



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Kopplingen mellan gräsbetessjuka och *Clostridium botulinum* typ C

Simon Holmberg

*Uppsala
2018*

Kopplingen mellan gräsbetessjuka och *Clostridium botulinum* typ C

The connection between equine grass sickness and *Clostridium botulinum* type C

Simon Holmberg

Handledare: *Bengt Guss, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF); Enheten för bakteriologi och livsmedelssäkerhet*

Examinator: *Maria Löfgren, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF); Enheten för patologi*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2018:36

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Gräsbetessjuka, häst, *Clostridium botulinum*, botulism, etiologi

Key words: Equine grass sickness, equine dysautonomia, horse, *Clostridium botulinum*, botulism, etiology

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Allmänt om gräsbetessjuka	3
Allmänt om <i>Clostridium botulinum</i>	4
<i>Clostridium botulinum</i> typ C som etiologiskt agens till gräsbetessjuka	4
Övriga föreslagna etiologiska agens till gräsbetessjuka.....	7
Diskussion	8
Litteraturförteckning	11

SAMMANFATTNING

Gräsbetessjuka är en allvarlig polyneuropatisk sjukdom vilken kan drabba betande hästar. Den ger upphov till neurodegeneration av framför allt det enteriska och autonoma nervsystemet vilket speglas kliniskt av bland annat ileus, dysfagi, anorexi och takykardi. I de flesta fall har gräsbetessjuka dödlig utgång förutom i vissa kroniska fall av sjukdomen där efter understödjande behandling ett tillfrisknande kan ske. Utbrotten sker främst på våren och på beten där fall förekommit tidigare.

Sjukdomen beskrevs första gången 1909 och många olika bidragande agens har under åren föreslagits, bland annat insekter, bakterier, svampar och växter. Denna litteraturstudies syfte är att studera forskning angående uppkomst av gräsbetessjuka med fokus på bakterien *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) typ C:s potentiella inverkan. Detta på grund av att resultaten från flera forskningsrapporter under senare år indikerat att *C. botulinum* typ C kan vara orsakande agens till gräsbetessjuka.

Flera studier har jämfört antikropps nivåer mellan drabbade och icke drabbade hästar. Resultaten visade att låga nivåer av specifika systemiska IgG-antikroppar mot ytantigen från *C. botulinum* typ C och dess toxin (BoNT/C) är förknippat med gräsbetessjuka. Dock när specifika IgA-antikroppar mot nämnda antigen från tunntarmens slemhinna studerades hade istället hästar drabbade av gräsbetessjuka högre nivåer antikroppar mot BoNT/C. En större förekomst av klostridier och anaeroba bakterier hos gräsbetessjuka hästar har även setts. Bland gräsbetessjuka hästar isolerades hos cirka hälften av hästarna BoNT/C i en studie.

Clostridium botulinum orsakar även sjukdomen botulism. Botulism ger dock en helt annan histopatologisk bild jämfört med gräsbetessjuka. Vissa av symptomen stämmer överens, men flera symptom skiljer sig åt i de olika sjukdomarna. Den geografiska utbredningen skiljer sig också åt en del då Storbritannien, vilket är drabbad hårdast av gräsbetessjuka, har förhållandevis relativt få fall av botulism hos häst.

Trots att flera studier har visat att *C. botulinum* typ C kan vara involverad i uppkomsten av gräsbetessjuka har det inte lyckats fastslås att bakterien är det sjukdomsframkallande agens vilket länge söks efter. Det är förbryllande att sedan sjukdomen först beskrevs över hundra år sedan, har det än idag, trots all forskning som bedrivits, inte bekräftats vilket agens det är som orsakar gräsbetessjuka. Orsaken till detta kan vara att gräsbetessjuka beror på flera faktorer vilket gör att den är komplex att studera. Detta manar till att mer forskning krävs för att få ökad kunskap om dess uppkomst och förhoppningsvis kan det leda till nya metoder för att behandla och förebygga sjukdomen.

SUMMARY

Equine grass sickness or equine dysautonomia is a serious polyneuropathy affecting grazing horses. It is characterized by degenerative neurons affecting mostly the enteric and autonomic nervous system. Typical symptoms are for example ileus, dysphagia, anorexia and tachycardia. In most cases the disease is fatal although some chronic cases have survived and recovered following intensive care. Outbreaks of the disease is most seen during spring and on pastures where horses have been affected before.

Equine grass sickness was first described 1909 and many different contributing agents have been proposed throughout the years *e.g.* insects, bacteria, fungi and plants. The purpose of this literature review was to study research involving the etiology behind equine grass sickness. The focus was on the hypothesis that *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) type C is an etiological agent. This because of the intensive research that have taken place on this topic lately.

Several studies have concluded that low levels of specific systemic IgG-antibodies in horses against surface antigen from *C. botulinum* type C and botulinum neurotoxin type C (BoNT/C) are associated with equine grass sickness. However, another study compared specific IgA-antibodies against said antigens from the mucosa of the small intestine and its results instead indicated that higher levels of IgA-antibodies against BoNT/C are associated with the disease.

Other studies have shown that *Clostridium* species and anaerobic bacteria in general appear more frequently in affected horses. One study isolated BoNT/C from approximately half of the horses with equine grass sickness.

Clostridium botulinum is also the bacteria responsible for botulism. The histopathology of that disease is completely different that of equine grass sickness and though some of the symptoms cohere many are still specific for each disease. The geographic distribution of the diseases differs too, *e.g.* Great Britain is the country were equine grass sickness most often occur, but the frequency of botulism is low in comparison.

Even though a lot of research have been performed regarding etiological agents causing equine grass sickness, there is still, after one hundred years, no definite answer. The reasons for this might be that the disease depends on several factors like environment, feed and various microorganisms making it a complex scenario for investigations. Therefor more research is needed before hopefully efficient prevention and treatment are possible.

INLEDNING

Gräsbetessjuka är en neurologisk sjukdom som främst drabbar betande hästar (Pirie *et al.*, 2014). Den beskrevs första gången 1909 i Skottland (Newton *et al.*, 2010) och i Sverige 1919 (SVA, 2017) och har orsakat många sjukdomsfall under åren, de flesta med fatal utgång (Pirie *et al.*, 2014). I Storbritannien, vilket är värst drabbat, uppskattas att cirka 150 hästar per år insjuknar (Wylie & Proudman, 2009). Många olika etiologiska agens har föreslagits, men ännu har inget helt kopplats till sjukdomen. Under senare år har flera forskningsrapporter där det undersökts huruvida *Clostridium botulinum* typ C kan vara orsaken publicerats. *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) är även den bakterie som orsakar botulism och det finns effektiva vaccin mot detta (SVA, 2016). Därför skulle ett eventuellt bekräftande av kopplingen mellan bakterien och gräsbetessjuka kunna ha stora konsekvenser för att förebygga och eventuellt behandla sjuka hästar.

Syftet med denna litteraturstudie är att studera forskning som bedrivits med hänsyn till uppkomst av gräsbetessjuka. Huvudfokus kommer vara på *C. botulinum* typ C:s eventuella inverkan på sjukdomsuppkomsten.

MATERIAL OCH METODER

I litteraturstudien användes databaserna Pubmed och Web of Science för att hitta vetenskapliga artiklar. De använda sökorden var horse*, equine, *Clostridium botulinum*, botulism och "equine grass sickness" i olika kombinationer. Artiklarna har sedan använts för att få en förståelse om *C. botulinum* typ C kan vara möjligt orsakande agens till gräsbetessjuka.

LITTERATURÖVERSIKT

Allmänt om gräsbetessjuka

Gräsbetessjuka är en polyneuropatisk sjukdom och drabbar främst betande hästar. Den karakteriseras av neurodegeneration i framför allt det enteriska (ENS) och autonoma nervsystemet (ANS) (McGorum & Pirie, 2018). Störst neurodegeneration ses i ileumregionen (Cottrell *et al.*, 1999). Sjukdomen brukar även delas in i tre olika typer med olika sjukdomsförlopp: akut (1–2 dygn), subakut (2–7 dygn) och kronisk (över 7 dygn) (Pirie *et al.*, 2014). Den akuta och subakuta formen är fatal (McGorum & Pirie, 2018), men av den kroniska formen är tillfrisknande möjligt i vissa fall med hjälp av understödjande behandling (Wylie & Proudman, 2009). Beroende på form varierar också ofta graden av symptom. Kliniskt kännetecknas sjukdomen av dysfunktion av ENS och ANS där takykardi, dysfagi, anorexi och nedsatt allmäntillstånd är vanliga symptom. Även fläckvis svettning, ofrivilliga muskelkontraktioner och ptos kan ofta ses (Pirie *et al.*, 2014). Akut sjuka hästar har ofta ileus (Wylie & Proudman, 2009) med ökad salivering och stora mängder nasogastriskt reflux (Pirie *et al.*, 2014). Kroniskt drabbade hästar har ofta rhinitis sicca (McGorum & Pirie, 2018) och

visar stor viktnedgång med indragen buk, vilket Wylie och Proudman (2009) beskriver liknandes en ”getingmidja”. Tecken på buksmärtor är dock ofta låga eller frånvarande (McGorum & Pirie, 2018). Histopatologiskt ses neurodegeneration med exempelvis pyknotiska kärnor, minskad eller avsaknad av nissl-substans, neuronsvullnad och eosinofila intracytoplasmatiska inklusionskroppar (McGorum *et al.*, 2016).

Gräsbetessjuka tycks vara säsongsbetonat, en fall-kontrollstudie kom fram till att flest fall av gräsbetessjuka i Storbritannien sker under perioden april till juni (Wood *et al.*, 1998). Risken är även större att hästar drabbas på beten där det tidigare förekommit fall (Wood *et al.*, 1998) och där det är ler- eller sandjord (Newton *et al.*, 2004). En annan undersökning visade att fall oftare inträffar efter en period av torrt och kallt väder (Doxey *et al.*, 1991).

Allmänt om *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum är en sporbildande grampositiv anaerob bakterie och dess naturliga habitat är i jorden (Galey, 2001). Bakterien kan producera potenta neurotoxiner (BoNT) och det finns flera serotyper av BoNT beskrivna: A, B, C, D, E, F och G (Peck *et al.*, 2017). En åttonde serotyp beskrevs av Barash och Arnon 2013 vilken gavs namnet typ H (Barash & Arnon, 2014). Av dessa finns typ A, B och C beskrivna på häst (Whitlock & McAdams, 2006) varav endast typ B har fastställts hos häst i Sverige (SVA, 2016). BoNT är ett protein (Galey, 2001) bestående av två delar och kan verka genom att den ena delen binder till en specifik presynaptisk receptor vid motorändplattan och BoNT transporteras sedan in i neuronet via endocytos (Coffield & Whelchel, 2012). Här frigörs den andra delen och klyver SNARE-proteiner (Coffield & Whelchel, 2012). Beroende på vilken typ av toxin klyvs olika SNARE-proteiner (syntaxin, synaptobrevin (VAMP), eller synaptosomal-associated protein-25) vid olika klyvningsställen (Peck *et al.*, 2017). SNARE-proteinerna har som funktion att möjliggöra fusion av acetylkolinvesiklar med cellmembranet och vid inhibering hindras frisättning (Coffield & Whelchel, 2012) och en paralytisk uppträder (Stratford *et al.*, 2014). Symptom kan vara generell muskelsvaghet, ileus, dysfagi, mydriasis, ofrivilliga muskelrörelser och andnöd (Stratford *et al.*, 2014). Förebyggande behandling finns genom effektivt vaccin. Anti-toxin finns även tillgängligt för behandling av pågående sjukdom, dock inte i Sverige (SVA, 2016).

Botulism kan uppstå på tre olika sätt. Den klassiska, där hästarna blir sjuka av att få i sig preformerat toxin, sker vanligtvis via kontaminerat foder och ses främst hos vuxna hästar. Toxikoinfektion, där sporer koloniserar tarmen, blir vegetativa och producerar toxin, ses framför allt hos föl, vilket ger upphov till ett syndrom kallat ”shaker foals” på grund av muskeltremor. Sårbotulism uppstår när sporer hamnar i anaeroba sår varpå bakterien tillväxer med efterföljande toxinproduktion (Stratford *et al.*, 2014).

***Clostridium botulinum* typ C som etiologiskt agens till gräsbetessjuka**

Clostridium botulinum som etiologiskt agens till gräsbetessjuka föreslogs redan i början av 1900-talet (Hedderston & Newton, 2004). En bakterie liknandes *C. botulinum* isolerades från

olika fall och symptom av gräsbetessjuka påminde om botulism. En vaccinationsstudie genomfördes därefter av Tocher *et al.*, där över 2000 hästar ingick. Hälften vaccinerades med botulinumvaccin och andra hälften agerade kontrollgrupp. Resultatet visade en signifikant minskning i mortalitet av gräsbetessjuka bland de vaccinerade hästarna under åren studien pågick (Hedderson & Newton, 2004).

En större fall-kontrollstudie genomfördes av McCarthy *et al.* (2004) bland annat i syfte att kontrollera om ett lågt antal IgG-antikroppar mot ytantigen från *C. botulinum* typ C och dess toxin är förknippat med gräsbetessjuka. Endast hästar med kliniska symptom, vilka bekräftats histologiskt, fick ingå i studien. Kontrollgruppen försökte matcha fallen i största möjliga mån, exempelvis genom att använda hästar från samma beten. Totalt ingick 66 fall av gräsbetessjuka och 132 kontrollhästar i studien. Ett frågeformulär delades ut till djurhållarna med frågor om exempelvis ålder, typ av foder, kön, tidigare sjukdomar etc. Träck insamlades för äggräkning av blodmaskar och blodprov togs också för serologiska tester. Resultaten tydde på att ökade antikropps nivåer mot ytantigen från *C. botulinum* typ C och dess toxin minskade risken att drabbas av gräsbetessjuka. Även ökade nivåer av antikroppar mot ytantigen från *Clostridium novyi* typ A tycktes ha en skyddande effekt. Ytantigen från *C. novyi* typ A kan representera *C. botulinum* typ C då de liknar varandra fenotypiskt. Ett icke-linjärt samband för ålder påvisades där störst risk att insjukna var vid fyra till fem års ålder för att sedan avta med stigande ålder. Foder såsom hö och hösilage verkar vara en skyddande faktor och byte av foder (mängd eller typ) upp till 14 dagar innan kliniska symptom verkar kunna öka risken för gräsbetessjuka (McCarthy *et al.*, 2004).

En tidigare studie av Hunter och Poxton (2001) undersökte också om det är skillnad i antal systemiska IgG-antikroppar mot BoNT/C och ytantigen från *C. botulinum* typ C mellan olika grupper. Grupperna var följande: hästar med kronisk gräsbetessjuka, hästar med subakut gräsbetessjuka, hästar med akut gräsbetessjuka, hästar vilka haft någon form av kontakt med ett fall av gräsbetessjuka samt hästar vilka gått på beten där gräsbetessjuka förekommit frekvent tidigare. Kontrollgruppen bestod av hästar inte drabbade av gräsbetessjuka. Blodprov togs från samtliga hästar och serologitestades mot BoNT/C och ytantigen från *C. novyi* typ A. *Clostridium novyi* användes då den är säkrare att arbeta med jämfört med *C. botulinum* och deras ytantigen är också immunologiskt korsreaktiva. Resultatet visade att gräsbetessjuka hästar hade signifikant lägre nivåer IgG-antikroppar mot BoNT/C och ytantigen från *C. novyi* typ A jämfört med dem som inte hade sjukdomen. Detsamma gällde även om de gräsbetessjuka hästarna endast jämfördes mot de hästar vilka befunnit sig på grässjukedrabade beten och de hästar som varit i kontakt med gräsbetessjuka hästar. Mellan de olika typerna av gräsbetessjuka sågs inga signifikanta skillnader och inte heller mellan gräsbetessjuka och kontrollgruppen, även om de gräsbetessjuka hade ett lägre medelvärde (Hunter & Poxton, 2001).

I samma studie togs det hos 14 av hästarna med kronisk gräsbetessjuka flera blodprov i syftet att kontrollera antikroppsvariet över tid. Hos tio av de 14 hästarna steg antikropps nivåerna mot både ytantigen och BoNT/C i minst ett av proven. Mot endast ytantigen steg det hos tre av

hästarna och mot endast BoNT/C i en häst. Dock var denna stigning väldigt låg i vissa fall. Under sjukdomsförloppet kunde antikropps nivåerna fluktueras och fluktuationerna följde inte alltid varandra mellan antikropparna mot BoNT/C och ytantigen. Att antikropps nivåerna ökade behövde inte betyda ett tillfrisknande. Slutligen jämfördes även antikropps nivåerna hos tillfrisknade hästar från kronisk gräsbetessjuka och hos hästar vilka avlivades. Inga signifikanta skillnader påvisades vare sig i början eller i slutet av sjukdomsförloppet (avlivning eller tillfrisknande) (Hunter & Poxton, 2001).

Nunn *et al.* (2007a) jämförde i en annan undersökning nivåer av IgG-antikroppar i sera mot ytantigen från *C. botulinum* typ C och mot BoNT/C och BoNT/D mellan överlevande och avlivade hästar med kronisk gräsbetessjuka. Totalt ingick 12 hästar i studien och blodprov togs från samtliga och analyserades med avseende på IgG-antikroppar. Resultatet visade att de överlevande hästarna hade signifikant högre nivåer av specifika IgG-antikroppar mot ytantigenen jämfört med gruppen med de avlivade hästarna. De överlevande hästarna visade även tendenser att ha högre nivåer IgG-antikroppar mot BoNT/C, men inga statistiskt signifikanta skillnader kunde dras. Mot BoNT/D sågs inga statistiska skillnader mellan grupperna (Nunn *et al.*, 2007a).

Samma forskargrupp undersökte också nivåer av IgA-antikroppar i tunntarmens slemhinna mot BoNT/C, BoNT/D och ytantigen från *C. botulinum* typ C hos hästar drabbade av akut gräsbetessjuka. Prover av duodenum, jejunum och ileum från totalt 12 hästar, avlivade på grund av akut gräsbetessjuka, användes. Kontroller var fyra hästar, avlivade av andra orsaker än gastrointestinala problem. Antikroppar extraherades från vävnadsproverna och genom ELISA påvisades både det totala antalet IgA-antikroppar och antal specifika IgA-antikroppar mot de antigen listade ovan. IgA-antikroppar hittades i alla vävnader och flest fanns i jejunumproverna, men ingen statistisk skillnad kunde påvisas mellan fallen och kontrollerna i det totala antalet. Störst skillnad var det dock mellan antal specifika IgA-antikroppar mot BoNT/C och BoNT/D där det i kontrollerna var endast över detekterbar gräns medan fallproven generellt visade högre nivåer. Statistisk signifikant skillnad påvisades dock endast i ileum- och jejunumproverna för BoNT/C och för BoNT/D i jejunum- och duodenumproverna. Att inte statistisk signifikans uppnåddes för resterande prov kan enligt författarna bero på det låga antal fall och kontroller som ingick i studien vilket påverkade beräkningen. I specifika antal IgA-antikroppar mot ytantigen från *C. botulinum* typ C nåddes endast statistisk signifikans i duodenumproverna (Nunn *et al.*, 2007b).

I de tidigare nämnda studierna studerades antikroppar, men Hunter *et al.* (1999) fokuserade istället på att påträffa *C. botulinum* typ C i gräsbetessjuka hästar. De analyserade tarminnehåll från ileum samt träck efter BoNT/C för att indirekt påvisa förekomst av *C. botulinum* typ C. Hos de gräsbetessjuka hästarna förekom BoNT/C i 13/29 ileumprover (45 %) och i 20/45 träckprover (44 %). Bland kontrollerna låg förekomsten på 1/28 ileumprover (4 %) och 3/77 träckprover (4 %). Värt att notera var att den positiva individen bland kontrollerna för

tarminnehåll hade haft kliniska symptom för akut gräsbetessjuka, men det hade inte gått att fastställa histopatologiskt. Författarna föreslog utifrån sina resultat att gräsbetessjuka är en toxikoinfektion med *C. botulinum* typ C med toxinproduktion och toxinabsorption framför allt i ileum (Hunter *et al.*, 1999).

När tarmfloran jämfördes mellan hästar med frisk tarmkanal och hästar med gräsbetessjuka genom träckprover och prov på tarminnehåll från ileum isolerades totalt 14 stycken olika klostridiearter från de gräsbetessjuka hästarna, men endast en art kunde isoleras från kontrollgruppen. Även en signifikant ökning av totalantal anaerober påvisades mellan gräsbetessjuka hästar och den friska kontrollgruppen (Garrett *et al.*, 2002).

Eftersom gräsbetessjuka orsakar neurodegeneration av det enteriska och autonoma nervsystemet undersökte McGorum *et al.* (2016) histologiprov från sex hästar med gräsbetessjuka och från fem hästar med botulism. En kontrollgrupp på sex hästar ingick i studien. Proven var tagna från cervikala ganglion och ileum. Jämförelsen genomfördes först med ljusmikroskopi. Sedan användes immunohistokemi för att jämföra uttrycket av tre olika SNARE-proteiner (syntaxin, synaptobrevin och synaptosomal-associated protein-25). Till sist jämfördes koncentrationen av SNARE-proteinerna i de cervikala ganglionen mellan gräsbetesfallen och kontrollgruppen. Olyckligtvis var inte detta möjligt i botulismfallen. Från resultaten av ljusmikroskopiundersökningen framgick att den typiska histologiska bilden av neurodegeneration kunde ses endast i fallen med gräsbetessjuka och inte i botulismfallen. I resultatet från immunohistokemin gick det inte att särskilja mellan botulismproven och kontrollproverna. I prover från gräsbetessjuka varierade uttrycket och fördelningen av SNARE-proteiner, men var högre jämfört med övriga prov. Koncentrationen av SNARE-proteiner var signifikant högre för syntaxin och synaptobrevin i proven från gräsbetessjuka jämfört med kontrollerna. För synaptosomal-associated protein-25 nåddes inte gränsen för statistisk signifikans (McGorum *et al.*, 2016).

Övriga föreslagna etiologiska agens till gräsbetessjuka

Genom åren har flertalet andra agens föreslagits vara delaktiga i uppkomsten av gräsbetessjuka såsom insekter, svampar, virus, olika bakterier, växter och brist på mineraler och vitaminer (Hedderson & Newton, 2004). Till exempel genom att analysera träck och innehåll från ileum med hjälp av ELISA och selektivt odlingsmedium fick Wagget *et al.* (2010) resultatet att prevalensen av *Clostridium perfringens* var signifikant högre i träck hos gräsbetessjuka hästar jämfört med friska betande hästar. Prevalensen var också nästan statistiskt signifikant högre i tarminnehåll från ileum hos de gräsbetessjuka jämfört med hästar vilka inte led av en gastrointestinal sjukdom (Waggett *et al.*, 2010).

Ett flertal studier har gjorts för att testa om mykotoxiner kan vara etiologiskt agens för gräsbetessjuka enligt litteraturstudien av Pirie *et al.*, (2014). Författarna nämner att en ökning

av *Fusarium spp.* setts på beten förknippade med gräsbetessjuka och när nervceller utsattes för ett extrakt av *Fusarium in vitro* sågs toxiska effekter (Pirie *et al.*, 2014).

Även olika växttoxiner har diskuterats. McGorum *et al.*, (2012) tog prov på vitklöver från fält inom 96 timmar efter att hästar drabbats av akut gräsbetessjuka. Bland annat sågs signifikant högre koncentrationer av två cyanogena glykosider jämfört med kontroller. Forskarna bedömer dock att det är osannolikt att hästarna kommer upp i akuta toxiska nivåer endast genom betning. De spekulerar i att det eventuellt kan underlätta för en bakteriell överväxt i och med att cyanid kan orsaka gastrointestinal stas och verka som en mikrobicid (McGorum *et al.*, 2012). En annan studie där det undersöktes aminosyrenivåer i plasma hade gräsbetessjuka hästar en liknande profil med individer drabbade av kronisk/subakut cyanidförgiftning (McGorum & Kirk, 2001).

I en studie av McGorum *et al.* (2000) insamlades växter från fält inom 72 h efter att en häst drabbats av gräsbetessjuka. Efter analys av materialet sågs flera förändringar, bland annat ökade nivåer av fruktos, minskad antioxidantaktivitet samt ökad prooxidantaktivitet. Detta tydde enligt författarna på att växterna var utsatta för oxidativ stress, exempelvis på grund av torka, kyla och svampangrepp. Dessa förändringar sågs dock inte när forskarna experimentellt utsatte växter för kyla och torka. Författarna föreslog utifrån detta flera teorier; antingen producerar växterna själva neurotoxin under stress eller att växternas förändrade antioxidant- och prooxidantaktivitet ändrar miljön i tarmen och underlättar överväxt av en neurotoxinproducerande bakterie. Stressen kan även ha orsakats av ett annat agens, exempelvis en neurotoxinproducerande svamp (McGorum *et al.*, 2000).

DISKUSSION

Då gräsbetessjuka nästan uteslutande drabbar betande hästar (McGorum & Pirie, 2018) och det tycks följa en säsongsvariation (Wood *et al.*, 1998) med en påverkan av rådande väderlek (Doxey *et al.*, 1991) finns det starka argument pekandes på att etiologin bakom gräsbetessjuka är något som finns på beten med förmåga att producera neurotoxin under rätta förhållanden. Att även tidigare drabbade beten (Wood *et al.*, 1998) och olika typer av jordar drabbas oftare (Newton *et al.*, 2004) stärker denna hypotes.

Flertalet studier har bedrivits om *C. botulinum* typ C kan vara inblandat i utvecklandet av gräsbetessjuka och många har fokuserat på att jämföra antikropps nivåer (Nunn *et al.*, 2007a; Nunn *et al.*, 2007b; McCarthy *et al.*, 2004; Hunter & Poxton, 2001). Gemensamt för dessa är att alla tyder på att ett samband mellan *C. botulinum* typ C och gräsbetessjuka verkar finnas. Signifikanta statistiska skillnader kunde ses mellan systemiska IgG-antikropps nivåer mot ytantigen (Nunn *et al.*, 2007a; McCarthy *et al.*, 2004; Hunter & Poxton, 2001) och mot BoNT/C (McCarthy *et al.*, 2004; Hunter & Poxton, 2001).

Att Nunn *et al.*, (2007b) kom fram till att hästar med gräsbetessjuka hade högre nivåer av IgA-antikroppar mot BoNT/C i tunntarmsslemhinnan jämfört med kontroller kan då verka motsägelsefullt. Författarna av studien försökte motivera det med att IgA-antikroppar i

slemhinnan mer representerar nuvarande exponering jämfört med systemiska antikroppar vilka enligt dem mer motsvarar tidigare exponering samt att antikropps nivåerna inte hunnit komma upp i skyddande nivåer innan sjukdomen brutit ut.

Problemet med antikroppsbestämningar är att det endast innebär att individen har utsatts för bakterien och toxinet, men det behöver inte betyda att det är det som har orsakat sjukdomen. Det svarar inte heller på när individen blev utsatt för bakterien och toxinet. Studien av Hunter och Poxton (2001) vilken undersökte hur antikropps nivåerna varierar över tid hos kroniska gräsbetessjuka hästar kunde inte heller visa att antikropps nivåerna var avgörande för ett tillfrisknande. Andelen antikroppar kunde också fluktuera mycket under sjukdomsförloppet (Hunter & Poxton, 2001). Nunn *et al.* (2007a) kom dock fram till att kroniskt gräsbetessjuka hästar vilka överlevt hade högre nivåer IgG-antikroppar mot ytantigen från *C. botulinum* typ C jämfört med de hästar vilka var tvungna att avlivas. Att inga signifikanta skillnader mellan de olika typer av gräsbetessjuka påvisades i studien av Hunter och Poxton (2001) kan betyda att antal antikroppar inte är helt avgörande för vilken typ av sjukdomen som uppstår.

Studier har dock även genomförts för att kontrollera om potentiellt orsakande agens finns tillgängligt under sjukdomsförloppet. Hos ungefär hälften av hästarna med gräsbetessjuka påvisades BoNT/C (Hunter *et al.*, 1999) och även en ökning av klostridiearter och totalantal anaerober har rapporterats (Garrett *et al.*, 2002). Om *C. botulinum* typ C skulle vara etiologiskt agens är det kanske mer förväntat att hitta BoNT/C i mer fall än bara cirka hälften, men Hunter *et al.* (1999) poängterar att den använda metoden (ELISA) inte är den känsligaste. BoNT/C kan även hunnit absorberats från tarmen eller neutraliserats av antikroppar eller av proteaser innan provtagning (Hunter *et al.*, 1999). Det är även ett extremt potent toxin och hästar är bland de känsligaste djuren för just BoNT (Galey, 2001). Risken finns att det förekommit falska negativa prov bland fallen med gräsbetessjuka (Hunter *et al.*, 1999).

Fall-kontroll studien av McCarthy *et al.*, (2004) visade även den på ett samband mellan *C. botulinum* typ C och gräsbetessjuka. Ett annat intressant resultat var att byte av foder tydde på ökad risk för uppkomst av sjukdomen. Foderbyte förändrar eventuellt miljön i tarmen så att tillväxt av *C. botulinum* typ C gynnas. Hö och hösilage verkade istället ha en skyddande effekt (McCarthy *et al.*, 2004) vilket kan tyda på att det handlar just om en toxikoinfektion vilket Hunter *et al.* (1999) föreslagit och inte klassisk botulism då det främst är associerat med just felaktigt konserverat foder (Whitlock & McAdams, 2006).

Om *C. botulinum* typ C är etiologiskt agens stämmer dessa resultat väl överens med beten bestående av ler- och sandjord är mer drabbade enligt Newton *et al.* (2004). *Clostridium botulinum* är en bakterie befinnandes i jorden och i sådana beten är det större risk att jorden rörs runt och gräset kontamineras av bakterien jämfört med andra mer kompakta jordarter.

Mycket forskning har bedrivits om *C. botulinum* typ C kan vara orsakande agens till gräsbetessjuka. Även om mycket tyder på ett samband finns det faktorer talandes emot och inte

går att bortse ifrån. Många av symptomen stämmer överens, exempelvis dysfagi, ofrivilliga muskelkontraktioner och ileus kan ses hos både botulism och gräsbetessjuka (Stratford *et al.*, 2014; Wylie & Proudman, 2009) medan symptom såsom mydriasis och generell muskelsvaghet endast ses i botulism (Wylie & Proudman, 2009).

Den histologiska bilden stämmer inte heller överens, vilket bekräftades av McGorum *et al.* (2016) då det vid botulism inte ses den typiska neurodegenerationen med avsaknad av nisslsubstans och pyknotiska kärnor. Wylie och Proudman (2009) skriver även i sin litteraturstudie att i USA isoleras ofta *C. botulinum* typ C från jorden, men de flesta fall av botulism sker av typ A och B. Storbritannien är hårdast drabbat av gräsbetessjuka, men antal fall av botulism är förhållandevis lågt.

Högst risk att drabbas av gräsbetessjuka var enligt studien av McCarthy *et al.* (2004) mellan fyra till fem års ålder och enligt litteraturstudien av Pirie *et al.* (2014) mellan två till sju års ålder. Detta är lite motsägelsefullt gentemot toxikoinfektion av *C. botulinum* då det främst drabbar föl (Stratford *et al.*, 2014). Enligt Wylie och Proudman (2009) finns heller inga fall av toxikoinfektion av *C. botulinum* beskrivna i Storbritannien förutom ett föl uppvisandes klinikopatologiska fynd av både botulism och gräsbetessjuka.

De andra studierna vilka pekar på andra agens, exempelvis vitklöver (McGorum *et al.*, 2012) och olika mykotoxiner (Pirie *et al.*, 2014) måste även tas i beaktning innan ett fullständigt bekräftande av etiologin kan ske. Att flera olika faktorer verka kunna spela in kan tyda på att etiologin är multifaktoriell.

Det är också svårt att avgöra om gräsbetessjuka orsakas av en eventuell toxikoinfektion av *C. botulinum* typ C eller att den dysfunktion av tarmsystemet som uppstår generellt underlättar för en bakteriell överväxt och toxikoinfektionen då är sekundär. Större förekomst av *C. perfringens* (Waggett *et al.*, 2010) och andra typer av klostridier samt totalantal anaerober har påvisats hos gräsbetessjuka hästar (Garrett *et al.*, 2002).

Ett vaccinförsök liknandes det Tocher *et al.* genomförde för närmare hundra år sedan (Hedderson & Newton, 2004) pågår i Storbritannien där över 1000 hästar deltar. Hästarna delas slumpmässigt in i två grupper där den ena gruppen vaccineras med inaktiverat BoNT/C och den andra med en inaktiv placebo. Incidens av gräsbetessjuka jämförs sedan mellan de olika grupperna (Ireland, 2014). När sedan studiens forskningsresultat publiceras kommer det förhoppningsvis ge en indikation hur en framtida förebyggande behandling kan utföras.

Avslutningsvis finns det mycket som tyder på att *C. botulinum* typ C är involverat i uppkomsten av gräsbetessjuka hos häst, men det finns ändå fakta som motsäger detta. Andra agens har föreslagits och även multifaktoriella etiologier är en möjlighet vilket kan vara orsaken till att etiologin är komplex att studera. Trots att det är över hundra år sedan det första fallet beskrevs finns ännu inget bekräftat agens och det kommer krävas vidare forskning för att få fram svar för att i framtiden eventuellt kunna behandla och förebygga sjukdom.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Barash, J.R. & Arnon, S.S. (2014). A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis*, 209(2): 183-191.
- Coffield, J.A. & Whelchel, D.D. (2012). Botulinum neurotoxins. I: Gupta, R.C. (red), *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, 2nd Edition. San Diego: Elsevier Academic Press Inc., 937-949.
- Cottrell, D.F., McGorum, B.C. & Pearson, G.T. (1999). The neurology and enterology of equine grass sickness: a review of basic mechanisms. *Neurogastroenterol Motil*, 11(2): 79-92.
- Doxey, D.L., Gilmour, J.S. & Milne, E.M. (1991). The relationship between meteorological features and equine grass sickness (dysautonomia). *Equine Vet J*, 23(5): 370-373.
- Galey, F.D. (2001). Botulism in the horse. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 17(3): 579-588.
- Garrett, L.A., Brown, R. & Poxton, I.R. (2002). A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Veterinary Microbiology*, 87(1): 81-88.
- Hedderson, E.J. & Newton, J.R. (2004). Prospects for vaccination against equine grass sickness. *Equine Vet J*, 36(2): 186-191.
- Hunter, L.C., Miller, J.K. & Poxton, I.R. (1999). The association of *Clostridium botulinum* type C with equine grass sickness: a toxicoinfection? *Equine Vet J*, 31(6): 492-499.
- Hunter, L.C. & Poxton, I.R. (2001). Systemic antibodies to *Clostridium botulinum* type C: do they protect horses from grass sickness (dysautonomia)? *Equine Vet J*, 33(6): 547-553.
- Ireland, J. (2014). Focus on: vaccination against equine grass sickness. *Veterinary Record*, 175(5): 114-115.
- McCarthy, H.E., French, N.P., Edwards, G.B., Poxton, I.R., Kelly, D.F., Payne-Johnson, C.E., Miller, K. & Proudman, C.J. (2004). Equine grass sickness is associated with low antibody levels to *Clostridium botulinum*: a matched case-control study. *Equine Vet J*, 36(2): 123-129.
- McGorum, B.C., Fry, S.C., Wallace, G., Coenen, K., Robb, J., Williamson, G. & Aruoma, O.I. (2000). Properties of herbage in relation to equine dysautonomia: biochemical composition and antioxidant and prooxidant actions. *J Agric Food Chem*, 48(6): 2346-2352.
- McGorum, B.C. & Kirk, J. (2001). Equine dysautonomia (grass sickness) is associated with altered plasma amino acid levels and depletion of plasma sulphur amino acids. *Equine Vet J*, 33(5): 473-477.
- McGorum, B.C. & Pirie, R.S. (2018). Equine Dysautonomia. *Vet Clin North Am Equine Pract.* doi: 10.1016/j.cveq.2017.11.010. 2018-02-28
- McGorum, B.C., Pirie, R.S. & Fry, S.C. (2012). Quantification of cyanogenic glycosides in white clover (*Trifolium repens* L.) from horse pastures in relation to equine grass sickness. *Grass and Forage Science*, 67(2): 274-279.

- McGorum, B.C., Scholes, S., Milne, E.M., Eaton, S.L., Wishart, T.M., Poxton, I.R., Moss, S., Wernery, U., Davey, T., Harris, J.B. & Pirie, R.S. (2016). Equine grass sickness, but not botulism, causes autonomic and enteric neurodegeneration and increases soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor protein expression within neuronal perikarya. *Equine Vet J*, 48(6): 786-791.
- Newton, J.R., Hedderson, E.J., Adams, V.J., McGorum, B.C., Proudman, C.J. & Wood, J.L. (2004). An epidemiological study of risk factors associated with the recurrence of equine grass sickness (dysautonomia) on previously affected premises. *Equine Vet J*, 36(2): 105-112.
- Newton, J.R., Wylie, C.E., Proudman, C.J., McGorum, B.C. & Poxton, I.R. (2010). Equine grass sickness: are we any nearer to answers on cause and prevention after a century of research? *Equine Vet J*, 42(6): 477-481.
- Nunn, F.G., Pirie, R.S., McGorum, B., Wernery, U. & Poxton, I.R. (2007a). Comparison of IgG antibody levels to *Clostridium botulinum* antigens between euthanased and surviving cases of chronic grass sickness. *Res Vet Sci*, 83(1): 82-84.
- Nunn, F.G., Pirie, R.S., McGorum, B., Wernery, U. & Poxton, I.R. (2007b). Preliminary study of mucosal IgA in the equine small intestine: specific IgA in cases of acute grass sickness and controls. *Equine Vet J*, 39(5): 457-460.
- Peck, M.W., Smith, T.J., Anniballi, F., Austin, J.W., Bano, L., Bradshaw, M., Cuervo, P., Cheng, L.W., Derman, Y., Dorner, B.G., Fisher, A., Hill, K.K., Kalb, S.R., Korkeala, H., Lindstrom, M., Lista, F., Luquez, C., Mazuet, C., Pirazzini, M., Popoff, M.R., Rossetto, O., Rummel, A., Sesardic, D., Singh, B.R. & Stringer, S.C. (2017). Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins (Basel)*, 9(1): 38.
- Pirie, R.S., Jago, R.C. & Hudson, N.P. (2014). Equine grass sickness. *Equine Vet J*, 46(5): 545-553.
- Stratford, C.H., Mayhew, I.G. & Hudson, N.P.H. (2014). Equine botulism: A clinical approach to diagnosis and management. *Equine Veterinary Education*, 26(8): 441-448.
- SVA, Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt (2016-06-13). *Botulism hos häst*. <http://www.sva.se/djurhalsa/hast/nervsjukdomar-hast/botulism-hast> [2018-03-01]
- SVA, Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt (2017-02-27). *Gräsbetessjuka (grässjuka) hos häst*. http://www.sva.se/djurhalsa/hast/forgiftningar-hast/grasbetessjuka_hast [2018-02-27]
- Waggett, B.E., McGorum, B.C., Wernery, U., Shaw, D.J. & Pirie, R.S. (2010). Prevalence of *Clostridium perfringens* in faeces and ileal contents from grass sickness affected horses: comparisons with 3 control populations. *Equine Vet J*, 42(6): 494-499.
- Whitlock, R.H. & McAdams, S. (2006). Equine botulism. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 5(1): 37-42.
- Wood, J.L.N., Milne, E.M. & Doxey, D.L. (1998). A case-control study of grass sickness (equine dysautonomia) in the United Kingdom. *Veterinary Journal*, 156(1): 7-14.
- Wylie, C.E. & Proudman, C.J. (2009). Equine grass sickness: epidemiology, diagnosis, and global distribution. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 25(2): 381-399.