

# Komplementbestimmungen im Serum und im Tracheobronchialsekret von chronisch lungenkranken Pferden

Autor(en): **Grünig, G. / Lerch, C. / Hermann, M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **130 (1988)**

PDF erstellt am: **05.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-592270>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 130, 571–581, 1988

Aus der Abteilung für Angewandte Physiologie des Veterinär-Physiologischen Instituts  
(Leiter Prof. Dr. R. v. Fellenberg)  
und der Veterinär-medizinischen Klinik<sup>1</sup>  
(Direktor Prof. Dr. P.-F. Suter)

## Komplementbestimmungen im Serum und im Tracheobronchialsekret von chronisch lungenkranken Pferden<sup>3</sup>

G. Grünig<sup>2</sup>, C. Lerch, M. Hermann<sup>1</sup> und R. von Fellenberg

### Einleitung

Chronische Lungenkrankheiten beim Pferd sind histologisch durch eine chronische Bronchiolitis charakterisiert (Breeze 1979, Schoon und Deegen 1983, Viel 1983, Winder 1987). Perivaskuläre und peribronchioläre Lymphozyteninfiltrationen bestehen schon bei leichtgradig erkrankten Tieren; sie sind bei schwer erkrankten Pferden stärker ausgeprägt. Weiterhin ist die Anzahl IgG- und IgA-haltiger Zellen erhöht (Winder 1987). Die luftleitenden Wege schwer erkrankter Tiere enthalten z. T. massenhaft Neutrophile (Breeze 1979, Schoon und Deegen 1983, Viel 1983, Winder 1987).

Diese Veränderungen deuten auf eine Stimulierung der Lunge durch Antigen hin. Denkbar wäre, dass diese Antigene aus dem Stall- und Heustaub eingeatmet werden. Diese exogenen Antigene sind höchstwahrscheinlich Sporen thermophiler Actinomyeten, anderer Streptomyces-Arten und Pilzsporen (McPherson et al. 1979, Halliwell et al. 1979, Grünig et al. 1986). Endogene Antigene könnten Viren sein oder durch persistierende Virusinfektionen produziert werden (Thorsen et al. 1983).

Das Komplementsystem ist an vielen Immunprozessen beteiligt. Antigen-Antikörper-Komplexe aktivieren es auf dem klassischen Weg; Komplement kann aber auch ohne Beteiligung von Antikörpern durch verschiedene Substanzen, z. B. durch Membranbestandteile von Mikroorganismen auf dem Alternativweg aktiviert werden. Aktivierte Komplementkomponenten wirken als Chemotaxine, Opsonine und Anaphylatoxine. Sie können Viren neutralisieren und Mikroorganismen sowie Zellen töten und lysieren (Linscott 1986). Weiterhin modulieren diese Substanzen *in vitro* die Antikörperproduktion und die Proliferation von Lymphozyten (Egwang und Befus 1984). Komplementfaktoren fördern die Clearance von Immunkomplexen (Egwang und Befus 1984). Die Aktivität der Komplementfaktoren wird auf verschiedene Arten reguliert: Nur bestimmte Immunglobulin-Klassen und -Subklassen können Komplement aktivieren

<sup>2</sup> Adresse: Dr. G. Grünig, Institut für Veterinär-Physiologie, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich

<sup>3</sup> Die Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds Nr. 3.872-0.86 unterstützt.

(Linscott 1986). Einige Faktoren sind instabil, so dass sie nur in der unmittelbaren Umgebung ihrer Entstehung und nur zeitlich begrenzt wirksam sind. Weiterhin gibt es Inhibitoren für verschiedene Komplementfaktoren (Linscott 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurden Seren und Tracheobronchialsekrete (TBS) von gesunden und von lungenkranken Pferden in bezug auf ihre hämolytische Komplementaktivität untersucht. Gesunde und lungenkranke Pferde hatten gleiche hämolytische Aktivitäten in den Seren. TBS wiesen keine oder nur geringe hämolytische Aktivität auf, stattdessen wirkten die Sekrete antikomplementär.

### Material und Methoden

*Seren:* 17 Seren von gesunden Pferden und 75 Seren von Pferden, die chronisch lungenkrank waren, wurden in bezug auf hämolytische Komplementaktivität untersucht. Bis zur Untersuchung wurden die Seren bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nur einmal aufgetaut. Alle Pferde wurden nach dem gleichen Schema untersucht und dann in die Gruppen: «gesund», «leichtgradig», «mittelgradig» und «hochgradig erkrankt» eingestuft (Grünig et al. 1985). Die Seren stammten von Patienten der Veterinär-Medizinischen und Veterinär-Chirurgischen Klinik und von Depotpferden der eidgenössischen Militärpferdeanstalt, Bern<sup>a</sup>.

*Tracheobronchialsekrete:* 77 TBS wurden in bezug auf Komplementtiter und 63 TBS in bezug auf anti-komplementäre Eigenschaften mit dem hämolytischen Test untersucht. Die TBS stammten von chronisch lungenkranken Pferden der Veterinär-Medizinischen Klinik. Die Pferde wurden alle nach dem oben erwähnten Schema untersucht und der Schweregrad der chronischen Lungenkrankheit beurteilt. Die Sekrete wurden mittels einer Sonde, die durch den Instrumentierkanal des Endoskops in einen Sekretsee in der Trachea tauchte, abgesaugt. Wegen dem nicht messbaren Verdünnungseffekt wurden keine Trachealspülungen durchgeführt. TBS von gesunden Pferden konnten nicht in die Untersuchung miteinbezogen werden, da gesunde Tiere kein Sekret in der Trachea aufweisen (Fischer 1980, Nuytten et al. 1983, Whitwell and Greet 1984). Die TBS wurden während 60 Minuten bei 50 000 g zentrifugiert und der Überstand bis zur Untersuchung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

*Erythrozyten (EC):* Die EC stammten von ca. 5–7 Monate alten und ca. 600–900 g schweren Meerschweinchen, Tricolor, die durch Genickschlag betäubt und danach entblutet wurden. Das Blut wurde im gleichen Verhältnis in Alsever (20,5 g Glucose, 8,0 g Natriumcitrat, 4,2 g NaCl, Aqua dest. ad 1000 ml, mit 10% Zitronensäure auf pH 6,1 eingestellt) aufgenommen. Penicillin/Streptomycin wurde in einer Endkonzentration von 100 IU bzw. 100  $\mu\text{g}$  pro ml Blut/Alsevergemisch beigegeben. Das Blut konnte während 10 Tagen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

*Antiserum gegen Meerschweinchen-EC:* Einem Pferd wurden Meerschweinchen-EC intravenös verabreicht. Dabei trat eine starke anaphylaktische Reaktion auf, die wahrscheinlich durch im Pferdeserum enthaltene Antikörper gegen EC verschiedener anderer Spezies ausgelöst wurde (Barta et al. 1973). Das Pferd konnte durch Adrenalin- und Cortisoninjektionen gerettet werden. Zehn Tage nach der Injektion wurde dem Pferd Blut entnommen und das Serum, nachdem es während 20 Min. auf  $60^{\circ}\text{C}$  erhitzt worden war, in kleinen Portionen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

*Puffer:* Die  $10\times$  konzentrierte Stammlösung enthielt 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,4 mit 1,4 M NaCl, 4,95 mM  $\text{MgSO}_4$  und 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Vor dem Gebrauch wurde die Stammlösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1:10 verdünnt.

*Hämolytischer Komplementassay:* Der Test nach Levine (1978) wurde mit wenigen Modifikationen angewendet. Alle Reagenzien wurden auf Eis gekühlt.

<sup>a</sup> Wir danken der Eidgenössischen Militärpferdeanstalt, Bern, für die Bereitstellung der Pferde.

*Vorbereiten der EC:* Die EC wurden 3mal mit Puffer gewaschen. Der Überstand war beim letzten Waschen klar und farblos. Danach wurden die gepackten EC mit einer Proteinase K-Lösung (Boehringer, Mannheim, 1 mg Proteinase K/ml Puffer) im Verhältnis von 1 Teil EC zu 9 Teilen Proteinase K-Lösung vermischt und bei 37 °C während 35 Minuten auf einer Rolle inkubiert (Roelke und Uhlenbuck 1969). Die EC wurden 4mal mit Puffer gewaschen und 1 Teil gepackte EC in 19 Teilen Puffer aufgenommen. Zum Sensibilisieren wurde die EC-Suspension mit einem gleichen Volumen Antiserum gegen Meerschweinchen-EC, das 1:1000 mit Puffer verdünnt worden war, während 15 Minuten bei 37 °C auf der Rolle inkubiert. Danach wurde die EC-Suspension noch einmal 1:20 mit Puffer verdünnt und konnte während 6 Stunden verwendet werden.

*Bestimmung der hämolytischen Komplementaktivität im Serum:* An einem Versuchstag konnten jeweils 10 Seren untersucht werden. Die Seren wurden in den Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40 und 1:50 in Doppelwerten getestet. Weiterhin wurde zur Kontrolle des Tests am Anfang und am Ende der täglichen Versuchsreihe ein Standardserum in den oben beschriebenen Verdünnungen mitgeführt. In die Teströhrchen (Nunc Cryotubes, 1 ml) wurden 500 µl Puffer, 100 µl verdünntes Serum und 100 µl sensibilisierte EC pipettiert. Als Kontrollen wurden die Eigenhämolysen der EC (600 µl Puffer und 100 µl sensibilisierte EC), die Totalhämolysen (600 µl H<sub>2</sub>O dest. und 100 µl sensibilisierte EC) und die Eigenfarbe des Serums (600 µl Puffer und 100 µl 1:10 verdünntes Serum) bestimmt. Danach wurden die Röhrchen während 60 Minuten bei 37 °C auf der Rolle inkubiert. Dann wurden die Röhrchen während 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde sofort nach dem Zentrifugieren bei 413 nm gemessen.

*Untersuchung der TBS:* Alle Messungen erfolgten im Doppel. Jeweils 8–10 TBS wurden gleichzeitig untersucht. Zur Kontrolle des Tests wurde an jedem Versuchstag eine Standardkurve mit Standardserum in 9 Verdünnungen von 1:8 bis 1:80 mitgeführt. Zur Bestimmung der Komplementaktivität wurden zu 250 µl Puffer 50 µl unverdünntes TBS pipettiert. Zur Erfassung der anti-komplementären Eigenschaften wurden die TBS 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1000 mit Puffer verdünnt. Dann wurden zu 200 µl Puffer 50 µl verdünntes TBS und 50 µl 1:8 verdünntes Standardserum pipettiert und gemischt. Die Röhrchen zur Bestimmung der Standardkurve enthielten 250 µl Puffer und 50 µl Standardserum in verschiedenen Verdünnungen. Alle Röhrchen wurden über Nacht bei 2–4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 µl sensibilisierte EC dazugegeben und die Röhrchen während 1 h bei 37 °C auf der Rolle inkubiert. Als Kontrollen wurden die Eigenfarbe des Standardserums bzw. des TBS (300 µl Puffer und 50 µl Serum bzw. TBS), die Totalhämolysen der EC (300 µl H<sub>2</sub>O dest. und 50 µl EC) und die Eigenhämolysen der Erythrozyten (300 µl Puffer und 50 µl EC) bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Röhrchen während 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert und die Extinktion des Überstands bei 413 nm abgelesen.

*Berechnung der Komplementaktivität im Serum:* Der Titer wurde berechnet, bei dem 50% der EC lysiert wurden (CH<sub>50</sub>-Wert).

Zuerst wurden vom Mittelwert der Doppelbestimmungen die Kontrollwerte der Eigenhämolysen und der Eigenfarbe des Serums abgezogen. Dann wurden die Hämolysenwerte in % der Totalhämolysen umgerechnet. Die Serumverdünnungen wurden logarithmisch gegen die Hämolysenwerte in % aufgetragen. Das ergab eine Gerade, aus der der 50%-Hämolysetiter berechnet werden konnte.

*Berechnung der Komplementaktivität im TBS:* Die erhaltenen Extinktionswerte wurden nach Abzug der Kontrollen (Eigenfarbe des TBS und Eigenhämolysen der EC) in % der Totalhämolysen umgerechnet.

*Berechnung der anti-komplementären Eigenschaften des TBS:* Die TBS-Verdünnung wurde berechnet, bei der das Standardserum nur noch 50% seiner hämolytischen Aktivität aufwies. Zuerst wurden vom Mittelwert der Doppelbestimmungen die Kontrollwerte der Eigenhämolysen und die Eigenfarben des TBS und des Serums abgezogen. Die Extinktion der Standardserumverdünnung von 1:8 ohne TBS-Zusatz wurde als 100% Wert genommen. Die Extinktionen der Standardserumverdünnung 1:8 mit den unterschiedlich verdünnten TBS-Zusätzen wurden danach in % umgerechnet. Nun wurden die TBS-Verdünnungen logarithmisch gegen die Hämolysen in % aufgetragen. Das ergab eine Gerade, aus der man den 50%-Hämolysen-Wert ausrechnen konnte.

*Statistische Auswertung der Daten:* Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet. Weiterhin wurden die Daten graphisch mittels der Boxplot-Methode ausgewertet (Eggenberger und Thun 1984).

## Resultate

*Komplementbestimmungen im Serum:* 17 Seren von gesunden Tieren, 35 Seren von leichtgradig erkrankten Pferden und 40 Seren von Pferden mit mittelgradiger oder hochgradiger Lungenerkrankung wurden in bezug auf die hämolytische Komplementaktivität untersucht. Die 50% Hämolysetiter betragen  $20,3 \pm 7,7$  bei den gesunden Tieren,  $21,7 \pm 6,0$  bei den leichtgradig erkrankten Tieren und  $25,0 \pm 13,9$  bei den mittelgradig und hochgradig erkrankten Tieren. Wie aus diesen Werten und aus Abbildung 1 ersichtlich ist, bestand kein Unterschied bezüglich der hämolytischen Komplementaktivität zwischen den Seren der verschiedenen Gruppen.

*Komplementbestimmungen im TBS:* 77 TBS wurden unverdünnt in bezug auf hämolytische Aktivität untersucht. Der grösste Störfaktor bei dieser Untersuchung war die starke Eigenfarbe der TBS – die TBS-Kontrollwerte hatten Extinktionen von  $0,155 \pm 0,067$ . Geringe hämolytische Aktivität war in 15 TBS vorhanden, die von 3 leichtgradig kranken, von 5 leicht- bis mittelgradig kranken, von 6 mittelgradig kranken und von einem hochgradig kranken Tier stammten. Durch diese TBS wurden 10 bis 62%, durchschnittlich 23% der im Ansatz vorhandenen EC hämolysiert, unabhängig vom Schweregrad der Lungenerkrankung.

*Anti-komplementäre Eigenschaften der TBS:* Bei der Bestimmung der hämolytischen Aktivität der TBS beobachteten wir, dass die meisten TBS anti-komplementäre Eigenschaften aufwiesen. Die hämolytische Aktivität des Serums wurde in Abhängigkeit von der TBS-Verdünnung gehemmt (Abb. 2). Bei 63 TBS wurde die Verdünnung bestimmt, bei der das zugegebene Serum nur noch 50% seiner Aktivität aufwies. Es resultierten Titer von 1 bis 130, durchschnittlich 26. Wie in Abbildung 3 dargestellt, bestand keine Korrelation zwischen den anti-komplementären Eigenschaften im TBS und den klinischen Diagnosen.

*Reproduzierbarkeit des hämolytischen Tests:* Die Resultate der hämolytischen Aktivitätsbestimmungen in den Seren waren im allgemeinen gut reproduzierbar, der Komplementtiter der 25 Hämolysekurven des Standardserums betrug  $15,2 \pm 3,1$  und schwankte zwischen 11 und 25. Weiterhin wurden die Komplementtiter bei 8 Testseren 2mal und bei 4 Testseren 3mal bestimmt. Weniger als 15% Abweichung vom Mittelwert zeigten die Resultate von 9 Seren, die Mittelwerte von 3 Seren wichen hingegen bis zu 50% voneinander ab. Die Titration der antikomplementären Eigenschaften im TBS war weniger gut reproduzierbar. Bei 10 TBS wurden die anti-komplementären Eigenschaf-

---

Abb.1 Hämolytische Komplementtiter (CH50-Titer) der Pferdeseren verglichen mit dem Schweregrad der chronischen Lungenerkrankung.

Zur Darstellung der Daten wurde die Boxplot-Methode verwendet. Die Box enthält 50% der Messwerte. Innerhalb der horizontalen Linien befinden sich 95% der Messwerte, und Extremwerte sind als Punkte dargestellt.

CH<sub>50</sub> Titer

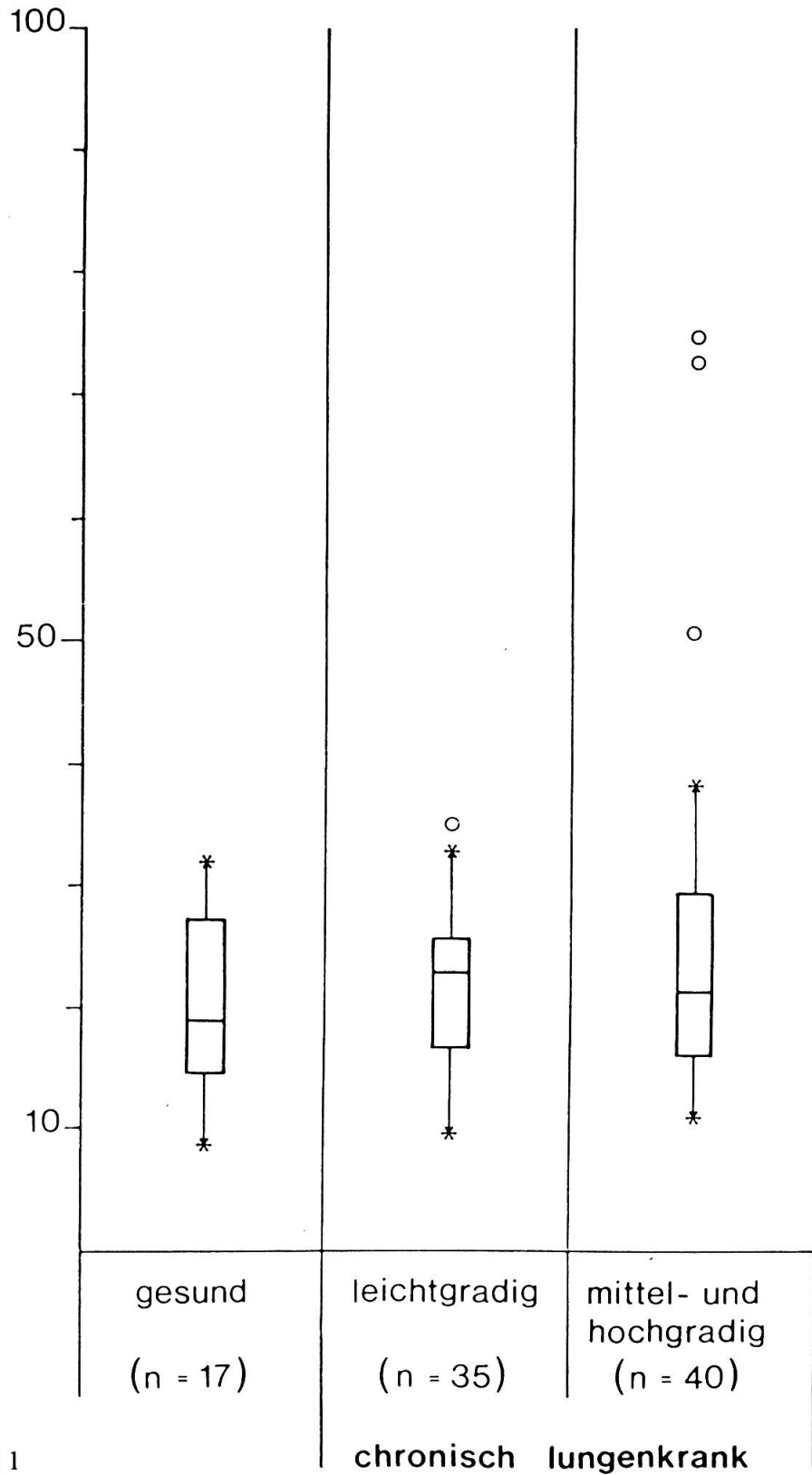


Abbildung 1

ten 2mal bestimmt, weniger als 20% Abweichung zeigten 5 TBS, bei den übrigen TBS schwankten die Titer  $55,2 \pm 4\%$ . Die Stabilität der Erythrozyten war gross, der Kontrollwert der Eigenhämolysen war  $0,022 \pm 0,011$ .

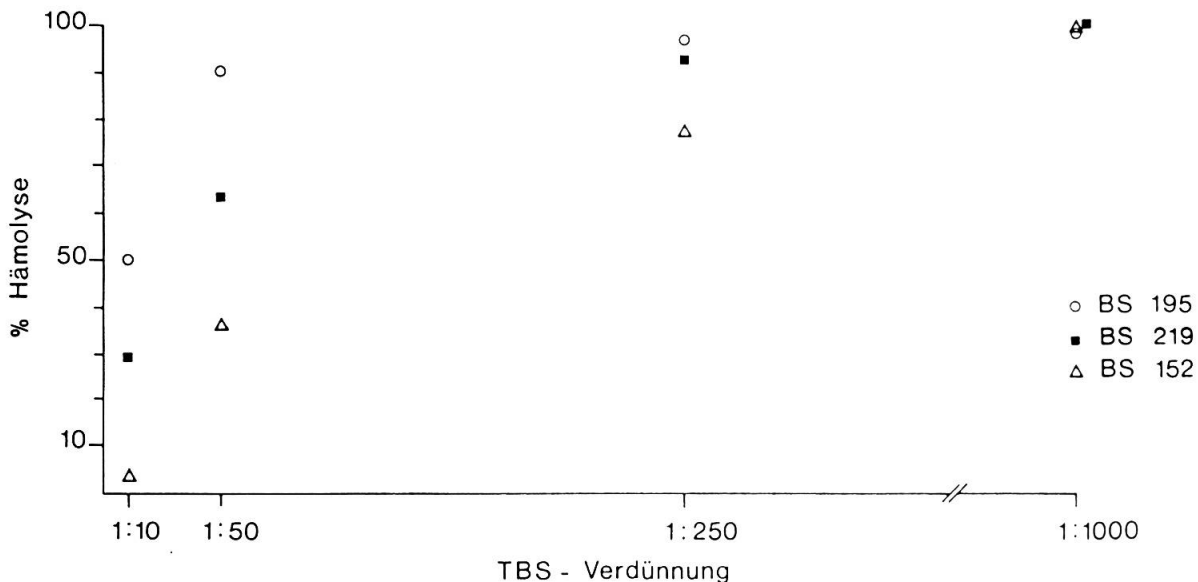


Abb. 2 Anti-komplementäre Eigenschaften von 3 verschiedenen Tracheobronchialsekreten. Die Extinktion des Standards ohne Zusatz von TBS wurde als 100% Hämolysen bezeichnet. Die Extinktionen des Standards mit den verschiedenen TBS-Verdünnungen wurden danach in % umgerechnet und gegen die TBS-Verdünnungen aufgetragen.

### Diskussion

In dieser Arbeit wurde der hämolytische Test zur Bestimmung der Komplementaktivität angewendet. Der Test nach Levine (1978) wurde durch die Verwendung von Meerschweinchen-Erythrozyten, die mit Proteinase K vorbehandelt worden waren, verfeinert. Die von uns bestimmten CH50-Titer im Serum lagen im Bereich zwischen 16 und 27. Extremwerte reichten von 8 bis 75. Die Seren gesunder Pferde und chronisch lungenkranker Pferde wiesen ähnliche CH50-Titer auf. Bis jetzt wurden Komplementtiter in Pferdeseren von 10–25 mit Kaninchen-, Schweine- oder Meerschweinchen-Erythrozyten, die gar nicht, oder die mit Schaf- oder Kaninchenantikörpern sensibilisiert worden waren, gemessen (Rice und Boulanger 1952, Barta et al. 1973, 1976, Leid et al. 1985). Die von uns verwendete Methode zeigte also vergleichbare Wer-

Abb. 3 Anti-Komplement-Titer der Tracheobronchialsekrete verglichen mit dem Schweregrad der chronischen Lungenerkrankung.

Zur Darstellung der Daten wurde die Boxplot-Methode verwendet. Die Box enthält 50% der Messwerte. Innerhalb der horizontalen Linien befinden sich 95% der Messwerte, und Extremwerte sind als Punkte dargestellt.

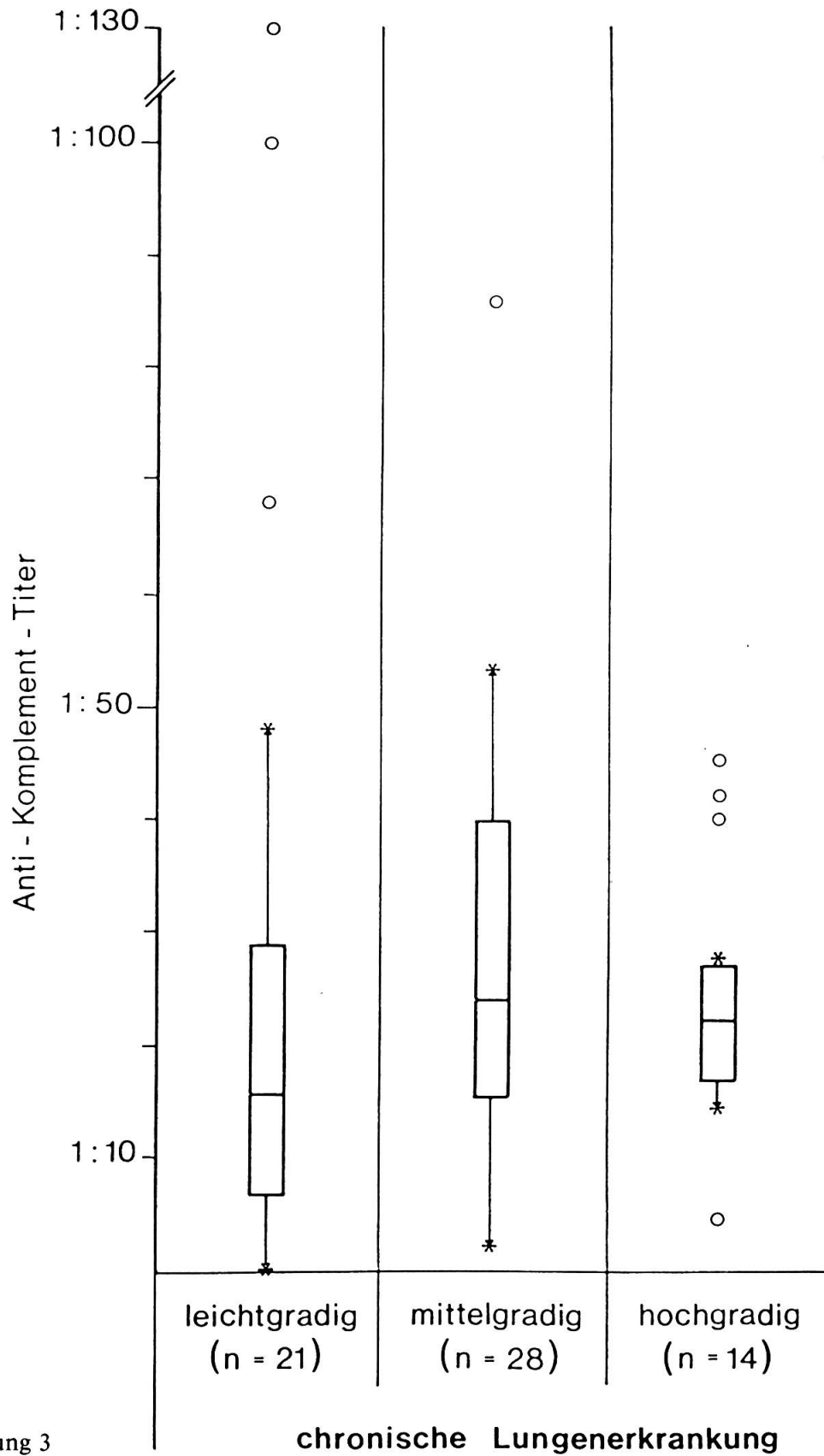


Abbildung 3



te und war gut reproduzierbar. Das Standardserum wurde an 25 Versuchstagen getestet, es ergaben sich CH50-Titer von  $15,2 \pm 3,1$ . Auch die sensibilisierten Erythrozyten waren stabil, der Kontrollwert der Eigenhämolysen war  $0,022 \pm 0,011$ .

Die Komplementbestimmung im TBS hingegen gestaltete sich sehr schwierig, weil die TBS sehr hohe Eigenextinktionen von  $0,155 \pm 0,067$  aufwiesen. 15 von 77 unverdünnt getesteten TBS bewirkten Hämolysen von 10 bis 62% der im Ansatz vorhandenen Erythrozyten, eine Korrelation zwischen dieser Aktivität und dem Schweregrad der Lungenerkrankung war nicht vorhanden. Bronchoalveolär-Lavage-Flüssigkeit von Menschen mit Sarkoidose oder mit idiopathischer Lungenfibrose, nicht jedoch die gesunder Nichtraucher, enthielt hämolytische Aktivität mit CH50-Titern von 5 bis 500. Die Serumaktivitäten dieser Patienten lagen bei 1500 bis 3000 (Lambré et al. 1986). Hämolytisch aktives C3, C4, C5 und C6 dazu noch Spuren von C1 waren in Bronchoalveolär-Lavage-Flüssigkeit gesunder Kaninchen vorhanden (Giclas et al. 1987).

Wir hatten zufällig beobachtet, dass die meisten TBS antikomplementäre Eigenschaften aufwiesen. TBS-Verdünnungen von 1:1 bis 1:130, durchschnittlich von 1:26 reduzierten die hämolytische Aktivität des Standardserums um 50%. Die antikomplementären Eigenschaften im TBS waren nicht mit dem Schweregrad der Lungenerkrankung korreliert. Antikomplementäre Wirkung im TBS könnte durch Komplementinhibitoren zustande kommen; so wurde in Bronchoalveolär-Lavage-Flüssigkeit gesunder Kaninchen und Menschen neben hämolytisch aktivem C3 auch ein Inhibitor von C3 gefunden, der reversibel die C3-Aktivität in der Lavage-Flüssigkeit und im Plasma hemmte (Giclas et al. 1987). Weiterhin könnten Immunkomplexe im TBS vorhanden sein, die das Komplement des Standardserums fixieren. Auch könnte TBS Aktivatoren des Alternativwegs wie z. B. Sporen, mikrobielle Zellwandbestandteile oder Proteasen enthalten, die Komplement verbrauchen. TBS von Pferden mit chronischer Lungenerkrankung enthält Sporen von *Bacillus* und *Streptomyces* spez. unabhängig vom Krankheitsgrad (Grünig 1984), die so klein sind, dass ein Teil von ihnen auch nach Zentrifugation im Überstand verbleiben könnte. Auch enthält TBS schwer kranker Pferde Proteaseaktivität (Grünig et al. 1985).

Ein Zusammenhang zwischen chronischen Lungenerkrankungen und hämolytischen Komplementbestimmungen im Serum oder im TBS wurde nicht gefunden. Dies muss aber nicht bedeuten, dass das Komplementsystem nicht an der Pathogenese der chronischen Lungenerkrankungen der Pferde beteiligt ist. Komplement könnte lokal im Lungengewebe aktiviert werden und dort pathologische Veränderungen bewirken, ohne dass dies zu messbaren Veränderungen im Serum oder TBS führt, zumal der hämolytische Test für Pferdekompement, verglichen mit anderen Spezies, sehr wenig empfindlich ist (Linscott 1986). Wir haben diesen Test dennoch gewählt, weil Gehalt und Aktivität einzelner Komplementfaktoren in Seren und TBS nicht untersucht werden konnten, da bis jetzt nur Testsysteme für einzelne Komplementfaktoren anderer Spezies käuflich sind. Einige Pferdekompementfaktoren können mit den käuflichen Tests bestimmt werden, andere jedoch nicht, wodurch die Aussagekraft der Tests gemindert wird (Barta und Barta 1976). Weiterhin wird mit der chronischen Lungenerkrankung des Pferdes ein Symptomenkomplex beschrieben, bei dem die Ätiologien unbekannt sind

(Gerber 1973). Es wäre nun denkbar, dass bei einem Teil der chronisch lungenkranken Pferde Komplement an der Pathogenese beteiligt ist, diese Fälle aber nicht abgegrenzt und gesondert untersucht werden können.

### Zusammenfassung

Komplementaktivitäten in Pferdeseren und -Tracheobronchialsekreten wurden mit Meer-schweinchenerythrozyten, die mit Pferdeantikörpern sensibilisiert worden waren, untersucht. Komplementtiter wurden in 17 Seren gesunder Pferde und in 75 Seren chronisch lungenkranker Pferde bestimmt. Die Serumverdünnungen, bei denen 50% der Erythrozyten lysiert wurden, lagen im Bereich von 1:16 bis 1:34. Die Serum-Komplementtiter waren nicht mit dem Krankheitsgrad korreliert.

Geringe hämolytische Aktivität war in 15 von 77 untersuchten TBS nachweisbar. Die unverdünnten TBS-Proben lysierten 10 bis 62%, durchschnittlich 23%, der im Ansatz vorhandenen Erythrozyten, unabhängig vom Schweregrad der chronischen Lungenerkrankung. Weiterhin wurde zufälligerweise beobachtet, dass TBS anti-komplementäre Eigenschaften aufwies. TBS-Verdünnungen von 1:1 bis 1:130, durchschnittlich von 1:26, reduzierten die hämolytische Aktivität des Standardserums auf die Hälfte. Die anti-komplementären Wirkungen der TBS waren nicht mit den Schweregraden der chronischen Lungenerkrankung korreliert. Die anti-komplementäre Wirkung der TBS-Proben könnte einerseits durch im TBS vorhandene Komplementinhibitoren zustande kommen; andererseits könnte TBS Komplement fixieren, z. B. durch Immunkomplexe oder durch mikrobielle Zellwandbestandteile.

Die fehlende Korrelation zwischen dem Schweregrad der chronischen Lungenerkrankungen und den Komplementbestimmungen muss nicht bedeuten, dass das Komplementsystem nicht an der Pathogenese der chronischen Lungenerkrankungen der Pferde beteiligt ist. Komplement könnte lokal im Lungengewebe aktiviert werden und dort pathologische Veränderungen bewirken, ohne dass dies zu messbaren Veränderungen im Serum oder TBS führt, zumal der hämolytische Test für Pferdekompiment wenig empfindlich ist.

### Résumé

Les expériences sur l'activité du complément de sérums et de sécrétions bronchiques (SB) de chevaux ont été faites sur des érythrocytes de cobayes sensibilisés avec des anticorps de chevaux. Les tests ont porté sur les sérums de 17 chevaux sains et 75 chevaux souffrant de maladies chroniques des poumons. 50% des erythrocytes ont été lysés par des dilutions de sérums allant de 1:16 à 1:34. Les titres du complément n'ont pas varié en fonction de la gravité de la maladie.

Une faible activité hémolytique a été observée dans 15 SB sur 77. Les échantillons de SB non dilués ont lysé 10–62% en moyenne 23%, des erythrocytes utilisés, indépendamment de la gravité de la maladie. En outre, on a constaté par hasard que des SB présentaient des activités anticomplémentaires. Des dilutions de SB allant de 1:1 à 1:130, en moyenne de 1:26, ont réduit l'activité hémolytique du sérum standard à moitié. Les activités anticomplémentaires des SB ne correspondent pas à la gravité de la maladie. Il est possible d'une part que l'activité anticomplémentaire soit provoquée par des inhibiteurs de complément, d'autre part que des complexes immunitaires ou des particules microbiennes de parois cellulaires fixent le complément des SB. Le manque de corrélation entre la gravité de la maladie et l'activité du complément n'indique pas forcément que le système du complément est insignifiant pour la pathogénèse des maladies pulmonaires chroniques du cheval. Il se peut que le complément soit activé localement dans le tissu pulmonaire et y produise des lésions, sans pour autant modifier le taux du complément dans le sérum ou la SB; le test hémolytique du complément chez le cheval est relativement peu sensible.

### Riassunto

Si è analizzata l'attività del complemento nel siero e nel secreto tracheobronchiale (TBS) di cavallo per mezzo degli eritrociti di porcellino d'India, precedentemente sensibilizzati verso le immunoglobuline di cavallo. Il titolo del complemento è stato determinato nel siero di 17 cavalli sani e in quello di 75 malati, presentando malattie croniche polmonari. La diluizione del siero alla quale il 50% degli eritrociti viene lisato risultò compresa nell'intervallo tra 1:16 e 1:36 (intervallo esterno tra 1:8 e 1:65).

Nessuna correlazione è stata trovata tra la titolazione del complemento e la gravità della malattia. Scarsa azione emolitica è stata accertata in 15 dei 77 TBS analizzati. Il TBS non diluito sembra in grado di lisare, indipendentemente dal grado della malattia, tra il 10 e il 62% (valor medio 23%) degli eritrociti. È stato inoltre osservato casualmente che nel TBS è presente attività anticomplemento. Diluendo il TBS tra 1:1 e 1:130 (valor medio 1:26) l'attività emolitica del siero campione risulta ridotta della metà. Nessuna correlazione è stata trovata tra l'attività anti-complemento del TBS e la gravità della malattia. L'inibizione del complemento potrebbe essere dovuta sia alla presenza di inibitori nel TBS che dal fatto che il TBS non sia in grado di fissare il complemento (ad esempio per mezzo di immunocomplessi oppure per mezzo di pareti cellulari batteriche).

Il fatto che gravità della malattia e complemento non siano correlati fra di loro, non esclude che quest'ultimo non sia coinvolto nelle malattie polmonari del cavallo. Il complemento potrebbe infatti venire attivato localmente nel tessuto polmonare e qui svolgere una attività patologica senza che questo, a causa della scarsa sensibilità del test usato, sia rivelabile nel siero o nel TBS.

### Summary

Complement was determined in sera and respiratory secretions of horses using guinea pig erythrocytes sensitized with horse antibodies. Complement titers were determined in sera of 17 healthy horses and in sera of 75 horses affected with chronic pulmonary disease. Sera diluted 1:16 to 1:34 hemolysed 50% of the erythrocytes in the assay. Hemolytic complement titers of the sera were not correlated with the degree of chronic pulmonary disease.

Low hemolytic activity was present in 15 out of 77 respiratory secretions. The undiluted secretions hemolysed 10 to 62% (mean 23%) of the erythrocytes. The hemolytic activity was not correlated with the degree of chronic pulmonary disease. Furthermore, it was observed by chance that respiratory secretions blocked complement activity. The hemolytic activity of a standard serum was reduced to 50% by respiratory secretions diluted 1:1 to 1:130 (mean 1:26). The anticomplement activity of the respiratory secretions was independent of the degree of chronic pulmonary disease. Respiratory secretions may contain complement inhibitors or complement may be fixed by immune complexes and/or by microbial cell walls present in the secretions.

Despite the missing correlation between the degree of chronic pulmonary disease and the complement determinations, the complement system may still be involved in the pathogenesis of chronic pulmonary disease. Complement could be activated within the lung causing tissue damage; however, changes in complement titers of sera and respiratory secretions might not be detected; also, the hemolytic assay for equine complement is quite insensitive.

### Literatur

- Barta O., Barta V. and Williams E. I.*: A method for titrating equine haemolytic complement. *Z. Immunol. Forsch.* 146, 114–122 (1973). — *Barta O., Barta V.*: The equine complement system. In: *Bryans J. T. and Gerber H.* eds. *Proc. 4th Int. Conf. Equine Infect. Dis., Vet. Publ., Princeton*, 189–199 (1976). — *Breeze R. G.*: Heaves. *Vet. Clin. North Am. (Large Anim. Pract.)* 1, 219–230 (1979). — *Eggenberger, E. und Thun, R.*: Eine graphische Methode zur Darstellung von Mess-

werten. Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 199–205 (1984). — *Egwang T. G. and Befus A. D.*: The role of complement in the induction and regulation of immune responses. Immunol. 51, 207–224 (1984). — *Fischer J.*: Bronchoskopische Untersuchungen als Beitrag zur klinischen und aetiologischen Diagnostik beim Pferd mit Atemwegserkrankungen. Diss., Hannover (1980). — *Gerber, H.*: Chronic pulmonary disease in the horse. Equine Vet. J. 8, 26–33 (1973). — *Giclas P. C., King T. E., Baker S. L. and Russo J., Henson P. M.*: Complement activity in normal rabbit bronchoalveolar fluid. Description of an inhibitor of C3 activation. Am. Rev. Respir. Dis. 135, 403–411 (1987). — *Grünig G., Hermann M., Jorisch S., Schärer C., v. Fellenberg R.*: Proteaseaktivität im Tracheobronchialsekret von Pferden mit COPD: Pathophysiologische Bedeutung. Pferdeheilkunde 1, 55–63 (1985). — *Grünig G., v. Fellenberg R., Maier R. and Corboz L.*: Elastaseproducing microorganisms in horse lungs: Their possible role in the pathogenesis of chronic pulmonary disease in the horse. Equine Vet. J. 18, 396–400 (1986). — *Grünig G.*: Zur Aetiologie und Pathogenese der Chronisch Obstruktiven Lungenkrankheiten (COPD) des Pferdes. Diss. vet. med. Zürich (1984). — *Halliwell K. E. W., Fleischman J. B., Mackay-Smith M., Beech J. and Gunson D. E.*: The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses. J. Am. Vet. Med. Ass. 174, 277–281 (1979). — *Lambré C. R., Le Maho S., Di Bella G., De Cremoux H., Atassi K. and Bignon J.*: Bronchoalveolar lavage fluid and serum complement activity in pulmonary sarcoidosis. Am. Rev. Respir. Dis. 134, 238–242 (1986). — *Leid R. W., Coley S. C., Blanchard D. P. and Perryman L. E.*: Equine alternative pathway activation by unsensitized red blood cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 9, 71–85 (1985). — *Levine L.*: Microcomplement fixation. In: Weir D. M. ed. Handbook of experimental immunology. 3rd ed. Blackwell Scientific Public., Oxford, 5B (1978). — *Linscott W. D.*: Biochemistry and biology of the complement system in domestic animals. Prog. Vet. Microbiol. Immunol. 2, 54–77 (1986). — *McPherson E. A., Lawson G. H. K., Murphy J. R., Nicholson J. M., Breeze R. G. and Pirie H. M.*: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses: Aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge Equine Vet. J. 11, 159–166 (1979). — *Nuytten J., Muylle E., Oyaert W., v. d. Hende C., Vlamincx K. and d. Keersmaecker F.*: Cytology, bacteriology and phagocytic capacity of tracheobronchial aspirates in healthy horses and in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Zbl. Vet. Med. A 30, 114–120 (1983). — *Rice C. E. and Boulanger P.*: The interchangeability of the complement components of different animal species. IV. In the hemolysis of rabbit erythrocytes sensitized with sheep antibody. J. Immunol. 68, 197–205 (1952). — *Roelcke D. und Uhlenbruck G.*: Proteinase K.: Eine neue, serologisch anwendbare Pilz-Protease. Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 155, 156–170 (1969). — *Schoon H. A. and Deegen, E.*: Histopathologie der chronisch obstruktiven Bronchitis bei klinisch manifest erkrankten Pferden. Tierärztl. Prax. 11, 213–221 (1983). — *Thorsen J., Willoughby R. A., McDonnell W., Valli V. E. O., Viel L. and Bignell W.*: Influenza hemagglutination inhibiting activity in respiratory mucus from horses with chronic obstructive pulmonary disorders (heaves syndrome). Can. J. Comp. Med. 47, 332–335 (1983). — *Viel L.*: Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease. PhD Thesis, University of Guelph (1983). — *Whitwell K. E. and Greet T. R. C.*: Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. Equine Vet. J. 16, 499–508 (1984). — *Winder N. C.*: Chronic small airway disease in the horse: Pathologic and immunohistochemical studies. Diss. vet. med. Zürich (1987).

Manuskripteingang: 31. März 1988