

Slutrapport 2007-2008 för projektet: Karies hos häst – studier av immunsvaret mot *Streptococcus devriesei*

GENERELL BAKGRUND TILL PROJEKTET

Fram till mitten av 1990-talet var karies, definierat som ett hål orsakat av bakteriell nedbrytning av cement, dentin och emalj, något som sågs hos enstaka hästar i ålderskategorin 15 år och äldre. I en rapport från 1988 avseende svenska hästars munhålestatus⁽¹⁾ meddelades en kariesfrekvens på c:a 1 % bland landets hästar. Den första oxeltanden, molar 1 (M1), var den tand där flest kariesangrepp sågs. Frekvensen karies i den svenska hästuppopulationen upplevs därefter ha ökat och då framförallt bland hästar yngre än 15 år. Den del av tuggytan som benämns infundibulum i överkäkens första kindtänder, premolar 2 (P2), upplevs vara som den lokalitet där ökningen varit som störst. Vid genomgång av tandvårdsjournaler från år 2000-2006 förda vid djurtandvårdskliniken i Söderköping och hästkliniken på SLU, Uppsala, diagnostiserades infundibulär karies hos mellan 6 – 10 % av munhåleundersökta hästar.

Vi har i en tidigare studie isolerat en hittills okänd art av Streptokocker, *Streptococcus devriesei*, från karieslesioner hos hästar⁽²⁾. Denna bakterie har egenskaper som kan göra den mer aggressiv i samband med kariesangrepp än de besläktade streptokockerna i familjen Mutans som förknippas med hål i tänderna hos människa. I en uppföljande studie har Lundström *et al.*⁽³⁾ visat att denna bakterie är starkt förknippad med P2 karies hos häst.

Bakterier som koloniserar slemhinnor och tänder ger upphov till ett immunsvaret bl.a. i form av antikroppar i saliv. Från studier av människor vet man att barn redan vid 1-2 månaders ålder, i saliv, har IgA-antikroppar mot bakterier som koloniserat tarm och munhåla⁽⁴⁾. När sedan barnets tänder bryter fram uppträder antikroppar mot sådana bakterier som behöver hårda ytor för tillväxt, exempelvis *S. mutans*, både i saliv (IgA) och serum (IgG). Vidare vet man från studier i människa, primater och gnagare att det lokala immunsvaret mot bakterier som orsakar karies kan skydda mot sjukdomen⁽⁵⁾. Skyddet medieras framförallt genom bakteriespecifika IgA-antikroppar i saliv. Dessa antikroppar kan förhindra att bakterierna fäster till och ackumuleras på tandytorna och eventuellt även hämma bakteriernas metabolism. Man har även visat experimentellt att man genom vaccination med bakterieproteiner kan inducera IgA i saliv och därmed ett visst skydd mot kariesangrepp.

Immunförsvaret i hästens munhåla är dock i dagsläget tämligen outforskat. Några tidiga studier^(6, 7) har med hjälp av radiell immundiffusion visat att IgA är den dominerande immunglobulintypen i hästsaliv. Vidare har den organiserade lymfoida vävnaden i hästens munhåla och svalg studerats morfologiskt⁽⁸⁻¹¹⁾. I dessa studier har man bl.a. identifierat B-celler positiva för IgA, IgG4 respektive IgG3+5, framförallt i lymfolliklarnas germinala centra i de olika typerna av tonsillvävnad som finns i hästens oropharynx (*T. lingualis*, *T. veli palatina* och *T. palatina*). Högst frekvens av IgA-positiva B-celler noterades i mjuka gommens tonsillvävnad. Vad beträffar hästsaliv fanns vid starten av detta projekt alltså inga resultat tillgängliga där man använt moderna reagens för att identifiera och kvantifiera olika typer av immunglobulin. Vidare var de tillgängliga reagensen för häst-IgA inte karakteriserade och hästens IgA-system mycket ofullständigt kartlagt.

Målsättning

Projektets övergripande syfte är att få ökad insikt i hästens antikroppsmedierade och cellmedierade immunsvaret vid *S. devriesei*-infektion. För att uppnå detta har vi under den gångna projektperioden arbetat med följande delprojekt: 1) *Detektion av häst-IgA - karakterisering av reagens och utveckling av metodologi* 2) *Identifiering av sekretoriskt IgA hos häst* 3) *Inventering av antikroppar i hästsaliv* 4) *Detektion av S. devriesei-specifika antikroppar i saliv*

Resultaten från delprojekten redovisas i detalj nedan. Sammantaget bidrar resultaten från projektet med ny kunskap om hästens orala immunförsvar, särskilt det mot *S. devriesei* vilket är mycket viktigt för vår förståelse av kariesproblematiken hos häst och utveckling av profylax mot denna. Resultaten torde också vara av vikt för förståelsen av kariesutveckling hos människa och även bidra till att öka den generella kunskapen om immunförsvaret mot orala patogener hos häst. Projektet är ett tvärvetenskapligt samarbete mellan Ove Wattle och Torbjörn Lundström, SLU, Eva Wattrang, SVA, och Gunnar Dahlén, Göteborgs Universitet

RAPPORTERING AV DELPROJEKTEN

1) Detektion av häst-IgA - karaktärisering av reagens och utveckling av metodologi

Bakgrund

Eftersom IgA i de flesta djurslag anses vara den dominerande typen av immunglobulin i saliv inledde vi arbetet i detta delprojekt med att inventera tillgängliga reagens för häst-IgA samt att sätta upp och validera en ELISA metod för att mäta häst-IgA. I dagsläget finns två monoklonala anti-häst IgA antikroppar beskrivna, 2G5 och 3E7. Vidare saluför några olika företag polyklonala anti-häst IgA antikroppar varav vi har arbetat med en från AbD-Serotec. Ingen av dessa antikroppars exakta specificitet, dvs. vilken del av häst-IgA de binder, var dock känd och det var heller inte känt under vilka förhållanden de kan användas. Kännedom om detta är givetvis avgörande för reagensens användbarhet och för att kunna utvärdera resultat från analyser där de används. Därför har vi lagt vikt vid att karaktärisera dessa anti-häst IgA antikroppar.

För att bestämma koncentrationen av IgA i hästsaliv ämnade vi använda ELISA-metodik. En häst-IgA-ELISA baserad på antikropparna 2G5 och 3E7 finns beskriven i litteraturen^(12, 13). Den beskrivna ELISA:n har använts till att jämföra IgA nivåer t.ex. i nasalsekret mellan olika prover genom att jämföra hur stor absorbans som färgreaktionen i ELISA:n genererar i olika prov (OD-värden). Detta tillvägagångssätt ger dock endast ett relativt mått på IgA-nivån i provet. Vi avser emellertid att bestämma "absoluta" IgA-koncentrationer i hästsaliv bl.a. för att detta ger oss möjlighet att direkt jämföra koncentrationerna av olika immunglobulintyper i t.ex. saliv. Vi behövde därför en preparation av renat häst-IgA att använda som standard i IgA-ELISA:n. Någon sådan preparation av häst IgA finns dock inte tillgänglig kommersiellt. Då saliv torde vara den enklast tillgängliga källan för större mängder sekretoriskt IgA och andelen andra immunglobuliner sannolikt är låga i hästsaliv^(6, 7) valde vi därför hästsaliv som källa till vår IgA preparation.

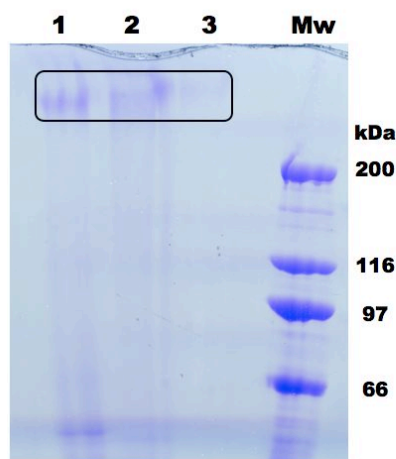
Material och metoder

Antikroppar mot häst-IgA: Av de två monoklonala anti-häst IgA antikropparna finns antikropp 2G5 tillgänglig kommersiellt (AbD-Serotec; MCA629). Antikropp 3E7 fick vi tillgång till genom samarbete med Dr Karin Haverson, Bristol University, England. Vi har även arbetat med polyklonalt get anti-häst IgA från AbD-Serotec (AAI34).



Figur 1. Dot-blot på nativa (A) och reducerade (B) prover färgade med antikropp 2G5, 3E7 respektive AAI34 mot häst-IgA.

1. Hästsaliv 2. Amoniumsulfatfäld hästsaliv 3. Nasalsekret 4. Serum
5. Negativ kontroll (10% BSA i PBS)



Figur 2. Coomassie färgad SDS-PAGE-gel med oreducerade prover. Inringat - protein-band med storlek motsvarande sekretoriskt IgA. 1. Obehandlad Hästsalliv 2. & 3. Amoniumsulfatfärd hästsalliv Mw MolekylviksstANDARD

Dot-blot analys: Olika prover innehållande häst-IgA (t.ex. saliv, nasalsekret eller serum) applicerades och torkades in på membran av nitrocellulosa. Membranet blockerades i fosfatbuffrad koksaltbuffert (PBS) med 5% mjölkprotein, tvättades och inkuberades sedan med respektive anti-häst IgA antikropp (primärantikropp) eller HRP-konjugerad anti-häst IgG (Jackson ImmunoResearch; 108-035-008). Efter tvätt inkuberades membran med anti-IgA antikroppar med HRP-konjugerad sekundärantikropp (DakoCytomation), anti-mus Ig respektive anti-get Ig (beroende på primärantikropp). Detektion av respektive antikropps bindning visualiserades med 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), ger brun färg vid reaktion med HRP, alternativt ECL, avger ljus vid reaktion med HRP vilket svärtar ljuskänslig film.

Rening av IgA från hästsalliv: Sallivprover från ett flertal hästar sammanblandades och proteiner, framförallt immunglobuliner, fälldes ut med mättad

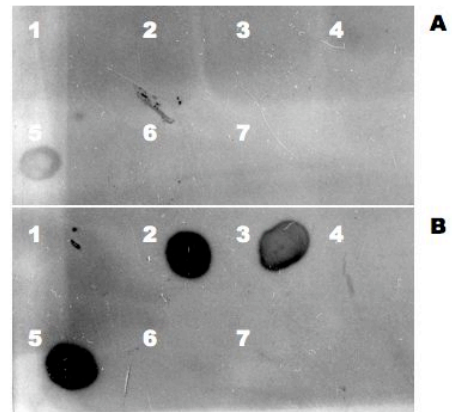
amoniumsulfatlösning. De fällda proteinerna löstes upp i PBS, pH 7.0, och applicerades på en protein G kolonn (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare) enligt tillverkarens instruktioner. Både de proteiner som inte band protein G ("genomflödet") och de som band protein G och därefter "lös gjordes" (eluerades) efter sänkning av pH till 2.7 ("eluatet") analyserades för innehåll av IgA respektive IgG med dot-blot teknik. Genomflödet befanns innehålla enbart IgA och IgA- (d.v.s. protein-) koncentrationen bestämdes med Bradford-test.

ELISA för kvantifiering av häst-IgA: En sandwich-ELISA etablerades med hjälp av de polyklonala get-anti häst-IgA antikropparna (AAI34) och den monoklonala antikroppen 2G5. ELISA-plattor (MaxiSorp, Nunc) coatades med antikropp AAI34. Efter inkubering över natt och tvätt blockerades brunnarna med med 4% bovin serumalbumin (BSA) i PBS. Efter inkubering och tvätt tillsattes prov respektive IgA-standard. Sallivproverna titrerades i åtta 2-stegs spädningar från ursprungsspädningen 1:1000. Efter inkubering och tvätt tillsattes antikropp 2G5 och efter ytterligare inkubering och tvätt tillsattes sedan HRP-konjugerad anti-mus Ig. Efter inkubering och tvätt detekterades bindning med substratlösning, 1 mM 3,5,3',5'-tetrametylbenzidin i 0,1 M kaliumcitrat buffert, färgreaktionen stoppades med H₂SO₄ och absorbansen mättes vid 450 nm. Som IgA-standard användes den renade och koncentrationsbestämda preparationen av häst-IgA (se ovan).

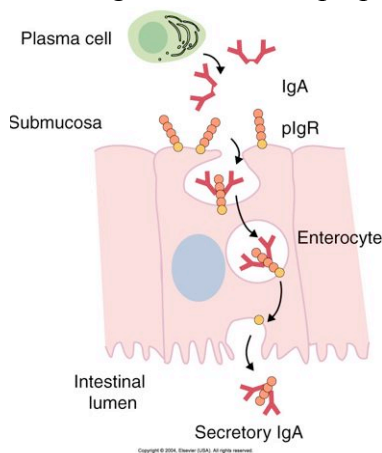
Resultat och Diskussion

De olika anti-IgA antikropparnas förmåga att detektera häst-IgA i olika typer av prover, saliv, nasalsekret eller serum analyserades med dot-blot teknik (Figur 1). Vi fann då att antikropp 2G5 endast detekterar IgA i saliv eller nasalsekret men inte i serum och därför sannolikt är specifik för s.k. sekretoriskt IgA (se nedan). Antikropp 3E7 och de polyklonala antikropparna detekterade IgA i samtliga provtyper. Vidare undersökte vi ifall antikropparna kunde detektera IgA vid s.k. reducerande förhållanden d.v.s. när proteiner är "uppdelade" i sina mindre enheter och t.ex. IgA är uppdelad i bl.a. tunga och lätta kedjor (Figur 1). Vi fann då att antikropparna 2G5 och 3E7 inte detekterade IgA vid reducerande förhållanden utan enbart i dess nativa ("naturliga") form medan den polyklonala antikroppen kunde användas vid både nativa och reducerande förhållanden. Denna information är ny och avgörande för att veta i vilka metoder reagensen kan användas och vilken typ av IgA man detekterar i analyserna.

För att sätta upp en metod att bestämma koncentrationen av IgA i hästsälv behövde vi en preparation av rent häst-IgA. En metod att rena IgA från hästserum baserad på bl.a. jonbyteskromatografi finns beskriven ⁽¹⁴⁾ och vi inledde arbetet med att applicera denna metod på hästsälv (se delrapport från 2007). Metoden visade sig fungera väl tekniskt men utbytet av renat IgA var alltför lågt för att den skulle vara realistiskt användbar för vårt ändamål. Vi behövde därför etablera en alternativ metod för IgA rening. Vid analys av hästsälv med gelelektrofores (PAGE; se nedan) och proteinfärgning fann vi att sälven endast innehöll ett fåtal proteiner (Figur 2). Efter fällning med amoniumsulfat reducerades antalet proteiner ytterligare och i princip endast ett band i storlek motsvarande vad som förväntas av sekretoriskt IgA observerades. Dot-blot analys av de fällda proteinerna visade att preparationen innehöll framförallt IgA men även IgG (Figur 3). Det var tidigare visat att protein G binder häst-IgG men inte häst-IgA ⁽¹⁴⁾. Vi renade därför de fällda proteinerna ytterligare genom att använda en protein G kolonn och kunde därefter visa att endast IgA fanns kvar i preparationen (Figur 3). IgA-koncentrationen kunde sedan bestämmas och preparationen användes som "guld-standard" i ELISA-testet. Vi satte upp en sandwich-ELISA med hjälp av de polyklonala get-anti häst-IgA antikropparna (AAI34) och den monoklonala antikroppen 2G5. ELISAn detekterade ned till 0,26 pg IgA/ml och det linjära detektionsintervallet gick upp till 8,5 ng IgA/ml. Eftersom antikropp 2G5 används detekterar ELISAn sannolikt endast den sekretoriska formen av häst-IgA. Om man vill inkludera även andra former av IgA i analysen kan man istället använda antikropp 3E7. Vi har härmed etablerat ett mycket viktigt verktyg för häst-immunologisk forskning och det fortsatta arbetet i projektet.



Figur 3. Dot-blot analys av IgG- (A) och IgA- (B) innehåll under rening av amoniumsulfat fälld hästsälv på protein G kolonn. 1. Genomflöde före prov 2. Provgenomflöde 3. 1:a genomflödet efter prov 4. Negativ kontroll (10% BSA i PBS) 5. Fälld hästsälv 6. 2:a genomflödet efter prov 7. 3:e genomflödet efter prov



Figur 4. IgA produceras av plasmaceller i submucosan och binds till receptorer på slemhinneepitelceller. IgA tas upp i cellerna och utsöndras sedan tillsammans med en del av receptorn på slemhinnan som sekretoriskt IgA. Bild från Tizard, Veterinary Immunology: An Introduction, 2006.

2) Identifiering av sekretoriskt IgA hos häst

Bakgrund

Hos de djurslag som hittills studerats föreligger IgA-molekylen i olika former i serum och på slemhinnor (d.v.s. i t.ex. tårvätska, nasalsekret och sälv). Hos t.ex. människa förekommer IgA i serum framförallt (till ca 90%) i monomer form, liksom IgG och IgE, men även i dimer form där monomererna är sammankopplade två och två med en s.k. J-kedja ⁽¹⁵⁾. När IgA utsöndras på slemhinnor kopplas dimererna ihop med den s.k. "secretory piece" (Figur 4) och kallas då sekretoriskt IgA. I en tidig studie ⁽⁷⁾ uppskattade man med storlekskromatografi molekylvikterna på olika former av häst-IgA och secretory piece. Vidare har man i en senare studie ⁽¹⁴⁾ med SDS-PAGE beräknat molekylvikterna för häst-IgAs tunga och lätta (gemensam för alla typer av Ig) kedja samt den monomera molekylen. För övrigt finns mycket lite data om hästens IgA-biologi tillgängligt. Vi ville därför med de reagens vi karaktäriserat definiera sekretoriskt IgA hos häst.

Material och Metoder

Poly-akrylamid gelelektrofores (PAGE): För att bestämma molekylvikterna för olika former av häst-IgA användes PAGE i tre olika system; helt oreducerat (nativt) system, SDS-gel med oreducerade prover samt helt reducerat SDS-gelsystem. I alla systemen användes en separationsgel med ett acrylamidinhåll på 6, 8 eller 10 %, beroende på i vilket storleksområde där högst upplösning önskades, samt en "stacking"-gel med 4 % akrylamid. Vid *nativ-PAGE* användes separationsgeler med 6 respektive 8 % acrylamid utan SDS, proverna späddes i buffert utan SDS eller reducerande ämnen och elektroforesen utfördes likaledes i buffert utan SDS. Elektroforesen utfördes vid konstant spänning, 200 V, tills proteinerna i provet separerats. Efter elektroforesen färgades gelerna för proteininnehåll med Coomassie Brilliant Blue. I det nativa systemet användes molekylviktsstandarden Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis (GE Helathcare). Molekylviktsbestämning av IgA i proverna utfördes med en s.k. "Ferguson-plot" och beräkning av retardations koefficienten K_R ⁽¹⁶⁾ för proteinerna i molekylviktsstandarden respektive för IgA i proverna och molekylvikten för IgA beräknades sedan med hjälp av regressionsanalys av standardkurvan från molekylviktsstandarden. Vid *SDS-PAGE* användes separationsgeler med SDS och elektroforesen utfördes i buffert med SDS. Oreducerade prover späddes i buffert med SDS utan reducerande ämnen medan reducerade prover späddes i buffert med SDS samt DTT som reducerande ämne. Elektroforesen utfördes vid konstant spänning, 200 V, tills proteinerna i provet separerats. Efter elektroforesen färgades gelerna för proteininnehåll med Coomassie Brilliant Blue. I båda systemen med SDS-geler användes molekylviktsstandarden Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Fermentas) och molekylviktsbestämning av IgA i proverna utfördes med hjälp av regressionsanalys standardkurvan från molekylviktsstandarden.

Western-blot analys: I de flesta fall utfördes PAGE parallellt på två identiska geler där den ena användes för proteinfärgning (ovan) och den andra användes för Western-blot analys. För den senare transfererades (överfördes) proteinerna från gelen till ett nitrocellulosamembran i en Mini Trans Blot cell (Bio-Rad Laboratories) vid 150 mA i 60-75 min. Membranet blockerades och immuno-blot utfördes med de olika anti-häst IgA-antikropparna på samma sätt som vid dot-blot analysen (ovan).

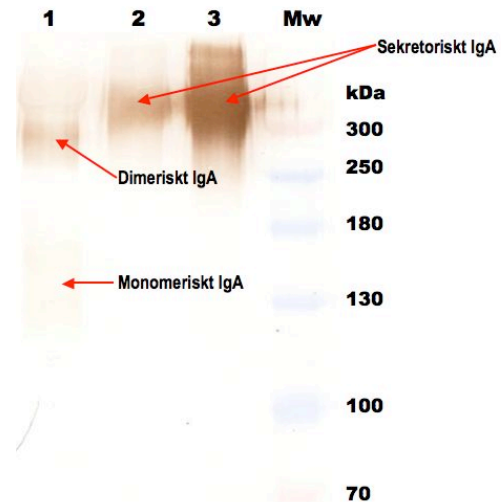
Resultat och Diskussion

Vi har med dessa analyser beräknat molekylvikten för sekretoriskt IgA, dimeriskt och monomeriskt serum-IgA och IgA molekylens tunga kedja samt uppskattat molekylvikten för secretory piece (ett exempel på PAGE i Figur 5; sammanställda resultat i Tabell 1).

Tabell 1. Molekylvikter för olika former av häst-IgA

Gel-system	Molekylvikt för häst-IgA (kDa)				
	sekretoriskt	dimeriskt	monomeriskt	tung kedja	secretory piece
nativ	410				
oreducerad-SDS	402	324	149		78*
reducerad-SDS				60	
Tidigare studier					
Referens #7	400±50	340±40	175±12		≈80
Referens #14			148	56	

*Uppskattad med avseende på skillnaden mellan sekretoriskt och dimeriskt IgA



Figur 5. Western-blot analys med antikropp 3E7 av SDS-PAGE med oreducerade prover. 1. Hästserum 2. Hästsaliv 3. IgA renat från hästsaliv Mw molekylviktsstandard

Detta är första gången sekretoriskt och dimeriskt häst-IgA analyserats med denna metodik och våra resultat stämmer väl överens med vad som tidigare rapporteras ^(7, 14). Intressant är att vi fann mycket mer IgA i dimerisk form än i monomerisk form i det serumprov vi analyserade. Det har även tidigare beskrivits att i hästserum förekommer IgA i högre grad i den dimeriska formen än i den monomeriska formen ^(6, 7, 17). Detta visar att skillnader föreligger mellan hästens och människans IgA-system och våra resultat bidrar sålunda till en viktig grund för att förstå IgA-systemet hos häst.

3) Inventering av antikroppar i hästsäliv

Bakgrund

Det har tidigare visats att nivån av IgA är högre i säliv än i serum hos häst emedan nivåerna av andra immunglobuliner sannolikt är låga i hästsäliv ^(6, 7). Dessa studier omfattade säliv från 4 ⁽⁶⁾ respektive 6 ⁽⁷⁾ hästar och någon mer ingående studie omfattande ett större antal hästar fanns inte. Vidare har B-celler positiva för IgA respektive IgG identifierats i tonsillvävnad från hästar ⁽⁸⁻¹¹⁾. Vi avsåg därför att kartlägga vilka typer och mängder av antikroppar, med initialt fokus på sekretoriskt IgA samt IgG, som förekommer i säliv från kliniskt friska hästar och sedan jämföra detta med statusen hos hästar med karies.

Material och Metoder

Hästar och provtagning: Vi har inkluderat prover från tre grupper av hästar i studien; kliniskt friska hästar utan karies, hästar med aktiv obehandlad karies och hästar som behandlats för karies (2 månader – 2 år efter behandling). Studien är godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd, d.nr. C 90/7. Hittills har 56 hästar och 58 prover inkluderats i studien, två hästar har provtagits vid två tillfällen. Hästarnas kariesstatus, ålder, ras och kön är sammanställda i Tabell 2.

Tabell 2. Antal provtagna* hästar i studien med avseende på kariesstatus, ålder, ras och kön

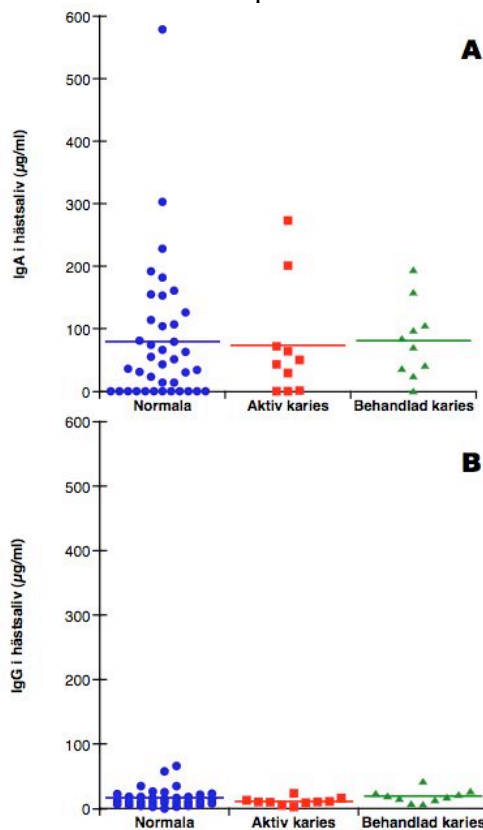
Ålder	Kariesstatus			Totalt
	Normala	Aktiv karies	Behandlad karies	
0-5	2	1	0	3
6-10	20	1	6	27
11-15	12	3	4	19
16-20	3	4	0	7
Okänd	1	1	0	2
Rasgrupp				
Islandshästar	1	1	1	3
Ponny	5	3	1	9
Varmblodiga travare	12	2	1	15
Arab o. Eng. fullblod	1	1	0	2
Varmblod	19	2	7	28
Okänd	0	1	0	1
Kön				
Vallacker	17	9	7	33
Hingstar	1	0	1	2
Ston	20	1	2	23
Totalt	38	10	10	58

* Två varmblodsvallacker blev provtagna vid två tillfällen, en i normalgruppen och en med behandlad karies.

Säliv samlades med en slamsug för valpar och kattungar (25 ml; SweVet Piab) på osederad häst eller omedelbart efter sedering och införande av munstege vid oral klinisk undersökning. I de flesta fall uppmuntrades hästarna att tugga på en gummislag, fäst vid grimman som ett betsel, ca 10-20 min före salivsamling för att stimulera salivproduktionen. Den insamlade saliven överfördes till ett provrör och fasta partiklar (t.ex. från foder) avlägsnades med centrifugering varefter saliven förvarades vid -20°C till analys. Vid provtagningstillfället samlades även serum och nasalsekret.

Alla hästar genomgick en fullständig oral klinisk undersökning ⁽³⁾ i samband med salivprovtagningen. Majoriteten av hästarna (n=37) provtogs även för bakteriologisk

undersökning, enligt tidigare beskriven metod ^(2, 3), där totalantalet bakterier samt antalet *S. devriesei*/ml transportmedium bestämdes.



Figur 6. Halten av sekretoriskt IgA (A) och IgG (B) i saliv från kliniskt friska (normala) hästar, hästar med aktiv karies och hästar med behandlad karies. Linjerna representerar medelvärdet för gruppen.

ELISA för immunglobuliner: Sekretoriskt IgA i salivproverna analyserades med IgA-ELISAn enligt beskrivningen ovan och IgA koncentrationen i proverna bestämdes med hjälp av regressionsanalys av standardkurvan från IgA-standard. För analys av IgG sattes en ELISA upp enligt samma grundprotokoll som beskrivits ovan men med anti-häst IgG (H+L specifik, 108-005-003) som coating-antikropp, HRP-konjugerad anti-häst IgG (Fc fragment specifik, 108-035-008) som detektionsantikropp och renat häst-IgG (ChromPure, 008-000-003) som standard; alla tre från Jackson ImmunoResearch. IgG koncentrationen i proverna bestämdes med hjälp av regressionsanalys av standardkurvan från IgG-standard.

Resultat och Diskussion

Koncentrationen av sekretoriskt IgA bestämdes med ELISA i alla insamlade salivprover. Resultaten visade att halten IgA i saliv från normalgruppen hade stor variation, från < 2,9 µg/ml (under detektionsgränsen) till 579 µg/ml (Figur 6), medel 79 ± 35 µg/ml ($\pm 95\%$ konfidensintervall, $n=39$; Figur 2).

Dessa resultat överinstämmer med vad som tidigare redovisats för häst ($n=6$) ⁽⁷⁾. Jämförbara värden som rapporterats för människa ^(18,19) och katt ⁽²⁰⁾ visade något högre IgA halter än de vi observerade. IgA halterna i saliv från hästar med aktiv karies eller som behandlats för karies visade samma mönster med stor individuell variation (Figur 6) som för de normala hästarna och skilde sig inte signifikant från de normala hästarnas IgA halter, medel 73 ± 57 µg/ml för aktiv och 81 ± 38 µg/ml för behandlad ($\pm 95\%$ konfidensintervall, $n=10$). De tidiga studierna ^(6, 7) indikerade att även IgG förekom i hästsalliv. Vi bestämde därför även koncentrationen av IgG i de insamlade proverna. Halten IgG i saliv från normalgruppen var i genomsnitt 17 ± 14 µg/ml ($\pm 95\%$ konfidensintervall, $n=34$) och visade liksom IgA-halten stor individuell variation (Figur 6). Dessa resultat överinstämmer likaså med vad som tidigare redovisats för häst ($n=6$) ⁽⁷⁾ och även människa ⁽¹⁸⁾ men ligger lägre än vad som observerats för katt ⁽²⁰⁾. IgG halterna i saliv från hästar med karies skilde sig inte heller signifikant från de normala hästarna (Figur 6), medel 11 ± 6 µg/ml för aktiv och 19 ± 11 µg/ml för behandlad ($\pm 95\%$ konfidensintervall, $n=10$). Halten av sekretoriskt IgA i hästsalliv var alltså i genomsnitt högre än IgG halten i alla hästgrupperna (Figur 6). Även när man på individnivå jämförde IgA och IgG halterna fann vi att IgA i regel dominerade över IgG men även här var den individuella variationen stor, medel IgA:IgG-ratio $4,8 \pm 2,0$ för normalhästar, $6,9 \pm 5,0$ för hästar med aktiv karies och $6,8 \pm 3,4$ för hästar med behandlad karies ($\pm 95\%$ konfidensintervall; $n=33$, $n=10$ respektive $n=10$). IgA:IgG-ratiot överinstämmer med en utav de tidigare studierna på hästsalliv ⁽⁷⁾ medan den andra studien av hästsalliv som redovisar denna typ av resultat rapporterar betydligt högre nivåer IgA jämfört med IgG, ca 100 gångers skillnad ⁽⁶⁾. Salivantikroppshalterna jämfördes även med andra parametrar i studien, men vi har inte funnit

något signifikant samband mellan IgA- eller IgG-halten och hästarnas kön, ålder, ras eller bakteriestatus i detta material. Vi fann dock att ston tenderade att ha lägre nivåer av sekretoriskt IgA i saliven jämfört med hingstar och vallacker. Detta överinstämmer med observationer hos människa där man funnit att män har både högre sekretionshastighet och högre salivkoncentration av sekretoriskt IgA än kvinnor ⁽²¹⁾. Eftersom den totala halten antikroppar bland annat avspeglar ”summan” av det totala smittryck en individ erfarit är en hög individuell variation att förvänta. Förutom infektioner påverkas även t.ex. IgA halten i saliv hos bl.a. människa av stress och hård fysisk ansträngning ⁽²²⁾. Det är alltså därför inte oväntat att vi ännu inte funnit någon enskild faktor som signifikant påverkar salivantikroppshalterna i vårt material.

Dessa resultat utgör sålunda den första omfattande kartläggningen av antikroppshalterna i hästsaliv och bidrar därmed med essentiell kunskap för att förstå munhålets immunsvaret hos hästar. Materialet i denna delstudie kommer att utökas så att det inkluderar minst 20 hästar i varje grupp.

4) Detektion av *S. devriesei*-specifika antikroppar i saliv

Bakgrund

Från studier i människa, primater och gnagare ^(5, 23) vet man att kariesbakterier ger upphov till specifika antikroppssvar i saliv och att sådana antikroppar kan mediera skydd mot bakterieangrepp. Huruvida hästens kariesbakterie, *S. devriesei*, också ger upphov till specifika antikroppssvar var dock inte känt. Vi satte därför upp en ”direkt-ELISA”-metod för att detektera antikroppar som binder *S. devriesei*-antigen och analyserade vårt material med avseende på sekretoriskt IgA med denna specificitet.

Material och Metoder

ELISA för detektion av S. devriesei-specifikt sekretoriskt IgA: För detektion av antikroppar mot *S. devriesei* sattes en ELISA upp där *S. devriesei* som ”sönderdelats” genom sonikering till en ”hel-bakterie”-antigenpreparation användes som coating. ELISA-plattor (PolySorp, Nunc) coatades med de sonikerade bakterierna. Efter inkubering över natt och tvätt blockerades brunnarna med 4% BSA i PBS. Efter inkubering och tvätt tillsattes salivproverna som titrerades i åtta 2-stegs spädningar från ursprungsspädningen 1:4. Efter inkubering och tvätt tillsattes antikropp 2G5 och efter ytterligare inkubering och tvätt tillsattes sedan HRP-konjugerad anti-mus Ig. Efter inkubering och tvätt detekterades bindning med substratlösning, 1 mM 3,5,3',5'-tetrametylbenzidin i 0,1 M kaliumcitrat buffert, färgreaktionen stoppades med H₂SO₄ och absorbansen mättes vid 450 nm (Abs_{450nm}). Absorbansvärdet för de olika provspädningarna plottades sedan för varje prov som en kurva mot spädningsfaktorn i ett log₂ diagram. För prover där absorbansen vid \geq spädning 1:4 var högre än bakgrunden i blankbrunnarna (d.v.s. brunnar utan prov) utfördes regressionsanalys av det linjära intervallet av titreringskurvan och titern vid Abs_{450nm}=1 räknades ut. Eftersom antikropp 2G5 användes för detektion av bindning till *S. devriesei*-antigenet analyserades endast sekretoriskt IgA med denna ELISA.

Resultat och Diskussion

Vi har med denna ELISA analyserat halterna (titrarna) av *S. devriesei*-specifika sekretoriska IgA-antikroppar i salivprover från de 36 hästar där bakterieodling utförts (Tabell 2). Även för *S. devriesei*-specifika IgA-antikroppar observerades en stor individuell variation i mängden antikroppar i salivproverna. Vi fann dock att de hästar som var negativa för *S. devriesei* vid provtagningstillfället i genomsnitt hade signifikant lägre bakteriespecifika IgA-titrar i saliven än de hästar där *S. devriesei* påvisades i munhålan. När gruppen med hästar som var positiva för *S. devriesei* delades upp med avseende på förekomst av karieslesioner tenderade hästar

med karies att ha högre *S. devriesei*-specifika IgA-titrar i saliven än de hästar som inte hade karies. När de kariesdrabbade hästarna delades upp ytterligare med avseende på aktiv eller behandlad karies skilde sig däremot inte de *S. devriesei*-specifika IgA-titrarna åt mellan grupperna. Det verkar alltså tydligt utifrån detta material att hästar hos vilka växt av *S. devriesei* inte kunde påvisas hade låga/inga IgA-antikroppshalter mot denna bakterie. Med endast enstaka provtagningstillfällen, såsom i detta material, kan man dock inte avgöra om de hästar som inte bar bakterien aldrig infekterats med *S. devriesei* eller om deras immunsystem lyckats eliminera bakterien. Vi kan inte heller avgöra om det finns ett samband mellan hur bakterien etablerar sig och hur antikropps nivåerna utvecklas. Dessa frågeställningar kvarstår till kommande projekt.

Tabell 2. *S. devriesei*-specifikt sekretoriskt IgA (medeltiter vid OD1 ± 1SE) i saliv från 36 hästar med olika status avseende förekomst av *S. devriesei* och karieslesioner

<i>S. devriesei</i> neg karies neg		<i>S. devriesei</i> pos	
2,2 ± 0,9 n=6		14,7 ± 4,1 n=30	
	<i>S. devriesei</i> pos karies neg	<i>S. devriesei</i> pos karies pos	
	10,2 ± 2,8 n=17	20,4 ± 8,7 n=13	
		aktiv karies	behandlad karies
		19,7 ± 13,3 n=6	21,1 ± 12,5 n=7

Neg – negativ, pos - positiv

Titrarna av *S. devriesei*-specifikt sekretoriskt IgA i hästarnas saliv jämfördes även med andra parametrar i studien och vi fann en signifikant korrelation ($r=0,81$; $p<0,0001$) mellan halten bakterie-specifikt sekretoriskt IgA och den totala halten av sekretoriskt IgA. För övrigt fann vi ingen signifikant korrelation mellan de *S. devriesei*-specifika IgA-titrarna och hästarnas kön, ålder, ras eller bakteriestatus i detta material. Vi observerade dock även för denna parameter, liksom för den totala halten av sekretoriskt IgA, att antikropps nivåerna tenderade att vara lägre hos ston jämfört med hingstar och vallacker vilket överinstämmer med situationen hos människa ⁽²¹⁾. Vidare tenderade de *S. devriesei*-specifika IgA-titrarna att vara lägre hos varmlodiga travare än hos islandshästar vilket är intressant med tanke på att människor med olika genetisk bakgrund uppvisar olika antikropps svar mot den humana kariesbakterien *S. mutans* ⁽²⁴⁾.

Vad beträffar munhålebakterier i detta material fann vi som väntat växt av bakterier, dock inte alltid *S. devriesei*, i alla prover. Ett intressant fynd var att hästar utan karies hade signifikant högre totalantal bakterier än hästar med karies, aktiv eller behandlad. Detta kan tyda på att växt av andra bakterier än *S. devriesei* kan verka skyddande genom att förhindra/försvåra för *S. devriesei* att kolonisera tänderna. Vidare fann vi växt av *S. devriesei* hos 83 % av friska kontrollhästar, dock tenderade hästar utan karies att ha ett lägre antal av bakterien än hästar med karies. Detta skiljer sig från en tidigare studie omfattande prover från 2000-2006 ⁽³⁾, där *S. devriesei* påvisades hos endast 10 % av de friska kontrollhästarna. Denna studie ⁽³⁾ rapporterade också växt av *S. devriesei* hos 100% av hästar med kariesangrepp efter 2000 men bakterien kunde inte påvisas i karieslesioner före 2000. Information om spridningen av *S. devriesei* i hästpopulationen är alltså tämligen begränsad men sammantaget tyder dessa resultat på en snabb spridning av bakterien. I dagsläget liknar situationen hos häst den hos människa där *S. mutans* räknas som en del av munhålets normalflora ⁽²⁵⁾.

Vår nuvarande studie är första gången som antigenspecifika antikroppar påvisas i hästsälv och resultaten utgör en viktig grund till förståelsen av hur *S. devriesei* påverkar och påverkas av hästens immunsystem. Materialet i denna delstudie kommer också att utökas så att det inkluderar minst 20 hästar i varje grupp.

PUBLIKATIONER OCH ÖVRIG RESULTATFÖRMEDLING TILL NÄRINGEN

Resultaten från projektet som presenterats ovan kommer till en del att kompletteras med ytterligare prover och därefter sammanställas för publikation i en vetenskaplig peer-review

tidsskrift. Delar av resultaten presenterades av Anna-Karin Palm i hennes examensarbete (Master's thesis; 27 ECTS) för erhållande av veterinärexamen vid Köpenhamns Universitet i november 2009. Examensarbetet med titeln "Equine secretory immunoglobulin A in association with dental caries" finns tillgängligt via Köpenhamns universitetsbiblioteks-databas (www.bvfb.life.ku.dk). Delar av resultaten presenteras också av Kajsa Dalunde i hennes EEF-arbete (15 HEC) inom veterinärprogrammet vid SLU i december 2009. EEF-arbetet med titel "Slemhinneskadors inverkan på salivens innehåll av IgG och IgA hos häst" kommer att finnas tillgängligt via SLU-bibliotekens databas Epsilon (<http://epsilon.slu.se/>). Vidare presenterade Ove Wattle och Anna-Karin Palm resultat från projektet i Hippocampus seminarier den 09109 under titeln "Hästar, karies och antikroppar i saliv".

REFERENSER

- Lundström, T. and H. Petterson, *Den svenska hästens munhålestatus*. Svensk Veterinär Tidning, 1988. **40**: p. 247-252.
- Collins, M.D., T. Lundström, C. Welinder-Olsson, I. Hansson, O. Wattle, R.A. Hudson, and E. Falsen, *Streptococcus devriesei sp. nov., from equine teeth*. Syst Appl Microbiol, 2004. **27**(2): p. 146-50.
- Lundström, T.S., G.G. Dahlen, and O.S. Wattle, *Caries in the infundibulum of the second upper premolar tooth in the horse*. Acta Vet Scand, 2007. **49**(1): p. 10.
- Smith, D.J. and M.A. Taubman, *Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans*. Crit Rev Oral Biol Med, 1992. **3**(1-2): p. 109-33.
- Russell, M.W., N.K. Childers, S.M. Michalek, D.J. Smith, and M.A. Taubman, *A Caries Vaccine? The state of the science of immunization against dental caries*. Caries Res, 2004. **38**(3): p. 230-5.
- Vaerman, J.P., P. Querinjean, and J.F. Heremans, *Studies on the IgA system of the horse*. Immunology, 1971. **21**(3): p. 443-54.
- Pahud, J.J. and J.P. Mach, *Equine secretory IgA and secretory component*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1972. **42**(2): p. 175-86.
- Kumar, P. and J.F. Timoney, *Histology and ultrastructure of the equine lingual tonsil. I. Crypt epithelium and associated structures*. Anat Histol Embryol, 2005. **34**(1): p. 27-33.
- Kumar, P. and J.F. Timoney, *Histology and ultrastructure of the equine lingual tonsil. II. Lymphoid tissue and associated high endothelial venules*. Anat Histol Embryol, 2005. **34**(2): p. 98-104.
- Kumar, P. and J.F. Timoney, *Histology, immunohistochemistry and ultrastructure of the equine palatine tonsil*. Anat Histol Embryol, 2005. **34**(3): p. 192-8.
- Kumar, P. and J.F. Timoney, *Histology, immunohistochemistry and ultrastructure of the tonsil of the soft palate of the horse*. Anat Histol Embryol, 2006. **35**(1): p. 1-6.
- Crouch, C.F., J. Daly, D. Hannant, J. Wilkins, and M.J. Francis, *Immune responses and protective efficacy in ponies immunised with an equine influenza ISCOM vaccine containing an 'American lineage' H3N8 virus*. Vaccine, 2004. **23**(3): p. 418-25.
- Crouch, C.F., J. Daly, W. Henley, D. Hannant, J. Wilkins, and M.J. Francis, *The use of a systemic prime/mucosal boost strategy with an equine influenza ISCOM vaccine to induce protective immunity in horses*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **108**(3-4): p. 345-55.
- Sugiura, T., H. Imagawa, and T. Kondo, *Purification of horse immunoglobulin isotypes based on differential elution properties of isotypes from protein A and protein G columns*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000. **742**(2): p. 327-34.
- Woof, J.M. and M.A. Kerr, *The function of immunoglobulin A in immunity*. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 270-82.
- Ferguson, K.A., *Starch-Gel Electrophoresis-- Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides*. Metabolism, 1964. **13**: p. SUPPL:985-1002.
- McGuire, T.C. and T.B. Crawford, *Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobulin A*. Infect Immun, 1972. **6**(4): p. 610-5.
- Brandtzaeg, P., *Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity?* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1098**: p. 288-311.
- Sari-Sarraf, V., T. Reilly, D. Doran, and G. Atkinson, *Effects of repeated bouts of soccer-specific intermittent exercise on salivary IgA*. Int J Sports Med, 2008. **29**(5): p. 366-71.
- Harley, R., T.J. Gruffydd-Jones, and M.J. Day, *Determination of salivary and serum immunoglobulin concentrations in the cat*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **65**(2-4): p. 99-112.
- Booth, C.K., D.B. Dwyer, P.F. Pacque, and M.J. Ball, *Measurement of immunoglobulin A in saliva by particle-enhanced nephelometric immunoassay: sample collection, limits of quantitation, precision, stability and reference range*. Ann Clin Biochem, 2009. **46**(Pt 5): p. 401-6.
- Gleeson, M. and D.B. Pyne, *Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on mucosal immunity*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(5): p. 536-44.
- Sanui, T. and R.L. Gregory, *Analysis of Streptococcus mutans biofilm proteins recognized by salivary immunoglobulin A*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(5): p. 361-8.
- Bratthall, D., R. Serinirach, K. Hamberg, and L. Widerstrom, *Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans streptococci*. Oral Microbiol Immunol, 1997. **12**(4): p. 212-8.
- Marcotte, H. and M.C. Lavoie, *Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 71-109.