

Allergivänliga hästar - Finns de?

Ellen Ankarcrona
Emma Pettersson
Marlene Boström
Monica Göthe
Sofia Hollstedt

Projektarbete Agrosystem Läsåret 2009/10,
Agronomutbildningen, Sveriges Lantbruksuniversitet

Handledare: Lena Elfman, Arbets- och miljömedicin,
Akademiska sjukhuset, Uppsala

SLU-Handledare: Catharina Svala, Institutionen för lant-
brukets byggnadsteknik, SLU, Uppsala





Ellen Ankarcrona, a06elan1@stud.slu.se
Emma Pettersson, a06empel@stud.slu.se
Marlene Boström, a06mabo1@stud.slu.se
Monica Göthe, a06mogo1@stud.slu.se
Sofia Hollstedt, a05soho1@stud.slu.se

Allergivänliga hästar

- Finns de?



Projektbeställare: Lena Elfman, Arbets- och miljömedicin, Akademiska sjukhuset, Uppsala
Handledare: Catharina Svala, Institutionen för lantbrukets byggnadsteknik, SLU, Uppsala

Agrosystem LB0034, 30 hp
Projektarbete
SLU, Uppsala HT 2009

SAMMANFATTNING

I Sverige finns idag omkring 300 000 hästar och ungefär en tredjedel av Sveriges befolkning har på något sätt kontakt med dessa djur. Näst efter pollen är pälsdjursallergi den vanligaste allergin. Syftet med denna studie var att undersöka om vissa hästraser sprider mindre mängd allergen än andra raser. Tre raser studerades; basjkirhäst, islandshäst och vanlig ridhäst, som här representeras av det svenska varmblodet. I studien användes tre olika ridanläggningar, en för vardera hästrasen, och i varje stall användes tre hästar. För att mäta spridning av luftburet hästallergen användes luftpumpar med IOM provtagare. Stöv samlades dessutom in genom ryktning av tre hästar i vardera stallet. Mängden hästallergen i luftproverna bestämdes genom användning av ELISA teknik. På stövproverna gjordes en proteinbestämning för att kunna uttrycka mängden hästallergen/mg protein. För att få reda på om rideleverna valt stall efter om de har hästallergi eller ej gjordes en enkätundersökning.

Mängden hästallergen hos de tre hästraserna var: (medianen) 8 248 U hästallergen/m³ luft för basjkirhäst, 36 801 U/ m³ för islandshäst och 32 420 U/m³ för varmblod. Studien visade att det var en stor variation i luftproverna mellan de tre hästarna inom varje ras. Vid jämförelse av stövprover mellan de tre hästraserna hade basjkirhästarna en något lägre hästallergenhalt än varmbloden och islandshästen samt hade ett annorlunda proteinmönster i SDS gelelektrofores. Enligt enkätundersökningen finns det ryttare som byter stall på grund av hästallergi för att kunna fortsätta utöva sitt hästintresse. Resultatet från denna studie gör det möjligt att med försiktighet rekommendera ridning på basjkirhästar, och i viss mån även islandshästar, för ryttare med hästallergi.

ABSTRACT

There are about 300 000 horses in Sweden today and one third of the people in Sweden have some sort of contact with horses. The second most common allergy in Sweden, after allergy to birch pollen, is to furred animals. There have been discussions if the Bashkir horse and the Icelandic horse are less allergenic than other horse breeds. The aim of this study was to investigate if some horse breeds spread less horse allergen to the surroundings than other horse breeds. Three different breeds have been studied: the Bashkir horse, the Icelandic horse and the original riding horse, of which in this report is represented by the Swedish warm-blooded horse. Three different horse premises were used in this study, one for each horse breed, and three horses were investigated in each stable. To measure the airborne horse allergen pumps with IOM samples were used. The amount of horse allergen was then determined by using ELISA. Some dander was collected from each horse and from these samples the protein was determined. A questionnaire study was performed to get an overview if the riding students selected a stable with a particular horse-breed if they had horse allergy.

The median levels of airborne horse allergen were: 8 248 U horse allergen/m³ air for the Bashkir horse, 36 801 U/m³ for the Icelandic horse and 32 420 U/m³ for the Swedish warm-blooded horse. However, the study showed variations in amount of airborne allergen between the three horses within each breed. The dander from the Bashkir horse had lower horse allergen level than the Swedish warm-blooded horse and the Icelandic horse and the protein pattern was different as shown by SDS-gelelectrophoresis. According to the questionnaire study there were riding students that had changed stable because of horse allergy. This study showed that it is possible to recommend to ride the Bashkir horse, and maybe also the Icelandic horse, to horse allergic people.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Introduktion	4
Syfte	5
Bakgrund	6
Basjkirhäst	6
Islandshäst	6
Svenskt varmblood	6
Material och metoder	7
Provtagning	7
Extraktion av prover	8
Analys med ELISA	8
Proteinbestämning	9
Analys med SDS-PAGE	9
Enkätstudie	9
Resultat	10
Hästallergen i luft	10
Hästallergen i stöv	11
Analys av proteinmönstret i häststöv med SDS-PAGE	11
Enkätstudie	11
Diskussion	12
Slutsats	14
Tack till	14
Referenser	15
Bilaga 1: Enkät	16
Bilaga 2: Standardkurvor för analys av hästallergen med ELISA	17
Bilaga 3: Standardkurvor för bestämning av hästallergen och protein i stövprover	18
Bilaga 4: Resultat från SDS-PAGE	19
Bilaga 5: Resultat från enkätundersökning	20

INTRODUKTION

Hästnäringen är på frammarsch i Sverige. Omkring 500 000 svenskar är aktiva inom ridsporten (Allergifakta, 2008). Idag finns det omkring 300 000 hästar i Sverige varav cirka 200 000 befinner sig i tätortsnära miljöer. Undersökningar har visat att så mycket som en tredjedel av Sveriges befolkning har kontakt med hästar på ett eller annat vis (Hästnäringens miljøråd, 2006). Med denna kontakt följer även allergier. Förekomsten av allergier i samhället har ökat under de senaste decennierna, framför allt bland barn och ungdomar. Näst efter pollen är pälsdjursallergi den vanligaste allergin (Allergifakta, 2008). Runt två tredjedelar av dem som är allergiska mot pälsdjur har så svåra besvär att de måste undvika djurmiljöer helt. Detta eftersom många av dem fortfarande har problem trots medicinering (Folkhälsorapport, 2007).

Allergi är en folksjukdom som kännetecknas av olika besvär med luftvägar, hud och/eller mag-tarmkanal vid kontakt med allergener som annars tåls av människor i allmänhet (Miljöhälsorapport, 2005). Allergener, även kallade antigener, är proteiner eller glykoproteiner. Vid en allergisk reaktion överproducerar kroppen immunoglobulin E (IgE) antikroppar mot det aktuella allergenet som kroppen exponeras för. IgE antikropparna binder därefter till ytan av mastceller vilka är celler som produceras i benmärgen och finns utspridda i kroppens vävnader. Nästa gång som man exponeras för allergenet så korsbinder allergenet med antikropparna på mastcellerna, som då stimuleras att frigöra aktiva inflammatoriska ämnen som t.ex. histamin. Beroende på vart i kroppen denna reaktion sker och på hur många mastceller som aktiveras kan reaktionen variera från en enkel nysning till en allergisk chock med dödlig utgång (Berg *et al.*, 2002; Brännström, 2002).

Allergen produceras bland annat i djurens svettkörtlar (Spitzauer, 1999). Den viktigaste källan för hästallergen är hästens stöv (mjäll), följt av hår och hudrester (Elfman, 2008). Allergener kan även utsöndras via hästens urin och saliv (Nordvall, 2005). Hästallergi kan vara medfött men kan även utvecklas senare i livet. Studier har visat att långvarig exponering för hästallergener kan orsaka astma eller hösnuva och därmed försvagad lungfunktion (Tutluog˘lu *et al.*, 2002). Detta innebär att man genom upprepade ridning, vistelse i stall, ryktning eller annan kontakt med hästallergener kan utveckla dessa allergiska besvär.

Allergen från häst anses vara ”starkt” och kan i värsta fall orsaka svåra allergiska reaktioner (Nordvall, 2005). En uppskattning presenterad i Allergifakta 2008 visar att omkring 7-10 % av Sveriges befolkning har besvär, av varierande grad, orsakat av hästallergi. För att dessa besvär ska kunna uppstå krävs inte direktkontakt med hästar. Hästallergener är väldigt små och lätta partiklar, avsevärt mindre än pollenkorn, vilket gör att de kan hålla sig luftburna länge samt även att de obemärkt kan fastna på kläder, hår eller dylikt (Miljöhälsorapport, 2005). Transportering av allergen på t.ex. kläder gör att även hästfria allmänna miljöer som exempelvis skolor kan kontamineras och därmed kan människor som aldrig är i direkt kontakt med hästar utsättas för dessa allergener. Enligt Nordvall (2005) innehåller damm i skolor höga koncentrationer av pälsdjursallergener. Dessa halter är tillräckliga för att utlösa en allergi och ge akuta symptom.

Det förekommer en diskussion huruvida det finns hästraser som inte framkallar några allergiska besvär eller i alla fall mindre besvär. Två av de hästraser som ofta figurerar i dessa diskussioner är basjkirhästen och islandshästen. Antalet studier inom detta ämne är dock begränsade. Man har kunnat konstatera att det inte finns några allergenfria hästar, däremot finns det studier som tyder på att vissa hästraser kan vara mindre allergena än andra (Emenius

et al., 2000). Till detta måste tilläggas att det även finns en stor variation mellan hästar av samma ras samt även hos en och samma häst över tid. Hur mycket allergen en häst utsöndrar verkar vara kopplat till bland annat kön, ålder och årstid (brunstcykler, fertilitet, etc.) (Allergifakta, 2008). Enligt Elfman *et al.* (2008) är allergenhalten lägre på hösten än på sommaren. På vintern är den som lägst. Orsaker till detta kan vara att den frusna marken på vintern och den ökade regnmängden på hösten kan skölja bort allergener och därmed ge en minskad spridning. Dessutom har många hästar täcken på vintern vilket minskar spridningen av allergener till den omgivande luften.

I en av de få studier som gjorts inom detta ämne jämfördes allergeninnehållet i stöv från hästar av sex olika raser, bland dem basjkirhästen (Felix *et al.*, 1996). Analysen av detta stöv, som genomfördes i huvudsak med immunoblotting, visade nitton olika allergena komponenter. Inget stövprov var det andra likt, kombinationen av olika allergenkomponenter varierade både mellan och inom raser. Alla prov och därmed alla hästraser innehöll dock alla de viktigaste allergenkomponenterna, ingen ras var unik och inget allergen var rasspecifikt. Det fanns inte heller någon signifikant skillnad mellan raser gällande antalet proteiner i stövet. Denna studie visade alltså att basjkirhästar inte skiljer sig från andra hästraser med avseende på de analyserade parametrarna. Felix *et al.* (1996) föreslog att anledningen till att allergiska personer får lindrigare alternativt avsaknad av besvär vid kontakt med basjkirhästen istället kan vara att deras långa päls släpper ifrån sig en mindre andel stöv, och därmed också färre allergener, till den omgivande luften än många andra hästraser.

Ytterligare en studie gjord i detta ämne studerade hästallergenhalten i luftprover samt stöv från olika hästraser (Emenius *et al.*, 2000). Tre av de studerade raserna var basjkirhästen, islandshästen och varmblood. Luftproverna samlades in med hjälp av en luftpump (luftflöde 2 L/min.) som bars av den person som ryktade respektive häst. De insamlade luftproverna samt stövet analyserades med hjälp av en hästallergenspecifik immunologisk metod kallad ELISA. Denna studie visade skillnader mellan hur mycket allergen som frigörs till luften mellan de olika raserna. Luftprov insamlade kring varmblooden innehöll en betydligt högre halt av hästallergen än både basjkirhästarna och islandshästarna. Den största skillnaden var mellan basjkirhäst och varmblood – de uppmätta luftnivåerna var hela 65 gånger lägre för basjkirhästarna. De analyserade stövproverna var svårare att jämföra, men tydde på liknande resultat.

SYFTE

Syftet med detta projekt var att undersöka om vissa hästraser sprider mindre mängd hästallergen än andra raser. De tre raserna som studerades var basjkirhästen, islandshästen samt vanlig ridhäst. Ridhästen representerades i denna studie av det svenska varmbloodet. Målsättningen för projektet var att undersöka om det är möjligt att rekommendera ridning på vissa hästraser såsom basjkir och islandshäst om man är allergisk mot häst.

BAKGRUND

I denna studie undersöktes allergenhalten hos de tre hästraserna basjkirhäst, islandshäst samt det svenska varmblodet.

Basjkirhäst

Basjkirhästen är en av världens äldsta hästraser. De har sitt ursprung i Rysslands Uralberg där de ofta lever i stora vilda flockar. Rasen har många användningsområden i Ryssland, bland annat används de till arbete och köttproduktion. Lokalbefolkningen tar ofta tillvara på deras tjocka vinterpäls och använder den till kläder, filter och dylikt. Stona är dessutom berömda för sin mjölkproduktion. Ett basjkirsto ger i genomsnitt 1 500 liter mjölk under sin mjölkgivningsperiod på sju till åtta månader. Det hårda klimatet har genom åren format basjkirhästen till väldigt starka och uthålliga hästar. De klarar såväl väta som köld mycket bra. I Ryssland går de oftast ute året om, ibland i djup snö och vid temperaturer ner till -40 grader (Lunn *et al.*, 1998). Det är en kompakt och kortben ponny med en mankhöjd på mellan 132 och 142 cm. Deras päls består av en tät fin hårrem som är mycket kort sommartid. På vintern får de en lång vinterpäls, ofta jämförbar med ull. Basjkirhästen är en väldigt lugn, klok och intelligent häst (Lunn *et al.*, 1998; Basjkirhästföreningens hemsida, 2009).

De första basjkirhästarna kom till Sverige så sent som år 1993. Antalet individer har nu växt till omkring 300 hästar och ungefär 30 nya föl föds i Sverige varje år. Aveln för dessa ponnyer kontrolleras av den Svenska Basjkirhästföreningen. Föreningens mål är att verka för en seriös avel som bevarar basjkirhästens rastyp och för spridandet av kunskap om rasen (Basjkirhästföreningens hemsida, 2009).

Islandshäst

Islandshästen kom till Island tillsammans med nordborna i slutet av 800-talet. Sedan 1100-talet har rasen varit isolerad på ön, helt utan inkorsningar med andra raser. Ön och dess befolkning har genom åren format hästen till en stark brukshäst med en kompakt kropp och tjock päls, framför allt vintertid. De är snabba, säkra på foten och dessutom lättfödda. Deras mankhöjd varierar ofta mellan 130 och 137 cm, men de kan vara högre. Det mest typiska med islandshästen är deras från urtypen bevarade fem gångarter; skritt, trav, galopp, passgång och tölt (Lunn *et al.*, 1998). På Island har hästen haft en betydande roll i uppbyggnaden av landet. Idag är hästnäringen fortfarande väldigt stor på Island, även om användningsområdena har förändrats. De används framför allt till fritid, sport och inom turism (Helmersson, 1991).

Islandshästen har funnits i Sverige sedan början av 1900-talet. Idag finns det mer än 25 000 registrerade islandshästar i Sverige (SIFs hemsida, 2009). Det Svenska Islandshästförbundet (SIF) har ställt upp följande avelsmål för islandshästen: ”en modig, stark och hållbar ridhäst, med mycket gott lynne, som är samarbetsvillig och arbetsvillig, är fyrgångare (skritt, trav, tölt, galopp) eller femgångare (+ flygande pass), med taktrena, spänstiga och vägvinnande rörelser i alla gångarter, med naturlig balans och bra undertramp, som bär sig väl under ryttere. Den skall ha ändamålsenlig exteriör och stark utstrålning. Den typiska robustheten, den rikliga behåringen med mycket skyddshår samt den stora färgvariationen måste alltid bevaras” (SIFs hemsida, 2009).

Svenskt varmblod

Merparten av Sveriges ridhästar är av rasen svenskt varmblod (Furugren, 1998). Bildandet av rasen började på 1800-talet då utländska varmblodshingstar började importeras i allt större utsträckning. Det var framför allt importen av de tyska varmblodsraserna hannover och

ostpreussare som dominerade, men även raser som det engelska fullblodet köptes in. Aveln med de importerade hingstarna och svenska ston skapade så småningom det vi idag kallar det svenska varmblodet (Laing *et al.*, 1992; Furugren, 1998). Dessa hästar har en storlinjerad kropp, dvs. hästen har en lång hals, lång och djup bröstorg och långt, välmusklat kors. Mankhöjden varierar mellan 160 och 175 cm. Huvudet är ädelt och uttrycksfullt med stora ögon. Varmblodets uppbyggnad och utmärkta gångarter gör att det passar ypperligt till hästsporter som dressyr och hoppning (Laing *et al.*, 1992; Furugren, 1998).

Det svenska varmblodet ingår i avelsföreningen ASVH (Avelsföreningen för Svenska Varmblodiga Hästen). Det är osäkert hur många varmblod det finns i Sverige idag. Enligt Hedin (Hedin, e-post, 2009) registreras cirka 3 500 föl av svensk varmblodig hästras varje år i ASVH. Avelsmålet för dessa hästar är ”en ädel, korrekt och hållbar varmblodshäst, som genom sitt prestationsinriktade temperament, sin ridbarhet, goda rörelser och/eller hoppförmåga är internationellt konkurrenskraftig” (ASVHs hemsida, 2009).

MATERIAL OCH METODER

För att mäta hur mycket luftburet hästallergen en ryttare utsätts för under en ridlektion användes i denna studie luftpumpar. Utöver det så ryktades hästarna och stövet samlades in för att få fram hur mycket hästallergen det innehöll. Dessutom analyserades stövet med SDS-polyakrylamidgelelektrofores (SDS-PAGE) för att studera proteinmönstret. För att se om det finns någon tanke i val av hästras och stall hos ryttare beroende på hästallergi delades enkäter ut i varje stall.

Provtagning

Tre olika ridanläggningar användes i denna studie, en för vardera hästrasen. Provtagningen på islandshästar gjordes på Islandshästkonsult, Bärby Gård i Alunda. För basjkirhästarna gjordes provtagningen på Hammarby Gård i Haninge och för varmbloden hos Väsby Ridskola på Sättra Gård, Upplands Väsby. I varje stall användes tre hästar. Provtagningarna för det luftburna hästallergen gjordes före, under och efter ritt. Under sammanlagt 105 minuter var ryttarna utrustade med varsin pump med munstycken placerade i axelhöjd. Första delen bestod av 15 minuter ryktning och 15 minuter sadling, etc. De tre hästarna reds sedan i 60 minuter. För att kunna bortse från faktorer som väder och vind skedde detta inomhus i ridhus. Även efter ritten då hästarna togs omhand var ryttarna utrustade med pumpar (15 minuter). Det hela simulerade en vanlig ridlektion där ryktning, umgänge med häst, ridning och dylikt ingick.

De luftburna allergenpartiklarna samlades upp med IOM provtagare med Fluoropor membranfilter (porstorlek 1,0 µm, typ FA Millipore AB, Sverige). Provtagaren monterades på en pump vilken jobbade med ett luftflöde på 3,5 l/min (AirChek XR5000, SKC Inc. PA, USA). Dessa mätningar pågick under 105 minuter x 3 för varje hästras (se ovan). Kalibrering av luftintaget gjordes före mätningen och luftflödet reglerades till 3,5 l/min. Efter avslutad mätning kontrollerades luftflödet åter igen och ett medelvärde räknades



Islandshästkonsult
Tel. 0174 – 360 40
www.islandshestkonsult.se

Hammarby Gård
Tel. 08 – 500 320 42
www.hammarbygard.com

Väsby Ridskola
Tel. 08 – 590 814 52
www.vasbyridklubb.a.se

ut för att få fram den luftvolym som senare användes i kalkyleringarna. I samband med provtagning av luftburet hästallergen samlades även stöv in genom ryktning av de tre hästarna i vardera stallet. Varje häst ryktades till dess att tillräcklig mängd samlats in. I varje stall användes nya ryktborstar och ryktskrapor. Detta för att proverna inte skulle kontamineras av andra hästars stöv och då ge felaktiga resultat. Stövet samlades upp i petriskålar (ett gemensamt prov för varje hästras) där det förvarades fram tills det skulle extraheras.

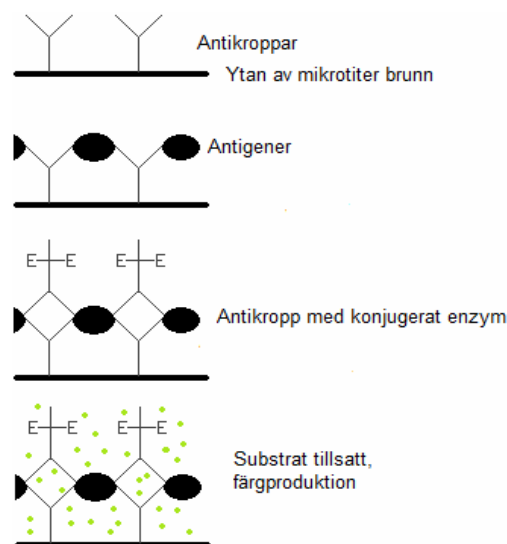
Extraktion av prover

Luftproverna extraherades genom att filtren med de uppsamlade luftburna allergenpartiklarna lades i minisorprör (70x11 SH, OneMed, Göteborg) och 2 ml fosfatbuffert innehållande 0,05 % Tween 20, 1 % albumin (BSA) med konserveringsmedlet Timerosal (PBS-T/BSA) tillsattes. Timerosal, vilket är en proteashämmare, tillsattes för att minska nedbrytningen av proteiner. Proverna extraherades genom rotation på Roto-Shake Genie (Scientific Industries Inc, Labora) över natt. Vätskan fördes sedan över i eppendorfrör (Sarstedt) och centrifugerades i Biofuge pico (Heraeus, Kendro Laboratory Products) vid 10 000 rpm under 10 min. Därefter överfördes supernatanten till 2 ml kryorör (Sarstedt) för förvaring vid +4-8°C fram till analys.

Extraktionen av stövproverna började med att 50 mg av det uppsamlade stövet vägdes upp på en analysvåg (Mettler, AC100) och överfördes till 15 ml provrör (Sarstedt). Därefter tillsattes 1 ml PBS-T samt 4 glaspärlor. Glaspärlorna tillsattes för att få en mer effektiv omrörning. Sedan mixades proverna på en MS1 Minishaker (IKA, OneMed, Göteborg) och därefter ytterligare genom rotation på Roto-Shake Genie under 2 timmar. Efter extraktionen centrifugerades proverna i Centra 12 (Thermo IEC, VWR International AB, Stockholm) vid 3500 rpm under 10 min. Supernatanten överfördes sedan till eppendorfrör (Sarstedt) och efter det centrifugerades proverna i Spectrafuge 7M (Labnet) vid 10 000 rpm under 10 min. Proverna förvarades i 1,5 ml kryorör (Sarstedt) vid +4-8°C fram till analys.

Analys med ELISA

För att få fram mängden hästallergen i luftproverna användes den immunologiska metoden Sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Detta är ett redskap som används för att kvantifiera och detektera en antikropp eller allergen. Det som sker är att antigenet fångas upp mellan två antikroppar som är specifika för att antigenen ska kunna detekteras. Mikrotiterplattor (Maxisorp, Nunc, Danmark) preparerades med hästantikroppar (Mabtech AB, Stockholm, Sverige) och därefter tillsattes de extraherade proverna. Hästallergenerna binder då till antikropparna. Plattan tvättas för att få bort material som inte har fastnat för att sedan kunna tillsätta den andra antikroppen som då binder till antigenet. En schematisk bild på detta kan ses i figur 1. Plattan tvättas sedan igen. För att kunna se enzymaktiviteten av det bundna materialet i brunnarna tillsätts ett substrat för enzymet och en färgproduktion startar. Färgproduktionen är proportionerlig mot mängden antigen som närvarar. För att kunna mäta koncentrationen av hästallergen avläses plattan i en spektrofotometer/plattläsare (EL800, Bio-tek Instruments,



Figur 1. En schematisk bild på hur antigener fäster på antikroppar och detekteras med Sandwich ELISA. Modifierad efter Madigan & Martinko, 2006.

USA). Med hjälp av en standardkurva som gjordes av dataprogrammet KC4 (Bio-Tek Instruments Inc. USA) och kurvanpassningsprogrammet 4 parametrar gjordes en haltbestämning (Madigan & Martinko, 2006).

Proteinbestämning

För att kunna jämföra halten hästallergen i de tre stövproverna (en för vardera hästrasen) gjordes en proteinbestämning. För denna bestämning användes BCA-protein analyskit (Fisher Scientific). Först gjordes en spädning med hjälp av en bovint serumalbumin (BSA) standardlösning (2 mg/ml) för att få fram en standardkurva, se tabell 1. Varje stövprov späddes till 1, 1/5, 1/10 och 1/20 på följande sätt;

1 = 200 µl outspädd lösning

1/5 = 40 µl av den outspädda lösningen + 160 µl PBS-T

1/10 = 100 µl av 1/5 lösningen + 100 µl PBS-T

1/20 = 100 µl av 1/10 lösningen + 100 µl PBS-T

Standardlösning och prover (200 µl/prov) tillsattes i brunnar i en mikrotiterplatta. En Working Reagent (WR) gjordes genom att blanda 50 delar Reagent A med en del Reagent B. Av Reagent A tillsattes 12,5 ml och av Reagent B 250 µl. 200 µl WR tillsattes sedan till varje brunn i en mikrotiterplatta. Alla prover kördes som dubletter på plattan. Mikrotiterplattan täcktes och inkuberades vid rumstemperatur och under inkubationen lästes plattan av i en Bio-Tek platt-läsare vid en absorbans av 562 nm. Sista avläsningen skedde efter en inkubationstid på 105 minuter.

Tabell 1. Spädningsschema för standardkurvan

<i>Provrör</i>	<i>Volym av PBS-T</i>	<i>Volym (µl) och BSA källa</i>	<i>Slutgiltig BSA koncentration (µl/ml)</i>
A	0	300 av Stock (BSA)	2000
B	125	375 av Stock (BSA)	1500
C	325	325 av Stock (BSA)	1000
D	175	175 av provrör Bs spädning	750
E	325	325 av provrör Cs spädning	500
F	325	325 av provrör Es spädning	250
G	325	325 av provrör Fs spädning	125
H	400	100 av provrör Gs spädning	25
I	400	0	0 = Blank

Analys med SDS-PAGE

För att jämföra proteinmönstret hos de tre hästraserna gjordes en Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelektrofores (SDS-PAGE) på de extraherade stövproverna. Hästextraktet späddes då med en buffert med eller utan dithiothreitol för att ge en reducerad eller oreducerad form. Hästextraktet kördes på ExcelGel SDS (MultiPhor II, GE Healthcare, Uppsala, Sverige) och ett LMW kalibreringskitt för SDS-elektrofores användes (GE Healthcare). Gelen var silverfärgad med en något modifierad metod Hoefer Automated Gel Stainer (GE Healthcare, Sverige). Analysen gjordes av företaget Phadia AB (Uppsala, Sverige).

Enkätstudie

En enkätstudie gjordes för att få en överblick på huruvida rideleverna i de olika stallen hade valt stall efter om de var hästallergiker eller ej. Då det diskuterats att både basjir- och

islandshästen är mindre allergena än andra hästraser kunde detta vara en bidragande orsak till valet av hästras. Enkäten var enkelt utformad för att passa såväl vuxna som barn. Den innehöll fyra frågor med enkla svarsalternativ vilket kan ses i bilaga 1. I varje stall delades 50 enkäter ut för att få en så rättvis bild som möjligt över detta.

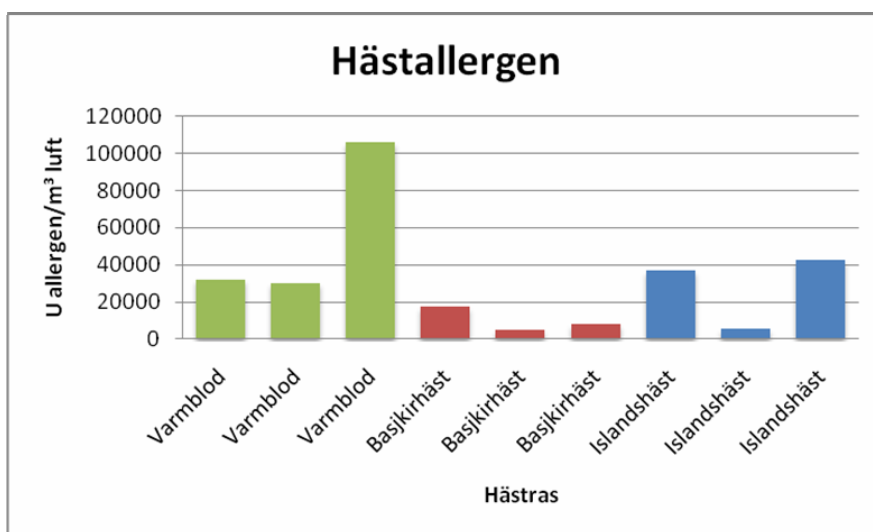
RESULTAT

Hästallergen i luft

Mängden hästallergen i de insamlade luftproverna analyserades med hjälp av Sandwich ELISA. För de standardkurvor som användes i beräkningarna av mängd hästallergen se bilaga 2. Anledningen till varför två olika kurvor användes är att spädningarna var för låga för flera prover och analysen då fick göras om för vissa prover. Analysen visade att basjikhästarna spred minst hästallergen med (median) 8 250 Units hästallergen/m³ luft medan islandshästarna 36 800 U hästallergen/m³ luft och varmbloden 32 400 U hästallergen/m³. Det var dock stor variation mellan de tre hästarna inom varje ras, vilket gör dessa medianvärden osäkra (se tabell 2). Varmbloden hade den största spridningen, 30 430 – 106 165 U hästallergen/m³ luft.

Tabell 2. Mängd insamlat hästallergen från de nio hästarna

Hästras	U hästallergen/m ³ luft
Varmblod	32 420
Varmblod	30 430
Varmblod	106 165
Varmblod; median	32 420
Basjikhäst	17 612
Basjikhäst	5 090
Basjikhäst	8 248
Basjikhäst; median	8 248
Islandshäst	36 801
Islandshäst	5 575
Islandshäst	42 808
Islandshäst; median	36 801



Figur 2. Mängd insamlat hästallergen från de nio hästarna.

Hästallergen i stöv

Den proteinbestämning som utfördes för att göra allergenförekomsten i stövproverna jämförbar visade även den en skillnad mellan de tre hästraserna. Det fanns ingen stor skillnad mellan stövet från basjkirhästarna och varmblooden, dock var allergenhalten något lägre för basjkirhästarna. Islandshästarna gav ett stövprov med högre allergenhalt per proteinmängd än de andra raserna (se tabell 3). För den standardkurva som användes till beräkningarna av dessa värden se bilaga 3.

Tabell 3. Mängd hästallergen/mg protein hos vardera hästrasen

Hästras	U hästallergen/mg protein
Varmblood	1 142 549
Basjkirhäst	1 089 714
Islandshäst	1 605 000

Analys av proteinmönstret i häststöv med SDS-PAGE

Figuren i bilaga 4 visar resultaten från SDS-PAGE av hästallergen från stöv från de tre hästraserna. Lika mycket proteinmängd har tillsatts av alla tre stövproverna i SDS-PAGE. Band 2-4 visar oreducerad form medan band 6-8 visar reducerad form. Band 1 och 10 visar molekylviktstandarden. Band 5 och 9 visar hästallergenstandarden, som används i ELISA. I denna gelbild kunde följande hästallergen identifieras: Equ c 1 (22 och 31 kDa, oreducerad och reducerad form) där banden visas mycket svagt. I reducerad form syns ett svagt band på basjkirhästen. Equ c 2 (18 och 16 kDa, oreducerad och reducerad form), vilken syns tydligt på islandshäst och varmblood. Equ c 3 (65 kDa oreducerad form) är identifierad i alla tre hästraserna. Equ c 4 (17 och 4,5 kDa, oreducerad och reducerad form) syns tydligt på islandshäst och varmblood men svagt på basjkirhäst. Equ c 5 (17 kDa oreducerad form) syns på islandshäst och varmblood. Equ c 5 (20,5 kDa, reducerad form) kan identifieras på varmblood. Det är svårt att skilja Equ c 2, Equ c 4 och Equ c 5 åt i den oreducerade formen då de nästintill ligger på samma kDa. Slutsatsen är att proteinmönstret från basjkirhästen skiljer sig åt från de andra två raserna och att de viktigaste hästallergenen, Equ c1, c2, c4 och c5 finns i betydligt mindre mängd.

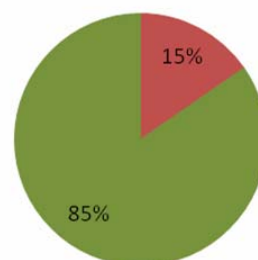
Enkätstudie

Svarsfrekvensen på enkäten var hög i basjkirhäst- och varmbloodsstallen (96 respektive 100%), medan den var låg i Islandshäststallet (26%). Resultatet av enkätundersökningen visar att i stallet med islandshästar uppvisar 15 % av ryttarna allergiska besvär av varierande grad vid kontakt med hästar (se figur 2a). I stallet med basjkirhästar är motsvarande siffra 21 % (se figur 2b) och i stallet med varmblood 6 % (se figur 2c). Detta är utspjtt över alla åldersklasser vilket kan ses i bilaga 5.

Enligt denna enkätundersökning finns det ryttare som byter stall på grund av sin allergi för att kunna fortsätta att utöva sitt hästintresse. Av de ryttare i de tre undersökta stallen som uppvisar allergiska besvär är det 67 % som upplever en lindrigare allergi vid kontakt med islands- eller basjkirhästar (se bilaga 5). Alla ryttare i islandshäst- och basjkirhäststallet som i enkätundersökningen uppgett att de uppvisar allergiska besvär vid kontakt med hästar har valt just detta stall på grund av sina allergiska besvär. De

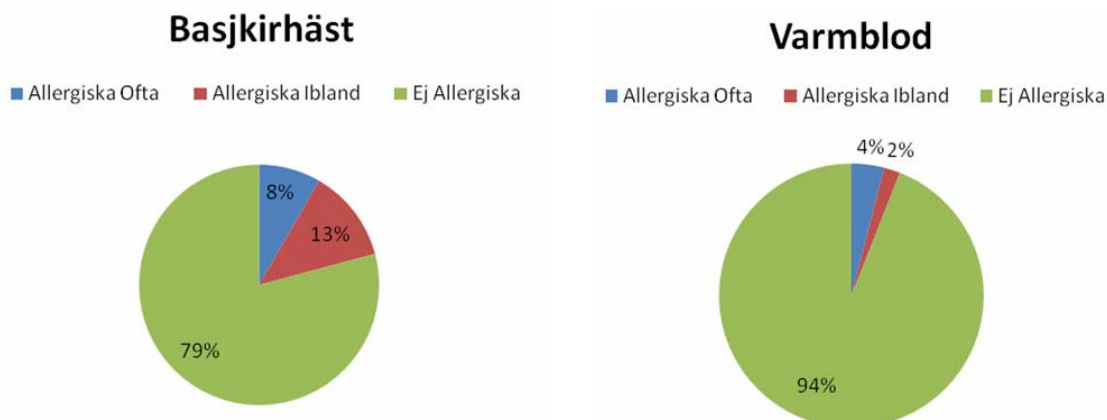
Islandshäst

■ Allergiska Ibland ■ Ej Allergiska



Figur 2a. Andel allergiska i stallet med islandshästar

ryttare som var allergiska i varmbloodsstallet har antingen slutat med sin ridning eller rider endast ett fåtal gånger per år på grund av sin allergi.



Figur 2b. Andel allergiska i stallet med basjkirhästar

Figur 2c. Andel allergiska i stallet med varmblood

DISKUSSION

Syftet med denna studie var att undersöka om basjkirhästen och/eller islandshästen sprider mindre mängd hästallergen än vanliga ridhästar, här representerade av det svenska varmbloodet. För att undersöka om de tre hästraserna sprider olika mängd hästallergen till den omgivande luften samlades luftprover in vid en ridlektion med tillhörande hantering av hästen. Resultat från studien visade stora variationer mellan hästar inom samma ras. Två av varmblooden spred drygt 30 000 U hästallergen/m³ luft, medan den tredje hästen gav så mycket som cirka 106 000 U hästallergen/m³. Detta höjde medelvärdet för varmbloodens hästallergenspridning. Även hos de två andra hästraserna fanns det stora variationer. Trots detta kunde man se att basjkirhästen sprider mindre mängd hästallergen än både varmbloodet och islandshästen, då dessa prover låg lägst. Ett liknande resultat går att se i en snarlik studie gjord av Emenius och medarbetare. Även i denna studie frigav varmblooden en signifikant högre hästallergenhalt till den omgivande luften än basjkirhästarna. Denna studie visade också att en sådan skillnad finns mellan varmblood och islandshästar, vilket vår studie ej visade.

Analysen av mängd hästallergen per mg protein i hästarnas stöv gav en tendens till att basjkirhästarna ligger något lägre än varmblooden. Däremot hade islandshästarna en högre allergenhalt per proteinhalt. Under provtagningstillfället var två av varmblooden ryktade även innan provtagningen startade, medan ingen av de andra hästarna var ryktade timmarna innan proven togs utan de togs in direkt från hagen. Detta kan innebära att mycket av deras stöv var bortborstat och därmed bidrog till att ge ett felaktigt resultat i det gemensamma stövprovet samt i sina individuella luftprover. Möjligheten finns att det var varmblood nummer 3 som med högst allergenhalt i sitt luftprov (106 000 U allergen/m³ luft) gav den mest representativa allergenhalten för rasen svenskt varmblood både vad gäller allergenhalt i stövens protein och i mängd frisläppt allergen. Detta skulle innebära att rasen svenskt varmblood har en högre halt allergen i sitt protein samt frisläpper högre halt allergen till den omgivande luften än både islandshästar och basjkirhästar.

Det fanns en skillnad i hur hästarna levde och sköttes på de tre olika ridanläggningarna. Både basjkir- och islandshästarna var ute i sina hagar under en mycket större del av dygnet jämfört med varmblooden. Dessutom hade varmblooden täcke på sig oftare än de andra hästarna. Detta kan innebära att varmblooden skulle ha haft en större pälssättning om de hölls på samma vis som basjkir- och islandshästarna vilket kan ha förändrat deras spridning av allergen. Dessutom skedde hanteringen (sadling, ryktning, etc.) av basjkirhästarna utomhus under ett vindskydd med tak, medan de andra hästarna hanterades inomhus i stallet. För att erhålla ett säkrare resultat än vad denna studie gav bör de tre hästraserna leva under mer lika förhållanden. Helst ska hästarna hållas i likadana stall med lika ridhus under hela studien och hanteringen av dem bör vara samma under provtagningens gång. Den mänskliga faktorn och skillnaderna mellan de tre ridanläggningarna har troligen påverkat resultatet i denna studie. Dessutom har ingen hänsyn tagits till faktorer som ålder, kön, klippt/ej klippt päls, etc.

Det skulle vara intressant att göra denna studie under olika årstider då tidigare studier har visat att årstidernas olika klimat påverkar spridningen av hästallergen (Elfman *et al.* 2008). Kanske även hästarnas olika pälssättning under sommar/vinter kan orsaka variationer i deras allergenfrisläppning. Denna variation kan innebära att en hästras är mer allergivänlig under en viss årstid jämfört med andra tider på året. Det skulle även vara intressant att separera provtagningen av allergenhalt i luften i två mindre delar; en som inkluderar ryktning och annan hantering av hästen och en som endast inkluderar ridning. En hypotes för detta är att det sker mer frisläppning av stöv, och därmed även allergen, under ryktningen.

Basjkirhästen visar ett annat proteinmönster än både islandshäst och varmblood. Equ c 1 – Equ c 5 visar hästallergenprotein. Flertalet av proteinbanden i stöv från basjkirhäst var svaga och i vissa fall visas proteinbanden inte alls. Equ c 3 är det enda proteinband som är starkt på basjkirhästen. Detta band visar proteinet albumin vilket är ett generellt protein som dessutom är det lägst allergiframkallande av allergenproteinerna. Det är dock svårt att skilja Equ c 2, Equ c 4 och Equ c 5 åt i den oreducerade formen då de nästintill ligger på samma kDa och överlappar varandra. Resultatet från SDS-PAGE tyder alltså på att basjkirhästen har ett annorlunda proteinmönster jämfört med islandshästen och det svenska varmbloodet. Detta kan vara en förklaring till varför vissa allergiska ryttare klarar av basjkirhästen bättre än andra raser.

För att se om det finns någon grund för den diskussion som ofta hålls inom detta ämne gjordes en enkätundersökning i de aktuella stallen. Tyvärr gav denna undersökning en ojämn svarsfrekvens. Från basjkirhäst- och varmbloodsstallen var svarsfrekvensen hög (48 resp. 50 ifyllda enkäter av 50 utdelade). På grund av brist i posthanteringen inkom endast 13 ifyllda enkäter från stallet med islandshästar. Trots detta kan man tydligt se att hästras ofta är en påverkande faktor vid val av ridstall för personer som uppvisar allergiska besvär. Detta gällde framför allt bland ryttarna i stallet med basjkirhästar. Denna enkätundersökning tyder alltså på att det finns skillnader mellan hästras vad gäller uppfattningen om spridning av hästallergen till sin omgivning.

Denna studie kan ge en antydning om att basjkirhästen, och även i viss mån islandshästen, sprider mindre mängd hästallergen till den omgivande luften än andra hästras. Inget är dock bevisat i och med denna undersökning, utan fler studier behövs. Kan det trots allt vara så att denna studie samt den lilla mängd annan forskning som gjorts inom detta ämne är missvisande – att dessa tre hästras egentligen är lika allergena? Eftersom en diskussion om just detta har uppkommit bedömer vi att det borde finnas någon grund för den. Enligt den enkätundersökning som gjorts i detta projekt uppger flera ryttare som visar allergiska besvär

att de kan fortsätta att utöva sitt intresse om de vistas i ett stall med basjkir- och/eller islandshästar. Detta, tillsammans med övriga resultat från vår studie samt annan forskning, anser vi tyder på att det finns en skillnad mellan de undersökta hästraserna. Denna skillnad kan även bero på att hästhållningssystemet ofta varierar mycket mellan raserna. Islandshästar och basjkirhästar hålls med fördel i kalla, fria system (ofta utomhus) och varmblooden i varma, slutna stallar. I en utomhusmiljö är förutsättningarna bättre för allergiska personer; här finns mindre damm och andra allergiframkallande ämnen (för många allergiska ryttare är det inte hästallergen som är besvärande, utan istället damm eller strömmaterial) och den friska luften gör att spridningen av hästallergen blir mer lindrigt.

Enligt de resultat som framkommit i denna studie anser vi att man med försiktighet kan rekommendera ridning på basjkirhästar och även i viss mån islandshästar om man är allergisk mot hästar. Det måste dock klargöras att inga hästar är helt allergenfria, utan man kan få allergiska symptom vid kontakt med alla hästar och hästraser. Om man trots sin allergi vill prova att rida exempelvis basjkirhästar rekommenderar vi att man börjar försiktigt. Kanske någon annan ryttare kan borsta hästen de första gångerna, eftersom vid ryktning är exponeringen för hästallergen nämligen stor. Man kan även välja ett stall där ridning och gärna även hantering sker utomhus med mycket större luftomväxling.

SLUTSATS

Denna studie visar att basjkirhästens stöv inte skiljer sig avsevärt från andra hästraser med avseende på allergenhalt per mg proteinmängd. Däremot verkar de sprida en mindre mängd hästallergen till den omgivande luften samt ha ett annorlunda proteinmönster än vad både islandshästar och det svenska varmbloodet har. Variationerna inom ras var dock stora. Materialet i denna studie är väldigt begränsat, vilket gör resultatet osäkert. En större studie med fler hästar och under olika delar på året behöver göras för att det ska gå att fastställa om det finns hästraser som är mer allergivänliga än andra.

Resultatet från denna studie gör det möjligt att rekommendera ridning på basjkirhästar och i viss mån även islandshästar för ryttare med hästallergi. Detta bör dock göras med försiktighet. Inga hästraser eller hästar är nämligen helt fria från allergener.

Tack till

Ett stort tack till vår handledare Lena Elfman för all hjälp vi har fått och för all tid du har lagt ner. Tack till Susanne Bohlin för all hjälp vid laborationer och till Catharina Svala för hjälp med redigering av arbetet. Ett stort tack till Islandshästkonsult, Hammarby Gård och Väsby Ridskola för att vi fick komma och ta prover hos er. Vi vill även tacka Mabtech AB, (Stockholm, Sverige) vilka bidrog med antikroppsreagensen till hästallergen ELISA och Håkan Larsson på Phadia AB (Uppsala, Sverige) för SDS-PAGE analysen. Sist, men inte minst: ett stort tack till er ryttare och hästar som stod ut med de surrande pumparna under ett ridpass!

REFERENSER

- Allergifakta, 2008. 2008. Astma- och Allergiförbundet & Stiftelsen Astma- och Allergiförbundets forskningsfond.
- ASVHs hemsida [www.asvh.se] avläst 2009-11-12.
- Basjkirhästföreningens hemsida [www.basjkir.se] avläst 2009-11-12.
- Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. 2002. Biochemistry. 5:e upplagan. New York. W. H. Freeman and Company.
- Brännström, J. 2003. Spridning av hästallergen från stall i luft- och dammprover. Examensarbete i biomedicinsk laboratorievetenskap, utfört vid Arbets- och miljömedicin, Uppsala Universitet.
- Elfman, L., Brännström, J. & Smedje, G. 2008. Detection of Horse Allergen around a Stable. International Archives of Allergy Immunology, 145, 269-276.
- Emenius, G., Härfast, B., Wickman, M & Svartengren, M. Hästallergen i luftprover och stöv från olika hästraser. Arbets & Miljömedicin [http://www.folkhalsoguiden.se/upload/Milj%C3%B6/Milj%C3%B6%20-%20studier/Studie%20om%20h%C3%A4stallergen.pdf] avläst 2009-11-10.
- Hedin, C. ASVH. cerrie@asvh.se. E-post, 2009-11-13.
- Felix, K., Ferrándiz, R., Einarsson, R. & Dreborg, S. 1996. Allergens of horse dander: Comparison among breeds and individual animals by immunoblotting. Journal of allergy and clinical immunology, 98, 169-171.
- Folkhälsorapport, 2007. Stockholm. 2007.
- Furugren, B. 1998. I: Lärn-Nilsson, J. (red.). Naturbrukets Husdjur. Del 2, 403-417. Stockholm, Natur och Kultur.
- Helmersson, S. 1991. Islandshästen 1: skötsel, ridning och avel. Karlskrona, Epona Förlag.
- Hästnäringens miljøråd. 2006. Visa hänsyn till hästallergiker. Praktisk guide nr. 1, 2006. Stockholm.
- Laing, J., Weeks, J., Thompson, S. & Townsend, H. 1992. Bonniers stora bok om hästar. Stockholm, Bokförlaget Bonnier Alba AB.
- Lunn, A., Keenes, T., Cunningham, A., Boys, E., D'Orsi, M., John, K., Brown, L., Buchanan, J., Creeke, H. & Silbert, M. 1998. Bonniers stora hästlexikon. Stockholm, Albert Bonniers Förlag.
- Miljöhälsorapport, 2005. Stockholm. 2005.
- Madigan, M.T. & Martinko, J.M. 2006. Brock Biology of microorganisms, elfte upplagan, 804-805. New Jersey, Pearson Education.
- Nordvall, L. 2005. Allergener, luftföroreningar och klimat. I: Foucard, T., Hedlin, G. & Wennergren, G. (red.). Allergi och astma hos barn, tredje upplagan, 78-95. Södertälje, AstraZeneca Sverige AB.
- SIFs hemsida [www.icelandichorse.se] avläst 2009-11-12.
- Spitzauer, S. 1999. Allergy to mammalian proteins: At the borderline between foreign and self. International Archives of Allergy and Immunology, 120, 259-269.
- Tutluog˘lu, B., Atıř, S., Anakkaya, A. N., Altug˘, E., Tosun, G. A. & Yaman, M. 2002. Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms. Clinical & Experimental Allergy, 32, 1170-1173.

BILAGA 1: Enkät

Det talas ofta om att vissa hästraser är mer allergiframkallande än andra. Vissa ryttare med hästallergi kan i och med byte av hästras fortsätta att utöva sitt intresse. Med den här enkäten vill vi undersöka hur ofta detta sker!

1. Ålder

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> 10 år eller yngre | <input type="checkbox"/> 16 – 20 år |
| <input type="checkbox"/> 11 – 15 år | <input type="checkbox"/> 21 år eller äldre |

2. Har du uppvisat allergiska besvär vid kontakt med hästar?

- ☐ Ja, ofta
☐ Ja, ibland
☐ Nej, aldrig

3. Om ja, har du upplevt att besvären är lindrigare vid kontakt med vissa hästraser?

- ☐ Ja
Vilka hästraser? _____
☐ Nej

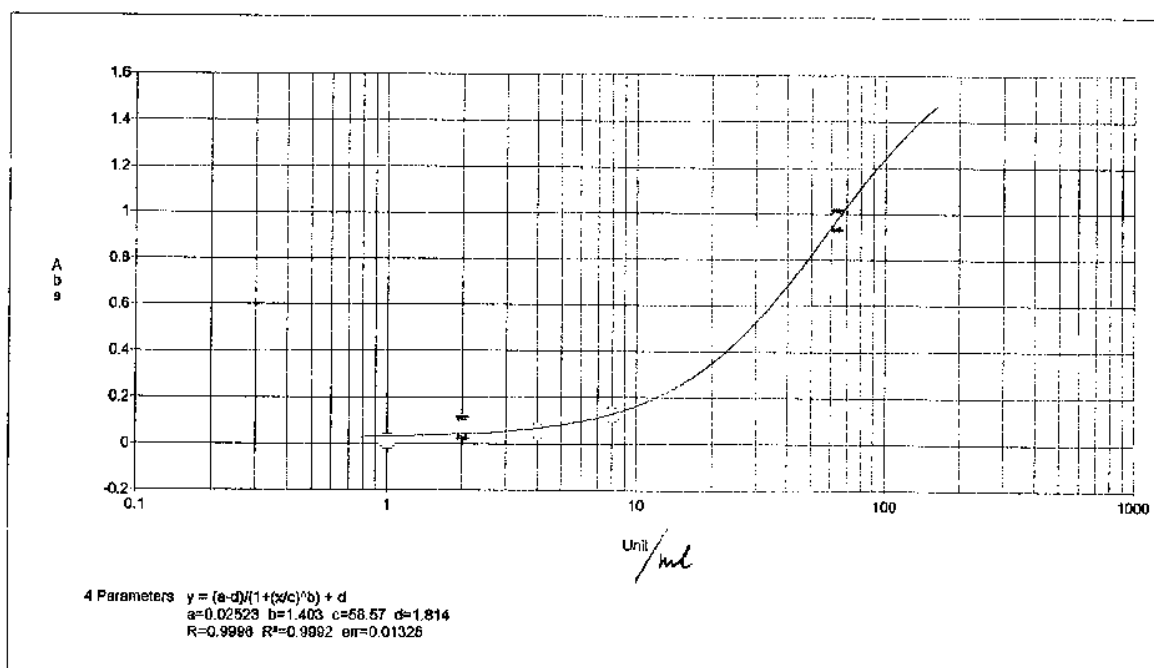
4. Har allergiska besvär varit en anledning till ditt val av ridstall?

- ☐ Ja
☐ Nej

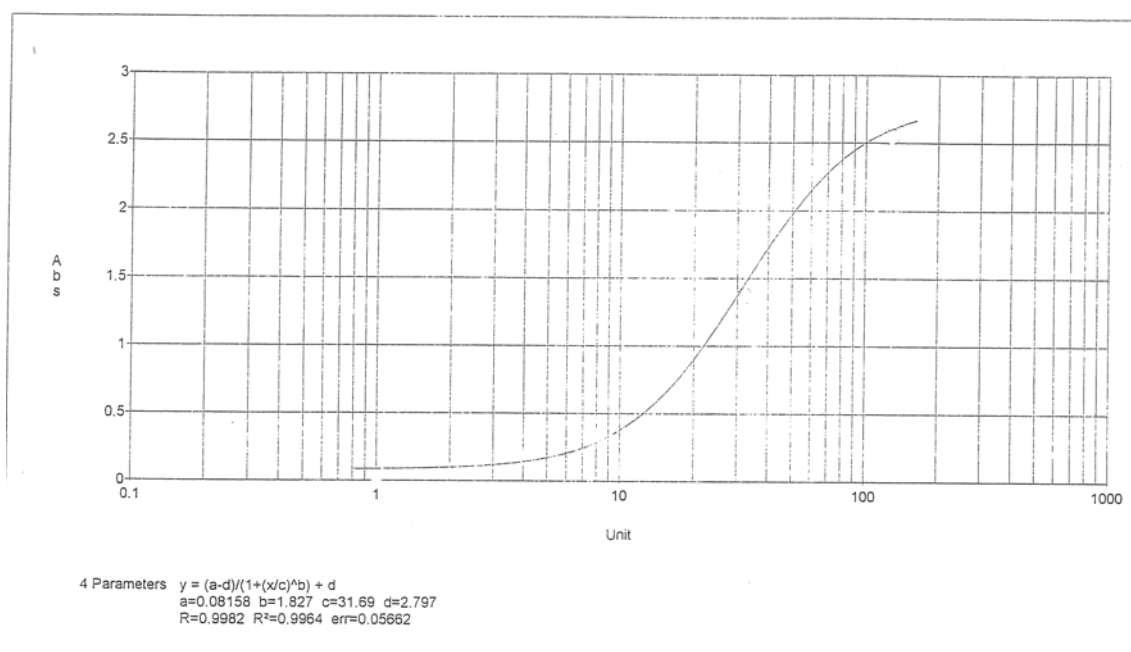
Tack för dina svar!



BILAGA 2: Standardkurvor för analys av hästallergen med ELISA

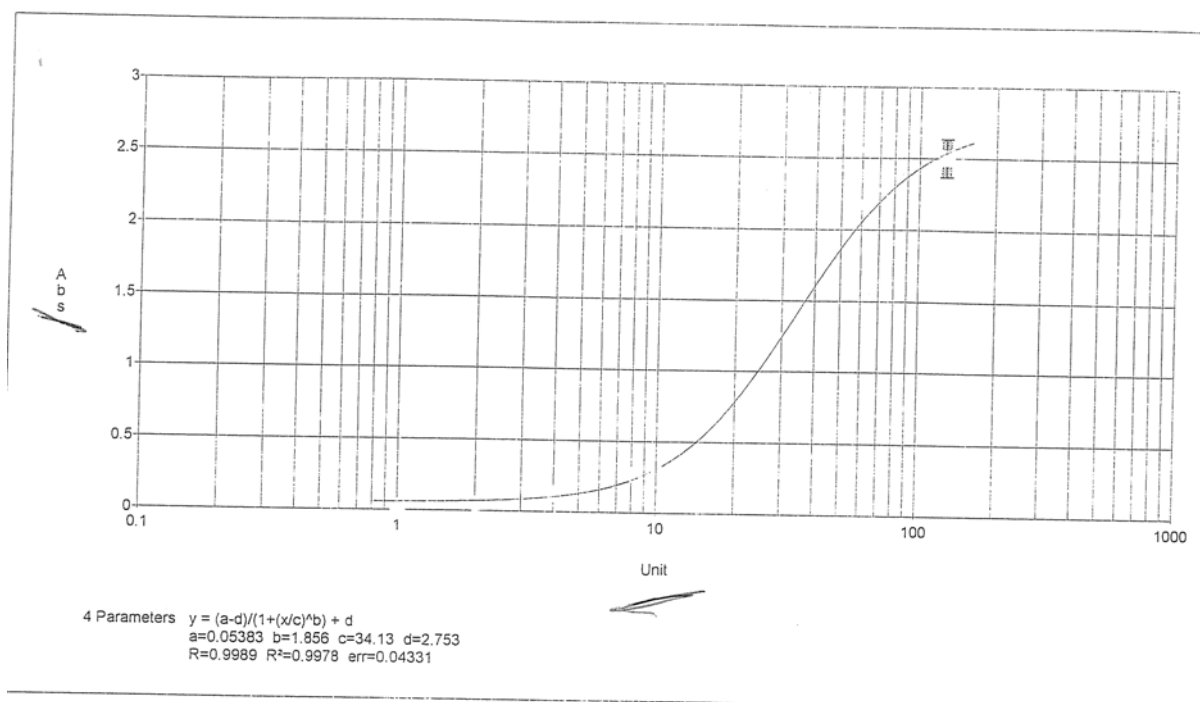


Figur 3a. Standardkurva för luftprover från varmblood 1-3, basjkielhäst 1 samt islandshäst 1 och 3.

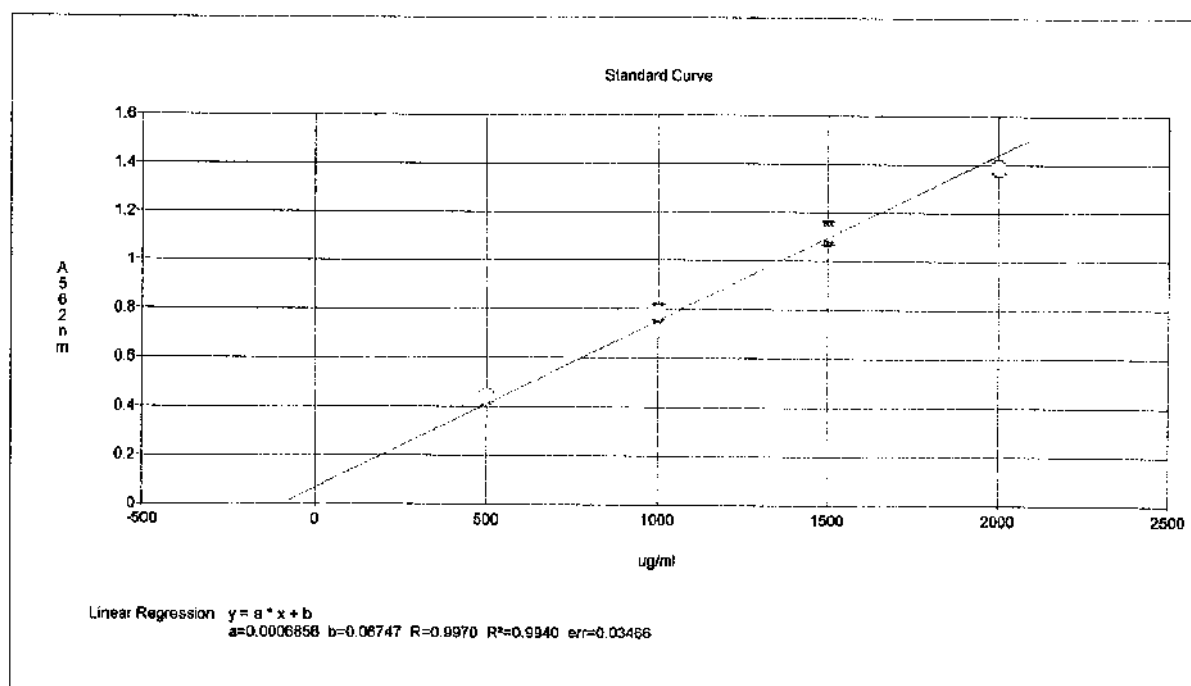


Figur 3b. Standardkurva för luftprover från basjkielhäst 2 och 3 samt islandshäst 2

BILAGA 3: Standardkurvor för bestämning av hästallergen och protein i stövprover

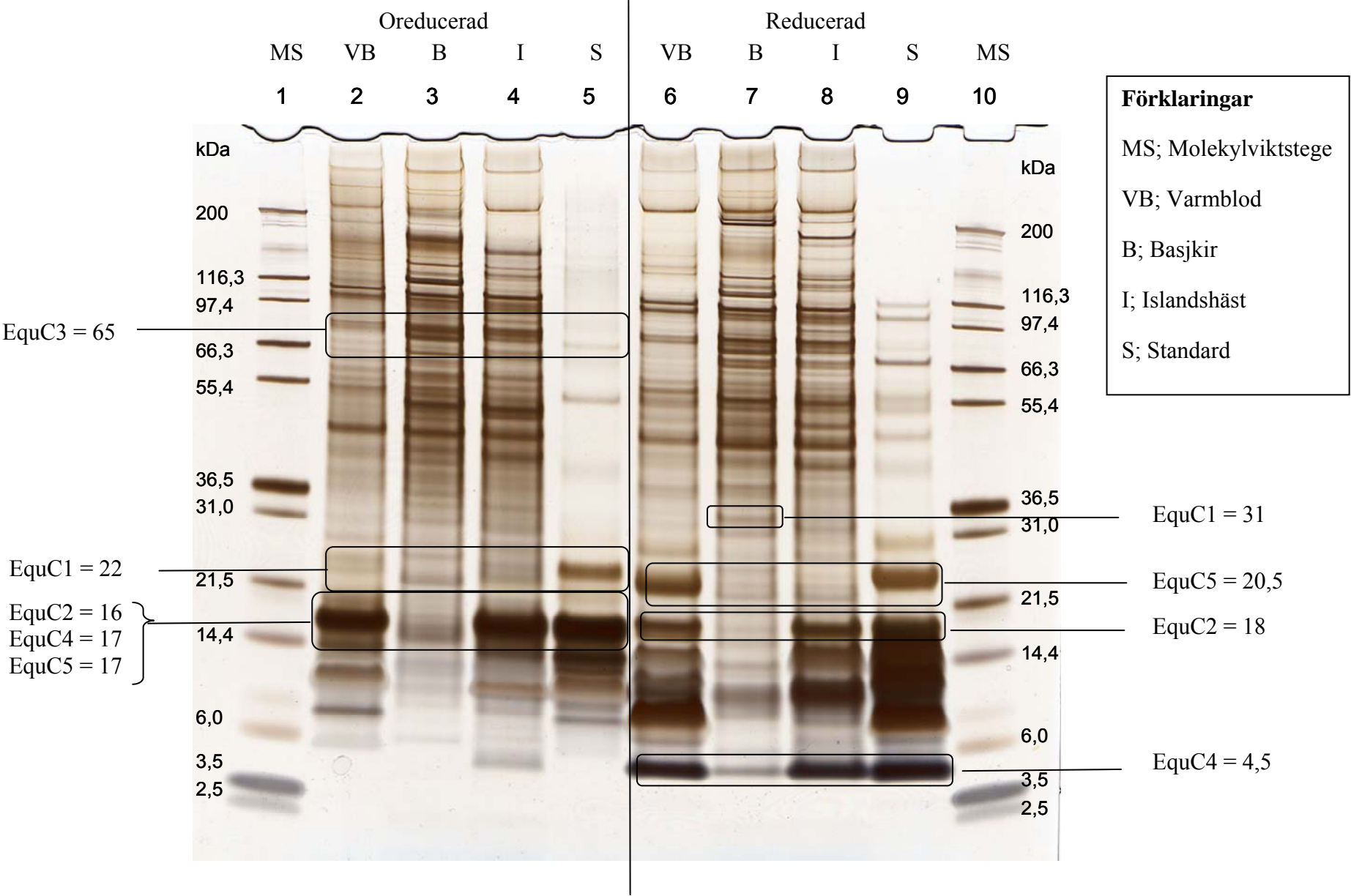


Figur 4a. Standardkurva för hästallergen framtagen med hjälp av ELISA.



Figur 4b. Standardkurva för proteinbestämning enligt BCA-protein analyskit.

SDS-PAGE



BILAGA 5: Resultat från enkätundersökning

Tabell 4. Resultat från enkätundersökningen i stallet med islandshästar

<i>Ålder</i>	<i>Antal svar</i>	<i>Allergisk ofta</i>	<i>Allergisk ibland</i>	<i>Ej allergisk</i>	<i>Mer lindrig allergi vid vissa hästraser</i>	<i>Val av stall pga allergi</i>	<i>Andel allergiska (%)</i>
<10år	1	-	1	-	1	1	100
11-15år	1	-	-	1	-	-	0
16-20år	2	-	-	2	-	-	0
>21år	9	-	1	8	1	1	11,1
	13	-	2	11	2	2	

Tabell 5. Resultat från enkätundersökningen i stallet med basjkirhästar

<i>Ålder</i>	<i>Antal svar</i>	<i>Allergisk ofta</i>	<i>Allergisk ibland</i>	<i>Ej allergisk</i>	<i>Mer lindrig allergi vid vissa hästraser</i>	<i>Val av stall pga allergi</i>	<i>Andel allergiska (%)</i>
<10år	8	1	-	7	1	1	12,5
11-15år	8		3	5	2	3	37,5
16-20år	5	1	1	3	2	2	40,0
>21år	27	2	2	23	3	4	14,8
	48	4	6	38	8	10	

Tabell 6. Resultat från enkätundersökningen i stallet med varmblod

<i>Ålder</i>	<i>Antal svar</i>	<i>Allergisk ofta</i>	<i>Allergisk ibland</i>	<i>Ej allergisk</i>	<i>Mer lindrig allergi vid vissa hästraser</i>	<i>Val av stall pga allergi</i>	<i>Andel allergiska (%)</i>
<10år	4	-	-	4	-	-	0
11-15år	21	1	-	20	-	-	4,8
16-20år	9	-	-	9	-	-	0
>21år	16	1	1	14	-	-	12,5
	50	2	1	47			

Rapport från Arbets- och miljömedicin 5/2011

Allergivänliga hästar - Finns de?

Akademiska sjukhuset, Uppsala Universitet, 751 85 Uppsala, Tfn 018-611 36 42
www.ammuppsala.se