



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper (KV)

Slemhinneskadors inverkan på salivens innehåll av IgG och IgA.

Kajsa Dalunde

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:04

Slemhinneskadors inverkan på salivens innehåll av IgG och IgA

Kajsa Dalunde

*Handledare: Ove Wattle, Institutionen för Kliniska vetenskaper (KV)
Eva Wattrang, Enheten för virologi, immunbiologi och parasitologi, SVA*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper (KV)
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: slemhinneskador, saliv, antikroppar, immunologi, häst, munhåla
Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	4
SUMMARY	4
INLEDNING	5
MATERIAL OCH METODER	6
RESULTAT	9
DISKUSSION	12
TACK TILL	14
LITTERATURFÖRTECKNING	15
BILAGA 1	17

SAMMANFATTNING

I syfte att nå mer kunskap om hästens orala immunförsvar har saliv samlats från 56 hästar. Denna har analyserats med avseende på IgG och SIgA med hjälp av ELISA-metodik. Förekomsten av antikroppar har också korrelerats till förekomst och omfattning av slemhinneskador i munhålan. Saliven visade sig ha en generellt lägre koncentration av IgG-antikroppar jämfört med SIgA. Antikroppskoncentrationerna visade inget samband med förekomst av slemhinneskador. Slutsatsen är att förekomsten av IgG och SIgA i saliv inte påverkades av förekomst av slemhinneskador i munhålan hos häst

SUMMARY

Saliva from 56 horses was collected in order to find more knowledge of the oral immune system of the horse. The saliva was analyzed for IgG and SIgA contents using ELISA methodology. The results were compared to the presence and extent of mucus membrane ulcers of the horses. The concentration of IgG in the saliva was lower than the concentration of SIgA. There was no correlation between amount of antibodies and mucous membrane ulcers. The conclusion was that the concentration of IgG and SIgA contents in horse saliva was not affected by the occurrence of mucus membrane ulcers.

INLEDNING

Det veterinärmedicinska intresset för det orala immunförsvaret hos häst har varit svalt och den samlade kunskapen på området är liten. Tell et al tittade år 2008 på förekomsten av slemhinneskador och kunde visa att problemet är stort hos framförallt ridhästar, 94% av de ridna hästarna hade sår i munslemhinnan, medan frekvensen var 55% hos hästar som inte reds. Det är rimligt att anta att dessa sår även påverkar förekomsten av antikroppar i hästens saliv. Det finns dock mycket få vetenskapliga studier av hästsalivens sammansättning och dess betydelse för hästens orala miljö.

Det har tidigare inte heller funnits någon bra teknik beskriven för att samla hästsaliv. Alexander (1966) samlade till exempel saliv genom att operera in en fistel till parotis. Men då saliv även produceras i glandula mandibularis och glandulae sublinguales gav denna metod inte information om den sammanlagda salivens sammansättning. I senare studier har olika ihåliga brett istället använts för att samla saliv (Eckersell, 1984). Dessa brett har dock kombinerats med syrliga fodermedel för att stimulera salivproduktionen, vilket visat sig bland annat påverka salivens pH och studiens relevans har därför ifrågasatts (Ellevik, 2006).

De tidigare studier som genomförts har visat att salivproduktionen och sekretionshastigheten för sekretoriskt immunoglobulin A (SIgA) stimuleras av hästens tuggande i första hand (Alexander & Hickson, 1970). Den producerade mängden saliv ökar alltså ju längre tid hästen tuggar. Hästens normala ättid är 17-18 timmar/dygn och det har bedömts kunna resultera i ca 12 liter saliv/dag (Alexander & Hickson, 1970).

Hos människa (Young & Schneyer, 1981) och nötkreatur (Phillipson & Mangan, 1959) har saliv, som kommer från parotidkörteln, rapporterats vara rik på elektrolyter och fattig på mucoprotein. Även hästar har stor mängd elektrolyter i parotissaliv (Alexander, 1966). Ökad salivproduktion har visat sig leda till linjärt ökade koncentrationer av natrium, kalium, kalcium, klor och bikarbonat emedan koncentrationen av urea inte påverkas av mängden saliv (Alexander 1966). Vidare har natrium, kalium, kalcium, magnesium, klor, urea, fosfat, protein, pH och glukos varierat i koncentration både hos en och samma häst och mellan olika hästar. Glukos, protein, och pH varierade minst (Alexander, 1966).

Hästens saliv är till skillnad från människans basisk (Ellevik, 2006). Den har också en större buffrande kapacitet genom sitt innehåll av i medeltal 27,4 mmol/l bikarbonat jämfört med människans 21,1 mmol/l, (Wattle, 2009). Dessa egenskaper har bedömts ha stor betydelse för den orala miljön då den långa ättiden av sockerrik föda ger hästens munhålebakterier goda möjligheter till fermentering med många och långa lokala ”syraattacker” som följd.

Vad gäller salivens innehåll av antikroppar (immunoglobuliner) har framförallt SIgA studerats, vilket får anses naturligt eftersom IgA är den dominerande sekretoriska immunoglobulinen både hos människa (Berdoz, *et al.*, 1999) och hos häst (Vaerman *et al.* 1971, Pahud och Mach 1972). IgA produceras av plasmaceller i slemhinnan samt i associerade exokrina körtlar där majoriteten av de aktiverade, antikropsproducerande, plasmacellerna återfinns. IgA utsöndras därefter som SIgA till saliven via receptorer (Korsrud and Brandtzaeg, 1980). Sekretoriskt IgA neutraliserar virus och endotoxiner i epitelceller utan att orsaka vävnadsskada samt hindrar antigen att passera in genom slemhinnan (Berdoz *et al*

1999) utan att aktivera komplementsystemet (Tizard, 2004). SIgA är mycket stabilt och kan förbli aktivt under långa perioder i munhålan (Berdoz *et al.*, 1999).

IgG produceras och utsöndras av plasmaceller i bland annat mjälte, lymfknutor och benmärg (Tizard, 2004). IgG anses allmänt vara den immunoglobulin som dominerar i serum (Tizard, 2004) och som, genom sin ringa storlek, lättast passerar ut genom endotelet. Den lätta endotelpassagen har stor betydelse i inflammerade vävnader (Tizard, 2004). Det finns idag inga publicerade studier där den samlade hästsalivens totala förekomst av IgG har analyserats.

Huruvida frekvensen av slemhinneskador i hästens munhåla påverkar salivsekretion och immunförsvar har inte studerats. Tell *et al.*, (2008) visade att sår i kindslemhinnan (buccalslemhinna) var vanligast men att skador även kunde ses på tungan, i gommen, kaudalt om M3 (trigonum) och i mungiporna.

Att ridning på träns och bitt ökar risken för att hästen utvecklar slemhinneskador i munnen kan bero på att nosgrimmor trycker slemhinnan mot vassa tandkanter (Dixon, 2000). Även dåligt anpassade bitt och dålig ridteknik kan vara bidragande (Bennet, 2001). Trycket som uppstår mellan utrustning och tand kan ge upphov till ischemi och trycksår i den levande vävnaden. Slemhinneskador har hos häst även rapporterats kunna orsakas av nedsatt njur- eller leverfunktion, infektioner, autoimmuna sjukdomar, nutritionella faktorer, neoplasier, trauma (Easley, 2005). Trycksår kan delas upp i ytliga och djupa sår. Ytliga omfattar hud eller slemhinna emedan de djupa uppstår i underliggande muskelvävnad och resulterar i en allvarligare skada (Bouten, 2003).

Munslemhinnesår har ansetts orsaka smärta hos hästen (Knottenbelt, 1999). I senare studier har hästar inte visat obehag trots förekomst av slemhinnesår. Detta har tolkats som att såren antingen inte orsakar smärta, att hästarna inte visar smärta, eller att ryttarna inte uppmärksammade att hästarna hade ont (Tell *et al.*, 2008).

Hypotes: Nivåerna av IgG i saliv ökar till följd av läckage från blodet vid samtidig förekomst av slemhinneskador i hästens munhåla.

Syftet med studien var att undersöka huruvida koncentrationerna av SIgA och IgG i saliven hos häst påverkas av samtidig förekomst av slemhinneskador i munhålan.

MATERIAL OCH METODER

Denna studie är en del av ett större projekt med syftet att studera huruvida dental karies påverkar eller påverkas av hästsalivens innehåll av immunoglobuliner.

Saliv samlades från 56 hästar i samband med att deras munnar öppnades för munhåleundersökning. Hästarna var antingen kliniskt friska utan karies, hade aktiv obehandlad karies eller var tidigare behandlade för karies. Hästarna var av olika ras, uppstallade på olika ställen, utfodrades med olika foder och sköttes av olika människor.

Hästarna sederades med 0,1-0,2ml/100kg Domosedan vet (10mg/ml)(Orion Pharma AB, Animal Health, Sollentuna, Sverige). Från de flesta hästarna i studien sögs fri saliv upp med en valpsug (25ml; SweVet Piab, Sjöbo, Sverige) direkt efter att hästens mun öppnats med munstege (Globus Sport AB, Karlskrona, Sverige). Initialt i studien användes ett ihåligt bitt med hål, som hästarna fick tugga på innan de sederades, för salivsamlandet. Om salivproduktionen var låg kunde de bjudas lite hö i samband med detta samlande. Metoden med bittet var dock tidsödande och inte alltid framgångsrik varför metoden med valpsugen istället användes.

Den samlade saliven hälldes över i provrör (Falcon 15 ml Sarstedt, Numbrecht, Tyskland) och centrifugerades därefter i 5 minuter med 2000 rpm. Supernatanten förvarades därefter i 1,5ml provrör (Plastibrand microtubes Brand, Wertheim, Tyskland) i -20 grader i väntan på analys.

Salivens innehåll av IgG analyserades med hjälp av en ELISA som sattes upp för total häst-IgG. Nittiosexbrunnars Elisaplattor, MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Danmark), användes. Inledningsvis fylldes brunnarna med 100 µl 1µg/ml AffiniPure goat antihorse IgG (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, UK) i coatingbuffert (0.05M Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer, pH 9.6 (SVA, Uppsala Sverige)). Plattan inkuberades 1-2 nätter varefter innehållet i brunnarna hälldes bort och brunnarna sköljdes tre gånger med fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS)- 0.1 % tween20 (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), 300µl per brunn. Därefter täcktes brunnarna med 300µl blockingbuffert (PBS 4% bovin serum albumin (BSA) (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) och inkuberades i 30 min. Sedan tillsattes standard och prover och plattan inkuberades i ytterligare en timme. Standarden utgjordes av hel IgG (ChromPure Horse IgG, Jackson ImmunoResearch, USA) från häst som späts till 56ng/ml i PBS med 4% BSA och som sedan späts ytterligare i åtta 2stegsspädningar. Proverna utgjordes av saliv som späts 1:1000 i PBS med 4% BSA och därefter i ytterligare åtta 2stegsspädningar. En negativ kontroll bestående av enbart PBS med 4% BSA användes i samtliga analyser. I flertalet analyser kördes parallellt en positiv kontroll för IgG bestående av ett känt positivt salivprov, se bilaga 1. Brunnarna tvättades sedan på nytt 3 gånger med 300µl PBS-0.1 % tween20 varpå tracing-anikroppar tillsattes. Till tracing användes Peroxidase-conjugated affinipure goat anti-horse IgG, Fc Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, UK) som späddes till 16ng/ml via tillsats av PBS med 4% BSA, varpå plattorna åter inkuberades en timme i rumstemperatur. Brunnarna tvättades efter det 3 gånger med PBS- 0.1 % tween20. Därefter tillsattes substratet som utgjordes av 100 µl 1mM 3,5,3,5-tetramtylbenzidine i 0,1M kaliumcitrat(1:20)(Statens veterinärmedicinska anstalt). Reaktionen stoppades efter tio minuter med hjälp av 50 µl 10% H₂SO₄ (SVA). Absorbansen mättes vid 450 nm (Multiskan Ex Original, Thermo Labsystems). Utifrån standardkurvan har koncentrationen av IgG-antikroppar i saliven räknats ut med linjär regressionsanalys.

Analys av SIgA-förekomst utfördes av veterinärstudent Anna-Karin Palm med hjälp av ELISA uppsatt av enheten för virologi, immunbiologi och parasitologi, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala.

Salivens koncentration av IgA har jämförts med dess koncentration av IgG hos samtliga hästar.

Förekomst av slemhinneskador journalfördes på 35 av hästarna som därefter delades in i följande grupper:

1. Inga slemhinneskador (kontrollgrupp) n=17
2. Slemhinneskador n=18
 - Gom n=3
 - Munvinkel n=3
 - Trigonum (=kaudalt om M3) n=4
 - Kindslemhinna n=5
 - Flera slemhinneförändringar n=3

Immunoglobulinkoncentrationerna har därefter jämförts mellan kontrollgrupp och olika grupper av hästar som journalförts med avseende på förekomsten av slemhinneskador.

RESULTAT

Hästarnas saliv innehöll generellt sett mer SIgA än IgG men totalmängden varierade mycket mellan hästar, 0 – 351 µg/ml för SIgA och 0 – 127,7 µg/ml för IgG. Även koncentrationsskillnaden mellan dessa immunoglobuliner varierade i omfattning mellan hästar.

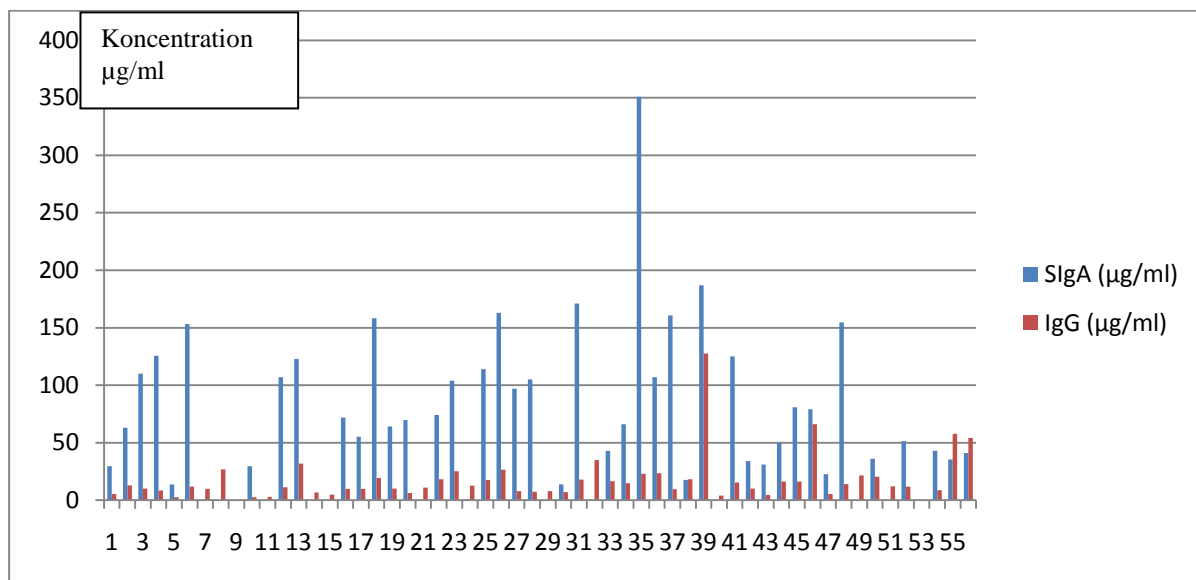


Diagram 1 visar fördelningen SIgA och IgG hos samtliga hästar. Y-axeln visar koncentrationen av antikroppar angivet i µg/ml och x-axeln visar hästnr. Ljusblå kurva representerar SIgA. Röd kurva representerar IgG.

De erhållna värdena hos den positiva IgGkontrollen varierade kraftigt mellan analyser av saliv från en och samma häst (diagram 2). Saliven är samlad vid samma tillfälle men analyserna har skett vid olika tillfällen.

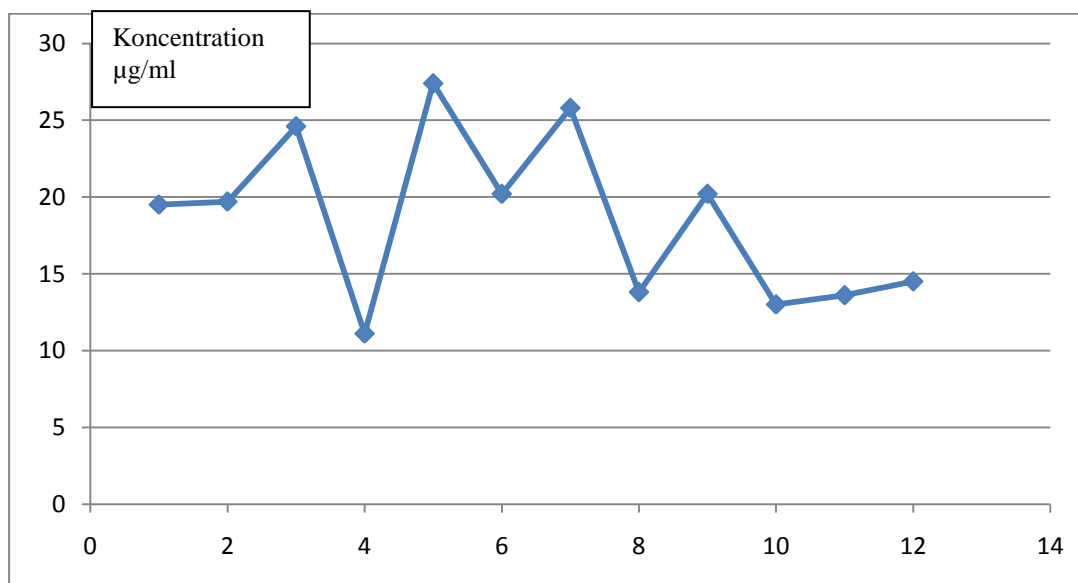


Diagram 2 visar de erhållna värdena för den positiva kontroll som använts i flertalet av analyserna för IgG-antikroppar. Y-axeln visar koncentration i $\mu\text{g/ml}$ medan X-axeln visar analystillfälle.

Det gick inte att utläsa någon skillnad i medelkoncentrationen av IgA och IgG mellan hästar med och utan samtidig förekomst av slemhinneskador (diagram 3 och 4). Medelkoncentrationen av SIgA var $73 \mu\text{g/ml}$ för alla sår och $48,5 \mu\text{g/ml}$ för kontrollgruppen. Statistik är inte beräknad men då de respektive konfidensintervallen överlappar varandra bedöms resultaten inte vara statistiskt åtskilda. Medelkoncentrationen av IgG var för alla sår $14,4 \mu\text{g/ml}$ och för kontrollgruppen $12,7$. Även i detta fall överlappar konfidensintervallen varandra.

Medelkoncentrationen av SIgA var för gruppen med sår i trigonum $64,5 \mu\text{g/ml}$, $59 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med sår i munvinkeln, $65,2 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med sår i buccalslemhinnan, $63 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med gombitning och $143 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med sår på flera ställen. Konfidensintervallen överlappade varandra för alla grupper utom mellan kontrollgruppen och gruppen med sår på flera ställen där en skillnad kunde ses. Det går inte att säga om skillnaden är statistiskt signifikant eftersom statistik inte är räknad.

Medelkoncentrationen av IgG var för gruppen med sår i trigonum $6,4 \mu\text{g/ml}$, $10,7 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med sår i munvinkeln, $22,2 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med sår i buccalslemhinnan, $15,1 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med gombitning och $12,3 \mu\text{g/ml}$ för gruppen med sår på flera ställen. Samtliga konfidensintervall överlappar varandra.

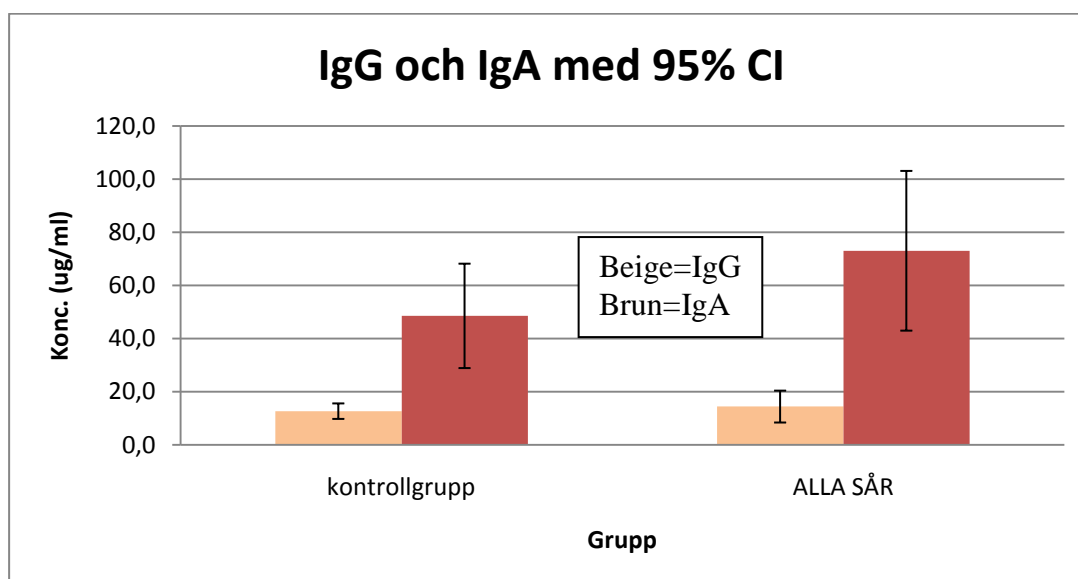


Diagram 3. Medelkoncentrationen av IgG och SIgA hos hästar utan slemhinnesår(kontrollgrupp) jämfört med hästar med slemhinnesår. Felstaplarna visar 95% konfidensintervall för de respektive grupperna.

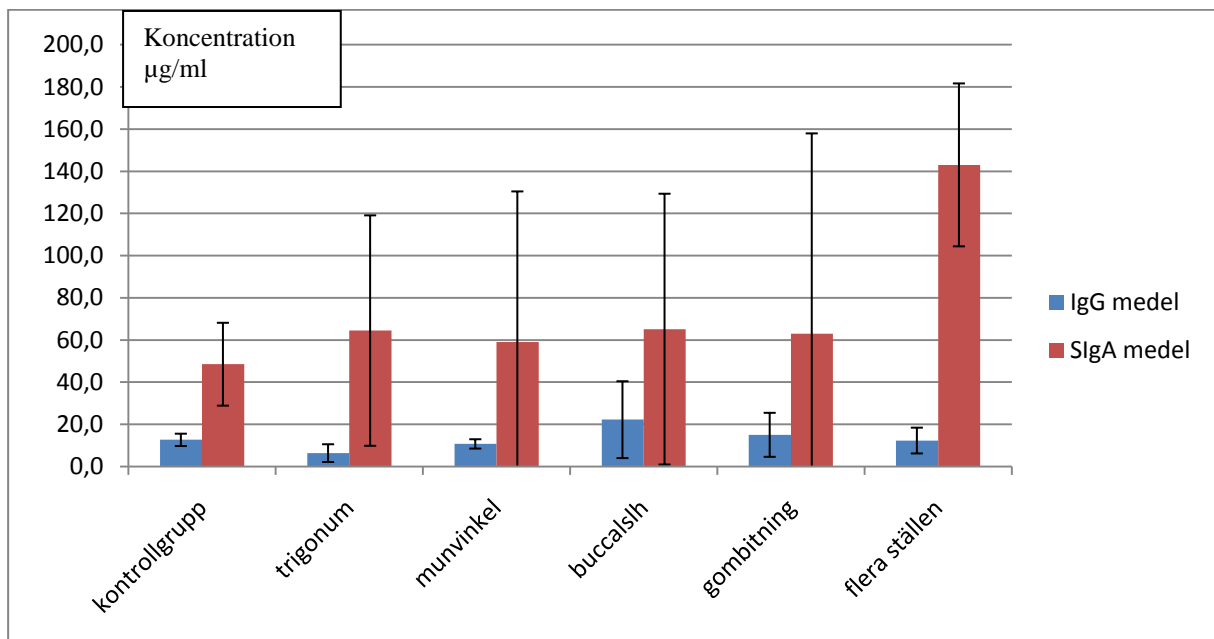


Diagram 4. Hästarna indelade i grupper beroende på vilken typ av slemhinneskador de har. På X-axeln visas de olika grupperna. På Y-axeln visas medelkoncentrationen av antikroppar angett i µg/ml. Felstaplarna visar 95% konfidensintervall.

DISKUSSION

Koncentrationen var generellt högre för SIgA än för IgG i hästsaliv. Resultatet är rimligt då SIgA som utsöndras till saliven via receptorer är den dominerande antikroppen i sekret emedan IgG som är den dominerande antikroppen i blodet och måste passera både endotel och epitel för att nå munhålan.

Koncentrationerna av SIgA varierade mellan 0 – 351 µg/ml. Studier gjorda på får har visat stor skillnad på sekretionen av IgA mellan submandibularsaliv respektive parotissaliv (Young & Schneyer, 1981). Det är rimligt att anta att nivåerna av SIgA i hästsaliv kan variera beroende på om spottkörtlarnas andel av salivproduktion varierat mellan individer vid provtagningstillfället. Vidare skiftade koncentrationen av protein i saliv både mellan olika hästar samt hos en och samma häst om denna provtogs vid olika tidpunkter enligt en studie av Eckersall (1984). Det är tänkbart att SIgA utgör en del av denna variation. Det skulle kunna förklara de olika SIgA värden som erhöles i denna studie. Hos andra djurslag, tex marsvin (Ibanez *et al.*, 1980) och möss (Baker *et al.*, 1985) har det visats förekomma hög- respektive lågproducerande djur av immunoglobuliner och specifika antikroppar. Det är tänkbart att detta även kan gälla häst och kan då vara ytterligare en orsak till de individuella variationerna mellan olika hästar. Det går dock inte att utesluta att andra förändringar i munhålan än slemhinnesår, tex karies och hästens allmänna status kan ha påverkat nivån av immunoglobuliner uppmätta i denna studie.

Koncentrationen av IgG varierade mellan 0 – 127,7 µg/ml. Koncentrationerna av IgG hos den positiva kontrollen varierade vid de olika körningarna mellan 11,1 och 25,8 µg/ml. Denna saliv samlades vid ett tillfälle men förvarades därefter i flera olika provrör. Huruvida detta har påverkat IgG koncentrationen eller ej är ej utrett. Vid analysen av IgG användes vid några tillfällen PolySorp-plattor av misstag och antikroppar binder in annorlunda till dessa plattor än till MaxiSorp-plattor. Då det av lab-protokollet inte gick att utläsa vid vilka körningar förväxlingen skett kan det inte uteslutas att skillnader i antikropps nivåer kan ha berott på detta. Vissa av plattorna inkuberades med coatingbuffert i två dagar istället för en dag vilket ytterligare kan ha påverkat hur antikropparna binder in till plattorna. Vidare har mycket små volymer använts vid analysen av IgG antikroppar. Detta ökar risken för metodfel eftersom även små fel leder till stor inverkan på slutresultatet. Vid så små volymer blir det även svårt för ögat att uppfatta om ett fel skett. I vissa av provrören med saliv har det förekommit stora mängder fibrer. Detta kan påverka koncentrationen av antikroppar och ge ett felaktigt värde. Även mätfel vid pipettering och absorbansmätning kan ha påverkat analysresultaten. Det är sannolikt att även proverna från de andra hästarna kan ha påverkats i motsvarande omfattning vilket kan vara en bidragande orsak till variationen i immunoglobulinförekomst mellan olika hästar.

Förekomsten av slemhinneskador journalfördes hos 35 av hästarna för att kunna jämföra förekomsten av slemhinneskador med koncentrationen av SIgA respektive IgG. 18 av de 35 (51 %) av hästarna i studien bedömdes ha slemhinneskador. Detta är en lägre incidens än i studien utförd av Tell *et al.*, 2008 där skador i munslemhinnan förekom bland 94% av de som reds och 55 % bland kontrollerna. En förklaring till att förekomsten av slemhinneskador i denna studie var lägre kan vara att hästarna inte grupperades enligt användningsområde och hästar av olika åldrar, raser och användningsområden användes och att flera inte hade arbetats

med bett i munnen i anslutning till undersökningen. Det hade även varit önskvärt att journalföringen hade varit mer specifik på de olika slemhinneförändringarna för att bättre kunna gruppera hästarna.

Det gick inte att utläsa något samband mellan antikropps-koncentrationer och förekomst av slemhinnesår. Hypotesen att läckage av blod vid förekomst av slemhinneskador i hästens munhåla skulle leda till ökade nivåer av IgG kunde alltså inte bevisas. Det kan finnas flera tänkbara orsaker till detta. I hästmaterialet till studien förekom hästar både med och utan karies. Detta kan ha påverkat förekomsten av antikroppar i saliven. Vidare hade vissa av kontrollhästarna relativt höga koncentrationer IgG vilket eventuellt kan förklaras av att de kan ha haft gingivala sår som inte journalförts men som kan ha orsakat blödning och därmed läckage av IgG ut i saliven. Exempel på sådana förändringar kan vara foderinpackningar och parodontit. Förändringar i munhålan som inte blöder ger sannolikt inte heller upphov till ett lika stort läckage av antikroppar till saliven och borde därför inte leda till en motsvarande ökning av IgG. Åldern och storleken på förändringarna kan följaktligen ha inverkat på resultaten.

Ytterligare en möjlig förklaring till att koncentrationerna av antikroppar i saliven inte kunde visas ha något samband med förekomst av slemhinneskador i munhålan kan vara den producerade mängden saliv. Alexander (1966) har visat att saliv produceras då hästen tuggar. Om antikroppar bedöms komma via läckage från slemhinnesår borde den totala koncentrationen av IgG i saliven vara beroende av mängden producerad saliv och därmed minska. Vidare har det visats att sekretionshastigheten av SIgA ökar vid tuggning (Proctor & Carpenter, 2001). Det är tänkbart att vissa av de hästar som provtogs med specialbettet hade tuggat mer än övriga, framförallt om de var unga och ovana vid bett. Det är möjligt att det kan ha påverkat koncentrationen av SIgA i saliven. En del av hästarna hade också rest till klinik inför undersökningen varför även utfodringstider och stressnivåer kan ha påverkat salivens mängd och sammansättning.

Värt att notera är också att de provtagna hästarna är av olika raser och hålls i olika stall där de sköts av olika människor och äter olika typer av foder. Dessa faktorer kan också vara bidragande till olika koncentrationer av antikroppar i saliven.

Totalt antal hästar i studien var 56 stycken medan antalet som journalfördes med avseende på slemhinneskador i munhålan var 35. Det hade varit önskvärt att ha fler hästar i studien för att individuella variationer hos hästarna inte skulle kunna ge ett stort genomslag för resultatet.

TACK TILL

Mina båda handledare Ove Wattle och Eva Wattrang. Även tack till Anna Karin Palm som varit behjälplig i samband med laborationsdelen och skrivandet av arbetet, samt till Torbjörn Lundström som varit behjälplig med insamlande av del saliv och journalföring. Tack också till de djurägare som ställt sina hästar till förfogande för denna studie.

LITTERATURFÖRTECKNING

Alexander, F. (1966) A study of parotid salivation in the horse. *J. Physiol.* 184 646-656

Allen, T.E. (2004). Incidence and severity of abrasions on the buccal mucosa adjacent to the cheek teeth in 199 horses. In: *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Denver CO, USA, 31-36.

Baker, P. J., Bailey, D.W., Fauntleroy, M.B., P.W., Caldes, G. & Prescott, B. (1985) Genes on different chromosomes influence the antibody-response to bacterial-antigens. *Immunogenetics.* 22, 269-276

Bennet, D.G. (2001). Bits and biting: form and function. In: *Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Denver CO, USA, 31-36

Berdoz, J., Blanc, C.T., Reinhardt, M., Kraehenbuhl, J.P. & Corthesy, B. (1999) In vitro comparison of the antigen-binding and stability properties of the various molecular forms of IgA antibodies assembled and produced in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3029-34

Bouten, C.V., Oomens, C.W., Baaijens, F.P. & Bader, D.L. (2003) The etiology of pressure ulcers: skin deep or muscle bound? *Arch Phys Med Rehabil* 84, 616-619,

Collins, M.D., Lundström, T., Welinder-Olsson, C., Hansson, I., Wattle, O., Hudson, R. A. & Falsen, E. (2004) *Streptococcus devriesei* sp. nov., from Equine Teeth. *System. Appl. Microbiol.* 27, 146-150

Dixon, P.M. (2000). Removal of equine dental overgrowths. *Equine veterinary Education* 12, 68-81

Easley, J. (2005). Dental and oral examination. In: Baker, G.J. & Easley, J. (Eds.) *Equine Dentistry*. second ed. 155-163. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Eckersall, P. D. (1984) Equine whole saliva: A sample collection system and biochemical analysis. *Vet. Rec.* 115, 437-438

Ellevik, S. (2005) *Effekten av olika foderberedningar på pH i normala hästars munhåla*. Ex. arb. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet. 2006

Genco, R.J., Yexies, L. & Karush, F. (1969) The immunoglobulins of equine colostrum and parotid fluid. *The journal of Immunology.* 103:3 437-444

Ibanez, O.M., Reis, M.S., Gennari, M., Ferreira, V.C.A., Santanna, O.A., Siqueira, M. & Biozzi, G. (1980) Selective breeding of high and low antibody-responder lines of guinea-pigs. *Immunogenetics* 10, 283-293

Klinman, N.R., Rockey, J.H. & Karush, F. (1965) Equine anti-hapten antibody II. The yG (7Sy) components and their specific interaction. *Immunochemistry* 2, 51-60.

Klinman, N.R., Rockey, J.H. & Karush, F. (1964) Equine anti-hapten antibody I. 7S B2A and 10S y1-globulin components of purified anti-B-lactoside antibody. *J Exp Med* 120, 589-609.

Knottenbelt, D.C. (1999). The systemic effects of dental disease. In: Baker, G.J. & Easley, J. (Eds.) *Equine Dentistry*. first ed. 127-137. London W.B. Saunders.

Korsrud, F.R., & Brandtzaeg, P. (1980) Quantitative immunohistochemistry of immunoglobulin- and J-chain-producing cells in human parotid and submandibular salivary glands. *Immunology* 39, 129-140

Lundström, T., Dahlén, G. & Wattle, O., (2007) Caries in the infundibulum of the second upper promolar tooth in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49:10 1-9

- Lundström, T & Pettersson, H. (1990) Status of Swedish horses II (Den svenska hästens munhålestatus II). *Svensk veterinärtidning* 42, 559-563
- Lundström, T & Pettersson, H. (1988) Status of Swedish horses I (Den svenska hästens munhålestatus II). *Svensk veterinärtidning* 40, 247-252
- Pahud, J.J. and J.P. Mach, *Equine secretory IgA and secretory component*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1972. 42(2): p. 175-86.
- Phillipson, A. T. & Mangan, J. L. (1959) Bloat in cattle XVI. Bovine saliva: the chemical composition of the parotid, submaxillary and residual secretions. *N.Z. J. of agric. Res.* 2, 990-1001.
- Proctor, G.B. & Carpenter, G.H. (2001) Chewing Stimulates Secretion of Human Salivary Secretory Immunoglobulin A. *J Dent Res* 80(3), 909-913
- Tell, A., Egenvall A., Lundström, T. & Wattle, O. (2008) The prevalence of oral ulceration in Swedish horses when ridden with bit and bridle and when unriden. *The Veterinary Journal* 178, 405-410.
- Tizard, I. R. (2004). *Veterinary Immunology*. 7. ed. Elsevier (USA): Saunders
- Vaerman, J.P., P. Querinjean, and J.F. Heremans, *Studies on the IgA system of the horse*. *Immunology*, 1971. 21(3): p. 443-54.
- Wattle, O. Personligt meddelande. Dec 2009
- Young, J. A. & Schneyer, C. A. (1981) Composition of saliva in mammalian. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.* 59, 1-53

BILAGA 1

Lista och detaljer på de hästar som ingår i studien

Häst	Kön	Födelseår	Provtagningsdatum	SlgA(ug/ml)	IgG(ug/ml)	Pos kontroll	Sårgrupp
1	val	1999	200706	29,54	5,33	11	
2	sto	2003	200907	63	12,98	2	ua
3	val	1989	200707	110	10,17	Nej	trigonum
4	sto	1992	200807	125,61	8,5	2	munvinkel
5	val	1992	200706	13,85	2,73	2	trigonum
6	val	1992	200706	153,1	11,67	11	Trigonum, buccalslh
7	sto	2000	200706	0	9,87	11	ua
8	val	1994	200807	0	26,91	nej	ua
9	val	1996	200707	0	0	2	
10	val	1995	200707	29,49	2,50	11	
11	val	1997	200807	0	2,92	2	buccalslh
12	sto	1996	200811	107	11,32	Nej	
13	sto	2003	200801	123	31,87	Nej	buccalslh
14	sto	1995	200904	0	6,71	2	
15	val	1998	200807	0,01	4,81	2	ua
16	val	2004	200807	72	9,90	2	
17	Sto	1998	200906	55,26	9,74	2	ua
18	Val	1999	200801	158,24	19,24	Nej	gombitning
19	Val	1989	200905	64	10,10	2	ua
20	Sto	1995	200807	69,57	6,24	2	trigonum
21	Val	1997	200811	0	10,99	Nej	ua
22	Val		200801	74,28	18,27	Nej	ua
23	Sto	1998	200811	104	25,28	Nej	
24			200801	1	12,67	Nej	buccalslh
25	Val	2001	200907	114	17,5	2	ua
26	val	1996	200907	163	26,45	nej	
27	Val	1995	200905	97	7,92	2	ua
28	Val	1993	200710	105	7,31	Nej	Munvinkel, buccalslh
29	Sto	1999	200811	0,25	7,92	2	
30	Sto	2001	200807	13,68	7,10	2	
31	Val	1990	200710	171	18,04	2	Buccalslh, trigonum
32	Hingst	2000	200906	0	34,84	Nej	
33	Sto	2000	200811	43	16,49	Nej	
34	Sto	2000	200811	66	14,90	Nej	
35	Val	1997	200710	351	22,96	2	
36	Val	1992	200906	107	23,48	Nej	
37	Sto	2001	200807	160,85	9,66	2	Buccalslh
38	Sto	2004	200811	17,7	18,14	Nej	

39	Val	1997	200707	187	127,7	2	
40	Val	2000	200801	0	4,12	2	Ua
41	Val	2000	200901	125	15,39	2	Ua
42	Sto	1997	200811	34	10,23	Nej	
43	Sto	2002	200706	30,9	4,49	2	Gombitning
44	Val	1997	200806	49,95	16,28	Nej	Ua
45	Sto	1999	200807	80,76	16,22	Nej	Ua
46	Sto	2001	200811	79,16	66,10	Nej	
47	Val	1994	200710	22,6	5,25	2	Ua
48	Sto	1995	200707	154,57	13,98	2	
49	Val	1996	200807	0	21,44	Nej	Gombitning
50	Sto	2003	200906	36	20,31	2	Ua
51	Sto	2001	200807	0	12,05	2	Munvinkel
52	Val	2000	200807	51,36	11,69	2	Munvinkel
53	Sto	1998	200707	0		2	Trigonum
54	Val	1992	200801	43,07	8,74	2	Ua
55	Sto	1990	200811	35,52	57,66	Nej	
56	hingst	2001	200906	41	54,06	2	Buccalslh