hämagglutination nach BOYDEN in der Modifikation von STAVITZKY (1954) mit der hierbei üblichen Beurteilung der Agglutinationsbilder am Grunde der Reagenzröhrchen auf Antikörper gegen die wäßrigen Extrakte (Antigen) aus verbrannter, gequetschter und normaler Haut untersucht (Methodik, Kontrollen und Versuchsanordnung sonst wie bei HAFFERKAMP et al., 1963), wobei jedes Serum mit den Verbrennungsantigenen des gleichen Tieres, von dem das Serum stammte, reagierte.

4. Blut- und Hautkulturen der verbrannten Tiere

Von den vor und am 1., 2., 4., 8., 20., 36. und 64. Tag nach der Verbrennung entnommenen Blutproben wurden jeweils 8—10 Tropfen in 18 ml Todd-Hewitt-Brühe (DIFCO) 18 Std bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden an den oben erwähnten Tagen nach der Verbrennung von den verbrannten Hautstellen Abstriche gemacht und auf einer 7% defibriniertes Schafblut

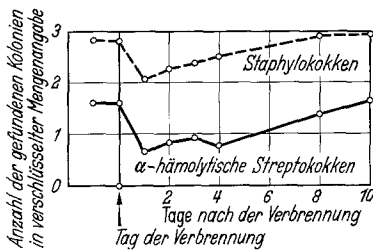


Abb. 1. Bakterielle Besiedlung der verbrannten Hautbezirke in den ersten Tagen nach der Verbrennung am Beispiel der Staphylokokken und der α -hämolytischen Streptokokken. Die Zahlen 1—3 auf der Ordinate entsprechen den verschlüsselten Mengenangaben: 1 = 1—3, 2 = 4—20, 3 = 21—50 Kolonien auf der Blut-Agar-Platte

(SMITH, 1965) enthaltenden Agar-Platte ausgestrichen. Um eine ungefähre Aussage über die Quantität der bakteriellen Besiedlung der verbrannten Hautstellen machen zu können, wurde die Anzahl der auf den Blut-Agar-Platten an den jeweiligen Tagen gefundenen Kolonien festgestellt und folgendermaßen bewertet: 1 = 1—3, 2 = 4—20, 3 = 21—50, 4 = 51—100, 5 = über 100 Kolonien.

Auch die wäßrigen Extrakt-Antigene der verbrannten, gequetschten und normalen Haut wurden auf ihren Bakteriengehalt geprüft. 5—10 Tropfen jeder Antigensuspension wurden in 10 ml Thio-glykolatbrühe inoculiert und über Nacht bei 37°C incubiert. Bei Bakterienwachstum wurden zunächst Unterkulturen auf Blut-Agar- und Phenolrot-Agar-Platten angelegt. Soweit notwendig, wurden weitere Unterkulturen auf Spezialnährböden mit den verschiedenen Routineuntersuchungen durchgeführt.

Bakteriologischer Befund. Bei den zahlreichen Blutproben ließen sich vor und nach der Verbrennung keine Bakterien nachweisen. In den Abstrichen von der verbrannten Haut fanden sich α -hämolytische Streptokokken, Staphylokokken (zum Teil coagulasepositiv, in der Mehrzahl jedoch coagulase-negativ) und gelegentlich auch coliforme Mikroorganismen. Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, war die Anzahl der gefundenen Kolonien in den ersten Tagen nach der Verbrennung gegenüber der vor der Verbrennung geringer. Die Besiedlung der verbrannten Haut nahm dann bis zum 8. Tag zu, an dem sie meist den Ausgangswert wieder erreichte. Außerdem zeigte es sich, daß in den ersten Tagen hauptsächlich Staphylokokken von der verbrannten Haut kultiviert werden konnten und daß sich erst nach einigen Tagen wieder α -hämolytische Streptokokken und coliforme Mikroorganismen in größerer Anzahl fanden. In 4 von 10 Extrakt-Antigenlösungen waren ebenfalls α -hämolytische Streptokokken, Staphylokokken und coliforme Organismen in geringer Anzahl vorhanden.

5. Nachweis von antibakteriellen Antikörpern in den Kaninchenserum

a) *Indirekte Methode* von COONS und KAPLAN. α -hämolytische Streptokokken und coagulasepositive Staphylokokken, die von der verbrannten Kaninchenhaut isoliert worden waren, wurden auf Objektträgern ausgestrichen und mit den *vor* und *nach* der Verbrennung entnommenen Serumproben überschichtet. Entsprechend dem indirekten Immunfluoreszenzverfahren bzw. der sogenannten Sandwich-Methode wurde auf die derart vorbehandelten Ausstriche ein mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes Schaf-Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Conjugat aufgetragen. Es wurden Kaninchenserum-Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50 geprüft (Methodik s. BEUTNER, 1961).

b) *Capillartest* nach LANCEFIELD. Als Präcipitinogen diente ein nach der Methode von LANCEFIELD (1928) gewonnener Extrakt aus einem von der verbrannten Kaninchenhaut isolierten, coagulasepositiven Staphylokokkenstamm. Der Präcipitintest wurde entsprechend dem von SWIFT, WILSON und LANCEFIELD (1943) angegebenen Verfahren durchgeführt. Alle an den oben angegebenen Tagen entnommenen Serumproben wurden untersucht.

6. Absorption der Seren mit den gefundenen Bakterien

Die von der verbrannten Haut der Kaninchen (Tier Nr. 701—710) sowie aus den Antigenlösungen isolierten Staphylokokken wurden in 200 ml tryptic soy broth (DIFCO), die α -hämolytischen Streptokokken in 330 ml Todd-Hewitt-Brühe und die Colibakterien in 200 ml Extraktbrühe 18 Std bei 37° C kultiviert, das Sediment 3 \times in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend im Wasserbad bei 56° C inaktiviert. Danach wurden die inaktivierten Staphylokokken, Streptokokken und Colibakterien in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, zu einem Gemisch vereinigt und zu gleichen Teilen in 15 Zentrifugenröhrchen übertragen. Zur Absorption gelangten die 10 Seren vom 20. Tag und die 5 zu einem Pool vereinigten Seren vom 2., 4., 8., 36. und 64. Tag aller verbrannten Tiere 701—710. Je 3 ml dieser Seren wurden mit dem Sediment der oben beschriebenen Bakteriensuspensionen zusammengebracht und 2 Std unter gelegentlichem Umschütteln bei 37° C ins Wasserbad gestellt. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert und mit allen Proben die passive Hämagglutination nach BOYDEN wiederholt. Die absorbierten Seren wurden ebenfalls mit der indirekten Methode nach COONS und KAPLAN (s. unter 5a) auf ihren Antikörpergehalt gegen Streptokokken und Staphylokokken überprüft.

Ergebnisse

Bei den 10 verbrannten Kaninchen ließ sich mit der passiven Hämagglutination nach BOYDEN eine Antikörperbildung gegen einen Extrakt aus der eigenen verbrannten Haut nachweisen. Bei der Beobachtung der Antikörperbildung im

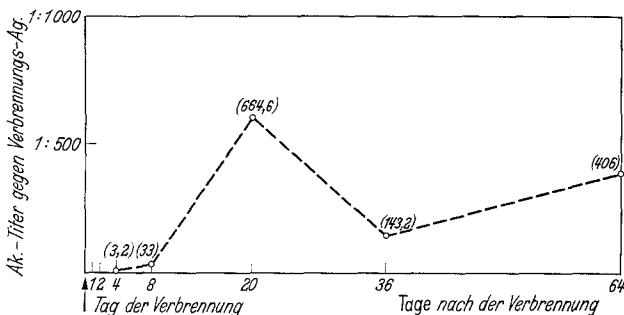


Abb. 2. Mittelwertskurve der mit der passiven Hämagglutination nach BOYDEN gemessenen Antikörpertiter gegen einen wässrigen Extrakt aus verbrannter Haut der Tiere 701—710

Verläufe von mehreren Tagen und Wochen nach der Verbrennung waren, wie die Abb. 2 und die Tabelle 1 zeigen, Maxima der Antikörperbildung jeweils am 20. und 64. Tag erkennbar. Wenn auch bei einigen Tieren der erste Höhepunkt verspätet eintrat, so zeigte doch die Mittelwertskurve (Abb. 2) aller Ergebnisse den als

charakteristisch anzusehenden Anstieg und Abfall der Antikörpertiter in der ersten, 4—5 Wochen dauernden Phase nach der Verbrennung. In den vor der Verbrennung entnommenen Serumproben ließen sich mit den Extrakten aus verbrannter Haut keine Antikörper nachweisen. Die mit den Verbrennungsseren

Tabelle 1. *Untersuchung der Seren der hautverbrannten Tiere 701—710, der hautgequetschten 711—713 und der unbehandelten Tiere 714—715 auf Antikörper gegen einen wäßrigen Extrakt aus verbrannter, gequetschter und normaler Haut. Endtiter (höchste Serumverdünnungsstufe in der noch eine Agglutination der Erythrocyten auftritt) der mit der passiven Hämagglutination nachgewiesenen Antikörper vor der Verbrennung (0*) und am 1., 2., 4., 8., 20., 36. und 64. Tag nach der Verbrennung*

Ka.-Nr.	Ag	Endtiter in der passiven Hämagglutination nach BOYDEN							
		Tag der Blutentnahme:							
		0*	1.	2.	4.	8.	20.	36.	64.
701	a	—	—	—	1:4	1:16	1:1024	1:64	1:1024
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
702	a	—	—	—	—	1:64	1:256	1:64	1:1024
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
703	a	—	—	—	1:2	1:32	1:512	1:16	1:256
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
704	a	—	—	—	1:2	1:64	1:512	1:64	1:32
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
705	a	—	—	—	—	1:16	1:512	1:64	1:32
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
706	a	—	—	—	1:2	1:8	1:1024	1:256	1:256
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
707	a	—	—	1:2	1:4	1:64	1:512	1:128	1:1024
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
708	a	—	—	—	1:4	1:64	1:512	1:128	1:1024
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
709	a	—	—	1:2	1:8	1:16	1:1024	1:64	1:1024
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
710	a	—	—	—	1:8	1:8	1:512	1:128	1:128
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
711	a	—	—	—	—	—	—	—	—
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
712	a	—	—	—	—	—	—	—	—
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Ka.-Nr.	Ag	Endtiter in der passiven Hämagglutination nach BOYDEN Tag der Blutentnahme:							
		0*	1.	2.	4.	8.	20.	36.	64.
713	a	—	—	—	—	—	—	—	—
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
714	a	—	—	—	—	—	—	—	—
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—
715	a	—	—	—	—	—	—	—	—
	b	—	—	—	—	—	—	—	—
	c	—	—	—	—	—	—	—	—

a = Bei Ka.-Nr. 701—710 Extrakt aus der eigenen verbrannten Haut, bei 711—715 Pool-extrakt aus verbrannter Haut der Tiere 701—710. b = Bei Ka.-Nr. 711—713 Extrakt aus der eigenen gequetschten Haut, bei 701—710 und 714—715 Poolextrakt aus gequetschter Haut der Tiere 711—713. c = Bei Ka.-Nr. 714—715 Extrakt aus der eigenen normalen Haut, bei 701—710 und 711—713 Poolextrakt aus normaler Haut der Tiere 714—715.

durchgeführte passive Hämagglutination gegen Extrakte aus gequetschter und normaler Haut anderer Kaninchen fiel negativ aus.

Nach Absättigung der einzelnen, oben genannten Serumproben mit den auf der verbrannten Haut und in den Antigen-Extrakten gefundenen Bakterien ließ sich mit der passiven Hämagglutination kein Abfall des Antikörpertiters gegen das sogenannte „Verbrennungsantigen“, d.h. das Extrakt-Antigen aus verbrannter Kaninchenhaut, feststellen (Tabelle 2). Im Gegensatz zu dem gleichbleibend hohen Titer an Antikörpern gegen den Extrakt aus verbrannter Haut nach Absorption der Seren war nach Überschichten der von der verbrannten Kaninchenhaut isolierten Bakterien mit den absorbierten Seren bei Verwendung des indirekten Verfahrens nach COONS und KAPLAN die vor der Absorption vorhandene, gelbgrüne Fluoreszenz als Ausdruck einer Antikörperbindung durch die Bakterien nicht mehr zu beobachten. Mit dieser Methode war nämlich sowohl vor wie nach der Verbrennung in den Seren bis zu einer Verdünnung von 1 : 10, gelegentlich auch bis zu 1 : 20 das Vorhandensein von Antikörpern gegen die oben erwähnten Bakterien nachweisbar gewesen. Ein nennenswerter Anstieg dieser antibakteriellen Antikörper ließ sich jedoch nach der Verbrennung nicht beobachten. Präzipitierende Antikörper gegen die erwähnten Bakterien waren zu keiner Zeit nachweisbar.

Besprechung

Wie in früheren experimentellen Untersuchungen von HAFERKAMP u. Mitarb. (1963) konnten auch jetzt im Serum verbrannter Kaninchen agglutinierende Antikörper gegen einen Extrakt aus verbrannter Haut nachgewiesen werden. Entsprechende Kontrollen mit einem Antigen-Extrakt aus gequetschter und normaler Haut waren negativ. Bei der Beobachtung der Antikörpertiter über mehrere Wochen zeigte sich, daß die ersten derartigen Antikörper meist schon am 8. Tag nach der Verbrennung feststellbar waren. Am 20. Tag erreichten sie ein erstes Maximum und fielen während der 4. Woche ab. Ein zweiter Höhepunkt zeigte sich um den 64. Tag.

Ähnliche Verhältnisse der Antikörperbildung fanden auch DOBRKOVSKY u. Mitarb. (1960) sowie PAVKOVA u. Mitarb. (1965) bei zahlreichen Serumuntersuchungen nach schweren Verbrennungen beim Menschen.

FEODOROV (1956), MALM und SLAWIKOWSKI (1962) und ROSENTHAL u. Mitarb. (1961) messen derartigen Antikörpern — wie aus ihren Untersuchungen mit

Rekonvaleszentenseren hervorgeht — eine neutralisierende bzw. protektive Wirkung bei. Sie nehmen an, daß diese Antikörper gegen verbrennungsspezifische Antigene oder Toxine aus der verbrannten Haut gerichtet sind. Die eigentliche Natur des Verbrennungsantigens ist jedoch noch keineswegs geklärt. Ob es sich hierbei um Peptone aus hitzedenaturiertem Eiweiß (PFEIFFER, 1925) handelt, scheint keineswegs bewiesen.

JEANJEAN und SIMONART (1962) führen das Verbrennungsantigen nicht auf denaturierte Eiweißabbauprodukte, sondern auf Substanzen zurück, die durch bakterielle Infektion der Verbrennungswunde entstehen. Bei spontaninfizierten Ödemen konnten JEANJEAN und ISTACE (1964) im Gegensatz zu sterilen Ödemen infolge Hitzeeinwirkung eine eindeutige proteolytische Fermentaktivität (GODFRAIND, 1958) feststellen. Erwartungsgemäß fand sich bei unseren Untersuchungen auf den verbrannten Hautbezirken in den ersten Tagen nach der Verbrennung eine deutliche Verminderung der bakteriellen Besiedlung. Wie aus Untersuchungen beim Menschen bekannt ist (ARTZ, 1963), kommt es häufig unter der sterilen Wundoberfläche

Tabelle 2. *Endtiter verbrennungsbedingter Antikörper in der passiven Hämagglutination nach BOYDEN vor und nach Absorption der Seren mit den auf den verbrannten Hautstellen und in den Antigenextrakten gefundenen Bakterien. Geprüft wurden die Serumproben der Tiere 701—710 vom 20. Tag nach der Verbrennung gegen einen wäßrigen Extrakt aus der eigenen verbrannten Haut sowie die Poolseren aller Tiere vom 2., 4., 8., 36. und 64. Tag nach der Verbrennung gegen einen Poolextrakt aus verbrannter Haut aller Tiere*

Nr. der Seren vom 20. Tag	Endtiter verbrennungsbedingter Antikörper in der passiven Hämagglutination nach BOYDEN	
	vor Absorption	nach Absorption
701	1:1024	1:1024
702	1:256	1:256
703	1:512	1:512
704	1:512	1:512
705	1:1024	1:512
706	1:1024	1:1024
707	1:512	1:512
708	1:256	1:256
709	1:1024	1:1024
710	1:512	1:256
Poolseren der Tiere 701—710 vom		
2. Tag	—	—
4. Tag	1:16	1:16
8. Tag	1:8	1:8
36. Tag	1:32	1:32
64. Tag	1:64	1:32

zu einer Vermehrung der in den Haarfollikeln primär vorhandenen und durch die Verbrennung nicht abgetöteten Bakterien. Bei unseren hautverbrannten Kaninchen konnten wir derartiges nicht beobachten. Wir fanden jedoch eine deutliche sekundäre Zunahme der auf der Hautoberfläche befindlichen Bakterien (Staphylokokken, α -hämolytische Streptokokken, Coli) 5—8 Tage nach der Verbrennung im Bereich der Verbrennungswunde. Zu keiner Zeit konnten wir jedoch im Blut Bakterien oder vermehrte antibakterielle Antikörper, etwa gegen α -hämolytische Streptokokken und Staphylokokken, nachweisen.

Die mit dem indirekten Immunfluoreszenzverfahren nach COONS und KAPLAN, welches wesentlich empfindlicher ist als der Präzipitationstest (SMITH u. Mitarb., 1962), feststellbare gelbgrüne Fluoreszenz der Staphylokokken und Strepto-

kokken war als Ausdruck einer Anwesenheit von Antikörpern gegen diese Erreger in gleicher Stärke auch schon vor der Verbrennung vorhanden. Weiter macht auch das negative Ergebnis unserer Absorptionsversuche von „Verbrennungsantikörper“ enthaltenden Seren mit eben den auf der verbrannten Haut und in den wäßrigen Antigen-Extrakten gefundenen Bakterien es eher unwahrscheinlich, daß das sogenannte „Verbrennungsantigen“ auf eine bakterielle Infektion der Verbrennungswunde zurückzuführen ist. Der mit der passiven Hämagglutination nach BOYDEN gemessene Antikörperspiegel gegen das Extrakt-Antigen aus verbrannter Kaninchenhaut war vor und nach der Absorption mit den Bakterien aus der Verbrennungswunde gleich. Die Effektivität dieser Absorption konnte mit der Methode von COONS und KAPLAN von uns bewiesen werden; bei Überschichten der Bakterien mit den absorbierten Seren und anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat markiertem Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Konjugat war nämlich die vor der Absorption feststellbare gelbgrüne Fluoreszenz der Bakterien nicht mehr nachweisbar.

II. Einfluß der Verbrennung auf die antibakterielle Antikörperbildung

Bei den vorangehenden tierexperimentellen Untersuchungen (Teil I) konnten wir bereits bestätigen, daß in Seren hautverbrannter Kaninchen Antikörper gegen Extrakte nur aus verbrannter — und nicht gequetschter oder normaler — Haut nachweisbar sind; diese Antikörper ließen sich nicht mit auf der verbrannten Kaninchenhaut gefundenen Bakterien absorbieren.

Die Klärung der Frage, ob die beim Menschen bei einer Verbrennung auftretende Abwehrschwäche gegen bakterielle Infekte als Folge einer Schädigung der Produktionsstätten für Antikörper aufzufassen ist, erschien uns bei unserer Versuchsanordnung nur durch zusätzliche bakterielle Immunisierung möglich. Wir führten deshalb bei einer Reihe von Kaninchen gleichzeitig mit der Verbrennung eine Immunisierung gegen β -hämolytische Streptokokken durch und setzten diese Immunisierungsergebnisse in Vergleich zu den Resultaten der Immunisierung nicht verbrannter Tiere.

Methodik

1. Verbrennung und Antigenherstellung

15—18% der Körperoberfläche von 10 Kaninchen (Tier Nr. 731—740) wurden wie in Teil I beschrieben verbrannt (HAFERKAMP u. Mitarb., 1963). Die Antigenherstellung geschah ebenfalls wie dort angegeben. Der Eiweißgehalt der Antigenextrakte betrug durchschnittlich 540 mg-%. Als Antigenkontrollen dienten die Extrakte aus gequetschter und normaler Kaninchenhaut (Tier Nr. 711—715).

2. Immunisierung der hautverbrannten Kaninchen mit β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe A

Die verbrannten Kaninchen wurden in zwei Gruppen geteilt. Die erste Gruppe (Tier Nr. 731—735) erhielt mit Beginn am 1. Tag nach der Verbrennung, die zweite Gruppe (Tier Nr. 736—740) mit Beginn am 7. Tag nach der Verbrennung eine Serie von i. v. Injektionen einer Aufschwemmung von inaktivierten β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe A (Stamm J 17 A 4 des Rockefeller Instituts, New York). Die Präparation des Streptokokkenantigens erfolgte wie bei SMITH, 1965, beschrieben, jedoch wurde, anders als dort angegeben, eine Pepsinbehandlung der Bakterien unterlassen.

Injektionsschema: An jeweils drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden i.v. folgende Mengen der Antigensuspension injiziert:

1. Woche = $3 \times 0,5$ ml,
2. Woche = $3 \times 1,0$ ml,
3. Woche = $3 \times 1,0$ ml
4. Woche = $3 \times 1,0$ ml.

8 Tage nach der letzten Antigengabe erhielten alle Tiere eine Booster-Injektion. Als Kontrolle der antibakteriellen Antikörperbildung bei den verbrannten Kaninchen (Tier Nr. 731—740) dienten die Werte von 10 nicht verbrannten, ebenfalls gegen Streptokokken der Gruppe A sensibilisierten Kaninchen (Tier Nr. 741—750). Bei dieser Versuchsgruppe bestanden hinsichtlich der Immunisierung völlig gleichartige Verhältnisse.

3. Nachweis der gegen Extrakte aus der verbrannten Haut gerichteten Antikörper

Mit der passiven Hämagglutination nach BOYDEN in der Modifikation nach STAVITZKY (1954) wurden Serumproben der Tiere 731—740 vor der Verbrennung und am 7., 14., 21., 28., 35. und 48. Tag nach der Verbrennung auf Antikörper gegen den wäßrigen Extrakt (Antigen) aus verbrannter Haut untersucht.

4. Nachweis der gegen Streptokokken gerichteten Antikörper

a) Capillartest nach LANCEFIELD. Methodik s. Teil I.

Untersucht wurden alle vor und nach der Verbrennung entnommenen Serumproben (s. oben) sämtlicher Tiere (Nr. 731—740 und 741—750).

b) Agglutinationstest. Zur Anwendung kam der Agglutinationstest wie er bei Bakterien üblich ist (KABAT und MAYER, 1964).

Als Antigen diente eine Aufschwemmung von inaktivierten Streptokokken der Gruppe A (Stamm J 17 A 4) in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Gehalt von etwa 1×10^9 Bakterien pro ml. Es wurden alle Serumproben in Verdünnungen von 1:20 bis 1:10 240 geprüft.

Ergebnisse

Bei den hautverbrannten Kaninchen (Tier Nr. 731—740) konnte ebenfalls eine Antikörperbildung gegen einen Extrakt aus der eigenen verbrannten Haut gefunden werden. Titerhöhe und Titerverlauf entsprachen in etwa den Ergebnissen der ersten Versuchsgruppe (s. Teil I). Sowohl die 10 nicht verbrannten Kontrolltiere (Tier Nr. 741—750) als auch die 10 verbrannten Kaninchen (Tier Nr. 731—740) zeigten bereits am 7. Tag nach Beginn der Immunisierung mit dem Bakterien-Agglutinationstest nachweisbare Antikörper gegen β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A. Der Titer dieser Antikörper erreichte meist um den 14. Tag nach Immunisierungsbeginn einen Höhepunkt, fiel dann deutlich ab, um nach dem 21. Tag erneut anzusteigen. Diese zweite, in der Mehrzahl der Fälle langsame Zunahme der Antikörper erfolgte fast immer schon vor der am 28. Tage nach Immunisierungsbeginn durchgeführten Booster-Injektion (Abb. 3). Es wäre also zunächst festzuhalten, daß die Antikörperbildung gegen die injizierten Streptokokken-Antigen-Suspensionen bei den für den Vergleich herangezogenen, nicht hautverbrannten Kaninchenkollektiven in gleicher Weise erfolgte. Wie aus den Abb. 3, 4 und 5 zu ersehen, lag der mittlere Antikörpertiter in der Gruppe der nicht verbrannten Kaninchen (Tier Nr. 741—750) am höchsten. Die Antikörper-Mittelwertskurve der Tiere, bei denen zugleich mit der Verbrennung die Immunisierung begonnen wurde (Tier Nr. 731—735), zeigte im Vergleich dazu einen geringen Abfall, während die 5 Kaninchen, die erst eine Woche nach

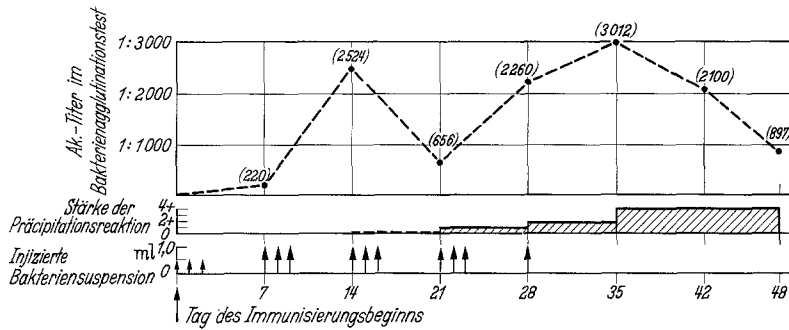


Abb. 3. Mittelwertskurve der im Bakterienagglutinationstest gemessenen antibakteriellen Antikörpertiter im Vergleich zur Stärke der Präzipitinreaktion von 10 nichtverbrannten und mit inaktivierten Streptokokken der Gruppe A (Stamm J 17 A 4) immunisierten Kaninchen (Tier Nr. 741–750)

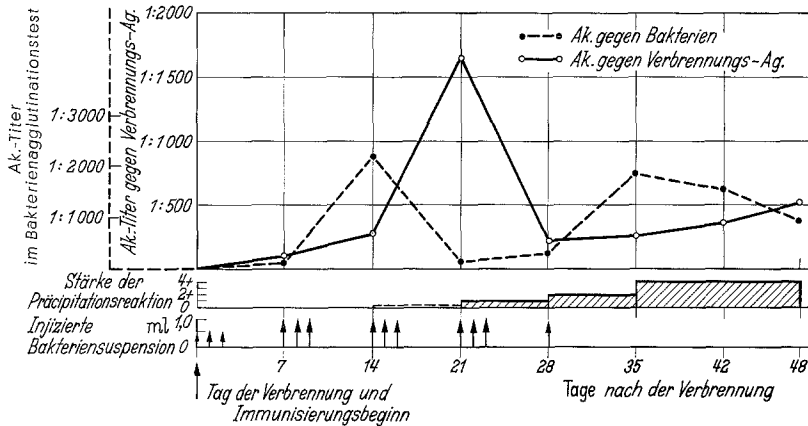


Abb. 4. Mittelwertskurve der Antikörpertiter gegen Verbrennungsantigen im Vergleich zur Mittelwertskurve der Antikörpertiter gegen Streptokokken der 5 Kaninchen 731–735, bei denen die Immunisierung mit Streptokokken (Stamm J 17 A 4) am Tage der Verbrennung begonnen wurde

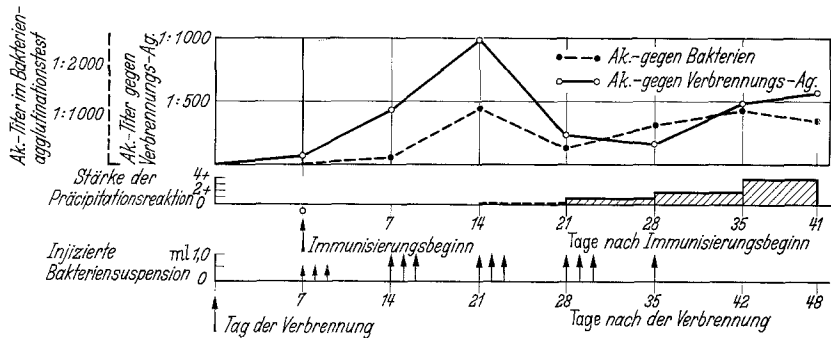


Abb. 5. Mittelwertskurve der Antikörpertiter gegen Verbrennungsantigen im Vergleich zur Mittelwertskurve der Antikörpertiter gegen Streptokokken der 5 Kaninchen 736–740, bei denen die Immunisierung mit Streptokokken (Stamm J 17 A 4) erst am 7. Tag nach der Verbrennung begonnen wurde

der Verbrennung immunisiert wurden (Tier Nr. 736–740), bereits deutlich niedrigere Werte erkennen ließen.

Im Präzipitationstest konnten Antikörper gegen β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A jeweils erst am 14. bzw. 21. Tage nach Immunisierungsbeginn, und dann auch meist nur schwach, nachgewiesen werden. Nach dieser

Zeit wurde der Ausfall der Präzipitationsreaktion jedoch kontinuierlich stärker und erreichte sein Maximum um den 35. Tag (Abb. 3, 4 und 5).

Infolge der mehr qualitativen als quantitativen Beurteilung der Präzipitate ließ sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der antibakteriellen Antikörperproduktion bei den verschiedenen Versuchsgruppen nicht feststellen.

Die Beobachtung, daß der Agglutinationstest regelmäßig um 1—2 Wochen vor dem Präzipitationstest positiv wurde, konnte sowohl bei der Gruppe der verbrannten Kaninchen (Tier Nr. 731—740) als auch bei den nicht verbrannten Kontrolltieren (Tier Nr. 741—750) gemacht werden.

Besprechung

1964 berichteten SCHNEEWEISS, MATHES und LINDNER über Immunisierungsversuche mit Brucellen-Antigenen an je drei hautverbrannten und thymektomierten Ratten. Sie fanden, daß die Antikörperspiegel gegen Brucellen bei den verbrannten Tieren deutlich niedriger lagen als bei einer nicht verbrannten und ebenfalls immunisierten Kontrollgruppe.

Die in unseren Versuchen bei den Kaninchen (Tier Nr. 736—740), die erst eine Woche nach der Verbrennung die erste Injektion von β -hämolytischen Streptokokken erhielten, gefundenen, relativ niedrigen Antikörpertiter könnten in etwa noch in Übereinstimmung mit diesen Befunden erwähnt werden. Andererseits sahen wir jedoch keinen eindeutigen Unterschied in der Höhe der Agglutinationstiter zwischen der Kaninchengruppe (Tier Nr. 731—735), die gleichzeitig mit der Verbrennung die ersten Injektionen von Streptokokkenantigenen erhielt, und der Gruppe (Tier Nr. 741—750), die — ohne Hautverbrennungen — nur gegen Streptokokken immunisiert wurde. Offenbar spielt also ein Zeitfaktor — Zeitraum zwischen Verbrennung und Immunisierungsbeginn — eine gewisse Rolle, obwohl auch die hautverbrannten, jedoch erst eine Woche nach der Verbrennung zusätzlich mit Streptokokken behandelten Kaninchen bezüglich ihrer niedrigeren Titerhöhe gegenüber den anderen Versuchstieren keine statistisch signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Das für die Immunisierung unserer hautverbrannten Kaninchen und der Kontrolltiere benutzte Antigen-Injektionsschema entsprach dem im Armed Forces Institute of Pathology (Washington, USA) zur Herstellung von Streptokokken-Hyperimmunseren üblichen Verfahren. Das Kriterium einer ausreichenden Immunisierung ist dabei primär der mit dem gruppenspezifischen Lancefield-Extrakt (LANCEFIELD, 1955) festgestellte Ausfall der Präzipitinreaktion. Da diese nun im Gegensatz zu der Agglutinationsreaktion (7.—8. Tag) relativ spät positiv wird (14.—21. Tag), ist eine Immunisierung über das mit dem Agglutinationstest gemessene, scheinbare Optimum hinaus erforderlich. Als Erklärung für den Abfall der Bakterienagglutinationstiter in der 3. Woche der Immunisierung (Abb. 3) bietet sich das Phänomen der immunologischen Überbürdung (GILLERT und EICHORN, 1960) an: die inzwischen gebildeten humoralen Antikörper werden durch weiter injizierte, große Antigenmengen abgesättigt. Die zweite Beobachtung, nämlich die, daß der Agglutinationstest bereits 1—2 Wochen vor dem Präzipitationstest positiv wird (Abb. 3) ist aus mehreren Gründen leicht verständlich: einerseits ist bekannt, daß für die Agglutinationsreaktion wesentlich kleinere Antikörpermengen als für die Präzipitationsreaktion erforderlich sind (ISLICKER,

1957), und andererseits ist es sehr wahrscheinlich, daß zu Beginn einer Immunisierung mit Streptokokken-Antigenen nur 19S- γ -Globuline als Antikörper, welche nicht präzipitieren, wohl aber agglutinieren, gebildet werden, und erst später die Produktion von 7S- γ -Globulin-Antikörpern, welche sowohl präzipitierende als auch agglutinierende Eigenschaften haben, einsetzt (KRAUSE).

Der Aussagewert dieser Immunisierungstechnik wird durch die immunologische Überbürdung in keiner Weise eingeschränkt, da erstens die Versuchsbedingungen bis auf den zu untersuchenden Faktor, nämlich die Verbrennung, bei beiden Kaninchengruppen gleich waren, und zweitens aus dem ersichtlichen parallelen Auftreten dieses Phänomens keine Interpretationsschwierigkeiten entstehen.

Wenn auch bei sehr schweren Verbrennungen, die zu einer Septicopyämie als Spättodesursache führen, eine Schädigung der Antikörper bildenden Stellen durch eine Summation toxischer Faktoren anzunehmen ist (Zusammenbruch der energetischen Bilanz nach schweren Verbrennungen, DOLECZEK, 1962), so konnten doch bei den hier durchgeführten Versuchen Hinweise dafür erzielt werden, daß grundsätzlich eine Hemmung der antibakteriellen Antikörperbildung, etwa im Sinne einer „Competition“ der Antikörperbildung, nach Verbrennung wohl nicht angenommen werden darf; konnten doch bei der großen Variationsbreite der Antikörperbildung beim Kaninchen bei allen unseren — mit und ohne Hautverbrennung — Versuchsgruppen im wesentlichen gleiche Verhältnisse der Antikörperbildung gefunden werden.

Zusammenfassung

I. In den Seren von hautverbrannten Kaninchen konnte mit der passiven Hämagglutination nach BOYDEN der Nachweis humoraler Antikörper gegen einen wäßrigen Extrakt aus verbrannter Kaninchenhaut erbracht werden. Diese Antikörper ließen sich mit Bakterien, welche von den verbrannten Hautstellen und aus den Antigen-Extrakten gezüchtet worden waren, nicht absorbieren. Darüberhinaus konnte weder ein Anstieg noch ein Abfall der antibakteriellen Antikörpertiter in den Seren hautverbrannter Kaninchen nach der Verbrennung festgestellt werden. Der negative Ausfall der Absorptionsversuche wird als Hinweis auf die Spezifität der verbrennungsabhängigen Antikörper angesehen, die nichts mit einer bakteriellen Infektion der Verbrennungswunde zu tun haben.

II. Beim Vergleich einer Gruppe von Kaninchen, welche gleichzeitig mit einer experimentellen Hautverbrennung gegen β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A immunisiert worden war, mit einer Gruppe nicht verbrannter, nur gegen diese Bakterien immunisierter Kaninchen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der antibakteriellen Antikörperbildung nachweisen. Eine Hemmung des antikörperbildenden Systems infolge Verbrennungen beschränkten Ausmaßes (15—18% der Körperoberfläche) scheint also im Tierversuch nicht vorzuliegen.

The production and significance of antibodies against bacteria in burn diseases

Summary

I. By indirect hemagglutination test according to the method of BOYDEN, antibodies against saline extract of burned skin from burnt rabbits can be demonstrated. These antibodies cannot be absorbed with bacteria cultured either from

the burned skin or from the extract of burned skin. No increase nor decrease in antibody titer against bacteria is found in the sera of rabbits with burned skin. Negative finding of the absorption experiment is seen as an indication of the specificity of the antibody in the sera of burnt animals and that the antibody production is caused by burning and not by bacterial infection.

II. Two groups of rabbits were skin burned and immunized with Group A hemolytic streptococci. The first injection was given two hours, respectively 7 days, after burning. A third group was similarly immunized but without any burning. There was no difference found in the elaboration of antibody against the organism nor was there any inhibition of antibody production seen.

Literatur

- ALLGÖWER, M., u. J. SIEGRIST: *Verbrennungen: Pathophysiologie-Pathologie-Klinik-Therapie*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- ARTZ, C. P.: Burn infections. *Sth. med. J.* **56**, 1071—1074 (1963).
- BEUTNER, H. E.: Immunfluorescent staining; the fluorescent antibody method. *Bact. Rev.* **25**, 49—76 (1961).
- BURRI, C., u. M. ALLGÖWER: Intestinale Faktoren im Verbrennungsschock. *Z. ges. exp. Med.* **139**, 189—199 (1965).
- COONS, A. H., and M. H. KAPLAN: Localization of antigens in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.* **91**, 1—13 (1950).
- DOBRKOVSKY, M., J. DOLEZALOVA, and L. PAVKOVA: Report on proceedings of the first Internat. Congr. on Research in Burns, p. 260. Washington D. C.: National Research Council 1960.
- DOLECEK, R., and J. KALINA: Recent views on the pathogenesis of some clinical features in burns disease. *Acta chir. plast.* **4**, 278—294 (1962).
- FEODOROV, N. A.: Über die Verbrennungskrankheit. *Tez. Dokl. 2-j, Vsesojuzn. konf. patofiziol.*, Kiev 1956.
- GILLERT, K. E., u. G. EICHHORN: Über das unterschiedliche Vermögen von Kaninchen präzipitierende Antikörper gegen Humanalbumin zu bilden. *Z. Immun.-Forsch.* **119**, 430—443 (1960).
- GODFRAIND, T.: *L'auto-intoxication après brûlure*. Bruxelles: Arscia 1958.
- HAERKAMP, O., H. SCHÄFER, H. ASAMER, G. FINGER u. H. WEGNER: Experimentelle Untersuchungen über eine Allergie vom verzögerten Typ nach Verbrennung und ihre homologe Übertragung. *Virchows Arch. path. Anat.* **338**, 261—276 (1965).
- — M. HENRIQUEZ, G. FINGER, F. MARTINEZ u. M. YOSHIDA unter technischer Mitarbeit von H. WEGNER: Experimentelle Untersuchungen zur pathogenen Bedeutung von spezifischen Iso- und Auto-Antikörpern nach Verbrennung. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 65—87 (1963).
- ISLIKER, H. C.: The chemical nature of antibodies. *Advanc. Protein Chem.* **12**, 387—463 (1957).
- JEANJEAN, M., et G. ISTACE: Pouvoir protéolytique de l'œdème de brûlure. *Rev. belge Path.* **30**, 199—204 (1964).
- , et A. SIMONART: Infection et toxicité de l'œdème de brûlure. *Rev. belge Path.* **28**, 397—406 (1962).
- KABAT, E. A., and M. M. MAYER: *Experimental immunochemistry*, p. 114—116. Springfield (Ill.): CH. C. THOMAS 1964.
- KRAUSE, R.: Persönliche Mitteilung 1966.
- LANCEFIELD, R. C.: The antigenic complex of streptococcus hemolyticus. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of streptococcus hemolyticus. *J. exp. Med.* **47**, 91—92 (1928).
- Technical procedures employed in the production and use of streptococcus grouping sera. The Hospital of the Rockefeller Institute for Medical Research, Publisher, New York. N.Y. USA 1955, p. 1—5.

- MALM, O. J., and G. J. M. SLAWIKOWSKI: Evaluation of different types of convalescent burn sera in the rat. *Res. Burns* **9**, 282—290 (1962).
- PAVKOVA, L., J. DOLEZALOVA, and Z. KONIKOVA: Immunological changes in the serum of patients with severe burns. *Rev. Czechosl. Med.* **11**, 2, 91—103 (1965).
- PFEIFFER, H.: Die Eiweißzerfallsvergiftungen. *Krankheitsforsch.* **1**, 407—444 (1925).
- ROSENTHAL, S. R., J. B. HARTNEY, and W. A. SPURRIER: The "Toxin-antitoxin" phenomenon in burned and injured human subjects. *J. Amer. med. Ass.* **174**, 957—965 (1960).
- SCHNEEWEISS, U., TH. MATTHES u. D. LINDNER: Immunbiologische Reaktionen nach experimenteller Thymektomie bei Verbrennungen. *Zbl. Chir.* **90**, 1112—1117 (1965).
- SMITH, CH. W., J. F. METZGER, and M. D. HOGGAN: Immunfluorescence as applied to pathology. *Amer. J. clin. Path.* **38**, 26—42 (1962).
- SMITH, TH. B.: Clinical application of immunofluorescence. I. Grouping β -hemolytic streptococci. *J. Bact.* **89**, 198—204 (1965).
- STAVITZKY, A. B.: Micromethods for the study of proteins and antibodies of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reaction with tannic-acid and protein treated red blood cells. *J. Immunol.* **72**, 360—367 (1954).
- SWIFT, H. F., A. T. WILSON, and R. C. LANCEFIELD: Typing group A hemolytic streptococci by M-precipitin reactions in capillary pipettes. *J. exp. Med.* **78**, 127—133 (1943).

Dr. W. VOGEL; Dr. B. HEYMER; Dr. TH. B. SMITH; Prof. Dr. O. HAFFERKAMP
Pathologisches Institut der Universität
53 Bonn 1, Postfach