

Reagerar grisar immunologiskt mot foderproteiner?

Lisa Haggård

**Handledare: Claes Fellström
Inst. för Kliniska Vetenskaper**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ABSTRACT	3
SAMMANFATTNING	4
BAKGRUND OCH SYFTE	5
LITTERATURÖVERSIKT	6
Diarréproblematiken	6
<i>Avvänjningen</i>	6
<i>Zink och antibiotika i fodret</i>	6
<i>Avvänjningsdiarré</i>	7
<i>Svindysenteri</i>	7
<i>Foder och foderintag</i>	7
<i>Tarmvilli</i>	9
GASTROINTESTINALA IMMUNSYSTEMET	9
SPANNMÅLENS UPPBYGGNAD	10
MATERIAL OCH METODER	11
Undersökta grissera	11
Proteinextraktion ur vete enligt Osborne	12
Proteinextraktion ur soja	14
Agar Gel Immunodiffusion test vete, havre, korn, soja	15
Proteinbestämning enligt Bradford	16
SDS-PAGE	17
Separation	17
Transferering	18
Immunoblott	19
RESULTAT OCH DISKUSSION	25
Agar gel immunodiffusion test	25
Immunoblott	25
Förslag till nya försök	28
Sammanfattning	29
ORDLISTA	30
TACK	31
LITTERATURFÖRTECKNING	32

ABSTRACT

The aim of this study was to detect antibodies in swine serum against proteins in soy beans, wheat, oat and barley. Two methods were used: agar gel immunodiffusion test (AGID), and SDS-PAGE followed by immunoblotting. The sera examined originated (I) from piglets younger than one week (negative control), (II) pigs from a feed trial with soy bean in a herd with PMWS, and (III) pigs inoculated with *Brachyspira hyodysenteriae* and *Escherichia coli* after being fed with soy. The AGID-test was negative concerning all examined sera which were analysed against proteins in soy bean, wheat, oat and barley. In the experiment based on immunoblot antibodies were demonstrated within all three groups of examined pigs. The sizes of the protein fragments demonstrated were 20, 28, 45, 46, 47, 48 and 50 kDa. The pigs from the feed trial were divided into two groups. One group was fed conventional soy and the other group processed soy where the contents of antigenic substances had been minimized. The group of pigs fed with conventional soy formed twice as many bands in the blot as the group fed soy which had been processed. Two out of three piglets showed antibodies against soy which indicates that maternal antibodies against soy can be transferred by the colostrum.

SAMMANFATTNING

Försöket avsåg att påvisa antikroppar hos grisar mot proteiner i soja, vete, havre och korn. Två metoder användes, dels en agar gel immunodiffusion test (AGID), och dels SDS-PAGE följt av immunoblott (western blot). Sera som undersöktes var tagna från grisar yngre än en vecka (kontrollgrisar), grisar från ett foderförsök med soja i en PMWS-besättning, och grisar som inokulerats med *Brachyspira hyodysenteriae* och *Escherichia coli* efter utfodring med soja. AGID-testen gav negativt resultat för alla undersökta serumprover analyserade för att påvisa antikroppar mot proteiner i soja, vete, havre och korn. Vid försök baserat på immunoblott undersöktes immunologiska reaktioner mot soja och här påvisades antikroppar hos alla undersökta grisgrupper. Proteinbanden som grisarna reagerade mot hade storlekarna 20, 28, 45, 46, 47, 48 och 50 kDa. Grisarna från foderförsöket var uppdelade i två grupper. Den ena gruppen utfodrades med konventionell soja och den andra gruppen fick processad soja där innehållet av antigena substanser minimerats. Gruppen som fått den konventionella sojan bildade dubbelt så många band i immunoblotten som den andra gruppen där sojan processats. Två av tre kontrollgrisar hade antikroppar mot soja och detta indikerar att maternala antikroppar mot soja överförs via råmjölken.

BAKGRUND OCH SYFTE

I Sverige utgörs huvuddelen av allt grisfoder av spannmål. Samtidigt tillhör grisar ett djurslag som i stor utsträckning drabbas av diarrésjukdomar. Genom att spannmål innehåller ett flertal proteiner som skulle kunna vara stressande för digestionsapparaten skulle den ensidiga dieten i sig kunna predisponera för mag/tarmstörningar. I ett tidigare EEF-arbete har det visats att vissa grisar reagerar immunologiskt mot gluten (gliadin). Andra undersökningar visar att soja i vissa fall kan vara predisponerande för diarré.

Som bakgrund till detta fördjupningsarbete föreligger följande grundhypoteser:

- grisar kan reagera immunologiskt mot vissa foderproteiner
- de immunologiska reaktionerna kan vara orsak till mag/tarmstörningar
- och/eller påverka grisars tillväxt negativt genom att de immunologiska reaktionerna kräver energi

Syftet med detta försök var (a) att utveckla metodik för att påvisa antikroppar mot foderproteiner och (b) att se om proteiner från vete, havre, korn och soja orsakar antikroppsbildning hos grisar. Ett mer långsiktigt syfte är att bestämma den kliniska betydelsen av antikroppsbildningen samt att undersöka om tekniken går att använda för att kvalitetskontrollera svinfoder för optimal tillväxt och hälsa.

LITTERATURÖVERSIKT

Diarréproblematiken

Avvänjningen

Avvänjningen är näst efter födseln den mest kritiska händelsen i grisens liv. Avvänjningen innebär att man abrupt tar bort smågrisarna från suggan. Hos grisar i fritt tillstånd sker avvänjningen successivt från ca 6 till 17 veckors ålder. I modern svinproduktion är avvänjningen en dramatisk upplevelse för grisen, som är van vid en varm och torr miljö hos suggan och huvudsakligen flytande föda med hög smältbarhet. Under avvänjningsperioden är grisens matsmältnings- och immunsystem fortfarande omogna. Flera basala krav på skötsel och miljö måste därför uppfyllas för att avvänjningen skall lyckas. Detta gäller speciellt när avvänjningen skall ske utan hjälp av antibiotika eller zinkoxid, eftersom det är välkänt att dessa tillsatser kan kompensera för brister i miljö och skötsel (Holmgren & Löfstedt, 2005).

Zink och antibiotika i fodret

1986 antogs en ny lag i Sverige som förbjöd inblandning av antibiotika i fodret i tillväxtbefrämjande syfte. Initiativet till förbudet togs av lantbrukarna själva pga. starka konsumentreaktioner i pressen mot fodermedelsantibiotika. Detta medförde dock att grisarna i ökad utsträckning drabbades av bland annat avvänjningsdiarréer. Man såg även en ökad dödlighet efter avvänjningen, högre ålder vid förmedling och ett ökat antal behandlingar med antibiotika. 1992 utfärdade därför Statens Jordbruksverk tillstånd att använda zinkoxid som fodertillsats i smågrisfoder t o m. två veckor efter avvänjning för att minska problemen.

Zink verkar profylaktiskt mot avvänjningsdiarré men marktoxiska effekter och samtidig kritik från EU-kommissionen ledde till ett förbud mot användning av zinkoxid som fodertillsats i högdos. Idag kan zinkoxid i högdos endast skrivas ut av veterinär som licensläkemedel. När förbudet mot foderantibiotika kom 1986 var smågrisproducenterna inte förberedda för en produktion utan lågdosantibiotika i fodret. Resultatanalys inom svinproduktionen (RASP) visade på högre dödlighet efter avvänjning och nästan en veckas längre uppfödningstid till 25 kilos vikt jämfört med före 1986. Avvänjningsfoder, hygiennivåer och produktionssystem var inte anpassade till de nyavvanda grisarnas behov. Förbättringar inom dessa områden har sedan skett och användningen av medicinfoder har kraftigt kunnat minska under senare delen av 1990-talet.

Problem med avvänjningsdiarré ledde till att Svenska Djurhälsovården 1998 beslöt att starta projektet "avvänjning utan zink och antibiotika". Avvänjningsprojektet kom att omfatta tre delstudier och målsättningen var att studera inflytandet av miljöfaktorer, foder, utfodringsstrategier och skötsel under avvänjningsperioden på förekomst av avvänjningsdiarré. Man fann fyra faktorer av betydelse. I besättningar där boxar för avvanda grisar tvättades mellan varje omgång halverades risken att få avvänjningsdiarré jämfört med om boxarna inte tvättades. Risken fördubblades om man blandade grisar som vuxit dåligt med yngre grisar i nästföljande omgång. En bra hygien på utfodringsytan halverade risken för avvänjningsdiarré jämfört med om hygien var medelgod eller dålig.

Avvänningsfoder där proteinkoncentratet utgjordes av fiskmjöl och mjölkprodukter, halverade risken för avvänningsdiarré (Löfstedt, 2002).

Avvänningsdiarré

Symtomen på avvänningsdiarré varierar från lindriga till svåra diarrétillstånd som alltid inträffar 4-14 dagar efter avvänjning. Allmäntillståndet är ofta nedsatt men behöver inte vara påverkat. Avvänningsdiarré anses vara orsakad av den stress som avvänjningen innebär i kombination med patogena stammar av *Escherichia coli* (*E. coli*). Denna stress omfattar i första hand psykiska reaktioner orsakade av unge-moderseparation, vilka orsakar ökad kortisolinsöndring och därmed ökad infektionsbenägenhet. Villi förkortas i tunntarmen vilket påverkar det absorberande epitelet. Detta leder till att tarmen överbelastas och risken för överväxt av patogena kolistammar ökar.

Tarmslemhinnan påverkas dessutom av den foderstress som uppstår i samband med avvänjningen vid byte från mjölk till mjöl. Avvänjningen innebär även en miljöstress genom att värmekällan i form av suggan försvinner.

Etiologin bakom avvänningsdiarré och relationen till *E. coli* är inte helt klarlagd. En doktorshandling av Lysgaard-Hale visar ett relativt dåligt samband mellan diarré efter avvänjning och tillväxt av hemolyserande *E. coli*. Lysgaard-Hale visar också att avvänningsdiarré ofta uppstår ur osmotiska förhållanden i tarmen utan synbart mikrobiologiskt samband. Osmotisk diarré uppstår när ofullständigt digererade födoämnen når grovtarmen, där de genom mikrobiell påverkan omvandlas och ett överskott av fria fettsyror bildas. Detta ökar osmolaliteten i grovtarmsinnehållet och därmed vätskeutträdet till tarmen med diarré som följd.

Avvänningsdiarré saknar ofta specifika patolog-anatomiska förändringar. De vanligaste fynden utgörs av dilaterad fylld magsäck och en katarral tunntarmsenterit (Fellström, 1995).

Svindysenteri

Svindysenteri drabbar grisar från 2-3 veckors ålder. Allvarligaste symptomen brukar man se hos slaktsvin. Sjukdomen orsakas av infektion med spiroketen *Brachyspira (B.) hyodysenteriae*. Organismen finns i grisarnas avföring och smitta sker genom oralt intag. Grisar som tillfrisknar kan bli subkliniska bärare av smittan i upp till 90 dagar. Spiroketen är starkt β -hemolyserande på blodagar och invaderar tarmkryptor i colon där epitelet förstörs och en mucohemorrhagisk colit utvecklas. Grisar som insjuknar får minskad aptit och feber. I typiska fall får grisarna diarré som är blodig och slemrik. Om sjukdomen inte behandlas kan dödligheten bli mycket hög (Radostits et al., 2005).

Foder och foderintag

Hos den nyavvanda grisen är mag-tarmkanalens produktion av syra och enzymer som kan spjälka foderkomponenter ofullständigt utvecklade. Genom att tillföra foder innan avvänjningen kan produktionen av dessa enzymer i viss omfattning stimuleras. Om grisar äter mycket foder innan avvänjning minskar risken för avvänningsdiarré.

Innan avvänjningen diar grisarna mjölk i små mängder vid många tillfällen under dygnet. Suggmjölkens smältbarhet är hög, medan avvänningsfodrets smältbarhet hos den nyligen avvanda grisen är lägre (Holmgren & Löfstedt, 2005).

Under lång tid har nyavvanda grisar i Sverige utfodrats med samma foder från start fram till förmedling. Detta foder är anpassat för tillväxtperioden och därmed också relativt svårsmält för nyavvanda grisar. Mjölakens smältbarhet är ca 95 % medan avvänjningsfoders smältbarhet varierar beroende på ingredienserna, mellan 70 och 90 % (Löfstedt, 2002).

Generellt bör grisarna ha ett smågrisfoder före och under avvänjningen med en så hög smältbarhet som möjligt och som dessutom är välsmakande. Sådana foder kännetecknas av att de inte är baserade på växtproteiner utan på fiskmjöl och mjölkprodukter. Soja anses vara direkt diarréprovocerande under avvänjningen (Holmgren & Löfstedt, 2005). Under andra hälften av 1990-talet började man i allt större utsträckning använda åtminstone två foder fram till förmedling, ofta i samband med övergång till blötfoder. På marknaden lanserades rena avvänjningsfoder baserade på mjölk och fiskprodukter och helt utan soja. I en studie visades att om besättningen använde foder baserade på fiskmjöl och mjölkprodukter var risken att drabbas av avvänjningsdiarré hälften så stor jämfört med om besättningen använde foder utan mjölk och fisk (Löfstedt, 2002).

Hos alla grisar sker under avvänjningsveckan en tillfällig tillbakabildning av tunntarmens ludd, vilket minskar ytan för foderupptag i tarmen och därmed också grisens tillväxt. Förändringen av tarmluddets längd påverkas av foderintagets storlek. Ett lågt foderintag ger ett kortare tarmludd. En ofullständig nedbrytning och ansamling av foderkomponenter bidrar till att pH i tarmen stiger och underlättar tillväxten av kolibakterierna. Om uppförökningen av toxinproducerande kolibakterier är kraftig kan diarré uppstå. En annan, icke infektiös orsak till diarré, är ofullständigt smält foder som har förmåga att binda vatten. Följden blir en osmotisk diarré. Styrd/restruktiv utfodring under avvänjningsperioden har visats minska förekomsten av diarré och minska dödligheten. Denna typ av utfodring innebär att fodergivan begränsas och tilldelas vid ett flertal tillfällen under dygnet. Principen är att fördela dygnsmängden foder på många utfodringsstillfällen. Detta för att inte överbelasta den begränsade matsmältningskapaciteten i grisens tarm (Holmgren & Löfstedt, 2005).

Det har under en längre tid varit känt att man kan påverka utvecklingen av colibacillos efter avvänjning genom att ändra på sammansättningen av dieten. Lättsmälta och mjölkbaserade foder associeras med mindre avvänjningsdiarré. Även foder med högt fiberinnehåll ger visst skydd mot avvänjningsdiarré. Sojabönor däremot kan vara direkt skadliga på tarmmukosan och leda till ackumulering av vätska i tarmen. Höga nivåer av dietärt protein har föreslagits predisponera för avvänjningsdiarré pga. deras höga syrabindande kapacitet i magsäcken, vilket då tillåter ETEC att undkomma den mindre sura miljön i magen och kolonisera tunntarmarna. Källan till det dietära proteinet kan också påverka utvecklingen av avvänjningsdiarré. Foder innehållande komplexa eller stort antal proteinkällor kan göra diarrén allvarligare jämfört med foder innehållande färre antal proteinkällor. Överskottsprotein i tarmarna bryts ned av mikrober och kan bidra till en proteolytisk diarré oberoende av närvaro av *E. coli*, med skadliga aminer som biprodukter vilka irriterar mucosan och inducerar diarré (Hampson D J & Hopwood D E, 2003).

Tarmvilli

Ett experiment utfördes för att utvärdera effekten av att mata avvanda grisar med foder innehållande mjölkprotein eller fjädermjölprotein (bestående av fjädrar från fjäderfän) som huvudsaklig proteinkälla, antingen i begränsad giva eller fri tillgång, med avseende på histologiska skillnader i tunntarmsmucosan från 0-14 dagar efter avvänjning. Mjölkprotein resulterade då i högre villilängd jämfört med fjädermjölprotein (Verdonk J et al., 2001). I en annan studie undersöktes förhållandet mellan avvänjning och villihöjd och kryptdjup i tunntarm hos gris under olika förhållanden. I experiment 1 jämfördes grisar från gårdar med en historia av avvänjningsdiarré med grisar från specific-pathogen-free (SPF) besättningar. I experiment 2 jämfördes avvanda SPF-grisar med icke avvanda kullsyskon. I experiment 3 jämfördes SPF-grisar som gavs tilläggsfoder under diperioden med kullsyskon som inte fick något extra foder. I experiment 1 var villi hos grisar med avvänjningsdiarré kortare än hos SPF-grisarna och kryptorna var djupare. I experiment 2 hade avvanda grisar kortare villi och djupare kryptor jämfört med oavvanda grisar. I experiment 3 hade grisar som fått tilläggsfoder djupare kryptor och längre villi jämfört med grisarna som endast fått dia. Graden av absorption och sekretion av näringsämnen, elektrolyter och vätska i tunntarmarna beror till stor del på villihöjden och kryptdjupet. Absorptionen av näringsämnen, elektrolyter och vatten sker i villienterocyter, medan elektrolyter och vatten utsöndras från kryptcellerna. Då kortare villi och djupare kryptor har färre absorberande och mer sekretoriska celler, blir därmed absorptionen sämre och sekretionen ökar. Slutsatsen av experimentet blev att diarré hos grisar från besättningar med lång historia av avvänjningsdiarré hängde ihop med kortare villi och djupare kryptor. Avvänjning associerades med förkortade villi och djupare kryptor, medan tilläggsfoder under diperioden förhindrar förkortning av villi och orsakar tidigare fördjupning av kryptorna. Djupare kryptor förhindrar villi att förkortas och detta kan leda till att avvänjningsdiarrén inte blir så allvarlig (Nabuurs, 1991).

Gastrointestinala immunsystemet

Gastrointestinala immunsystemet hos gris har två viktiga roller. Det måste kunna känna igen och eliminera mikroorganismer som har potential att orsaka infektiösa sjukdomar. Det måste även kunna känna igen ofarliga (framför allt dietära) antigen och förhindra onödiga och potentiellt skadliga dietära svar på dem (Stokes et al., 2001). Överkänslighetsreaktioner mot dietära antigen kan vara en predisponerande faktor för avvänjningsdiarré. Miller *et al.* (1984) visade att avvänjningsdiarré utvecklades när högantigent material (bovint casein) inkluderades i dieten jämfört med lågantigent material (hydrolyserat casein). Man drog slutsatsen att immunologiskt medierad tarmskada kan predisponera för avvänjningsdiarré hos grisen. Andra matkomponenter som lectin, tanniner, α -amylas inhibitorer och sojabönprotein har visat på liknande immunsvaret när det givits till avvänjningsgrisar. Sojabönans proteiner glycinin och β -conglycinin har visats orsaka villiatrofi och krypthyperplasi. Man har sett både ett lokaliserat och systemiskt immunsvaret mot sojabönans proteiner (King, 2003).

Trots att de organiserade lymfoida vävnaderna utvecklas snabbt och uttrycker immunologisk funktion hos den nyfödda grisen, kan det ta upp till nio veckor innan intestinala lamina propria har utvecklats. Hos den vuxna grisen finns stor

mängd leukocyter i lamina propria med plasma och B-celler runt kryptorna och T-celler i villi. Plasmacellerna är framförallt IgA-producerande och IgM-producerande. Praktiskt taget inga T-celler eller plasmaceller finns i lamina propria hos den nyfödda grisen. Utvecklingen är antigendriven och sker i faser. Dåligt utvecklat lamina propria hos unga grisar kan bidra till misslyckande att nedreglera svar mot dietära antigen vid avvänjning. Den unga grisen har ett aktivt immunsvaret mot virus och dietära komponenter vid tre veckors ålder. Tolerans mot kontinuerligt utfodrat protein är dock inte fullt utvecklat förrän efter 8 veckors ålder. Det har föreslagits att detta tidiga misslyckande att nedreglera svar mot ofarliga dietära proteiner bidrar till avvänjningsdiarré hos grisarna (Stokes et al., 2001).

Sojajmjöl som foder till avvänjningsgrisar minskar ofta tillväxten p.g.a. att det är svårsmält och orsakar överkänslighetsreaktioner. I ett experiment utfört av Li, Nelsén, Reddy, Blecha, Klemm och Goodband (1991) var daglig viktuppgång, matkonversionseffektivitet och proteinsmältbarhet signifikant lägre hos avvänjningsgrisar som fått sojajmjöl jämfört med grisar som fått mjölkbaserat foder (Li et al., 2003).

Komplexa proteiner i sojabönans mjöl har föreslagits som orsak till en övergående överkänslighetsreaktion hos avvänjningsgrisen. Bourne (1984) förklarar att innan tolerans mot ett antigen byggs upp, går grisen igenom en period av ökat svar mot antigenet. Genom att fodra med sojabönprotein under denna period kan skador uppkomma p.g.a. överkänslighetsreaktioner, som t.ex. ökad kryptocellsdelning och omogna enterocyter på villi, vilket leder till minskad absorptionsförmåga och ökad känslighet mot enterotoxiner. Detta svar orsakas av antigena proteiner i sojabönan, som t.ex. glycinin och β -conglycinin. Den övergående överkänslighetsreaktionen mäts experimentellt som högre IgG-titrar (Tokach et al., 2003).

Spannmålens uppbyggnad

I litteraturen anges att de i försöket undersökta fodermedlen vete och soja har följande beståndsdelar:

Vete

Stärkelse – 68,8 %

Protein – 14,1 %

Pentosaner – 7,8 %

Cellulosa – 2,7 %

Reducerande sockerarter – 2,4 %

Lipider – 2,1 %

Aska – 2,1 %

Man klassificerar proteiner i vete baserade på deras olika löslighet.

1. Albuminer – proteiner lösliga i vatten
 2. Globuliner – proteiner lösliga i saltlösning men ej i vatten
 3. Prolaminer (kallas gliadiner i vete) – proteiner lösliga i alkohol men olösliga i altlösning
 4. Gluteliner – olöslig rest
- (Salomonsson, 1986)

Soja

Lösliga kolhydrater – 15 %

Olösliga kolhydrater – 15 %

Olja – 18 %

Protein – 38 %

Fukt, aska, annat – 14 %

Sojabönan innehåller proteiner som klassificeras enligt Svedburgs sedimentationsenheter, S. Ju lägre Svedburgnummer desto mindre är proteinets molekylvikt. De två huvudkomponenterna i sojaprotein är glycinin och β -conglycinin. Glycinin klassificeras som 11S och har en molekylvikt på 350 kDa. (FOO, 2004) Glycinin delas upp i mindre subenheter med en molekylvikt på 45, 38 och 22 kDa. β -conglycinin hör till klassen 7S och har en molekylvikt på 76, 72 och 53 kDa. (El-Shemy et. al., 2001)

MATERIAL OCH METODER

Undersökta grissera

Sera från grisar undersöktes avseende antikroppar mot vatten respektive alkohollösliga proteiner i vete samt proteiner extraherade från soja.

Sera som användes härstammade från tre olika typer av grisar:

- 3 grisar yngre än en vecka som fått råmjölk ("negativ" kontroll). Dessa grisar kommer senare i uppsatsen refereras till som grupp X.
- 5 grisar från ett infektionsförsök där grisarna fodrats med soja och sedan inokulerats med *E. coli* och *B. hyodysenteriae*. Grisarna härstammade från en bruksbesättning och var ca 8 veckor gamla vid försökets början. Under ca en veckas anpassningstid fodrades de med pelleterat slaktsvinsfoder. Därefter bestod fodret under 10 dagars tid av slaktsvinsfoder på morgonen och ren soja i fri tillgång på eftermiddagen. Grisarna inokulerades sedan vid ett tillfälle med tre olika stammar av *E. coli* och vid tre tillfällen med *B. hyodysenteriae* stam B204. Blodprover uttogs sedan efter en månad i samband med avlivning. Dessa grisar kommer senare i uppsatsen refereras till som grupp Y.
- Grisar härstammade från en PMWS-besättning som ingått i ett foderförsök med soja (etiskt tillstånd C255/6). Grisarna delades upp i två grupper där den ena gruppen gavs ett foder innehållande konventionell soja (grupp A) och den andra gruppen ett foder där sojan processats genom etanolextraktion och värmebehandling för att bli av med de antinutritionella egenskaperna (grupp B). Grisarna avvandes vid 5 veckors ålder. Från 3 veckors ålder gavs tillskottsfoder (Trygge zink) fram tills de var 7 veckor gamla. Därefter fick de respektive försöksfoder. Blodprov togs den 25/9 i samband med att försöksutfodringen påbörjades, samt 4 veckor senare den 25/10. Avvänjningsfodret hade en låg proteinhalt, innehöll 2000 mg Zn, och innehöll nästan ingen soja (max 0,2-0,6 % GMO fritt Hamlet (soja) protein där de antigena substanserna är "borttagna"). Försöksgrisarna fasades därefter över på försöksfodren (tabell 1), antingen ett innehållande ordinär soja eller ett med processad soja där innehållet av antigena substanser minimerats. Båda fodren innehöll en hög aminosyranivå och proteinhalt (Ehlorsson et al., 2006).

Tabell 1. Fodersammansättning samt beräknat och analyserat innehåll

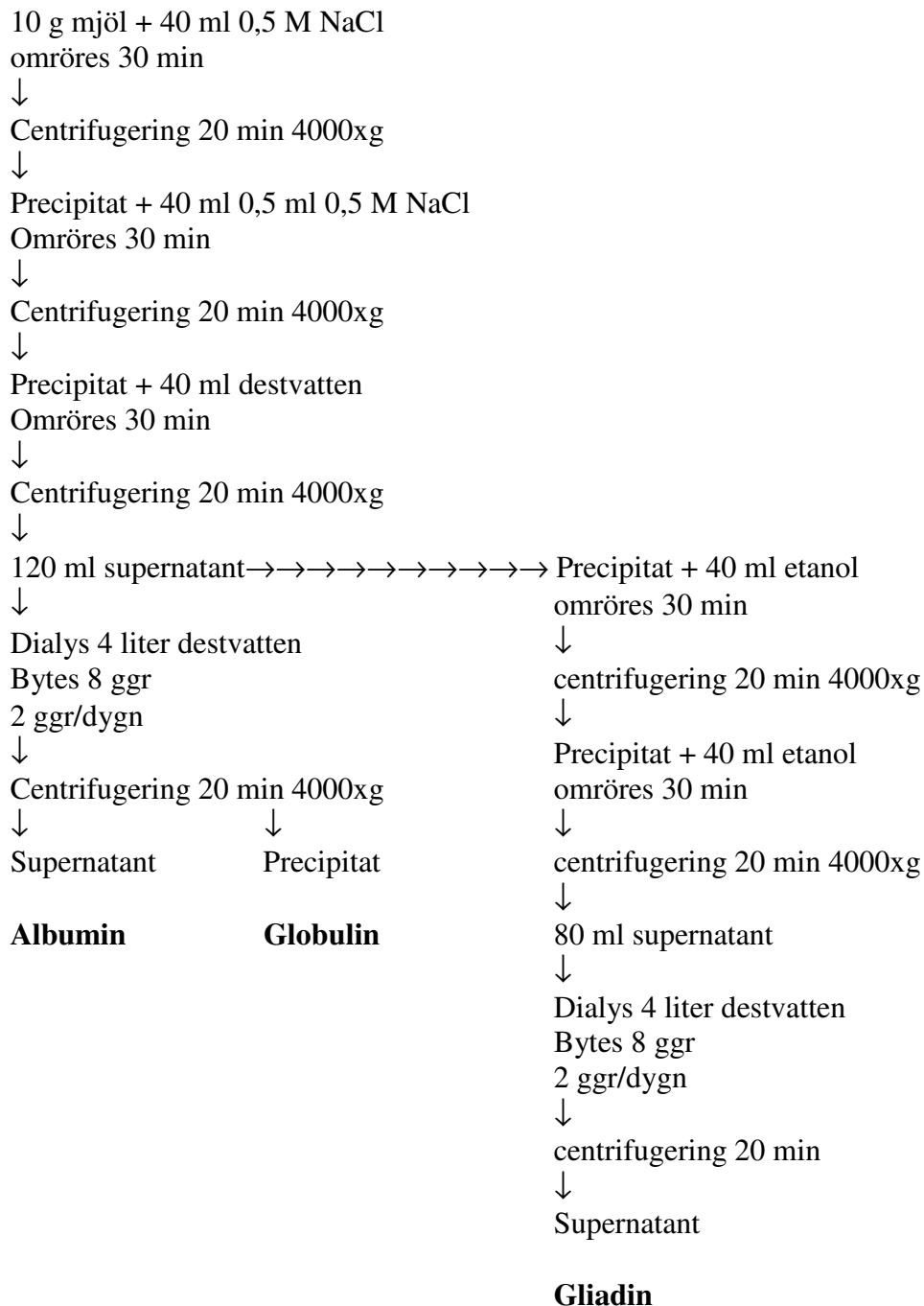
Foder	Konventionellt sojafoder	Processat sojafoder
Korn	30,0	30
Vete	31,1	35
Vetekli	5	5
Vetefodermjöl	8	8
Sojamjöl	15,9	
Processat sojaproteinkoncentrat		12,8
Melass	2	2
Laktos 70	2	2
Ako-feed standard	1,6	0,9
Lysinhydroklorid	0,38	0,43
DL-metionin	0,14	0,14
L-treonin	0,06	0,08
Mineralämnen+ spårämnen + vitaminer + syror	3,82	3,65
Beräknad sammansättning (analyserad)		
MJ/kg	12,6	12,6
Råprotein %	17,7	17,3
Lysin g/kg	11,0	10,9
Sislys g/kg	10,1	10,1
Treonin g/kg	6,6	6,6
Methionin + cystin g/kg	6,9	6,9
Ca g/kg	8,6	8,6
P g/kg	7,0	6,9
Smb P g/kg	3,3	3,3

Källa: Ehlorsson et al., 2006.

Proteinextraktion ur vete enligt Osborne

I studien användes extraktionsmetod enligt Osborne (1907) modifierad av Chen & Bushuk (1970) för att fraktionera albumin, globulin, gliadin och glutenin från oavfettat vetemjöl (Figur 1). Vetekornen maldes i en kaffekvarn 10x10 s med 1 minuts paus mellan varje period. Detta för att kaffekvarnen inte skulle bli för varm och därmed denaturera proteinerna. 10 gram mjöl blandades med 40 ml 0,5 M NaCl och rördes om med magnetorrörare under 30 min i 4°C. Blandningen centrifugerades därefter i 20 min 4000xg. Precipitatet blandades med 40 ml 0,4 M NaCl och rördes på nytt om under 30 min med magnetorrörare i 4°C. Efter ny centrifugering i 20 min 4000xg blandades precipitatet med 40 ml destillerat vatten och rördes om med magnetorrörare under 30 min i 4°C. Därefter centrifugerades blandningen i 20 min 4000xg. Totalt erhöles från dessa steg 120 ml supernatant som fick genomgå dialys i 4 liter destillerat vatten som byttes 8 gånger 2 gånger per dygn. Precipitatet från centrifugeringen blandades ut med 40 ml etanol och rördes om under 30 min med magnetorrörare i 4°C. Blandningen centrifugerades därefter i 20 min 4000xg. Precipitatet blandades ut med ytterligare 40 ml etanol

och rördes om med magnetorrörare under 30 min i 4°C. Blandningen centrifugerades därefter i 20 min 4000xg. Totalt erhöles 80 ml supernatant som fick genomgå dialys i 4 liter destillerat vatten som byttes 8 gånger 2 gånger per dygn. Detta för att få bort alkoholen ur blandningen. Efter dialysen centrifugerades innehållet i vardera dialysslang. Supernatanten i dialysslangen som från början innehöll etanol bestod då av gliadiner. Supernatanten i den andra dialysslangen bestod av albuminer och precipitatet av globuliner. Extraktionen av gliadin utfördes även utan dialys och då innehöll den slutgiltiga supernatanten alkohol (Figur 2). Extraktionen ovan upprepades för havre och korn.



Figur 1. Flödesschema över proteinextraktion enligt Osborne med dialys av gliadin

10 g mjöl + 40 ml 0,5 M NaCl
omröres 30 min
↓
Centrifugering 20 min 4000xg
↓
Precipitat + 40 ml 0,5 ml 0,5 M NaCl
omröres 30 min
↓
Centrifugering 20 min 4000xg
↓
Precipitat + 40 ml destvatten
omröres 30 min
↓
Centrifugering 20 min 4000xg
↓
Precipitat + 40 ml etanol
omröres 30 min
↓
Centrifugering 20 min 4000xg
↓
Precipitat + 40 ml etanol
omröres 30 min
↓
Centrifugeras 20 min
↓
Supernatant

Gliadin

Figur 2. Flödesschema över gliadinextraktion ur vete enligt Osborne

Proteinextraktion ur soja

Sojamjöl erhålls genom att mala hela sojaböner i kaffekvarn. För att avfetta mjölet rördes 100 gram mjöl om med 300 ml etanol i 30 minuter med en magnetomrörare i rumstemperatur. Blandningen fick stå en stund och skikta sig och det översta lagret hälldes därefter bort. Extraktionen upprepades på samma sätt två gånger till för att uppnå maximal avfettning. Efter det sista avfettningsteget filtrerades lösningen i ett kaffefilter och sköljdes med etanol. Mjölet fick därefter torka ett dygn i rumstemperatur.

10 gram avfettat mjöl löstes upp i 150 ml uppvärmt vatten (55°C) och pH justerades och upprätthölls till 9.0 med 2 M NaOH och rördes om under 45 min med magnetomrörare vid 55°C. Lösningen fick stå i 15 min i rumstemperatur och centrifugerades därefter i 30 min 4000xg. Supernatanten samlades upp och pH justerades till 4.5 med 2 M HCl och rördes om under 45 min med magnetomrörare vid 25°C. Därefter centrifugerades lösningen i 15 min 2830xg. Precipitatet tvättades två gånger i destillerat vatten och centrifugerades var gång vid 2830xg i

10 min. Det tvättade precipitatet löstes upp i minimal mängd vatten och neutraliserades till pH 7.0 med 2 M NaOH (Figur 3) (L'hocine et al., 2006).

Avfettat sojamjöl 10 g upplöst i 150 ml 55°C vatten
↓
pH justeras till 9.0 med 2 M NaOH
omröres 45 min vid 55°C
↓
Centrifugeras 30 min 4000xg
↓
pH på supernatanten justeras till 4,5 med 2 M HCl
omröres 45 min vid 25°C
↓
Centrifugeras 15 min 2830xg
↓
Precipitatet tvättas och centrifugeras
10 min 2830xg två gånger
↓
Precipitatet löses upp i liten mängd vatten
pH justeras till 7.0 med 2 M NaOH

Figur 3. Flödesschema för proteinextraktion ur soja

Agar gel immunodiffusion test – vete

Till försöket användes agar gel immunodiffusion test – AGID. Gelen tillverkades enligt följande recept: agarosen löses i 8,5 % NaCl och buffras till pH 9.0 med Tris aminomethane. Slutgiltig agarosekoncentration 0,75 %. Tillsatt natriumazide till en slutlig koncentration av 0,02 %. Plastpetriskålarna hade en diameter på 5 cm och en hålstans med ett centrumhål och sex perifera hål, Ø 4 mm och med 1 cm avstånd användes. Hålen stansades och sögs rent med en vacuumsug. Mängden prov var 30 µl/brunn. Mittenbrunnen fylldes med antigen, i detta fall de olika proteinfraktionerna från tidigare extraktion ur vete (albumin, globulin, gliadin renat från alkohol och gliadin löst i alkohol). I de sex brunnarna runt omkring sattes serumprov från grisar härrörande från PMS-besättningen, grisar från försöket med *B. hyodysenteriae* (grupp Y) och prov från grisarna yngre än en vecka (grupp X). Antalet satta prover var 10 stycken från PMWS-besättningen vid en tidig provtagning (25/9), 10 prover från PMWS-besättningen provtagen en månad senare och 5 prover från grupp Y. Dessutom sattes 3 prover från grupp X. De nyfödda grisarna i grupp X skulle i detta fall fungera som negativ kontroll då de inte kommit i kontakt med annat foder än mjölk och därmed inte själva kunnat utveckla antikroppar mot vete. Problemet med de nyfödda grisarna är att de eventuellt skulle kunna fått antikroppar överförda via råmjölken.

Plattorna inkuberades i 30° C och agarosen avlästes avseende förekomst av precipitationslinjer efter 24 och 48 timmar. Ingen reaktion kunde ses.

För att ta reda på om antigenet förekom i en för hög koncentration gjordes en spädning av gliadinet x 10 och nya prover sattes. Ingen reaktion kunde dock ses efter inkubation 24 och 48 timmar.

Agar gel immunodiffusion test – soja

Ovanstående försök upprepades med soja som antigen i mitten av brunnarna. Plattorna lästes av efter 24 och 48 timmar men ingen reaktion kunde ses.

Agar gel immunodiffusion test – havre

Ovanstående försök upprepades med havre som antigen i mitten av brunnarna. Plattorna lästes av efter 24 och 48 timmar men ingen reaktion kunde ses.

Agar gel immunodiffusion test – korn

Ovanstående försök upprepades med korn som antigen i mitten av brunnarna. Plattorna lästes av efter 24 och 48 timmar men ingen reaktion kunde ses.

Proteinbestämning enligt Bradford

Bradford stamlösning späddes 5 gånger med destillerat vatten för att få en brukslösning. Lösningen filtrerades genom Munktell filterpapper OOH. Till försöket användes en mikrotiterplatta (Figur 4)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figur 4. Mikrotiterplatta

Blank rad = rad 1

40 µl destillerat vatten tillsattes alla hål i rad 1

40 µl destillerat vatten tillsattes alla hål utom A-hålen i rad 2 t.o.m. 11

Till vardera A-hålen i rad 2 och 3 sattes 80 µl av referensen

Till vardera A-hålen i rad 4 och 5 sattes 80 µl av prov 2 (gliadin från vete dialyserat)

Till vardera A-hålen i rad 6 och 7 sattes 80 µl av prov 3 (albumin från vete)

Till vardera A-hålen i rad 8 och 9 sattes 80 µl av prov 4 (globulin från vete)

40 µl titrerades från rad A t.o.m. H (ej rad 1). 40 µl kastades efter sista raden.

200 µl Bradford brukslösning tillsattes till alla hål.

Absorbansvärdena avlästes i spektrofotometer vid våglängd 595 nm.

Försöket ovan upprepades med soja (späddes 20 µl soja + 2 ml destillerat vatten).

Proteinhalten i de olika proverna beräknades sedan till:

Gliadin från vete (i etanol) 672 µg/ml

Gliadin från vete (dialyserat) 34 µg/ml

Albumin från vete 320 µg/ml

Globulin från vete 1600 µg/ml

Soja (20 µl soja + 2 ml destillerat vatten spädning) 272 µg/ml

Utstryk av alla prover gjordes på blodagarplattor för att kontrollera förekomst av bakterieväxt. Plattorna inkuberades i 37°C i 24 timmar. Bakterieväxt kunde då ses i albumin, dialyserat gliadin och globulin. Det förekom inte några bakterier i sojan eller det odialyserade gliadinet innehållande etanol. Proverna framställdes cirka fyra veckor tidigare och borde ha frysts mellan framtagning och tillfälle för analys för att undvika bakterieväxt.

”Rå”-gliadin inköpt från Sigma löstes upp i 50% etanol och blandades till en koncentration på 2 mg/ml. Gliadinet analyserades med avseende på proteinkoncentration enligt Bradfords metod ovan.

Proteinbestämningen gav en koncentration på 1920 µg/ml.

SDS-PAGE – gjuta gel

Separationsgel 12 % blandades enligt följande recept:

2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

3,35 ml destillerat vatten

4,0 ml 30 % Acrylamide/Bis

50 µl 20 % SDS

100 µl 10 % APS

10 µl TEMED

Gelen polymeriserades i rumstemperatur i ca 30 min.

Stackinggel blandades enligt följande recept:

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

6,1 ml destillerat vatten

1,3 ml 30 % Acrylamide/Bis

50 µl 20 % SDS

100 µl 10 % APS

20 µl TEMED

Separation

Soja (spädning 20 µl soja + 2 ml destillerat vatten) 272 µg/ml tillreddes i en spädningsserie:

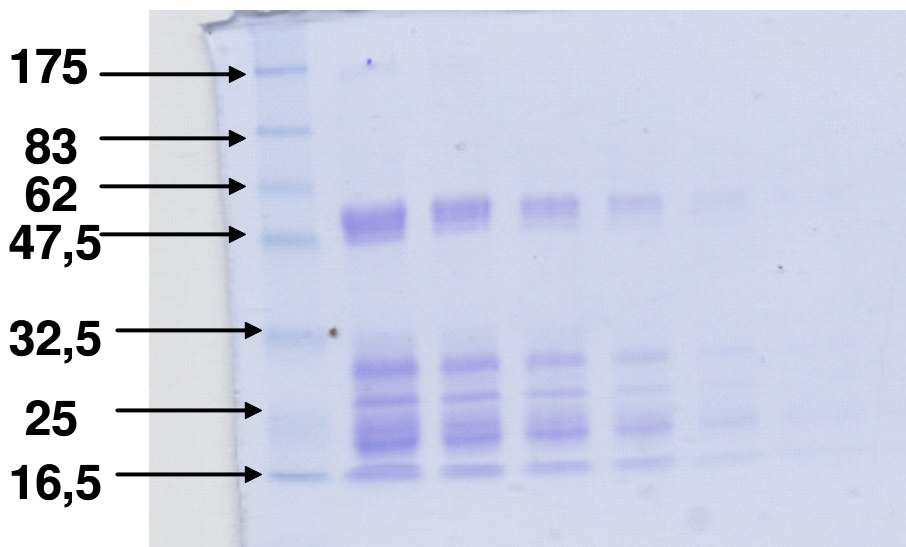
1:2 Soja 25 µl + (SDSx2) 25 µl (kokas 5 min)

1:4 Från ovanstående blandning togs 25 µl som blandades med 25 µl destvatten

1:8 Från ovanstående blandning togs 25 µl som blandades med 25 µl destvatten

1:16 Från ovanstående blandning togs 25 µl som blandades med 25 µl destvatten

1:32 Från ovanstående blandning togs 25 µl som blandades med 25 µl destvatten
 1:64 Från ovanstående blandning togs 25 µl som blandades med 25 µl destvatten
 Markören NEB Protein Marker broad range kokades även denna i 5 min.
 7 µl av markören tillsattes till brunn 1 i gelen. Brunn 2, 3, 4, 5, 6 och 7 fylldes med spädningsserien av soja (10 µl i vardera brunn). Gelen kördes därefter i 45 min 200 V. Gelen färgades i en timme och avfärgades i ytterligare en timme. Proteinband kunde ses i spädning 1:2 och 1:4 på storlekarna 48, 28 och 20 kDa men banden syntes inte jättetydligt. Därför göts senare under projektet en ny gel med starkare koncentration av sojan i brunnarna. 20 µl av soja från den ursprungliga råfraktionen blandades med 125 µl destillerat vatten. Denna blandning tillreddes i en spädningsserie med SDSx2 från 1:2- 1:128. Blandningarna kokades i 5 min tillsammans med markören och 10 µl tillsattes sedan till varje brunn i gelen. Elektrofores kördes på 200 V under 50 min. Gelen färgades i en timme och fick sedan avfärgas i ytterligare en timme. Starka proteinband kunde då ses på storlekarna 50, 28, 25, 20 och 16,5 kDa. (Figur 5)



Figur 5. Soja med proteinband där storleken på markören längst till vänster anges i kDa

En ny gel göts innehållande inköpt rågliadin. Gliadinet späddes 1:2 med destillerat vatten och späddes därefter med 2xSDS från 1:4-1:32. En elektrofores kördes i 50 min och gelen färgades sedan. Proteinband kunde ses vid storleken 40 kDa samt suddigt från 35 kDa och nedåt i sjunkande proteinstorlek.

Transferering

Ytterligare en gel göts med en stor kam där gliadin spädd 1:2 med SDSx2 placerades. En elektrofores kördes i 50 min och därefter transfererades gelen innehållande gliadin över till ett membran under 45 min vid 300 mA. Transferbufferten som användes innehöll 200 ml metanol, 100 ml transferbuffert 10x och 700 ml destillerat vatten.

Membranet sköljdes med TBS och därefter tillsattes blockningsbuffert bestående av 5 g torrmjök utblandat i 100 ml TBS. Membranet fick stå med blockningsbufferten i 30 min rumstemperatur på skakmaskin.

Immunoblott

Membranet klipptes i 3 mm breda stripps, totalt 23 stycken. Sera från grisar provtagna 25/9 och negativa kontrollen X nr 9 tillreddes i två spädningar, 1:25 och 1:100 (Tabell 2). Spädningsvätskan bestod av TBS-T + 2 % mjölkpulver. Serumspädningarna tillsattes till stripp 4-23 och fick stå på skakmaskin i rumstemperatur en timme. Strippen sköljdes sedan på skakmaskin 3x5 min med TBS-T. Konjugatet grisantiserum (kaninsera med antikroppar mot grisens IgG-antikroppar) späddes i TBS-T + 2 % mjölkpulver i spädningarna 1:200 och 1:1000. Konjugatet antigliadin späddes i TBS-T + 2 % mjölkpulver i spädningarna 1:250, 1:500 och 1:1000. Antigliadinet tillsattes till stripp 1-3 och grisantiserat till stripp 4-23 (~1 ml/stripp) för att sedan stå på skakmaskin under en timme. Stripparna sköljdes därefter på skakmaskin 3x5 min med TBS-T och framkallades sedan med DAB (två tabletter av vardera sorten till 10 ml destillerat vatten) under 15 min i rumstemperatur. Stripp 1, 2 och 3 med antigliadin var utsmetat och hade ej distinkta band. Detta kan bero på att gliadinet var en råfraktion och inte tillräckligt framrenat. Gris nr 9 hade ett distinkt band på 40 kDa. Övriga grisar visade också proteinband men här var bakgrunden mörkare och banden svårare att avläsa.

Tabell 2. Spädningsserie för grissera från grupp X samt grisar provtagna den 25/9

Strip p	Gris	Spädning	Mängd sera	Mängd TBS-T	Grisantiserum spädning
1	Antigliadin	1:250			
2	Antigliadin	1:500			
3	Antigliadin	1:1000			
4	9 (X)	1:25	32	768	1:200
5	9 (X)	1:25	32	768	1:1000
6	9 (X)	1:100	8	792	1:200
7	9 (X)	1:100	8	792	1:1000
8	1 (25/9)	1:25	32	768	1:200
9	1 (25/9)	1:25	32	768	1:1000
10	1 (25/9)	1:100	8	792	1:200
11	1 (25/9)	1:100	8	792	1:1000
12	2 (25/9)	1:25	32	768	1:200
13	2 (25/9)	1:25	32	768	1:1000
14	2 (25/9)	1:100	8	792	1:200
15	2 (25/9)	1:100	8	792	1:1000
16	3 (25/9)	1:25	32	768	1:200
17	3 (25/9)	1:25	32	768	1:1000
18	3 (25/9)	1:100	8	792	1:200
19	3 (25/9)	1:100	8	792	1:1000
20	4 (25/9)	1:25	32	768	1:200
21	4 (25/9)	1:25	32	768	1:1000
22	4 (25/9)	1:100	8	792	1:200
23	4 (25/9)	1:100	8	792	1:1000

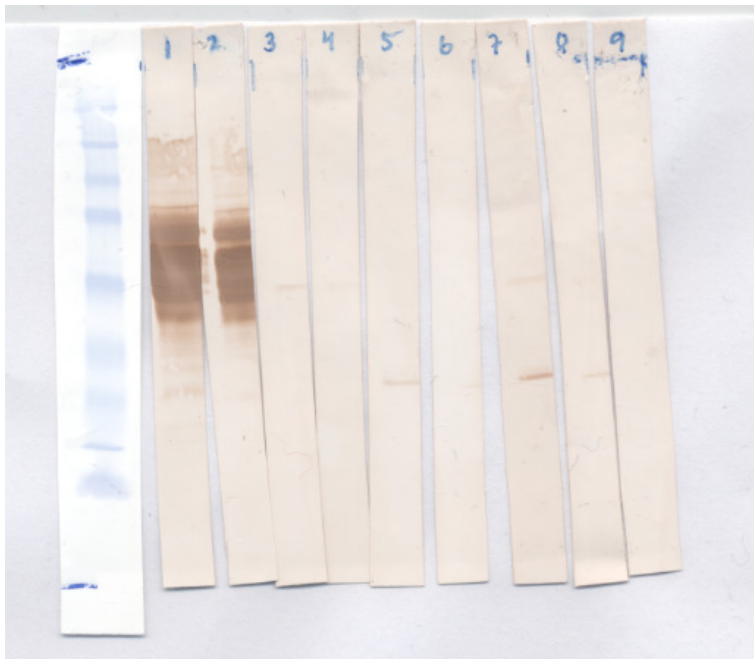
Nytt försök med soja utfördes med två brunnar innehållande gliadin (extraherat i etanol) och övriga brunnar innehållande soja. Två geler göts där brunn 2 och 3 innehöll gliadin spädd 1:2 i SDSx2 och där soja sattes till brunn 4-10. Elektrofores kördes i 50 min, därefter transferering 45 min 300 mA.

Membranen klipptes i stripp efter brunnarnas storlek, totalt 9 stycken per membran.

Sera från grisar provtagna den 25/10 grupp A och B tillreddes i två spädningar, 1:25 och 1:100 (Tabell 3 och 4). Spädningsvätskan bestod av TBS-T + 2 % mjölkpulver.

Serumspädningarna tillsattes till stripp 3-9 och fick stå på skakmaskin i rumstemperatur en timme. Strippen sköljdes sedan på skakmaskin 3x5 min med TBS-T. Konjugatet grisantiserum späddes i TBS-T + 2 % mjölkpulver 1:500 och konjugatet antigliadin späddes i TBS-T + 2 % mjölkpulver 1:250 och 1:500. Antigliadinet tillsattes till stripp 1-2 och svinantiserat till stripp 3-9 (~1 ml/stripp) för att sedan stå på skakmaskin under en timme. Strippen sköljdes sedan på skakmaskin 3x5 min med TBS-T. Strippen framkallades sedan med DAB (två tabletter av vardera sorten till 10 ml destillerat vatten) under 15 min i rumstemperatur.

Gliadinet färgades in av antigliadinet och detta visar att testet fungerade (Figur 6).



Figur 6. Grisar från 25/10 med gliadin på första två strippen

Tabell 3. Spädningsserie för grissera från grisar provtagna den 25/10

Stripp	Gris (25/10)	Spädning	Mängd sera	Mängd TBS-T	Grisantiserum spädning
1	Antigliadin	1:250			
2	Antigliadin	1:500			
3	10A	1:25	32	768	1:500
4	10A	1:100	8	792	1:500
5	13A	1:25	32	768	1:500
6	13A	1:100	8	792	1:500
7	14A	1:25	32	768	1:500
8	14A	1:100	8	792	1:500
9	15A	1:25	32	768	1:500

Tabell 4. Spädningsserie för grissera från grupp X samt grisar provtagna den 25/10

Stripp	Gris (25/10)	Spädning	Mängd sera	Mängd TBS-T	Grisantiserum spädning
1	Antigliadin	1:250			
2	Antigliadin	1:500			
3	15 (X)	1:25	32	768	1:500
4	15 (X)	1:100	8	792	1:500
5	14B	1:25	32	768	1:500
6	14B	1:100	8	792	1:500
7	15B	1:25	32	768	1:500
8	15B	1:100	8	792	1:500
9	16B	1:25	32	768	1:500

Fyra nya geler med en stor kam göts och soja spädd 1:2 i SDSx2 tillsattes till de stora brunnarna. Elektrofores kördes i 50 min 200 V, därefter transferering 45 min 300 mA till membran. Sera från grisar provtagna 25/9, 25/10 grupp A och B, grupp Y och grupp X tillsattes till klippta stripps med gris 15 B som positiv kontroll och gris 16B som negativ kontroll (Tabell 5-8). Grisserat späddes 1:25 med TBS-T + 2 % mjölkpulver. Strippen med serumspädningarna fick stå på skakmaskin i rumstemperatur en timme. Strippen sköljdes sedan på skakmaskin 3x5 min med TBS-T. Konjugatet grisantiserum späddes 1:500 i TBS-T + 2 % mjölkpulver och tillsattes till strippen (~1 ml/stripp) för att sedan stå på skakmaskin under en timme. Strippen sköljdes därefter på skakmaskin 3x5 min med TBS-T.

Strippen framkallades med DAB (två tabletter av vardera sorten till 10 ml destillerat vatten) under 15 min i rumstemperatur. (Figur 7 och 8)



Figur7. Grisar provtagna den 25/10 ur grupp B



Figur 8. Grisar provtagna den 25/10 ur grupp A samt tre grisar från grupp X (stripp 12-14)

Tabell 5. Spädningsserie för grissera från grisar provtagna den 25/9

Stripp	Gris (25/9)	Spädning sera	Grisantiserum spädning
1	15 B (25/10) pos kontroll	1:25	1:500
2	16 B (25/10) neg kontroll	1:25	1:500
3	2	1:25	1:500
4	3	1:25	1:500
5	4	1:25	1:500
6	5	1:25	1:500
7	7	1:25	1:500
8	8	1:25	1:500
9	9	1:25	1:500
10	12	1:25	1:500
11	13	1:25	1:500
12	14	1:25	1:500
13	18	1:25	1:500
14	19	1:25	1:500
15	20	1:25	1:500
16	26	1:25	1:500
17	24	1:25	1:500
18	27	1:25	1:500
19	28	1:25	1:500
20	29	1:25	1:500
21	32	1:25	1:500
22	35	1:25	1:500

Tabell 6. Spädningsserie för grissera från grupp X samt grisar provtagna den 25/10

Stripp	Gris (25/10)	Spädning sera	Grisantiserum spädning
1	1A	1:25	1:500
2	2A	1:25	1:500
3	4A	1:25	1:500
4	8A	1:25	1:500
5	9A	1:25	1:500
6	11A	1:25	1:500
7	12A	1:25	1:500
8	16A	1:25	1:500
9	17A	1:25	1:500
10	18A	1:25	1:500
11	20A	1:25	1:500
12	9 (X)	1:25	1:500
13	15 (X)	1:25	1:500
14	18 (X)	1:25	1:500

Tabell 7. Spädningsserie för grissera från grisar provtagna den 25/10

Stripp	Gris (25/10)	Spädning sera	Grisantiserum spädning
1	1B	1:25	1:500
2	2B	1:25	1:500
3	5B	1:25	1:500
4	6B	1:25	1:500
5	7B	1:25	1:500
6	8B	1:25	1:500
7	9B	1:25	1:500
8	11B	1:25	1:500
9	12B	1:25	1:500
10	15B	1:25	1:500
11	15B	1:25	1:500
12	17B	1:25	1:500
13	19B	1:25	1:500
14	20B	1:25	1:500

Tabell 8. Spädningsserie för grissera från grupp Y

Stripp	Gris (Y)	Spädning sera	Grisantiserum spädning
1	1	1:25	1:500
2	2	1:25	1:500
3	3	1:25	1:500
4	4	1:25	1:500
5	5	1:25	1:500
16	15B (25/10) pos kontroll	1:25	1:500
17	16B (25/10) neg kontroll	1:25	1:500

RESULTAT OCH DISKUSSION

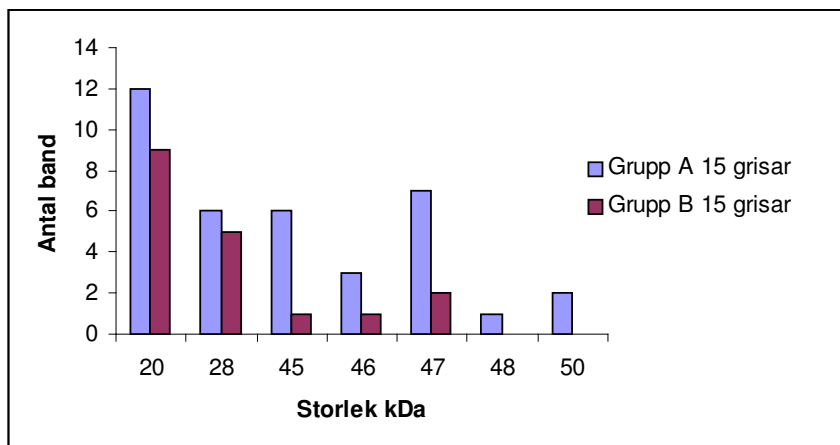
Agar gel immunodiffusion test

Det inledande försöket med agar gel immunodiffusion test var negativt på alla satta prover från soja, vete, korn och havre. Då testet inte hade någon positiv kontroll var det svårt att utvärdera om resultatet berodde på metodfel eller om det inte fanns några antikroppar att detektera. Senare utförda försök med immunblott visar att det faktiskt fanns antikroppar i sera från många av de provtagna grisarna. Möjlig orsak till det falskt negativa resultatet skulle kunna vara att gelen inte var optimal för antikropparna att vandra i. Denna förklaring är dock inte så sannolik eftersom testen fungerar när den används vid annan diagnostik av antikroppar av motsvarande storlekar. En annan tänkbar orsak är att antigenerna inte funnits i tillräckligt hög koncentration i de extraherade proteinfraktionerna eller att de inte har kunnat vandra i gelen. Orsakerna gick inte att utvärdera i det här försöket.

Immunoblott

Serumprover från den 25/9 sattes till stripp innehållande inköpt gliadin. Som kontroll för att se att testet fungerade sattes antigliadin till tre av strippen. Vid framkallning var strippen med antigliadin utsmetade och mörka i färgen. Detta kan bero på att gliadinet var en råfraktion och inte tillräckligt framrenat. Fyra serumprover från grisar provtagna den 25/9 undersöktes och alla visade svaga band vid storlekarna 45, 32 och 25 kDa. Bakgrunden var även här relativt mörkfärgad och strippen blev svåra att avläsa. Den unga grisen X nr 9 hade ett distinkt tydligt band vid 45 kDa. Detta tyder på att antikroppar mot gluten faktiskt kan överföras via råmjölken.

Nytt försök på soja utfördes där serumprover sattes från grisar provtagna den 25/9 samt den 25/10 (Tabell 9). Totalt 20 prover sattes från den 25/9 och av dessa var det endast en gris som visade reaktion vid proteinstorlek 48 kDa. Resterande grisar saknade antikroppar. 15 prover från den 25/10 från grupp A och 15 prover från grupp B analyserades och där sågs en tydlig skillnad mellan grupperna (figur 9). Grisar ur grupp A hade utvecklat totalt 37 band vid olika proteinstorlekar (20, 28, 45, 46, 47, 48, 50 kDa) medan grisar ur grupp B hade utvecklat endast 18 band vid olika proteinstorlekar (20, 28, 45, 46, 47 kDa).



Figur 9. Jämförelse mellan antalet proteinband hos grupp A och B provtagna den 25/10

Tabell 9. Resultat från immunoblott från grisar provtagna 25/9, 25/10 grupp A, 25/10 grupp B

Box	25/9 Provrör nr	Band (kDa)	25/10 Provrör nr	Band (kDa)
330:1			1A	20 och svag 45, 46, 47, 50
330:2			2A	Liten mängd kvar
330:3			3A	20 och svag 28, 45, 47
330:4	3	blank	4A	20
330:5			5A	Blod
331:6			6A	Slut
331:7	14	blank	7A	Slut
331:8			8A	20 och svag 45, 47
331:9			9A	svag 45, 46, 47
331:10			10A	20 och svag 28, 48
332:11	32	blank	11A	svag 47 och 50
332:12	12	blank	12A	Blank
332:13	24	blank	13A	svag 20 och 28
332:14			14A	20 och 28
332:15			15A	svag 20
333:16	9	blank	16A	svag 20
333			17A	svag 20, 28, 45, 46, 47
333:18			18A	svag 20, 45, 47
333:19	4	blank	19A	Saknas
333			20A	svag 20 och 28
312:1			1B	20
312:2	19	blank	2B	svag 20
312:3	20	48	3B	Saknas
312:4	7	blank	4B	Slut
312:5	29	blank	5B	svag 28
312:6			6B	stark 20
312:7			7B	svag 28
312:8	13	blank	8B	Blank
312:9	35	blank	9B	20 och 28 och 47
312:10			10B	Saknas
311:11			11B	svaga 45, 46 47
311:12	8	blank	12B	20 och svag 28
311:13	2	blank	13B	Slut
311:14	27	blank	14B	20
311:15	26	blank	15B	20 och 28
310:16	28	blank	16B	Blank
310:17			17B	svag 20
310:19	5	blank	19B	20
310:20	18	blank	20B	Blank

Grupp A hade fått det konventionella sojafodret medan grupp B utfodrats med processad soja där innehållet av antigena substanser minimerats. Den processade sojan tycks därmed vara skonsammare för grisen och inte stimulera till lika hög antikropps bildning som den oprocessade sojan.

Grisarna provtagna den 25/9 visade ingen antikropps bildning mot soja men fyra veckor senare efter utfodring med soja hade de flesta av grisarna bildat antikroppar, framför allt i gruppen som fått oprocessad soja. Någon negativ inverkan på tillväxten genom att använda oprocessad soja jämfört med processad kunde inte påvisas. En negativ effekt när det gäller foderåtgången (foderomvandlingsförmågan) kan dock inte helt uteslutas eftersom foderåtgången inte registrerades i försöket. Det är väl känt att mycket energi åtgår när immunsystemet skall producera immunoglobuliner. Man kan därför inte utesluta att foderåtgången varit större i gruppen som fått oprocessad soja.

Tre unga grisar från den "negativa kontrollen" grupp X undersöktes avseende antikroppar mot soja och två av dessa visade band med storleken 28 kDa (Tabell 10). Detta tyder på att antikropparna överförts via råmjölken från suggan. De maternala antikropparna kvarstår men avtar normalt fram till avvänjningen och under någon vecka till. Grisarna som provtogs den 25/9 var ca 7 veckor gamla och de maternala antikropparna bör ha minskat kraftigt eller helt försvunnit hos dessa. Det är därför logiskt att antikroppar mot soja inte kunde påvisas hos dessa grisar.

Tabell 10. Resultat immunoblott kontrollgrisar

Grupp X	Band (kDa)
9	blank
15	28
18	28

De fem grisarna som ingått i ett infektionsförsök med *E. coli* och *B. hyodysenteriae* visade alla antikropps bildning mot soja (Tabell 11). Proteinbanden låg på storlekarna 10, 20, 47, 49 och 50 kDa. Dessa grisar saknade helt antikroppar mot band vid storleken 28 kDa, något som faktiskt hittades både hos grisarna provtagna den 25/10 grupp A och B samt hos två av kontrollgrisarna.

Tabell 11. Resultat immunoblott grupp Y

Gris nr	Band (kDa)
1	svag 20, 47, 49, 50
2	svag 10, 47, 49, 50
3	svag 49
4	svag 49, 50
5	svag 20, 49, 50

Soja innehåller proteiner av flera storlekar varav glycinin är mycket stort, ca 350 kDa. Vid gjutning av gel och separation av proteinbanden kunde bara proteiner med storleken 175 kDa och mindre analyseras. Detta skulle kunna betyda att ett av sojans huvudproteiner inte kom med på gelen och därför inte kunde undersökas avseende antikroppar hos grisarna. Troligen har glycininet delats upp i dess mindre subenheter på 45, 38 och 22 kDa. Grisarna som undersöktes hade band vid storlekarna 45 och 20 kDa och detta tyder på att glycininet faktiskt var uppdelat i

subenheter. Huruvida glycininet delades upp eller inte var dock svårt att utvärdera i försöket.

Förslag till nya försök

Undersökningarna visar att tekniken SDS-PAGE och immunoblott är en väl lämpad metod för att undersöka om grisar reagerar immunologiskt mot fodermedel. Denna teknik skulle därför kunna användas för att kontrollera lämpligheten av ett foder som ges till grisar. I litteraturen beskrivs ett antal försök med soja och dess effekter på immunsystemet och magtarmkanalen, men när det gäller de olika sädeslagen finns mycket lite publicerat inom området. Studier behövs för att undersöka om ett ökat antikroppssvar ger en positiv eller negativ inverkan på grisens hälsa och tillväxt. En studie finns utförd där man undersökte effekten av genistein (en isoflavon som finns i stor mängd i soja) på grisar som inokulerats med PRRS virus. Grisarna delades in i grupper och fodrades med olika koncentrationer av genistein (0, 200, 400 och 800 ppm). Från avvänjning till inokulation (19 dagar) minskade viktuppgång och foderintag linjärt med ökande koncentrationer genistein. Efter inokulationen resulterade dock en ökad mängd utfodrad genistein i en linjärt minskad serumkoncentration av viruset. Detta ledde till att kroppsvikten under faser med hög viremi ökade när det dietära genisteinet ökade (Greiner et al., 2001). Studien visar alltså att utfodring med genistein ökar grisens motståndskraft mot att infekteras och inhiberar virusreplikation. Den lägre nivån av virusinfektion hos grisarna som fått genistein resulterade i ökad tillväxt och högre foderintag. Genistein tycks därmed ha en positiv inverkan på immunförsvaret. Tillväxten minskade dock innan inokuleringen med PRRS virus. Andra undersökningar visar också att utfodring med soja jämfört med andra proteinkällor gav en lägre tillväxt och kortare tarmvilli (Friesen et al., 1993; Li et al., 1991).

En framtida studie skulle kunna inriktas på att jämföra ”pellegrisar” med friska grisar från samma box avseende antikroppar mot gluten och andra spannmålsproteiner samt soja. Det vore intressant att se om de klenväxta grisarna och grisar som har haft diarré har en högre förekomst av antikroppar mot fodret jämfört med de friska grisarna.

För att undersöka om en ökad antikropps bildning hos grisen medför några negativa effekter på gastrointestinalkanalen vore det även intressant att ta biopsier från tarmen. Man skulle då kunna se om ett ökat antikroppssvar ger upphov till förändringar i tarmväggen. Studier finns som visar att soja kan ha en negativ inverkan på grisars tarmvillihöjd (Li et al., 1991) vilket i sin tur kan leda till sämre näringsupptag och lägre tillväxt.

Proteinextraktionerna från AGID-testet fick stå i kylskåp under några veckor i väntan testet med immunoblott. Detta ledde till bakterieväxt i proverna innehållande albumin, globulin och gliadin som dialyserats. Tiden medgav inte att göra nya proteinextraktioner, men det vore intressant att i framtiden undersöka om antikropps bildning sker även mot dessa proteiner. Indikationer på att så är fallet finns då proteinband kunde ses vid immunoblott av inköpt gliadin. Detta gliadin var dock dåligt framrenat och gjorde testet svårt att avläsa efter framkallning.

Sammanfattning

SDS-PAGE och immunoblott är en metod som lämpar sig väl för att detektera antikroppar hos grisar mot soja.

Antikroppar mot soja kan överföras via råmjölken

Maternala antikroppar mot soja avtar efter några veckor men nya antikroppar utvecklas när grisen utfodras med soja

Vissa grisar utvecklar antikroppar även mot gliadin i vete

AGID som metod fungerar ej såsom den använts här för att detektera antikroppar mot soja

ORDLISTA

AGID – Agar Gel Immunodiffusion Test

EPEC – Enterotoxigenic Escherichia Coli

GMO – Genetiskt Modifierade Organismer

Ig - Immunoglobulin

kDa – Kilodalton

PMWS – Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome

PRRS – Porcine Reproductive Respiratory Syndrome

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SPF-grisar – Specific Pathogen Free-grisar

TBS-T – Tris Buffered Saline Tween

TACK

Min handledare Claes Fellström för god hjälp med mitt EEF-arbete.

Kristina Karlström och Eva-Britt Jakubek för excellent hjälp på deras respektive laboratorier.

Jens Mattsson för goda råd och att han givit mig en labbplats på parasitologen.

Leif Göransson för viktiga synpunkter på sojautfodringen.

Lennart Salomonsson för hjälp med proteinextraktionen.

Carl-Johan Ehlorsson, Magdalena Jacobson och Per Wallgren för att de tillhandhållit serumprover.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ehlorsson C-J, Göransson L, Fellström C, 2007, Impact of soy quality on health and production in a PMWS herd, manuscript
- Fellström C, Gunnarsson A, Rabe J, 1995, Avvänjningsdiarré och proliferativ enteropati, Svensk Veterinärtidning, Volym 47, Nr 5, 205-208
- Friesen K G, Goodband R D, Nelssen J L, Blecha D N, Reddy P G, Kats L J, 1993, The effect of pre – and postweaning exposure to soybean meal on growth performance and on the immune response in the early-weaned pig, Journal of Animal Science, vol 71, 2089-2098
- Foo S K, 2004, Extraction kinetics and precipitation, and higher purify of soybean protein at different pH, University of Queensland, www.cheque.uq.edu.au/ugrad/theses/2004/pdf/CHEE4007/40358798/40358798.pdf
- Greiner L L, Stahly T S, Stabel T J, 2001, The effect of dietary soy genistein on pig growth and viral replication during a viral challenge, Journal of Animal Science, vol 79, 1272-1279
- Hampson D J, Hopwood D E, 2003, Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period, Weaning the pig, Red. J R Pluske, J Le Dividch, M W A Verstegen, Wageningen Academic Publishers, Nederländerna, 199-218
- Holmgren N, Lundheim N, Löfstedt M, 2002. Riskfaktorer för avvänjningsdiarré, Svensk Veterinärtidning, Volym 54, Nr 10, 457-461
- Holmgren N, Löfstedt M, 2005. Avvänjningsboken. Svenska Djurhälsovården
- King D E, 2003, Gastrointestinal disorders in neonatal pigs, Gastrointestinal physiology and nutrition the neonatal pig, Red. Xu R-J, Cranwell P D, Nottingham university press, Nottingham, 275-308
- L'hocine L, Boye J I, Arcand Y, 2006, Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures, Journal of Food Science, Vol 71, Nr 3
- Li D F, Jiang J Y, Ma Y X, 2003, Early weaning diets and feed additives, The neonatal pig, Red. Xu R-J, Cranwell P D, Nottingham university press, Nottingham, 227-274

- Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, Blecha F, Klemm R D, Giesting D W, Hancock J D, Allee G L, Goodband R D, 1991, Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria, *Journal of Animal Science*, Vol 69, 3299-3307
- Nabuurs M, 1991, Etiologic and pathogenic studies on postweaning diarrhea, Doctoral thesis, Rijksuniversiteit te Utrecht, Proefschrift Utrecht, ISBN 90-9004096-X
- Radostits O M, Gay C C, Blood D C, Hinchcliff K W, 2005, *Veterinary medicine*, nionde upplagan, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, W B Saunders Company, 986-992
- Salomonsson L, 1986, Studies on composition of proteins in wheat from different growing systems, SLU, Uppsala, Doctoral thesis
- El-Shemy H, Ahmed S, Saneoka H, Fujita K, Mar 2001, Differences in composition of glycinin and β -conglycinin globulins in some legume cultivars, ISC – International Scientific Communications Inc., www.iscpubs.com/articles/entireabl.html
- Stokes C R, Bailey M, Haverson K, 2001, Development and function of the pig gastrointestinal immune system, *Digestive Physiology of Pigs*, Red. J E Lindberg, B Ogle, CAB International, Wallingford, 59-66
- Tokach M D, Dritz S S, Goodband R D, Nelssen J L, 2003, Nutritional requirements of the weaned pig, *Weaning the pig*, Red. J R Pluske, J Le Dividch, M W A Verstegen, Wageningen Academic Publishers, Nederländerna, 259-299
- Verdonk J, Verstegen M W A, Bakker G C M, Spreeuwenberg M A M, 2001, Effect of protein source and feed intake level on histology of the small intestine in newly weaned piglets, *Digestive physiology of pigs*, Red. J E Lindberg, B Ogle, CAB International, Wallingford, 347-349