

## Eerste geval van raaigraskramp bij paarden in België

### *First confirmed case of ryegrass staggers in horses in Belgium*

H. Nollet, K. Vanschandevijl, L. Lefere, P. Deprez

Vakgroep Inwendige Ziekten en Klinische Biologie van de Grote Huisdieren,  
Faculteit diergeneeskunde, Universiteit Gent,  
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Heidi.Nollet@UGent.be

#### SAMENVATTING

**In deze casus wordt het eerste bevestigde geval van raaigraskramp bij paarden op een manege in België beschreven. Eind februari 2007 vertoonden een dertigtal paarden variabele neurologische symptomen, waaronder een schrikachtig gedrag, spierfasciculaties, hypermetrie en ataxie. Op basis van de klinische symptomen, de anamnese waaruit bleek dat ze sinds een aantal dagen geïmporteerd raaigrashooi uit Frankrijk kregen, en op basis van het aantonen van een hoog lolitremgehalte in het hooi kon de diagnose van raaigraskramp gesteld worden. Niettegenstaande de hoge morbiditeit is geen enkel dier gestorven: na het verwijderen van het raaigrashooi uit het rantsoen herstelden alle dieren in de loop van enkele dagen.**

#### SUMMARY

This paper describes the first confirmed case of ryegrass staggers in horses from a riding school in Belgium. During the last days of February 2007 about thirty horses showed variable neurological symptoms, such as anxiety, muscle fasciculations, hypermetria and ataxia. The diagnosis of ryegrass staggers was made based on the clinical symptoms, the anamnesis which stated that perennial ryegrass hay imported from France had been fed to the animals since a few days, and on the demonstration of a high lolitrem concentration in the hay. No horses died despite of the high morbidity: all horses recovered completely three days after withdrawal of the hay.

#### INLEIDING

Wanneer neurologische symptomen optreden bij meerdere paarden op hetzelfde bedrijf wordt in België vooral gedacht aan een uitbraak van de neurologische vorm van het equiene herpesvirus type 1. Hierbij zijn de symptomen matige koorts, een variërende graad van ataxie en parese tot decubitus. Vaak gaat de ataxie gepaard met cauda equinasymptomen, zoals blaas-, rectum-, anus- en staartparalyse.

Andere minder frequent voorkomende oorzaken bij uitbraken in een groep zijn van toxische aard, zoals overdoseringen bij de behandeling met chemotherapeutica (ontwormingsmiddelen, insecticiden,...), uitbraken van botulisme of de opname van mycotoxinen, waarbij fumonisine B1, slaframine en lolitrem B de belangrijkste zijn. Elk van de toxinen geeft een typisch ziektebeeld en wordt geproduceerd door respectievelijk *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia leguminicola* en *Neotyphodium lolii* die elk een specifiek gewas infecteren, met name respectievelijk maïs, rode en witte klaver en raaigras (*Lolium perenne*). Bij het paard veroorzaakt fumonisine B1 leuko-

encefalomalacie, een fatale, snel progressieve aandoening gekenmerkt door somnolentie en ataxie die na enkele dagen evolueert naar coma en sterfte. Bij het histopathologisch onderzoek worden doorgaans een liquefactie en necrose van de cerebrale witte stof gezien. Slaframine is de oorzaak van "slobbers". Bij deze aandoening speekselen paarden overvloedig en kunnen ze tranenvloed, koliek en diarree vertonen. De opname van het derde mycotoxine, lolitrem B, zorgt voor raaigraskramp of "rye grass staggers". In de onderhavige casus wordt een beschrijving gegeven van de typische symptomen, de evolutie en de diagnose van een intoxicatie van paarden met het mycotoxine lolitrem B.

#### CASUÏSTIEK

##### Anamnese en klinisch verloop

Begin februari 2007 werd de dienst Inwendige Ziekten van de Grote Huisdieren van de Faculteit Diergeneeskunde (Universiteit Gent) gecontacteerd voor een probleem van onverklaarbare spiertremoren

en ataxie bij een drietal paarden op een manege waar een zeventigtal paarden gehouden worden. Een afspraak werd gemaakt voor een bedrijfsbezoek de dag erna. Enkele uren na het telefonisch onderhoud echter werden er reeds een vijftigtal nieuwe paarden met vergelijkbare symptomen gesignaleerd. Bovendien verminderden de symptomen bij de eerste 3 aangetaste paarden niet en één paard ging zelfs regelmatig plat liggen en kon moeilijk opstaan. Sommige paarden zweetten erg. Geen enkel paard vertoonde koorts. Uit de anamnese van de manegehouder bleek ook dat een aantal aangetaste paarden al een paar dagen trager aten of hun eetbak slechts gedeeltelijk leeg aten. Volgens de dierenarts en manegehouder kwamen de paarden niet in contact met insecticiden of antiparasitaire middelen. De aangetaste paarden kregen naast hun gewone krachtvoeder sedert een drietal dagen nieuw aangevoerd raaigrashooi vanuit Frankrijk. Een opvallende observatie was dat een zestal paarden die apart gestald stonden en ander hooi kregen, geen enkel symptoom vertoonden. Aangezien de typische klinische symptomen optraden na het opnemen van het raaigrashooi werd een lolitremintoxicatie mogelijk geacht. Met het doel de darmassage te versnellen en de bijkomende opname van het toxine te beperken, diende de dierenarts alle aangetaste paarden medicinale kool en/of paraffineolie toe via een neusslokdarmsonde.

De dag na het verwijderen van het hooi werden geen nieuwe gevallen meer gesignaleerd. De aangetaste dieren waren volgens de dierenarts en manegehouder enigszins verbeterd. Twee paarden lagen nog volledig bezweet op de grond en konden zelfs na aansporen niet opstaan. Volgens de eigenaar stonden ze na een rustperiode af en toe nog wel spontaan op waarbij ze enorm trilden. De meeste dieren waren erg schrikachtig en hadden een spastische spiertonus. Veel paarden stonden licht wijdbeens. De spiertremoren kwamen voor over het volledige lichaam en varieerden qua intensiteit van uiterst mild tot schokkend. Paarden die normaal bij benaderen heel rustig waren, reageerden zeer schrikachtig; en vertoonden uitgesproken spiertremoren. Enkele licht aangetaste paarden werden uit hun stal gehaald en vertoonden een eerder stijve en lichte hypermetrische gang. De erg aangetaste dieren werden uit veiligheidsoverwegingen niet uit hun stal gehaald. Deze paarden stonden heel onstabiel in hun box en sommige steunden tegen een muur. De hart- en longauscultatie uitgevoerd bij enkele paarden was normaal. Bij het klinisch onderzoek van het hoofd schrokken sommige paarden op, doch er kon geen uitval van kopzenuwen aangetoond worden.

Twee dagen later (drie dagen na het stopzetten van de toediening van het hooi) waren alle dieren weer volledig normaal. De paarden werden nog twee weken op rust gezet en hervatten daarna hun werk opnieuw, zonder problemen.

### Bloedonderzoek

Een bloedonderzoek uitgevoerd door de bedrijfsdierenarts bij de eerste drie aangetaste paarden, direct na het ontstaan van de symptomen, toonde milde leukocytose bij 2 paarden (respectievelijk  $10,1 \times 10^9$

WBC/l en  $13,1 \times 10^9$  WBC/l). De drie paarden hadden milde hyperchloremie (respectievelijk 106, 102 en 104 mmol/l; normaal 90-100 mmol/l) en normale spierenzymen. Eén paard vertoonde een milde stijging van het alkalische fosfatase (427 U/l; normaal < 268 U/l).

Tijdens het bedrijfsbezoek werd enkel bloed van de twee meest aangetaste paarden genomen ter controle van de elektrolyten (natrium, kalium, ionair calcium) waarbij er bij één een milde hypokaliëmie vastgesteld werd (2,7 mmol/l; normaal 3,5-5,5 mmol/l).

### Diagnose

Gezien de klinische symptomen en gezien het feit dat er geen nieuwe gevallen meer waren bijgekomen na het verwijderen van het hooi, werd gedacht aan tremorogene mycotoxicosis (zoals lolitrem B).

Bij de inspectie van het hooi vond men geen macroscopisch schimmelgroei. Ook de dierenarts bevestigde dat het reeds gegeven hooi geen zichtbare schimmelgroei vertoonde.

Twee stalen van het hooi werden direct na de staalname opgestuurd naar de Universiteit van Utrecht voor analyse (afdeling Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie). Het eerste staal (staal 1) betrof een rest van het hooi dat de dag ervoor gegeven werd. Het tweede staal bestond uit meerdere deelmonsters van verschillende nog opgeslagen balen hooi. Er werd getracht om bij de bemonstering zoveel mogelijk lagen (oppervlakkig en diep) van het hooi te nemen. Alle deelmonsters werden uiteindelijk samengevoegd en vormden staal 2. De gehalten van lolitrem B bedroegen respectievelijk 5,9 mg/kg en 4,9 mg/kg in staal 1 en 2.

Op basis van de symptomen en het toxicologisch onderzoek werd dit geval gediagnosticeerd als een lolitrem B-intoxicatie.

### DISCUSSIE

De meeste uitbraken van "rye grass staggers" of raaigraskramp worden beschreven in Nieuw-Zeeland, Australië en het Verenigd Koninkrijk bij grazende paarden, runderen en voornamelijk schapen op weiden met hoofdzakelijk raaigras (*Lolium perenne*) gedurende het tweede deel van de zomer wanneer er weinig grasgroei is (Fletcher *et al.*, 1981; Galey *et al.*, 1991). Op het Europese continent werd raaigraskramp beschreven in Frankrijk (runderen) (Benkhelil *et al.*, 2004) en in Nederland (runderen, paarden) (Huyben en Sol, 1992; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan *et al.*, 1999; Holzhauer en Westerhout, 2004). De aandoening wordt veroorzaakt door een intoxicatie met het lolitremtoxine dat behoort tot de tremorinducerende ("tremorgenic") mycotoxinen. Dit zijn secundaire schimmelmetabolieten die een indolgroep bevatten, mogelijk afgeleid van tryptofaan, en die bij dieren na opname tremoren, spierfasciculaties, spastische krampen en bilaterale vestibulaire ataxie (wijdbeense stand, "swaying", instabiliteit, nystagmus en decubitus) veroorzaken.

Lolitrem B is de meest toxische vertegenwoordiger van de lolitremtoxinen (lolitrem A, B, C, D) (Osweiler, 2001) en wordt geproduceerd door een endophyt, namelijk *Neotyphodium lolii* (vroeger gekend

onder de naam *Acremonium lolii*). Een endofhyt is een endogene schimmel die in symbiose leeft met de plant en de plant helpt beschermen tegen droogte en insectenplagen. Bijgevolg kan ze niet met het blote oog gedetecteerd worden. *Neotyphodium lolii* heeft als gunstige eigenschap peramine te produceren, een alkaloid met een insectenwerend effect en een lage toxiciteit voor zoogdieren en wordt daarom moedwillig toegevoegd aan graszaden om de zaden en grasplanten te beschermen tegen insecten (Rowan en Gaynor, 1986). Bovendien wordt gezien dat raaigrasplanten besmet met *Neotyphodium lolii* minder oppervlakkige wortels vormen en hierdoor beter vochtbestendig zijn (Crush *et al.*, 2004). In stressomstandigheden, zoals droogte of overstroming, begint de endofhyt echter verschillende toxinen te produceren. De grootste concentratie van het toxine komt voor in de onderste delen van de plant, waardoor er meer kans op intoxicatie bestaat bij het grazen op overbezette weiden. In hooi wordt lolitrem B door de endofhyt voor of kort na het maaien van het gras gevormd. Een significante toename van het toxine tijdens de bewaring en opslag van het hooi treedt immers niet op.

Uitbraken van raaigraskrampen ontstaan meestal na de opname van vers gras op weilanden of na de opname van raaigrashooi (Galey *et al.*, 1991; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan *et al.*, 1999; Benkheilil *et al.*, 2004; Holzhauer en Westerhout, 2004). Symptomen werden eveneens gerapporteerd bij schapen na het eten van krachtvoederbrokken waar lolitrem bevattend zaad in verwerkt zat (Gallagher *et al.*, 1982).

Het werkingsmechanisme van lolitrem B is nog niet volledig doorgrond. Vermoedelijk werkt het via de aantasting van de GABA-receptoren in het centrale zenuwstelsel, waardoor chloride-influx geïnhibeerd wordt, de zenuwdepolarisatie langer aanhoudt en bijgevolg de zenuwcelmembranen gemakkelijker gestimuleerd worden waardoor tremoren ontstaan (Plumlee and Galey, 1994). Een ander of bijkomend mechanisme wordt voorgesteld door Dalziel *et al.* (2005). Ze toonden aan dat het lolitrem B de functie van humane spanningsgevoelige  $Ca^{2+}$ -afhankelijke kalium (BK) kanalen inhibeert. De inhibitie van die kanalen zou onder andere zorgen voor een verhoogde vrijstelling van excitatorische neurotransmitters, zoals glutamaat en aspartaat. Dit laatste fenomeen werd reeds in 1983 opgemerkt door Mantle ter hoogte van cerebrocorticale synaptosomen bij schapen met rye-grass staggers, maar kon toen niet verklaard worden. In meerdere studies is aangetoond dat voornamelijk de cerebellaire purkinjecellen aangetast worden door het toxine (Peterson *et al.*, 1977; Oz *et al.*, 1986; Dalziel *et al.*, 2005).

Slechts enkele uren tot dagen na de opname van gras of hooi met een lolitrem B-gehalte van minstens 0,8 mg/kg kunnen milde klinische symptomen optreden. Bij een concentratie boven 1,2 mg/kg kunnen duidelijke klinische symptomen (tremor, ataxie) verwacht worden (Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan *et al.*, 1999; Fink-Gremmels en Bull, 2000; Fink-Gremmels, persoonlijke mededeling). Bij de hogerbeschreven uitbraak werden gehalten van > 4,9 mg/kg in het bemonsterde hooi gemeten.

De oorzaak van de verminderde eetlust bij de paarden kan mogelijk verklaard worden door een veranderde maagdarmpmotiliteit tengevolge van het toxine.

Bij schapen werd immers aangetoond dat lolitrem B de intrinsieke activiteit stimuleert, doch de vagaal gemedieerde cyclische contracties van het reticulorumen inhibeert (McLeay *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003).

Een specifieke behandeling van de intoxicatie is niet voorhanden. De remissie van de klinische symptomen treedt relatief snel op na het verwijderen van de bron en het geven van ander voer. Sterfte treedt zelden op, behalve wanneer paarden die niet meer kunnen staan aan hun lot worden overgelaten. Bij de autopsie worden meestal geen afwijkingen gevonden. Enkel bij chronisch aangetaste dieren kan een verlies van purkinjecellen ter hoogte van het cerebellum gezien worden (Plumlee en Galey, 1994). In de hier besproken casus werd eveneens een spectaculaire verbetering waargenomen na het wegnemen van het hooi en er trad geen sterfte op.

Gecontamineerd hooi dient vernietigd te worden en mag zeker niet aan runderen of schapen gegeven worden. Tijdens de opslag van het hooi zou de lolitremconcentratie na verloop van tijd eventueel kunnen afnemen ten gevolge van een microbiële omzetting. Deze afbraak is wisselend en afhankelijk van de microbiële activiteit in het monster en de opslagomstandigheden (Fink-Gremmels, persoonlijke mededeling). Wanneer nog veel "besmet" hooi aanwezig is, kan het dus aangewezen zijn om na een aantal maanden het hooi te herbemonsteren. Wanneer het op een bepaald moment lolitremvrij zou zijn, kan het in principe nog vervoederd worden. Het feit dat het hooi in deze casus in de maand februari (vermoedelijk minstens een zestal maanden na het maaien) nog dergelijke hoge lolitremconcentraties bevat, doet echter vermoeden dat de microbiële omzetting in dit geval slechts heel traag of niet verlopen was.

In landen waar weiden voorkomen met endofhyt-besmette planten wordt een strategie toegepast om de klinische symptomen beperkt te houden door op de weiden bij te voeren zodat er minder van het besmette gras gegeten wordt. Ook overbegrazing moet vermeden worden aangezien de grootste hoeveelheid toxine voorkomt in de onderste delen van de plant (Meerdink, 2002). In dergelijke landen worden soms bepaalde adsorbantia voor mycotoxinen (zoals bepaalde gistcelwandextracten) aan het voeder toegevoegd (Raymond *et al.*, 2003).

## CONCLUSIE

Deze casuïstiek toont aan dat ook in ons land lolitremintoxicatie in de differentiaaldiagnose van neurologische aandoeningen bij paarden dient opgenomen te worden. De diagnose werd in eerste instantie gebaseerd op de opname van raaigrashooi, de klinische tekenen van hyperexcitabiliteit en ataxie, die erger werden na stimulatie, en het snelle en volledige herstel na het verwijderen van het raaigrashooi als voederbron. De vermoedelijke diagnose werd vervolgens bevestigd door het aantonen van het toxine in het hooi. De morbiditeit was hoog, doch geen enkel paard stierf.

## DANKBETUIGING

De dierenartsen G. De Wispelaere en K. Hanssens worden bedankt voor het aanbrengen van het patiëntenmateriaal.

## REFERENCES

- Benkhelil A., Grancher D., Giraud N., Bezille P., Bony S. (2004). Outbreak of an endophyte toxicosis in a herd of bulls for service. *Revue de médecine vétérinaire* 155, 243-247.
- Crush J.R., Popay A.J., Waller J. (2004). Effect of different *Neotyphodium* endophytes on root distribution of a perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivar. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 47, 345-349.
- Dalziel J.E., Finch S.C., Dunlop J. (2005). The fungal neurotoxin lolitrem B inhibits the function of human large conductance calcium-activated potassium channels. *Toxicology Letters* 155, 421-426.
- Fink-Gremmels J., Bull S. Prevalence of ryegrass staggers syndrome in horses in the Netherlands. In: 4th International *Neotyphodium/Grass* Interaction Symposium. Book of abstracts. Edited by V.H. Paul and P.D. Daprich. Soest, Germany. 2000; p.72.
- Fletcher L.R., Harvey I.C. (1981). An association of *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *New Zealand Veterinary Journal* 29, 185-186.
- Galey F.D., Tracy M.L., Craigmill A.L., Barr B.C., Markgard G., Peterson R., O'Connor M. (1991). Staggers induced by consumption of perennial ryegrass in cattle and sheep from northern California. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 199, 466-470.
- Gallagher R.T., Campbell A.G., Hawkes A.D., Holland P.T., McGraveston D.A., Pansier E.A., Harvey I.C. (1982). Ryegrass staggers: the presence of lolitrem neurotoxins in perennial ryegrass seed. *New Zealand Veterinary Journal* 30, 183-184.
- Holzhauser M., Westerhout A.C. (2004). Young perennial ryegrass staggers in a dairy herd. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 129, 298-300.
- Huyben M.W., Sol J. (1992). Threshed English ryegrass (*Lolium perenne*) as a cause of ryegrass 'staggers' in stabled heifers. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 117, 323-324.
- Mantle P.G. (1983). Amino acid neurotransmitter release from cerebrocortical synaptosomes of sheep with severe ryegrass staggers in New Zealand. *Research in Veterinary Science* 34, 373-375.
- McLeay L.M., Smith B.L., Munday-Finch S.C. (1999). Tremorgenic mycotoxins paxilline, penitrem and lolitrem B, the non-tremorgenic 31-epilolitre B and electromyographic activity of the reticulum and rumen of sheep. *Research in Veterinary Science* 66, 119-127.
- Meerdink G.L. (2002). Mycotoxins. *Clinical Techniques in Equine Practice* 1, 89-93.
- Osweiler G.D. (2001). Mycotoxins. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 17, 547-566.
- Oz H.H., Nicholson S.S., Al-Bagdadi F.K., Zeman D.H. (1986). Cerebellar disease in an adult cow. *Canadian Veterinary Journal* 27, 13-16.
- Peterson J.E., Jago M.V. (1977). Brain damage by extracts of parasitized annual ryegrass (*Lolium rigidum*) in nursing rats. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 55, 233-244.
- Plumlee K.H., Galey F.D. (1994). Neurotoxic mycotoxins: a review of fungal toxins that cause neurological disease in large animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 8, 49-54.
- Raymond S.L., Smith T.K., Swamy H.V.L.N. (2003). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and haematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Journal of Animal Science* 81, 2123-2130.
- Rowan D.D., Gaynor D.L. (1986). Isolation of feeding deterrents against Argentine stem weevil from ryegrass infected with *Acremonium lolii*. *Journal of Chemical Ecology* 12, 647-658.
- Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M., Schipper F.C.M., Goehring L.S., Fink-Gremmels, J. (1999). Neurologische verschijnselen bij paarden op een manege. Rhinopneumonie of mycotoxine-intoxicatie? *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 124, 679-681.
- Wang L., Cross A.L., Allen K.L., Smith B.L., McLeay L.M. (2003). Tremorgenic mycotoxins increase gastric smooth muscle activity of sheep reticulum and rumen in vitro. *Research in Veterinary Science* 74, 93-100.