

**DE ETIOLOGIE EN EPIDEMIOLOGIE  
VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS IN NEDERLAND**

**MET BIJZONDERE AANDACHT VOOR ASPECTEN BETREFFENDE DE  
THERMISCHE WATERVERONTREINIGING EN DE VOLKSGEZONDHEID**

**ETIOLOGY AND EPIDEMIOLOGY  
OF BOTULISM IN WATERFOWL IN THE NETHERLANDS**

**WITH SPECIAL REFERENCE TO  
THERMAL WATER POLLUTION AND PUBLIC HEALTH**

*(with a summary in English)*

**PROEFSCHRIFT**

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE DIERGENEESKUNDE  
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS  
PROF. DR. S.J. GROENMAN,  
VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN  
OP DONDERDAG 7 JUNI 1973  
DES NAMIDDAGS TE 4.15 UUR**

**DOOR**

**JAN HAAGSMA**

**GEBOREN OP 3 FEBRUARI 1933  
TE WYMBRITSERADEEL**

PROMOTOR:  
PROF. A. VAN DER SCHAAF

De inhoud van dit proefschrift verschijnt tevens als publicatie van het

Centraal Diergeneeskundig Instituut,  
afdeling Rotterdam,  
Prof. Poelslaan 35,  
Rotterdam - 7.

---

1973  
BRONDER-OFFSET B.V. -- ROTTERDAM

*Aan zij die mij lief zijn en die daardoor  
een voortdurende stimulans zijn geweest*

## VOORWOORD

Bij het verschijnen van dit proefschrift wil ik gaarne de gelegenheid benutten U, Hoogleraren, Oud-hoogleraren en andere docenten van de Faculteit der Diergeneeskunde, dank te zeggen voor Uw bijdrage tot mijn wetenschappelijke vorming.

Hooggeleerde Van der Schaaf, Hooggeachte Promotor, ik ben U zeer erkentelijk voor de prettige en geestdriftige wijze, waarop U de totstandkoming van dit proefschrift hebt begeleid. Voor het vertrouwen dat U mij hebt geschonken en voor de voortvarende wijze waarop U het manuscript hebt doorgewerkt, waarin ook Uw officiële afscheid als Hoogleraar geen verandering bracht, ben ik U oprecht dankbaar.

Geleerde Bool, beste Jeroen, ik ben je zeer veel dank verschuldigd voor de stimulerende belangstelling die je steeds voor het onderzoek hebt getoond. Dat je, naast de bergen werk die je uit hoofde van je functie moest verzetten, nog gelegenheid vond het tot stand komen van dit manuscript op de voet te volgen en toestemde als co-referent te willen optreden, heeft mij met groot respect vervuld.

Zeergeleerde Over, beste Hans, de buitengewoon plezierige en enthousiaste wijze, waarop wij hebben samengewerkt, is nauwelijks in woorden te vangen. Voor bepaalde gedeelten van dit onderzoek was een tandem dierenarts - bioloog van eminent belang. Ik heb de overtuiging dat dank zij deze koppeling het onderzoek met een extra dimensie is verrijkt. Tijdens het veldwerk heb ik bijzonder genoten van je grote kennis van al wat leeft en bloeit. Ik ben je daarom zeer erkentelijk dat juist jij mij als paronymf wilt bijstaan.

Zeergeleerde Terpstra, toen wij bij de eerste watervogels met botulismus stonden, was U er snel van overtuigd dat hier een taak lag voor het Instituut; U fiatteerde daarmee de aanloop van de eerste onderzoekingen.

Gaarne betuig ik mijn dank voor de nuttige contacten die ik bij het tot stand komen van dit proefschrift met collega's van het Instituut had. De prettige en collegiale sfeer tussen ons heeft hier zeer toe bijgedragen.

Bijzonder veel dank ben ik verschuldigd aan de medewerkers van de afdeling voor de uitvoering van de laboratoriumwerkzaamheden. Geachte mejuffrouw van Pelt, beste Frida, deze dank beperkt zich voor jou niet alleen tot de voorgevechten die op dit onderzoek betrekking hebben. Geachte mejuffrouw Schwarz en geachte heren Maas en de Jong, beste Alie, Maas en Dirk, jullie inzet is steeds boven alle lof verheven geweest en zonder jullie nimmer aflatende hulp had dit werkstuk nimmer tot stand kunnen komen. De goede sfeer en teamgeest zijn mede bepalend geweest voor het eindresultaat.

Veel andere medewerkers van het Instituut moet ik eveneens dankzeggen voor hun aandeel. In het bijzonder wil ik gaarne memoreren de grote nauwgezetheid waarmede mevrouw van Daal-Vervloet al het typewerk heeft verzorgd en de consciëntieuze wijze waarop de heer Koster de foto's en figuren heeft vervaardigd. Het is niet mogelijk verder iedereen apart dank te zeggen, doch wil ik nog een uitzondering maken voor de medewerkers van de afdeling voedingsmedia, de sectiezaal en de technische dienst.

Ik stel het zeer op prijs ook de hulp te memoreren die ik heb ontvangen van personen en instellingen buiten het Instituut; de geographische spreiding weerspiegelt zich in de inhoud van dit proefschrift. Voor de belangrijke observaties die in Hilvarenbeek, in het bijzonder in het Talingputje, konden worden uitgevoerd, ben ik zeer veel dank verschuldigd aan U, Zeergeachte mevrouw van Puyenbroek en aan Uw medewerker, de heer van der Berg. Voor de hulp bij het onderzoek in 's-Gravenhage wil ik danken U, geleerde Ansingh van de Gemeentelijke Geneeskundige- en Gezondheidsdienst en Uw medewerker de heer Nieuwenhoven. Geleerde van der Kamp, beste Jan, in Groningen mocht ik op jou steun rekenen. Geachte heer Musters, zeer veel gegevens betreffende "Amsterdam" ontving ik dank zij Uw bemiddeling. Medewerkers van de afdeling Parasitologie te Lelystad, ik gedenk gaarne het materiaal dat door jullie werd verzameld.

Ook al diegenen, wier namen ik niet heb genoemd, maar die toch op enigerlei wijze hebben bijgedragen in dit onderzoek, wil ik oprecht dankzeggen.

Het zij mij vergund ook mijn eigen gezin in deze dankbetuigingen te betrekken. Lieve Maaïke, jij hebt schijnbaar moeiteloos allerlei huiselijke beslommeringen op je schouders erbij genomen en het daardoor mogelijk gemaakt dat ik mij volledig kon inzetten. Wij zullen zeker nog vaak moeten glimlachen bij de herinnering aan Johan Frank's meestal 's avonds na het nieuws vermanend uitgesproken woorden: nu moet papa werken.

## INHOUD

HOOFDSTUK 1. INLEIDING	15
HOOFDSTUK 2. LITERATUURSTUDIE	17
2.1. Algemeen gedeelte	17
2.1.1. Historie en voorkomen	17
2.1.2. Etiologie	21
2.1.3. Pathogenese	24
2.1.4. Symptomatologie	24
2.1.5. Pathologische anatomie	25
2.1.5.1. Macroscopische veranderingen	25
2.1.5.2. Histologische veranderingen	26
2.1.6. Diagnostiek	26
2.1.7. Prophylaxe en therapie	27
2.2. Bijzonder gedeelte	29
2.2.1. De etiologie van botulismus bij watervogels	29
2.2.2. De epidemiologie van botulismus bij watervogels	30
2.3. Samenvatting	34
HOOFDSTUK 3. MATERIALEN EN METHODIEKEN	35
3.1. Materialen	35
3.1.1. Voedingsmedia	35
3.1.1.1. Vloeibare voedingsmedia voor anaërobe kweek	35
3.1.1.2. Vaste voedingsmedia voor anaërobe kweek	37
3.1.1.3. Andere voedingsmedia	38
3.1.2. Antitoxische sera	39
3.1.2.1. Cl. botulinum antitoxinen	39
3.1.2.2. Cl. tetani antitoxine	40

<b>3.2. Methodieken</b>	<b>41</b>
3.2.1. Aantonen en typering van het botulinumtoxine	41
3.2.2. Isolatie van Cl. botulinum	44
3.2.2.1. Aantonen in ophopingsculturen	44
3.2.2.2. Isolatie van Cl. botulinum in reïncultuur	45
3.2.3. Bepaling van de concentratie van het botulinumtoxine	47
<b>HOOFDSTUK 4. EEN ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS IN NEDERLAND</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Inleiding</b>	<b>48</b>
<b>4.2. Diagnostiek van botulismus bij watervogels</b>	<b>48</b>
4.2.1. Symptomatologie	49
4.2.2. Post-mortem bevindingen	50
4.2.3. Aantonen van het botulinumtoxine	51
<b>4.3. Het optreden van botulismus bij watervogels in Nederland</b>	<b>54</b>
4.3.1. In 's-Gravenhage	54
4.3.2. In Amsterdam	55
4.3.3. In Hilvarenbeek	60
4.3.4. In Zuidelijk Flevoland	61
4.3.5. In Groningen	63
4.3.6. In Leiden/Voorschoten	64
4.3.7. In andere gebieden	65
<b>4.4. Samenvatting</b>	<b>67</b>
<b>HOOFDSTUK 5. EEN ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN CL. BOTULINUM IN VERBAND MET HET OPTRE- DEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS</b>	<b>68</b>
<b>5.1. Inleiding</b>	<b>68</b>
<b>5.2. Materialen en methodieken</b>	<b>69</b>
5.2.1. Onderzoek van bodemonsters	69
5.2.2. Onderzoek van dieren	69
<b>5.3. Resultaten</b>	<b>71</b>
5.3.1. Voorkomen van Cl. botulinum in de bodem in Nederland	71
5.3.1.1. In gebieden waar vogelsterfte door botulismus was vastgesteld	71

5.3.1.2.	In gebieden met veel watervogels, waarin geen vogelsterfte door botulismus was vastgesteld	76
5.3.1.3.	In willekeurige bodemonsters	79
5.3.2.	Voorkomen van <i>Cl. botulinum</i> bij dieren	82
5.3.2.1.	Bij vogels, afkomstig uit gebieden waar botulismus was vastgesteld	83
5.3.2.2.	Bij vogels, afkomstig uit gebieden waar botulismus niet was vastgesteld	88
5.3.2.3.	Bij diverse zoogdieren	91
5.3.2.4.	Bij vissen	92
5.3.2.5.	Bij invertebraten	95
5.3.3.	Isolatie van <i>Cl. botulinum</i> in reïncultuur	102
5.3.3.1.	<i>Cl. botulinum</i> type C	102
5.3.3.2.	<i>Cl. botulinum</i> type E	103
5.3.3.3.	<i>Cl. botulinum</i> type B	103
5.3.3.4.	<i>Cl. botulinum</i> type A	104
5.4.	<b>Samenvatting</b>	104
<b>HOOFDSTUK 6. EEN ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN HET BOTULINUMTOXINE</b>		108
6.1.	<b>Inleiding</b>	108
6.2.	<b>Materialen en methodieken</b>	108
6.3.	<b>Resultaten</b>	110
6.3.1.	Onderzoek van kadavers van vertebraten	110
6.3.1.1.	Van watervogels	111
6.3.1.2.	Van zoogdieren	112
6.3.1.3.	Van vissen	112
6.3.2.	Onderzoek van invertebraten	112
6.3.3.	Onderzoek van water en slib	114
6.3.3.1.	Verzameld in gebieden met botulismus	114
6.3.3.2.	Productie van het botulinumtoxine onder experimentele omstandigheden	115
6.3.3.3.	Resistentie van het botulinumtoxine in slib	116
6.3.4.	Veldproef met wilde eenden	119
6.4.	<b>Samenvatting</b>	120
<b>HOOFDSTUK 7. DE GEVOELIGHEID VAN EENDEN VOOR HET BOTULINUMTOXINE</b>		122



7.1. Inleiding	122
7.2. Materialen en methodieken	122
7.3. Resultaten	125
7.3.1. Gevoeligheid voor het type C-toxine	125
7.3.2. Gevoeligheid voor de toxinetypen A, B en E	126
7.3.3. Optreden van het "Behring phenomeen"	129
7.3.4. Immunologische aspecten	129
7.4. Samenvatting	131
<b>HOOFDSTUK 8. MORFOLOGISCHE, CULTURELE, BIOCHEMISCHE EN SEROLOGISCHE ONDERZOEKINGEN VAN DE GEÏSOLEERDE CL. BOTULINUM STAMMEN</b>	<b>133</b>
8.1. Inleiding	133
8.2. Materialen en methodieken	134
8.3. Resultaten	137
8.3.1. Morfologische, culturele en biochemische eigenschappen	137
8.3.1.1. Cl. botulinum type C	137
8.3.1.2. Cl. botulinum type B	142
8.3.1.3. Cl. botulinum type A	144
8.3.1.4. Cl. botulinum type E	145
8.3.2. Serologisch onderzoek	147
8.3.2.1. Specificiteit van het C-mink antitoxine	147
8.3.2.2. Vergelijkend onderzoek van C-mink antitoxine met enkele andere type C antitoxinen	147
8.3.2.3. Vergelijkend onderzoek van C-mink antitoxine met het botulinumtoxine van Nederlandse type C-stammen	149
8.4. Samenvatting	150
<b>HOOFDSTUK 9. DE INVLOED VAN DE TEMPERATUUR BIJ HET OPTREDEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS</b>	<b>152</b>
9.1. Inleiding	152
9.2. Materialen en methodieken	152

<b>9.3. Resultaten</b>	153
9.3.1. Productie van botulinumtoxine type C bij lagere temperaturen	153
9.3.2. Milieutemperaturen in gebieden waar botulismus bij watervogels is opgetreden	156
9.3.2.1. In een natuurlijk milieu	156
9.3.2.2. In gebieden waar sprake is van een thermische waterverontreiniging	158
<b>9.4. Samenvatting</b>	165
<b>HOOFDSTUK 10. BESPREKING VAN DE RESULTATEN.</b>	166
<b>10.1 De etiologie van botulismus bij watervogels</b>	166
<b>10.2. De epidemiologie van botulismus bij watervogels</b>	169
<b>10.3. De invloed van thermische waterverontreiniging bij het optreden van botulismus bij watervogels</b>	171
<b>10.4. Volksgezondheidsaspecten bij het optreden van botulismus bij watervogels</b>	174
<b>SAMENVATTING EN CONCLUSIES</b>	179
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	188
<b>LITERATUUR</b>	196
<b>REGISTER MET VOGELNAMEN</b>	203
<b>CURRICULUM VITAE</b>	205

## HOOFDSTUK I

### INLEIDING

Botulismus is een specifieke intoxicatie, veroorzaakt door de opname van toxinen die door *Clostridium botulinum* zijn gevormd.

De eerste beschrijving van deze ziekte bij de mens werd in 1820 gegeven door de Duitse dichter en medische geschiedschrijver Justinus Kerner (Jordan, 1917).

Bij dieren is het ziektebeeld reeds in de 18e eeuw beschreven. De ontdekkingsreiziger Le Vaillant, die van 1780 tot 1785 door Zuid-Afrika trok, signaleerde bij runderen een door verlamningsverschijnselen gekenmerkte ziekte, die door hem heel passend met "lamsiekte" werd aangeduid. Hutcheon vestigde in 1884 voor het eerst de aandacht op het knagen aan beenderen, speciaal door jonge dieren in de tijd dat de ziekte veel optrad. Later is gebleken dat "lamsiekte" door het botulinumtoxine wordt veroorzaakt (Henning, 1956).

De etiologie van botulismus bij de mens werd in de jaren 1895-1897 opgehelderd door de Belg van Ermengem; hij toonde het botulinumtoxine aan en isoleerde de eerste *Clostridium botulinum*-cultuur. Sindsdien is gebleken dat, op grond van antigene verschillen tussen de gevormde toxinen, diverse typen van *Cl. botulinum* kunnen worden gedifferentieerd. Momenteel onderscheidt men 6 toxinetypen, die met de letters A tot en met F worden aangeduid (Dolman en Murakami, 1961).

De mens is zeer gevoelig voor de toxinetypen A, B, E en F, terwijl de typen C en D vooral verantwoordelijk blijken te zijn voor het optreden van botulismus bij dieren. Er bestaat een duidelijk onderscheid in gevoeligheid voor deze toxinetypen bij de verschillende diersoorten. Zo zijn paarden, runderen, schapen, nertsen, bepaalde vogelsoorten en enkele laboratoriumproefdieren zeer gevoelig voor het botulinumtoxine. De meeste hond- en katachtigen en het varken zijn daarentegen vrijwel ongevoelig voor het toxine.

Uitgebreide sterfte bij landbouwhuisdieren door botulismus is vooral waargenomen in Zuid-Afrika, Noord-Amerika en West-Australië.

Bij watervogels dateert de eerste beschrijving van 1893, toen in Zuid-Afrika in

de "Agricultural Journal of the Cape" gewag werd gemaakt van "lamsiekte" bij eenden. In de Verenigde Staten is het regelmatig optreden van botulismus bij watervogels sinds 1910 bekend. Ook in Australië is melding gemaakt van massale sterfte door botulismus bij watervogels.

In Europa zijn pas in de laatste jaren enkele vrij ernstige gevallen van botulismus bij watervogels vastgesteld, nl. in Zweden (Niléhn en Johannsen, 1965), in Denemarken (Müller, 1967) en in Engeland (Blandford *et al.*, 1969).

In Nederland was massale sterfte door botulismus alleen bekend bij farmnertsen, terwijl bij paarden en runderen slechts enkele ziektegevallen zijn waargenomen. Bij watervogels is een enkele keer een verdacht ziektegeval gesignaleerd, zonder dat de diagnose in het laboratorium kon worden bevestigd.

In deze toestand kwam verandering, toen in de zomer van 1970 op verschillende plaatsen in Nederland grote aantallen watervogels met dezelfde ziekteverschijnselen bleken te sterven. Nader onderzoek leerde dat hier sprake was van botulismus, veroorzaakt door de opname van het toxine van *Cl. botulinum* type C (Haagsma *et al.*, 1971). Dit eerste massale optreden van botulismus bij watervogels in Nederland was aanleiding een verder onderzoek in te stellen, temeer omdat hier problemen, verband houdende met de milieuverontreiniging en de volksgezondheid, aan het licht kwamen. Dit onderzoek, dat werd gestimuleerd door het nog ernstiger optreden van botulismus in 1971, concentreerde zich vooral op de volgende punten:

- 1) Wat is de verspreiding van *Cl. botulinum* in Nederland?
- 2) Onder welke omstandigheden heeft de vorming van het botulinumtoxine plaats, zodat massale sterfte bij watervogels en eventueel andere dieren mogelijk wordt?
- 3) Is er een relatie met bepaalde vormen van milieuverontreiniging?
- 4) Welke zijn de consequenties voor de volksgezondheid?

In de volgende hoofdstukken worden de resultaten van het hierboven geschetste onderzoek nader beschreven.

## HOOFDSTUK II

### LITERATUURSTUDIE

#### 2.1. ALGEMEEN GEDEELTE

##### 2.1.1. Historie en voorkomen

Botulismus is de benaming van een ziekte, waarbij een specifieke orale intoxicatie optreedt, veroorzaakt door de opname van toxinen die door de bacterie *Clostridium botulinum* zijn gevormd (Meyer, 1953).

Andere aanduidingen van de ziekte als allantiasis en ichthyosismus zijn thans in het vergeetboek geraakt.

De naam botulismus is afgeleid van het Latijnse woord botulus, wat worst betekent. Men meende in de eerste helft van de 19e eeuw dat botulismus veroorzaakt werd door het eten van giftige worst, speciaal van bloedworst zoals die veel in Zuid-Duitsland werd bereid. Van Ermengem (1897) heeft er echter reeds op gewezen dat de benaming botulismus minder juist is, omdat de ziekte ook kan optreden na het eten van diverse andere levensmiddelen, zoals ham, vleesconserveren en zelfs vis.

In tegenstelling tot andere vormen van voedselvergiftigingen, waarbij meestal gastro-intestinale symptomen op de voorgrond treden, is botulismus vooral gekenmerkt door het optreden van nerveuze afwijkingen.

De etiologie van botulismus werd opgehelderd door van Ermengem (1896, 1897), die een voedselvergiftiging in het Belgische dorpje Ellezelles bestudeerde. De ziekte trad op bij personen, die 14 december 1895 aan een rouwplechtigheid hadden deelgenomen. Alle patiënten, waarvan er drie stierven, hadden gegeten van ongekookte, door zout geconserveerde ham. Met restanten van deze ham kon bij proefdieren na orale en parenterale applicatie de toxiciteit van dit voedsel afdoende worden gedemonstreerd. Het gelukte van Ermengem vervolgens uit deze ham en uit de milt van één der overleden patiënten een obligaata anaëroob groeiende bacterie in reïncultuur te isoleren.

Met toxische culturen en met bacterievrije filtraten van dit micro-organisme konden bij proefdieren dezelfde ziekteverschijnselen worden opgewekt. Muizen, caviae en konijnen waren zeer gevoelig voor het toxine, duiven en ratten minder. Honden en kippen bleken ook na subcutane toediening van het toxine refractair te zijn. Katten waren ook weinig gevoelig voor het toxine, maar het ziektebeeld, dat pas na hoge subcutaan toegeediende doseringen kon worden opgewekt, vertoonde wel de grootste overeenkomst met dat van de mens. Met deze onderzoeken was afdoende bewezen dat botulismus door het toxine van het anaëroob groeiend micro-organisme werd veroorzaakt, en niet, zoals steeds was verondersteld, door bederf van het voedsel met de daarbij optredende giftige autolytische afbraakproducten (toxische alkaloiden, ptomainen).

De ontdekkingen van van Ermengem hebben de stoot gegeven aan tal van nieuwe onderzoeken in verband met het optreden van voedselvergiftigingen, speciaal als er sprake leek te zijn van botulismus.

In de jaren 1920-1930 stimuleerde de snel groeiende conservenindustrie het onderzoek bovendien in hoge mate, met name in de Verenigde Staten. Er werden spoedig ook meer *Cl. botulinum*-culturen geïsoleerd; Leuchs stelde in 1910 als eerste vast, dat er twee immunologisch verschillende toxinetypen waren. Momenteel onderscheidt men 6 toxinetypen, die met de letters A tot en met F worden aangeduid; het C-toxine wordt nog in de subtypen C $\alpha$  en C $\beta$  verdeeld (Dolman en Murakami, 1961).

Sinds de eerste wereldoorlog blijkt botulismus bij de mens voornamelijk te worden veroorzaakt door met zout, suiker of door hitte thuis geconserveerd voedsel; vlees en vis veroorzaakten de meeste gevallen, maar uitbraken door groenten en fruit kwamen ook voor. Hierbij werden vrijwel steeds de toxinetypen A, B en E gevonden (Meyer, 1956; Anon., 1963; Foster *et al.*, 1965; Matveev *et al.*, 1967). Slechts Møller en Scheibel (1960) vermelden een geval van botulismus in Denemarken, waarbij type F was betrokken. Verder worden enkele discutabele gevallen, veroorzaakt door type C en D, besproken door Dolman en Murakami (1961) en Matveev *et al.* (1967).

In Nederland zijn bij de mens enkele gevallen van botulismus bekend geworden. In de periode 1918 tot 1937 worden 7 gevallen vermeld, waarbij in totaal 19 patiënten waren betrokken; bij 4 personen had de ziekte een fatale afloop. In 4 gevallen betreft het alleen een klinische diagnose, zodat er 3 betrouwbaar gediagnostiseerde botulismusuitbraken overblijven. Het eerste geval, waarbij beide patiënten stierven, wordt door Gewin (1918) beschreven. Varkensvlees werd als het verdachte voedsel beschouwd, het botulinumtoxine werd hierin aangetoond, doch typering vond niet plaats. Dit geschiedde wel bij de door Clarenburg en Fijen (1937) en Schoonhoven van Beurden en Clarenburg (1937) vermelde gevallen, die zich in Zuid-Limburg voordeden, en waarbij type B-toxine werd aangetoond. In het laatste geval werd uit de voor de botulismus-

uitbraak verantwoordelijk gestelde varkensham tevens *Cl. botulinum* type B geïsoleerd.

Voor zover bekend zijn de laatste gevallen van botulismus bij de mens in de 2e Wereldoorlog voorgekomen. In drie internaten in de omgeving van Nijmegen, die voedsel van dezelfde keuken ontvingen, zijn in november 1943 in totaal 24 personen ziek geworden waarvan er 9 aan botulismus zijn gestorven. Het botulinumtoxine werd aangetoond in het bloeds serum van 2 patiënten en in één van de voedingsmiddelen (varkensham). Interessant is verder de waarneming dat het toxine niet was te neutraliseren met antitoxine type A of B; andere typen antitoxine waren helaas niet beschikbaar (Bekker, 1944; Enneking, 1944).

Bij dieren kan eveneens min of meer uitgebreide sterfte optreden door botulismus. In het begin der 20e eeuw zijn in de Verenigde Staten de typen A en B wel verantwoordelijk gesteld voor botulismusgevallen: forage poisoning bij paarden door type B (Graham en Brueckner, 1919) en limberneck bij kippen door type A (Burke, 1919).

Na de ontdekking van de toxinetypen C $\alpha$  (Bengston, 1922), C $\beta$  (Seddon, 1922) en D (Theiler en Robinson, 1927; Robinson, 1930) is gebleken dat botulismus bij dieren voornamelijk door deze typen wordt veroorzaakt.

Bij runderen is botulismus de oorzaak van ernstige ziekte-uitbraken geweest en onder verschillende namen beschreven: als "lamsiekte" in Zuid-Afrika; als "loin disease" en "down in-the-back" in de Verenigde Staten en als "Midland cattle disease", "bulbar paralysis", "dry bible" en "bushsickness" in Australië (Henning, 1956).

In Europa is bij runderen ook incidenteel botulismus vastgesteld: in Denemarken door Müller (1963); in Noorwegen door Fjølstad en Klund (1969) en Hauge (1970); in Nederland door Koopman, de Reus en Haagsma (1971).

Paarden en muilezels blijken ook zeer gevoelig te zijn voor het botulinumtoxine; sterfte is dan ook door diverse auteurs beschreven: in Zuid-Afrika door Theiler en Robinson (1927); in Senegal en Mauritanië door Doutre en Chambon (1971); in Australië door Bennetts en Hall (1938); in Frankrijk en België door Prévot en Brygoo (1953); in Denemarken door Müller (1963); in Noorwegen door Hauge (1970); in Nederland door Cysouw en Tesink (1968).

Bij schapen is botulismus vooral een probleem geweest in Australië (Bennetts, 1938). Incidentele sterfgevallen zijn waargenomen door Hauge (1970) en Haagsma (1972).

Varkens lijken zeer ongevoelig te zijn voor alle toxinetypen; het experimentele onderzoek van Smith *et al.* (1971) heeft deze mening bevestigd. Enkele in de literatuur vermelde botulismusgevallen zijn wegens de onvolledige diagnostiek onbetrouwbaar. Een uitzondering hierop is misschien de botulismusuitbraak, die door Beiers en Simmons (1967) wordt beschreven bij 14 varkens in Australië.

Honden en katten zijn in hoge mate refractair voor het botulinumtoxine.

Prévoet en Brygoo (1953) vermelden echter dat zij 5 gevallen bij de hond hebben waargenomen, terwijl Johannsen (1965) een geval bij één hond beschrijft.

De wetenschappelijke waarde van deze publicaties is echter aanvechtbaar, omdat niet aan alle diagnostische criteria werd voldaan. Dit geldt ook voor de door Vallée *et al.* (1956) beschreven ziektegevallen. Bij katten zijn evenmin goed gedocumenteerde botulismusevallen aangetroffen. Wel is reeds door van Ermengem (1897) vastgesteld dat bij katten onder experimentele omstandigheden botulismus kan worden opgewekt met grote doses type B-toxine; dit is later door andere onderzoekers bevestigd (Prévoet en Brygoo, 1953).

Van de bedrijfsmatig gehouden zoogdieren blijken tenslotte ook nertsen erg gevoelig te zijn voor het botulinumtoxine, speciaal voor het C-toxine; in alle landen met een belangrijke nertsenfokkerij zijn ernstige ziekte-uitbraken voorgekomen, waarbij in enkele dagen vaak duizenden nertsen aan botulismus stierven (o.a. Quortrup en Gorham, 1949; Dinter en Kull, 1950 en 1955; Avery *et al.*, 1959; Hawkyard, 1965; Yndestad en Loftsgard, 1970).

In Nederland is uitgebreide sterfte bij nertsen door botulismus vastgesteld door Akkermans (1961) en Haagsma (1965).

Bij vogels is het optreden van botulismus ook veelvuldig beschreven. Bij kippen in de Verenigde Staten was de ziekte reeds in 1918 bekend onder de naam "limberneck". Botulismus werd toen toegeschreven aan het voederen van bedorven keukenafval en trad soms gelijktijdig op met ziektegevallen bij de mens; meestal werd hierbij type A aangetoond. Later werd de rol van type C onderkend, waarbij de toxine-opname vooral zou geschieden via maden van sarcophage vliegen (Wilkens en Dutcher, 1920; Graham en Boughton, 1924). Zoals Blandford en Roberts (1970) en Haagsma (1972) vaststelden, kunnen in de moderne kippenbedrijven ook nog botulismusingevallen voorkomen.

In fazantenfokkerijen in Zweden is uitgebreide sterfte door botulismus voorgekomen (Dinter en Kull, 1954). In de Verenigde Staten (Boroff en Reilly, 1962; Fish *et al.*, 1967) is dit ook waargenomen.

In gebieden met "lamsiekte" is botulismus ook bij struisvogels vastgesteld (Henning, 1956).

Zeer ernstige sterfte door botulismus is voorgekomen bij watervogels in de Verenigde Staten. Een historisch overzicht is gegeven door Kalmbach (1935). De ziekte kwam voor het eerst in 1910 voor, toen in Salt Lake Valley (Utah) ontelbare watervogels het slachtoffer werden. In de daaropvolgende jaren kwam het ook op andere plaatsen tot massale sterfte; zo werden in 1912 bij Ogden (Utah) 30.000, in Salt Lake Valley van 22 augustus tot 21 september 44.000 dode vogels verzameld. Omdat de ziekte vooral in het Westen van de Verenigde Staten voorkwam, sprak men aanvankelijk van "Western duck sickness", later ook wel van "alkali disease".

Nadat Bengston in 1922 *Cl. botulinum* type C $\alpha$  had ontdekt, werd door onderzoekingen van Kalmbach (1930 en 1932), Giltner en Couch (1930) en



Hobmaier (1930) aangetoond, dat deze massale sterfte door het botulinumtoxine type C $\alpha$  werd veroorzaakt. Botulismus is sindsdien bijna elk jaar op steeds meer plaatsen voorgekomen (Kalmbach, 1968).

Ook in andere landen is botulismus bij watervogels vastgesteld. Waarschijnlijk dateert de eerste beschrijving reeds van 1893, toen in Zuid-Afrika een "lamsiekte" bij eenden werd gesignaleerd (Henning, 1956). In Australië zijn botulismusuitlekten beschreven door Pullar (1934) en Grubb (1964).

Sinds enkele jaren is ook in Europa botulismus bij watervogels onderkend: in Zweden door Niléhn en Johannsen (1965), in Denemarken door Müller (1967a) en in Engeland door Blandford en medewerkers (1969). In Nederland trad de ziekte voor het eerst op in 1970 (Haagsma *et al.*, 1971).

### 2.1.2. Etiologie

Algemeen wordt aangenomen dat botulismus een intoxicatie is en er dus feitelijk niet van een infectieziekte gesproken kan worden. Het oorzakelijke micro-organisme, *Cl. botulinum*, produceert een zeer krachtig toxine. Dit toxine wordt na de orale opname geabsorbeerd door de mucosa van de maag en de dunne darm en wekt vervolgens het karakteristieke ziektebeeld op. Botulismus ontstaat niet door de opname van grote doses bacteriesporen, die door wassen of verhitten zijn gedetoxificeerd (o.a. Tanner en Tanner, 1953; Wilson en Miles, 1957; Lamanna, 1959). Gunnison en Coleman (1932) toonden aan dat ook bij eenden met  $6 \times 10^8$  gedetoxificeerde bacteriesporen geen ziekteverschijnselen konden worden opgewekt.

Slechts enkele publicaties omstreeks 1920 vermelden dat botulismus wel kon worden veroorzaakt na de opname van toxinevrije bacteriesporen. De applicatie geschiedde bij caviae subcutaan en per os (o.a. Coleman en Meyer, 1922; Graham en Eriksen, 1922; Starin en Dack, 1925). Deze resultaten zijn later niet door andere onderzoekers bevestigd; zij zijn bovendien aanvechtbaar omdat het zeer lastig blijkt te zijn *Cl. botulinum*-sporen volledig toxinevrij te maken (Wilson en Miles, 1957).

Bij de mens is het optreden van botulismus meestal te wijten aan drie factoren (Foster *et al.*, 1965):

- 1) aan een inadaequate voorbehandeling van het voedsel (zouten, pekelen, roken, drogen en verhitten);
- 2) aan het bewaren van het voedsel bij temperaturen die de groei van *Cl. botulinum* mogelijk maken;
- 3) aan het eten zonder voldoende verhitting van het voedsel vooraf.

In de Verenigde Staten werden talrijke gevallen veroorzaakt door thuis ingemaakte groenten en vruchten, in Europa daarentegen vaker door vleesgerechten die van het varken afkomstig waren. In de Verenigde Staten, Canada, Japan, Rusland en de Scandinavische landen blijken botulismusevallen, waarbij type E

is betrokken, meestal te zijn ontstaan door het nuttigen van visgerechten (Meyer, 1956).

Bij het optreden van botulismus bij het rund in Zuid-Afrika speelde vaak fosfordeficiëntie, waardoor de neiging tot osteophagie ontstond een belangrijke rol. In gebieden in Zuid-Afrika, waar "lamsiekte" endemisch is, blijkt een hoog percentage van de benige resten van kadavers toxisch te zijn (Henning, 1956). In Australië kunnen toxische kadavers van konijnen botulismus bij schapen veroorzaken (Bennetts en Hall, 1938).

De incidentele gevallen van botulismus bij paarden en runderen in Europa werden meestal veroorzaakt door het toxisch geworden kadaver van een kat of een rat, die in het voeder (meestal hooi) was terecht gekomen. Bij nertsen is ondeskundig bewaren van het voedsel de belangrijkste oorzaak van botulismus.

De bijzondere omstandigheden die een rol spelen bij het optreden van botulismus bij watervogels, zullen later afzonderlijk worden beschreven.

Botulismus kan naast de normale orale infectieweg, zeer sporadisch op een andere wijze worden veroorzaakt: de literatuur vermeldt bij de mens 3 gevallen waarin de ziekte het gevolg was van een wondinfectie (Lamanna, 1959).

### *Bacteriologie*

De naam *Clostridium botulinum* is in 1917 algemeen aanvaard; voordien sprak men meestal van *Bacillus botulinus*, in navolging van van Ermengem (Winslow *et al.*, 1917). *Cl. botulinum* is een Gram-positief staafje met afgeronde uiteinden, sporevormend en obligaet anaëroob (Breed *et al.*, 1957). Zoals reeds is vermeld, onderscheidt men op grond van immunologische verschillen tussen de toxinen, momenteel 6 toxinetypen, die met de letters A, B, C, D, E en F worden aangeduid (Dolman en Murakami, 1961).

De in 1896 door van Ermengem beschreven cultuur behoorde tot type B, terwijl de eerste type A-cultuur in 1904 in Duitsland (Darmstadt) werd geïsoleerd; beide stammen zijn helaas reeds spoedig verloren gegaan.

In 1922 werd door Bengston in de Verenigde Staten en door Seddon in Australië een nieuw toxinetype geïsoleerd; het bleek dat er slechts een gedeeltelijke serologische verwantschap bestond tussen de toxinen van beide *Cl. botulinum*-stammen (Pfenninger, 1924). Dit werd bevestigd door Gunnison en Meyer (1929b) en op hun voorstel werd het door Bengston geïsoleerde type met C $\alpha$  en het door Seddon gevonden type met C $\beta$  aangeduid. Later is gebleken dat type D, in 1927 in Zuid-Afrika ontdekt, ook enige serologische verwantschap heeft met type C (Mason en Robinson, 1935). De verwarring rond de verwantschap tussen type C $\alpha$ , C $\beta$  en D is gedeeltelijk opgehelderd door Jansen (1971), die met monospecifieke antisera en monospecifieke toxinen werkte. Hierbij is gebleken dat type C $\alpha$  vooral toxinefactor C<sub>1</sub>, ook factor D en afhankelijk van het groeimedium iets factor C<sub>2</sub> produceert; type C $\beta$  produceert

alleen factor  $C_2$  en type D vooral factor D maar ook  $C_1$ . Bij dit onderzoek bleek tevens dat het Internationale Standaard type C antitoxine (State Serum Laboratories, Kopenhagen) antistoffen bevat tegen factor  $C_1$ ,  $C_2$  en D. Dit gegeven en de omstandigheid dat bij  $C\alpha$  de productie van factor  $C_2$  afhankelijk bleek te zijn van het groeimedium, zou andere schijnbaar tegenstrijdige resultaten bij de typering van type C-toxinen (o.a. Avery *et al.*, 1959; Grubb, 1964) kunnen verklaren.

De toxinetypen E en F, respectievelijk rond 1935 bij de Kaspische Zee en in 1960 in Denemarken ontdekt, zijn serologisch niet verwant aan de andere toxinetypen.

De onderverdeling van *Cl botulinum* uitsluitend op grond van de geproduceerde toxinen – een indeling die taxonomisch aanvechtbaar is (Lee en Riemann, 1960) – heeft de waarde van de differentiatie door middel van culturele en biochemische eigenschappen nogal gedevalueerd.

Aan één eigenschap, de proteolytische activiteit, is vroeger reeds veel aandacht besteed. Men heeft zelfs geruime tijd de proteolytische stammen (alle type A-stammen en de in Amerika gevonden type B-stammen) apart aangeduid met *Cl parobotulinum*. Deze benaming is echter in 1953 vervallen (Dolman en Murakami, 1961).

De type C-stammen zijn, evenals de typen D en E, nonproteolytisch; gelatine wordt daarentegen meestal wel vervloeid.

Tussen de  $C\alpha$ - en  $C\beta$ -culturen bestaan verschillen in de saccharolytische activiteit. De  $C\beta$ -stam van Seddon vergist geen koolhydraten; de andere  $C\beta$ -stammen zijn eveneens weinig actief, terwijl de  $C\alpha$ -stammen wel verschillende koolhydraten omzetten (Gunnison en Meyer, 1929b; Dolman en Murakami, 1961; Segner *et al.*, 1971a).

De hitte-resistentie van de sporen van type C ligt tussen de sporen van type A en type E (Segner en Schmidt, 1971).

De laagste temperatuur, waarbij groei en toxineproductie plaats vindt, bedraagt voor type C  $12,8^\circ\text{C}$ . De meeste type C-stammen groeien niet bij een pH lager dan 5,62, evenmin bij een zoutconcentratie van 2,5 tot 3% (Segner *et al.*, 1971b). Deze auteurs zagen geen toename van de toxiciteit van het C-toxine na de inwerking van trypsine, in tegenstelling tot andere onderzoekers die bij toxinefactor  $C_2$  wel een activatie waarnamen (Jansen en Knoetze, 1971; Eklund en Poysky, 1972).

De botulinumtoxinen zijn goed bestand tegen de inwerking van zuur; in alkalisch milieu zijn zij daarentegen weinig stabiel. Verwarmen gedurende 30 minuten bij  $80^\circ\text{C}$  inactieveert de toxinen. Het C-toxine is, evenals het D-toxine, nog het meest warmteresistent (Prévot en Brygoo, 1953; Foster *et al.*, 1965). De chemische structuur van de toxinen is nog niet volledig opgehelderd. Het zijn globulaire proteïnen, uitsluitend opgebouwd uit aminozuren. De typen A, B en E zijn vooral onderzocht; hiervan zijn ook de moleculairgewichten vastgesteld:

Lamanna en Sakaguchi (1971) vermelden resp. 900.000, 165.000 en 350.000. Alleen type A-toxine heeft men kunnen zuiveren tot een stadium waarin kristallisatie mogelijk werd. Alle toxinetypen hebben een fractie die hemagglutinerende eigenschappen bezit.

De botulinumtoxinen zijn de meest potente toxinen die in de natuur bekend zijn. De dosis letalis van zuiver A- of B-toxine voor de mens zou slechts ongeveer 0,01 mg bedragen (Wilson en Miles, 1957).

### 2.1.3. Pathogenese

Het botulinumtoxine passeert als zodanig, in tegenstelling tot andere exotoxinen als b.v. tetanustoxine en diphtherietoxine, de mucosa van de digestietractus. Als "porte d'entrée" worden de maag en het begin van de dunne darm opgegeven, waarbij het niet bekend is hoe het maagdarmkanaal deze grote eiwitmoleculen kan absorberen. Via het lymfevatensstelsel komt het toxine in de bloedcirculatie en ontplooit vervolgens haar activiteit in de myoneurale verbindingen (motorische eindplaten) van de cholinergische zenuwen. Hier wordt de prikkeloverdracht geblokkeerd, doordat het botulinumtoxine specifiek de werking van het acetylcholine verhindert. Het toxine kan derhalve geen invloed uitoefenen op de adrenergische en sensibele zenuwen. Het centrale zenuwstelsel wordt evenmin aangetast. Door de neuro-musculaire blokkade ontstaat paralyse van de cholinergisch geïnnerde spieren; speciaal de ademhalingsspieren worden beïnvloed, zodat de dood bij botulismus optreedt door asphyxie (Lamanna, 1959; Foster *et al.*, 1965).

Het werkingsmechanisme van het botulinumtoxine is niet exact bekend. Stevenson en Girvin (1953) menen dat er een verminderde synthese van acetylcholine plaatsvindt, b.v. doordat de acetylering van choline wordt verstoord. Lamanna (1959) veronderstelt dat het toxine interfereert met het vrijkomen of de diffusie van acetylcholine. De paralyse is irreversibel en kan niet worden opgeheven door cholinesteraseremmers, zoals dat wel mogelijk is bij een curarevergiftiging.

### 2.1.4. Symptomatologie

Van Ermengem (1897) heeft in zijn klassiek geworden beschrijving van de ziekte-uitbraak te Ellezelles reeds uitvoerig de ziekteverschijnselen gemeld, die bij de mens bij botulismus optreden.

Ondanks de neurotoxiciteit van de botulinumtoxinen, hebben de eerste symptomen bij de mens toch meestal betrekking op de digestietractus: nausea, vomeren en koliekaanvallen die vaak 12 tot 18 uur na de voedselopname optreden. Typisch zijn de klachten over een droge mond.

Spoedig ontwikkelen zich ook neurologische symptomen, zoals oogafwijkin-

gen (diplopie, accommodatiemoeilijkheden, pupildilatatie, ptosis der oogleden en een starre blik), slikbezwaren, spraakmoeilijkheden en algehele spiermoeheid.

In fataal verlopende gevallen voeren respiratiestoornissen meestal na 3 tot 6 dagen tot de dood. Het bewustzijn en het pijngevoel worden niet aangetast (van Ermengem, 1897; Foster *et al.*, 1965).

Bij dieren verloopt het ziektebeeld in grote lijnen op dezelfde wijze. Bij paarden en runderen overheerst het beeld van spinaal- of bulbarparalyse. De tongverlamming is bij runderen soms een opvallend verschijnsel, evenals het sterke speekselen door verlamming van de pharynx. De lust om te eten of te drinken is soms nog wel aanwezig (Henning, 1956; Koopman *et al.*, 1971).

Bij nertsen treedt het verdwijnen der agressiviteit nogal op de voorgrond (Quortrup en Gorham, 1949).

Als belangrijkste ziekteverschijnselen bij watervogels – en vogels in het algemeen – worden genoemd: verlamming van de vleugelspieren, poot- en halsspieren (waardoor de z.g. "limberneck" optreedt); het onvermogen geluid te maken; verdwijnen van de ooglidreflex; ten slotte treden ademhalingsmoeilijkheden op, waarna de dieren uiteindelijk in coma sterven (o.a. Hobmaier, 1930; Pullar, 1934; Niléhn en Johannsen, 1965; Haagsma *et al.*, 1971).

Het ziekteverloop is sterk afhankelijk van de hoeveelheid opgenomen toxine. Bij opname van een veelvoud van de letale dosis zal het ziekteproces acuut verlopen, terwijl bij kleinere hoeveelheden toxine zich een meer chronisch ziektebeeld gaat ontwikkelen, dat zich over één of meerdere weken kan uitstrekken. Bij de mens kan het herstel verscheidene maanden vergen (Foster *et al.*, 1965), bij watervogels duurt het korter nl. één tot twee weken.

De symptomatologie schijnt onafhankelijk te zijn van het toxinetype; er bestaat echter wel een duidelijk verschil in gevoeligheid bij de verschillende diersoorten voor de 6 toxinetypen.

## 2.1.5. Post-mortem bevindingen

### 2.1.5.1. Macroscopische veranderingen

In het algemeen wordt aangenomen dat bij het macroscopisch onderzoek geen typische afwijkingen zijn waar te nemen bij botulismus. In sommige gevallen wordt een hyperaemie van de lever, de nieren of de meninges vastgesteld (van Ermengem, 1897; Wilson en Miles, 1957; Simmons en Tammemagi, 1965). Indien andere macroscopisch waarneembare afwijkingen – b.v. een verslikpneumonie – zijn waargenomen, dienen deze als secundair te worden beschouwd (Lamanna, 1959).

Bij "lamsiekte" kan de aanwezigheid van skeletdelen en andere corpora aliena in de digestietractus een aanwijzing zijn dat de dieren aan pica hebben geleden (Henning, 1956).

maatregel; het antitoxine kan hoogstens werkzaam zijn tegen toxine dat circuleert of nog uit de digestietractus wordt geresorbeerd. Daarbij is de keuze van het juiste antitoxine-type nog een extra complicatie (Henning, 1956; Lamanna, 1959).

Kalmbach (1968) vermeldt echter dat de behandeling met antitoxine type C bij watervogels die aan botulismus lijdten, wel succesvol is; zelfs bij ernstig aangetaste vogels had deze therapie waarde. Haagsma *et al.* (1971) constateerden eveneens goede resultaten bij wilde eenden en talingen.

Bij botulismusuitbraken op nertsenfarms is met de toediening van antitoxine ook een gunstig effect waargenomen, indien de behandeling kort na het begin van de ziekteuitbraak kon worden ingezet (Haagsma, 1965).

Het toedienen van snelwerkende laxantia wordt eveneens aanbevolen, eventueel te combineren met maagspoelingen.

Het botulinumtoxine blijkt *in vitro* te worden geïnactiveerd door jodium, kaliumpermanganaat en alcohol (Wilson en Miles, 1957). Over het effect *in vivo* zijn geen betrouwbare gegevens gevonden. Burke *et al.* (1921) vermelden, dat de absorptie van het toxine is tegen te gaan door de toediening van olijfolie met vloeibare zeep.

Bij de bestrijdingsmaatregelen moet bij botulismus het accent vooral op de prophylaxe worden gelegd.

Preventieve vaccinatie wordt algemeen toegepast bij runderen in Zuid-Afrika in lamsiekte-streken (Henning, 1956), bij schapen en runderen in Australië (Bennetts en Hall, 1938) en bij farmnertsen. Bij andere diersoorten is dit niet gebruikelijk vanwege het incidentele voorkomen; hetzelfde geldt voor de mens. De wijze van conservering en de hygiënische behandeling van het voedsel vooraf wordt dan van het grootste belang.

Botulismus was bij de opkomst van de conservenindustrie het zwaard van Damocles. Daarom werd in deze periode aan de bacteriologie van *Cl. botulinum* veel aandacht geschonken, speciaal aan de thermoresistentie van de sporen (Burke, 1923; Gunnison en Meyer, 1929; Meyer en Gunnison, 1929a, 1929b; Townsend, 1929; Meyer, 1956).

Henning (1956) noemt bij "lamsiekte" verder als aanvullende prophylactische maatregelen het verwijderen van kadavermateriaal en het voorkomen van de osteophagie door toediening van beendermeel.

De bestrijding van botulismus op fazantenfokkerijen is vooral gebaseerd op het verwijderen van de kadavers, voordat deze met maden van sarcophage vliegen zijn bezet (Boroff en Reilly, 1962; Fish *et al.*, 1967). Laatstgenoemden bestreden de ziekte ook met behulp van toxoid-vaccinaties, zonder dat dit een gunstig resultaat opleverde; zij veronderstelden dat de immunologische verschillen tussen  $C\alpha$  en  $C\beta$  verantwoordelijk waren voor dit negatieve resultaat. Boroff en Reilly (1959) hadden reeds experimenteel aangetoond dat met intraperitoneale injecties van toxoid een actieve immuniteit kan worden opgewekt bij

gen (diplopie, accommodatiemoeilijkheden, pupildilatatie, ptosis der oogleden en een starre blik), slikbezwaren, spraakmoeilijkheden en algehele spiermoeheid.

In fataal verlopende gevallen voeren respiratiestoornissen meestal na 3 tot 6 dagen tot de dood. Het bewustzijn en het pijngevoel worden niet aangetast (van Ermengem, 1897; Foster *et al.*, 1965).

Bij dieren verloopt het ziektebeeld in grote lijnen op dezelfde wijze. Bij paarden en runderen overheerst het beeld van spinaal- of bulbaire paralyse. De tongverlamming is bij runderen soms een opvallend verschijnsel, evenals het sterke speekselen door verlamming van de pharynx. De lust om te eten of te drinken is soms nog wel aanwezig (Henning, 1956; Koopman *et al.*, 1971).

Bij nertsen treedt het verdwijnen der agressiviteit nogal op de voorgrond (Quortrup en Gorham, 1949).

Als belangrijkste ziekteverschijnselen bij watervogels – en vogels in het algemeen – worden genoemd: verlamming van de vleugelspijeren, poot- en halsspieren (waardoor de z.g. "limberneck" optreedt); het onvermogen geluid te maken; verdwijnen van de ooglidreflex; ten slotte treden ademhalingsmoeilijkheden op, waarna de dieren uiteindelijk in coma sterven (o.a. Hobmaier, 1930; Pullar, 1934; Niléhn en Johannsen, 1965; Haagsma *et al.*, 1971).

Het ziekteverloop is sterk afhankelijk van de hoeveelheid opgenomen toxine. Bij opname van een veelvoud van de letale dosis zal het ziekteproces acuut verlopen, terwijl bij kleinere hoeveelheden toxine zich een meer chronisch ziektebeeld gaat ontwikkelen, dat zich over één of meerdere weken kan uitstrekken. Bij de mens kan het herstel verscheidene maanden vergen (Foster *et al.*, 1965), bij watervogels duurt het korter nl. één tot twee weken.

De symptomatologie schijnt onafhankelijk te zijn van het toxinetype; er bestaat echter wel een duidelijk verschil in gevoeligheid bij de verschillende diersoorten voor de 6 toxinetypen.

## 2.1.5. Post-mortem bevindingen

### 2.1.5.1. Macroscopische veranderingen

In het algemeen wordt aangenomen dat bij het macroscopisch onderzoek geen typische afwijkingen zijn waar te nemen bij botulismus. In sommige gevallen wordt een hyperaemie van de lever, de nieren of de meninges vastgesteld (van Ermengem, 1897; Wilson en Miles, 1957; Simmons en Tammemagi, 1965). Indien andere macroscopisch waarneembare afwijkingen – b.v. een verslikpneumonie – zijn waargenomen, dienen deze als secundair te worden beschouwd (Lamanna, 1959).

Bij "lamsiekte" kan de aanwezigheid van skeletdelen en andere corpora aliena in de digestietractus een aanwijzing zijn dat de dieren aan pica hebben geleden (Henning, 1956).

Bij watervogels worden evenmin pathognomonische laesies waargenomen (Hobmaier, 1930; Pullar, 1934; Niléhn en Johannsen, 1965). Alleen Dobberstein en Piening (1933) beschrijven dat zij bloedingen en necrosehaardjes in de hersenen hebben aangetroffen bij zwanen, die aan botulismus zouden zijn gestorven. In dit geval is de diagnose echter onvoldoende geweest: deze steunde op het aantonen van *Cl. botulinum* type A in de lever, milt en het maagdarmlkanaal, zonder dat het botulinumtoxine in de kadavers werd vastgesteld.

#### 2.1.5.2. Histologische veranderingen

Bij overleden botulismuspatiënten worden geen histologische veranderingen waargenomen, noch in de parenchymateuze organen, noch in het centrale zenuwstelsel. Bij opname van grote concentraties toxine vormt bovendien het snelle ziekteverloop een verklaring voor de afwezigheid van histopathologische veranderingen (Lamanna, 1959).

Bij zeer chronische gevallen van botulismus zijn veranderingen van de spiervezels waargenomen. Aan de motorische eindplaten werden aanvankelijk geen veranderingen vastgesteld. Dit gelukte Duchon en Strich (1968) wel bij muizen en caviae na de intramusculaire toediening van subletale hoeveelheden toxine; na 7 tot 14 dagen werden de eerste veranderingen gezien, na 2 tot 5 weken waren deze maximaal. De belangrijkste veranderingen waren: atrophie van de spiervezelen en woekering van de motorische zenuwuiteinden. De afwijkingen zouden een reactie zijn op het verbreken van de neuromusculaire transmissie en geen regeneratieproces. Het herstel trad pas op na 10 tot 36 weken.

#### 2.1.6. Diagnostiek

De symptomen bij botulismus zijn zowel bij de mens als de dieren vaak zo karakteristiek dat de diagnose op grond van de klinische verschijnselen met redelijke zekerheid kan worden gesteld.

De bevestiging van de klinische diagnose vindt in het laboratorium plaats; hierbij is zowel op de aanwezigheid van het botulinumtoxine als op het oorzakelijke micro-organisme te letten. Voor een betrouwbare diagnose is de isolatie van *Cl. botulinum* niet voldoende, hiervoor dient het toxine te worden aangetoond, dat vervolgens door middel van een serumneutralisatietest is te typeren. *Cl. botulinum* kan nl. ubiquitair voorkomen, zodat voedsel – vooral groenten en fruit – vaak reeds kiemhoudend kunnen zijn. Aan de isolatie van *Cl. botulinum* uit voedsel of maagdarminhoud van botulismuspatiënten kan dan ook geen doorslaggevende diagnostische waarde worden toegekend (Dubovsky en Meyer, 1922a; Meyer en Dubovsky, 1922a; Dubovsky en Meyer, 1922b; Henning, 1956; Sterne en Thomson, 1963; Müller, 1967b).

Het aantonen van het botulinumtoxine stuit vaak op grote moeilijkheden, vooral als het verdachte voedsel niet meer is te achterhalen. Men is dan



aangewezen op bloed, maaginhoud, braaksel of urine van de patiënt. Bij dodelijk verlopende ziektegevallen kan ook getracht worden het toxine aan te tonen in de maagdarminhoud of in de lever, eventueel aangevuld met andere organen. Bij de grote huisdieren zou het onderzoek van de lever de beste kans op succes geven (Prévot en Brygoo, 1953; Henning, 1956; Wilson en Miles, 1957). Bij vogels – speciaal kippen, pauwen, fazanten en kalkoenen – zouden volgens Gross en Smith (1971) bloed en kropinhoud in de eerste plaats moeten worden onderzocht. Blandford en Roberts (1970) vonden dat bij kippen onderzoek van bloedserum is te prefereren boven dat van de spiermaaginhoud.

Bij watervogels schijnt het botulinumtoxine eveneens bij voorkeur te worden aangetoond in het bloed (Jensen en Gritman, 1967; Blandford *et al.*, 1969).

Meerdere schrijvers wijzen er op dat in een deel van de botulismusegevallen het toxine niet meer is aan te tonen. Deze moeilijkheid zou zich vooral voordoen in de chronisch verlopende ziektegevallen, waarin nauwelijks één letale dosis van het toxine is opgenomen. Er resteert dan voor de diagnostiek te weinig vrij toxine in het bloed, terwijl uit de inhoud van het maagdarmkanaal het toxine reeds is verdwenen, omdat dit snel wordt geabsorbeerd. Een negatief verloop van het toxine-onderzoek bewijst dus niet dat de diagnose "botulismus" moet worden uitgesloten (Prévot en Brygoo, 1953; Henning, 1956; Gross en Smith, 1971).

Sinds de onderzoekingen van van Ermengem (1897) geschiedt het aantonen van het botulinumtoxine met behulp van laboratoriumproefdieren, speciaal muizen. Dit is nog steeds de meest betrouwbare en gevoeligste methode. Quantitatief onderzoek wordt uitgevoerd door muizen intraperitoneaal met een serie verdunningen van het toxische materiaal in te spuiten.

Andere methodieken, zoals de hemagglutinatietest, de hemagglutinatie inhibitietest, de bentoniet flocculatietest, de agargelprecipitatietest volgens Ouchterlony en de immunofluorescentietechniek blijken minder gevoelig of minder specifiek te zijn (Riemann en Genigeorgis, 1971; Sakaguchi *et al.*, 1971).

Bij enkele toxinetypen, met name de typen E en F, kan de diagnostiek worden verfijnd, omdat de toxische activiteit door trypsinisatie wordt verhoogd (Duff *et al.*, 1956; Gerwing *et al.*, 1965; Eklund *et al.*, 1967).

Bij patiënten, die herstellen, kan getracht worden antitoxinen in het bloed aan te tonen; de kans op een positief resultaat schijnt klein te zijn (Wilson en Miles, 1957; Gross en Smith, 1971).

### 2.1.7. Prophylaxe en therapie

Een therapeutische behandeling van botulismuspatiënten biedt slechts beperkte mogelijkheden. Het toxine dat de neuro-musculaire prikkeloverdracht blokkeert, is onbereikbaar. Het succes van een behandeling met antitoxine is dan ook problematisch en bij de mens voornamelijk een psychotherapeutische

maatregel; het antitoxine kan hoogstens werkzaam zijn tegen toxine dat circuleert of nog uit de digestietractus wordt geresorbeerd. Daarbij is de keuze van het juiste antitoxine-type nog een extra complicatie (Henning, 1956; Lamanna, 1959).

Kalmbach (1968) vermeldt echter dat de behandeling met antitoxine type C bij watervogels die aan botulismus lijdten, wel succesvol is; zelfs bij ernstig aangetaste vogels had deze therapie waarde. Haagsma *et al.* (1971) constateerden eveneens goede resultaten bij wilde eenden en talingen.

Bij botulismusuitbraken op nertsenfarms is met de toediening van antitoxine ook een gunstig effect waargenomen, indien de behandeling kort na het begin van de ziekteuitbraak kon worden ingezet (Haagsma, 1965).

Het toedienen van snelwerkende laxantia wordt eveneens aanbevolen, eventueel te combineren met maagspoelingen.

Het botulinumtoxine blijkt *in vitro* te worden geïnactiveerd door jodium, kaliumpermanganaat en alcohol (Wilson en Miles, 1957). Over het effect *in vivo* zijn geen betrouwbare gegevens gevonden. Burke *et al.* (1921) vermelden, dat de absorptie van het toxine is tegen te gaan door de toediening van olijfolie met vloeibare zeep.

Bij de bestrijdingsmaatregelen moet bij botulismus het accent vooral op de prophylaxe worden gelegd.

Preventieve vaccinatie wordt algemeen toegepast bij runderen in Zuid-Afrika in lamsiekte-streken (Henning, 1956), bij schapen en runderen in Australië (Bennetts en Hall, 1938) en bij farmnertsen. Bij andere diersoorten is dit niet gebruikelijk vanwege het incidentele voorkomen; hetzelfde geldt voor de mens. De wijze van conservering en de hygiënische behandeling van het voedsel vooraf wordt dan van het grootste belang.

Botulismus was bij de opkomst van de conservenindustrie het zwaard van Damocles. Daarom werd in deze periode aan de bacteriologie van *Cl. botulinum* veel aandacht geschonken, speciaal aan de thermoresistentie van de sporen (Burke, 1923; Gunnison en Meyer, 1929; Meyer en Gunnison, 1929a, 1929b; Townsend, 1929; Meyer, 1956).

Henning (1956) noemt bij "lamsiekte" verder als aanvullende prophylactische maatregelen het verwijderen van kadavermateriaal en het voorkomen van de osteophagie door toediening van beendermeel.

De bestrijding van botulismus op fazantenfokkerijen is vooral gebaseerd op het verwijderen van de kadavers, voordat deze met maden van sarcophaga vliegen zijn bezet (Boroff en Reilly, 1962; Fish *et al.*, 1967). Laatstgenoemden bestreden de ziekte ook met behulp van toxoid-vaccinaties, zonder dat dit een gunstig resultaat opleverde; zij veronderstelden dat de immunologische verschillen tussen C $\alpha$  en C $\beta$  verantwoordelijk waren voor dit negatieve resultaat. Boroff en Reilly (1959) hadden reeds experimenteel aangetoond dat met intraperitoneale injecties van toxoid een actieve immuniteit kan worden opgewekt bij

fazanten en eenden.

Bij watervogels is de prophylaxe een zeer moeilijke aangelegenheid. Dit blijkt uit het gegeven dat in de U.S.A. sinds 1910 vrijwel elk jaar grote aantallen vogels aan botulismus sterven, vaak jaar na jaar in dezelfde gebieden. Men tracht door een betere beheersing van de waterhuishouding te voorkomen dat grote moddervlakten bedekt worden met een dun laagje water. Het was nl. opgevallen dat in aansluiting hierop vaak grote botulismusuitbraken volgden (Kalmbach, 1968).

## 2.2. BIJZONDER GEDEELTE

### 2.2.1. De etiologie van botulismus bij watervogels

De eerste onderzoeken zijn in de Verenigde Staten verricht, toen men de etiologie van "Western duck sickness" trachtte op te helderen; een goed overzicht is gegeven door Kalmbach (1968). De eerste massale sterfte bij watervogels – speciaal eenden – die zich in 1910 in Salt Lake Valley voordeed, is niet nader onderzocht. In 1911 werd bij dode eenden, afkomstig uit dezelfde streek, de voorlopige diagnose darmcoccidiosis gesteld; deze uitspraak werd later herroepen. Wetmore, wiens werkterrein ook in Salt Lake Valley lag, veronderstelde in 1915 dat de sterfte veroorzaakt werd door te hoge zoutconcentraties in het water en sprak van "alkaline poisoning".

In de jaren 1925 tot 1927 werd de juistheid van deze theorie twijfelachtig omdat toen in Canada dezelfde "duck sickness" werd vastgesteld in watergebieden zonder dat er sprake was van een hoog zoutgehalte van het water. Intussen had Bengston (1922) *Cl. botulinum* type C ontdekt en hadden Graham en Boughton (1924) bij kippen en tamme eenden met "limberneck" botulinumtoxine type C aangetoond. De overeenkomst in het ziektebeeld van "limberneck" en "Western duck sickness" leidde tot nieuwe inzichten omtrent de etiologie van "Western duck sickness"; in een serie onderzoeken werd daarna bewezen dat de massale sterfte bij watervogels in Salt Lake Valley en elders inderdaad veroorzaakt werd door botulinumtoxine type C (Kalmbach, 1930; Hobmaier, 1930; Giltner en Couch, 1930; Kalmbach, 1932). Het C-toxine bleek in toxine-antitoxine testen immunologisch overeen te komen met het door Bengston (1922) geïsoleerde type C $\alpha$ -toxine (Kalmbach, 1932). Gunnison en Coleman (1932) toonden vervolgens aan in een vergelijkend onderzoek met type C $\alpha$  en type C $\beta$  dat de geïsoleerde "duck strain" in morfologische, culturele, toxicologische en serologische eigenschappen overeenkwam met *Cl. botulinum* type C $\alpha$ . Er is daarna steeds aangenomen dat botulismus bij watervogels in de Verenigde Staten door type C $\alpha$  wordt veroorzaakt (Jensen en Gritman, 1967).

Naar aanleiding van de resultaten, verkregen in vergelijkende neutralisatie-

testen met *Cl. botulinum* type C $\alpha$  (NCTC 8264) en *Cl. botulinum* type C $\beta$  (NCTC 3732), besloot Grubb (1964) dat de botulismusuitbraken in West-Australië (Perth) eveneens door type C $\alpha$  werden veroorzaakt. De massale sterfte door botulismus, die in 1932 in Zuid-Oost-Australië (Victoria) voorkwam, werd daarentegen door Pullar (1934) aan type C $\beta$  toegeschreven.

Van de botulismusuitbraken bij watervogels, die vanaf 1965 in Europa zijn vastgesteld, wordt alleen gemeld dat zij door type C zijn veroorzaakt, zonder dat een definitieve uitspraak over het subtype (C $\alpha$  of C $\beta$ ) wordt gedaan (Niléhn en Johannsen, 1965; Müller, 1967; Blandford *et al.*, 1969; Haagsma *et al.*, 1971).

In navolging van de algemeen aanvaarde mening is steeds aangenomen dat bij watervogels opname van reeds gevormd (preformed) toxine plaatsvindt. De experimenten van Gunnison en Coleman (1932) bevestigen deze mening.

In zijn discussie stelt Grubb (1964) echter ook de mogelijkheid van toxinevorming *in vivo* aan de orde. Boroff en Reilly (1962) komen in hun onderzoek bij fazanten en dwergsterns tot dezelfde gedachte en spreken van toxinevorming *de novo*. Zij vonden herhaaldelijk *Cl. botulinum* type C in de lever van vogels, als deze in het eindstadium van botulismus werden afgemaakt. Er zou dan niet alleen sprake zijn van een toxinaemie, maar ook van een bacteriaemie; toxinevorming zou dan kunnen plaatsvinden door clostridia – die als vegetatieve kiemen of als sporen waren opgenomen – in de digestietractus of in andere organen waar zij vanuit de digestietractus waren terechtgekomen.

In oudere publicaties is ook reeds vermeld dat *Cl. botulinum* type C werd aangetoond in de organen van watervogels (vooral eenden) tijdens botulismusuitbraken (Hobmaier, 1930; Giltner en Couch, 1930; Gunnison en Coleman, 1932). Dat men toch meende dat opname van "preformed" toxine plaatsvindt, is toe te schrijven aan de omstandigheid dat *Cl. botulinum* ook in de lever van herstelde of anderszins gestorven eenden werd aangetroffen (Hobmaier, 1930; Gunderson, 1933), terwijl bovendien in het milieu van de botulismusgebieden toxine kon worden aangetoond (Kalmbach, 1932).

### 2.2.2. De epidemiologie van botulismus bij watervogels

De epidemiologie van een ziekte behandelt het ontstaan en het verloop van een snel om zich heen grijpende infectieziekte. Daar botulismus een intoxicatie is, veroorzaakt door de consumptie van toxisch voedsel, zal er gewoonlijk sprake zijn van ziekte-uitbraken met een meer beperkte omvang, waarbij zich geen secundaire gevallen voordoen omdat de ziekte op zich zelf niet besmettelijk is. Dit beeld geldt met name voor de mens. Maar bij dieren doet zich bij botulismus vaak een geheel andere situatie voor, waarbij wel secundaire ziektegevallen optreden. Gegevens uit de literatuur wijzen er op dat dit o.a. bij watervogels het geval is (Kalmbach, 1930). Voor het verkrijgen van een juist inzicht in de

epidemiologie van botulismus bij watervogels is het noodzakelijk de dosis letalis voor de verschillende vogelsoorten te leren kennen, de wijze waarop deze vogels het toxine opnemen en de omstandigheden waaronder de productie van het toxine plaatsvindt.

Gunnison en Coleman (1932) hebben toxiciteitsproeven verricht bij wilde pijlstaarteenden. De perorale letale dosis bedroeg voor het C $\alpha$ -toxine ruim 100.000, voor het C $\beta$ -toxine stam Seddon ongeveer 10.000, en voor het C $\beta$ -toxine stam Heller uit Zuid-Afrika 120.000 subcutane MLD voor caviae. Bij dit onderzoek bleken pijlstaarteenden dus het gevoeligst te zijn voor het C $\beta$ -toxine stam Seddon.

Boroff en Reilly (1959), die met C $\beta$ -toxine, stam Prévot en Brygoo uit Frankrijk werkten, vermelden dat de orale LD<sub>50</sub> voor wilde eenden overeenkwam met 1 orale muis LD<sub>50</sub>, terwijl de intramusculaire dosis 500 intramusculaire muis LD<sub>50</sub> bedroeg.

Voor de opname van het toxine uit het milieu lijken tijdens ziekte-uitbraken voldoende mogelijkheden aanwezig te zijn; het toxine is aangetoond in kadavers van watervogels, in diverse invertebraten, in water en slib en in rottend plantaardig materiaal. Vooral de bevindingen van Kalmbach (1932) zijn van groot belang; hij toonde het botulinumtoxine type C $\alpha$  aan in de kadavers van gestorven vogels, in slib in de onmiddellijke omgeving van de kadavers, in het water van ondiepe plassen, in dode en levende maden van sarcophage vliegen en in mengmonsters bestaande uit overblijfselen van insecten, poppen, slakken, algen en kroos. In Australië kon Pullar (1934) botulinumtoxine aantonen in water en slib van botulismusegebieden. Het onderzoek van Quortrup en Holt (1940) leerde dat de pH en de zuurstofconcentratie van groot belang zijn bij de productie van botulinumtoxine in het milieu van de botulismusegebieden. Met behulp van deze parameters konden zij plaatsen aanwijzen waar het water minstens 1 MLD voor muizen bevatte. De juiste concentratie van het toxine werd echter niet bepaald. Deze onderzoekers stellen verder dat in rottend plantaardig materiaal een goede productie van het C-toxine mogelijk is: 10 tot 20 ml water bleek onder experimentele omstandigheden een letale dosis te bevatten voor pijlstaarteenden en talingen. Ook de samenstelling van de microflora in het betreffende gebied bleek een belangrijke rol te spelen. Volgens Quortrup en Sudheimer (1943) zou *Pseudomonas aeruginosa* de groei van *Cl. botulinum* type C bevorderen, terwijl andere micro-organismen (b.v. *E. coli*) een antagonistische werking hebben.

Gegevens omtrent de concentratie van het toxine zijn zeer schaars, zodat niet is vast te stellen welk toxisch materiaal bij de epidemiologie van botulismus de belangrijkste rol speelt. Richardson *et al.* (1965) vermelden dat zij in extracten van maden van de vlieg *Phaenica* (Syn. *Lucilia*) *sericata*, verzameld tijdens een botulismusuitbraak bij eenden, 20.000 tot 200.000 intraperitoneale muis LD<sub>50</sub>

per ml konden aantonen.

Andere onderzoekers in de Verenigde Staten (Anon., 1965) toonden aan dat maden, afkomstig uit de kadavers van vissen – vooral karpers – minstens 8.000 muis intraperitoneale MLD per gram bevatten.

Pullar (1934) vermeldt dat de concentratie van het toxine in water en slib voldoende was om een cavia per os te doden.

Uit de experimenten van Kalmbach (1930) blijkt dat 0,5 tot 1 gram oraal verstrekt kadavermateriaal – vooral lever – van een aan botulismus gestorven eend, voldoende was om een fataal verlopend ziektebeeld bij gezonde eenden op te wekken; 0,1 tot 0,05 gram veroorzaakte nog wel ziekteverschijnselen, maar de vogels herstelden na 4 tot 6 dagen. Het epidemiologisch karakter van botulismus bij watervogels werd door Kalmbach reeds aangetoond, toen hij op deze manier het ziektebeeld 5 maal kon passeren, waarbij in de 5e passage nog geen verlies van de toxiciteit leek te zijn opgetreden.

Voor het optreden van massale sterfte bij watervogels door botulismus, is de aanwezigheid van grote concentraties toxine noodzakelijk. Bij de productie hiervan spelen de ecologische omstandigheden een belangrijke rol. Grubb (1964) stelt dat een maximale toxineproductie afhankelijk is van de temperatuur, de mate van anaërobie en de aanwezigheid van geschikt organisch materiaal voor de bacteriële groei; of in dat geval letale doses toxine aanwezig blijven zal afhankelijk zijn van de regenval, de hoogte van het waterpeil, van stromingen en golfbewegingen in het water en van de afbraak door antagonistisch werkende bacteriën.

Zowel in Noord-Amerika als in Australië trad botulismus op tijdens het zomerseizoen en het begin van de herfst; speciaal hete en droge zomers schijnen predisponerend te zijn. Hetzelfde geldt voor stilstaand water bij een zeer lage waterstand, b.v. droogvallende slikgebieden (Kalmbach, 1930; Pullar, 1934; Grubb, 1964; Anon., 1965).

De botulismusuitbraken, die in Europa zijn beschreven, deden zich ook voor in het warme jaargetijde. Afwijkend van de Noord-Amerikaanse omstandigheden is echter dat de ziekte zich vooral heeft voorgedaan in meren, plassen, vijvers en kanalen, waar de waterstand normaal was; soms was er sprake van stilstaand water (Niléhn en Johannsen, 1965; Müller, 1967a en 1972; Blandford *et al.*, 1969; Haagsma *et al.*, 1971; Keymer *et al.*, 1972; Roberts *et al.*, 1972).

Voor het verkrijgen van voldoende inzicht in de epidemiologie van botulismus kunnen verder de experimenten van Jensen en Gritman (1967) van belang zijn. Zij constateerden dat wilde eenden en meeuwen (*Larus californicus*) aan een subletale dosis van het C-toxine stierven als aan de vogels gelijktijdig een subletale dosis E-toxine werd toegediend. In 1964 en 1965 was tijdens massale sterfte van watervogels (vooral meeuwen en futen) in het Michiganmeer reeds E-toxine aangetoond in de kadavers van deze vogels (Kaufmann en Fay, 1964; Fay *et al.*, 1965). Het is volgens Jensen en Gritman (1967) nog niet mogelijk de

praktische betekenis van deze "dubbele intoxicatie" voor de epidemiologie van botulismus bij watervogels te overzien.

Steunend op oude onderzoeken van Behring (1893) is door Matveev (1959) een belangwekkend fenomeen gepubliceerd. Matveev beschrijft dat hij – werkend met A-toxine – experimenteel botulismus bij kleine proefdieren (muizen, caviae en konijnen) heeft veroorzaakt door de toediening van multiële, subletale doses toxine; hierbij lag de som van de subletale doses ver beneden de dosis letalis bij een eenmalige applicatie.

Kennis omtrent het voorkomen van *Cl. botulinum*, speciaal van type C, is eveneens nodig om een goed inzicht te verkrijgen in de factoren die bij het ontstaan van botulismusuitbraken een rol spelen. Diverse onderzoekers hebben *Cl. botulinum* type C aangetoond in gebieden waar botulismus optrad. In de kadavers van watervogels, die aan botulismus waren gestorven, werd de aanwezigheid van type C aangetoond door Giltner en Couch (1930), Hobmaier (1930), Gunnison en Coleman (1932) en Shaw en Simpson (1936) in Noord-Amerika, door Pullar (1934) en Grubb (1964) in Australië. *Cl. botulinum* type C werd verder aangetoond in slijk van het botulismusegebied door Giltner en Couch (1930), Grubb (1964), Anon. (1965), Blandford *et al.* (1969) en Haagsma *et al.* (1971).

In invertebraten is *Cl. botulinum* ook aangetoond. Bengston (1922) isoleerde de eerste type C-cultuur uit maden van *Lucilia caesar* tijdens botulismusevallen bij kippen. Kalmbach (1932) toonde type C aan in dode larven en poppen van waterkevers en in de overblijfselen van niet nader genoemde insecten. Gunderson (1935) demonstreerde de aanwezigheid van *Cl. botulinum* type C in larven van de waterkever *Enochrus Hamiltoni* Horn.

Over het voorkomen in Nederland van *Cl. botulinum* in de natuur is slechts weinig bekend. Het is verrassend dat de oudste gegevens uit de U.S.A. komen: Meyer en Dubovsky (1922b) onderzochten 10 grondmonsters van grasland, die hun waren toegezonden door Prof. D.A. de Jong uit Leiden. In 2 monsters, afkomstig uit Drente en Gelderland, werd *Cl. botulinum* type B aangetoond; 4 andere monsters uit Friesland, Zuid-Holland, Noord-Brabant en Zeeland waren eveneens toxisch, doch het toxine kon niet worden getypeerd met de toen beschikbare antitoxinen type A en B.

Bij een humaan geval van botulismus in Zuid-Limburg isoleerden Schoonhoven van Beurden en Clarenburg (1937) *Cl. botulinum* type B.

Naast type B blijkt ook type C in Nederland voor te komen. De botulismusuitbraken op nertsenfarms werden steeds door het botulinumtoxine type C veroorzaakt (Akkermans, 1961; Haagsma, 1965). *Cl. botulinum* type C werd later in reïncultuur geïsoleerd uit gevallen van botulismus bij paarden (Haagsma, 1968), runderen (Haagsma, 1969; Koopman *et al.*, 1971) en watervogels (Haagsma *et al.*, 1971).

### 2.3. SAMENVATTING

Uit de literatuurgegevens blijkt dat botulismus vrijwel mondiaal voorkomt. Bij de mens zal bij botulismusuitbraken gewoonlijk slechts een beperkt aantal patiënten zijn betrokken; dit is bij dieren ook vaak het geval.

Bij dieren kan echter ook massale sterfte optreden, waarbij de ziekte een epidemisch karakter krijgt. Dit ziektebeeld ontwikkelt zich heel duidelijk als botulismus onder bijzondere omstandigheden optreedt bij watervogels. Algemeen wordt aangenomen dat botulismus veroorzaakt wordt door de opname van "preformed" toxine, alhoewel het bij dieren soms moeilijk is hiermede het ontstaan van alle ziektegevallen aannemelijk te maken. Voor de vorming van toxine *in vivo* of *de novo* zijn bij dieren geen betrouwbare gegevens bekend geworden.

De toxinetypen C en D blijken vooral verantwoordelijk te zijn voor het optreden van botulismus bij dieren. Er is steeds aangenomen dat botulismus bij watervogels uitsluitend door *Cl. botulinum* type C zou worden veroorzaakt; recente onderzoekingen wijzen er echter op dat type E ook een rol kan spelen bij de epidemiologie van botulismus. De differentiatie van *Cl. botulinum* type C in de subtypen C $\alpha$  en C $\beta$  blijkt tal van moeilijkheden op te leveren; de gegevens van oudere publicaties dienen dan ook zeer voorzichtig te worden beoordeeld.

Met betrekking tot de symptomatologie, de pathologische anatomie en de pathogenese is er weinig verschil van mening.

De diagnostiek van botulismus daarentegen blijkt niet altijd zonder problemen te zijn, zodat men in sommige gevallen niet aan alle noodzakelijke diagnostische criteria heeft kunnen voldoen. Bij de interpretatie van bijzondere botulismusgevallen bij mens en dier dient men dan ook zeer kritisch te zijn. Dit geldt zowel voor het optreden van ziektegevallen bij refractaire diersoorten als voor het optreden van botulismusgevallen door afwijkende toxinetypen, b.v. type C of D bij de mens, type B bij paarden en type A of E bij watervogels.

In de kennis van de etiologie en de epidemiologie van botulismus bij watervogels blijken nog tal van hiaten aanwezig te zijn, zodat op veel vragen geen duidelijk antwoord kan worden gegeven. Er lijken ook ecologische verschillen te bestaan tussen de botulismusgebieden in de Verenigde Staten en in Nederland.

Over het voorkomen van *Cl. botulinum* in Nederland – een belangrijk gegeven om het inzicht in de epidemiologie van botulismus te verdiepen – zijn slechts enkele, deels sterk verouderde, gegevens bekend.



## HOOFDSTUK III

### MATERIALEN EN METHODIEKEN

In dit hoofdstuk worden de materialen en laboratoriumtechnieken beschreven, die in de loop van het onderzoek geregeld werden toegepast.

De technieken die slechts voor één bepaald aspect van het onderzoek zijn gebruikt, zijn in het betreffende hoofdstuk opgenomen.

#### 3.1. MATERIALEN

##### 3.1.1. Voedingsmedia

Voor de groei van *Cl. botulinum* werd zowel van vloeibare als van vaste voedingsmedia gebruik gemaakt.

*Cl. botulinum* behoort tot de obligaat anaërobe kiemen, zodat de groei steeds in een streng anaëroob milieu dient plaats te vinden.

##### 3.1.1.1. Vloeibare voedingsmedia voor anaërobe kweek

Voor de groei in vloeibare media werden leverpartikelbouillon, vleespartikelbouillon, het medium volgens Cardella *et al.* (1958) en fortified egg meat medium volgens Segner *et al.* (1971) gebruikt.

##### *Leverbouillon*

Tien liter van dit medium werd op de volgende wijze bereid:  
Vijf kg kalfslever, afkomstig van 3 of 4 verschillende dieren, werd in grote stukken gesneden en gedurende ongeveer 1 uur in 2,5 liter vleesinfuus gekookt, tot de rode kleur van de lever verdwenen was. De stukken lever werden nu uit de "leverbouillon" gehaald, ontdaan van minder goede delen, in dobbelsteentjes van 0,5 bij 0,5 cm gesneden en daarna in leidingwater gewassen, totdat het bovenstaande water geen zwevende stukjes lever meer bevatte.

De "leverbouillon" werd vervolgens met rundvleesbouillon tot 10 liter aangevuld, de pH met 4N natronloog op 8,5 gebracht, 15 min. op 100°C verhit en na afkoelen door kaasdoek gefiltreerd. Hierna werd de "leverbouillon" door dubbele papieren Whatman filters gefiltreerd. De pH werd nu met 4N natronloog op 8 gebracht, waarna het medium in hoeveelheden van 10 ml over cultuurbuizen (160 x 16 mm) werd verdeeld. Aan elke cultuurbuis "leverbouillon" werden tenslotte 3 tot 4 stukjes lever toegevoegd en daarna werd de leverpartikelbouillon – ook wel lever-leverbouillon of kortweg leverbouillon genoemd – gedurende 30 min. bij 120°C gesteriliseerd.

Het vleesinfuus, dat bij de bereiding van de leverbouillon was gebruikt, werd als volgt gemaakt:

Voor 10 liter infuus werd 5 kg mager ribvlees van runderen in kleine stukken gesneden en daarna fijn gemalen in een vleesmolen. Het gemalen vlees werd overgebracht in 10 liter leidingwater en na 20 uur bij 4°C bewaren onder voortdurend roeren aan de kook gebracht. De grove stukken vlees werden in een vergiet verwijderd en de resterende vloeistof werd opgekookt en gefiltreerd door een gesteriliseerde doek.

Runderbouillon werd verkregen door aan het vleesinfuus 1% bacto-pepton (Difco) en 0,5% natriumchloride toe te voegen, waarna de pH op 7,6 werd gebracht.

#### *Vleespartikelbouillon*

Hiervoor werd Cooked Meat Medium (Difco 0267-01) gebruikt, waarvan de volgende samenstelling wordt opgegeven:

Een liter medium bevat 454 g runderhart in de vorm van kleine stukjes vlees, 20 g proteose pepton (Difco), 2 g dextrose en 5 g natriumchloride. De pH dient bij 25°C 7,2 te bedragen. Het Cooked Meat Medium (CMM) werd bereid met aqua destillata, vervolgens in hoeveelheden van 10 ml over cultuurbuizen verdeeld en in de autoclaaf gedurende 15 min. bij 120°C verhit.

#### *Cardella-medium*

Dit vloeibare medium, dat geen stukjes lever of vlees bevat, werd bereid volgens de gegevens van Cardella *et al.* (1958). Een liter medium bevat 20 g NZ. Case peptone (pancreatic digest of casein, Sheffield Chemical, Norwich, N.Y.), 40 g proteose-pepton (Difco), 20 g gistextract (Difco) en 10 g glucose. De pH wordt op 7,8 gebracht en de sterilisatie vond plaats met behulp van passage door een Seitzfilter.

#### *Fortified Egg Meat medium*

Dit medium – voortaan kortweg FEM genoemd – werd samengesteld volgens de richtlijnen van Segner *et al.* (1971).

Een liter van het medium bevat 150 g egg meat medium, 10 g gistextract, 10 g

ammoniumsulfaat en 10 g glucose. De sterilisatie vond plaats gedurende 15 min. bij 120°C en de pH dient hierna 7,0 tot 7,2 te zijn.

De samenstelling van het egg meat medium wordt als volgt opgegeven:  
454 g rundvlees, het wit van 6 eieren en 5 g calciumcarbonaat.

### 3.1.1.2. Vaste voedingsmedia voor anærobe kweek

Voor de groei van *Cl. botulinum* op vaste voedingsbodems werd gebruik gemaakt van hartinfuus-schapebloedagarplaten, glucose-runderbloedagarplaten, Reinforced Clostridium Medium en brain heart runderbloedagarplaten.

#### *Hartinfuus-schapebloedagarplaten (HIS)*

Deze voedingsbodem werd bereid met behulp van Bacto Heart Infusion Agar (Difco 0044-01). Een liter bevat 500 g infuus van runderhart, 10 g bacto-tryptose, 5 g natriumchloride en 15 g bacto-agar.

Voor de bereiding van de bloedplaten werd 40 g medium in 1000 g koude aqua destillata opgelost door verwarmen tot het kookpunt. Hierna werd het medium in de autoclaaf gesteriliseerd gedurende 15 min. bij 120°C; na afkoeling tot 45°C werd 5% gedefibrineerde schapebloedcellen toegevoegd. Na goed mengen werd het medium lege artis in steriele petrischalen gegoten.

#### *Glucose-runderbloedagarplaten*

Deze bloedplaten, ook wel Zeissler-platen genoemd, bevatten 1% glucose, 2% agar en 10% gedefibrineerde runderbloedcellen.

#### *Reinforced Clostridium Medium (RCM)*

Dit medium werd bereid naar gegevens van Hirsch en Grinstead (1954) en is speciaal aanbevolen voor de groei van clostridia.

Eén liter medium bevat 3 g bacto-gistextract, 10 g pepton (Evans), 10 g vleesextract (Lab-Lemco), 8,34 g 60% natriumlactaat, 5 g natriumacetaat, 1 g oplosbaar zetmeel, 20 g bacto-agar en 50 ml 1% cysteïne HCl oplossing. Hieraan werden 5% gedefibrineerde schapebloedcellen toegevoegd.

#### *Brain heart runderbloedagarplaten (BHR)*

Als basis voor dit groeimedium diende bacto-brain heart infusion (Difco 0037-01). De ingrediënten per liter zijn:

Infuus van kalverhersen	200	g
Infuus van runderhart	250	g
Proteose pepton (Difco)	10	g
Bacto-dextrose	2	g
Natriumchloride	5	g
Dinatriumfosfaat	2,5	g

Bij de bereiding werd 37 g medium opgelost in 1 liter aqua destillata. Hieraan

werd 2% bacto-agar en 5% runderbloed toegevoegd. De pH is 7,4 bij 25°C.

### 3.1.1.3. Andere voedingsmedia

Deze media werden gebruikt bij het onderzoek van de biochemische eigenschappen van de geïsoleerde *Cl. botulinum*-stammen.

#### *Carbohydraatmedia*

Deze media werden aangewend bij de bestudering van de fermentatie van carbohydraten. Hierbij werd gebruik gemaakt van het volgende basismedium (voorschrift voor de bereiding van 1 liter):

Bacto-gistextract	7	g
Bacto-casiton	15	g
L-cystine (Difco)	0,25	g
Natriumchloride	2,5	g
Thioglycolzuur	0,3	g
Bacto-agar	0,75	g

Aan dit basismedium werd 5 g van het gewenste koolhydraat toegevoegd. Het medium werd afgevuld in cultuurbuizen (8 ml per buis) en gedurende 15 min. gesteriliseerd op 110°C. De pH dient 7,2 tot 7,4 te bedragen. Als indicator werd een oplossing van 0,8% broomthymolblauw in 96% alcohol gebruikt, die echter pas na het incuberen in de hoeveelheid van 0,1 ml werd toegevoegd.

#### *Gelatine medium*

Voor het aantonen van het enzym gelatinase werd gebruik gemaakt van bacto-nutrient gelatine.

De ingrediënten voor 1 liter medium zijn:

Bacto-beefextract	3	g
Bacto-pepton	5	g
Bacto-gelatine	120	g

De bereiding vond plaats volgens de voorschriften van de fabrikant.

#### *Lakmoesmelk*

De samenstelling van dit medium was als volgt:

Vetvrije rauwe ondermelk	1.000	ml
Runderbouillon	30	ml
Lakmoestinctuur p.a.	50	ml

De pH dient 6,8 te bedragen.

#### *Medium volgens Löffler*

Deze voedingsbodem werd gebruikt voor het onderzoek van de proteolytische activiteit van de geïsoleerde *Cl. botulinum*-stammen.

Bij de bereiding werd 1 g glucose in 100 ml runderbouillon opgelost en daarna

vermengd met 300 ml normaal paardeserum. De sterilisatie vond plaats door filtratie (Seitzfilter), waarna het medium in cultuurbuizen werd gegoten, en in de serumstollingsstoof schuin werd gestold.

#### *Medium volgens Kligler*

Met dit medium kan de vorming van zwavelwaterstof worden aangetoond. De samenstelling per liter van het gebruikte bacto-Kligler iron agar luidt:

Bacto-beefextract	3	g
Bacto-gistextract	3	g
Bacto-pepton	15	g
Bacto-proteose pepton	5	g
Bacto-lactose	10	g
Bacto-dextrose	1	g
Ferrosulfaat	0,2	g
Natriumchloride	5	g
Natriumthiosulfaat	0,3	g
Bacto-agar	12	g
Bacto-phenolrood	0,024	g

De sterilisatie geschiedde door autoclaveren gedurende 15 min. bij 120°C.

### 3.1.2. Antitoxische sera

#### 3.1.2.1. *Cl. botulinum* antitoxinen

De verschillende typen van *Cl. botulinum* worden gedifferentieerd op grond van de antigene verschillen tussen de gevormde toxinen. Men onderscheidt momenteel 6 toxinetypen, die met de letters A tot en met F worden aangeduid.

Voor de typering werd bij dit onderzoek gebruik gemaakt van de volgende antitoxische sera.

#### *Antitoxine type C-mink*

Dit antitoxine werd bereid met een uit Zweden ontvangen *Cl. botulinum* type C cultuur. Deze C-stam werd door Dinter en Kull geïsoleerd bij een botulismus-uitbraak bij nertsen.

Met de *Cl. botulinum* type C-mink cultuur werd na groei in leverbouillon door inactivatie met 0,3% formaldehyde anatoxine (toxoid) gemaakt. Dit anatoxine werd vervolgens geadsorbeerd aan aluminiumhydroxide. Voor de bereiding van het antitoxine type C-mink werd aan het instituut een paard met stijgende hoeveelheden C-mink toxoid ingespoten. Het paard werd 4 weken na de laatste injectie verbleed, nadat was vastgesteld dat de antitoxine titer hoog was. Het antiserum werd geconserveerd met 0,5% phenol en opgeslagen bij 4°C.

In een hierna uitgevoerde neutralisatietest bij muizen bleek 1 ml antiserum

meer dan 150.000 en minder dan 1.500.000 LD<sub>50</sub>\* van het homologe C-mink toxine te neutraliseren.

#### *Antitoxine type C-Pasteur*

Dit antitoxine is, evenals enkele hierna genoemde antitoxinen, van het "Instituut Pasteur" te Parijs afkomstig. Het is verkregen door immunisatie van een paard en is monovalent; een differentiatie in C $\alpha$  of C $\beta$  wordt niet aangegeven. Het is een hoogwaardig immuunserum waarvan 1 ml in staat is 100.000 MLD voor muizen (1.000 Unités Antitoxiques; 1 UA is de minimale hoeveelheid serum, die in staat is 100 MLD voor muizen van het homologe toxine te neutraliseren) van het homologe toxine te neutraliseren. Bij een vergelijking tussen de neutraliserende werking van de antisera type C-mink en C-Pasteur bleek door beide sera een analoge hoeveelheid C-mink toxine te worden geneutraliseerd, nl. tussen 150.000 en 1.500.000 LD<sub>50</sub>. Dit duidt er op dat de antitoxische werkzaamheid van het C-mink en het C-Pasteur antiserum in hoge mate met elkaar overeenkomen.

#### *Antitoxine type B-Pasteur*

Dit antiserum is monovalent; 1 ml bevat 500 Unités Antitoxiques.

#### *Antitoxine type B-Atlanta*

Dit antiserum is ontvangen van het "Center for Disease Control" te Atlanta (Georgia). Het antitoxine is monovalent en bevat volgens opgave per ml ongeveer 10 International Units (één IU is gelijk aan één UA).

#### *Antitoxine type E-Pasteur*

Dit antiserum is ook monovalent en bevat per ml 1.000 UA.

#### *Antitoxine type E-Atlanta*

Dit monovalente antiserum bevat ongeveer 10 IU per ml.

#### *Antitoxine type A-Pasteur*

Dit antitoxine bevat 5.000 UA per ml.

#### **3.1.2.2. Cl. tetani-antitoxine**

Bij de uitvoering van een neutralisatietest werd gebruik gemaakt van een Cl. tetani-antitoxine, dat aan het Instituut in een paard is bereid en per ml 1.200 internationale eenheden tetanus antitoxine bevat.

\* In de verdere tekst wordt een muis intraperitoneale LD<sub>50</sub> aangeduid met LD<sub>50</sub>.

## 3.2. METHODIEKEN

### 3.2.1. Aantonen en typering van het botulinumtoxine

De aanwezigheid van het botulinumtoxine werd vastgesteld door het aantonen van een toxische stof, die bij muizen een typisch ziektebeeld veroorzaakte en door een specifiek botulinum-antitoxine kon worden geneutraliseerd.

Voor het aantonen van het botulinumtoxine in vast materiaal was de bereiding van extracten nodig. Grote kwanta materiaal, zoals organen van grotere dieren, werden in een mixer fijn gemalen; kleinere hoeveelheden materiaal – b.v. maden, poppen of vliegen – werden in een Griffith tube of mortier fijn gewreven.

Door toevoeging van runderbouillon werd een 20-50% suspensie verkregen, waaruit na centrifugeren gedurende 15 min. bij 3.000 rpm de grovere bestanddelen werden verwijderd.

Complicaties van bacteriële aard werden bij de in te spuiten muizen voorkomen door aan de bovenstaande vloeistof 1.000 E penicilline en 1.000 E streptomycine per ml toe te voegen.

Vloeibaar onderzoekingsmateriaal – zoals onstolbaar gemaakt bloed of bloedserum, water en ophopingsculturen – werd met eenzelfde hoeveelheid antibiotica behandeld.

Na een inwerkingsduur van 30 min. bij kamertemperatuur werd per muis 0,5 ml intraperitoneaal ingespoten, waarbij per monster meestal 2 muizen werden genomen. Hiervoor werden steeds Swiss Random muizen van 18-20 g gebruikt, afkomstig van het Centraal Proefdierenbedrijf TNO te Zeist.

Over het algemeen kon het materiaal onverdund worden ingespoten, zonder dat specifieke sterfte optrad. Als de muizen echter FEM, Cardella of CMM culturen onverdund kregen toegediend, traden veelal na korte tijd heftige convulsies op, gevolgd door specifieke sterfte. Deze sterfte werd voorkomen door de vloeistof van deze culturen 1 : 5 te verdunnen met runderbouillon.

De muizen werden na de injectie gedurende 4 dagen nauwkeurig geobserveerd. De ziekteverschijnselen ontwikkelden zich meestal 2-24 uur na de injectie. Bij botulismus treden vooral ademhalingsmoeilijkheden op de voorgrond: de ademhalingspijpen worden door het botulinumtoxine verlamd, de frequentie van de ademhaling daalt en bij het voortschrijden van het ziekteproces ontstaat ten slotte bij elke ademhaling in de flanken een diepe insnoering, de z.g. wespentaille. In het eindstadium wordt bij elke inhalatie de mond wijd opengesperd en krampachtig gesloten (luchthappen). Vaak is ook het locomotie-apparaat min of meer verlamd en de muizen sterven ten slotte onder symptomen van ernstige benauwdheid. Bij een langzamer verlopend ziekteproces (48 tot 96 uur) sterven de muizen meestal nadat zij in coma zijn geraakt.

De verdere identificatie van het toxine vond plaats middels een neutralisatie-

test in muizen met behulp van specifieke antitoxinen. Hiertoe werden in afzonderlijke buisjes het te onderzoeken toxische materiaal en verschillende antitoxinen in de verhouding 10 : 1 bij elkaar gebracht en goed vermengd. Bij de keuze van de antitoxinen kan men zich vaak laten leiden door de resultaten van eerdere onderzoekingen. Als controle op de aanwezigheid van voldoende toxine, werd in een puntbuis het te onderzoeken toxische materiaal vermengd met normaal paardeserum, eveneens in de verhouding 10 : 1. Aan alle toxine-serum-mengsels werd per ml 1.000 E penicilline en 1.000 E streptomycine toegevoegd. De toxine-antitoxine-mengsels en de buis met het toxine-normaal serum-mengsel werden aanvankelijk gedurende 90 minuten bij 37°C geïncubeerd. Het bleek dat hierbij soms toxine verloren ging, omdat ook de muizen, die ingespoten waren met het toxine-normaal paardeserum-mengsel, in leven bleven. De incubatie werd daarna in overeenstemming gebracht met de voorschriften van het "Center for Disease Control" te Atlanta, nl. 30 min. bij 20°C. Na de incubatieperiode werden Swiss Random muizen intraperitoneaal ingespoten met 0,5 ml van de toxine-antitoxine-mengsels en het toxine-normaal serum-mengsel. De muizen werden gedurende 4 dagen geobserveerd. Alleen de muizen, die ingespoten waren met een mengsel waarvan het monovalente antitoxine het aanwezige botulinumtoxine *in vitro* had geneutraliseerd, bleven in leven. De uitslag van deze neutralisatietest was bepalend voor de typering van het toxine.

Bij onderzoek van vloeibare ophopingsmedia stierven soms alle met toxine-antitoxine-mengsels ingespoten muizen onder typische verschijnselen van botulismus. De ervaring leerde dat dan een mengsel van 2 (of meer) botulinumtoxinen aanwezig kon zijn. De neutralisatietest werd herhaald, waarbij nu aan het toxische materiaal een mengsel van 2 verschillende antitoxinen in onderling gelijke hoeveelheden werd toegevoegd, weer in de verhouding 10 : 1. Als controle op de aanwezige botulinumtoxinen dienden hierbij toxine-antitoxine-mengsels, waaraan slechts 1 van de betrokken antitoxinen was toegevoegd.

Voorbeeld:

- 1) Muizen, ingespoten met toxine + antitoxine type C: gestorven aan botulismus.
- 2) Muizen, ingespoten met toxine + antitoxine type E: gestorven aan botulismus.
- 3) Muizen, ingespoten met toxine + mengsel van antitoxine C + E: gezond gebleven.

Uit dit resultaat werd geconcludeerd dat in het te onderzoeken materiaal zowel C-toxine als E-toxine aanwezig was.

In sommige gevallen bleek ook een mengsel van botulinum-antitoxinen niet in staat te zijn de toxische substantie te neutraliseren. De ziekteverschijnselen bij de muizen waren soms onduidelijk, terwijl een andere keer tetanische krampen optraden.

De typering van het toxische materiaal werd in deze gevallen voortgezet door



bij de neutralisatietest ook tetanus-antitoxine te betrekken. De neutralisatietest met tetanustoxine werd met muizen volgens dezelfde principes uitgevoerd als is aangegeven voor het botulinumtoxine. De neutralisatie vond plaats gedurende 1 uur bij 20°C; als controle werden muizen intraperitoneaal ingespoten met een mengsel van toxine en normaal paardeserum. Vaak werden tevens controle muizen ingespoten met toxine-botulinum-antitoxine-mengsels, teneinde de differentiatie van het eventueel aanwezige tetanustoxine tegenover bepaalde botulinumtoxinen scherper te stellen.

De ervaring leerde uiteindelijk dat in sommige ophopingsculturen een mengsel van botulinum- en tetanustoxine aanwezig bleek te kunnen zijn; er werd dan een neutralisatie uitgevoerd, waarbij botulinum-antitoxine en tetanus-antitoxine gelijktijdig aan het toxische materiaal werden toegevoegd. Als controle dienden toxine-antitoxine-mengsels, waaraan slechts 1 van de betrokken antitoxinen was toegevoegd.

Voorbeeld:

- 1) Muizen, ingespoten met toxine + botulinum-antitoxine type C: gestorven.
- 2) Muizen, ingespoten met toxine + tetanus-antitoxine: gestorven.
- 3) Muizen, ingespoten met toxine + een mengsel van botulinum-antitoxine type C en tetanus-antitoxine: gezond gebleven.

Op grond van deze uitslag werd geconcludeerd dat in het toxische materiaal zowel botulinumtoxine type C als tetanustoxine aanwezig was.

In sommige gevallen bleek de hoeveelheid toxine per inoculum van 0,5 ml onvoldoende te zijn: de muizen vertoonden wel min of meer verdachte ziekteverschijnselen, maar herstelden na enkele dagen. In deze gevallen werd getracht de hoeveelheid toxine per inoculum van 0,5 ml te vergroten door speciale bewerkingen toe te passen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van "Centriflo" ultrafilters of van trypsinisatie van het te onderzoeken materiaal.

#### *Centriflo ultrafilters*

Deze methodiek werd tijdens dit onderzoek speciaal voor de bovengenoemde doeleinden uitgewerkt. De concentratie met behulp van het centriflo® membraanfilter (Amicon) berust op het vermogen van het membraanfilter om moleculen, afhankelijk van het moleculairgewicht en de vorm, tegen te kunnen houden. Moleculen met een moleculairgewicht beneden de 5.000 worden niet en boven de 50.000 worden wel tegengehouden. In het gebied tussen 5.000 en 50.000 moleculairgewicht wordt de retentie vooral bepaald door de grootte en de vorm van de moleculen.

In een serie oriënterende onderzoeken bleken de botulinumtoxinen type A, B, C en E uitstekend met deze methodiek geconcentreerd te kunnen worden.

Orgaansuspensies moesten een voorbehandeling ondergaan: door de suspensies 1 of 2 maal in te vriezen en weer te ontdooien, werd beoogd een verregaande

celdestructie te bewerkstelligen.

Het toxische materiaal (ophopingsculturen, bloedserum, orgaansuspensies) werd eerst gedurende 15 minuten bij 3.000 rpm gecentrifugeerd. Daarna werd 5 tot 7 ml van de bovenstaande vloeistof in het trechtvormige membraanfilter (membrane cone CF 50A) gepipetteerd. Het filter wordt daarna in een conische houder (CS 1A, van polyethyleen) overgebracht, die op haar beurt in een speciale puntvormige buis (CT1) wordt gezet. De scheiding tussen de verschillende moleculen wordt nu door centrifugerén verkregen, waarbij 1.000 g relatieve centrifugale kracht niet dient te worden overschreden.

Na 20 tot 45 min. centrifugerén bleef meestal 2 tot 3 ml vloeistof in het filter achter, zodat het toxine 2 tot 3,5 maal was geconcentreerd. Dit bleek voldoende te zijn om het botulinumtoxine aan te tonen in een aantal gevallen, waarbij de normale methodiek niet toereikend was geweest.

#### *Trypsine behandeling*

De behandeling met trypsine vond vooral plaats, indien de aanwezigheid van E-toxine werd vermoed. Deze bewerking geschiedde volgens richtlijnen aangegeven door Gerwing *et al.* (1965): de pH van de te onderzoeken suspensies werd op 5,8 gebracht en de eindconcentratie van trypsine (Difco) bedroeg 0,5%, waarna het mengsel gedurende 2 uur bij 37°C werd geïncubeerd.

### **3.2.2. Isolatie van *Cl. botulinum***

Voor het aantonen van de aanwezigheid van *Cl. botulinum* kunnen de normale bacteriologische technieken niet worden aangewend; hierbij moet de bacterie zo snel mogelijk in reïncultuur worden verkregen, en de identificatie kan daarna geschieden op grond van morfologische, culturele en biochemische eigenschappen.

Het is nl. slechts zelden mogelijk *Cl. botulinum* uit sterk met clostridiumsporen verontreinigd materiaal (grond, slib, organen van dieren, voedselresten) in reïncultuur te isoleren. Daarom vindt het aantonen van *Cl. botulinum* in eerste instantie plaats door het onderzoeken van ophopingsculturen op de aanwezigheid van botulinumtoxinen, die bij een positieve uitslag vervolgens in een neutralisatietest bij muizen nader worden getypeerd (zie 3.2.1.).

In sommige gevallen kan daarna nog getracht worden *Cl. botulinum* in reïncultuur te isoleren.

#### **3.2.2.1. Aantonen van *Cl. botulinum* in ophopingsculturen**

Als voedingsmedia werden leverbouillon, CMM en Cardella-medium gebruikt, waarbij vooral aan het eerste medium de voorkeur werd gegeven. Leverbouillon bleek nl. in een vooronderzoek minstens even goed als CMM en het Cardella-medium te zijn, maar heeft het voordeel, dat de cultuurvloeistof onverdund kan

worden onderzocht (zie 3.2.1.).

De cultuurmedia werden kort voor het enten in een waterbad gedurende minstens 5 min. op 100°C verhit om de zuurstof te verdrijven die in het vloeibare medium was opgelost. Na het enten werden de culturen afgedekt met vloeibare steriele paraffine, zodat de anaërobie in het medium gehandhaafd bleef.

Alle culturen werden gedurende 5 tot 7 dagen bij 30°C geïncubeerd, waarna onderzoek op de aanwezigheid van botulinumtoxine plaatsvond (zie 3.2.1.).

Het te onderzoeken materiaal werd aanvankelijk zowel onverhit als na verhitten gedurende 30 min. bij 60°C en 70°C onderzocht. Later werd als standaardmethode het materiaal zonder voorafgaande verhitting onderzocht, omdat het aantal positieve bevindingen met betrekking tot *Cl. botulinum* type C na verhitten minder hoog bleek te zijn.

### 3.2.2.2. Isolatie van *Cl. botulinum* in reïncultuur

De isolatie van *Cl. botulinum* uit sterk verontreinigd materiaal is alleen met enige kans op succes mogelijk, indien het materiaal voldoende kiemen en sporen van *Cl. botulinum* bevat.

In subculturen, geënt met onverhit uitgangsmateriaal, bleek de verontreiniging met andere anaëroob groeiende bacteriën zo groot te zijn, dat op vaste voedingsbodems geen op *Cl. botulinum* gelijkende kolonies werden aangetroffen.

Er werden slechts weinig toxische subculturen verkregen, indien het uitgangsmateriaal voor het enten bij 80°C of hoger werd verhit.

Voor de isolatie van *Cl. botulinum* uit grond of slib werd daarom een methodiek gebruikt, die in principe ook door Segner *et al.* (1971) voor de isolatie van type C uit maritieme sedimenten werd gevolgd.

Als uitgangsmateriaal werden alleen die bodemonsters in onderzoek genomen, die bij enting van hoogstens 0,1 g nog toxische culturen opleverden. Het uitgangsmateriaal werd eerst gedurende 30 min. bij 65°C verhit, waarna 12 tot 24 cultuurbuizen, gevuld met leverbouillon of FEM werden geënt met de hoeveelheid slib of grond die met een oogje van een entnaald kon worden overgebracht (ongeveer 10-15 mg). Deze leverbouillon en FEM culturen werden na 5 tot 7 dagen op botulinumtoxine onderzocht (zie 3.2.1.) en van de meest toxische culturen werd met een entnaald één druppel cultuur overgebracht in een tweede serie cultuurbuizen met leverbouillon of FEM. Met deze tweede serie subculturen konden volgens dezelfde principes eventueel nog meer series subculturen worden aangelegd.

Uit zeer toxische subculturen van de 2e, 3e en 4e serie subculturen werden vervolgens een groot aantal vaste voedingsbodems geënt (24 of meer hartinfuus-chapebloedagarplaten of glucose-runderbloedagarplaten), die volgens de principes van McIntosh en Fildes (1916) gedurende 2 dagen bij 37°C in een anaëroben-vat werden geïncubeerd. In dit anaëroben-vat kunnen maximaal 12

bloedplaten worden bebroed. Het vat dient zeer nauwkeurig te worden afgesloten. Op de bodem van het anaëroben-vat werd een laag silicagel gebracht om overmatige condensvorming te voorkomen. Het anaëroben-vat werd driemaal vacuum gezogen, waarbij het vat telkens weer met een gasmengsel, bestaande uit 80% stikstof, 10% waterstof en 10% CO<sub>2</sub>, werd gevuld. De hierna nog resterende zuurstof werd verwijderd met behulp van een gloei-element waar elektrische stroom (12 V) door werd geleid. De resterende zuurstof verbindt zich dan met waterstof, nadat voldoende warmte is ontwikkeld. Deze laatste handeling werd na 24 incuberen nog eens herhaald.

Na de incubatieperiode werden van vaste voedingsmedia kolonies, die gelijkenis vertoonden met die van *Cl. botulinum*, in leverbouillon of FEM geënt. Ook deze culturen werden na 5 tot 7 dagen incuberen bij 30°C op botulinumtoxine onderzocht. Indien zich hierbij toxische culturen bevonden, werden deze weer op de eerder genoemde vaste voedingsmedia geënt en op reinheid gecontroleerd. Van reïnculturen op deze bloedplaten werden tenslotte monoculturen verkregen in leverbouillon of FEM, waarvan het toxintype definitief met monovalente anti-toxinen werd vastgesteld.

De meest toxogene reïncultuur werd aangehouden en hiervan werden vervolgens de culturele en biochemische eigenschappen vastgesteld. De culturele eigenschappen werden nagegaan op hartinfuus-schapebloedagarplaten en BHR, die 48 uur bij 30 of 37°C waren geïncubeerd in anaëroob milieu en van leverbouillon en FEM culturen die bij 30°C waren gegroeid.

De media die gebruikt werden bij het onderzoek van de biochemische eigenschappen, zijn reeds vermeld onder 3.1.1.

De proteolytische activiteit werd nagegaan in het medium volgens Löffler, in lakmoesmelk, in CMM en in leverbouillon.

Het vermogen gelatine te hydroliseren werd vastgesteld in bacto-nutrient gelatine (Difco).

De vorming van H<sub>2</sub>S werd in CMM onderzocht met behulp van een papiertje gedrenkt in loodacetaat en in het medium volgens Kligler (Difco).

De hemolytische activiteit werd bepaald met hartinfuus-schapebloedagarplaten en met brain heart runderbloedagarplaten.

De saccharolytische activiteit werd nagegaan in het basismedium, vermeld onder 3.1.1.3. Alle media werden geënt met 0,2 ml van een goed gegroeide leverbouilloncultuur en gedurende minstens 6 dagen bebroed bij 30 of 37°C in anaëroob milieu (McIntosh en Fildes methode). De fermentatie van de verschillende koolhydraten werd steeds na 6 dagen onderzocht met behulp van de toevoeging van broomthymolblauw en door de meting van de pH met de Portamess 902 (Knick).

De isolatie van *Cl. botulinum* in reïnculturen uit minder verontreinigd materiaal, zoals uit organen van dieren die aan botulismus hebben geleden, van

gezonde dieren die drager bleken te zijn en uit gekweekte sarcophage vliegen, geschiedde volgens dezelfde principes als is vermeld voor de isolatie uit grond, slib, e.d. De isolatie in reïncultuur verliep dan soms sneller, zodat het mogelijk was reeds goede kolonies te vinden op vaste voedingsmedia, die geënt waren met verhit materiaal van de eerste serie subculturen in leverbouillon of FEM.

### 3.2.3. Bepaling van de concentratie van het botulinumtoxine

De concentratie van het botulinumtoxine werd vastgesteld door Swiss Random muizen van 18-20 g met 0,5 ml van de verdunningen van het toxine intraperitoneaal in te spuiten.

Het te onderzoeken toxische materiaal werd eerst gedurende 15 min. bij 3.000 rpm gecentrifugeerd, waarna van de bovenstaande vloeistof met runderbouillon een serie verdunningen werd gemaakt.

Indien een eenvoudige bepaling van de concentratie van het toxine voldoende was, werd de intraperitoneale MLD bepaald met behulp van tienvoudige verdunningen, waarbij 1 of 2 muizen per verdunning werden gebruikt.

Voor een nauwkeurige bepaling van de concentratie van het toxine werd de intraperitoneale LD<sub>50</sub> bepaald met behulp van tienvoudige verdunningen, soms verder aangevuld met tweevoudige verdunningen. Per verdunning werden nu 4 of 5 muizen gebruikt. De intraperitoneale LD<sub>50</sub> werd bepaald door toepassing van de berekening volgens Reed en Muench (1938).

## HOOFDSTUK IV

### EEN ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS IN NEDERLAND

#### 4.1. INLEIDING

Botulismus is tot 1970 niet onderkend bij watervogels in Nederland. Bij sterfte van watervogels is in sporadische gevallen in de differentieel-diagnostiek wel aan botulismus gedacht, doch het onderzoek verliep steeds negatief.

In de zomer van 1970 stierven op verschillende plaatsen in Nederland grote aantallen watervogels onder dezelfde ziekteverschijnselen; deze ziekte-uitbraken bleken bij nader onderzoek door botulismus te worden veroorzaakt (Haagsma *et al.*, 1971).

In dit hoofdstuk zullen de botulismusgevallen worden beschreven, die sinds de zomer van 1970 in Nederland zijn vastgesteld.

#### 4.2. DIAGNOSTIEK VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS

De klinisch waarneembare ziekteverschijnselen kunnen een goede aanwijzing zijn voor de diagnostiek, in tegenstelling tot het patholoog-anatomisch onderzoek.

Een definitieve diagnose is pas gesteld als het botulinumtoxine bij zieke of pas gestorven vogels is aangetoond.

De diagnostische betekenis van het aantonen van *Cl. botulinum* bij verdachte ziektegevallen wordt door diverse onderzoekers terecht betwijfeld. In dit onderzoek is dan ook aan de isolatie van *Cl. botulinum* geen diagnostische waarde toegekend.

#### 4.2.1. Symptomatologie

Op grond van experimentele ziektegevallen en van waarnemingen in het veld, bleken de volgende ziekteverschijnselen bij watervogels diagnostische waarde te hebben.

Bij botulismus traden de verlamningsverschijnselen sterk op de voorgrond. Als eerste ziekteverschijnsel werd een verminderd vliegvermogen opgemerkt; bij het voortschrijden van de ziekte konden de vogels niet meer vliegen. Er traden daarna ook loopstoornissen op en tenslotte zaten de dieren in elkaar gezakt met afhangelende vleugels. Zwembewegingen konden eerst nog wel worden gemaakt, maar duiken was al spoedig niet meer mogelijk. De vogels waren gemakkelijk te vangen en bleken geen geluid meer te kunnen voortbrengen. Er trad vervolgens ook een verlamming van de halsspieren op (z.g. "limberneck"). Door het verdwijnen van de ooglidreflex ontwikkelde zich veelal een kerato-conjunctivitis. In het eindstadium van de ziekte ontwikkelden zich ernstige ademhalingsstoornissen, waarbij de dieren met krampachtige bewegingen en open snavel trachtten voldoende lucht te inhaleren. Soms stierven de vogels in coma.

Het ziekteverloop was sterk afhankelijk van de hoeveelheid opgenomen toxine. Bij opname van een veelvoud van de letale dosis was het ziekteproces binnen 24 uur afgelopen; bij kleinere hoeveelheden toxine ontwikkelde zich een meer chronisch beeld, dat zich over meerdere dagen kon uitstrekken. Hierbij trad soms zelfs spontane genezing op.



Foto 1

Wilde eend met de verlamningsverschijnselen door botulismus; enkele uren ante mortem.  
Mallard affected with botulism: symptoms of paralysis a few hours before death.

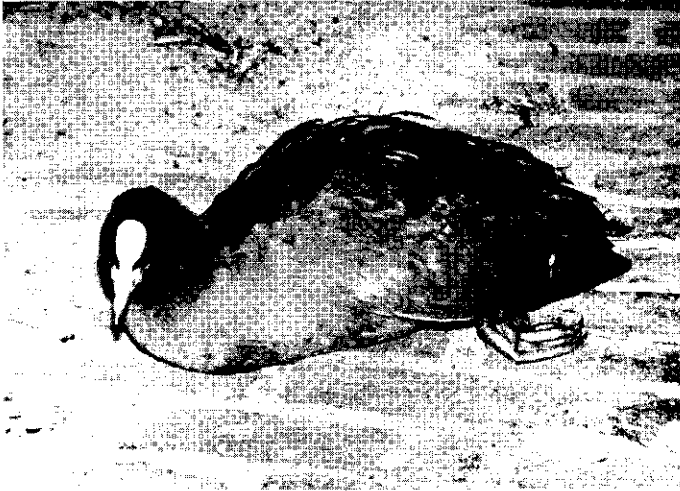


Foto 2  
Meerkoet met botulismus.  
Coot affected with botulism.

#### 4.2.2. Post-mortem bevindingen

Bij het post-mortem werden geen pathognomonische laesies waargenomen. De vogels verkeerden meestal in een goede voedingstoestand. In enkele gevallen werd een kleine hoeveelheid helder vocht in het pericard aangetroffen of werden kleine subepicardiale bloedingen aangetroffen. Bij veel vogels was de omgeving van de cloaca bevuild met groene faeces. De maag bevatte meestal weinig voedsel en er werd soms hyperaemie van de darmmucosa of een geringe enteritis vastgesteld. De cloaca was in een aantal gevallen overvuld met faeces en neerslagen van urinezuurzouten.

Bij enkele eenden, afkomstig uit de Vecht bij Loenen, Amsterdam en 's-Gravenhage, werden in de neusholte bloedzuigers aangetroffen; soms kwamen deze ook voor op de oogleden of in de mondholte. De exemplaren in de neusholte waren in sommige gevallen sterk met bloed gevuld, waardoor een bemoeilijkte luchtpassage kan zijn ontstaan. De bloedzuigers werden gedetermineerd als *Theromyzon tessulatum* (Müll)\*, een soort die in de literatuur als facultatief parasitair levend wordt beschreven (Williams, 1970; Keymer *et al*, 1972). Volgens andere onderzoekers zou bij jonge eenden de infectie wel fataal kunnen verlopen (Büchli, 1924; Rollinson *et al*, 1950).

\* Determinatie verricht door Dr. H.J. Over, afdeling Parasitologie, Centraal Diergeneeskundig Instituut te Lelystad.



In enkele eenden werden parasitaire infecties van de digestietractus vastgesteld; hierbij werden o.a. aangetroffen een *Tetrameres* species (vermoedelijk *T. fissispina*), *Echinuria uncinata* en *Amidostomum acutum*\*.

#### 4.2.3. Aantonen van het botulinumtoxine

Voor het aantonen van het botulinumtoxine werden bij voorkeur zieke vogels onderzocht, omdat dan bloed voor het onderzoek kon worden verzameld. Werden deze zieke vogels afgemaakt, dan kon zonodig ook de lever in het onderzoek worden betrokken. De inhoud van de krop of het maagdarmkanaal werd slechts in enkele gevallen aan een verder onderzoek onderworpen, omdat reeds eerder werd ervaren dat het botulinumtoxine met meer succes in de lever kan worden aangetoond (Haagsma *et al*, 1971).

Bij gestorven watervogels werden de lever en in enkele gevallen de digestietractus op de aanwezigheid van het botulinumtoxine onderzocht. Het onderzoek van gestorven vogels is echter aan beperkingen onderhevig. Met nadruk moet worden gesteld dat voor een betrouwbare, individuele diagnostiek het onderzoek van verse kadavers noodzakelijk is. Oudere kadavers, waarbij reeds bederfverschijnselen aanwezig zijn, zijn voor de diagnostiek minder betrouwbaar, omdat hierbij rekening moet worden gehouden met een postmortale toxineproductie.

Het te onderzoeken materiaal werd, voorzover dit niet direct nodig was voor verder onderzoek, steeds bij  $-20^{\circ}\text{C}$  bewaard, ten einde een daling van de toxineconcentratie te voorkomen. De werkzaamheden bij kamertemperatuur werden om deze reden verder zo snel mogelijk uitgevoerd (Pigoury *et al*, 1965).

Van het bloed werd na stolling het serum verzameld, terwijl van de lever of van de inhoud van het maagdarmkanaal een 20-50% suspensie werd bereid. Dit materiaal werd daarna op de aanwezigheid van botulinumtoxine onderzocht en bij een positieve uitslag werd het toxine nader getypeerd met behulp van specifieke botulinum-antitoxinen (zie 3.2.1.); hierbij werd uitsluitend het botulinumtoxine type C gevonden. Bij een negatieve uitslag van het toxineonderzoek werd in een aantal gevallen het onderzoek herhaald na concentratie van het materiaal in een centriflo membraanfilter (zie 3.2.1.). Zowel in bloedserum als in leversuspensies bleek hierdoor het botulinumtoxine te kunnen worden geconcentreerd, zodat het mogelijk werd het toxine specifiek aan te tonen in een aantal gevallen, waarbij de normale methodiek niet toereikend was (tabel 1).

\* Determinatie verricht door Dr. H.J. Over, afdeling Parasitologie, Centraal Diergeneeskundig Instituut te Lelystad.

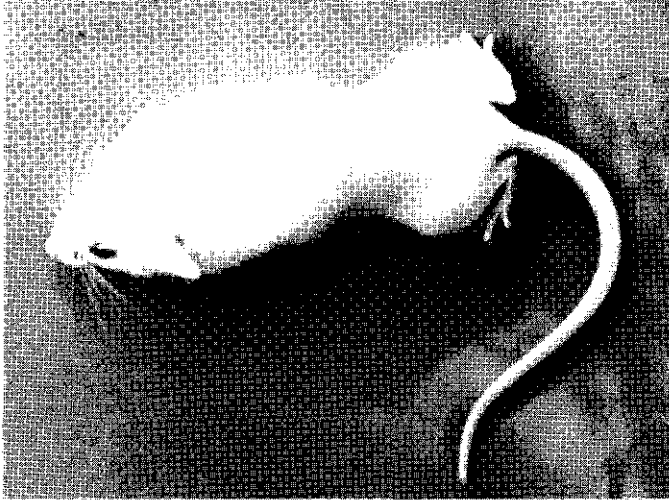


Foto 3  
Swiss Random muis met typische ziekteverschijnselen van botulismus.  
Swiss Random mouse with typical symptoms of botulism.

Tabel 1

Resultaten bij het gebruik van centriflo membraanfilters in de diagnostiek van botulismus.  
Results by means of centriflo membrane ultrafilters for diagnostic examinations of botulism.

	Toxine met normale methodiek aangetoond	Voor aantonen van toxine gebruik van centriflo membraanfilters noodzakelijk
Lever suspensies	38	10 (= 26,3%)
Bloedsersa	14	4 (= 28,6%)

Hieruit blijkt tevens dat de concentratie van het botulinumtoxine, dat voor diagnostisch onderzoek beschikbaar was, in vrij veel gevallen slechts zeer gering was. Het bleek in sporadische gevallen zelfs nodig de muizen na 24 of 48 uur nog eens met het te onderzoeken materiaal (concentraat van centriflo membraanfilter) te behandelen, omdat na een éénmalige applicatie slechts vage ziekteverschijnselen optraden. De ervaring tijdens het diagnostische onderzoek leerde dat in de leversuspensies per 0,5 ml meestal ongeveer 1 MLD\* aanwezig was.

\* In de verdere test wordt één minimaal letale dosis voor muizen aangeduid met MLD.

In het bloeds serum was de concentratie van het toxine meestal eveneens niet veel meer dan 1 MLD. In enkele gevallen bleek echter wel meer toxine aanwezig te zijn en de hoogste toxineconcentratie die werd vastgesteld, bedroeg 16 MLD per ml serum.

In bepaalde fracties van de inhoud van de digestietractus werd in een uitzonderlijk geval zelfs een veel hogere concentratie van het botulinumtoxine aangetroffen. Bij 2 dode talingen werden nog intacte maden in de spier- en kliermaag aangetroffen; bij titratie bleek 0,5 ml van een 10% suspensie van deze maden nog  $10^3$  resp.  $10^4$  MLD toxine te bevatten. In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van het diagnostisch onderzoek. Hieruit blijkt dat bij aan botulismus lijdende vogels (vooral eenden) onderzoek van het bloed de meeste kans op succes biedt. Bij aan botulismus gestorven vogels is het onderzoek van de lever te prefereren boven dat van de inhoud van de digestietractus. Dit wordt mede veroorzaakt door de omstandigheid dat bij onderzoek van de digestietractus vaak specifieke sterfte optreedt bij de ingespoten muizen.

Tabel 2

Overzicht van het diagnostisch onderzoek tot 1 september 1972.  
Survey of diagnostic examinations up to 1 September, 1972.

	Vogels die aan botulismus leden		Kadavers van vogels die aan botulismus waren gestorven	
	Toxine aangetoond	Toxine niet aangetoond	Toxine aangetoond	Toxine niet aangetoond
Bloeds serum	20	1	3	0
Lever	3	7	55	8
Digestietractus	1	0	9	8

Een bijzondere waarneming werd verricht bij 3 eenden die met grote bloedzuigers waren geïnfecteerd. In ongestold bloed dat uit deze bloedzuigers kon worden verzameld, werd minstens 1 MLD van het botulinumtoxine aangetoond. Dit gegeven droeg in belangrijke mate bij in de diagnostiek, omdat bij deze dode eenden elders geen ongestold bloed was te verzamelen, terwijl in de leversuspensies van deze eenden slechts weinig toxine aanwezig bleek te zijn: in 2 gevallen werden de ingespoten muizen wel specifiek ziek maar stierven niet, in het 3e geval kon in de leversuspensie zelfs geen toxine worden aangetoond.

Enkele resultaten van het toxine-onderzoek deden vermoeden dat een negatieve uitslag geen volledige zekerheid gaf dat de vogel niet aan botulismus had geleden. Vooral het volgende onderzoek verschaftte hierin een beter inzicht. Van een groep van 8 eenden, die klinisch specifieke symptomen van botulismus

vertoonden en waarbij werd vastgesteld dat er sprake was van botulismus, werden 2 eenden na 4 resp. 5 dagen afgemaakt. Het botulinumtoxine kon toen niet meer worden aangetoond, alhoewel bij deze eenden nog symptomen van botulismus waren waar te nemen (niet kunnen vliegen, snel vermoeid na opjagen).

#### **4.3. HET OPTREDEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS IN NEDERLAND**

In 6 gebieden werd bij het optreden van botulismus een uitgebreider onderzoek verricht in verband met de bijzondere aspecten die zich hierbij voordeden. Deze gebieden zullen daarom apart worden besproken.

##### **4.3.1. In 's-Gravenhage**

In de eerste helft van juli 1970 werd door omwonenden opgemerkt, dat veel eenden stierven in het z.g. verversingskanaal, waarin koelwater van het Gemeentelijk Energie Bedrijf wordt geloosd. Door de Gemeentelijke Geneeskundige en Gezondheidsdienst van 's-Gravenhage, die begin augustus te hulp werd geroepen, werden in het water enkele tientallen dode en verscheidene zieke, min of meer verlamde eenden aangetroffen. Als ziekte-oorzaak werd primair gedacht aan een chemische intoxicatie of een infectieziekte. Bij navraag bleek, dat eind mei 1970 de walkanten van het verversingskanaal met het herbicide MCPA (2-methyl, 4-chloorfenoxyzijnzuur) waren bespoten. Het was opgevallen, dat sindsdien geen ratten meer werden gezien. Het gebruikte herbicide was echter zeer matig gedoseerd en wordt als weinig of niet toxisch voor dieren beschouwd.

Eind augustus werden op het Instituut gestorven eenden voor diagnostisch onderzoek ontvangen. Als doodsoorzaak werd hierbij botulismus vastgesteld, nadat het verdere bacteriologisch, virologisch en chemisch-toxicologisch onderzoek negatief was verlopen.

In september 1970 verdween de sterfte geleidelijk, maar in december werd bij enkele eenden, afkomstig uit het verversingskanaal, wederom botulismus vastgesteld.

Vanaf 20 juli 1971 werd opnieuw botulismus gediagnostiseerd bij eenden in het verversingskanaal. In augustus deed zich echter een geheel nieuwe ontwikkeling voor, doordat nu ook botulismus werd vastgesteld bij eenden en andere watervogels in verschillende grachten, parken en vijvers elders in de stad. Zo werden in het Haagse Bos in enkele dagen een zestigtal eenden aangetroffen met symptomen van botulismus, in de Paleistuin een dertigtal eenden, in het park Clingendael enkele tientallen en in de Hofvijver 15 eenden en een zwaan. In het verversingskanaal werden nog slechts enkele zieke eenden gesignaleerd.

De situatie verslechterde bedenkelijk toen eind augustus ook botulismus bleek voor te komen bij watervogels in de duinpannen van het waterleidingbedrijf te Scheveningen. Evenals in 1970 verminderde ook nu in september het aantal botulismusgevallen beduidend. Gedurende de maanden oktober, november en december werden zo nu en dan nog enkele watervogels (vooral eenden) met verschijnselen van botulismus waargenomen, zowel in het verwarmde water van het verversingskanaal als op plaatsen waar het water een normale temperatuur had.

Dit beeld zette zich ook in januari en februari 1972 voort. Een opvallende uitbraak van botulismus deed zich eind januari 1972 voor bij tamme grauwe ganzen in het Zuiderpark, waar het water in de vijvers een normale temperatuur heeft; deze ganzen konden het park niet verlaten, zodat het zeker was dat de ganzen het toxine ter plaatse hadden opgenomen. Dit in tegenstelling tot de botulismusgevallen gedurende de herfst en de winter bij wilde eenden, waarbij het mogelijk was dat deze het toxine elders hadden opgenomen, b.v. op plaatsen waar de watertemperatuur door thermische pollutie was verhoogd.

Van maart tot en met juni werden geen botulismusgevallen meer gesignaleerd, maar in juli, augustus en september 1972 ontwikkelde zich weer dezelfde situatie als in de nazomer van 1971: in het verversingskanaal werden slechts enkele en elders in de stad weer tientallen watervogels met symptomen van botulismus waargenomen. Op het terrein van het duinwaterleidingbedrijf te Scheveningen werden in 1972 geen gevallen van botulismus vastgesteld.

Van de verschillende ziekte-uitbraken werden meestal één of meer watervogels op botulismus onderzocht, speciaal indien de sterfte zich op plaatsen voordeed waar eerder geen botulismusgevallen waren waargenomen.\* In alle gevallen, waarin het onderzoek op botulismus positief verliep, werd uitsluitend het type C-toxine aangetoond. In tabel 3 wordt hiervan een overzicht gegeven. Er zijn in 's-Gravenhage geen betrouwbare tellingen verricht, zodat het aantal ziektegevallen niet nauwkeurig kan worden aangegeven.

#### 4.3.2. In Amsterdam

In augustus 1970 werd in het Vondelpark en het Sarphatipark sterfte bij enkele watervogels waargenomen, waarbij het ziektebeeld op botulismus wees. Deze diagnose werd bevestigd bij een zieke eend door het botulinumtoxine in het bloed aan te tonen.

In juli en augustus 1971 werd in verschillende grachten, parken en plantsoenen wederom veel sterfte bij watervogels vastgesteld; zieke vogels vertoonden steeds verschijnselen van botulismus en in een aantal gevallen werd bevestigd dat hier inderdaad sprake was van botulismus (tabel 7). Bij de typering

\* Veel informatie en materialen voor onderzoek werden ontvangen via de Gemeentelijke Geneeskundige en Gezondheidsdienst van 's-Gravenhage.

Tabel 3

Gevallen van botulismus in 's-Gravenhage waarbij de klinische diagnose specifiek werd bevestigd.

Cases of botulism in the Hague, in which the clinical diagnoses were specifically confirmed.

Tijdvak	Plaatsaanduiding	Diersoort	Aantal
1970, augustus	Verversingskanaal	wilde eend	2
december	Verversingskanaal	wilde eend	1
1971, juli	Verversingskanaal	wilde eend	3
augustus	Verversingskanaal	wilde eend	4
augustus	Clingendael	wilde eend	1
augustus	Schwarzerstraat	wilde eend	1
augustus	Paleistuin	wilde eend	1
augustus	Kwekerijweg	wilde eend	1
augustus	Hofvijver	nijlgans	1
augustus	Haagse Bos	wilde eend	1
augustus	Haringkade	wilde eend	1
augustus	Dedemsvaartweg	wilde eend	1
augustus	Sluis Verversingskanaal, zeezijde	wilde eend	1
augustus	Zuiderpark	wilde eend	1
augustus	Veilingsstraat	knobbelzwaan	1
augustus	Meer en Bos	kapmeeuw	1
augustus	Duinpannen Waterleidingbedrijf	wilde eend	1
augustus	Duinpannen Waterleidingbedrijf	kuifeend	4
augustus	Duinpannen Waterleidingbedrijf	bergeend	1
september	Hofvijver	wilde eend	2
december	Verversingskanaal	wilde eend	1
1972, januari	Haagse Bos	kuifeend	1
januari	Zuiderpark	grauwe gans	2
februari	Haagse Bos	blauwe reiger	1
februari	Leidschendam	wilde eend	1
juli	Verversingskanaal	wilde eend	1
juli	Waterpartij	wilde eend	2
augustus	Clingendael	wilde eend	1
augustus	Park Marlot	wilde eend	1
augustus	Voorburg	wilde eend	6
september	Zuiderpark	wilde eend	1
september	Bezuidenhout	wilde eend	3

51

werd steeds het botulinumtoxine type C aangetroffen. Door de afdeling Beplantingen van de gemeente Amsterdam zijn van 19 juli tot 23 augustus 1971 tellingen verricht op grond waarvan een indruk kan worden verkregen over de omvang van deze sterfte (tabel 4).\* Plaatsen, waar zich de grootste sterfte voordeed, waren het Vondelpark met 163, Schellingwouderbreek met 106, Valentijnkade met 47, Flevopark met 30 en de omgeving van de J. Edenbaan met 26 sterfgevallen. Onder de 524 slachtoffers werden 498 wilde eenden geteld, 9 meerkoeten, 2 kapmeeuwen en 15 geleewiekte sierwatervogels (o.a. 1 mandarijneend, 2 carolina-eenden, 3 smienten, 1 zomertaling, 2 pijlstaarteenden, 1 vlekbeekend en 1 baikaleend).

Tabel 4

Overzicht van het aantal gestorven of ernstig verlamde watervogels in Amsterdam van 19 juli tot 23 augustus 1971.

Survey of the number of dead or seriously paralysed waterfowl in Amsterdam observed between 19 July and 23 August, 1971.

	19-26 juli	26 juli-2 aug.	2-9 aug.	9-16 aug.	16-23 aug.
Aantal	295	16	162	30	21

Kort na het begin van de botulismusuitbraken in 1971 is de afdeling Beplantingen begonnen met het stelselmatig verwijderen van de kadavers van gestorven watervogels, waarbij vooral de stadsparken nauwkeurig werden geïnspecteerd. Het viel op dat daarna de sterfte beperkt bleef tot wilde watervogels (vooral wilde eenden), terwijl er geen sterfte meer optrad bij de autochtone, geleewiekte sierwatervogels van de stadsparken, hetgeen suggereerde dat met het opruimen van de kadavers ook de bron van het toxine was weggenomen. De sterfte onder wilde watervogels zou daarentegen verklaard kunnen worden met de hypothese dat deze vogels het toxine tijdens het fourageren elders hebben opgenomen, tijdens het preklinische ziektestadium naar de stadsparken zijn gevlogen en daar dan ziek zijn geworden. Waarnemingen in de stadskwekerij voor sierwatervogels wezen in dezelfde richting: er traden namelijk geen nieuwe gevallen van botulismus meer op, nadat het kadaver van een wilde eend, geheel bezet met maden en verborgen onder overhangende takken in het water drijvend, was verwijderd.

In september 1971 verminderde het aantal botulismusgevallen duidelijk en vanaf oktober werden geen ziektegevallen meer vastgesteld.

\* Deze informatie werden ontvangen van de afdeling Beplantingen, Dienst der Publieke Werken, gemeente Amsterdam.

In de eerste 3 maanden van 1972 werden opnieuw botulismusegevallen waargenomen, vooral in Amsterdam-Oost in parken en grachten waar de watertemperatuur niet verhoogd was door een thermische waterverontreiniging. Het betrof steeds watervogels die ook op andere plaatsen konden fourageren, zodat niet was vast te stellen waar deze vogels het botulinumtoxine hadden opgenomen. Een overzicht van deze ziektegevallen is gegeven in tabel 5. De diagnose botulismus werd in een aantal ziektegevallen bevestigd (tabel 7); hierbij werd uitsluitend het type C-toxine vastgesteld.

Tabel 5

Overzicht van het aantal watervogels, dat in het 1e kwartaal 1972 met symptomen van botulismus is gestorven.

Survey of the number of waterfowl, that died in the first quarter of 1972 with symptoms of botulism.

Tijdvak	Wilde eend	Meerkoet	Zwaan	Waterhoen	Kuifeend	Kapmeeuw
januari	8	2	—	—	—	—
februari	10	1	1	—	—	1
maart	7	3	—	1	1	—

In het 2e kwartaal 1972 werden geen gevallen van botulismus meer opgemerkt, maar in juli, augustus en september 1972 stierven in verschillende grachten en parken opnieuw veel watervogels onder ziekteverschijnselen die op botulismus wezen. In een beperkt aantal gevallen werd bevestigd dat deze vogels aan botulismus waren gestorven (tabel 7).

Door de afdeling Bepantingen zijn ook in 1972 tellingen uitgevoerd, zodat weer een indruk kan worden verkregen over de omvang van deze sterfte (tabel 6).

Tabel 6

Overzicht van het aantal gestorven of ernstig verlamde watervogels in Amsterdam van 10 juli tot 18 september 1972.

Survey of the number of dead or seriously paralysed waterfowl in Amsterdam observed between 10 July and 18 September, 1972.

	10-17 juli	17-24 juli	24-31 juli	31 juli -7 aug.	7-14 aug.	14-21 aug.	21-28 aug.	28 aug. -4 sept.	4-11 sept.	11-18 sept.
Aantal	9	2	8	9	86	66	77	39	148	2



Het blijkt dat botulismus in de zomer 1972 vooral is voorgekomen in Amsterdam-Noord; zo werden in de Schellingwouderbreek 111 slachtoffers geteld, in enkele grachten bij de Jisperveldstraat-IJdoornlaan-Alkmaarstraat 72, bij het Riolwaterzuiverings Instituut Noord 42 en in de poel "de Slochter" 32. Er zijn aanwijzingen dat het verzamelen van dode en zieke vogels hier minder intensief is geweest. De grote sterfte in de 1e helft van september doet bovendien vermoeden dat hier bijzondere omstandigheden een belangrijke rol hebben gespeeld. Als zodanig kan aan het effect van thermische pollutie door het Riolwaterzuiverings Instituut Noord worden gedacht.

In het Vondelpark werden nu slechts 20 gevallen van botulismus geteld. De verminderde sterfte in de stadsparken in het algemeen kan vermoedelijk worden toegeschreven aan een verbeterde inspectie, waarbij zieke of gestorven watervogels tijdig werden verzameld.

Onder de 446 slachtoffers werden weer hoofdzakelijk wilde eenden geteld, nl. 411 exemplaren; verder 11 knobbelzwanen, 7 meerkoeten, 6 slobenden, 5 kuifeenden, 2 wintertalingen, 2 kapmeeuwen, 1 blauwe reiger en slechts 1 sierwatervogel, nl. een krooneend.

Tabel 7

Gevalen van botulismus in Amsterdam, waarbij de klinische diagnose specifiek werd bevestigd.

Cases of botulism in Amsterdam, in which the clinical diagnoses were specifically confirmed.

Tijdvak	Plaatsaanduiding	Diersoort	Aantal
1970, september	Sarphatipark	wilde eend	1
1971, juli	Schellingwouderbreek	wilde eend	1
juli	Sloterplas	wilde eend	3
augustus	Volkstuinen "Nut en Genoegen"	wilde eend	1
augustus	Westerpark	wilde eend	4
augustus	Radioweg	wilde eend	4
augustus	Artisvijver	pijlstaarteend	1
september	Badhoevedorp	wilde eend	1
september	Schellingwouderbreek	wilde eend	2
1972, januari	Archimedesplantsoen	wilde eend	3
januari	Plantsoenen en grachten Amsterdam-Oost	wilde eend	5
maart	Ranonkelkade	wilde eend	1
maart	Volkstuinen "Nut en Genoegen"	knobbelzwaan	1
juli	Vondelpark	knobbelzwaan	2
augustus	Schellingwouderbreek	knobbelzwaan	1
augustus	Slotermeer	wilde eend	3
augustus	Alkmaarstraat	wilde eend	3
september	Riolwaterzuiverings Instituut Noord	wilde eend	2
september	Riolwaterzuiverings Instituut Noord	meerkoet	1
september	Jisperveldstraat	wilde eend	2
			42

#### 4.3.3. In Hilvarenbeek

Op 20 augustus 1970 werd door een jachtopziener voor het eerst abnormale sterfte opgemerkt onder watervogels in een drietal vennen op het landgoed "De Utrecht", nabij Hilvarenbeek. In ongeveer vier weken zijn hier naar schatting enkele duizenden watervogels gestorven. Bij zieke vogels wezen de ziekteverschijnselen op botulismus. De sterfte is in september geleidelijk afgenomen, samenvallend met het verdwijnen van het warme zomerweer.

Door het "Rijksinstituut voor Natuurbeheer" werd op 26 augustus 1970 een telling verricht in één van de drie betrokken vennen (nl. het "Goorven"), op grond waarvan een inzicht kan worden verkregen van de vogelsoorten die bij de sterfte waren betrokken (tabel 8). Hierbij werden 361 kadavers gevonden, die te verdelen waren in: 280 skeletten, 70 kadavers met vliegenmaden en 11 verse kadavers.

Tabel 8

Overzicht van op 26 augustus 1970 dood aangetroffen watervogels in het Goorven.  
Survey of dead waterfowl observed in the "Goorven" on 26 August, 1970.

Vogelsoort	Aantal
Wintertaling	148
Wilde eend	98
Kapmeeuw	83
Meerkoet	11
Waterhoen	8
Watersnip	7
Kuifeend	4
Zwarte stern	1
Porseleinhoen	1
	361

Het aantal gestorven kapmeeuwen was opvallend hoog. Dit is te verklaren door de omstandigheid dat in deze vennen, die omsloten zijn door gebieden van vochtige heide, elk jaar duizenden kapmeeuwen broeden. In de tweede helft van juli vertrekken deze kapmeeuwen geleidelijk en pas daarna keren de andere vogelsoorten (vooral watervogels) weer in grote aantallen terug. Bij de skeletten waren verhoudingsgewijs veel kapmeeuwen; dit zou er op kunnen duiden, dat de sterfte in 1970 in de kapmeeuwenkolonie was begonnen.

In 1971 werden in de eerste helft van juli weer enkele gevallen van botulismus waargenomen bij watervogels, vooral bij talingen en eenden (tabel 9). In de

kapmeeuwenkolonie was geen abnormale sterfte voorgekomen en er werden klinisch geen verdachte gevallen van botulismus vastgesteld. Er werden zodoende in 1971 geen aanwijzingen gevonden dat de kapmeeuwenkolonie een directe rol speelde bij de epidemiologie van botulismus bij watervogels in dit gebied.

Nadat in 1971 de eerste botulismusegevallen waren opgemerkt, werden door jachtopzieners regelmatig de kadavers van watervogels uit het vennengebied verwijderd, hetgeen goed uitvoerbaar bleek te zijn ondanks het moeilijk toegankelijke terrein. Er werd nadien nog maar een enkel verdacht geval van botulismus waargenomen.

In 1972 werden in het vennengebied bij Hilvarenbeek in het geheel geen botulismusegevallen meer vastgesteld bij watervogels.

Tabel 9

Gezellen van botulismus in Hilvarenbeek, waarbij de klinische diagnose specifiek werd bevestigd.

Cases of botulism in Hilvarenbeek, in which the clinical diagnoses were specifically confirmed.

Tijdvak	Diersoort	Aantal
1970, augustus	kuifeend	2
augustus	wintertaling	3
augustus	wilde eend	2
september	wintertaling	1
september	wilde eend	1
september	wintertaling	1
1971, juli	wilde eend	1
juli	wintertaling	4
		15

#### 4.3.4. In Zuidelijk Flevoland

In Zuidelijk Flevoland werd op 24 juni 1971 door vogelliefhebbers voor het eerst abnormale sterfte opgemerkt in een kolonie van visdiefjes en kapmeeuwen langs de Oostvaardersdiepdijk tussen Muiderberg en Lelystad ter hoogte van het gemaal "De Blocq van Kuffeler".

Er waren naar schatting in dit gebied 4.000 paren kapmeeuwen en 400 paren visdiefjes aanwezig. Op 24 juni werd zeer uitgebreide sterfte bij de jonge visdiefjes waargenomen, terwijl ook veel volwassen visdiefjes dood werden aangetroffen. Bij de jonge kapmeeuwen werd eveneens vrij veel sterfte vastgesteld.

Op 30 juni bleek reeds ongeveer 80% van de jonge kapmeeuwen te zijn gestorven; bij de volwassen kapmeeuwen werd nu ook sterfte vastgesteld. Bij zieke vogels werd het ziektebeeld gekenmerkt door verlamningsverschijnselen.

Aanvankelijk werd er een verband gelegd tussen deze sterfte en bespuitingen met herbiciden, die door de Rijksdienst voor de IJsselmeerpolders op wilgenopslag was uitgevoerd. Bij het aanvankelijk ingestelde chemisch-toxicologisch en bacteriologisch onderzoek kon geen oorzaak voor de massale vogelsterfte worden aangetoond. Eerst in een later stadium werd een onderzoek op botulismus ingesteld bij materiaal van 8 kapmeeuwen en 3 visdiefjes, dat bij 4°C was bewaard. Desondanks kon in de inhoud van de digestietractus van een jonge kapmeeuw nog botulinumtoxine worden aangetoond. Bij het onderzoek van de darminhoud van een andere jonge kapmeeuw werden bij de ingespoten muizen verdachte symptomen waargenomen, doch de aanwezigheid van het botulinumtoxine kon in dit geval niet meer met zekerheid worden aangetoond mede door gebrek aan onderzoeksmateriaal; ten tijde van dit onderzoek werd het toxine echter nog niet geconcentreerd met centriflo membraanfilters.

Ondanks de beperkingen, die bij het onderzoek naar het botulinumtoxine een rol speelden, is, indien ook de symptomatologie in aanmerking wordt genomen, toch aannemelijk gemaakt dat hier sprake is geweest van botulismus.

Dit gegeven wordt nog gesteund door het feit dat op 29 augustus 1971 in hetzelfde gebied aan de binnenzijde van de Oostvaardersdiepdijk opnieuw grote vogelsterfte werd geconstateerd, evenals iets noordelijker vlak bij Lelystadhaven. Bij zieke vogels overheersten klinisch de verlamningsverschijnselen. Er kon nu bij meer vogels worden vastgesteld dat deze aan botulismus waren gestorven (tabel 10), maar ook nu was het aantal onderzochte vogels slechts een fractie van het totale aantal dode vogels. Een indruk van deze vogelsterfte kan worden verkregen uit tellingen die door enkele vogelliefhebbers zijn verricht en in het oktobernummer van "Het vogeljaar" zijn gepubliceerd (van der Geld, 1971; Osieck en Roselaar, 1971). Op 4 september 1971 werden op 500 m<sup>2</sup> ongeveer 70 dode vogels geteld, verdeeld over 11 vogelsoorten. Vervolgens werden op 17 september over een oeverlengte van 800 m ongeveer 1.700 dode vogels geteld (24 vogelsoorten) en in een waterplas bij het gemaal "De Blocq van Kuffeler" ongeveer 550 vogelkadavers (10 vogelsoorten). Op 24 september leek de sterfte te zijn verminderd: er werden over een oeverlengte van 400 m "slechts" 159 kadavers geteld, verdeeld over 15 vogelsoorten. Bij combinatie van deze tellingen blijkt de grootste sterfte te zijn voorgekomen bij de wintertalingen (ongeveer 2.100); er werden vervolgens 113 dode kluten en 71 wilde eenden geteld. Bij de gestorven vogels bevonden zich voorts enige tamelijk zeldzaam voorkomende broed- en trekvogels (3 bontbekplevieren, 4 lepelaars, 1 poelruiter, 1 porseleinhoen en 5 zwarte ruiters), zodat gesteld kan worden dat door deze sterfte ernstige schade aan de vogelstand was toegebracht. Er is echter geen zekerheid dat ook deze vogels aan botulismus zijn gestorven omdat bij de kadavers geen

betrouwbaar onderzoek meer kon worden uitgevoerd. Van de meeste soorten is bovendien de gevoeligheid voor het botulinumtoxine nog onbekend. Na september 1971 werden geen meldingen meer ontvangen over vogelsterfte in dit gebied.

In 1972 werden in Zuidelijk Flevoland geen gevallen van botulismus waargenomen, ondanks het feit dat de vogelstand in het getroffen gebied zich weer grotendeels had hersteld.

Tabel 10

Gevalen van botulismus in Zuidelijk Flevoland waarbij de klinische diagnose specifiek werd bevestigd.

Cases of botulism in Southern Flevoland, in which the clinical diagnoses were specifically confirmed.

Tijdvak	Plaatsaanduiding	Diersoort	Aantal
1971, juni	Oostvaardersdiepdijk	kapmeeuw	1
augustus	Oostvaardersdiepdijk	wintertaling	6
augustus	Oostvaardersdiepdijk	bergeend	2
augustus	Oostvaardersdiepdijk	wilde eend	1
augustus	Oostvaardersdiepdijk	meerkoeft	1
september	Lelystadhaven	wintertaling	4
september	Lelystadhaven	kapmeeuw	2
september	Oostvaardersdiepdijk	watersnip	1
september	Oostvaardersdiepdijk	tureluur	1
			19

#### 4.3.5. In Groningen

In de stad Groningen kwam in september 1971 sterfte voor bij wilde eenden in het Helperdiepje, waarin koelwater van het Electriciteitsbedrijf voor Groningen en Drente (EGD) werd geloosd. Het ziektebeeld wees op botulismus en dit vermoeden werd bij laboratoriumonderzoek bevestigd (tabel 11).

Ook in oktober, november en december werden nog geregeld botulismusgevallen waargenomen. In januari 1972, toen tijdens een vorstperiode nog meer watervogels naar dit tot 20°C verwarmde open water trokken, nam de sterfte verontrustende vormen aan. Hierop besloot het EGD op 21 januari de lozing van koelwater in dit deel van het koelcircuit te staken, waarna de watertemperatuur snel tot normale waarden daalde: synchroon hiermede kwam er een einde aan de sterfte door botulismus bij watervogels. Van september 1971 tot januari 1972 zijn in het Helperdiepje naar schatting enkele honderden eenden gestorven.

In augustus en oktober 1972 trad botulismus op bij een twintigtal eenden in twee stadsvijvers, waarvan één in de directe omgeving van het EGD ligt.

Bijzonderheden over deze 2 kleine botulismusuitbraken konden verder niet worden achterhaald.

Tabel 11

Gevalen van botulismus in Groningen, waarbij de klinische diagnose specifiek werd bevestigd.

Cases of botulism in Groningen, in which the clinical diagnoses were specifically confirmed.

Tijdvak	Plaatsaanduiding	Diersoort	Aantal
1971, september	Helperdiepje	wilde eend	4
december	Helperdiepje	wilde eend	2
1972, januari	Helperdiepje	wilde eend	3
augustus	Stadsvijver bij EGD	wilde eend	1
oktober	Stadsvijver (overloop riolering)	wilde eend	1
			11

#### 4.3.6. In Leiden/Voorschoten

Naar pas achteraf duidelijk is geworden aan de hand van gegevens, verstrekt door de vogelwacht Rijnland, is in het gebied Leiden/Voorschoten in augustus 1970 een verhoogde sterfte voorgekomen bij watervogels, vooral bij eenden. Het ziektebeeld kwam overeen met botulismus.

Over de winter 1970/1971 zijn geen gegevens bekend geworden maar in juli, augustus en september 1971 stierven hier honderden watervogels met dezelfde ziekteverschijnselen. Bij eenden, die in een naburig laboratorium werden onderzocht, werd als ziekte-oorzaak een *E. coli*-infectie vastgesteld. Er werd echter geen deugdelijk onderzoek op botulismus ondernomen.

In januari 1972 stierven nog steeds wilde eenden met hetzelfde ziektebeeld; nu werden voor het eerst 2 wilde eenden bij het Instituut onderzocht, waarbij de diagnose botulismus kon worden gesteld (tabel 12). Analyse van de situatie leerde dat ook in deze omgeving sprake is van een thermische waterverontreiniging, met de Stedelijke Lichtfabriek (SLF) als belangrijkste producent van warm koelwater. In augustus 1970 werden hier watertemperaturen van 35°C gemeten. De botulismusgevallen in januari 1972 zijn met dit gegeven ook verklaarbaar geworden.

In de zomer van 1972 zijn in dit gebied opnieuw tientallen gevallen van botulismus opgetreden. Eind oktober/begin november werd nog botulismus vastgesteld bij 2 zwanen en in december bij een muskuseend (tabel 12).

Tabel 12

Gevallen van botulismus in Leiden/Voorschoten, waarbij de klinische diagnose specifiek werd bevestigd.

Cases of botulism in Leiden/Voorschoten, in which the clinical diagnoses were specifically confirmed.

Tijdvak	Plaatsaanduiding	Diersoort	Aantal
1972, januari	Voorschoten/Veurseweg	wilde eend	2
oktober	Leiden, Rijnsburgersingel	wilde eend	2
oktober	Leiden, Rijnsburgersingel	knobbelzwaan	1
november	Leiden, Rijnsburgersingel	knobbelzwaan	1
december	Leiden, Rijnsburgersingel	muskuseend	1
			7

#### 4.3.7. In andere gebieden

Sinds 1970 zijn een aantal botulismusuitbraken in andere dan reeds genoemde gebieden waargenomen, die echter van beperkte omvang of van korte duur waren.

Deze kleinere uitbraken kwamen alle voor in de warme zomermaanden: juni, juli, augustus en september (tabel 13). Een samenhang met de andere hiervoor beschreven grotere botulismusuitbraken is moeilijk met zekerheid aan te tonen; de geografische spreiding van de meeste ziektegevallen zou hier wel voor kunnen pleiten. Ook andere gegevens kunnen tot deze veronderstelling bijdragen. Een duidelijk voorbeeld is het geval van botulismus in Rotterdam, waarbij slechts 1 eend ziek werd aangetroffen in een stadssingel. Het is mogelijk dat dit een trekkende eend is geweest, die het botulinumtoxine elders – met name in 's-Gravenhage – had opgenomen. Soortgelijke overwegingen zijn denkbaar bij de gevallen van botulismus in Pijnacker en Delft/Nootdorp, die dan eveneens in relatie met 's-Gravenhage zouden hebben gestaan; de gevallen in Bunschoten/Eemdijk, Hilversum en Marken zouden zo kunnen samenhangen met de grote botulismusuitbraak in Zuidelijk Flevoland. De botulismusegevallen in de laatste 3 plaatsen deden zich ook in dezelfde tijdsperiode voor als die in Zuidelijk Flevoland. Geografisch gezien behoort een verspreiding uit Amsterdam echter hier ook tot de mogelijkheden. Recente gegevens, betreffende het koelcircuit van de SLF, wijzen er tenslotte op dat er een verband kan zijn geweest tussen de botulismusegevallen in Warmond en de ziektehaard in Leiden/Voorschoten.

Bij de botulismusegevallen in Zuilichem (bij Zaltbommel) en in de Vecht tussen Nieuwersluis en Loenen aan de Vecht is een samenhang met andere botulismusuitbraken minder aannemelijk. In Zuilichem stierven in een vijver in

enkele dagen een twintigtal eenden aan botulismus; opvallend bij deze ziekte-uitbraak was het feit dat deze reeds op 21 juni voorkwam, dus voor alle andere botulismusgevallen in 1971.

In de Vecht stierven in augustus en september 1972 enkele honderden watervogels – hoofdzakelijk eenden – aan botulismus. In deze streek speelde een thermische pollutie van het oppervlaktewater evenmin een rol. Een belangwekkende mededeling was dat ratten niet meer werden gezien na het optreden van botulismus. Het is de vraag, evenals in 's-Gravenhage, in hoeverre hier sprake is van een toevallige samenloop van de omstandigheden. Het is denkbaar dat deze ratten eveneens aan botulismus zijn gestorven; een andere mogelijkheid is dat de ratten aan een intercurrente oorzaak zijn gestorven en – aannemende dat bij deze ratten dragers van *Cl. botulinum* type C voorkwamen – dat de kadavers daarna de primaire bron van het toxine zijn geworden.

Tabel 13

Gevallen van botulismus in 9 andere gebieden, waarbij de klinische diagnose specifiek werd bevestigd.

Cases of botulism in 9 other areas, in which the clinical diagnoses were specifically confirmed.

Tijdvak	Plaatsaanduiding	Omvang gesignaleerde sterfte	Specifieke diagnose bij	
			Diersoort	Aantal
1970, augustus	Warmond, Poelmeer	Enkele tientallen	wilde eend	1
augustus	Warmond, Poelmeer	5-10	meerkoet	1
1971, juni	Zuilichem	10-20	wilde eend	2
juli	Bunschoten/Eemdijk	onbekend	wilde eend	1
augustus	Hilversum (Raadhuisingel)	1 eend <sup>a</sup>	wilde eend	1
augustus	Marken	Enkele tientallen	wilde eend	4
september	R'dam (Witte Dorp)	1 eend	wilde eend	1
september	Pijnacker	10-20?	wilde eend	1
1972, augustus	Delft/Nootdorp	Enkele honderden	wilde eend	10
september	Vecht tussen Loenen en Nieuwer sluis	Enkele honderden	wilde eend	5
				27



#### 4.4. SAMENVATTING

Sinds augustus 1970 is in 15 gebieden in Nederland bij watervogels botulismus vastgesteld. Bij het optreden van botulismus in 6 gebieden werd een uitgebreid onderzoek verricht in verband met de bijzondere aspecten die zich hierbij voordeden.

In twee gebieden, nl. Hilvarenbeek en Zuidelijk Flevoland, kwamen de botulismusgevallen uitsluitend in het warmere jaargetijde voor, dus van juni tot september; hier speelden de klimatologische omstandigheden kennelijk een belangrijke rol. Toch moeten ook andere factoren van invloed zijn geweest: in Hilvarenbeek kwam in 1970 massale sterfte door botulismus voor en in 1971 slechts enkele gevallen, terwijl in Zuidelijk Flevoland in 1971 juist op grote schaal botulismus optrad.

De vier andere plaatsen, die bijzondere aandacht kregen, waren 's-Gravenhage, Amsterdam, Groningen en Leiden/Voorschoten, waar de gevallen van botulismus voorkwamen in grote bevolkingscentra. De grootste sterfte kwam weer in de warmere zomermaanden voor, maar er bleven hier ook in de herfst en winter nog botulismusgevallen voorkomen. Er werden gegevens verzameld die er op wijzen dat de thermische pollutie van het oppervlaktewater door electriciteitsbedrijven een belangrijke rol speelde.

In alle gediagnostiseerde botulismusgevallen werd bij typering met specifieke antitoxinen uitsluitend het botulinumtoxine type C aangetoond. Bij dit onderzoek werd steeds gebruik gemaakt van het antitoxine type C-mink. Bij de individuele diagnostiek van botulismus bij watervogels kunnen zich grote moeilijkheden voordoen, aangezien in een aantal gevallen slechts weinig toxine beschikbaar is voor het diagnostisch onderzoek. Deze moeilijkheden werden zowel bij onderzoek van eenden ervaren als bij zwanen, meerkoeten en kapmeeuwen. Door gebruik te maken van centriflo membraanfilters, bleek het mogelijk een aantal gevallen te diagnostiseren die anders niet waren onderkend. Het is daarom mogelijk dat ook voor 1970 reeds incidenteel een geval van botulismus kan zijn opgetreden, maar door de beperkte diagnostische mogelijkheden niet werd vastgesteld. Het is echter hoogst onwaarschijnlijk dat voor 1970 reeds massale sterfte door botulismus is opgetreden; deze mening werd bij navraag door ornithologen bevestigd.

Bij onderzoek van sterfte onder in het wild levende vogels, blijkt botulismus sinds 1970 een belangrijke plaats in te nemen. Op grond van een globale schatting zijn van 1970 tot 1972 tussen 5.000 en 10.000 vogels aan botulismus gestorven. Van Genderen (1972) stelt dan ook terecht dat bij ernstige vogelsterfte, waarbij een chemische intoxicatie – met name pesticiden – wordt vermoed, in de differentieel-diagnostiek eveneens aan botulismus dient te worden gedacht.

## HOOFDSTUK V

### EEN ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN *Cl. botulinum* IN VERBAND MET HET OPTREDEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS

#### 5.1. INLEIDING

Om een goed inzicht te verkrijgen in de factoren die bij het ontstaan van botulismus bij watervogels een rol spelen, is het van groot belang het voorkomen van *Cl. botulinum* – speciaal van type C – in de natuur te kennen.

In Nederland is type C aangetoond bij botulismus van bedrijfsmatig gehouden dieren als paarden, runderen en nertsen; over het voorkomen van type C in de natuur zijn echter geen gegevens bekend. Uit het bescheiden onderzoek van Meyer en Dubovsky (1922b) is gebleken dat type B in Nederland in de bodem voorkomt, evenals een ander toxinetype dat met de antitoxinen type A en B niet was te typeren. Het is verder onbekend in hoeverre de typen A, D, E en F in Nederland voorkomen.

In het hierna te beschrijven onderzoek over het voorkomen van *Cl. botulinum* is in de eerste plaats gelet op de relatie met het optreden van botulismus bij watervogels. Dit gegeven heeft niet alleen als leidraad gediend bij de keuze van de onderzochte water- en bodemonsters, maar ook bij het onderzoek van de verschillende dieren; er is bijzondere aandacht besteed aan het onderzoek van invertebraten, omdat deze als voedselbron van watervogels dienen; bovendien werd *Cl. botulinum* type C reeds eerder aangetoond bij een sarcophage vliegensoort, *Lucilia illustris* (Haagsma *et al.*, 1971).

In daarvoor geselecteerde gevallen is het gelukt reïnculturen te isoleren van de gevonden toxinetypen.

## 5.2. MATERIALEN EN METHODIEKEN

### 5.2.1. Onderzoek van bodemmonsters

De water-, slib- en grondmonsters werden verzameld in gesteriliseerde flessen of in nieuwe, nog nimmer gebruikte, plastic zakken en kartonnen bekers. Een uitzondering hierop vormden de gedroogde grondmonsters, die van de "Stichting voor Bodemkartering" en van de "Rijksdienst voor de IJsselmeerpolders" in afzonderlijke papieren zakjes werden ontvangen. Het materiaal werd bij 4°C bewaard, indien de periode tussen de monsternamen en enten langer dan 48 uur bedroeg.

In de meeste gevallen werd het materiaal binnen 24 uur in vloeibare cultuurmedia geënt. Van elk monster werden minstens 2 cultuurbuizen geënt, waarvoor meestal leverbouillon en CMM werden gekozen; van enkele slibmonsters werden echter 2 cultuurbuizen met leverbouillon geënt. Per cultuurbuis werd 3 ml water of ongeveer 2 g grond of slib geënt. Van watermonsters werd de bovenstaande vloeistof geënt, nadat het zwaardere materiaal naar de bodem was gezakt. Dit bezinksel werd dan als een slibmonster onderzocht, indien 2 g kon worden verzameld.

Aanvankelijk werd het materiaal zowel zonder voorafgaande verhitting als na verhitting gedurende 30 minuten bij 60°C en bij 70°C, aan de cultuurmedia toegevoegd. Deze verhitting van het te enten materiaal werd nagelaten, nadat gebleken was dat het aantal isolaties van *Cl. botulinum* type C na verhitting beduidend minder was.

De geënte media werden gedurende 5 tot 7 dagen bij 30°C geïncubeerd en daarna werd de aanwezigheid van *Cl. botulinum* aangetoond door de culturen te onderzoeken op botulinumtoxinen (zie 3.2.1. en 3.2.2.).

In enkele gevallen konden toxische culturen in eerste instantie niet met voldoende zekerheid worden getypeerd; dit werd soms veroorzaakt door de geringe concentratie van het toxine, in andere gevallen doordat in de met toxine-antitoxine behandelde muizen specifieke sterfte optrad. Er werd dan getracht de moeilijkheden op te lossen door uit het oorspronkelijke monster opnieuw een aantal cultuurbuizen te enten met wisselende hoeveelheden materiaal (van 2 g tot 0,25 g).

### 5.2.2. Onderzoek van dieren

Het onderzoek naar de aanwezigheid van *Cl. botulinum* in vogels, zoogdieren, vissen en invertebraten werd in principe volgens dezelfde methodiek uitgevoerd als bij het onderzoek van bodemmonsters.

Voor onderzoek werden – tenzij anders is vermeld – alleen kadavers geaccepteerd, waarbij geen of nauwelijks waarneembare bederfverschijnselen

aanwezig waren.

Bij het post-mortem werden de kadavers steriel geopend. Hiertoe werd de buik nauwgezet geflambeerd, terwijl de messen en scharen steeds in de vlam van een Bunzenbrander werden gesteriliseerd. De te onderzoeken organen werden lege artis gescheiden verzameld in steriele Petrischalen.

Bij watervogels werden van elke poot 1 of 2 zwemvliezen verzameld, terwijl bij de andere vogels en zoogdieren 1 of 2 tenen met de nagel werden onderzocht. Elk zwemvlies of elke teen werd in een afzonderlijk groeimedium overgebracht.

Als huidmateriaal werd een stukje buikhuid van ongeveer 2 bij 2 cm verzameld, nadat de grotere dekveren waren verwijderd. Deze dekveren werden soms apart onderzocht.

Van het maagdarmkanaal werd de inhoud uit de klier- en spiermaag, uit het middelste gedeelte van de dunne darm en uit het rectum verzameld. Bij vogels met een krop of coeca werd bovendien de inhoud van deze organen onderzocht. Bij kleine vogels kon de inhoud uit de diverse delen van het maagdarmkanaal moeilijk apart worden verzameld. In deze gevallen werd de gehele maag of een darmgedeelte na openknippen in de cultuurbuis overgebracht.

Zo mogelijk werd steeds ongeveer 2 g inhoud van het maagdarmkanaal in het groeimedium geënt. Ook van de lever, de nieren, de milt en de hartspeer werd ongeveer 2 g weefsel na fijnknippen aan een cultuurbuis toegevoegd.

Het onderzoek bij zoogdieren (vooral katten en ratten) verliep op dezelfde wijze als bij vogels is aangegeven.

Bij vissen werden de linker- en rechterkieuwen apart onderzocht en van de digestietractus werden de maag en een darmgedeelte met inhoud in hun geheel overgebracht in het cultuurmedium.

De invertebraten werden meestal in een aparte cultuurbuis onderzocht. Alle maden, poppen, vliegen, kevers, slakken en mosselen werden eerst minstens 5 minuten in een zeef met leidingwater gespoeld. De intacte invertebraten werden daarna in het cultuurmedium overgebracht en met een entnaald fijngewreven. Alleen van maden en poppen, die van één kadaver waren verzameld, werden een aantal (10 tot 20) in een mortier of een Griffith tube fijngewreven, waarna met deze suspensies cultuurmedia werden geënt.

Als groeimedium werd bij het onderzoek van de verschillende diersoorten op het voorkomen van *Cl. botulinum* steeds leverbouillon gebruikt, waarbij per monster één cultuurbuis werd geënt. De leverbouillon werd weer 5 tot 7 dagen bij 30° geïncubeerd en daarna volgens eerder aangegeven methoden onderzocht op de aanwezigheid van *Cl. botulinum*.

## 5.3. RESULTATEN

### 5.3.1. Voorkomen van *Cl. botulinum* in de bodem van Nederland

In verband met de opzet van het onderzoek werden hoofdzakelijk bodemonsters onderzocht van plaatsen waar vogelsterfte door botulismus was vastgesteld.

Ten einde de gegevens, die bij dit onderzoek werden verkregen, beter te kunnen interpreteren, werd een vergelijkend onderzoek uitgevoerd in gebieden met watervogels waar nog geen botulismus bij watervogels was waargenomen.

De bevindingen van deze gebieden werden vervolgens vergeleken met bodemonsters die willekeurig over het land verdeeld waren verzameld; deze laatste serie zal dan min of meer een beeld geven van de verspreiding van *Cl. botulinum* in Nederland.

#### 5.3.1.1. In gebieden waar vogelsterfte door botulismus was vastgesteld

Het onderzoek naar het voorkomen van *Cl. botulinum* werd in augustus 1970 op bescheiden schaal begonnen, nadat in 's-Gravenhage en Hilvarenbeek botulismus was vastgesteld bij watervogels. De water-, slib- en grondmonsters werden verzameld op plaatsen waar de grootste sterfte werd waargenomen. Het bleek dat er soms geen goed onderscheid gemaakt kon worden tussen water en slib bij het verzamelen van de monsters; dit was met name het geval in Hilvarenbeek waar tijdens het waden in ondiep water veel materiaal van de bodem werd opgewerveld. De grondmonsters werden op de roestplaatsen van de wilde eenden verzameld, dicht langs de waterkant.

In 1971 en 1972 werden op uitgebreide schaal monsters onderzocht. Het accent werd steeds meer gelegd op onderzoek van slib, omdat dit vaker een positief resultaat bleek op te leveren.

De gebieden, waar botulismus was vastgesteld, bleken zeer uitgebreid besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C, zoals uit de verzamelde gegevens van tabel 14 blijkt; in deze milieu's werd bovendien veelvuldig type E en enkele keren type B gevonden (respectievelijk 71,6, 14,4 en 3,9% van het aantal onderzochte monsters).

De typen B en E kwamen vaak in combinatie met type C voor in hetzelfde monster; dit is, gelet op de sterke besmetting met type C, zeer goed verklaarbaar. In tabel 14 zijn deze typen afzonderlijk weergegeven, zodat het aantal gevonden toxinetypen hoger is dan het aantal positieve monsters. Type B werd overwegend in grondmonsters van de oeverrand aangetroffen, type E meestal in water- en slibmonsters.

*Cl. tetani* werd eveneens in een aantal grondmonsters aangetoond; uit grond van een eilandje in het Sarphatipark te Amsterdam kon een toxogene reïncultuur

Tabel 14

Voorkomen van *Cl. botulinum* in bodemonsters afkomstig uit gebieden waar botulismus bij watervogels was vastgesteld.

Incidence of *Cl. botulinum* in soil samples from areas where botulism in waterfowl was diagnosed.

Plaatsaanduiding	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype		
			C	B	E
's-Gravenhage	84	58	58	0	6
Amsterdam	34	31	30	0	7
Hilvarenbeek	72	55	55	5	7
Zuidelijk Flevoland	15	12	9	2	7
Groningen	28	22	22	1	1
Leiden/Voorschoten	5	5	4	0	5
Delft/Nootdorp	8*	3	3	0	1
Loenen a/d Vecht	11	7	3	2	3
	257	193 (75,1%)	184 (71,6%)	10 (3,9%)	37 (14,4%)

\* Uitsluitend watermonsters

van *Cl. tetani* worden geïsoleerd, nadat in de oorspronkelijke leverbouilloncultuur van dit grondmonster de hoge concentratie van  $10^5$  LD<sub>50</sub> per 0,5 ml van het type C-toxine was aangetoond.

De bodemonsters werden in alle jaargetijden verzameld en het bleek dat er geen duidelijke verschillen waren vast te stellen tussen de percentages positieve monsters. Het onderzoek in Hilvarenbeek van augustus 1970 tot oktober 1972 is hiervan een duidelijk voorbeeld (tabel 15). De positieve monsters van juni 1971 werden verzameld voor de eerste botulismusegevallen, die pas in juli voorkwamen. Dit duidt er op dat de type C-sporen in de winter niet verdwijnen, zodat het milieu tot de volgende zomerperiode besmet blijft. Dat type C in een dergelijk milieu lang aanwezig blijft, bleek ook uit de onderzoeken in 1972, omdat in dit gebied slechts enkele botulismusegevallen in juli 1971 waren vastgesteld.

In gebieden met botulismus bij watervogels werd het slib van enkele plaatsen kwantitatief op de aanwezigheid van *Cl. botulinum* type C onderzocht. Uit de gegevens van tabel 16 blijkt dat op deze plaatsen het slib zeer intensief was besmet, ook als dit slib één jaar na de laatste gevallen van botulismus werd verzameld (Zuidelijk Flevoland).

Tabel 15

Voorkomen van *Cl. botulinum* in Hilvarenbeek in de verschillende jaargetijden.  
Incidence of *Cl. botulinum* in Hilvarenbeek in the different seasons.

Tijdvak	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinotype				Tijdens de monstername botulismus vastgesteld?
			C	B	E	N.T.	
1970, september	11	7	9 ( 64%)	1	—	—	ja
1971, juni	10	8	8 ( 80%)	—	—	—	neen
1971, juli	23	19	7	—	1	12	ja
1971, november	22	18	18 ( 82%)	2	5	—	neen
1972, april	15	12	12 ( 80%)	—	1	—	neen
1972, oktober	3	3	3 (100%)	2	—	—	neen
	84	67	55	5	7	12	

N.T. = geen onderzoek verricht.

Tabel 16

Quantitatief onderzoek van slib uit gebieden met botulismus op *Cl. botulinum* type C.  
A quantitative examination for *Cl. botulinum* type C in mud from areas with botulism.

Slib-nummer	Verzamelaarsplaats	Datum van bemonstering	Gewichtshoeveelheid slib die in leverbouillon werd geënt				
			2 g	1 g	0,5 g	0,1 g	10-15mg
1	Hilvarenbeek	1971, juni	+	+	+	+	+
2	Hilvarenbeek	1971, juni	+	+	+	+	+
3	Amsterdam	1971, januari	+	+	+	+	+
4	's-Gravenhage	1971, november	+	+	+	+	+
5	's-Gravenhage	1971, november	+	+	+	+	+
6	Hilvarenbeek	1972, april	+	+	+	+	+
7	Hilvarenbeek	1972, april	+	+	+	+	+
8	Hilvarenbeek	1972, april	+	+	+	+	+
9	Hilvarenbeek	1972, april	+	+	+	+	—
10	Hilvarenbeek	1972, april	+	+	+	+	+
11	Hilvarenbeek	1972, april	+	+	+	+	—
12	Zuidelijk Flevoland	1972, juli	+	+	+	+	+
13	Zuidelijk Flevoland	1972, juli	+	+	—	+	—
14	Zuidelijk Flevoland	1972, juli	+	+	+	+	—

+ = *Cl. botulinum* type C aangetoond.

— = *Cl. botulinum* type C niet aangetoond.

Nadat was vastgesteld dat slib van gebieden met botulismus bij watervogels intensief was besmet met *Cl. botulinum* – speciaal type C – werd in een volgend onderzoek het voorkomen van *Cl. botulinum* in de omgeving nagegaan. Dit onderzoek vond plaats in Hilvarenbeek in de omgeving van het zogenaamde Talingputje bij het Goorven op 25 november 1971, dus ongeveer 4 maanden nadat de laatste gevallen van botulismus waren vastgesteld. Dit Talingputje werd gekozen omdat hier zeer veel vogels aan botulismus waren gestorven, terwijl er over een korte afstand een grote variatie in de terreingesteldheid voorkomt. In dit gebied werden op een afstand van ongeveer 20 m slib- en grondmonsters verzameld langs twee raaien, die Noord-Zuid en Oost-West liepen (figuur 1). De monsters werden op 5 cm en op 20 cm diepte verzameld met behulp van een grondboor, waarbij steeds in de periferie werd begonnen en geëindigd werd bij het snijpunt van de twee raaien. Het monster werd met een steriele spatel op de juiste diepte uit het midden van het uitgeboorde materiaal genomen.



Foto 4  
Talingputje bij het Goorven te Hilvarenbeek.  
“Talingputje” near the Goorven at Hilvarenbeek.



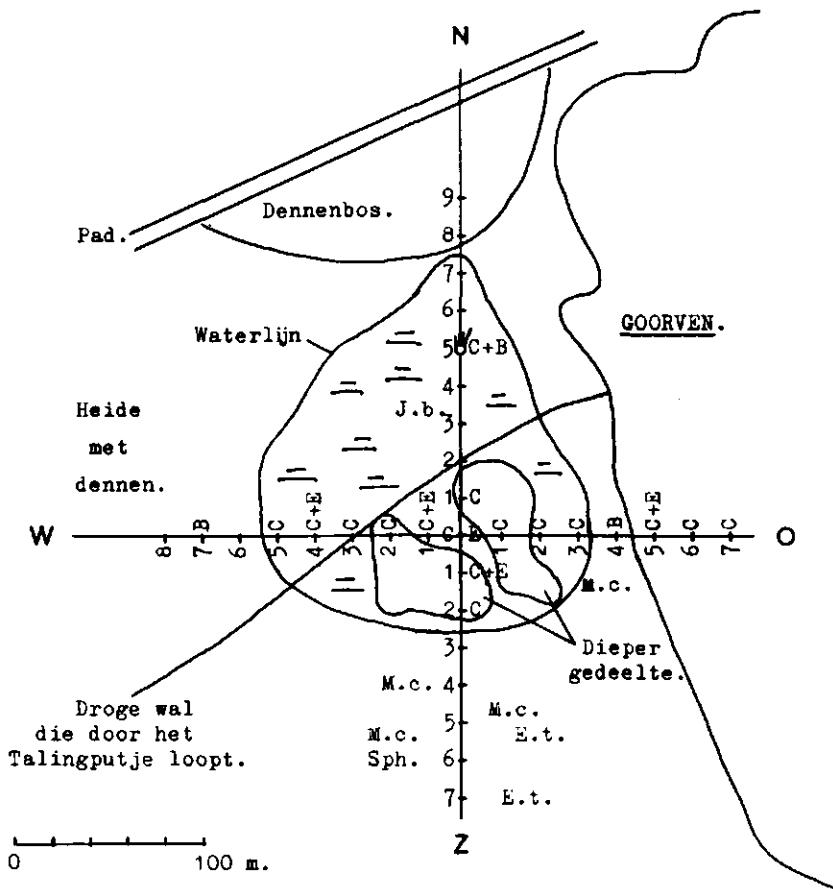


Fig. 1.

Talingputje met raaien waarlangs werd bemonsterd. Resultaten van het onderzoek van de monsters genomen op 5 cm diepte.

"Talingputje" showing transects along which soil samples were collected. Results of the examination of samples from a depth of 5 cm.

- |                          |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| E.t. = Erica tetralix.   | = = Moerassig gedeelte. |
| Sph. = Sphagnum spec.    | C = type C aangetoond.  |
| M.C. = Molinia coerulea. | B = type B "            |
| J.b. = Juncus bufonius.  | E = type E "            |
| o = Juncus effusus.      |                         |

Uit de resultaten blijkt, dat *Cl. botulinum* type C uitsluitend werd gevonden in het bodemslib van het Talingputje en het Goorven; type C werd dus niet meer aangetoond zodra het omgevende heide- en bosachtige terrein met overwegend zandgrond werd bereikt. In 2 grondmonsters, die in dit droge terrein op 5 cm diepte werden genomen, werd wel 2 maal type B aangetoond (W7 en O4); het onderzoek verliep negatief bij de andere 9 monsters. *Cl. botulinum* type B werd in het gebied van het Talingputje ook 2 maal gevonden; in beide gevallen echter op drogere plekken van het terrein, nl. op 5 cm diepte in een pol *Juncus effusus* (pitrus N5) en op 20 cm diepte in de droge wal die in het Talingputje is gelegen (N2). *Cl. botulinum* type E werd in het bodemslib van het Talingputje en het Goorven 5 maal in de monsters van 5 cm diepte – steeds in combinatie met type C – aangetoond (W4, W1, Z1, O5 en punt C) en 1 maal op 20 cm diepte (W1).

Bij een vergelijking tussen monsters, genomen op 5 en op 20 cm diepte, blijken de meer oppervlakkige monsters 18 maal een positief resultaat te hebben opgeleverd tegenover 5 maal bij monsters van 20 cm diepte (W2, N1, O3, Z2 en punt C). Bij een onderzoek van het profiel in het centrum van het Talingputje werd *Cl. botulinum* in het zand op 40 en 50 cm diepte niet meer aangetoond. *Cl. botulinum* – speciaal type C – blijkt dus vooral in de sliblaag van deze gebieden voor te komen.

#### **5.3.1.2. In gebieden met veel watervogels, waarin geen vogelsterfte door botulismus was vastgesteld**

Dit onderzoek werd in augustus 1971 begonnen, nadat was gebleken dat de gebieden met botulismus bij watervogels zeer uitgebreid en intensief met *Cl. botulinum* type C waren besmet.

De onderzochte watergebieden werden geselecteerd op het voorkomen van watervogels aan de hand van de directe waarneming van deze vogels tijdens het bemonsteren of omdat het bekende waterwildreservaten zijn, vaak eigendom van de "Vereniging tot behoud van natuurmonumenten in Nederland" of aanverwante instellingen.

De water-, slib- en grondmonsters werden op dezelfde wijze verzameld als vermeld is bij 5.3.1.1.; het aantal slibmonsters domineerde hier eveneens.

Van alle onderzoeken is de datum van monsternamen vermeld, omdat met de mogelijkheid rekening moest worden gehouden, dat vogels of andere dieren deze gebieden zouden hebben besmet, b.v. vanuit de intensief besmette watergebieden waar botulismus reeds was voorgekomen.

Zoals uit tabel 17 blijkt, werden voor deze veronderstelling geen duidelijke aanwijzingen gevonden. *Cl. botulinum* type C bleek zowel in 1971 als in 1972 in deze botulismuvrije gebieden slechts zeer weinig voor te komen (4,1%). De positieve monsters waren bovendien – in vergelijking met slibmonsters uit gebieden met botulismus bij watervogels – licht met type C besmet, zoals het beperkte kwantitatieve onderzoek (tabel 18) laat zien.

Tabel 17

Voorkomen van *Cl. botulinum* in bodemonsters afkomstig uit gebieden met veel water-  
vogels waarin geen vogelsterfte door botulismus was vastgesteld.

Incidence of *Cl. botulinum* in soil samples from areas with concentrations of waterfowl,  
where no clinical cases of botulism were observed.

Datum van de monstername	Plaatsaanduiding	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype				
				C	B	E	N.T.	L.T.
1971, augustus	Rotterdam	16	3	1	-	-	2	-
augustus	Maassluis	6	0	-	-	-	-	-
september	Maasland (Vlietlanden)	6	0	-	-	-	-	-
september	Oud-Alblas	2	1	-	-	1	-	-
september	Oostelijk Flevoland	3	0	-	-	-	-	-
september	Oudenhorn	2	0	-	-	-	-	-
september	Ridderkerk	2	2	-	-	1	-	1
september	Utrecht	2	0	-	-	-	-	-
september	Vuren	2	0	-	-	-	-	-
september	Westland	4	2	1	1	-	-	-
oktober	De Bilt	2	0	-	-	-	-	-
oktober	Roosendaal	2	0	-	-	-	-	-
oktober	Bergen op Zoom	2	0	-	-	-	-	-
oktober	Akkrum	2	1	-	-	1	-	-
oktober	Vollenhove	1	0	-	-	-	-	-
oktober	Zwolle e.o.	4	0	-	-	-	-	-
oktober	Callantsoog (Zwanenwater)	5	3	-	-	3	-	-
november	Ooststellingwerf	1	0	-	-	-	-	-
1972, februari	Hoek van Holland	4	4	-	4	-	-	-
februari	Alphen a/d Rijn	3	1	-	-	1	-	-
april	Luntershoek	3	1	-	1	-	-	-
april	Heumense vennen	6	2	1	1	-	-	-
mei	Zuidelijk Flevoland, punt 26	8	8	-	-	8	-	-
mei	IJsselmeerdijk, Lelystadhaven	1	0	-	-	-	-	-
mei	Schiermonnikoog	4	2	1	-	1	-	-
mei	Sneekmeer	7	6	-	-	6	-	-
juni	Pijnacker	1	0	-	-	-	-	-
juni	Lelystad, Bronsweg	25	8	2	-	7	-	-
juli	Heiloo	1	0	-	-	-	-	-
augustus	Heerjansdam	1	1	-	1	-	-	-
november	Rotterdam	7	1	-	-	1	-	-
november	Rockanje (Quackjeswater)	6	0	-	-	-	-	-
		141	46	6	8	30	2	1
			(32,6%)	(4,2%)	(5,6%)	(21,2%)		

N.T. = geen onderzoek verricht.

L.T. = muizen, ingespoten met de cultuur van dit monster, vertoonden verschijnselen van  
botulismus; het toxine kon echter niet worden getypeerd, omdat de toxiciteit van de  
cultuur gering was en verloren ging.

Tabel 18

Quantitatief onderzoek van slib uit gebieden met watervogels, waar geen sterfte door botulismus was vastgesteld.

A quantitative examination for *Cl. botulinum* type C in mud from areas with waterfowl, where no cases of botulism were diagnosed.

Slib-nummer	Verzamelaarsplaats	Datum van bemonstering	Gewichtshoeveelheid slib die in leverbouillon werd geënt				
			2 g	1 g	0,5 g	0,1 g	10-15mg
1	Lelystad, Bronsweg	juni 1972	+	+	-	-	-
2a	Lelystad, Bronsweg	juni 1972	+	-	-	-	-
2b	Lelystad, Bronsweg	juni 1972	+	-	-	-	-

Van de plaatsen waar *Cl. botulinum* type C voorkwam, kunnen de volgende bijzonderheden worden vermeld. In Rotterdam werd type C in de Hazelaarsloot te Hillegersberg gevonden, die hoofdzakelijk door eenden wordt bevolkt. In het Westland werd type C aangetoond in een kanaal bij Kwintshul. Dit kanaal staat in verbinding met de 's-Gravenhaagse boezem, waartoe ook het verversingskanaal behoort. Er waren slechts weinig watervogels in dit gebied. Bij Heumen kwam type C voor in het Wychense ven, een oude afgesloten rivierarm; dit ven is, evenals de andere vennen bij Heumen, rijk aan vele soorten waterwild. Type C werd op Schiermonnikoog bij het westelijke strand gevonden in een gebied met enige vegetatie, waar veel bergeenden werden gesignaleerd tijdens de monstername. In het terrein aan de Bronsweg bij Lelystad, dat langs een raai werd bemonsterd, kwam type C 2 maal voor. In dit terrein kwam een grote variatie in de bodemgesteldheid voor, doordat een tamelijk dunne laag zand was gestort op de klei van de vroegere IJsselmeerbodem. In 1971 was hier een kolonie van kapmeeuwen en visdiefjes aanwezig, terwijl ook veel andere vogelsoorten werden waargenomen; type C werd binnen deze vogelkolonies gevonden. *Cl. botulinum* type E werd in dit gebied 7 maal aangetoond, steeds in monsters die grotendeels uit klei waren samengesteld.

Het gebied bij punt 26 in Zuidelijk Flevoland, ten Noorden van de Eem gelegen, was sterk besmet met type E (alle 8 monsters). De oorspronkelijke IJsselmeerbodem blijkt, zoals ook reeds in tabel 14 was te zien, op veel plaatsen besmet te zijn met type E; de hierna in deel 5.3.1.3. te beschrijven onderzoeken zullen dit verder bevestigen. Door het verhoudingsgewijs vrij grote aantal monsters uit Oostelijk en Zuidelijk Flevoland is het percentage monsters met type E (20,4%) vrij hoog uitgevallen.

Uit dit onderdeel van het onderzoek blijkt dat *Cl. botulinum* type B en E in de gebieden met watervogels waar geen vogelsterfte door botulismus was

vastgesteld, ongeveer even vaak werd gevonden als in de gebieden waar wel botulismus bij watervogels was voorgekomen. Het grote verschil is echter dat type C in de eerstgenoemde gebieden weinig voorkwam (4,1%), maar uitgebreid en intensief bleek voor te komen in de gebieden met botulismus bij watervogels (71,6%).

### 5.3.1.3. In willekeurige bodemmonsters

Voor dit onderdeel van het onderzoek werden vanaf augustus 1971 slib- en grondmonsters op verschillende plaatsen in Nederland verzameld. Deze bodemmonsters waren samengesteld uit verschillende grondsoorten, zowel afkomstig van gerijpte als van ongerijpte gronden; het waren verder gebieden waar tijdens het bemonsteren geen watervogels werden gezien, terwijl de situatie van het terrein er op wees dat concentraties van watervogels ook niet waren te verwachten. De resultaten zijn samengevat in tabel 19.

Dit onderzoek werd aangevuld met 203 grondmonsters van de "Stichting voor Bodemkartering" te Wageningen. De meeste monsters (169) waren voor juli 1970 verzameld en gaven dus een indruk van de situatie voordat botulismus bij watervogels was vastgesteld; de 34 resterende monsters waren later verzameld, van november 1970 tot januari 1972. De grond was vanaf het moment van de monsternamen droog bewaard bij kamertemperatuur en de resultaten van dit onderzoek zijn daarom apart weergegeven (tabel 20).

*Cl. botulinum* type C kon, zoals uit de tabellen 19 en 20 blijkt, slechts in enkele gebieden in de bodem worden aangetoond. Het monster bij Windesheim (Overijssel) bestond uit slib van een smalle sloot. Uit het onderzoek van de collectie monsters van de "Stichting voor Bodemkartering" (Stiboka) blijkt verder dat type C vóór het massaal optreden van botulismus bij watervogels ook reeds in de bodem van Nederland voorkwam, nl. in 4,1% van het aantal monsters. De plaatsen, waarin type C voor 1970 werd gevonden, waren gerijpte gronden in Denekamp, Diepenveen, Milsbeek, Ruurlo en Weerselo en ongerijpte gronden (2 maal) in Oude Zeug (N.H.).

In een bodemmonster, dat door Stiboka in Ruurlo werd verzameld, werd voor de eerste maal *Cl. botulinum* type A aangetoond (tabel 20). Dit toxinetype werd daarna niet meer gevonden, zodat kan worden vastgesteld dat type A in Nederland veel minder frequent voorkomt dan de typen B, C en E.

In tabel 19 valt verder het hoge percentage monsters met *Cl. botulinum* type E op. Bij nadere analyse blijken deze gebieden vooral in het voormalige IJsselmeer te liggen; dit gebied blijkt dus, zoals reeds eerder werd gesteld, sterk besmet te zijn met type E. In vergelijkbare maritieme gebieden als de Waddenzee en de Lauwerszee, werd type E eveneens gevonden. Type E werd ook aangetoond in 4 van 68 bodemmonsters, die door de "Rijksdienst voor de IJsselmeerpolders" in Oostelijk en Zuidelijk Flevoland waren verzameld, voordat

Tabel 19

Onderzoek van bodemonsters op *Cl. botulinum*, verzameld vanaf augustus 1971.  
Examination for *Cl. botulinum* in soil samples, collected from August, 1971 onwards.

Plaatsaanduiding	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype			
			C	B	E	L.T.
Akkrum	1	0	-	-	-	-
Amersfoort	2	1	-	-	-	1
Appelsga	2	0	-	-	-	-
Boskoop	1	0	-	-	-	-
Gilze-Rijen	2	0	-	-	-	-
Groningen	3	0	-	-	-	-
Heino	1	1	-	1	-	-
Hilvarenbeek	24	2	-	2	-	-
Lauwerszee	4	2	-	-	2	-
Luntershoek	3	0	-	-	-	-
Rhedensche heide	3	0	-	-	-	-
Nunspeet	2	0	-	-	-	-
Rotterdam	4	0	-	-	-	-
Schiermonnikoog, duinen	2	0	-	-	-	-
Schiermonnikoog, wad	2	2	-	-	2	-
Ulvenhout	1	1	-	1	-	-
Veluwe (oerbank)	1	0	-	-	-	-
Vollenhove	2	1	-	-	1	-
Windesheim (O)	1	1	1	-	-	-
Wyhe	1	0	-	-	-	-
IJsselstein	1	0	-	-	-	-
Willemstad	1	1	-	1	-	-
Zwinderen	1	0	-	-	-	-
Zeist	4	0	-	-	-	-
Scheveningen	3	3	-	3	-	-
Valkenswaard, visvijvers	8	0	-	-	-	-
Liskes, visvijvers	8	0	-	-	-	-
Valkenhorst, visvijvers	10	0	-	-	-	-
Lelystad, kavel 98 en 99	17	11	-	1	10	-
Lelystad, visvijvers	20	13	-	-	13	-
	135	39 (28,8%)	1 (0,7%)	9 (6,6%)	28 (20,7%)	1

L.T. = muizen, ingespoten met de cultuur van dit monster, vertoonden verschijnselen van botulismus; het toxine kon echter niet worden getypeerd, omdat de toxiciteit van de cultuur gering was en verloren ging.

Tabel 20

Onderzoek van bodemmonsters op *Cl. botulinum*, door de "Stichting voor bodemkartering" vanaf 1953 verzameld en droog bewaard bij kamertemperatuur.

Examination for *Cl. botulinum* in soil samples, collected and preserved by the "Stichting voor bodemkartering" from 1953 onwards.

Jaar van monstername	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype			
			C	B	E	A
1953	20	4	—	4	—	—
1954	19	3	—	3	—	—
1955	50	4	2	2	—	—
1957	3	1	1	—	—	—
1958	10	0	—	—	—	—
1964	3	3	2	1	—	—
1965	22	0	—	—	—	—
1969	42	4	2	1	1	1
1970	6	0	—	—	—	—
1971	23	2*	1	2	—	—
1972	5	0	—	—	—	—
	203	21 (10,3%)	8 (3,9%)	13 (6,4%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)

\* In 1 grondmonster werd, ook bij herhaling, zowel type B als type C aangetoond.

het IJsselmeer droogviel; type E was hier dus al aanwezig, voor dat de rijping van deze sedimentatiegronden begon. Het relatief lage percentage (5,9%) is misschien te verklaren door het feit dat deze monsters in gedroogde toestand waren bewaard. In de 203 droog bewaarde monsters van "Stiboka" werd type E immers ook slechts 1 maal aangetoond, nl. in een bodemmonster dat in 1969 bij Sittard was genomen. Dit wekt de indruk dat de bacteriesporen van type E tegen deze wijze van bewaren minder goed bestand zijn dan de sporen van type B en C, die immers nog in bodemmonsters van 19 respectievelijk 18 jaar oud werden aangetoond. De tabellen 19 en 20 laten verder zien dat het percentage monsters, waarin type B voorkwam, overeenkomt met de percentages die in de gebieden met watervogels werden gevonden (tabellen 14 en 17).

De geografische spreiding van *Cl. botulinum* in willekeurige grondmonsters is weergegeven in tabel 21; hieruit is de normale situatie in Nederland af te lezen zonder dat deze beïnvloed werd door botulismusuitbraken. Het blijkt dat, met inachtnaam van het ongelijk aantal monsters per provincie, de verdeling in Nederland betrekkelijk gelijkmatig is te noemen, met uitzondering van Oostelijk en Zuidelijk Flevoland, waar *Cl. botulinum* type E relatief frequent werd gevonden.

Tabel 21

Geografische spreiding van *Cl. botulinum* in Nederland in willekeurige bodemmonsters.  
Geographic distribution of *Cl. botulinum* in soil samples throughout the Netherlands.

Provincie	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype			
			C	B	E	A
Friesland	9	3	0	0	3	0
Groningen	6	1	0	0	1	0
Drente	14	3	0	3	0	0
Overijssel	56	8	4	3	1	0
Gelderland	59	6	2	3	0	1
Utrecht	8	1*	0	0	0	0
N.-Holland	42	3	2	1	0	0
Z.-Holland	14	3	0	3	0	0
Zeeland	11	0	—	—	—	—
N.-Brabant	75	7	0	7	0	0
Limburg	7	3	1	1	1	0
O. en Z. Flevoland	37	24	0	1	23	0
	338	62 (18,3%)	9 (2,7%)	22 (6,5%)	29 (8,6%)	1 (0,3%)

\* L.T. (zie onder tabel 17).

Als bijzonderheid kan tenslotte nog worden vermeld dat bij de gevolgde methode van onderzoek *Cl. tetani* ook 11 maal (5,4%) werd gevonden in de 203 bodemmonsters van "Stiboka". Bij een meer op de isolatie van *Cl. tetani* gerichte methode van onderzoek had dit percentage zeker nog hoger kunnen uitvallen.

### 5.3.2. Voorkomen van *Cl. botulinum* bij dieren

Als leidraad bij het onderzoek naar het voorkomen van *Cl. botulinum* bij dieren diende de betekenis, die deze dieren – zowel vertebraten als invertebraten – zouden kunnen hebben bij de etiologie en epidemiologie van botulismus bij watervogels.

Daarom werden in eerste instantie vogels onderzocht die aan botulismus leden of waren gestorven. Dit onderzoek werd later in de gebieden waar botulismus was vastgesteld, uitgebreid met het onderzoek van vogels die aan intercurrente oorzaken waren gestorven en van normale, gezonde watervogels.

Deze resultaten werden vergeleken met het onderzoek van vogels uit gebieden waar geen botulismus was vastgesteld.

In dit deel van het onderzoek werden ook enkele zoogdieren betrokken, in



het bijzonder katten en ratten, omdat van deze dieren bekend is dat zij een rol spelen bij het optreden van botulismus bij andere dieren als b.v. paarden en runderen.

In sommige gebieden trad vissterfte op in een periode dat botulismus bij watervogels voorkwam. Dit werd de aanleiding ook vissen in het onderzoek te betrekken.

Verder werden veel invertebraten als maden, poppen, zoöphage vliegen en andere insecten als ook verschillende weekdieren om uiteenlopende redenen op *Cl. botulinum* onderzocht.

### 5.3.2.1. Bij vogels, afkomstig uit gebieden waar botulismus was vastgesteld

Dit onderzoek ving aan in 1970 bij 9 watervogels (4 wilde eenden, 3 wintertalingen, 1 slobend en 1 kuifeend), die in Hilvarenbeek aan botulismus waren gestorven. Bij deze vogels kon *Cl. botulinum* in de lever en in de dunne darm niet worden aangetoond. Dit resultaat suggereerde dat bij botulismus van watervogels sprake zou zijn van een intoxicatie, waarbij geen of althans niet meer aantoonbare aantallen kiemen of sporen van *Cl. botulinum* zouden worden opgenomen.

Deze bevindingen weken echter af van de gegevens die in de Verenigde Staten bij "Western duck sickness" waren verzameld; het onderzoek van watervogels op *Cl. botulinum* werd daarom in 1971 en 1972 voortgezet.

Aanvankelijk werden in 1971 alleen de lever en de dunne darm onderzocht van 34 watervogels (20 wilde eenden, 7 wintertalingen, 3 kapmeeuwen, 1 zwaan, 1 nijlgans, 1 meerkoet en 1 kuifeend), die in Hilvarenbeek, 's-Gravenhage en Zuidelijk Flevoland aan botulismus waren gestorven of in het eindstadium van de ziekte verkeerden. *Cl. botulinum* werd nu wel gevonden bij deze vogels; tabel 22 laat zien dat het percentage positieve bevindingen bij aan botulismus gestorven

Tabel 22

Onderzoek van watervogels met botulismus op *Cl. botulinum*; onderzoek in 1971.  
Examination for *Cl. botulinum* in 1971 in waterfowl that were suffering from botulism or had died.

	Lever			Dunne darm		
	Onderzocht	positief	%	Onderzocht	positief	%
Aan botulismus lijdende watervogels	4	0	0	11	6	55
Aan botulismus gestorven watervogels	16	9	56	19	14	74

watervogels hoger lag dan bij aan botulismus lijdende vogels. Bij typering werd in alle gevallen type C gevonden.

Deze resultaten werden de aanleiding het onderzoek verder uit te breiden, waarbij van een groot aantal vogels veel meer organen op *Cl. botulinum* werden onderzocht, ten einde de rol die deze vogels bij de etiologie en epidemiologie van botulismus spelen, nader te kunnen analyseren. Het onderzoek beperkte zich niet tot watervogels waarbij het onderzoek op botulismus positief verliep, maar er werden nu ook intercurrente sterfgevallen en gezonde vogels in onderzoek genomen.

De watervogels met botulismus waren afkomstig uit Amsterdam, Groningen, 's-Gravenhage, Loenen aan de Vecht, Delft/Nootdorp en Leiden/Voorschoten. Er werden geen verschillen vastgesteld tussen de onderzochte vogels van deze uiteenlopende gebieden. Er werden per vogel 11 organen onderzocht en het bleek dat deze botulismuspatiënten vaak zeer uitgebreid besmet waren met *Cl. botulinum* (tabel 23).

*Cl. botulinum* kon bij 22 botulismuspatiënten (43%) in de parenchymateuze organen + hartspier en bij 40 gevallen (78%) in de digestietractus worden aangetoond; in totaal waren 45 patiënten (88%) in één of meer inwendige organen en 36 (71%) uitwendig – op de zwemvliezen en buikhuid – besmet. Dit betekent dat een zeer hoog percentage van de botulismuspatiënten bij de etiologie en epidemiologie van botulismus een belangrijke rol kunnen spelen. De kadavers van deze vogels zullen immers in belangrijke mate bijdragen tot de contaminatie van de bodem met *Cl. botulinum*, terwijl met name elk inwendig besmet kadaver een potentiële nieuwe toxinebron is, waarmee de cyclus van de ziekte kan worden gecontinueerd. Het werkelijke verloop van de botulismus-uitbraak zal verder sterk afhankelijk zijn van diverse ecologische omstandigheden, waarvan de omgevingstemperatuur vermoedelijk de belangrijkste factor is (hoofdstuk 9).

Bij 22 botulismuspatiënten (43%) werd *Cl. botulinum* dus minstens in één van de parenchymateuze organen + hartspier aangetroffen; bij 4 wilde eenden, waaronder een levend voor onderzoek ontvangen wilde eend, waren zelfs alle 4 organen positief. Van deze 22 botulismusegevallen waren 6 watervogels levend aangevoerd, zodat het onderzoek op *Cl. botulinum* onmiddellijk na de euthanasie plaatsvond. De resultaten van het onderzoek van deze groep botulismusegevallen, in het bijzonder van de groep van de 6 hiervoor genoemde levend aangevoerde vogels, duiden er op dat *Cl. botulinum*, in tegenstelling tot de veel verbreide mening, wel invasieve eigenschappen zou kunnen bezitten waarbij het micro-organisme zich soms reeds ante mortem in het lichaam verspreidt. Er kon niet worden vastgesteld in welke mate tijdens de agonie een verspreiding van *Cl. botulinum* plaats vond vanuit de digestietractus. Deze mogelijkheid was zeker aanwezig, omdat bij 40 botulismuspatiënten (78%) de digestietractus met

Tabel 23

Voorkomen van *Cl. botulinum* bij watervogels, afkomstig uit gebieden waar botulismus was vastgesteld.  
Incidence of *Cl. botulinum* in waterfowl from areas where botulism was diagnosed.

	Aantal onderzochte vogels	Aantal gevallen waarin <i>Cl. botulinum</i> werd gevonden													
		Lever	Milt	Nier	Hart	Slok- darm	Maag	Dunne darm	Coeca	Rec- tum	Tenen of zw.vl.	Buik- huid	Par. Org.+ hart	Diges- tie- tractus	Uit- wen- dig
<b>A. Botulismuspatiënten</b>															
Wilde eend	41	10	6	8 <sup>b)</sup>	6	6	17	19	24	21 <sup>b)</sup>	25 <sup>c),b)</sup>	13	18	33	29
Knobbelzwaan	6	2	3	2	1	3	1 <sup>a)</sup>	4	4	4	5	3	2	5	5
Grauwe gans	2	1	-	-	-	1	2	2	2	2	1	1	2	2	
Meerkoet	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Blauwe reiger	1	0	-	-	-	0	0	-	0	-	-	0	0	-	
	51												22	40	36
													(43%)	(78%)	(71%)
<b>B. Intercurrente ziektegevallen</b>															
Wilde eend	11	2	0	2	0	0	2	2	2 <sup>a)</sup>	2	3	1	2	6	3
Kuifeend	2	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Meerkoet	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Kapmeeuw	10	0	0	0	-	0	0	0	-	0	2	0	0	0	2
Andere vogels	13	1	-	-	-	-	3	3	-	3	0	1	1	6	1
	37												3	12	6
													(8%)	(32%)	(16%)
<b>C. Gezonde vogels</b>															
Wilde eend	6	1	-	-	-	1	0	1	0	2	1	2	1	3	2
Meerkoet	7	2	-	-	-	1	0	1	3	1	3	3	2	5	4
Kapmeeuw	14	5	1	2	-	1	1	1	-	0	0	2	5	2	2
Fuut	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
Andere vogels	4	3	-	-	-	0	1	0	0	1	2 <sup>c)</sup>	1	3	1	2
	32												11	12	10
													(34%)	(37%)	(31%)

—: niet onderzocht.

Par org. = paren hymateuze organen.

Zw.vl. = zwemvliezen, onderzoek van linker en rechterpoot bij elkaar geteld.

In alle gevallen werd *Cl. botulinum* type C aangetoond, behalve:

a) *Cl. botulinum* type B 1 maal in de maag van een zwaan en 1 maal in de coeca van een wilde eend aangetoond.

b) *Cl. botulinum* type E 1 maal in de nier, het rectum en op de zwemvliezen van beide poten van een wilde eend aangetoond.

c) Bovendien werd *Cl. tetani* op de poten van een wilde eend en een kraai aangetoond.

*Cl. botulinum* besmet bleek te zijn.

Het hoge percentage watervogels, waarbij *Cl. botulinum* op de zwemvliezen of buikhuid kon worden aangetoond, is verklaarbaar omdat bij eerder onderzoek reeds was vastgesteld dat de bodem van de gebieden waar botulismus optrad, intensief besmet was met *Cl. botulinum* (tabel 14).

Bij de typering, die van alle positieve culturen werd uitgevoerd, bleek in bijna alle gevallen *Cl. botulinum* type C aanwezig te zijn. In 2 gevallen werd echter een ander toxinetype aangetoond, nl. bij een zwaan uit Amsterdam, waarbij in de

maag *Cl. botulinum* type B werd gevonden en bij een wilde eend uit 's-Gravenhage waarbij in de nier, het rectum en op de zwemvlieszen van beide poten *Cl. botulinum* type E voorkwam. Bij de zwaan bleek elders in de digestietractus (dunne darm, coecum en rectum) wel *Cl. botulinum* type C aanwezig te zijn. Bij de wilde eend werd *Cl. botulinum* type C niet aangetroffen, hoewel deze eend aan het botulinumtoxine type C was gestorven. Bij voortgezet onderzoek kon met reeds eerder beschreven methodieken *Cl. botulinum* type E in reïncultuur worden geïsoleerd uit de sterk verontreinigde oorspronkelijke leverbouilloncultuur van de nier van deze eend. *Cl. botulinum* type B en type E lijken verder bij de epidemiologie en de etiologie van botulismus bij watervogels geen rol van betekenis te spelen. Er dient hier echter reeds de aandacht te worden gevestigd op het feit dat de besmetting van botulismuspatiënten met de typen B en E uit oogpunt van de volksgezondheid als een zeer ongewenste situatie is te beschouwen; in de kadavers van deze vogels is immers een postmortale productie van B- en E-toxine mogelijk, terwijl tevens een ernstige contaminatie kan optreden van het milieu met de sporen van *Cl. botulinum* type B en E.

Een belangwekkende vraag is verder hoe lang watervogels besmet kunnen blijven met *Cl. botulinum* type C. Er werd getracht enig inzicht in dit probleem te verkrijgen door een onderzoek van 10 wilde eenden, die als botulismuspatiënten uit Delft/Nootdorp werden ontvangen. Dat deze eenden aan botulismus leden, werd bevestigd door onderzoek van de 4 ernstigste ziektegevallen van deze groep. De resterende 6 minder zieke eenden werden in een stal ondergebracht, die dagelijks grondig werd schoongemaakt. De eenden, die de beschikking hadden over korrelvoer en leidingwater, werden na 3 tot 13 dagen onderzocht op *Cl. botulinum* (tabel 24).

Uit het onderzoek blijkt dat wilde eenden, die aan botulismus leden, nog minstens gedurende 2 weken besmet blijven met *Cl. botulinum* type C. Er schijnen bovendien individuele verschillen voor te komen, zoals blijkt uit de vergelijking van de eenden 3 en 4 met de eenden 5 en 6. Bij de laatste 2 eenden waren klinisch geen ziekteverschijnselen meer vast te stellen, zodat deze eenden dus als klinisch gezonde smetstofdragers waren te beschouwen.

Zoals uit tabel 23 blijkt, werd *Cl. botulinum* ook bij de intercurrente ziektegevallen gevonden. De watervogels van deze groep waren meestal afkomstig uit watergebieden waar ten tijde van het onderzoek botulismus heerste, zoals 's-Gravenhage en Amsterdam – waar de meeste gevallen vandaan kwamen – en Groningen, Zuidelijk Flevoland en Loenen aan de Vecht. Alleen in Hilvarenbeek waren gedurende de laatste 9 maanden geen gevallen van botulismus meer vastgesteld.

De groep "andere vogels" (tabel 23 ad B), die verzameld was in parken en

Tabel 24

Onderzoek van herstellende botulismuspatiënten op *Cl. botulinum* type C.  
Examination of waterfowl recovering from botulism for *Cl. botulinum* type C.

Eend Proef- dag	Onderzoek op <i>Cl. botulinum</i> van											Aantal positieve organen	
	Lever	Milt	Nier	Hart	Slok- darm	Maag	Dunne darm	Coeca	Rec- tum	Zwem- vlie- zen	Buik- huid		
1	3	+	n.t.	—	—	—	—	+	—	—	+	—	3
2	4	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	5
3	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
4	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
5	10	+	+	+	+	—	+	—	+	—	—	+	7
6	13	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	3

+ : *Cl. botulinum* type C aangetoond.

— : Onderzoek verliep negatief.

n.t.: geen onderzoek verricht.

plantsoenen te 's-Gravenhage, bestond uit 1 lijster, 1 vink, 1 fazant en 10 spreeuwen. Bij alle vogels verliep het onderzoek op het botulinumtoxine negatief. In de meeste gevallen kon wel een andere ziekte-oorzaak worden aangetoond, zoals een infectie met *P. multocida* (bij de spreeuwen), pseudotuberculosis, aspergillosis, pericarditis, jicht, loodintoxicatie door hagelkorrels, corpus alienum en cachexie. Het percentage gevallen, waarbij *Cl. botulinum* werd gevonden, is duidelijk lager dan bij de groep van de botulismuspatiënten. Het voorkomen van *Cl. botulinum* op de zwemvliezen en de huid was te verwachten, nadat was aangetoond in welke mate deze gebieden met *Cl. botulinum* zijn besmet (tabel 14). Het vrij hoge percentage vogels (32%) met *Cl. botulinum* in de digestietractus is om dezelfde reden plausibel. Verder zou de aanwezigheid van *Cl. botulinum* in parenchymateuze organen (8%) er weer op kunnen wijzen dat dit micro-organisme invasieve eigenschappen bezit.

De *Cl. botulinum*-culturen werden in bijna alle gevallen als type C getypeerd; er was slechts één uitzondering, nl. de cultuur uit een van de coeca van een wilde eend uit 's-Gravenhage, waarin type B aanwezig bleek te zijn. Uit het onderzoek blijkt dat, naast botulismuspatiënten, ook vogels die aan intercurrente ziekten lijden, een rol kunnen spelen in de verspreiding van *Cl. botulinum* type C naar nog onbesmette gebieden.

Uit de gebieden, waar botulismus bij watervogels was opgetreden, werden ook gezonde vogels onderzocht op het voorkomen van *Cl. botulinum*. Alle vogels waren afkomstig uit 's-Gravenhage, uitgezonderd de fuut en de kapmeeuwen, die

resp. uit Delft/Nootdorp en Hilvarenbeek kwamen Vijf meerkoeten, vier eenden en de fuut werden levend ontvangen, zodat het onderzoek onmiddellijk na de euthanasie kon worden verricht. De overige vogels werden voor d't onderzoek door jagers geschoten en daarna binnen 24 uur onderzocht. De groep "andere vogels" bestond uit 2 fazanten, 1 zwarte kraai en 1 kauw.

De resultaten van het onderzoek zijn in tabel 23 ad C weergegeven. Het blijkt dat in de gebieden, waar botulismus voorkwam, een hoog percentage van de gezonde vogels – speciaal van de watervogels – besmet was met *Cl. botulinum* type C. Deze gezonde smetstofdragers zullen daarom eveneens een belangrijke rol kunnen spelen in de epidemiologie van botulismus bij watervogels. *Cl. botulinum* type C kan door deze vogels immers gemakkelijk naar onbesmette gebieden worden verspreid, terwijl bij intercurrente sterfte de kadavers van deze vogels een potentiële bron van het botulinumtoxine zijn. Deze mogelijkheid doet zich ook nog een jaar na het optreden van de laatste botulismusevallen voor, zoals blijkt uit het onderzoek van de kapmeeuwen in Hilvarenbeek, dat in mei en juni 1972 plaatsvond. De laatste gevallen van botulismus waren nl. in juli en augustus 1971 voorgekomen, zodat via deze gezonde smetstofdragers botulismus in een volgende zomer bij bepaalde ecologische omstandigheden kan recidiveren.

Het hoge percentage gezonde smetstofdragers in een vogelpopulatie, afkomstig uit een gebied waar botulismus was vastgesteld, is tevens het motief geweest op grond waarvan bij het diagnostisch onderzoek geen betekenis werd toegekend aan het voorkomen van *Cl. botulinum* (4.2.1.)

#### 5.3.2.2. Bij vogels, afkomstig uit gebieden waar botulismus niet was vastgesteld

Nadat was aangetoond dat in gebieden, waar botulismus was opgetreden, veel vogels besmet waren met *Cl. botulinum*, werd in 1972 getracht eveneens een onderzoek in te stellen bij vogels die waarschijnlijk niet in contact waren geweest met de botulismusegebieden. Deze laatste voorwaarde bleek de mogelijkheden van het onderzoek aanzienlijk te beperken, omdat nu vogels uit andere delen van het land, zo ver mogelijk van de botulismusegebieden gelegen, moesten worden onderzocht. Het bleek aanvankelijk zeer moeilijk te zijn voldoende van deze vogels voor onderzoek ter beschikking te krijgen (tabel 25 ad A). Zodoende werden ook vogels voor onderzoek geaccepteerd, afkomstig van plaatsen die soms zelfs betrekkelijk dicht bij de botulismusegebieden waren gelegen. Vogels die binnen een arbitrair ingestelde afstand van 20 km van de botulismusegebieden afkomstig waren, zijn daarom in tabel 25 apart vermeld. In deze tabel is eveneens apart vermeld het onderzoek van een grote groep vogels die afkomstig waren uit een kolonie van kapmeeuwen en visdiefjes in de omgeving van Lelystad.

Bij alle vogels verliep het onderzoek op botulismus negatief, zodat het hier ook intercurrente sterfgevallen betrof. Bij de vogels van Poortugaal werd een parathionvergiftiging vastgesteld (afd. toxicologie), terwijl aspergillosis, acuut trauma of cachexie bij de meeste andere vogels de doodsoorzaak bleek te zijn.



Tabel 25

Voorkomen van *Cl. botulinum* bij vogels, afkomstig uit gebieden waar botulismus niet was vastgesteld.  
Incidence of *Cl. botulinum* in birds from botulism-free areas.

Plaats van herkomst	Soort en aantal onderzochte vogels	Aantal waarbij <i>Cl. botulinum</i> type C werd aangetoond	<i>Cl. botulinum</i> aangetoond in			Bijzonderheden
			Par.org.	Digestie-tractus	Zw.vl. + buikhuid	
<b>A. Buiten straal van 20 km</b>						
Dalfsen	7 wilde eenden	0	0	0	0	
Yerseke	4 wilde eenden	0	0	0	0	
Alkmaar	2 wilde eend	0	1	0	1	Een eend met type E.
Schiermonnikoog	1 wilde eend	0	0	0	0	<i>Cl. tetani</i> op de huid.
Jutphaas	1 waterhoen	0	0	0	0	
Harderwijk	1 kapmeeuw	0	0	0	0	
Zwolle	19 <sup>a)</sup>	3	2	2	0	} 2 kolganzen en 1 meerkoet met type C. 1 meerkoet met type B.
Ameland	2 <sup>b)</sup>	0	0	0	0	
	37	3				
<b>B. Binnen straal van 20 km</b>						
Naaldwijk	1 wilde eend	0	n.t.	0	n.t.	
Vlaardingeng	2 <sup>c)</sup>	1	1	1	1	Een reiger met type C en E.
Schiedam	1 wilde eend	0	0	0	0	
Poortugaal	13 <sup>d)</sup>	11	9	8	6	Diverse vogels met type C.
	17	12				
C. Lelystad	39 <sup>e)</sup>	2	2	3	1	Een kapmeeuw met type B. Een stormmeeuw met type C en E. Een kapmeeuw met type C. Een kolgans met type B.

n.t. : niet onderzocht.

Par.org.: parenchymateuze organen.

Zw.vl. : zwemvliezen; onderzoek van linker- en rechterpoot bij elkaar geteld.

a) 12 meerkoeten, 4 kolganzen, 1 rietgans en 2 torenvalken.

b) 1 eidereend en 1 rotgans.

c) 1 wilde eend en 1 blauwe reiger

d) 1 wilde eend, 1 waterral, 1 leeuwerik, 1 fazant, 1 merel, 1 rietgors, 1 spreeuw, 2 vinken, 2 huismussen en 2 ringmussen.

e) 17 kapmeeuwen, 7 visdiefjes, 2 houtduiven, 2 kolganzen, 2 dodaarzen, 1 kluut, 1 fazant, 1 scholekster, 1 stormmeeuw, 1 graspieper, 1 spreeuw, 1 grauwe gans, 1 goudplevier en 1 ongedetermineerde vogel.

De resultaten van dit onderzoek (tabel 25) dienen voorzichtig te worden geïnterpreteerd omdat de meeste vogels zich, vooral tijdens de trek, over grote afstanden kunnen verplaatsen. Bij de watervogels van groep A werd *Cl. botulinum* type C 3 maal (8,1%) gevonden: bij 2 kolganzen in de lever respectievelijk in een der coeca en bij een meerkoet in de lever, de hartspier en de nieren. In de hartspier en op de huid van een eend uit Alkmaar werd bovendien type E aangetoond en in één der coeca van een meerkoet uit Zwolle type B.

Het gebied waar de vogels uit groep C werden verzameld, lag binnen de arbitrair ingestelde afstand van 20 km, gerekend vanaf de plaatsen waar een jaar eerder (1971) in Zuidelijk Flevoland botulismus was opgetreden. De vogels van dit gebied bij Lelystad zijn in tabel 25 apart van de groepen A en B vermeld,



omdat daar in 1972 veel onderzoek werd verricht, waarbij dit terrein achteraf kan worden beschouwd als een controlegebied met veel watervogels zonder dat er botulismus is opgetreden. In groep C werd *Cl. botulinum* type C slechts bij twee vogels (5,1%) in een orgaan aangetoond, nl. eenmaal in de lever van een jonge kapmeeuw en eenmaal in de hartspier van een stormmeeuw. Bij dezelfde stormmeeuw werd *Cl. botulinum* type E eveneens aangetoond in de maag, de dunne darm en het rectum. Verder werd bij deze groep *Cl. botulinum* type B gevonden in de maag van een kapmeeuw en bij een kolgans in het rectum en op een der zwemvliezen. Bij de populatie vogels uit dit gebied bleek type C dus even vaak aanwezig te zijn als de typen B en E. Dit vormt het grote verschil met de vogels, afkomstig uit de gebieden waar botulismus was vastgesteld; bij deze populatie vogels domineerde immers type C heel duidelijk (tabel 23).

Uit deze resultaten (tabel 25, groep A en C) mag met enige reserve worden geconcludeerd, dat vogels slechts sporadisch met *Cl. botulinum* type C zijn besmet, indien deze vogels geen contact hebben gehad met de botulismusgebieden. Een onderzoek van watervogels, verzameld voor het optreden van botulismus in 1970, zou deze conclusie belangrijk hebben kunnen ondersteunen.

De resultaten van het onderzoek van de vogels uit groep B (tabel 25) moeten onder veel voorbehoud worden gehanteerd. Het was immers niet meer na te gaan in hoeverre deze vogels in contact waren geweest met de nabij gelegen botulismusgebieden. Van de groep vogels uit Poortugaal zou men dit haast wel verwachten; het percentage met type C besmette vogels was niet alleen hoog (85%), maar per vogel bleken ook veel organen positief te zijn. Alleen bij de twee ringmussen kon *Cl. botulinum* type C niet worden aangetoond. De groep vogels uit Poortugaal was aan een acute parathionvergiftiging gestorven, zodat in feite gesteld mag worden dat deze vogels voor hun dood gezonde smetstofdragers waren.

Uit de lever van de wilde eend werd volgens eerder beschreven technieken (3.2.2.2.) een reïncultuur van *Cl. botulinum* type C verkregen, die de eigenschappen van een normale, toxogene stam bleek te bezitten.

### 5.3.2.3. Bij diverse zoogdieren

Deze groep dieren werd onderzocht om de kennis van het voorkomen van *Cl. botulinum* in Nederland te vergroten, mede in verband met de etiologie en epidemiologie van botulismus bij watervogels.

Ratten werden in het onderzoek betrokken omdat op twee plaatsen – 's-Gravenhage en Loenen aan de Vecht – was waargenomen dat deze dieren kort voor of tijdens het optreden van botulismus bij watervogels waren verdwenen. Alle ratten werden levend gevangen.

Katten werden onderzocht omdat deze dieren in verband worden gebracht

met het optreden van botulismus bij paarden en runderen; het botulinumtoxine zou meestal gevormd worden in het kadaver van een kat, die in het hooi of in kuilvoer was terechtgekomen. Deze veronderstelling kan alleen juist zijn, indien een gedeelte van de kattenpopulatie besmet is met *Cl. botulinum* type C. De katten werden onderzocht nadat zij aan andere ziekten waren gestorven. Enkele konijnen en een haas werden in onderzoek genomen, omdat deze in het buitenland wel worden genoemd als de bron van het botulinumtoxine, o.a. bij botulismus van fazanten.

Uit tabel 26 blijkt dat bij deze zoogdieren verscheidene smetstofdragers voorkwamen, waarbij *Cl. botulinum* zowel in de parenchymateuze organen als in de digestietractus werd aangetroffen. Het is opvallend dat uitsluitend *Cl. botulinum* type C werd aangetroffen.

Bij bisamratten werd *Cl. botulinum* type C ook op de huid en de poten aangetoond, een bevinding die in verband met de leefwijze van deze dieren wel plausibel is te noemen. De besmette bisamrat uit Hilvarenbeek werd in de omgeving van het Goorven geschoten.

Uit de lever van de bruine rat uit Lelystad, de bisamrat uit Hilvarenbeek en de haas uit Poortugaal werden reïnculturen van *Cl. botulinum* type C geïsoleerd volgens reeds eerder beschreven methodieken (3.2.2.2.), deze culturen bleken normale toxogene eigenschappen te bezitten.

#### 5.3.2.4 Bij vissen

In augustus 1971 kwam in het verversingskanaal te 's-Gravenhage vissterfte voor, hetgeen leidde tot een lokale ophoping van dode vissen. De sterfte werd toegeschreven aan de slechte kwaliteit van het water, in het bijzonder aan het lage zuurstofgehalte. Een aantal dode vissen werd op *Cl. botulinum* onderzocht, omdat deze een gunstig groeisubstraat voor dit micro-organisme zouden kunnen vormen.

Het onderzoek werd in 1972 voortgezet met enkele vissen die dood in het Flevomeer werden gevonden, langs de dijk van Zuidelijk Flevoland.

Zoals uit tabel 27 blijkt, werd *Cl. botulinum* type C aangetoond in de 4 dode palingen, die uit het verversingskanaal afkomstig waren. Bij later onderzoek zou blijken dat in deze palingen ook vrij hoge concentraties van het botulinumtoxine type C voorkwamen. Alhoewel het onderzoek bij de andere vissen uit het verversingskanaal negatief verliep, werd met dit onderzoek toch aangetoond dat vissen een rol kunnen spelen bij de verspreiding van *Cl. botulinum* type C.

Bij een baars uit het Flevomeer werd *Cl. botulinum* type E gevonden. Dit feit behoeft geen verwondering meer te wekken, omdat bij het bodemonderzoek van het voormalige IJsselmeer reeds was gebleken, dat type E in dit gebied veel voorkomt.

Tabel 26

Voorkomen van *Cl. botulinum* bij diverse zoogdieren.  
Incidence of *Cl. botulinum* in some mammal species.

Diersoort	Aantal onderzochte dieren	Aantal waarbij <i>Cl. botulinum</i> werd aangetoond	Herkomst positief geval	<i>Cl. botulinum</i> type C aangetoond in							Doodsoorzaak		
				Lever	Milt	Nier	Maag	Dunne darm	Dikke darm	Rec-tum		Buik-huid	Poten
Bruine rat	9	1	Lelystad	+	—	—	—	—	—	—	—	n.t.	euthanasie
Bisamrat	4	2	Hilvarenbeek v-Gravenhage	+	n.t.	n.t.	+	+	—	—	—	n.t.	+ doodgeschoten
Woelrat	1	1	v-Gravenhage	—	—	+	—	—	—	—	—	—	euthanasie
Kat	15	3	Wouw v-Gravenhage	—	+	+	—	—	—	+	+	n.t.	euthanasie trauma
Haas	1	1	Blaricum	—	—	—	—	—	—	—	—	n.t.	n.t. thymoom
Konijn	3	0	Poortugaal	—	—	—	+	—	—	—	—	n.t.	n.t. intoxicatie
				+	—	+	—	—	—	—	—	—	— pneumonie
		33											

+ : *Cl. botulinum* type C aangetoond.

— : *Cl. botulinum* type C niet aangetoond.

n.t.: geen onderzoek verricht.

Tabel 27  
 Voorkomen van *Cl. botulinum* bij vissen.  
 Incidence of *Cl. botulinum* in some fish species.

Plaats herkomst	Soort	Aantal onderzochte dieren	Aantal positieve dieren	<i>Cl. botulinum</i> aangetoond in				Toxinetype
				Lever	Digestie- tractus	Kieuwen	Huid	
's-Gravenhage	paling	4	4	n.t.	+	n.t.	n.t.	Type C
's-Gravenhage	karpel	12	0	n.t.	—	n.t.	n.t.	
's-Gravenhage	voorn	8	0	n.t.	—	n.t.	n.t.	
's-Gravenhage	bleek	1	0	n.t.	—	n.t.	n.t.	
Flevomeer	baars	2	1	—	—	+	—	Type E
Flevomeer	snoekbaars	1	0	—	—	—	—	
		28	5					

+ : *Cl. botulinum* aangetoond.

— : *Cl. botulinum* niet aangetoond.

n.t.: Geen onderzoek verricht.

### 5.3.2.5. Bij invertebraten

In het onderzoek werden enkele soorten invertebraten betrokken, enerzijds omdat deze tot het voedselpakket van watervogels behoren en zodoende een rol kunnen spelen bij de besmetting van watervogels met *Cl. botulinum*, anderzijds omdat bepaalde insecten in relatie staan met putride kadavers.

De onderzochte invertebraten behoorden tot de klasse van de insecten (*Insecta*) en tot de klasse van de weekdieren (*Mollusca*); van de *Insecta* werden tweevleugeligen (*Diptera*) en kevers (*Coleoptera*) op *Cl. botulinum* onderzocht, van de weekdieren een aantal zoetwaterslakken en mosselachtigen.

#### *Insecta*

Van de orde der *Diptera* werden maden en poppen van zoöphage vliegen en volwassen vliegen onderzocht, van de orde der *Coleoptera* enkele keversoorten die als "doodgravers" bekend staan (*Necrophorus investigator* en *N. humator*).

Tijdens de botulismusuitbraak in 1970 in Hilvarenbeek werden van 28 kadavers van watervogels maden verzameld. Van 10 tot 15 maden van één kadaver werd een suspensie gemaakt, die daarna op *Cl. botulinum* werd onderzocht. Het onderzoek verliep bij alle 28 monsters positief. Op dezelfde wijze werd *Cl. botulinum* aangetoond in twee groepen maden, die in 1972 waren verzameld tijdens botulismusuitbraken in Delft/Nootdorp en in Loenen aan de Vecht.

Het onderzoek verliep daarentegen negatief bij 5 monsters maden, die in 1972 in Lelystad werden verzameld van kadavers van kapmeeuwen in een gebied waar geen botulismus was vastgesteld.

Een gedeelte van de maden, die in 1970 in Hilvarenbeek waren verzameld, werd op runderlever via het popstadium tot volwassen vliegen gekweekt. Bij determinatie bleken 2 soorten vliegen aanwezig te zijn: *Lucilia illustris* en *Calliphora erythrocephala* (de blauwe vleesvlieg). In één van de 2 groepen poppen en in één van 11 *L. illustris* vliegen kon *Cl. botulinum* type C nog worden aangetoond. Dit lijkt er op te wijzen dat in enkele gevallen type C-sporen tot na de metamorphose persisteren; volwassen vliegen die uit met *Cl. botulinum* besmette maden zijn gegroeid, zouden aldus kunnen bijdragen in de verspreiding van *Cl. botulinum* type C.

Dit gegeven werd in 1972 nader onderzocht door in 2 gebieden volwassen insecten op *Cl. botulinum* te onderzoeken. Voor dit doel werd een vliegenval opgesteld in een gebied waar botulismus voorkwam – Delft/Nootdorp – en in een gebied bij Lelystad waar geen gevallen van botulismus voorkwamen gedurende de proefperiode; het terrein bij Lelystad was een kolonie van kapmeeuwen en visdiefjes, die reeds eerder in 5.3.1.2. werd beschreven. De insecten werden gelokt met gekookte runderlever, waarvan vooraf het onderzoek op *Cl. botulinum* negatief was verlopen. Met dit voedsel werden vooral insecten gevangen, die sensibel waren voor geputrificeerd, organisch materiaal.

Tabel 28

Onderzoek op *Cl. botulinum* van insecten tijdens het voorkomen van botulismus bij watervogels in Delft/Nootdorp.  
Incidence of *Cl. botulinum* in insects during an outbreak of botulism in waterfowl in Delft/Nootdorp.

Verzamelperiode	Insecten soort	Aantal onderzochte dieren	Aantal positieve dieren	Toxinetype			Totaal aantal gevallen van	
				C	E	C + E	type C	type E
1972, 11-15 augustus	<i>L. illustris</i>	10	5	3	1	2	9	6
	<i>C. erythrocephala</i>	5	2	0	0	2		
	<i>H. dentipes</i>	5	2	1	0	1		
15-22 augustus	<i>L. illustris</i>	10	8	0	8	0	1	15
	<i>C. erythrocephala</i>	5	4	0	3	1		
	<i>H. dentipes</i>	10	3	0	3	0		
	Overige soorten	5	0	-	-	-		
22-31 augustus	<i>L. illustris</i>	10	0	-	-	-	3	1
	<i>C. erythrocephala</i>	5	1	0	1	0		
	<i>H. dentipes</i>	5	1	1	0	0		
	Overige soorten	5	2	2	0	0		
		75	28	7	16	6	13	22
			(37%)	(9%)	(21%)	(8%)		

De vliegenva1 in Delft/Nootdorp werd 11 augustus 1972 met medewerking van de gemeentelijke plantsoenendienst in een besloten, parkachtig terrein opgesteld, 1 week nadat hier de eerste gevallen van botulismus bij watervogels waren voorgekomen. De insecten werden in augustus elke week verzameld, maar in september en oktober, toen er geen botulismusegevallen meer werden waargenomen, elke 2 weken. Het bleek dat er verschillende soorten insecten aanwezig waren, waarbij *L. illustris*, *C. erythrocephala* en *Hydrotaea dentipes* sterk domineerden. Door Dr. Th. van Leeuwen (Zoölogisch museum der Universiteit van Amsterdam) werden in de groep "overige soorten" (tabel 28), die in augustus waren verzameld, de volgende soorten gedetermineerd: *Cynomyia mortuorum*, *Muscina assimilis*, *Ophyra leucostoma*, *Hylemyia nigrimana*, *Pollenia rudis*, *Hydrotaea occulta*, *Fanniinae spec.* en *Phaenoniinae spec.* Van de meeste soorten is bekend dat de larven (maden) coprophaag of zoöphaag zijn, dus met name in kadavers leven. De insecten werden gedood door ze 2 tot 3 dagen bij  $-20^{\circ}\text{C}$  te bewaren en daarna op *Cl. botulinum* onderzocht met behulp van reeds eerder beschreven methodieken (5.2.2.).

Het bleek dat in augustus, tijdens het optreden van botulismus bij watervogels, veel insecten besmet waren met *Cl. botulinum*, zowel met type C, type E als met type C en E samen (tabel 28).

In september en oktober – in een periode waarin geen gevallen van botulismus meer werden waargenomen – werd *Cl. botulinum* niet meer aangetoond, alhoewel in september 113 en in oktober 44 *Diptera* werden onderzocht, nl. 71 *L. illustris*, 48 *C. erythrocephala*, 21 *H. dentipes* en 17 van de groep "overige soorten".

In Lelystad werd de vliegenva1 reeds op 30 juni 1972 geplaatst. Het onderzoek werd op dezelfde wijze uitgevoerd als in Delft/Nootdorp. De insecten werden om de 7 tot 14 dagen verzameld, waarbij bleek dat bijna uitsluitend *L. illustris*, *C. erythrocephala* en *Necrophorus spec.* aanwezig waren. Vergeleken met Delft/Nootdorp ontbraken hier in het onderzoek *H. dentipes* en "andere soorten" *Diptera* omdat deze slechts sporadisch werden verzameld. In het vogelrijke gebied werden tijdens de inspecties van het terrein geregeld dode vogels gevonden in verschillende stadia van decompositie; het betrof vooral kapmeeuwen en visdiefjes. Desondanks werd *Cl. botulinum* bij de onderzochte insecten slechts enkele malen aangetoond, zoals in tabel 29 is weergegeven.

Deze resultaten passen bij het beeld dat tijdens het onderzoek in Delft/Nootdorp werd verkregen, nl. dat slechts zeer weinig insecten met *Cl. botulinum* besmet zijn, indien in de omgeving geen gevallen van botulismus voorkomen.

Tabel 29

Onderzoek op *Cl. botulinum* van insecten in een gebied bij Lelystad, waar geen botulismus werd waargenomen.

Incidence of *Cl. botulinum* in insects in a botulism-free area near Lelystad.

Verzamelperiode	Insecten soort	Aantal onderzochte dieren	Aantal positieve dieren	Toxinetype	
				C	E
1972, juli	<i>L. illustris</i>	40	4	4	0
	<i>C. erythrocephala</i>	2	0	—	—
	<i>N. investigator</i>	5	0	—	—
augustus	<i>L. illustris</i>	42	0	—	—
	<i>C. erythrocephala</i>	5	0	—	—
	<i>N. investigator</i>	18	1	0	1
september	<i>L. illustris</i>	37	0	—	—
	<i>C. erythrocephala</i>	14	0	—	—
	<i>N. investigator</i>	6	0	—	—
oktober	<i>L. illustris</i>	13	0	—	—
	<i>C. erythrocephala</i>	11	0	—	—
	<i>C. mortuorum</i>	12	0	—	—
	<i>N. investigator</i>	8	0	—	—
	<i>N. humator</i>	1	0	—	—
		214	5 (2,3%)	4 (1,9%)	1 (0,5%)

### *Mollusca*

In de gebieden waar botulismus bij watervogels was vastgesteld, werden in 1971 en 1972 zoetwaterslakken en enkele mosselachtigen verzameld voor onderzoek op *Cl. botulinum*.

De onderzochte species behoren vermoedelijk voor het merendeel tot het voedselpakket van de verschillende watervogels. De weekdieren werden meestal apart voor dit onderzoek verzameld, maar waren in enkele gevallen uit slibmonsters afkomstig. Bij het onderzoek waren de meeste weekdieren nog in leven; in een aantal gevallen waren in de schelp echter nog slechts restanten van de gestorven gastheer aanwezig. De determinatie van de *Mollusca* werd verricht door Dr. H.J. Over, Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Parasitologie, te Lelystad.

Van het onderzoek is in tabel 30 een overzicht gegeven, waaruit blijkt dat in een hoog percentage (38,4%) van de levende en dode *Mollusca*, *Cl. botulinum* type C kon worden aangetoond. Van de soorten, die in grotere aantallen werden



Tabel 30

Onderzoek op *Cl. botulinum* van *Mollusca*, afkomstig uit gebieden waar botulismus bij watervogels was vastgesteld.  
Examination for *Cl. botulinum* in molluscs from areas where botulism was diagnosed in waterfowl.

Verzamelperiode	Plaats van herkomst	Weekdieren soort	Status van het weekdier	Aantal onderzochte dieren	Aantal positieve dieren	Toxinetype		
						C	B	E
1971, augustus	Verversingskanaal te 's-Gravenhage	<i>Bithynia tentaculata</i>	levend	2	2	2	0	0
augustus	Verversingskanaal	<i>Bithynia tentaculata</i>	dood	5	5	5	0	0
augustus	Verversingskanaal	<i>Physa acuta</i>	levend	1	1	1	0	0
augustus	Verversingskanaal	<i>Physa acuta</i>	dood	2	1	1	0	0
1972, maart	Diemerplas, Amsterdam	<i>B. tentaculata</i>	levend	1	0	-	-	-
maart	Diemerplas, Amsterdam	<i>B. tentaculata</i>	dood	8	0	-	-	-
maart	Diemerplas, Amsterdam	<i>Vaivata piscinalis</i>	dood	1	0	-	-	-
maart	Diemerplas, Amsterdam	<i>Dreissena polymorpha</i>	levend	1	1	1	0	0
maart	Linnaeuskade, A'dam	<i>B. tentaculata</i>	levend	14	2	2	0	0
maart	Linnaeuskade, A'dam	<i>Anadonta cygnea</i>	levend	1	1	0	1	0
1972, mei	Zuidelijk Flevoland	<i>A. cygnea</i>	dood	10	10	10	0	0
juni	Zuidelijk Flevoland	<i>Lymnaea ovata</i>	levend	11	0	-	-	-
				57	23 (40,3%)	22 (38,6%)	1 (1,7%)	0

Tabel 31

Onderzoek op *Cl. botulinum* van *Mollusca*, afkomstig uit gebieden waar geen botulismus was vastgesteld.  
 Examination for *Cl. botulinum* in molluscs from botulism-free areas.

Verzamelperiode	Plaats van herkomst	Weekdieren soort	Status van het weekdier	Aantal onderzochte dieren	Aantal positieve dieren	Toxinetypen		
						C	B	E
1972, april mei mei	Wychense ven	<i>Anadonta cygnea</i>	levend	1	0	-	-	-
	Flevomeer	<i>Dreissena polymorpha</i>	levend	3	0	-	-	-
	Flevomeer	<i>Bithynia tentaculata</i>	levend	13	1	1	0	0
				17	1	1	0	0
					(5,9%)	(5,9%)		

onderzocht, verliep alleen bij *Lymnaea ovata* het onderzoek negatief. *Cl. botulinum* type B werd slechts eenmaal gevonden; het is daarentegen opvallend dat type E in het geheel niet voorkwam in het onderzochte materiaal, hoewel in deze biotopen type E bij dit onderzoek wel herhaaldelijk werd gevonden.

Op dezelfde wijze werden ook een beperkt aantal *Mollusca* onderzocht uit gebieden, waar geen botulismus bij watervogels was vastgesteld; het merendeel werd verzameld uit het Flevomeer bij Oostelijk Flevoland. Zoals uit tabel 31 blijkt, is de besmettingsgraad met *Cl. botulinum* in deze groep duidelijk lager.

In het kader van dit onderzoek werd ook aandacht besteed aan *Mollusca* die in zout water leven. Uit de Waddenzee bij Schiermonnikoog werden in mei 1972 14 levende mosselen – de consumptiemossel *Mytilus edulis* – onderzocht.

Dit onderzoek werd aangevuld met 28 monsters mosselen die door het "Onderzoek Station voor de Zeevisserij" te Den Helder voor de Nederlandse kust waren verzameld tussen maart 1971 en april 1972. Een aantal mosselen van één verzamelplaats was door de medewerkers van dit station vernalen tot een verzamelmonster, dat daarna bij  $-20^{\circ}\text{C}$  werd bewaard. In tegenstelling tot alle

Tabel 32

Onderzoek van mosselen (*Mytilus edulis*), verzameld voor de Nederlandse kust tussen maart 1971 en mei 1972.

Examination for *Cl. botulinum* in mussels (*Mytilus edulis*), collected on different sites on the coast of the Netherlands between March 1971 and May 1972.

Plaats van herkomst	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetypen		
			C	B	E
Holwerd	3	0	–	–	–
De Cocksdorp	3	1	0	0	1
Balgzand	2	0	–	–	–
Petten	3	1	1	0	0
IJmuiden	3	1	0	0	1
Hoek van Holland	3	0	–	–	–
Wemeldinge	3	1	0	1	0
Vlissingen	3	1 <sup>a)</sup>	0	0	0
Hansweert	3	1	0	1	0
Nieuwstad	2	0	–	–	–
Schiermonnikoog	14	3	0	3	0
	42	9 (21,4%)	1 (2,4%)	5 (11,9%)	2 (4,8%)

a) In de cultuurmedia van dit monster was botulinumtoxine aanwezig, dat echter niet kon worden getypeerd omdat de toxiciteit van de media snel verloren ging.

andere onderzoeken bij vertebraten en invertebraten, werden van elk monster gemalen mosselen 3 cultuurbuizen met leverbouillon geënt. De resultaten van deze onderzoeken zijn weergegeven in tabel 32. Het blijkt dat deze consumptiemosselen besmet kunnen zijn met de 3 toxinetypen van *Cl. botulinum*, die in Nederland zijn geïsoleerd. *Cl. botulinum* type B werd het meest gevonden en type C slechts eenmaal; type E neemt een intermediaire plaats in.

### 5.3.3. Isolatie van *Cl. botulinum* in reïncultuur

De isolatie van *Cl. botulinum* uit ernstig verontreinigd materiaal levert, zoals reeds eerder werd vermeld, grote moeilijkheden op en is alleen met enige kans op succes mogelijk, indien het materiaal voldoende kiemen en sporen van *Cl. botulinum* bevat.

Daarom werd slechts in een beperkt aantal gevallen getracht *Cl. botulinum* in reïncultuur te isoleren met methodieken, die reeds in 3.2.2.2. werden beschreven. Als voedingsmedia werden vooral leverbouillon en HIS gebruikt, omdat hiermede de beste resultaten werden bereikt.

#### 5.3.3.1. *Cl. botulinum* type C

Van *Cl. botulinum* type C werden vooral reïnculturen geïsoleerd uit materiaal dat afkomstig was van belangrijke botulismusuitbraken. De stam uit Hilvarenbeek (HV 1970) werd geïsoleerd uit een gekweekte *Lucilia illustris*-vlieg. De overige type C-stammen werden geïsoleerd uit de organen van vogels en zoogdieren, zowel van watervogels die aan botulismus waren gestorven als van dieren die als latente kiemdrager moeten worden beschouwd (tabel 33). De isolatie van toxogene C-stammen in reïncultuur uit de ophopingsculturen van de organen van deze dieren leverde nog tal van moeilijkheden op, omdat ook deze ophopingsculturen ernstig verontreinigd waren met andere clostridiën die op vaste voedingsbodems niet of nauwelijks waren te onderscheiden van toxogene type C-stammen. Indien een karakteristiek kolonietype op de vaste voedingsbodems werd waargenomen, bleken hiervan veel kolonies bij nader onderzoek nontoxisch te zijn en een klein aantal slechts zwak toxisch, d.w.z. slechts ongeveer 1 MLD per 0,5 ml leverbouillon te bevatten. De isolatie werd verder bemoeilijkt omdat het kolonie-aspect van *Cl. botulinum* type C steeds aan kleine variaties onderhevig was, hetgeen vooral samenhang met de groeiomstandigheden in het anaërobenvat. Tijdens het onderzoek bleek dat er bovendien tussen de diverse type C-culturen nog kleine onderlinge verschillen waren.

In een aantal gevallen – Hilvarenbeek, 's-Gravenhage en Amsterdam – werd getracht type C in reïncultuur uit slib te isoleren, zonder dat dit een positief resultaat opleverde. De indruk bestond dat type C de competitieve groei met andere clostridiën verloor in deze zeer ernstig verontreinigde ophopingsmedia.

Tabel 33

Overzicht van de *Cl. botulinum*-stammen die in reïncultuur werden geïsoleerd.  
List of the *Cl. botulinum* strains isolated in pure culture.

Toxine- type	Aanduiding van de geïsoleerde stam	Plaats van herkomst	Geïsoleerd uit	Eventuele ziekte- of doodsoorzaak
C	HV 1970	Hilvarenbeek	<i>Lucilia illustris</i>	..
C	75965	Poortugaal	Lever van een wilde eend	Parathion- vergiftiging
C	80414	Amsterdam	Milt van een knobbelzwaan	Botulismus
C	80671	Delft/Nootdorp	Lever van een wilde eend	Botulismus
C	81290	Groningen	Lever en milt van een wilde eend	Botulismus
C	83218	Leiden	Lever van een knobbelzwaan	Botulismus
C	84381	Leiden	Hart van een muskuseend	Botulismus
C	75617	Lelystad	Lever van een bruine rat	Geen, gezond
C	78158	Hilvarenbeek	Lever van een bisamrat	Geen, gezond
C	78807	Poortugaal	Lever van een haas	Pneumonie
B	WB 1971	's-Gravenhage	Slib uit een verzamel- bekken	—
E	69361	Lelystad	Slib uit een visvijver	—
E	81509	's-Gravenhage	Nier van een wilde eend	Botulismus
A	78638	Ruurlo	Lemige zandgrond	—

### 5.3.3.2. *Cl. botulinum* type E

Er werden 2 reïnculturen geïsoleerd van *Cl. botulinum* type E. Stam 69361 werd geïsoleerd uit slib van een visvijver in Lelystad. In een serie monsters uit deze vijver werd type E — voor zover bekend — voor het eerst in Nederland aangetoond. Dit werd het argument om te trachten dit type in reïncultuur te isoleren, hetgeen na een langdurig onderzoek gelukte, nadat ook in dit geval de verontreiniging met andere clostridiën tal van moeilijkheden had veroorzaakt.

Later werd nog een tweede reïncultuur van type E, stam 81509, uit de nier van 1 wilde eend geïsoleerd. Deze eend, afkomstig uit het Zuiderpark te 's-Gravenhage, was gestorven aan botulismus (type C-toxine aangetoond). Het onderzoek van de organen op *Cl. botulinum* type C verliep negatief, maar in het rectum, in de nieren en op de zwemvliezen van beide poten werd wel *Cl. botulinum* type E aangetoond. De isolatie geschiedde volgens dezelfde methodieken als eerder is vermeld voor type C.

### 5.3.3.3. *Cl. botulinum* type B

Van *Cl. botulinum* type B werd één reïncultuur geïsoleerd uit slib van een

verzamelbekken voor drinkwater (zie 10.4). Aanvankelijk werd het slib, voordat de vloeibare ophopingsculturen werden geënt, gedurende 30 minuten bij 80°C of hoger verhit. Het bleek echter dat deze temperatuur voor de meeste type B-sporen van dit monster te hoog was, omdat hierna slechts enkele weinig toxische culturen werden verkregen.

Het te onderzoeken materiaal werd daarom gedurende 30 minuten bij 65°C verhit, zoals ook steeds bij de isolatie van type C en E was geschied. Na onderzoek van zeer veel subculturen kon uiteindelijk een toxogene reïncultuur van type B worden geïsoleerd.

#### 5.3.3.4. *Cl. botulinum* type A

Uit het grondmonster waarin *Cl. botulinum* type A werd aangetoond, werd getracht een reïncultuur te verkrijgen met methodieken die reeds eerder zijn vermeld. Het gelukte type A reeds uit de eerste serie subculturen te isoleren op HIS, die bij 30°C waren geïncubeerd.

De resultaten van het onderzoek van de culturele, biochemische en serologische eigenschappen van de geïsoleerde *Cl. botulinum*-stammen zullen in een apart hoofdstuk worden besproken (hoofdstuk 8).

### 5.4. SAMENVATTING

In dit onderzoek is aangetoond dat *Cl. botulinum* type A, B, C en E in Nederland in de bodem voorkomen. De percentages waarin de laatste 3 toxinetypen werden gevonden, bleken in willekeurig verzamelde bodemmonsters en in bodemmonsters, die uit botulismusvrije watergebieden met veel watervogels afkomstig waren, ongeveer gelijk te zijn (tabel 34). Deze percentages benaderen vermoedelijk het meest de gemiddelde situatie in Nederland. Men kan hoogstens stellen dat type C in watergebieden iets vaker werd aangetroffen; hierbij dient met de mogelijkheid rekening te worden gehouden dat enkele van deze gebieden, waarin type C werd aangetoond, na 1970 besmet kunnen zijn. Het onderzoek van de serie grondmonsters van Stiboka heeft echter bewezen dat *Cl. botulinum* type C ook voor 1970 – dus voor de ernstige botulismusepidemieën bij watervogels – reeds verspreid in de bodem voorkwam. *Cl. botulinum* type D en F werden in dit onderzoek niet gevonden, terwijl type A slechts 1 maal werd aangetoond.

Een vergelijking met de omliggende West-Europese landen is slechts op beperkte schaal mogelijk. Meyer en Dubovsky (1922b) vonden in bodemmonsters uit België, Zwitserland, Denemarken en Engeland uitsluitend *Cl. botulinum* type B. Stableforth en Galloway (1959) vermelden echter dat Haines in Engeland *Cl. botulinum* type A ook had vastgesteld en wel in 5% van de bodemmonsters. Johannsen (1963) vond in waterrijke gebieden (meren, vijvers,

rivieren) in Zweden in 167 monsters overwegend *Cl. botulinum* type E, in 70% van de bodemmonsters; type B en type C kwamen beide slechts 1 maal voor (0,6%), de andere toxinetypen werden door hem niet aangetroffen. In de USSR – inclusief het in Azië gelegen gebied – werd bij een groot opgezet onderzoek door Kravchenko en Shishulina (1967) in 4.242 bodemmonsters de volgende verdeling van de gevonden toxinetypen vermeld: *Cl. botulinum* type A 0,87%, type B 2,9%, type C 0,21%, type D 0,02% en type E 6,5%.

In het algemeen kan worden geconcludeerd dat in de meeste Europese landen de toxinetypen B en E het meest voorkwamen, terwijl de typen A en C soms ook werden gevonden; een beeld dus zoals dat bij het onderzoek in Nederland eveneens werd aangetroffen in de botulismuvrije gebieden en de willekeurig verzamelde grondmonsters.

In gebieden in Nederland, waar botulismus bij watervogels was opgetreden, werden de typen B en E ongeveer in dezelfde mate aangetroffen. Het grote verschil was echter dat deze gebieden zeer intensief besmet bleken te zijn met *Cl. botulinum* type C (tabel 34). Deze besmetting was 1 jaar nadat de laatste gevallen van botulismus waren voorgekomen, nog niet merkbaar afgenomen.

Tabel 34

Voorkomen van *Cl. botulinum* in de bodem.  
Incidence of *Cl. botulinum* in soil.

Herkomst van de monsters	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype in procenten			
			C	B	E	A
Gebieden met botulismus	257	193	71,6	3,9	14,4	0
Botulismuvrije vogelgebieden	141	46*	4,2	5,6	21,2	0
Willekeurige bodemmonsters	135	39	0,7	6,6	20,7	0
Stiboka	203	21	3,9	6,4	0,5	0,5

\* Drie positieve culturen werden niet getypeerd, zie tabel 17.

Indien dieren – zowel vertebraten als invertebraten – werden onderzocht, kwam eenzelfde verdeling te voorschijn.

In de gebieden waar botulismus was opgetreden bleken niet alleen de watervogels, die aan botulismus waren gestorven of lijdende waren, ernstig besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C, maar ook veel gezonde vogels en vogels die aan intercurrente ziekten waren gestorven. Deze besmetting strekte zich ook uit tot zoogdieren, vissen, in het water levende *Mollusca* en de larvale stadia van zoöphaag levende *Insecta*. Tijdens een uitbraak van botulismus bij watervogels,

bleken de volwassen stadia van deze insecten niet alleen veelvuldig met type C te zijn besmet, maar zelfs nog vaker met type E. *Cl. botulinum* type C blijkt in deze gebieden ubiquitair voor te komen, waarbij een relatie bodem–dier aanwezig lijkt te zijn. De typen B en E komen hier eveneens ubiquitair voor, maar de relatie bodem–dier is veel minder duidelijk; met name type E had dan vaker bij vogels, zoogdieren, vissen en *Mollusca* moeten worden gevonden (tabel 35).

In de gebieden, waar botulismus niet was waargenomen, bleken dieren eveneens besmet te kunnen zijn met *Cl. botulinum* type B, C of E, alhoewel het aantal besmette dieren verhoudingsgewijs veel geringer was. Bij zoogdieren en vogels kwam type C relatief wat meer voor, wat er op zou kunnen duiden dat dit type bij deze dieren gemakkelijker kan persisteren. Bij een nader onderzoek bleken wilde eenden minstens 14 dagen met type C besmet te kunnen blijven. In *Mollusca*, speciaal de consumptiemossel *M. edulis*, werd *Cl. botulinum* type B relatief vaak aangetoond.

Tabel 35

Voorkomen van *Cl. botulinum* bij dieren in gebieden waar botulismus bij watervogels was opgetreden en in botulismuvrije gebieden.  
Incidence of *Cl. botulinum* in animals in areas where botulism in waterfowl had occurred and in botulism-free areas.

Diersoort en herkomst	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype		
			C	B	E
<b>A. Gebieden met botulismus</b>					
Vogels	120	78	76	3	1
Zoogdieren	17	4	4	0	0
Vissen	25	4	4	0	0
<i>Diptera</i>	75	28	13	0	22
<i>Mollusca</i>	57	23	22	1	0
	294	137	<sup>b</sup> 119 (40.5%)	4 (1.4%)	23 (7.8%)
<b>B. Botulismuvrije gebieden</b>					
Vogels*	76	9	5	3	2
Zoogdieren	16	4	4	0	0
Vissen	3	1	0	0	1
<i>Diptera</i>	214	5	4	0	1
<i>Mollusca</i>	59	10	2	5	2
	368	29	15 (4.1%)	8 (2.2%)	6 (1.6%)



Samenvattend kan worden geconcludeerd dat er voor de verspreiding van *Cl. botulinum* tal van mogelijkheden aanwezig zijn; vogels lijken hierbij een grote rol te spelen. *Cl. botulinum* type C zal vooral worden verspreid vanuit de intensief besmette watergebieden, waar botulismus bij watervogels is voorgekomen.

## HOOFDSTUK VI

### EEN ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN HET BOTULINUMTOXINE IN VERBAND MET HET OPTREDEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS

#### 6.1. INLEIDING

Botulismus is een specifieke intoxicatie, waarbij reeds eerder gevormd botulinumtoxine oraal wordt opgenomen. Deze definitie is ook algemeen aanvaard voor botulismus bij watervogels. Slechts Boroff en Reilly (1962) menen op grond van hun onderzoekingen dat een toxinevorming *de novo* ook mogelijk is, omdat zij herhaaldelijk *Cl. botulinum* aantoonde in de lever van aan botulismus lijdende vogels.

Indien men aanneemt dat botulismus bij watervogels wordt veroorzaakt door de opname van "preformed" toxine, betekent dit dat het botulinumtoxine ook in de natuur in voldoende hoge concentraties met behulp van proeven op muizen moet kunnen worden aangetoond, zodat watervogels een letale dosis ervan kunnen opnemen.

De onderzoekingen, die hierna zullen worden beschreven, waren vooral hierop gericht, waarbij, in overeenstemming met gegevens uit de literatuur, bijzondere aandacht werd besteed aan putride, dierlijk materiaal en aan het voorkomen van het toxine in water en slib.

#### 6.2. MATERIALEN EN METHODIEKEN

Het botulinumtoxine werd in de kadavers van vertebraten aangetoond met methodieken die reeds in 3.2.1. zijn beschreven.

Het onderzoek van maden, verzameld van putride kadavers, geschiedde volgens dezelfde principes. Van één kadaver werden 10 grote of 15 kleinere maden gedurende minstens 5 minuten in een zeef met stromend leidingwater

gespoeld, vervolgens in een mortier of Griffith tube fijngewreven en met een bekende hoeveelheid bouillon verdund tot een injecteerbare suspensie, die gedurende 15 minuten bij 3.000 rpm werd gecentrifugeerd. Aspecifieke sterfte bij de muizen werd voorkomen door aan het te onderzoeken materiaal meer penicilline en streptomycine toe te voegen, nl. van elk 2.000 E per ml, terwijl het inoculum 0,25 in plaats van 0,5 ml bedroeg.

Het onderzoek van bepaalde aantallen poppen en zoöphage vliegen geschiedde op dezelfde wijze.

Water en slib, dat op botulinumtoxine werd onderzocht, was verzameld op plaatsen waar de grootste sterfte door botulismus bij watervogels voorkwam. Het materiaal werd na centrifugeren gedurende 5 minuten bij 1.000 rpm op botulinumtoxine type C onderzocht. Dezelfde water- en slibmonsters werden tevens op *Cl. botulinum* onderzocht.

Voor de productie van het botulinumtoxine in water en slib onder experimentele omstandigheden werden uitsluitend monsters genomen, waarvan was aangetoond dat zij intensief besmet waren met *Cl. botulinum* type C. Monsters van 10 tot 15 ml werden bij 30°C geïncubeerd, waarna op verschillende tijdstippen een controle op de productie van botulinumtoxine plaats vond. De concentratie van het botulinumtoxine werd steeds vastgesteld door de MLD te bepalen, zoals reeds in 3.2.3. werd beschreven. In de eerste 3 experimenten werden geen maatregelen genomen het zuurstofgehalte van de geïncubeerde water- en slibmonsters te verminderen. In een vierde experiment met 4 series van 14 slibmonsters was dit wel het geval. In de eerste serie werd de opname van zuurstof uit de lucht voorkómen, door de slibmonsters af te dekken met paraffine-olie. De tweede, derde en vierde serie slibmonsters werden onder anaërobe omstandigheden geïncubeerd volgens de methode van McIntosh en Fildes. De derde en vierde serie werden, in tegenstelling tot de eerste en tweede serie slibmonsters, verrijkt met blokjes lever uit leverbouillon resp. vleespartikels uit CMM.

De resistentie van het botulinumtoxine type C in slib werd bepaald in het Talingputje te Hilvarenbeek met behulp van toxine van stam HV 1970. Een dertigtal cultuurbuizen met leverbouillon en CMM werden met deze stam geënt en gedurende 6 dagen bij 30°C geïncubeerd. Na deze periode werd de bovenstaande cultuurvloeistof afgegoten en werden in Griffith tubes van de blokjes lever uit één leverbouillon cultuur en van de vleespartikels uit een CMM-cultuur een 10% suspensie (w/v) in bouillon gemaakt. Na centrifugeren en het maken van tienvoudige verdunningen werd de concentratie van het botulinumtoxine zowel van de blokjes als van de vleespartikels bepaald op 10<sup>4</sup> MLD per 0,5 g. De resterende blokjes lever en vleespartikels werden over buizen van 108 x 14 mm verdeeld – waarbij de hoeveelheid per buis overeenkwam met de inhoud van 1 cultuurbuis – en vervolgens gedurende 6 dagen bewaard bij –20°C. Op 5 april 1972 werden deze buizen in het Talingputje geplaatst, nadat

elke buis tot de helft met ter plaatse verzameld water en slib was aangevuld en zorgvuldig met een plastic stop was afgesloten. Deze buizen met botulinumtoxine bevonden zich in een rek op een beschaduwde plaats iets onder de waterlijn. Direct na plaatsing werd 1 buis met blokjes lever en 1 buis met vleespartikels medegenomen voor controle van de toxineconcentratie. De toxineconcentratie werd vervolgens aanvankelijk elke 2 weken bepaald, na 3 maanden echter eens per 4 weken. Het onderzoek vond steeds direct na aankomst van de 2 buizen plaats. Van de bovenstaande vloeistof werd de concentratie van het botulinumtoxine in MLD per 0,5 ml bepaald, nadat dit vloeibare materiaal gedurende 5 minuten bij 3.000 rpm was gecentrifugeerd en 1.000 E penicilline en 1.000 E streptomycine was toegevoegd. De blokjes lever en de vleespartikels werden vervolgens verzameld, nauwkeurig gewogen en met bouillon in een Griffith tube tot een 10% suspensie (w/v) verwerkt; daarna werd op analoge wijze de concentratie van het botulinumtoxine in MLD per 0,5 g bepaald.

Van de bovenstaande vloeistof en de 10% suspensies van de blokjes lever en de vleespartikels werd tevens de pH gemeten.

De luchttemperatuur en de temperatuur van het slib en het water in het Talingputje werd 's morgens om 9 uur gemeten op de dag dat de buizen werden verzameld (fig. 3).

De veldproef met wilde eenden werd op 11 september 1970 in Hilvarenbeek begonnen, op plaatsen waar de grootste sterfte door botulismus voorkwam. Hier werden 40 gekortwiekte wilde eenden uitgezet in 5 grote kooien zonder bodem en met zijwanden van wijdmazig gaas. De meeste kooien waren zo geplaatst, dat een gedeelte van de omheinde ruimte uit drooggevalen slib bestond, terwijl in het resterende gedeelte met ondiep water de eenden tijdens het fourageren gemakkelijk de bodem konden bereiken, zodat er voldoende gelegenheid was voedsel uit het water en het bodemslib op te nemen. Er vond verder enige bijvoeding plaats met mais. Tijdens de proefperiode werden in de omgeving van de 3 kooien in het Talingputje (fig. 1) nog watervogels met botulismus aangetroffen, evenals kadavers in verschillende stadia van ontbinding die soms met maden waren bezet. Het experiment werd na 4 weken afgesloten.

## **6.3. RESULTATEN**

### **6.3.1. Onderzoek van kadavers van vertebraten**

Met dit kwantitatieve onderzoek werd beoogd aan te tonen dat in putride kadavers van vogels, zoogdieren en vissen hoge concentraties van het botulinumtoxine kunnen worden aangetroffen, zodat deze kadavers een belangrijke rol kunnen spelen in de epidemiologie van botulismus.

Als leidraad bij de beoordeling van de concentratie van het toxine kan het

gegeven dienen, dat in toxogene culturen van *Cl. botulinum* type C concentraties van  $10^4$  tot  $10^6$  MLD per ml voorkomen.

### 6.3.1.1. Van watervogels

In hoofdstuk 4 werd bij het diagnostisch onderzoek beschreven dat in de weefsels van verse kadavers van watervogels, die aan botulismus zijn gestorven, over het algemeen lage concentraties van het botulinumtoxine werden vastgesteld; meestal bleek nauwelijks 1 MLD per 0,5 ml van het te onderzoeken materiaal aanwezig te zijn. In hoofdstuk 5 werd echter reeds vermeld, dat watervogels, die aan botulismus zijn gestorven, veelvuldig met *Cl. botulinum* type C besmet zijn. Een postmortale productie van het botulinumtoxine in deze kadavers was dus in principe mogelijk.

Tijdens botulismusuitbraken in 's-Gravenhage, Hilvarenbeek, Amsterdam en Delft werd daarom van enkele min of meer putride kadavers van watervogels de concentratie van het botulinumtoxine in enkele organen bepaald. Uit tabel 36 blijkt dat de concentratie van het toxine hierin zeer hoge waarden kan bereiken. Van de meeste kadavers was de ouderdom onbekend, met uitzondering echter van de zwaan uit Amsterdam en de eend uit Hilvarenbeek waarvan bekend was dat zij 3 dagen voor het onderzoek met verschijnselen van botulismus waren gestorven. Van de eend uit park Clingendael kan als bijzonderheid worden vermeld dat deze in een vijver rondreef, waarvan de temperatuur van het water  $19^{\circ}\text{C}$  bedroeg.

Tabel 36

Bepaling van de concentratie van het botulinumtoxine type C in putride kadavers.  
Assay of the concentration of botulinum toxin type C in putrefying cadavers of waterfowl.

Datum	Herkomst	Diersoort	Toxineconcentratie in MLD per g		
			Lever	Inhoud di- gestietractus	Skelet-mus- culatuur
1970, augustus	's-Gravenhage	wilde eend	$1 \times 10^6$	n.t.	n.t.
1972, juli	Hilvarenbeek	wilde eend	$6 \times 10^3$	$1 \times 10^7$	n.t.
juli	Hilvarenbeek	wintertaling	$6 \times 10^2$	$1 \times 10^8$	n.t.
juli	Hilvarenbeek	wintertaling	$6 \times 10^3$	$1 \times 10^6$	n.t.
augustus	's-Gravenhage*	wilde eend	$5 \times 10^1$	$6 \times 10^3$	n.t.
1972, augustus	Amsterdam	knobbelzwaan	$4 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	n.t.
augustus	Delft/Nootdorp	wilde eend	$6 \times 10^4$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^4$

n.t.: geen onderzoek verricht.

\* : park Clingendael.

### 6.3.1.2. Van zoogdieren

Bij het onderzoek van enkele putride kadavers van katten, die in hooi of voordroogkuil waren terechtgekomen en een rol hadden gespeeld bij het optreden van botulismus bij paarden of runderen, bleek dat ook in deze kadavers een hoge concentratie van het botulinumtoxine type C aanwezig kan zijn. Zo werd in geval 26656 in de restanten van een grotendeels gemummificeerde kat  $2 \times 10^4$  MLD per g weefsel aangetroffen, in geval 61884 in detritus uit de buikholte van de kat  $2 \times 10^5$  MLD per g weefsel en in geval 84124 in de lever van een kat  $5 \times 10^4$  MLD per g. (Meer bijzonderheden van deze gevallen van botulismus zijn in hoofdstuk 8.2 vermeld.) Het is niet gelukt kadavers van zoogdieren (ratten, katten), die een rol bij het optreden van botulismus bij watervogels zouden hebben kunnen spelen, voor onderzoek ter beschikking te krijgen. Met bovengenoemde onderzoekingen is echter voldoende aangetoond dat de productie van het botulinumtoxine niet alleen behoeft plaats te vinden in de putride kadavers van watervogels; dit zal immers ook kunnen geschieden in de kadavers van zoogdieren, die latent besmet zijn met *Cl. botulinum* type C (tabel 26).

### 6.3.1.3. Van vissen

In hoofdstuk 5 werd reeds beschreven dat in 4 dode palingen uit het verversingskanaal te 's-Gravenhage *Cl. botulinum* type C werd aangetoond. Een 20% suspensie (w/v) van de ingewanden werd eveneens op botulinumtoxine onderzocht. De snelle, specifieke sterfte van de muizen in de toxineutralisatie-test duidde op de aanwezigheid van veel type C-toxine, waarvan de concentratie echter pas 4 dagen later kon worden bepaald; in 3 palingen werd nog een toxineconcentratie van  $10^3$  MLD per g ingewanden vastgesteld, terwijl in de 4e paling geen toxine meer was aan te tonen. Het materiaal was, in tegenstelling tot de algemene regel, bewaard bij  $4^{\circ}\text{C}$  en het is plausibel dat hierdoor botulinumtoxine verloren is gegaan. Alhoewel dus geen betrouwbare concentratie van het toxine kon worden bepaald, is met dit onderzoek toch aangetoond dat ook in dode vissen de vorming van botulinumtoxine type C mogelijk is.

In dezelfde periode werden ook 12 karpers, 7 voorns en 1 blik, eveneens afkomstig uit het verversingskanaal, op botulinumtoxine onderzocht. Het onderzoek verliep negatief, een resultaat dat in overeenstemming is met het negatief verlopen onderzoek van deze vissen op *Cl. botulinum* (tabel 27).

### 6.3.2. Onderzoek van invertebraten

Dit onderzoek had betrekking op maden en poppen van *L. illustris* en *C. erythrocephala* en op zoöphage *Diptera* die in een vliegenvaal werden gevangen.

De maden waren verzameld in augustus 1970 in Hilvarenbeek, dus in een periode waarin veel watervogels aan botulismus stierven. Van putride kadavers

van 13 wilde eenden en 15 wintertalingen werden 28 monsters maden arbitrair ingedeeld in grote en in kleine maden, die daarna binnen 24 uur op botulinumtoxine werden onderzocht. Dit onderzoek verliep bij 27 monsters positief waarna bij typering steeds het type C-toxine werd vastgesteld. Van 3 positieve monsters stierf maar 1 van de 2 muizen, zodat de toxineconcentratie van deze suspensies slechts 1 LD<sub>50</sub> per 0,25 ml bedroeg. Van de overige monsters stierven beide muizen en van deze groep werd vervolgens van 15 willekeurig gekozen monsters de MLD per 0,25 ml madensuspensie bepaald, met behulp waarvan de gemiddelde toxineconcentratie per made kon worden berekend. Uit tabel 37 blijkt dat de toxineconcentratie in deze maden zeer hoge waarden kan bereiken; deze bedroeg in de grote maden van eendekadavers gemiddeld 70.370 MLD per made.

Tabel 37

Concentratie van het botulinumtoxine type C in maden van zoöphage vliegen.  
Concentration of botulinum toxin type C in maggots of zoophagous flies.

Type made	Diersoort waaruit de maden werden verzameld	Gemiddelde toxineconcentratie in MLD per made
Groot	wilde eend	$2 \times 10^5$
Groot	wilde eend	$2 \times 10^5$
Groot	wilde eend	$2 \times 10^4$
Groot	wilde eend	$2 \times 10^3$
Groot	wilde eend	$2 \times 10^2$
Groot	wilde eend	$2 \times 10^1$
Klein	wilde eend	$1,3 \times 10^1$
Klein	wilde eend	$1,3 \times 10^1$
Klein	wilde eend	$1,3 \times 10^0$
Groot	wintertaling	$2 \times 10^2$
Groot	wintertaling	$2 \times 10^2$
Groot	wintertaling	$2 \times 10^1$
Groot	wintertaling	$2 \times 10^0$
Groot	wintertaling	$2 \times 10^0$
Klein	wintertaling	$1,3 \times 10^0$

Van elk der 28 monsters maden werden 10 tot 15 maden verder gekweekt op stukjes runderlever. Een gedeelte van deze maden werd na 4 dagen onderzocht op botulinumtoxine. Hierbij bleek slechts 1 monster, waarvan de gemiddelde toxineconcentratie eerst  $2 \times 10^5$  MLD had bedragen, nog ongeveer 1 MLD per made te bezitten. De maden van de andere monsters hadden zich kennelijk reeds bevrijd van het toxine. Dit resultaat duidt er op dat het botulinumtoxine niet in deze zoöphaag levende maden werd gevormd, maar dat het toxine met het

voedsel door de maden passief werd opgenomen uit de putride kadavers. Deze mening werd bevestigd door de negatieve bevindingen bij het toxine-onderzoek van kunstmatig gekweekte en in het veld (Hilvarenbeek) verzamelde poppen. De maden van dit onderzoek konden worden geïdentificeerd, doordat het gelukte uit 24 monsters maden vliegen te kweken; deze werden als *L. illustris* en *C. erythrocephala* gedetermineerd (Dr. Th. van Leeuwen).

Zoöphage vliegen werden eveneens op botulinumtoxine onderzocht, nadat deze verzameld waren in een vliegenva, die in Delft/Nootdorp tijdens het optreden van botulismus bij watervogels en in Lelystad in een botulismusrvrij gebied stond opgesteld (zie 5.3.2.5.).

In 3 mengmonsters van 50 exemplaren van *L. illustris*, in Lelystad verzameld op 20 juli, 26 juli en op 1 augustus 1972, verliep het onderzoek negatief; andere zoöphage vliegen werden hier niet onderzocht omdat zij niet voldoende beschikbaar waren.

In Delft/Nootdorp werden op 15 augustus 1972 mengmonsters van 30 exemplaren van *L. illustris*, *C. erythrocephala* en *H. dentipes* onderzocht. Het onderzoek verliep negatief bij *C. erythrocephala*, maar muizen ingespoten met materiaal van de 2 andere monsters, vertoonden specifieke ziekteverschijnselen na 24 tot 48 uur. Alleen van *L. illustris* was voldoende materiaal aanwezig voor de typering van het toxine; het bleek dat hier sprake was van het type C-toxine, doch dat de hoeveelheid toxine zeer gering was. Per *L. illustris*-vlieg was gemiddeld slechts 0,2 MLD toxine aanwezig. Het onderzoek op botulinumtoxine verliep negatief bij 2 mengmonsters van 50 exemplaren van *L. illustris*, die op 25 augustus en op 1 september werden onderzocht.

### 6.3.3. Onderzoek van water en slib

In een onderzoek naar het voorkomen van het botulinumtoxine werden ook water en slib betrokken. Ter vergelijking met gegevens uit de literatuur werd getracht het toxine hierin direct aan te tonen.

Dit onderzoek werd later gevolgd door experimenten, waarbij de productie van het botulinumtoxine in water en slib onder laboratoriumomstandigheden werd nagegaan.

In een apart onderzoek werd onderzocht hoelang het botulinumtoxine kan persisteren in een biotoop, waarin botulismus bij watervogels was opgetreden.

#### 6.3.3.1. Verzameld in gebieden met botulismus

Bij ernstige uitbraken van botulismus werden vanaf 1970 water en bodemslib verzameld op plaatsen, waar de meeste watervogels waren gestorven. Dit materiaal werd binnen 24 uur na het verzamelen op toxine onderzocht. In een zeer hoog percentage van deze monsters werd, zoals reeds in hoofdstuk 5 is beschreven, *Cl. botulinum* type C aangetoond. Het onderzoek op botulinum-



toxine verliep echter steeds negatief, met uitzondering van één monster uit 's-Gravenhage (tabel 38). Dit monster, bestaande uit water en bodemslib, was verzameld in de directe omgeving van een verregaand in ontbinding verkerend kadaver van een fazant, die daar langs de oeverrand in ondiep water dreef. Het onderzoek op *Cl. botulinum* verliep in dit bodemmonster eveneens positief. In water en slib op 2 m van het kadaver werd geen toxine meer gevonden, wat er op zou kunnen wijzen dat de toxineconcentratie in het eerder genoemde monster gering was; de exacte concentratie werd echter niet nader bepaald.

Tabel 38

Onderzoek van water en slib op het voorkomen van botulinumtoxine type C.  
Incidence of botulinum toxin type C in water and mud.

Plaats en jaar van onderzoek	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters
Hilvarenbeek, 1970	12	0
Hilvarenbeek, 1971	33	0
's-Gravenhage, 1970	1	0
's-Gravenhage, 1971	15	1
Groningen, 1971	13	0
Amsterdam, 1971	11	0
Amsterdam, 1972	4	0
Delft/Nootdorp, 1972	8	0
	97	1

De conclusie van dit onderzoek is, dat het massaal optreden van botulismus bij watervogels in Nederland niet wordt veroorzaakt door de opname van het botulinumtoxine met water of slib met het daarin normaal voorkomende plantaardig of dierlijk voedsel.

#### 6.3.3.2. Productie van het botulinumtoxine onder experimentele omstandigheden

In dit onderzoek werd de vorming van botulinumtoxine type C in water en slib, afkomstig uit botulismusegebieden van Amsterdam, Hilvarenbeek en 's-Gravenhage, nagegaan.

In een eerste experiment kon gedurende 30 dagen incuberen bij 30°C in 2 water- en 2 slibmonsters geen productie van botulinumtoxine worden vastgesteld.

In een tweede experiment werden 6 water- en 6 slibmonsters eerst gedurende 21 dagen op dezelfde wijze geïncubeerd. Toen bleek dat in deze serie evenmin toxine werd gevormd, werden aan de water- en slibmonsters een variabele

hoeveelheid blokjes lever (1 tot 5), afkomstig uit cultuurbuizen met leverbouillon, toegevoegd. Na deze verrijking van het medium bleek pas een geringe productie van botulinumtoxine tot stand te komen in 3 water- en 3 slibmonsters, die na 7 dagen aantoonbaar was. De bepaling van de concentratie van het botulinumtoxine geschiedde na 12 dagen, waarbij bleek dat in 1 monster  $2 \times 10$  MLD per ml aanwezig was, terwijl in de 5 andere positieve monsters minder toxine was gevormd. Na 44 dagen was nog maar in 1 water- en 1 slibmonster toxine aan te tonen.

In een derde experiment werden 4 water- en 4 slibmonsters verrijkt met 5 levende exemplaren van *Lymnaea truncatula*. Deze slakken stierven al spoedig na het begin van de incubatie en induceerden een sterke bacteriële groei. Er kon echter gedurende de proefperiode van 14 dagen geen productie van botulinumtoxine in deze monsters worden vastgesteld.

In het vierde experiment werd in de eerste en tweede serie van 14 slibmonsters, die niet met dierlijk materiaal waren verrijkt, gedurende een proefperiode van 21 dagen geen productie van botulinumtoxine vastgesteld. In de met blokjes lever, maar vooral in de met vleespartikels verrijkte slibmonsters, was dit wel het geval. Bij de eerste controle na 7 dagen was alleen in 11 monsters met vleespartikels botulinumtoxine gevormd; de hoogste toxineconcentratie bedroeg  $2 \times 10^3$  MLD per ml. Na 14 en 21 dagen was in de derde serie slechts 1 monster met leverblokjes positief (1 MLD per ml) en 8 monsters met vleespartikels (hoogste MLD  $2 \times 10^3$  per ml).

De resultaten van deze 4 experimenten duiden er op dat een vorming van botulinumtoxine type C in water en slib, dat intensief besmet is met *Cl. botulinum* type C, zeer onwaarschijnlijk is: de vorming van toxine kwam zelfs nog maar in betrekkelijk geringe mate tot stand als water en slib, verrijkt met dierlijk materiaal zoals blokjes lever en vleespartikels, onder anaërobe omstandigheden werden geïncubeerd.

#### 6.3.3.3. Resistentie van het botulinumtoxine in slib

De resistentie van het botulinumtoxine type C in slib werd bepaald, omdat dit gegeven een belangrijke rol kan spelen in de etiologie en de epidemiologie van botulismus bij watervogels.

Het botulinumtoxine bleek bij de gegeven proefomstandigheden zeer resistent te zijn, zowel in de blokjes lever als in de vleespartikels (tabel 39). Vanaf 8 weken was de concentratie van het toxine in de vleespartikels en in de bijbehorende bovenstaande vloeistof meestal 1 log. hoger. Dit zou kunnen samenhangen met de hogere pH die hierin steeds werd gemeten (tabel 40).

De blokjes lever bleven tot het einde van de proef goed herkenbaar; bij de vleespartikels werd dit na 8 weken steeds moeilijker en was bijmenging met slib niet geheel te voorkomen. Uiteindelijk moesten na 7 maanden het slib uit de buis en de niet meer te onderscheiden vleespartikels gezamenlijk als 1 monster



Tabel 39

Resistentie van het botulinumtoxine in slib van het Talingputje.  
Resistance of botulinum toxin in mud under field conditions at "Talingputje" near Hilvarenbeek.

Datum	Tijdsduur van het onderzoek in weken	Concentratie van het botulinumtoxine*				
		In de blokjes lever	In het water bij de blokkjes lever	In de vleesparkitels	In het water bij de vleesparkitels	In de blokjes lever geplaatst in een linnen zakje
1972,						
5 april	0	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	-
19 april	2	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	-
3 mei	4	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	-
17 mei	6	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	-
31 mei	8	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	-
14 juni	10	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	-
28 juni	12	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	-
26 juli	16	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	-
23 augustus	20	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	-
20 september	24	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	-
19 oktober	28	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
15 november	32	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
13 december	36	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>

\* In leverblokjes en vleesparkitels in MLD per 0,5 g; in het water in MLD per 0,5 ml.

Tabel 40

Overzicht van de pH-waarden tijdens het onderzoek naar de resistentie van het botulinumtoxine.  
Table of the pH-values observed during the investigation into the resistance of the botulinum toxin.

Tijdsduur van het onderzoek in weken	pH in de buis met lever		pH in de buis met vlees		pH in de blokjes lever geplaatst in een linnen zakje
	In de blokjes lever	In de bovenstaande vloeistof	In de vleespartikels	In de bovenstaande vloeistof	
4	6,9	6,1	7,4	8,0	—
6	7,5	6,4	7,4	8,2	—
8	6,9	6,1	7,5	8,1	—
10	6,5	6,2	7,9	8,2	—
12	7,3	6,8	7,5	7,5	—
16	6,6	6,4	7,8	7,8	—
20	7,1	7,0	7,5	7,7	—
24	7,7	7,3	8,0	8,4	—
28	6,8	6,2	7,4	7,7	6,9
32	7,3	8,1	7,1	7,9	7,3
36	7,3	6,7	7,5	8,0	7,1
	gem. 7,1	gem. 6,7	gem. 7,5	gem. 7,9	gem. 7,1

Na 9 maanden, bij de voorlopige afsluiting van dit onderzoek, waren de concentraties van het toxine nog even hoog als bij het begin van dit experiment. Dit betekent dat een dergelijk gebied zeer langdurig met botulinumtoxine besmet kan blijven, zodat daar toevallig fouragerende watervogels nog na vele maanden aan botulismus kunnen gaan lijden.

#### 6.3.4. Veldproef met wilde eenden

Vijftien dagen nadat de wilde eenden in de kooien waren geplaatst, werd in één der kooien in het Talingputje een eend gezien met typische verschijnselen van botulismus. Deze eend stierf na een ziekte duur van 4 dagen en onderzoek van het kadaver bevestigde, dat dit dier aan botulinumtoxine type C was gestorven. Bij de overige 39 eenden werden geen ziekteverschijnselen vastgesteld, zodat de proef op 10 oktober 1972 werd beëindigd.

Het resultaat van dit onderzoek is als een bevestiging te zien van de conclusie die reeds getrokken werd bij het onderzoek van water en slib.

#### 6.4. SAMENVATTING

Bij dit onderzoek werd tijdens het optreden van botulismus bij watervogels een zeer hoge concentratie van het botulinumtoxine type C aangetroffen in putride kadavers van watervogels en in de daarin aanwezige maden van zoöphage vliegen.

Deze maden schijnen het toxine oraal op te nemen; indien groeiende maden daarna in een toxinevrij substraat gaan leven, verliezen deze maden het toxine in enkele dagen, hetzij door inactivatie in de darmtractus, of door uitscheiding met de excreta. Er waren dus geen aanwijzingen dat het botulinumtoxine zich in de maden ontwikkelde.

In de poppen van zoöphage vliegen werd geen botulinumtoxine aangetoond en in de volwassen zoöphage vliegen tijdens een uitbraak van botulismus een nauwelijks aan te tonen concentratie van het type C-toxine. Deze vliegen zullen als bron van het botulinumtoxine geen rol hebben kunnen spelen; het lijkt aannemelijk dat deze vliegen het toxine hebben opgenomen tijdens hun contacten met toxische kadavers.

In dode vissen (palingen) en zoogdieren (katten) is eveneens een belangrijke vorming van het botulinumtoxine type C mogelijk, doch de rol van de kadavers van deze dieren lijkt bij het massaal optreden van botulismus bij watervogels vooralsnog van geen betekenis te zijn.

Er werd een groot aantal monsters water en slib op botulinumtoxine onderzocht. Slechts in 1 geval – water uit de directe omgeving van een putride kadaver – werd toxine type C aangetoond. Door experimenteel onderzoek in het laboratorium werd bovendien aannemelijk gemaakt dat in water en slib uit de gebieden met botulismus geen productie van botulinumtoxine tot ontwikkeling komt, ook niet bij anaërobe omstandigheden. Zelfs de verrijking van deze media met dierlijk, organisch materiaal leidde slechts tot een geringe toxinevorming van maximaal  $2 \times 10$  MLD per ml. Pas bij incubatie van deze verrijkte media in een anaëroob milieu werden hogere toxineconcentraties vastgesteld van maximaal  $2 \times 10^3$  MLD per ml.

De resultaten van deze onderzoeken werden bevestigd bij een veldproef met 40 wilde eenden, die in grote kooien waren gehuisvest. Het is daarbij mogelijk geweest, dat de eend die aan botulismus stierf, besmet is door toxisch materiaal dat door het wijdmazige gaas de kooi is binnengedreven.

Het botulinumtoxine type C, onder experimentele omstandigheden in een milieu gebracht waar in ernstige mate botulismus bij watervogels was opgetreden, bleek zo stabiel te zijn dat zelfs na 9 maanden nog geen daling van de concentratie van het toxine waarneembaar was. Hogere zomertemperaturen hadden hierop geen invloed, evenmin als variaties in de pH van 6,1 tot 8,4. In het licht alkalische milieu van de vleespartikels was de concentratie zelfs ongeveer 1 log. hoger, alhoewel vermeld wordt dat de toxiciteit beter gehandhaafd blijft in

een zuur milieu (Prévot en Brygoo, 1953). Het onderzoek heeft aangetoond dat een milieu, dat tijdens een botulismusuitbraak door een opeenhoping van toxische kadavers met type C-toxine is gecontamineerd, gedurende vele maanden voor fouragerende watervogels een potentieel gevaar kan vormen.

## HOOFDSTUK VII

### DE GEVOELIGHEID VAN EENDEN VOOR HET BOTULINUMTOXINE

#### 7.1. INLEIDING

Een goede kennis van de gevoeligheid van watervogels – met name van wilde eenden – voor de verschillende toxinetypen, is van veel belang om het inzicht in de etiologie en de epidemiologie van botulismus bij watervogels te vergroten.

Over de gevoeligheid van wilde eenden voor het botulinumtoxine type C zijn echter slechts enkele gegevens bekend. Gunnison en Coleman (1932) vermelden de gevoeligheid van pijlstaarteenden bij orale applicatie, uitgedrukt in subcutane MLD voor caviae, terwijl Boroff en Reilly (1959) in hun summier onderzoek werken met de orale LD<sub>50</sub> voor muizen. Deze beide maten zijn minder gebruikelijk en daarom zal in dit onderzoek de gevoeligheid worden weergegeven in de thans algemeen aanvaarde intraperitoneale LD<sub>50</sub> voor muizen (zie 2.1.6.).

De gevoeligheid van eenden werd niet alleen voor het type C-toxine bepaald, maar ook voor 3 andere toxinetypen; type B en E omdat deze in Nederland vrij veel bleken voor te komen (hoofdstuk 5) en type A omdat sommige vogels voor dit type gevoelig zijn (Burke, 1919; Prévot en Brygoo, 1953; Pesce de Fagonda en Sardi, 1967).

Verder werd het effect van de applicatie van multiple, subletale doses nagegaan, zowel in verband met het optreden van het "Behring phenomeen" als voor de bestudering van andere immunologische reacties.

#### 7.2. MATERIALEN EN METHODIEKEN

De wilde eenden waren in een eendenkooi gevangen. De volwassen vogels wogen tijdens de proeven 0,9 tot 1,2 kg.

De Khaki Campbell eenden waren op het Instituut gefokt. Voor de



experimenten werden volwassen exemplaren gebruikt met een lichaamsgewicht van 1,4 tot 1,9 kg.

De Peking eenden waren als jonge vogels aangekocht. De eenden werden op verschillende leeftijden gebruikt, waardoor de lichaamsgewichten varieerden van 1,3 tot 2,5 kg.

De caviae waren afkomstig van de instituutsfokkerij en wogen bij de aanvang van de experimenten 350-400 g.

De applicatie van het botulinumtoxine per os geschiedde bij de eenden met behulp van een speciale, gebogen canule, waarmee het toxine rechtstreeks in de oesophagus werd gebracht zodat geen toxine verloren kon gaan. Het totale volume van de vloeistof dat werd toegediend, was per experiment steeds gelijk (5-10 ml), door aan kleine volumens toxine aangepaste hoeveelheden runderbouillon toe te voegen.

De botulinumtoxinen werden verkregen door groei van *Cl. botulinum*-culturen in het medium volgens Cardella gedurende 5 dagen bij 30°C, waarna de cultuur 15 minuten bij 3.000 rpm werd gecentrifugeerd. Het type C-toxine was afkomstig van stam HV 1970, van de stam van Dinter en Kull (type C-mink) en van stam 81290; het A-toxine van stam NCTC 7272; het B-toxine van stam NCTC 7273 en het E-toxine van stam NCTC 8266. De laatste 3 culturen werden in 1963 ontvangen uit Engeland (National collection of type cultures, Central public health laboratory, Londen). De botulinumtoxinen werden afgedekt met paraffine-olie en in kolfjes van 100 ml bij 4°C bewaard. De concentratie van het botulinumtoxine werd in elk kolfje nauwkeurig bepaald in LD<sub>50</sub> per ml, zoals reeds in 3.2.3. werd beschreven.

Het gehalte aan toxineutraliserende antistoffen bij eenden werd als volgt onderzocht: in puntvormige buisjes werd 0,5 ml onverdund, niet geïnactiveerd eendeserum samengebracht met 0,5 ml van een toxineverdunding die 16 LD<sub>50</sub> C-mink toxine per 0,25 ml bevatte. Het mengsel werd na even schudden gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd, waarna het toxineutraliserend vermogen van het eendeserum werd bepaald door het mengsel intraperitoneaal in te spuiten bij 2 Swiss Random muizen van 18 tot 20 g. Indien de muizen aan botulismus stierven betekende dit dat in het eendeserum per ml minder dan 64 anti-LD<sub>50</sub> toxineutraliserende antistoffen aanwezig waren. Als controle diende eenzelfde test met normaal paardeserum. Bij onderzoek van dit toxine-paardeserum mengsel bleek hierin na afloop van de incubatie bij 37°C nog slechts 4 LD<sub>50</sub> aanwezig te zijn, in plaats van de te verwachten 16 LD<sub>50</sub>. Indien eenzelfde daling bij de eendesera heeft plaatsgevonden – b.v. door de incubatie bij 37°C – dan betekent dit dat het gehalte aan toxineutraliserende antilichamen per ml eendeserum eigenlijk ten opzichte van 16 LD<sub>50</sub> toxine werd bepaald.

Tabel 41

Gevoeligheid van wilde eenden voor het botulinumtoxine type C.  
Sensitivity of mallards to botulinum toxin type C.

Type C-toxine	Eend	Toxinedosis in LD <sub>50</sub>	Ziekteverloop
I. C-mink toxine	139	224.000	Na 24 uur geringe parese, na 48 uur hersteld.
C-mink toxine	137	224.000	Na 48 uur ziek, hersteld na 4 dagen.
C-mink toxine	166	384.000	Na 48 uur ziek, hersteld na 5 dagen.
C-mink toxine	129	640.000	Na 24 uur gestorven aan botulismus.
II. HV 1970-toxine	142	63.000	Gezond gebleven.
HV 1970-toxine	141	189.000	Gezond gebleven.
HV 1970-toxine	147	441.000	Na 48 uur ziek, hersteld na 5 dagen.
HV 1970-toxine	138	630.000	Na 48 uur aan botulismus gestorven.
HV 1970-toxine	136	756.000	Na 48 uur aan botulismus gestorven.
HV 1970-toxine	149	756.000	Na 24 uur ziek, na 5 dagen weer gezond.
III. 81290	1	360.000	24 uur na de derde toxine-applicatie gestorven aan botulismus.
81290	2	360.000	96 uur na de derde toxine-applicatie gestorven aan botulismus.

### 7.3. RESULTATEN

#### 7.3.1. Gevoeligheid voor het type C-toxine

De gevoeligheid voor het botulinumtoxine type C werd bepaald bij wilde eenden, Khaki Campbell eenden en Peking eenden.

##### *Wilde eenden*

De gevoeligheid van wilde eenden bij orale applicatie werd aanvankelijk voor type C-mink toxine en HV 1970-toxine bepaald. Uit tabel 41 blijkt dat de gevoeligheid voor beide typen C-toxinen gelijk was, waarbij de MLD voor wilde eenden bij orale applicatie op ongeveer 630.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht kon worden bepaald.

Later werd de gevoeligheid van wilde eenden voor het botulinumtoxine stam 81290 onderzocht, door aan 2 wilde eenden gedurende 3 opeenvolgende dagen 120.000 LD<sub>50</sub> per os toe te dienen. Op de tweede dag, na 240.000 LD<sub>50</sub>, leden beide eenden reeds in geringe mate aan botulismus en met de derde toxine-applicatie werd reeds de letale dosis bereikt (tabel 41).

Wilde eenden schijnen voor het toxine van *Cl. botulinum* type C stam 81290, welke stam uit de lever van een aan botulismus lijdende eend werd geïsoleerd, iets gevoeliger te zijn.

##### *Khaky Campbell eenden*

De gevoeligheid van Khaky Campbell eenden bij orale applicatie werd uitsluitend bepaald met het C-mink toxine. Uit tabel 42 blijkt dat deze eenden

Tabel 42

Gevoeligheid van Khaky Campbell eenden voor het botulinumtoxine type C-mink.  
Sensitivity of Khaki Campbells to botulinum toxin type C.

Eend	Toxinedosis in LD <sub>50</sub>	Ziekteverloop
96	21.500	Gezond gebleven.
89	215.000	Na 24 uur geringe parese, na 48 uur hersteld.
85	215.000	Na 48 uur gestorven aan botulismus.
87	215.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.
90	430.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.
95	430.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.
86	645.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.
91	645.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.
88	860.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.
94	860.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.
92	1.075.000	Binnen 18 uur gestorven aan botulismus.

iets gevoeliger waren voor het botulinumtoxine type C dan wilde eenden. De MLD voor Khaky Campbell eenden werd bij orale applicatie op ongeveer 130.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht bepaald.

#### *Peking eenden*

De gevoeligheid van Peking eenden werd aanvankelijk bepaald met het C-mink toxine. Het bleek dat deze eenden bij orale applicatie veel minder gevoelig waren voor het botulinumtoxine dan wilde eenden en Khaky Campbell eenden (tabel 43). De eenden wogen tijdens dit experiment 1,3 tot 1,4 kg, zodat de MLD voor het C-mink toxine op ongeveer 3.300.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht werd bepaald.

Naar aanleiding van deze resultaten werd in een volgend experiment eveneens de MLD bij intramusculaire toediening van het C-mink toxine bepaald (tabel 43). De Peking eenden wogen nu 1,8 tot 2,0 kg, zodat de MLD bij intramusculaire applicatie op ongeveer 170.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht werd bepaald; deze waarde lag zelfs nog hoger dan de orale MLD van Khaky Campbell eenden.

Na de isolatie van *Cl. botulinum* type C stam 81290 werd de orale gevoeligheid van Peking eenden voor het type C-toxine eveneens onderzocht met het toxine van deze stam. Het bleek dat Peking eenden voor dit toxine veel gevoeliger waren (tabel 43). De eenden wogen 1,9-2,0 kg, zodat de MLD voor het C-toxine van stam 81290 op ongeveer 316.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht werd bepaald. Peking eenden zijn dus voor dit toxine 10 maal zo gevoelig als voor het C-mink toxine.

#### **7.3.2. Gevoeligheid voor toxinetypen A, B en E**

Bij de bepaling van de gevoeligheid voor het botulinumtoxine type A en type B werden Peking eenden van ongeveer 2,5 kg gebruikt, waarbij de beide toxinen uitsluitend oraal werden toegediend. Uit tabel 44 blijkt dat Peking eenden per os weinig gevoelig waren voor het type B-toxine, maar dat de gevoeligheid voor het type A-toxine nog iets groter was dan voor het type C-mink toxine: de MLD van het type A-toxine bedroeg per kg lichaamsgewicht 1.280.000 LD<sub>50</sub> en was voor het type C-mink toxine bepaald op 3.300.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht.

Het ziekteverloop week vooral met het type B-toxine duidelijk af van het ziekteverloop, dat bij het type C-toxine was waargenomen. De eerste symptomen werden pas na verscheidene dagen zichtbaar en de ziekte had daarna een zeer slepend verloop, zodat eend 256 pas na 21 dagen volledig was hersteld en eend 257 na 30 dagen. Ook eend 259, die type A-toxine had gekregen, was pas na 35 dagen geheel hersteld.

De gevoeligheid voor het type E-toxine werd bepaald bij Peking eenden en wilde eenden. De toxiciteit van het E-toxine werd verhoogd door een

Tabel 43

Gevoeligheid van Peking eenden voor het botulinumtoxine type C.  
Sensitivity of Pekings to botulinum toxin type C.

Toxine type	Applicatie van het toxine	Eend	Toxinedosis in LD <sub>50</sub>	Ziekteverloop
I. C-mink	Oraal	281	1.300.000	Gezond gebleven.
C-mink	Oraal	265	2.600.000	Na 24 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 5 dagen.
C-mink	Oraal	287	2.600.000	Na 24 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 5 dagen.
C-mink	Oraal	266	3.500.000	Na 24 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 5 dagen.
C-mink	Oraal	285	3.800.000	Na 24 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 5 dagen.
C-mink	Oraal	267	4.500.000	Na 24 uur gestorven aan botulismus.
C-mink	Oraal	280	5.100.000	Na 24 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 5 dagen.
C-mink	Oraal	268	5.500.000	Na 24 uur gestorven aan botulismus.
C-mink	Oraal	269	5.800.000	Gezond gebleven.
C-mink	Intramusculair	291	10.000	Gezond gebleven.
C-mink	Intramusculair	297	40.000	Na 72 uur geringe parese, hersteld na 6 dagen.
C-mink	Intramusculair	290	160.000	Na 72 uur ernstig ziek, hersteld na 9 dagen.
C-mink	Intramusculair	270	320.000	Na 27 uur gestorven aan botulismus.
C-mink	Intramusculair	286	1.280.000	Na 24 uur gestorven aan botulismus.
C-mink	Intramusculair	282	3.520.000	Na 21 uur gestorven aan botulismus.
II. 81290	Oraal	174	150.000	Na 24 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 5 dagen.
81290	Oraal	172	180.000	Gezond gebleven.
81290	Oraal	171	240.000	Na 48 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 6 dagen.
81290	Oraal	177	300.000	Na 48 uur verlamingsverschijnselen, hersteld na 6 dagen.
81290	Oraal	178	450.000	Gezond gebleven.
81290	Oraal	173	600.000	Na 72 uur gestorven aan botulismus.
81290	Oraal	175	750.000	Na 72 uur gestorven aan botulismus.
81290	Oraal	170	1.800.000	Na 24 uur gestorven aan botulismus.

Tabel 44

Gevoeligheid van Peking eenden voor het botulinumtoxine type A en type B bij orale applicatie.  
Sensitivity of Pekins to botulinum toxin type A and type B after oral application.

Toxinetype	Eend	Toxinedosis in LD <sub>50</sub>	Ziekteverloop
Type A-toxine	259	640.000	Na 24 uur geringe paralyse, zeer traag hersteld.
Type A-toxine	243	1.600.000	Gezond gebleven.
Type A-toxine	241	3.200.000	Na 24 uur gestorven aan botulismus.
Type A-toxine	249	6.400.000	Na 30 uur gestorven aan botulismus.
Type B-toxine	255	640.000	Gezond gebleven.
Type B-toxine	256	6.400.000	Na 11 dagen paralyse, zeer traag hersteld.
Type B-toxine	257	10.560.000	Na 6 dagen paralyse, zeer traag hersteld.

behandeling met trypsine (zie 3.2.1.). Dat het aantal LD<sub>50</sub> van de toxinedosis desondanks laag bleef, wordt veroorzaakt door de omstandigheid dat muizen, in vergelijking met het type A-, B- en C-toxine, relatief minder gevoelig zijn voor het E-toxine (Dolman en Murakami, 1961).

Omdat bij eenden per os met het E-toxine geen ziekteverschijnselen konden worden opgewekt, werd het onderzoek aangevuld met een parenterale applicatie van het toxine, ten einde de mogelijke invloed van een slechte resorptie uit het maagdarmlkanaal uit te sluiten. Uit tabel 45 blijkt dat desondanks met het E-toxine bij deze eenden geen ziekteverschijnselen konden worden opgewekt.

Tabel 45

Gevoeligheid van eenden voor het botulinumtoxine type E.  
Sensitivity of ducks to botulinum toxin type E.

Type eend	Toxinedosis in LD <sub>50</sub>	Applicatie	Ziekteverloop
Peking eend	13.200	Per os	Gezond gebleven.
Peking eend	192.000	Per os	Gezond gebleven.
Peking eend	32.000	Intramusculair	Gezond gebleven.
Peking eend	192.000	Intramusculair	Gezond gebleven.
Wilde eend	192.000	Per os	Gezond gebleven.
Wilde eend	32.000	Intramusculair	Gezond gebleven.
Wilde eend	192.000	Intramusculair	Gezond gebleven.

### 7.3.3. Optreden van het "Behring phenomeen"

Het effect van de toediening van multipele, subletale doses toxine werd onderzocht bij muizen, caviae en Peking eenden. Het botulinumtoxine, dat afkomstig was van stam C-mink, werd bij muizen en caviae subcutaan toegediend, bij Peking eenden oraal. De MLD bij subcutane applicatie werd bij muizen op 3,2 LD<sub>50</sub> bepaald, bij caviae op 32 LD<sub>50</sub>.

#### *Muizen en caviae*

10 muizen en 10 caviae ontvingen multipele doses van 1/10 MLD toxine, zoals is aangegeven in tabel 46. Bij deze dieren ontwikkelden zich reeds na enkele toxine-injecties lichte verlamingsverschijnselen van het locomotie-apparaat, die geleidelijk duidelijker werden. De muizen en caviae stierven uiteindelijk na een ziektebeeld dat gekenmerkt was door een algemene paralyse, zonder dat de respiratoire moeilijkheden opvallend waren geweest. De voedsel- en wateropname was enkele dagen voor de dood bijna geheel verdwenen. Er trad pas sterfte op als de som van de multipele subletale doses ongeveer 1 MLD bedroeg, wat er op duidt dat de sterfte werd veroorzaakt door een accumulatie van het botulinumtoxine. Er werden geen verschijnselen van sensibilisatie, die bij het "Behring phenomeen" optreden, waargenomen.

#### *Peking eenden*

Voor dit onderzoek werden 2 groepen van 5 Peking eenden gebruikt, die, verdeeld over een periode van 3 weken, 15 doses C-mink toxine per os ontvingen. Aan groep A werd steeds 1/10 MLD toegediend – nl. 320.000 LD<sub>50</sub> – aan groep B 1/100 MLD.

In groep B zijn geen ziekteverschijnselen waargenomen. In groep A traden in de derde week bij 3 eenden lichte verlamingsverschijnselen op: bij één eend op de 16e dag, nadat het dier 11/10 MLD had ontvangen en bij 2 eenden op de 19e dag nadat zij 14/10 MLD hadden ontvangen. De symptomen waren niet progressief en verdwenen nadat de eenden vanaf de 21e dag geen botulinumtoxine meer kregen toegediend. De andere 2 eenden van groep A bleven gezond, ondanks het feit dat zij 15/10 MLD toxine hadden ontvangen.

De conclusie kan zijn dat er bij dit onderzoek geen aanwijzingen werden gevonden die het bestaan van het "Behring phenomeen", zoals dat door Matveev in 1959 bij muizen en caviae werd beschreven, bij eenden bevestigen.

### 7.3.4. Immunologische aspecten

Het ontstaan van een effectieve immuniteit na het herstel van botulismus werd bij 2 wilde eenden onderzocht. Deze 2 eenden, die in een experiment 224.000 LD<sub>50</sub> botulinumtoxine type C-mink per os hadden gekregen waarvan

Tabel 46

Subcutane applicatie van multiple subletale doses botulinumtoxine type C bij muizen en caviae.  
Subcutaneous application of repeated sublethal doses of botulinum toxin type C in mice and guinea pigs.

Proefdier	Dagen waarop botulinumtoxine werd toegediend																								Som van de subletale doses	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Muis 1	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	d	-	-	-	11/10 MLD	
Muis 2	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	d	-	-	-	11/10 MLD	
Muis 3	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	d	-	-	-	11/10 MLD	
Muis 4	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	t	d	-	-	12/10 MLD	
Muis 5	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	t	d	-	-	12/10 MLD	
Muis 6	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	t	d	-	-	13/10 MLD	
Muis 7	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	t	d	-	-	13/10 MLD	
Muis 8	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	t	d	-	-	13/10 MLD	
Muis 9	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	t	d	-	-	14/10 MLD	
Muis 10	t	t	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	t	t	-	-	t	d	-	-	14/10 MLD	
Cavia 1	t	t	-	-	-	-	t	t	t	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7/10 MLD	
Cavia 2	t	t	-	-	-	-	t	t	t	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7/10 MLD	
Cavia 3	t	t	-	-	-	-	t	t	t	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7/10 MLD	
Cavia 4	t	t	-	t	t	-	-	-	-	t	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7/10 MLD	
Cavia 5	t	t	-	-	-	-	-	-	t	t	t	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8/10 MLD	
Cavia 6	t	t	-	-	-	-	-	-	t	t	t	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8/10 MLD	
Cavia 7	t	t	-	-	-	-	-	-	t	t	t	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8/10 MLD	
Cavia 8	t	t	-	-	-	-	-	-	t	t	t	-	-	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8/10 MLD	
Cavia 9	t	t	-	-	-	-	-	-	t	t	t	-	-	t	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8/10 MLD	
Cavia 10	t	t	-	t	t	-	-	-	-	t	t	-	-	-	t	t	t	d	-	-	-	-	-	-	10/10 MLD	

t = 1/10 MLD botulinumtoxine subcutaan toegediend.

- = geen toxine toegediend.

d = aan botulismus gestorven.



zij na 2 tot 4 dagen spontaan waren hersteld, werden 12 dagen later onderzocht op toxineutraliserende antistoffen. Toen het onderzoek van het bloedserum negatief verliep, kregen de 2 eenden de volgende dag weer een subletale dosis botulinumtoxine per os (320.000 LD<sub>50</sub>) met als gevolg dat zij opnieuw aan botulismus gingen lijden. De dieren herstelden na 1 tot 3 dagen, waarna 9 dagen later 1 en 2 MLD resp. (645.000 en 1.128.000 LD<sub>50</sub> resp.) per os werd toegediend. Beide eenden succombeerden thans binnen 48 uur en bleken dus nog volledig gevoelig te zijn voor botulismus.

Het ontstaan van toxineutraliserende antistoffen werd tevens onderzocht bij de 10 Peking eenden, die gebruikt waren bij het onderzoek betreffende het optreden van het "Behring phenomeen". Aan deze eenden was in 3 weken per os 15 x 1/10 resp. 1/100 MLD botulinumtoxine type C-mink toegediend. Het bloedserum werd 3 en 31 dagen na de laatste applicatie van het toxine onderzocht op toxineutraliserende antistoffen. Dit onderzoek verliep geheel negatief, ook bij de 3 eenden die in de 3e week geringe verschijnselen van botulismus hadden vertoond.

Beide onderzoeken wijzen er op dat het botulinumtoxine type C bij eenden geen aantoonbare immuniteit opwekt, zodat eenden, die in een met toxine besmet gebied subletale doses van het toxine opnemen, nog gevoelig blijven voor een minimum letale dosis.

#### 7.4. SAMENVATTING

In de onderzoeken van dit hoofdstuk werd eerst de gevoeligheid van eenden voor verschillende botulinumtoxinen bepaald, terwijl verder enkele immunologische aspecten werden onderzocht, die kunnen optreden nadat eenden het botulinumtoxine type C hebben opgenomen.

Zowel wilde eenden, Khaky Campbell eenden als Peking eenden bleken per os gevoelig te zijn voor het botulinumtoxine type C; de gevoeligheid varieerde per species vrij sterk, waarbij vooral de grotere ongevoeligheid van Peking eenden voor het type C-mink toxine opvallend was. Er bleek echter een duidelijk verschil in gevoeligheid voor de botulinumtoxinen van de verschillende type C-stammen aanwezig te zijn, waarbij wilde eenden, maar vooral Peking eenden, gevoeliger waren voor het type C-toxine van stam 81290. Voor het meest virulente type C-toxine bedroeg de orale MLD per kg lichaamsgewicht voor Khaky Campbell eenden 130.000 LD<sub>50</sub>, voor Peking eenden 316.000 LD<sub>50</sub> en voor wilde eenden 360.000 LD<sub>50</sub>.

Het onderzoek naar de gevoeligheid voor het botulinumtoxine type A en B, dat bij Peking eenden werd uitgevoerd, wees uit dat deze eenden weinig gevoelig zijn voor het type B-toxine; voor het type A-toxine bedroeg de MLD per os 1.280.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht. Het klinische herstel van botulismus,

veroorzaakt door de toxinetypen A en B, bleek opvallend trager te verlopen dan bij type C.

Met het type E-toxine werden bij wilde eenden en bij Peking eenden geen ziekteverschijnselen opgewekt, noch na orale noch na intramusculaire applicatie.

Het bleek dat er geen effectieve immuniteit was ontstaan bij wilde eenden na het herstel van botulismus, terwijl na de orale toediening van multipale subletale doses van het botulinumtoxine type C evenmin toxineutraliserende antistoffen konden worden aangetoond bij Peking eenden.

Bij muizen, caviae en Peking eenden werd tenslotte een onderzoek ingesteld naar het voorkomen van het "Behring phenomeen", dat zou optreden na de applicatie van multipale subletale doses van het botulinumtoxine. Bij het type C-toxine werd dit phenomeen van sterk verhoogde gevoeligheid voor het toxine, die zou worden veroorzaakt door sensibilisatie, niet waargenomen. De proefdieren succombeerden pas nadat ongeveer 1 MLD van het type C-toxine was toegediend, wat er op wijst dat hier sprake is van een accumulatie van het toxine.

## H O O F D S T U K VIII

### MORFOLOGISCHE, CULTURELE, BIOCHEMISCHE EN SEROLOGISCHE ONDERZOEKINGEN VAN DE GEISOLEERDE CL. BOTULINUM STAMMEN

#### 8.1 INLEIDING

Bij de identificatie van *Cl. botulinum* speelt het geproduceerde toxine de belangrijkste rol. De onderverdeling van *Cl. botulinum* berust op serologische verschillen tussen de botulinumtoxinen, zodat men thans 6 typen onderscheidt. Tussen deze 6 typen blijken bij verder bacteriologisch onderzoek eveneens morfologische, culturele en biochemische verschillen te bestaan, hoewel er ook eigenschappen zijn die de diverse toxinetypen gemeen hebben. Ook bij één toxinetype kunnen nog opvallende verschillen bestaan. Zo zijn bij type B en type F proteolytische en nonproteolytische stammen beschreven; de Europese B-stammen zouden overwegend nonproteolytisch zijn en de in Amerika geïsoleerde B-stammen steeds proteolytisch. De Europese B-stammen vertoonden daarentegen een grotere saccharolytische activiteit.

Bij *Cl. botulinum* type C bestaat omtrent de verschillende eigenschappen veel onduidelijkheid, hetgeen vooral samenhangt met de verwarring die er heerst bij de onderverdeling van type C in de subtypen C $\alpha$  en C $\beta$ . De C $\beta$ -stam van Seddon bleek geen saccharolytische activiteit te bezitten, terwijl de in Amerika geïsoleerde C $\alpha$ -stammen wel enkele koolhydraten omzetten (Gunnison en Meyer, 1929<sup>b</sup>). De positie die de in Europa geïsoleerde C-stammen innemen, is tamelijk onduidelijk. De in Frankrijk geïsoleerde en bij het "Instituut Pasteur" te Parijs getypeerde stammen bleken steeds van het type C $\beta$  te zijn (Prévot en Brygoo, 1953), waarbij de typering plaats vond met het antitoxine C-Pasteur. Bulatova *et al* (1967) vermelden dat enkele in de USSR bij nertsen geïsoleerde stammen ook van het type C $\beta$  zouden zijn. Deze auteurs beschrijven bovendien dat zij geen toxogene reïnculturen van type C konden verkrijgen en menen dat de verontreiniging met bepaalde symbionten noodzakelijk is voor de productie van het botulinumtoxine. Segner *et al* (1971) zagen enkele verschillen in de saccharoly-

tische activiteit tussen C-stammen die in Amerika uit maritieme sedimenten waren geïsoleerd en Europese C-stammen die van het vasteland afkomstig waren.

Geheel nieuwe inzichten zijn naar voren gebracht door onderzoeken waarbij de rol werd onderzocht, die bacteriophagen bij de toxiciteit van type C- en type D-stammen spelen (Eklund *et al*, 1971; Eklund en Poysky, 1972). Het verschil tussen C $\alpha$  en C $\beta$  zou samenhangen met de aanwezigheid van een bacteriophage CE $\beta$ . Een toxische *Cl. botulinum* type C cultuur, waarin deze phaag als een prophaag voorkomt, zou als C $\alpha$  worden getypeerd omdat de toxinefactor C<sub>1</sub> sterk domineert. Bij verlies van de CE $\beta$ -bacteriophage wordt de stam nontoxisch of er resteert nog iets C<sub>2</sub>-toxine dat vooral na trypsinisatie is aan te tonen. Een dergelijke cultuur zou dan als C $\beta$  worden getypeerd. De auteurs onderzochten niet de culturele en biochemische eigenschappen van de verschillende *Cl. botulinum*-stammen, die bij deze experimenten ontstonden.

Het onderscheid tussen C $\alpha$  en C $\beta$  wordt nog extra bemoeilijkt omdat van de in het buitenland verkrijgbare type C antisera niet wordt opgegeven, welke antitoxinen aanwezig zijn. Het onderzoek van Jansen (1971) heeft aangetoond, dat het Internationale Standaard type C antitoxine uit Kopenhagen zowel toxinefactor C<sub>1</sub> als C<sub>2</sub> bevat en bovendien nog in geringe mate factor D. Jansen (1971) en Eklund en Poysky (1972) vermelden bovendien dat de samenstelling van de cultuurmedia invloed heeft op de verhouding waarin de toxinefactoren gevormd worden.

Uitgaande van deze gegevens werden een aantal onderzoeken uitgevoerd naar de eigenschappen van de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum*-stammen.

## 8.2 MATERIALEN EN METHODIEKEN

De herkomst van de meeste *Cl. botulinum*-stammen is reeds vermeld in tabel 33. Type C-stammen, die kort voor en tijdens dit onderzoek in gevallen van botulismus bij andere dieren werden geïsoleerd, werden ter vergelijking eveneens in onderzoek genomen. De herkomst van deze C-stammen was als volgt:

Stam 26656 werd in 1968 geïsoleerd bij een geval van botulismus bij paarden in Zeeland; zowel uit het kadaver van de kat als uit de lever van een der gestorven paarden werd een reïncultuur verkregen.

Stam 43065 werd in 1969 geïsoleerd uit de lever van een rund uit de omgeving van Bergen op Zoom; vermoedelijk was hier sprake van botulismus, doch het botulinumtoxine kon niet worden aangetoond.

Stam 61884 werd in 1971 geïsoleerd uit spierweefsel van een rund, dat gestorven was aan botulismus in de omgeving van Alkmaar.

Stam 74902 werd in 1972 geïsoleerd bij een geval van botulismus op een groot pluimveebedrijf in Ulvenhout uit de lever van een kip.

Stam 84124 werd in 1972 geïsoleerd bij een geval van botulismus bij runderen in Drente; uit de lever van een der runderen werd een reïncultuur ver-

kregen.

Behalve deze in Nederland geïsoleerde C-stammen werden ook nog in onderzoek genomen de *Cl. botulinum* type C-mink cultuur, die van Dinter en Kull uit Zweden werd ontvangen en 2 culturen die uit Londen uit de "National collection of type cultures" afkomstig waren, nl stam NCTC 8548, die type C $\beta$  en stam NCTC 8264, die type C $\alpha$  werd genoemd.

De eigenschappen van de in Nederland geïsoleerde type A-, type B- en type E-stammen (tabel 33), werden vergeleken met een type A-, type B- en type E-stam die uit dezelfde collectie afkomstig waren, nl NCTC 7272 (type A), NCTC 7273 (type B) en NCTC 8266 (type E).

Alle culturen werden nauwkeurig op reinheid onderzocht door met elke stam minstens 3 passages op HIS (sporadisch op BHR) en in leverbouillon te maken, waarbij van de vaste voedingsmedia steeds 5 kolonies werden geënt in leverbouillon en de volgende HIS geënt werd uit de meest toxogene van de 5 leverbouillonculturen. Van alle type C-stammen werden zo sterk toxogene culturen verkregen met een toxineconcentratie van minstens  $10^4$  en meestal van  $2 \times 10^5$  MLD per ml.

Voor de samenstelling van de voedingsmedia, die bij het onderzoek van de morfologische, culturele en biochemische eigenschappen werden gebruikt, kan worden verwezen naar hoofdstuk 3.

Na hittefixatie van de aan de lucht gedroogde bacteriepreparaten werd de kleuring volgens Gram uitgevoerd volgens richtlijnen van het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid:

1 minuut kleuren met een gefiltreerde kristalvioletaniline-oplossing; afspoelen met water;

1 minuut behandelen met de lugoloplossing; afspoelen met ethanol (gehalte tenminste 95%); gedurende 1 minuut ontkleuren met ethanol (gehalte tenminste 95%); afspoelen met water;

1 minuut kleuren met een 0,2% waterige fuchsine-oplossing. De kristalviolet-oplossing met pH 8 werd als volgt bereid: 0,2 g kristalviolet (Merck) oplossen in 10 ml ethanol 96%; 3,2 g aniline p.a. mengen met 90 ml gedestilleerd water, krachtig schudden gedurende 15 minuten en door een nat filter filteren; daarna het aniliewater mengen met de kristalvioletoplossing.

De samenstelling van de lugoloplossing luidde: 1 g jodium, 2 g kaliumjodide en 300 ml gedestilleerd water.

Bij het serologisch onderzoek werd gebruik gemaakt van botulinumtoxine type F van de originele Langeland-stam (Møller en Scheibel, 1960). Deze stam werd ontvangen van M.W. Eklund, Pacific Fishery Products Technology Center, te Seattle. Met type D-toxine kon geen onderzoek worden verricht aangezien van dit type niet de beschikking kon worden verkregen over een toxogene stam. Verder was het botulinumtoxine type A afkomstig van stam NCTC 7272, het B-toxine

van stam NCTC 7273 en het E-toxine van stam E-8266.

De botulinumtoxinen werden verkregen door groei van *Cl. botulinum*-culturen in het medium volgens Cardella gedurende 5 dagen bij 30°C, waarna de cultuur 15 minuten bij 3.000 rpm werd gecentrifugeerd. De toxinen werden, afgedekt door paraffine-olie, bij 4°C bewaard in kolfjes van 100 ml. De concentratie van het botulinumtoxine werd in elk kolfje nauwkeurig bepaald in LD<sub>50</sub> per ml, zoals reeds in 3.2.3 werd beschreven.

Het Internationale Standaard type C antitoxine werd uit Kopenhagen ontvangen. Dit gevriesdroogde antiserum werd opgelost in 5 ml aqua destillata, zodat het toxine-neutraliserend vermogen 20.000 MLD per ml zou bedragen. Dit antitoxine werd met de reeds vermelde antitoxinen C-mink en C-Pasteur in het serologisch onderzoek betrokken.

Het C $\alpha$ -stam NCTC 8264 antitoxine werd verkregen door immunisatie van 2 konijnen. Het toxoid werd op dezelfde wijze bereid als het C-mink toxoid (zie 3.1.2.1.), waarna de konijnen met stijgende hoeveelheden toxoid werden ingespoten. Het antiserum werd verzameld nadat vastgesteld was dat de antitoxische werkzaamheid van de beide sera voldoende hoog was.

De specificiteit van het C-mink antitoxine werd als volgt onderzocht: 0,25 ml onverdund C-mink antitoxine werd in puntvormige buisjes samengebracht met 0,25 ml van een toxineverdunding, die slechts 4 tot 16 LD<sub>50</sub> van de te onderzoeken toxinen type A, B, E of F bevatte. Het mengsel werd na even schudden gedurende 60 minuten bij 37°C gezet, waarna het toxine-neutraliserend vermogen werd bepaald door per muis 0,5 ml van het mengsel intraperitoneaal in te spuiten. Er werden per toxineverdunding 4 Swiss Random muizen van 18 tot 20 g gebruikt. Indien neutralisatie van het botulinumtoxine plaatsvond, werd dit toxine-neutraliserend vermogen (TNV) uitgedrukt in anti-LD<sub>50</sub> per ml door toepassing van de berekening volgens Reed en Muench (1938). Als controle diende eenzelfde test met normaal paardeserum.

Op soortgelijke wijze werd het TNV van het C-mink antitoxine vergeleken met het C-Pasteur antitoxine en met het Internationale Standaard type C antitoxine. Van deze antitoxische sera werden nu tienvoudige serumverdundingen in aqua destillata gemaakt, waarna 0,25 ml serumverdunding werd samengebracht met 0,25 ml van een type C-toxineverdunding die van 16 tot 54 LD<sub>50</sub> toxine per 0,25 ml bevatte. De incubatie geschiedde eveneens gedurende 60 minuten bij 37°C en er werden per serumverdunding 4 muizen gebruikt. De TNV werd weer in anti-LD<sub>50</sub> per ml uitgedrukt.

Op dezelfde wijze werd het TNV van het C-mink antitoxine onderzocht ten opzichte van de C-toxinen van de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type C culturen en van de toxinen van C $\beta$ -stam NCTC 8548 en C $\alpha$ -stam NCTC 8264. Ook nu werd de TNV uitgedrukt in anti-LD<sub>50</sub> per ml.

### 8.3. RESULTATEN

#### 8.3.1. Morfologische, culturele en biochemische eigenschappen

##### 8.3.1.1. *Cl. botulinum* type C

Bij de beoordeling van de morfologische en culturele eigenschappen dient steeds rekening te worden gehouden met de omstandigheden waaronder de groei heeft plaatsgevonden. Als belangrijkste kunnen worden genoemd de incubatietijd, de incubatietemperatuur, de samenstelling van het voedingsmedium en de kwaliteit van de anaërobe omstandigheden. Voor dit onderzoek werd *Cl. botulinum* type C op HIS en BHR gedurende 48 uur bij 37°C in een anaëroben-vat geïncubeerd.

Op HIS bleek het kolonie-aspect nogaf te variëren, waarbij als uitersten de volgende kolonietypen waren te onderscheiden:

- 1) Een deel van de C-stammen groeide hierop met tamelijk platte, vrijwel kleurloze kolonies zonder een verheven centrum, een fijn gegranuleerd kolonieoppervlak en met slechts kleine uitlopertjes langs de rand van de kolonie. Ruim losliggende kolonies hadden meestal een doorsnede van 4 tot 5 mm (Foto 5).\*

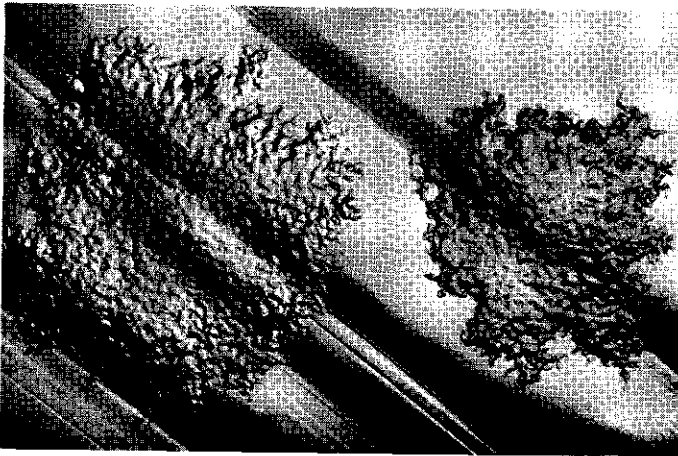


Foto 5

*Cl. botulinum* type C stam HV 1970. Kolonietype 1, groei op HIS na een incubatieperiode van 48 uur bij 37°C. Vergroting 10 x.

*Cl. botulinum* type C strain HV 1970. Colony type 1, grown on HIS for 48 hours at 37°C. Magnification 10 x.

\* De foto's van kolonies van *Cl. botulinum*-culturen werden genomen met een techniek die beschreven is door Johannsen (1964).

- 2) Een ander deel van de C-stammen groeide op HIS met zeer ongelijke kolonies, doordat deze stammen neiging tot zwermen vertoonden; de kolonieranden waren zeer onregelmatig met talloze zeer fijne, gekrulde uitlopers, waardoor de grootte en de vorm van de kolonies sterk varieerde; er werden vaak microkolonies waargenomen; het kolonie-oppervlak was tamelijk oneffen zonder dat een verheven centrum was te bemerken; de kolonies waren eveneens vrijwel kleurloos (Foto 6).

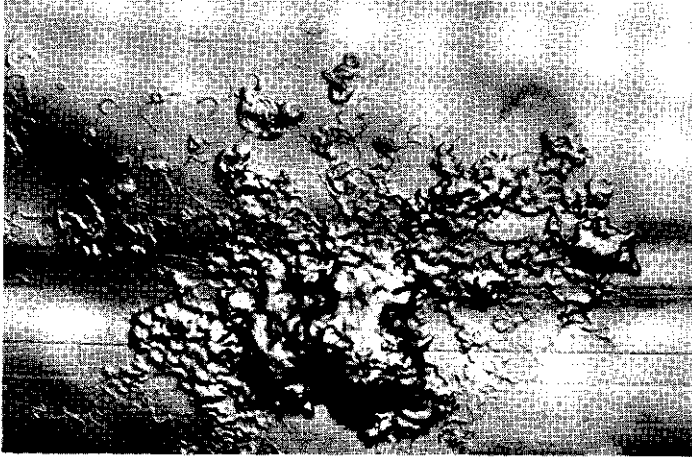


Foto 6

*Cl. botulinum* type C stam 61884. Kolonietype 2, groei op HIS na een incubatieperiode van 48 uur bij 37°C. Vergroting 10 x.

*Cl. botulinum* type C strain 61884. Colony type 2, grown on HIS for 48 hours at 37°C. Magnification 10 x.

Veel C-stammen vertoonden een kolonie-aspect dat tussen deze uitersten in lag; de verschillen tussen kolonietype 1 en 2 werden bovendien enigszins beïnvloed door de vochtigheidsgraad van de voedingsbodem.

Dit verschil in kolonietype was bij groei op BHR gedeeltelijk verdwenen. De groei van de C-stammen was hierop iets weelderiger, de kolonies waren meer verheven en hadden meestal een doorsnede van 4 tot 6 mm; de kolonieranden vertoonden kleine uitloperijtjes, waarbij soms weer de neiging tot zwermen was te bespeuren; het kolonie-oppervlak was zeer fijn gegranuleerd en de kolonies waren iets meer glimmend (Foto 7).

Zowel op HIS als op BHR werd hemolyse waargenomen. Bij sommige C-stammen was na 48 uur nog geen volledige opheldering aanwezig, bij andere stammen was dit wel het geval. Na langer bebroeden was bij alle C-stammen  $\beta$ -hemolyse waar



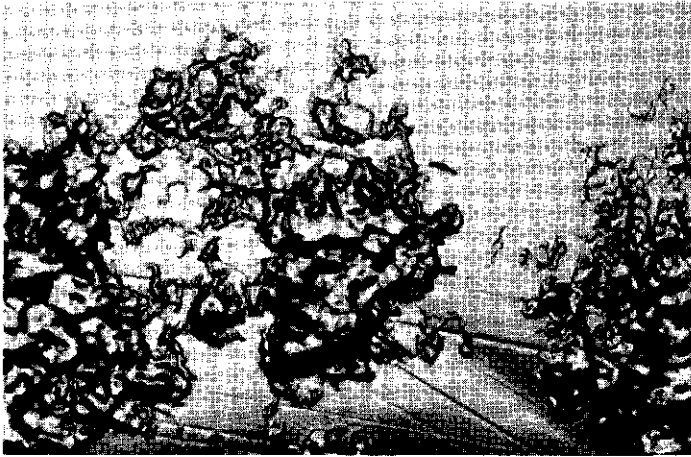


Foto 7

*Cl. botulinum* type C stam 61884. Groei op BHR na een incubatieperiode van 48 uur bij 37°C. Vergroting 10 x.

*Cl. botulinum* type C strain 61884. Grown on BHR for 48 hours at 37°C. Magnification 10 x.

te nemen, die zich tot even buiten de kolonies uitbreidde.

In leverbouillon, CMM en FEM groeiden de C-stammen allen op dezelfde wijze, zowel bij 30° als 37°C. Gedurende de eerste dagen trad sterke groei op met veel gasvorming. Na enkele dagen nam deze gasvorming duidelijk af en na 5 tot 7 dagen was de bovenstaande vloeistof vrijwel helder geworden. In deze periode werden ook reeds de hoogste toxineconcentraties vastgesteld. De stukjes lever, vleespartikels en "egg meat"-partikels vertoonden ook na langer incuberen geen verschijnselen die op proteolyse wezen.

De morfologie van type C werd onderzocht na groei gedurende 2 dagen bij 37°C op HIS. In preparaten die volgens Gram zijn gekleurd, werden tussen de diverse C-stammen geen wezenlijke verschillen waargenomen. *Cl. botulinum* type C was een vrij groot Gram-positief staafje met afgeronde uiteinden, waarbij veel metachromasie was waar te nemen; er zijn na 48 uur vaak reeds veel Gram-negatieve staafjes en schimmen van bacteriën aanwezig. De staafjes lagen meest apart, maar er werden ook korte ketens waargenomen. Er werden slechts weinig bacteriesporen gezien; deze lagen subterminaal of terminaal (Foto 8). Een toename van het aantal sporen bleek meestal samen te hangen met een afname van de toxiciteit van de cultuur.

De resultaten van het onderzoek naar de biochemische eigenschappen zijn weergegeven in tabel 47. Type C bleek ook in het medium volgens Löffler geen proteolytische activiteit te bezitten. Gelatine werd meestal wel vervloeid, al-

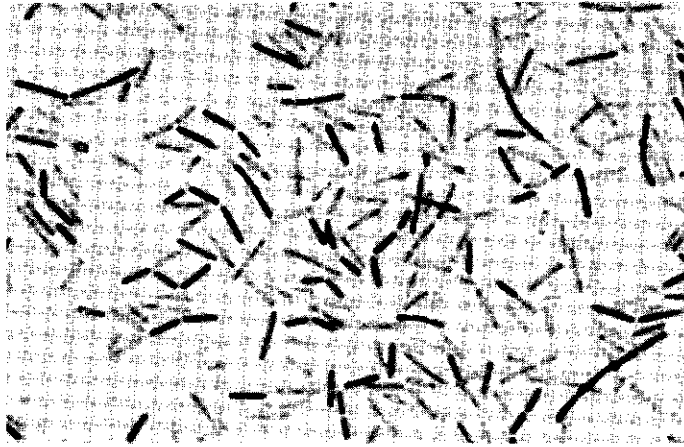


Foto 8

*Cl. botulinum* type C stam 80671. Kleuring volgens Gram. Vergroting 1200 x.  
*Cl. botulinum* type C strain 80671. Gram's strain. Magnification 1200 x.

hoewel de incubatieperiode soms tot 18 dagen moest worden verlengd. De reacties van de lakmoesmelk vertoonden verschillen; bij de meeste C-stammen werden geen veranderingen gezien, maar enkele stammen vertoonden zuurvorming met coagulatie van de caseïne.

In het medium volgens Kligler kon geen vorming van  $H_2S$  worden aangetoond, maar met behulp van een papiertje gedrenkt in loodacetaat was bij een aantal stammen in CMM wel een geringe vorming van  $H_2S$  vast te stellen.

De saccharolytische activiteit bleek zich tot enkele koolhydraten te beperken. De groei van de C-stammen in de koolhydraatmedia verliep trager dan bij de B- en E-stammen. De incubatieperiode werd daarom bij de C-stammen verlengd tot 15 dagen, waarbij een eerste onderzoek na 6 dagen plaatsvond. Uit tabel 47 blijkt dat alleen glucose en ribose door alle C-stammen werden omgezet. Een minimale pH van 4,70 werd gemeten in de glucose bij stam HV 1970. Bij inositol verliep de fermentatie vaak langzamer en bij 2 C-stammen was de omzetting onvolledig (pH tussen 6,0 en 6,2). Maltose, fructose en mannose werden door de meeste C-stammen eveneens omgezet, maar er waren ook stammen waarbij dit onvolledig (pH tussen 6,0 en 6,2) of zelfs geheel negatief verliep. Fermentatie van glycerine, melibiose en galactose kon bij de meeste C-stammen niet worden aangetoond; bij enkele stammen werd echter wel een dubieuze of positieve reactie vastgesteld. In de andere onderzochte koolhydraten werd geen zuurvorming waargenomen.

Tabel 47

Biochemische eigenschappen van *Cl. botulinum* type C stammen; incubatie gedurende 15 dagen bij 37°C.  
 Biochemical characteristics of *Cl. botulinum* type C strains; incubation for 15 days at 37°C.

Stam	Galatine vervloeiing	Lakmoesmelk	H <sub>2</sub> S- vorming	Glucose	Maltose	Fructose	Inositol	Mannose	Glycerine	Ribose	Melbiose	Galactose
75965	+	coagulatie	+	+	+	+	+	+	-	+	±	-
80414	+	coagulatie	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
80671	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
81290	+	-	-	+	+	±	+	+	-	+	+	+
83218	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
84381	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
HV 1970	+	coagulatie	+	+	+	+	+	+	±	+	±	-
74902	-	-	+	+	+	±	+	±	+	+	-	-
26656	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
43065	+	-	+	+	-	+	±	+	-	+	-	-
61884	+	coagulatie	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
84124	+	coagulatie	+	+	+	+	+	+	-	+	±	-
75617	+	-	-	+	+	±	+	+	-	+	+	+
78158	+	coagulatie	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
78807	+	-	+	+	+	±	+	-	+	+	-	-
C - mink	+	-	-	+	+	+	±	±	±	+	±	±
NCTC 8548,Cβ	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
NCTC 8264, Cα	+	-	+	+	-	+	+	±	-	+	-	-

Bij de reacties van de koolhydraten betekent:

+ : pH lager dan 6,0; indicator werd geel;

± : pH tussen 6,0 en 6,2; indicator vertoonde mengkleuren;

- : pH boven 6,2; indicator werd blauwgroen.

De reactie verliep negatief in lactose, sucrose, mannitol, dulcitol, inuline, adonitol, arabinose, rhamnose, salicine, raffinose, sorbitol, xylose en dextrine.

### 8.3.1.2. *Cl. botulinum* type B

De morfologische en culturele eigenschappen van type B, stam WB 1971, werden minder intensief onderzocht als die van type C, omdat de belangstelling vooral uitging naar de biochemische eigenschappen.

De groei van stam WB 1971 bleek op HIS en BHR beter bij 30°C dan bij 37°C te zijn, zodat de eigenschappen van deze stam bij 30°C werden onderzocht. Stam WB 1971 vormde op deze voedingsmedia kolonies die enigszins met het 1e kolonietype van de C-stammen overeenkwam (Foto 9). De uitlopers van de kolonie waren over het algemeen meer afgerond, terwijl er ook kolonies met

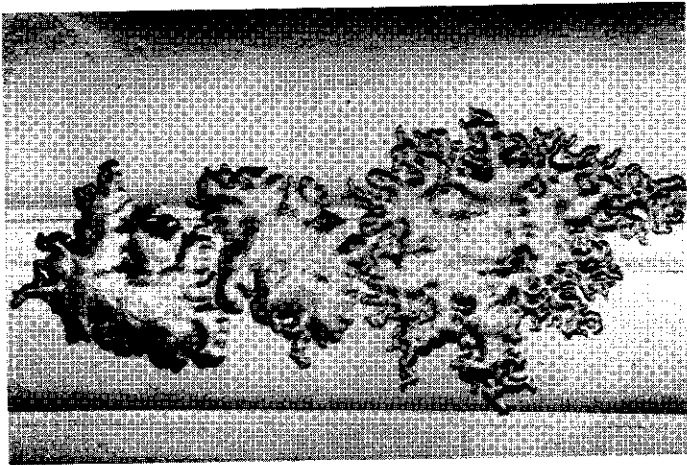


Foto 9

*Cl. botulinum* type B stam WB 1971. Groei op HIS na een incubatieperiode van 48 uur bij 30°C. Vergroting 15 x.

*Cl. botulinum* type B strain WB 1971. Grown on HIS for 48 hours at 30°C. Magnification 15 x.

geheel gladde randen voorkwamen. De stam vertoonde na 48 uur tot 72 uur  $\beta$ -hemolyse op HIS en op BHR. Het kolonietype kwam goed overeen met type B stam NCTC 7273. Bij groei in leverbouillon, CMM en FEM werden geen verschijnselen waargenomen die op proteolyse wezen. De groei was in deze media zeer goed met veel gasvorming, die na enkele dagen verminderde. Stam WB 1971 bleek bij de kleuring volgens Gram eveneens tamelijk Gram-labiel te zijn. De staafjes lagen meest apart en vertoonden veel overeenkomst met type C. Er werden weinig sporen aangetroffen.

De resultaten van het biochemische onderzoek zijn weergegeven in tabel 48 en zijn vergeleken met de eigenschappen van de B-stam NCTC 7273. Het blijkt dat er tussen beide stammen enkele duidelijke verschillen aanwezig waren. De in

Nederland geïsoleerde stam WB 1971 bleek nonproteolytisch te zijn, terwijl de saccharolytische activiteit veel groter was. De stam kan gekarakteriseerd worden als een typische Europese B-stam, die grote overeenkomst vertoonde met de oorspronkelijke stam van van Ermengem. De eigenschappen van stam NCTC 7273 kwamen overeen met die van de meeste Amerikaanse B-stammen (Gunnison en Meyer, 1929<sup>b</sup>).

Tabel 48

Biochemische eigenschappen van *Cl. botulinum* type A en B; incubatie gedurende 6 dagen bij 30°C. Vergelijking van stam 78638 en stam WB 1971 met andere type A- en B-stammen. Biochemical characteristics of *Cl. botulinum* type A and B; incubation for 6 days at 30°C. Comparison of strain 78638 and strain WB 1971 with other type A- and B-strains.

	<i>Cl. botulinum</i> type A		<i>Cl. botulinum</i> type B		
	78638	NCTC 7272	Stam WB 1971	NCTC 7273	Stam 162*
Proteolyse	+	+	-	+	-
Lakmoesmelk	coagulatie en digestie	coagulatie en digestie	-	coagulatie en digestie	n.t.
H <sub>2</sub> S-vorming	++	+	-	++	n.t.
Gelatine vervloeiing	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	+	-	+
Maltose	+	+	+	+	+
Fructose	-	+	+	+	+
Glycerine	-	-	+	±	+
Dextrine	-	-	+	-	+
Salicine	±	+	-	+	-
Inositol	-	-	+	-	-
Adonitol	-	-	+	-	+
Sorbitol	-	±	+	±	+

Bij de reacties van de koolhydraten betekent:

- + : pH lager dan 6,0; indicator werd geel;
- ± : pH tussen 6,0 en 6,2; indicator vertoonde mengkleuren;
- : pH boven 6,2; indicator werd blauwgroen.

De reactie was negatief met stam 78638, NCTC 7272, WB 1971 en NCTC 7273 in lactose, mannitol, dulcitol, galactose, inuline, arabinose, raffinose, mannose, rhamnose, xylose, ribose en melibiose.

\* Deze gegevens zijn overgenomen van Gunnison en Meyer (1929<sup>b</sup>). Stam 162 zou overeenkomen met de oorspronkelijke stam van van Ermengem.

### 8.3.1.3. *Cl. botulinum* type A

De morfologische, culturele en biochemische eigenschappen van de in Nederland geïsoleerde stam 78638 kwamen overeen met stam NCTC 7272. Bij de kleuring volgens Gram werden vrij veel terminaal en subterminaal gelegen sporen gezien.

Beide stammen groeiden goed op HIS en BHR, zowel bij 30° als bij 37°C, waarbij het kolonietype enigszins overeenkwam met type B (Foto 10). Na 48 uur vertoonden de voedingsbodems  $\beta$ -hemolyse onder en direct rondom de kolonies. In leverbouillon, CMM en FEM traden na enkele dagen verschijnselen

Tabel 49

Biochemische eigenschappen van *Cl. botulinum* type E; incubatie gedurende 7 dagen bij 30°C. Vergelijking van de stammen 69361 en 81509 met stam NCTC 8266.  
 Biochemical characteristics of *Cl. botulinum* type E; incubation for 7 days at 30°C. Comparison of the strains 69361 and 81509 with strain NCTC 8266.

	Stam 69361	Stam 81509	Stam NCTC 8266
Proteolyse	-	-	-
Lakmoesmelk	-	-	iets zuurvorming
H <sub>2</sub> S-vorming	-	-	-
Gelatine vervloeiing	x	-	x
Glucose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Mannose	+	+	+
Glycerine	+	+	+
Adonitol	+	+	+
Ribose	+	+	+
Dextrine	+	-	±
Arabinose	±	-	-

Bij de reactie van de koolhydraten betekent:

- + : pH lager dan 6,0; indicator werd geel;
- ± : pH tussen 6,0 en 6,2; indicator vertoonde mengkleuren;
- : pH boven 6,2; indicator werd blauwgroen.
- x : betekent: gelatine pas na 14 dagen vervloeid.

De reactie was negatief in lactose, mannitol, dulcitol galactose, inuline, inositol, raffinose, rhamnose, salicine, xylose en melibiose.

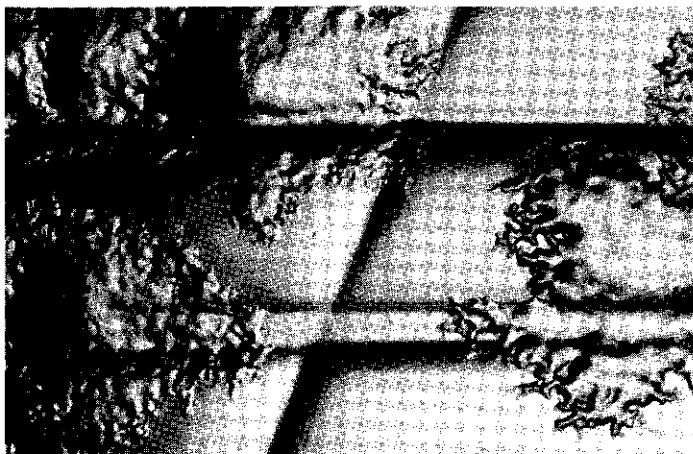


Foto 10

*Cl. botulinum* type A stam 78638. Groei op HIS na een incubatieperiode van 48 uur bij 30°C. Vergroting 12,5 x.

*Cl. botulinum* type A strain 78638. Grown on HIS for 48 hours at 30°C. Magnification 12,5 x.

van proteolyse op. De resultaten van het biochemisch onderzoek zijn weergegeven in tabel 48. De saccharolytische activiteit bij 30°C blijkt overeen te komen met een proteolytische type B cultuur (stam NCTC 7273).

#### 8.3.1.4. *Cl. botulinum* type E

De morfologische, culturele en biochemische eigenschappen van de beide in Nederland geïsoleerde E-stammen 69361 en 81509, werden vergeleken met E-stam NCTC 8266. Er werden uitsluitend toxogene culturen van de 3 E-stammen in onderzoek genomen.

De groei van de E-stammen bleek op HIS en BHR bij 30°C beter te zijn dan bij 37°C, zodat het onderzoek bij een incubatietemperatuur van 30°C plaatsvond.

De morfologische en culturele eigenschappen van de 3 type E-stammen bleken goed met elkaar overeen te komen. De kolonies op HIS en BHR waren veel kleiner dan bij type B en type C, terwijl de randen meestal glad waren of slechts enkele korte uitlopertjes bezaten (Foto 11). Na 48 tot 72 uur vertoonden deze voedingsbodems  $\beta$ -hemolyse onder en rondom de kolonies. De groei in leverbouillon, CMM en FEM verliep onder zeer veel gasvorming, veel sterker dan bij type C. Er werden geen verschijnselen van proteolyse waargenomen, ook niet na langer incuberen.

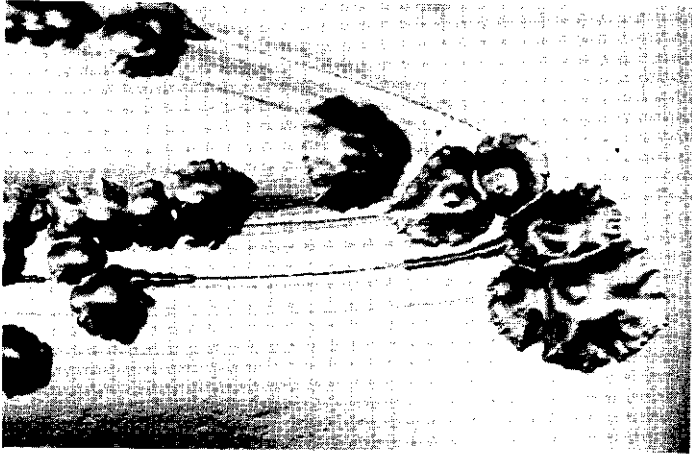


Foto 11

*Cl. botulinum* type E stam NCTC 8266. Groei op HIS na een incubatieperiode van 48 uur bij 30°C. Vergroting 15 x.

*Cl. botulinum* type E strain NCTC 8266. Grown on HIS for 48 hours at 30°C. Magnification 15 x.

Bij de kleuring volgens Gram bleken ook de type E-stammen tamelijk Gram-labiel te zijn. De staafjes waren over het algemeen kleiner dan bij type C en type B. Er werden duidelijk meer, meestal vrijliggende sporen waargenomen (Foto 12).

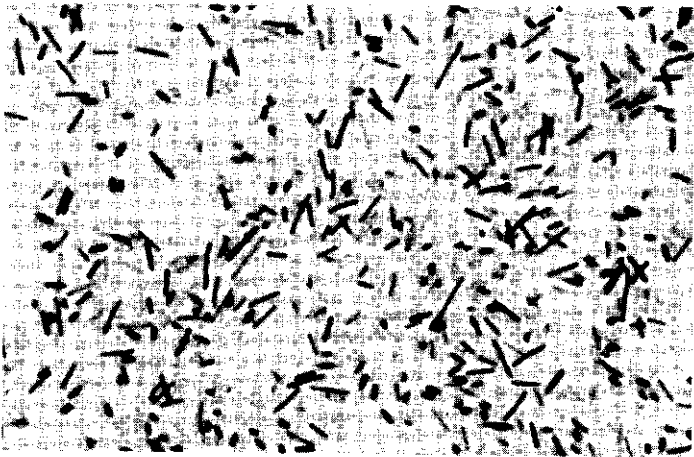


Foto 12

*Cl. botulinum* type E stam 81509. Kleuring volgens Gram. Vergroting 1200 x.

*Cl. botulinum* type E strain 81509. Gram's strain. Magnification 1200 x.



De resultaten van het biochemische onderzoek van de 3 E-stammen zijn weergegeven in tabel 49. Het blijkt dat er slechts ondergeschikte verschillen voorkwamen bij de fermentatie van enkele koolhydraten.

### 8.3.2. Serologisch onderzoek

#### 8.3.2.1. Specificiteit van het C-mink antitoxine

Het C-mink antitoxine bleek tegenover A-, B-, E- en F-toxine geen toxine-neutraliserend vermogen te bezitten, ook niet als 0,25 ml onverdund C-mink antitoxine tegenover zeer geringe concentraties van resp. 5 en 4 LD<sub>50</sub> toxine werd onderzocht (tabel 50). Dit betekent dat de specificiteit van het C-mink antitoxine zeker aan de te stellen eisen heeft voldaan: bij de typering van de botulinumtoxinen bevatte 0,5 ml van het toxine-antitoxine-mengsel immers steeds slechts 0,05 ml antitoxine (3.2.1.).

Tabel 50  
Onderzoek naar de specificiteit van het C-mink antitoxine.  
Determination of the specificity of the C-mink antitoxin.

Hoeveelheid C-mink antitoxine	Toxinetypen en concentratie	Sterftecoëfficiënt van de muizen*	TNV in anti-LD <sub>50</sub> per ml.
0,25 ml onverdund	16 LD <sub>50</sub> A-toxine	4/4	}
" "	10 " "	4/4	
" "	5 " "	4/4	
0,25 ml onverdund	16 LD <sub>50</sub> B-toxine	4/4	}
" "	4 " "	4/4	
0,25 ml onverdund	16 LD <sub>50</sub> E-toxine	4/4	}
" "	5 " "	4/4	
0,25 ml onverdund	16 LD <sub>50</sub> F-toxine	4/4	}
" "	8 " "	4/4	
" "	4 " "	4/4	

\* Teller : aantal gestorven muizen;  
Noemer: aantal ingespoten muizen.

#### 8.3.2.2. Vergelijkend onderzoek van C-mink antitoxine met enkele andere type C-antitoxinen

Het doel van dit onderzoek was meer inzicht te verkrijgen in de antigeenstruc-

tuur van het C-mink toxine en antitoxine. Daartoe werd het TNV van het C-mink antitoxine vergeleken met enkele andere type C-antitoxinen in een kruis-immuniteitstest. De resultaten zijn weergegeven in de tabellen 51 en 52.

Tabel 51

Kruisimmuniteitstest tussen type C-mink en type C-Pasteur; toxineneutraliserend vermogen in anti-LD<sub>50</sub> per ml.  
Cross-immunity test of type C-mink and type C-Pasteur; toxin neutralizing capacity in anti-LD<sub>50</sub> per ml.

Antitoxine	Toxinetype	
	C-mink	C-Pasteur
C-mink	64.000*	51.200**
C-Pasteur	640.000*	512.000**

\* : TNV bepaald met 50 LD<sub>50</sub> C-mink toxine.

\*\* : TNV bepaald met 40 LD<sub>50</sub> C-Pasteur toxine.

Tabel 52

Kruisimmuniteitstest tussen type C-mink en subtype Ca, stam NCTC 8264; toxineneutraliserend vermogen in anti-LD<sub>50</sub> per ml.  
Cross-immunity test of type C-mink and subtype Ca, strain NCTC 8264; toxin neutralizing capacity in anti-LD<sub>50</sub> per ml.

Antitoxine	Toxinetype	
	C-mink	Ca, stam NCTC 8264
C-mink	64.000 <sup>1)</sup>	30.720 <sup>3)</sup>
Ca, stam NCTC 8264, partij I	67.840 <sup>2)</sup>	20.480 <sup>4)</sup>
Ca, stam NCTC 8264, partij II	67.840 <sup>2)</sup>	20.480 <sup>4)</sup>

1) TNV bepaald met 50 LD<sub>50</sub> C-mink toxine.

2) TNV bepaald met 53 LD<sub>50</sub> C-mink toxine.

3) TNV bepaald met 24 LD<sub>50</sub> Ca, stam NCTC 8264 toxine.

4) TNV bepaald met 16 LD<sub>50</sub> Ca, stam NCTC 8264 toxine.

Het blijkt dat de antitoxische werkzaamheid van het type C-Pasteur antitoxine 10 maal zo groot was als van het C-mink antitoxine, maar dat het TNV van de 2 antitoxinen tegenover het homologe en het heterologe botulinumtoxine verder gelijk was. Dit betekent dat er geen wezenlijke verschillen zijn tussen de antigeenstructuur van het C-mink toxine en het C-Pasteur toxine; hetzelfde kan worden gesteld van de 2 antitoxinen.

Uit tabel 52 blijkt dat er evenmin wezenlijke verschillen werden gevonden tussen de toxinen en antitoxinen van type C-mink en het subtype C $\alpha$ , stam NCTC 8264. De kleine verschillen in TNV, die in de tabel 51 en 52 zijn vermeld, werden veroorzaakt door de omstandigheid dat de hoeveelheid toxine die in de neutralisatietesten werd gebruikt, niet steeds precies gelijk waren.

Bij onderzoek van het Internationale Standaard type C antitoxine bleek het TNV van dit antitoxine tegenover het C-mink toxine 466.400 anti-LD<sub>50</sub> te bedragen, een waarde die nog iets hoger was dan de door de producent aangegeven antitoxische werkzaamheid. Dit resultaat duidt er op dat er eveneens een grote mate van overeenkomst is tussen de antitoxinen type C-mink en het Internationale Standaard type C.

Het TNV van het C-mink antitoxine werd eveneens tegenover het C $\beta$ -toxine van stam NCTC 8548 bepaald; deze waarde bleek 58.880 anti-LD<sub>50</sub> te bedragen, hetgeen betekent dat het TNV van C-mink antitoxine tegenover het C $\alpha$ - en het C $\beta$ -toxine van gelijke orde is. Dit duidt er op dat er tussen de toxinen van C $\alpha$ -stam NCTC 8264 en C $\beta$ -stam 8548 geen verschillen in antigeen structuur bestaan, zodat het niet mogelijk is met behulp van deze 2 type C-stammen de stam C-mink in te delen bij subtype C $\alpha$  of subtype C $\beta$ .

### **8.3.2.3 Vergelijkend onderzoek van C-mink antitoxine met botulinumtoxine van Nederlandse type C-stammen**

Van de resultaten van dit onderzoek is in tabel 53 een overzicht gegeven. Het blijkt dat het TNV van het type C-mink antitoxine tegenover deze C-toxinen steeds van dezelfde grootte was, behalve bij stam 26656, stam 84381 en stam 78158. In tabel 53 is bij deze 3 stammen het gemiddelde van 2 of 3 toxine-neutralisatietesten aangegeven, waarbij de testdosis van het botulinumtoxine wisselde van 23 tot 107 LD<sub>50</sub>. Het TNV tegenover deze 3 botulinumtoxinen bleek zelfs hoger te zijn als voor het homologe C-mink toxine.

Het TNV van het C-Pasteur antitoxine tegenover het toxine van deze 3 stammen werd eveneens bepaald. Bij testdosis van het botulinumtoxine van 54 resp. 53 LD<sub>50</sub> bleek het TNV voor stam 26656 nu 691.200 anti-LD<sub>50</sub> per ml te bedragen, voor stam 84381 en stam 78158 was dit 678.400 anti-LD<sub>50</sub> per ml. Deze waarden waren daarmee gelijk aan die van het C-mink toxine en ook aan die van het homologe C-Pasteur toxine (tabel 51).

Tabel 53

Toxineutraliserend vermogen van het C-mink antitoxine tegenover de botulinumtoxinen van Nederlandse type C-stammen.

Toxin neutralizing capacity of the C-mink antitoxin against the botulinum toxins of Dutch type C-strains.

Cl. botulinum type C-stam	Herkomst	TNV in anti-LD <sub>50</sub> per ml.	Testdosis van het botulinumtoxine in LD <sub>50</sub> per 0,25 ml.
75965	wilde eend	67.840	53
80671	wilde eend	51.200	40
81290	wilde eend	51.200	40
84381	muskuseend	544.000*	32 en 53
80414	knobbelzwaan	67.840	53
83218	knobbelzwaan	69.120	54
HV 1970	<i>L. illustris</i>	64.000	50
74902	kip	51.200	40
26656	paard	331.520*	27, 40 en 107
43065	rund	53.760	42
61884	rund	60.160	47
84124	rund	67.840	53
75617	bruine rat	30.720	24
78158	bisamrat	204.850*	23, 53 en 59
78807	haas	51.200	40

Het TNV van het C-mink antitoxine tegenover het homologe C-mink toxine bedroeg 64.000 anti-LD<sub>50</sub> per ml.

\* De gemiddelde waarde van 2 respectievelijk 3 toxineutralisatietesten.

#### 8.4. SAMENVATTING

In dit hoofdstuk werden morfologische, culturele, biochemische en serologische onderzoeken met de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum*-stammen verricht, waarbij een vergelijking plaatsvond met enkele buitenlandse stammen.

Bij het culturele onderzoek van de type C-stammen bleek enige variatie in het kolonietype aanwezig te zijn, dat vooral was toe te schrijven aan een verschil in neiging tot zwermgroei.

De biochemische eigenschappen van de type C-stammen kwamen tamelijk goed overeen met de beschrijvingen die in de Verenigde Staten van type C $\alpha$  werden gegeven (Gunnison en Meyer, 1929b; Dolman en Murakami, 1961; Segner *et al*, 1971<sup>a</sup>). Vooral de saccharolytische activiteit doet de Nederlandse type C-stammen afwijken van het type C $\beta$  stam Seddon, die geen enkele kool-

hydraat vergistte (Gunnison en Meyer, 1929<sup>b</sup>). De Nederlandse type C-stammen vertoonden onderling vrij geringe verschillen in de biochemische eigenschappen, die niet in relatie stonden met de herkomst van de stammen. Er waren met name geen verschillen tussen stammen die uit watervogels of uit zoogdieren waren geïsoleerd en evenmin tussen stammen die uit gevallen van botulismus waren geïsoleerd of uit dieren die gezonde kiemdrager waren.

De Nederlandse type C-stammen bleken serologisch een zeer nauwe verwantschap te bezitten, omdat het TNV van het C-mink antitoxine tegenover de toxinen van deze stammen van gelijke grootte was. Slechts 3 type C-stammen, stam 26656, 84381 en 78158, weken iets af; tegenover het C-Pasteur antitoxine werd echter geen verschil in TNV gevonden.

In een kruisimmunitest bleken de antigene componenten van het C-mink antitoxine gelijk te zijn aan die van het C-Pasteur antitoxine en ook aan die van 2 bij het Instituut bereide C $\alpha$ -antitoxinen van stam NCTC 8264.

De antigene componenten van het C-mink toxine bleken ook overeen te komen met het Internationale Standaard type C antitoxine en met het toxine van C $\beta$ -stam NCTC 8548.

De eindconclusie kan zijn dat het niet mogelijk was de in Nederland geïsoleerde type C-stammen in te delen bij het subtype C $\alpha$  of C $\beta$ . De resultaten van het onderzoek wijzen er echter op dat de type C-stammen, die onderzocht werden, alle tot eenzelfde type behoren met een gemeenschappelijke dominerende toxinefactor. Publicaties van Jansen (1971) en Eklund en Poysky (1972) maken aannemelijk dat dit toxinefactor C<sub>1</sub> is, de belangrijkste toxinefactor van subtype C $\alpha$ . De biochemische eigenschappen van de geïsoleerde type C-stammen pleiten hier eveneens voor.

De biochemische eigenschappen van de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type B wezen uit dat deze stam WB 1971 een nonproteolytische, typische Europese B-stam is, die grote overeenkomst vertoont met de oorspronkelijke stam van van Ermengen.

De biochemische eigenschappen van de 2 in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type E stammen bleken slechts geringe onderlinge verschillen te vertonen. De essentiële eigenschappen kwamen overeen met type E stam NCTC 8266 en met de eigenschappen die in de literatuur worden aangegeven (Dolman en Murakami, 1961).

Evenzo kwamen de biochemische eigenschappen van de Nederlandse *Cl. botulinum* type A stam 78638 nauw overeen met type A stam NCTC 7272.

## HOOFDSTUK IX

### DE INVLOED VAN DE TEMPERATUUR BIJ HET OPTREDEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS

#### 9.1. INLEIDING

Uit de beschrijving van de gevallen van botulismus bij watervogels in het buitenland blijkt dat deze steeds voorkwamen in de warme zomermaanden. Dit is plausibel omdat de vermenigvuldiging van *Cl. botulinum* en de vorming van het botulinumtoxine gebonden is aan bepaalde temperatuurgrenzen.

In Nederland werden de eerste botulismusgevallen bij watervogels in juli en augustus 1970 waargenomen, dus eveneens in de warmste periode van het jaar. Sindsdien is echter gebleken dat botulismus bij watervogels ook voorkwam in de herfst- en wintermaanden. Deze gevallen werden met name gesignaleerd in 's-Gravenhage, Amsterdam, Groningen en Leiden/Voorschoten (hoofdstuk 4). Het onderzoek was er op gericht de etiologie van deze gevallen te verklaren. In hoofdstuk 6 werd reeds aangetoond dat de grootste concentraties van het botulinumtoxine in de kadavers van watervogels werden gevonden. Een sterke ontwikkeling van het toxine kan echter alleen bij bepaalde, vrij hoge, temperaturen plaatsvinden. Indien een kadaver in het water drijft, wordt de temperatuur er van vooral bepaald door de temperatuur van het omringende water. De temperatuur in een kadaver dat op de grond ligt, zal vooral bepaald worden door de luchttemperatuur. In verband hiermede werden gegevens verzameld over de water- en luchttemperaturen tijdens het optreden van botulismus en werd in het laboratorium de productie van het botulinumtoxine bij lagere temperaturen onderzocht.

#### 9.2. MATERIALEN EN METHODIEKEN

De productie van botulinumtoxine bij lagere temperaturen werd onderzocht met *Cl. botulinum* type C stammen die reeds in hoofdstuk 8 zijn beschreven. Deze stammen werden geïncubeerd in een broedstoof waarvan de temperatuur nauw-

keurig kon worden gehandhaafd met behulp van een contactthermometer. Het was in sommige gevallen nodig de broedstoof in een gekoelde ruimte te plaatsen. Als cultuurmedia werden leverbouillon en gemodificeerde FEM\* gebruikt, waarbij van elke type C-stam per medium 1 cultuurbuis met 0,2 ml van een toxinevrije sporesuspensie werden geënt. Deze nontoxische sporesuspensies werden als volgt verkregen: de type C-stammen werden in leverbouillon geënt en gedurende 5 dagen bij 30°C geïncubeerd, waarna de culturen werden gecentrifugeerd nadat de blokjes lever waren verwijderd; het sediment werd verzameld en het botulinumtoxine werd vervolgens hierin geïnactiveerd door dit materiaal gedurende 30 minuten bij 80°C te verhitten. Deze bewerking was noodzakelijk omdat verhitten gedurende een kortere tijd of bij een lagere temperatuur het toxine niet in alle gevallen bleek te inactiveren. Stam 26656 was bij controle, in tegenstelling tot alle andere sporesuspensies, zelfs na deze verhitting nog niet altijd vrij van actief botulinumtoxine; éénmaal bevatte de verhitte sporesuspensie van 26656 namelijk nog 10 MLD per ml.

Het vermogen van de verhitte sporesuspensies nog voldoende toxine te vormen, werd gecontroleerd door van iedere type C-stam een cultuurbuis met leverbouillon te enten, die na een incubatieperiode van 6 dagen bij 30°C op groei en toxineproductie werd gecontroleerd. Het toxogene vermogen bleek bij alle type C-stammen door deze bewerkingen niet te zijn verminderd.

De productie van het botulinumtoxine bij lagere temperaturen werd op gezette tijden gecontroleerd, waarbij de concentratie van het toxine in MLD per 0,5 ml cultuurmedium werd bepaald. De culturen werden tijdens deze handelingen in een bak met smeltend ijs gezet om elke ongewenste temperatuurstijging van de culturen te voorkomen.

### 9.3. RESULTATEN

#### 9.3.1. Productie van botulinumtoxine type C bij lagere temperaturen.

De productie van het botulinumtoxine type C werd onderzocht bij 10, 12,5, 15 en 20°C. Bij 10°C werd gedurende een incubatieperiode van 90 dagen in leverbouillon en in FEM geen groei en geen toxineproductie vastgesteld. Dit onderzoek werd verricht met dezelfde 8 type C-stammen, die ook bij 15 en 20°C zijn onderzocht.

Bij 12,5, 15 en 20°C bleek wel botulinumtoxine te worden geproduceerd; de concentraties zijn weergegeven in de tabellen 54, 55 en 56.

In FEM werd bij 12,5°C geen toxine gevormd. Deze waarneming is echter niet met die van de andere FEM- en leverbouillonculturen te vergelijken, omdat FEM

\* Op grond van ongepubliceerde gegevens van Eklund (1972) werd per liter medium 5 g glucose en 5 g ammoniumsulfaat toegevoegd in plaats van 10 g.

Tabel 54  
 Toxineproductie van *Cl. botulinum* type C bij 12,5°C in leverbouillon.  
 Toxin production of *Cl. botulinum* type C in liver broth at 12,5°C.

Type C-stam	Toxineconcentratie in MLD per 0,5 ml na . . . dagen										
	3	11	20	39	56	63	70	77	99	119	133
26656	-	-	-	-	10 <sup>0,7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup>
43065	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80414	-	-	-	-	-	10 <sup>0,7</sup>	-	10 <sup>0,7</sup>	10 <sup>0,7</sup>	-	-
80671	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75965	-	-	-	-	-	10 <sup>1,7</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0,7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>

- : geen botulinumtoxine aangetoond in 0,5 ml cultuurvloeistof (1 : 5 verdund).

Tabel 55  
 Toxineproductie van *Cl. botulinum* type C bij 15°C in leverbouillon en FEM.  
 Toxin production of *Cl. botulinum* type C in liver broth and FEM at 15°C.

Type C-stam	Toxineproductie in MLD per 0,5 ml na . . . dagen								
	6	9	15	22	30	37	44	52	66
A. Leverbouillon									
26656*	-	-	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>
43065	-	-	-	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
80414	-	-	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
80671	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
75965	-	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
HV 1970	-	-	-	10 <sup>0,7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
61884	-	-	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
C-mink	-	-	-	-	-	10 <sup>0,7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
B. FEM									
26656*	10 <sup>0,7</sup>	-	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
43065	-	-	-	-	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
80414	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80671	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75965	-	-	10 <sup>0,7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
HV 1970	-	-	-	-	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
61884	-	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
C-mink	-	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>

\* : In de sporesuspensie van 26656 werd nog iets botulinumtoxine aangetoond (10 MLD per ml).

- : geen botulinumtoxine aangetoond in 0,5 ml (1 : 5 verdund).



in dit geval geen glucose en ammoniumsulfaat bevatte. Het kan wel een aanwijzing zijn dat de toevoeging van deze ingrediënten belangrijk is. In leverbouillon werd door 3 van de 5 onderzochte type C-stammen betrekkelijk weinig botulinumtoxine gevormd (tabel 54). In vergelijking met de orale MLD voor wilde eenden kunnen deze toxineconcentraties als ongevaarlijk worden bestempeld.

Bij 15°C werd door alle 8 stammen in leverbouillon botulinumtoxine gevormd. In FEM werd echter door de stammen 80671 en 80414 ook na 66 dagen geen toxine geproduceerd (tabel 55). De toxineproductie verliep in vergelijking met de culturen bij 12,5°C sneller en er werden veel hogere toxineconcentraties bereikt. Bij stam 75965 werd na 37 dagen een maximum concentratie van 200.000 MLD per ml vastgesteld. Dit zou kunnen betekenen dat bij zeer gunstige omstandigheden reeds bij 15°C in de natuur toxineconcentraties bereikt kunnen worden van omstreeks één MLD voor wilde eenden.

Bij 20°C werd – met uitzondering van stam 80414 – zowel in leverbouillon als in FEM botulinumtoxine gevormd (tabel 56). De toxineproductie verliep aanmerkelijk sneller dan bij 15°C, zodat na 9 dagen bij één stam reeds een

Tabel 56

Toxineproductie van *Cl. botulinum* type C bij 20°C in leverbouillon en FEM.  
Toxin production of *Cl. botulinum* type C in liver broth and FEM at 20°C.

Type C-stam	Toxineproductie in MLD per 0,5 ml na . . . dagen					
	3	6	9	14	21	34
<b>A. Leverbouillon</b>						
26656	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
43065	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
80414	-	-	-	-	-	-
80671	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
75965	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
HV 1970	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
61884	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
C-mink	-	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
<b>B. FEM</b>						
26656	-	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
43065	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
80414	-	-	-	-	-	-
80671	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
75965	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
HV 1970	-	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
61884	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
C-mink	-	-	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>

- : geen botulinumtoxine aangetoond in 0,5 ml (1 : 5 verdund).

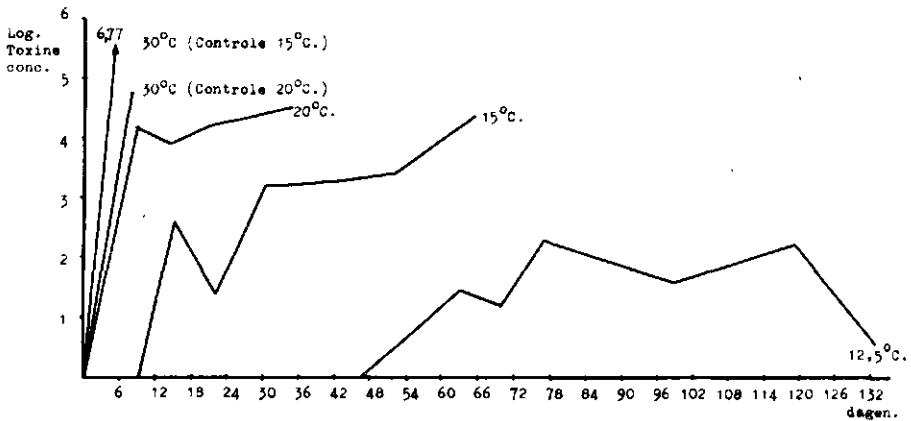


Fig. 4.

Toxineproductie van *Cl. botulinum* type C bij 12,5, 15, 20 en 30°C in leverbouillon.

Gemiddelde toxineconcentratie van de stammen die in tabel 54, 55 en 56 zijn vermeld.

Toxin production of *Cl. botulinum* type C at 12,5 - 15 - 20 and 30°C in liver broth. Average toxin concentration of the strains mentioned in tabel 54, 55 and 56.

toxineconcentratie van 200.000 MLD per ml werd vastgesteld. Zowel bij 15°C als bij 20°C werd de concentratie van 200.000 MLD per ml slechts bij enkele stammen vastgesteld. De toxineproductie zal echter groter zijn naarmate de temperatuur meer boven 20°C stijgt. Als vergelijking kunnen de controlebuizen dienen, die bij 30°C werden geïncubeerd; na 6 dagen werden bij 4 van de 8 stammen reeds toxineconcentraties van 200.000 MLD per ml gevonden, bij de overige 4 stammen minimaal 20.000 MLD per ml. Bij dezelfde stammen werden regelmatig toxineconcentraties van 200.000 MLD per ml vastgesteld, indien de cultuurmedia geënt werden met onverhit cultuurmateriaal.

### 9.3.2. Milieutemperaturen in gebieden waar botulismus bij watervogels is optreden

In de inleiding is reeds het bijzondere feit vermeld dat in sommige gebieden ook in de herfst- en wintermaanden nog gevallen van botulismus bij watervogels voorkwamen. Bij het onderzoek naar de samenhang tussen de milieutemperaturen en het optreden van botulismus bij watervogels zullen deze gebieden afzonderlijk worden behandeld.

#### 9.3.2.1. In een natuurlijk milieu

Voor dit deel van het onderzoek werden alleen van de ziekte-uitbraken in Hilvarenbeek en Zuidelijk-Flevoland gegevens verzameld. Van de kleinere botulismuisbraken, die in tabel 13 werden vermeld, zijn nl slechts weinig ecologische gegevens bekend.

### *Hilvarenbeek*

In tabel 57 is voor de zomermaanden een overzicht gegeven van de luchttemperaturen in 1968 tot 1972 in Gilze-Rijen, het dichtst bij Hilvarenbeek gelegen meetstation van het KNMI. Het blijkt dat de gemiddelde overdagtemperaturen in juni 1970, even voordat hier de eerste gevallen van botulismus voorkwamen, zeer hoog waren. Het in mindere mate optreden van botulismus in 1971 en het geheel wegblijven in 1972 is niet te verklaren met lagere gemiddelde overdagtemperaturen in die jaren.

Tabel 57

Gemiddelde overdagtemperaturen\* in °C in Gilze-Rijen en Lelystad.

Average temperatures in the daytime in °C at Gilze-Rijen near Hilvarenbeek and at Lelystad.

	Gilze-Rijen				Lelystad			
	mei	juni	juli	augustus	mei	juni	juli	augustus
1968	12,4	17,2	17,6	18,1	11,7	16,8	17,3	17,9
1969	14,6	17,2	20,1	19,1	13,4	16,5	19,3	19,1
1970	14,9	19,8	17,6	18,9	14,2	18,8	17,1	18,4
1971	15,4	15,7	19,4	18,6	13,7	14,8	18,2	17,8
1972	13,4	15,4	18,9	17,1	12,5	14,5	18,2	16,7

\* Waarnemingen om 8,14 en 19 uur. De vermelde waarden in de jaren 1971 en 1972 zijn naar voorschrift van het KNMI gecorrigeerd.

De temperaturen van het water en het slib in de ondiepe zones langs de oevers van de vennen waren in de zomer van 1970 eveneens hoog opgelopen. Hoewel een continue serie waarnemingen ontbreekt, kan dit worden afgeleid uit incidentele metingen op 27 augustus. Bij luchttemperaturen van 23°C overdag werden in ondiepe oeverzones watertemperaturen van ongeveer 30°C gemeten. Op diepere plaatsen in de vennen was de temperatuur van het water 22°C.

In 1971 werden alleen op 17 juni temperaturen gemeten: bij een luchttemperatuur van 15°C bleek de temperatuur van ondiep water in het Talingputje 14°C te bedragen.

Een indruk van het verloop van de temperaturen van lucht, water en slib in 1972 kan worden verkregen uit metingen die ten behoeve van het onderzoek van de resistentie van het botulinumtoxine zijn verricht (fig. 3, hoofdstuk 6).

### *Zuidelijk Flevoland*

Tijdens het optreden van botulismus in Zuidelijk-Flevoland in 1971 zijn geen water- of slibtemperaturen gemeten. Voor het verkrijgen van een indruk over de rol die de temperatuur heeft gespeeld, staan alleen de luchttemperaturen ter beschikking, die in het dichtbij gelegen meetstation in Lelystad zijn verzameld

(tabel 57). Het blijkt dat deze waarden in 1971, toen in juni en in augustus/ september in Zuidelijk-Flevoland botulismus bij watervogels voorkwam, geen belangrijke verschillen vertonen met de waarden van de omringende jaren.

### 9.3.2.2. In gebieden waar sprake is van een thermische waterverontreiniging

Tijdens het diagnostisch onderzoek van de botulismusgevallen in 's-Gravenhage, Amsterdam, Groningen en Leiden/Voorschoten (hoofdstuk 4) bleek dat deze vooral voorkwamen in bepaalde waterpartijen.

Bij nader onderzoek bleek dat hier de watertemperaturen verhoogd waren door thermische pollutie met koelwater. Voor dit deel van het onderzoek werden gegevens van lucht- en watertemperaturen verzameld, ten einde een beter inzicht te verkrijgen in de rol die deze thermische pollutie van het oppervlaktewater bij het optreden van botulismus bij watervogels had gespeeld.

#### 's-Gravenhage

In tabel 58 is voor de zomermaanden een overzicht gegeven van de luchttemperaturen in 1968 tot 1972 in Naaldwijk, een nabijgelegen meetstation van het KNMI. Hieruit blijkt dat de gemiddelde overdagtemperaturen in juni 1970 zeer hoog waren en dus, als in Hilvarenbeek, een gunstige omstandigheid zijn geweest tijdens het optreden van de eerste gevallen van botulismus in 's-Gravenhage.

Tabel 58

Gemiddelde overdagtemperaturen\* in °C in Naaldwijk en Oude Wetering  
Average temperatures in the daytime in °C at Naaldwijk near the Hague and at Oude Wetering near Amsterdam and Leiden.

	Naaldwijk				Oude Wetering			
	mei	juni	juli	augustus	mei	juni	juli	augustus
1968	11,8	16,6	17,3	18,1	11,9	16,9	17,5	18,2
1969	13,9	16,3	19,0	19,0	14,0	16,9	19,5	19,0
1970	14,2	19,1	17,1	18,7	14,7	19,6	17,5	18,7
1971	14,4	14,9	18,6	18,3	15,0	15,4	19,1	18,6
1972	13,0	14,6	18,2	16,8	13,2	15,0	18,5	16,9

\* Zie tabel 57.

Ondanks de iets lagere gemiddelde overdagtemperaturen in de zomers van 1971 en 1972 – vooral in juni –, bleven er in 's-Gravenhage botulismusgevallen voorkomen. Dit duidde er op dat er nog één of meer andere predisponerende omstandigheden aanwezig waren, met name in het verversingskanaal waar de meeste gevallen van botulismus werden gelocaliseerd. Het bleek dat dit water-

Tabel 59

Ecologische gegevens bij het optreden van botulismus in 's-Gravenhage.  
Ecological conditions during the occurrence of botulism in the Hague.

Plaatsaanduiding	Datum	Wassertemperatuur in °C	Diepte	Luchttemperatuur in °C	Onderzoek op <i>Cl. botulinum</i> *	Bijzonderheden
Park Clingendael	5 - 8 - 1971	19	10 cm	n.t.	Type C	Waterpand in het park.
Paleistuin	5 - 8 - 1971	23	10 cm	n.t.	Type C	Grote tuinvijver.
Verversingskanaal	5 - 8 - 1971	33	10 cm	n.t.	Type C	1.300 m na koelwaterlozing.
Verversingskanaal	19 - 8 - 1971	36	10 cm	24	Type C	1.300 m na koelwaterlozing
Ruygenhoek	19 - 8 - 1971	21	10 cm	27	Type C	Waterleidingterrein Scheveeningen.
Waterpartij	19 - 8 - 1971	22	10 cm	24	Type C, Type E	Afgesloten waterpand.
Verversingskanaal	23 - 8 - 1971	38	10 cm	20,5	Type C	1.300 m na koelwaterlozing.
Verversingskanaal	23 - 8 - 1971	36	100 cm	20,5	Type C	1.300 m na koelwaterlozing.
Verversingskanaal	23 - 8 - 1971	34,5	200 cm	20,5	Type C	1.300 m na koelwaterlozing.
Ruygenhoek	30 - 8 - 1971	20	10 cm	18,5	Type C	Waterleidingterrein Scheveeningen.
Hofvijver	1 - 9 - 1971	18	10 cm	n.t.	Type C	Geen koelwaterlozing.
Hofvijver	14 - 8 - 1972	20	10 cm	n.t.	Type C	Geen koelwaterlozing.

\* *Cl. botulinum* in slijbmonsters aangetoond.

n.t.: geen temperatuur bepaald.

pand van de andere waterpartijen afweek door een aanmerkelijk hogere watertemperatuur, veroorzaakt door de lozing van koelwater van het Gemeentelijk Energiebedrijf. Uit gegevens van het Hoogheemraadschap Delfland bleek dat vanaf 1965 het temperatuurverschil tussen water dat het koelcircuit binnenkwam en uitstromend water steeds groter werd.

In 1970 werden in juni reeds watertemperaturen van 29°C in het koelcircuit gemeten. Deze temperaturen zijn ruimschoots voldoende voor een snelle productie van het botulinumtoxine waarbij hoge toxineconcentraties kunnen worden bereikt.

Bij incidentele metingen in 1971 en 1972 bleek dat de watertemperaturen in het verversingskanaal nog hogere waarden bereikten. Ter vergelijking zijn enkele temperaturen vermeld van andere waterpartijen in 's-Gravenhage (tabel 59).

Ook op grotere diepte bleven de watertemperaturen in het verversingskanaal zeer hoog, zoals uit metingen op 1.300 m afstand van het Gemeentelijk Energiebedrijf op 23 augustus 1971 bleek: op 1 m werd 36°C gemeten en op 2 m diepte nog 34,5°C. Deze afzonderlijk hoge temperaturen, als gevolg van thermische pollutie door het Gemeentelijk Energiebedrijf, vormden ongetwijfeld een zeer gunstige omstandigheid bij de productie van botulinumtoxine.

De periode, waarin in het verversingskanaal watertemperaturen boven 20°C voorkwamen, strekte zich in 1971 en 1972 bovendien uit van omstreeks 1 mei tot omstreeks 15 november (tabel 60); dit kan een verklaring vormen voor het feit dat ook in september, oktober en november nog gevallen van botulismus bleven voorkomen bij watervogels.

Uit diverse metingen\* in 1971 en tweewekelijkse metingen in 1972 blijkt tevens dat de pH niet, maar de zuurstofgehalten van het verversingskanaal wel enige afwijkingen vertoonden. De pH varieerde in 1971 van 7,5 tot 7,9 en in 1972 van 7,7 tot 8,1. In een vijver in de duinen, die gedeeltelijk gevoed werd met kwelwater en voor de temperatuurwaarnemingen als referentiepunt diende, varieerde de pH in dezelfde periode van 7,6 tot 8,7. De zuurstofgehalten in het verversingskanaal schommelden in 1971 van 3,1 mg per liter op 28 september tot 6,7 op 17 november en in 1972 van 2,8 mg per liter op 26 juli tot 6,9 op 12 december. Bij het referentiepunt waren de zuurstofgehalten beduidend hoger, de laagste waarde bedroeg 6,6 mg per liter op 26 juli 1972 en de hoogste waarde 15,4 op 10 februari 1972. In het algemeen streeft men in het oppervlaktewater naar zuurstofgehalten van minstens 5 mg per liter.

#### *Amsterdam*

Uit tabel 58 blijkt dat de gemiddelde overdagtemperaturen in Oude Wetering (tussen Amsterdam en Leiden) weinig afweken van Naaldwijk en Gilze Rijen.

\* Deze gegevens werden welwillend ter beschikking gesteld door de Gemeentelijke Geneeskundige- en Gezondheidsdienst te 's-Gravenhage.

Toch kwamen in 1970 in Amsterdam slechts enkele gevallen van botulismus voor. In 1971 en 1972, toen de gemiddelde overdagtemperaturen met name in juni lager waren, werden echter in Amsterdam zeer veel gevallen van botulismus bij watervogels vastgesteld, vergelijkbaar met de aantallen die in 's-Gravenhage in 1970 werden aangetroffen (hoofdstuk 4). Deze gegevens wezen er op dat in Amsterdam het optreden van botulismus niet direct afhankelijk was van hoge

Tabel 60

Watertemperaturen in °C in het verversingskanaal te 's-Gravenhage in 1971 en 1972.

Water temperatures in °C in the cooling-water circuit of the electric power station in the Hague in 1971 and 1972.

Datum	Veenkade bij inlaat van GEB	Newtonstraat, bij uitlaat van GEB	Groothertoginnelaan, 900 m van GEB	Referentiepunt, duinvijver
1971, 12 - 3	12	21,5	19	
1 - 4	13	22	18	
22 - 4	16	25	23	
28 - 7	26	35	32	
4 - 8	24	32	28,5	
28 - 9	21	30	28	
21 - 10	20	27	23	
17 - 11	14	22	20	
24 - 11	11,5	23	19,5	4
8 - 12	11	20	16	6
21 - 12	12	23	19	7
1972, 12 - 1	14	25	22	4
26 - 1	11	22	18	1,5
10 - 2	14	24	21	3
23 - 2	12	20	16	3,5
7 - 3	13	22	18	6
15 - 3	13	22,5	20	6
29 - 3	14	22	18	7,5
12 - 4	15,5	21,5	19	10
9 - 5	19,5	26,5	24,5	15
25 - 5	19	28	24	15
13 - 6	17	25	23	16
26 - 7	26	31	28	20
11 - 8	24	27	27	18,5
25 - 8	22	29	27	18
21 - 9	19	28	25	14
1 - 11	17	26	22	10
16 - 11	13	19	16	6
7 - 12	12	20	17	7

De temperaturen werden 's morgens tussen 9 en 10 uur gemeten op een diepte van 30 cm.

luchttemperaturen in de zomermaanden, zodat ook hier een andere predisponerende omstandigheid aanwezig moest zijn. In analogie met 's-Gravenhage werd gezocht naar plaatsen met hogere watertemperaturen door thermische pollutie, die inderdaad op verscheidene punten in de stad werden aangetroffen. In het overzicht in tabel 61 zijn ter vergelijking enkele waterpartijen vermeld, waar geen temperatuurverhogende invloeden aanwezig waren.

Het blijkt dat ook in Amsterdam verwarmd koelwater een belangrijke rol kan spelen bij de epidemiologie van botulismus bij watervogels. In tegenstelling tot 's-Gravenhage is de situatie minder overzichtelijk, omdat in Amsterdam thermische pollutie in meerdere over de stad verspreid liggende waterpanden voorkomt. Toch zijn er ook in Amsterdam aanwijzingen dat hierbij in de eerste plaats aan de electriciteitscentrale dient te worden gedacht; uit tabel 61 blijkt dat de grootste temperatuurstijging in de Diemerplas werd gemeten, terwijl bij nadere informatie bleek dat deze centrale in het voorjaar van 1970 met de eerste productie-eenheid was gestart en in oktober 1970 met de tweede eenheid.

#### *Groningen*

In de stad Groningen ontwikkelde zich in januari 1972 een bijzondere situatie, toen tijdens een vorstperiode veel watervogels aan botulismus stierven (hoofdstuk 4). De ziekte was gelocaliseerd in het Helperdiepje, waarin koelwater van het Electriciteitsbedrijf voor Groningen en Drente (EGD) werd geloosd. Dichtvriezen van de watergebieden in de omgeving deed de trek van watervogels naar het Helperdiepje toenemen. Tijdens dit winterweer werden in het Helperdiepje nog watertemperaturen van 20°C gemeten (tabel 62). Toen de sterfte verontrostende vormen ging aannemen, besloot de directie van het EGD op 21 januari, na advies te hebben ingewonnen, de lozing van koelwater in dit deel van het koelcircuit te staken. De watertemperaturen in het Helperdiepje daalden hierna snel tot normale waarden en synchroon hiermede verdween de sterfte door botulismus. Door dit verloop werd de relatie tussen thermische waterverontreiniging en het optreden van botulismus wel zeer duidelijk gedemonstreerd.

#### *Leiden/Voorschoten*

Bij de gevallen van botulismus, die zich in 1970, 1971 en 1972 in Leiden/Voorschoten hebben voorgedaan, werden alleen in het laatste jaar incidenteel gegevens verzameld. De ziekte was hier voornamelijk gelocaliseerd in de Rijnsburgersingel, een onderdeel van het koelcircuit van het Gemeentelijk Energiebedrijf, waar in de zomer van 1972 watertemperaturen van 35°C werden gemeten.

Mede in analogie met de gegevens die in de hiervoor genoemde steden werden verzameld, mag ook in Leiden worden verondersteld dat er een nauwe relatie tussen deze thermische waterverontreiniging en het optreden van botulismus bij watervogels heeft bestaan.



Tabel 61

Ecologische gegevens bij het optreden van botulismus in Amsterdam.  
Ecological conditions during the occurrence of botulism at Amsterdam.

Plaatsaanduiding	Datum	Wassertemperatuur in °C	Diepte	Luchttemperatuur in °C	Onderzoek op <i>Cl. botulinum</i> *	Bijzonderheden
Diemerplas	24 - 1 - 1972	15	10 cm	5	Type C	Lozing koelwater electriciteitscentrale
Diemerplas	24 - 1 - 1972	15	200 cm	5	Type C	1 km vanaf de elec- tricitieitscentrale.
Rioolwaterzuiverings- Instituut West	24 - 1 - 1972	10	80 cm	5	Type C, Type E	Lozing koelwater RIW.
Smalle sloot bij Genetisch Instituut	24 - 1 - 1972	9,5	50 cm	5	Type C	Locale koelwater- lozing.
Sloterplas	24 - 1 - 1972	2,5	50 cm	5	Type C	Geen lozing koel- water.
Vondelpark I	25 - 1 - 1972	0,5	50 cm	1	Type C	Geen lozing koel- water.
Vondelpark II	25 - 1 - 1972	0	70 cm	1	Type C	Geen lozing koel- water.
Vondelpark III	25 - 1 - 1972	0	100 cm	1	Type C	Geen lozing koel- water.
Westerpark	25 - 1 - 1972	1,5	100 cm	5	Type C	Geen lozing koel- water.
Diemerplas	29 - 2 - 1972	14	50 cm	8	Type C	Lozing koelwater electriciteitscentrale.
Diemerplas	29 - 2 - 1972	14	80 cm	8	Type C	Lozing koelwater electriciteitscentrale.
Hemweg	29 - 2 - 1972	16	50 cm	6	Negatief	Lozing koelwater electriciteitscentrale.
Centrale Noord	29 - 2 - 1972	15	150 cm	6	Type E	Lozing koelwater vuilverbranding.
Stadspark Nut en Genoegen	29 - 2 - 1972	6	25 cm	6	Type C, Type E	Geen lozing koel- water.
Linnæuskade	29 - 2 - 1972	7	40 cm	8	Type C, Type E	Geen lozing koel- water.

\* *Cl. botulinum* in slijbmonsters aangetoond.

Tabel 62  
 Ecologische gegevens bij het optreden van botulismus in Groningen.  
 Ecological conditions during the occurrence of botulism at Groningen.

Plaatsaanduiding	Datum	Watertemperatuur in °C	Diepte	Luchttemperatuur in °C	Onderzoek op <i>Cl. botulinum</i> *	Bijzonderheden
Helperdiepje I	21 - 1 - 1972	20	10 cm	1	Type C	Lozing koelwater EGD.
Helperdiepje II	21 - 1 - 1972	19	10 cm	0	Type C	Lozing koelwater EGD.
Helperdiepje III	21 - 1 - 1972	18	10 cm	0	Type C	Lozing koelwater EGD.
Helperdiepje I	2 - 2 - 1972	2	10 cm	4	Type C	Lozing koelwater gestaakt.
EGD-uitlaatwater	23 - 2 - 1972	19	10 cm	6,5	Type C, Type B	EGD-terrein.
Winschoterdiep, 1 km na EGD	23 - 2 - 1972	19,5	10 cm	6,5	Type C	Circuit koelwater EGD.
Winschoterdiep, 3 km na EGD	23 - 2 - 1972	15	10 cm	6,5	negatief	Circuit koelwater EGD.
Noord-Willemsvaart	23 - 2 - 1972	4	10 cm	6,5	Type C	Verlengde van Helper- diepje.

\* *Cl. botulinum* in slibmonsters aangetoond.

Het zuurstofgehalte van het Helperdiepje varieerde op 20-1-1972 van 7,3 tot 4,8 mg per liter, resp. dicht bij EGD en bij de duiker naar de Noord-Willemsvaart (einde Helperdiepje). De pH van het uitlaatwater bij de EGD was op die datum 7,9.

#### 9.4. SAMENVATTING

In dit hoofdstuk is de invloed nagegaan, die de temperatuur heeft bij het optreden van botulismus bij watervogels.

Daartoe werd eerst de productie van botulinumtoxine type C in reinculturen bij lagere temperaturen onderzocht. Bij 10°C werd geen toxine gevormd, terwijl bij 12,5°C de toxineproductie slechts gering was: als hoogste concentratie werd voor het eerst na 77 dagen 2.000 MLD per ml vastgesteld.

Bij 15°C werd door alle 8 onderzochte stammen botulinumtoxine gevormd. Het toxine werd sneller gevormd en de toxineconcentraties waren aanmerkelijk hoger. Een maximum concentratie van 200.000 MLD per ml werd voor het eerst na 37 dagen gevonden.

Bij 20°C verliep de toxineproductie aanmerkelijk sneller zodat bij stam 61884 na 9 dagen reeds een concentratie van 200.000 MLD per ml werd aangetoond.

In het tweede gedeelte van dit hoofdstuk is een overzicht gegeven van de lucht- en watertemperaturen, die in de gebieden met botulismus bij watervogels werden vastgesteld.

In Hilvarenbeek en Zuidelijk Flevoland, waar de ziekte voorkwam in een natuurlijk biotoop, werd het optreden van botulismus beïnvloed door de klimatologische omstandigheden, met name door de temperatuur. De ziekte trad hier alleen in de warmere zomermaanden op.

In 4 andere gebieden werd een relatie aangetoond met een thermische waterverontreiniging, die vooral door electriciteitscentrales met ongunstig gesitueerde koelwatercircuits werd veroorzaakt. Een bijzonder gevolg van deze thermische pollutie was, dat in deze gebieden ook in de herfst- en wintermaanden nog sterfgevallen bij watervogels door botulismus bleven voorkomen.

## HOOFDSTUK X

### BESPREKING VAN DE RESULTATEN

#### 10.1. DE ETIOLOGIE VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS

Uit de resultaten van het diagnostisch onderzoek, weergegeven in hoofdstuk 4, blijkt dat botulismus bij watervogels in Nederland door een intoxicatie met het botulinumtoxine type C wordt veroorzaakt. De botulinumtoxinen type A, B en E werden bij dit diagnostisch onderzoek nimmer aangetoond, alhoewel *Cl. botulinum* type A, B en E blijkens de onderzoeken die in hoofdstuk 5 werden beschreven, wel in Nederland voorkomen.

De definitieve diagnose berustte steeds op het aantonen van het botulinumtoxine. Bij het onderzoek van gestorven vogels moet worden benadrukt dat een betrouwbare diagnostiek alleen mogelijk is bij verse kadavers. Uit de resultaten van het onderzoek blijkt immers duidelijk dat bij bepaalde omstandigheden rekening moet worden gehouden met een postmortale toxineproductie in de kadavers van vogels, waarbij reeds bederfverschijnselen waarneembaar zijn. Het bleek dat *Cl. botulinum* type C niet alleen in de digestietractus en de parenchymateuze organen van vogels die aan botulismus leden of waren gestorven kon worden aangetoond, maar ook bij gezonde vogels of bij vogels die aan andere ziekten waren gestorven. Bij vogels die aan botulismus waren gestorven, werden *Cl. botulinum* type B en E eveneens enkele malen aangetoond. Deze laatste gevallen illustreren wel zeer duidelijk dat de diagnose op het aantonen van het toxine dient te steunen, omdat bij deze vogels gelijktijdig botulinumtoxine type C en *Cl. botulinum* type B of E werd vastgesteld.

Bij het diagnostisch onderzoek (hoofdstuk 4) bleek vooral bij gestorven vogels – waarbij het toxine in de lever of in de digestietractus moet worden aangetoond – de hoeveelheid toxine die voor het onderzoek beschikbaar is, in sommige gevallen zeer gering te zijn. Het is dan ook niet uitgesloten dat vóór 1970 reeds

incidenteel een geval van botulismus bij enkele watervogels is voorgekomen, dat echter door de beperkte diagnostische mogelijkheden niet werd onderkend (van der Schaaf, pers. mededeling).

Moeilijkheden bij de diagnostiek kunnen ook de oorzaak zijn geweest dat in het verleden sterfte bij watervogels aan de aanwezigheid van bloedzuigers (*Theromyzon tessulatum*) werd toegeschreven, vooral als deze in de neusholten werden aangetroffen en daarbij een bemoeilijkte luchtpassage hadden veroorzaakt. In enkele proeven, uitgevoerd bij het Zoölogisch Laboratorium der Universiteit en de Afdeling Bepantingen van de gemeente Amsterdam, ondervonden gezonde, jonge en volwassen eenden echter geen nadeel van deze bloedzuigers. Waarnemingen tijdens het optreden van botulismus wezen er voorts op dat watervogels -- vooral wilde eenden -- die aan botulismus lijdten, wel gemakkelijk secundair geïnfecteerd raken met *Theromyzon tessulatum*. Williams (1970) en Keymer *et al* (1972) beschouwen deze soort eveneens als een facultatief parasitair levend organisme. De mening van Büchli (1924) en Rollinson *et al* (1950), dat bij jonge eenden een infectie met *Theromyzon tessulatum* wel fataal zou kunnen verlopen, dient dan ook nader te worden bevestigd, waarbij met name botulismus dient te worden uitgesloten.

Algemeen wordt ook bij watervogels aangenomen dat botulismus veroorzaakt wordt door de opname van reeds gevormd (preformed) toxine. Tijdens dit onderzoek werden geen aanwijzingen gevonden die tegen deze mening pleiten; bij de bespreking van de epidemiologie van botulismus zal hier uitgebreider op worden ingegaan. Boroff en Reilly (1962) meenden dat bij vogels ook sprake zou kunnen zijn van toxinevorming "de novo", op grond van het feit dat zij in de levers van watervogels die aan botulismus waren gestorven, herhaaldelijk *Cl. botulinum* type C aantoonde. Minervin (1967) komt tot eenzelfde mening naar aanleiding van ervaringen bij de behandeling van botulismus bij de mens en spreekt van het "toxico-infectieuze" karakter van botulismus. Hij isoleerde *Cl. botulinum* uit de lever, milt en andere organen van botulismuspatiënten, maar veronderstelt dat een toxinevorming "de novo" in de digestietractus zou plaatsvinden. Daarom adviseert Minervin curatief antitoxine per os te verstrekken.

De resultaten van dit onderzoek (hoofdstuk 5) wijzen niet op een toxinevorming "de novo", omdat *Cl. botulinum* type C ook bij gezonde watervogels werd gevonden en bij watervogels die aan andere ziekten waren gestorven, niet alleen in de gebieden waar botulismus optrad maar ook incidenteel in gebieden waar botulismus nimmer was voorgekomen. Bovendien is bij een toxinevorming "de novo" moeilijk te verklaren waarom in een gebied met een natuurlijk biotoop botulismus alleen in de zomer optrad, omdat in deze gebieden ook in de winter nog watervogels voorkwamen, waarbij *Cl. botulinum* type C in de parenchymateuze organen of in de digestietractus werd aangetoond.

Het zou ook mogelijk kunnen zijn dat botulismus ontstaat doordat toxine van sporen van *Cl. botulinum*, na opname van toxische sporen uit een ernstig geïn-

fecteerd milieu, in het lichaam vrijkomt door lysis van de sporewand. De resultaten van het onderzoek van Suzuki *et al* (1971) met *Cl. botulinum* type A pleiten hiertegen, aangezien zij vaststelden dat de sporewand niet werd aangetast door bacteriolytisch werkende enzymen (b.v. lysozymen) van lichaamsvloeistoffen. Het botulinumtoxine bleek pas vrij te komen door inwerking van lysozymen als toxische sporen eerst door leucocyten waren gefagocyteerd. Vegetatieve kiemen bleken wel gevoelig te zijn voor de directe werking van lysozymen.

In de Verenigde Staten wordt algemeen aangenomen dat botulismus bij watervogels door het toxine van *Cl. botulinum* type C $\alpha$  wordt veroorzaakt (Jensen en Gritman, 1967). Van botulismusgevallen bij watervogels, die vanaf 1965 in Europa zijn beschreven, wordt door de verschillende auteurs geen uitspraak over het subtype gedaan. Het onderzoek van de biochemische en serologische eigenschappen van de 15 type C-stammen die in Nederland in reïncultuur werden geïsoleerd, wijst er op dat deze stammen een eenheid vormen met één gemeenschappelijke, dominerende toxinefactor. Naar aanleiding van de publicaties van Jansen (1971) en Eklund en Poysky (1972) mag worden verondersteld dat dit de toxinefactor C<sub>1</sub> zal zijn, de belangrijkste toxinefactor van subtype C $\alpha$ .

De verwarring rond type C $\alpha$  en C $\beta$  is ontstaan sinds Pfenninger (1924) en Gunnison en Meyer (1929<sup>b</sup>) aantoonde dat het antitoxine van stam Seddon het toxine van de Amerikaanse C $\alpha$ -stammen niet neutraliseerde. Na de onderzoeken van Jansen (1971), Eklund *et al* (1971) en Eklund en Poysky (1972) zou dit kunnen worden verklaard door aan te nemen dat de type C-stam van Seddon door verlies van haar prophaag CE $\beta$  niet meer in staat was de toxinefactor C<sub>1</sub> te produceren, zodat in de culturen van deze stam nog slechts toxinefactor C<sub>2</sub> aanwezig was. De antisera die hiermede werden verkregen, bevatten alleen antitoxine C<sub>2</sub>, waarmede de toxinen C<sub>1</sub> en C<sub>2</sub> die door de C $\alpha$ -stammen werden geproduceerd, niet konden worden geneutraliseerd. Het verlies van de prophaag CE $\beta$ , dat bij type C-stammen *in vitro* vaak schijnt op te treden, leidt door het ontbreken van de belangrijkste toxische component (C<sub>1</sub>) tot het ontstaan van culturen die veelal nontoxisch of zwak toxisch zijn. Dit zou worden veroorzaakt door het feit dat in deze culturen toxinefactor C<sub>2</sub> meestal aanwezig is als een protoxine dat alleen na trypsinisatie is aan te tonen. Eigen onderzoek, vooral met stam 74902, leerde dat de saccharolytische activiteit van sommige zwak toxische en nontoxische culturen gering kan zijn, zodat de biochemische eigenschappen overeenkwamen met de beschrijvingen die Gunnison en Meyer (1929<sup>b</sup>) van de stam Seddon en 2 andere C $\beta$ -stammen gaven. De biochemische eigenschappen van de reïnculturen van de 15 in Nederland geïsoleerde zeer toxische type C-stammen kwamen daarentegen overeen met de beschrijvingen die van de Amerikaanse C $\alpha$ -stammen worden gegeven (Gunnison en Meyer, 1929<sup>b</sup>; Dolman en Murakami, 1961; Segner *et al*, 1971<sup>a</sup>).

Dat er een immunologische overeenkomst tussen de type C-stammen van de Verenigde Staten en Nederland bestaat, is ook aannemelijk te maken met een

gegeven uit de praktijk. Tot 1970 werden de nertsen in Nederland met volledig succes gevaccineerd tegen botulismus met een vaccin dat bij het Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Rotterdam, werd geproduceerd met behulp van *Cl. botulinum* type C-mink. Sinds 1970 worden de nertsen in Nederland echter gevaccineerd met een uit de Verenigde Staten geïmporteerd vaccin en het blijkt dat de protectie tegen botulismus met dit vaccin in Nederland even goed is als in de Verenigde Staten.

Een definitieve uitspraak over de toxische componenten van de Nederlandse type C-stammen is pas mogelijk, indien een onderzoek zou kunnen plaatsvinden met monospecifieke antisera, zoals die door Jansen (1971) en Eklund *et al* (1972) zijn bereid.

## 10.2. DE EPIDEMIOLOGIE VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS

Bij het ontstaan en het verloop van botulismus bij watervogels speelt de MLD voor de verschillende watervogels een zeer belangrijke rol, evenals de concentratie waarin het botulinumtoxine kan voorkomen.

Uit de onderzoeken beschreven in hoofdstuk 7 blijkt, dat de MLD voor volwassen wilde eenden – die meestal ongeveer 1 kg wegen – voor het meest virulente toxine op 360.000 LD<sub>50</sub> werd bepaald. Dit betekent dat, indien gevallen van botulismus bij watervogels voorkomen, in het gebied hoge concentraties van het botulinumtoxine type C aanwezig moeten zijn. Deze hoge toxineconcentraties werden niet in water en slib van deze gebieden aangetroffen, wel echter in kadavers en in maden die zich hierin hadden ontwikkeld. Vooral in kadavers van watervogels werden soms zeer hoge concentraties van het type C-toxine vastgesteld. Watervogels als wilde eenden, talingen, zwanen en ganzen leven echter hoofdzakelijk van plantaardig voedsel en het is daarom onwaarschijnlijk dat deze vogels rechtstreeks toxisch materiaal van deze kadavers zullen opnemen. Deze opname zal wel kunnen plaatsvinden als in het water drijvende kadavers, na volledige decompositie, in kleine deeltjes op de bodem terecht komen. Als dit in ondiep water geschiedt, zullen watervogels tijdens het fourageren dit toxische materiaal gemakkelijk met ander voedsel opnemen. Het is denkbaar dat op deze wijze botulismus op beperkte schaal optreedt, maar het is onwaarschijnlijk dat zo in korte tijd massale sterfte door botulismus optreedt, tenzij in een dergelijk gebied sprake is van een ernstige overbevolking van watervogels, waarbij de bodem door voedselgebrek bij het grondelen zeer intensief wordt afgezocht. Daarom dient ernstig rekening te worden gehouden met de mogelijkheid dat maden van zoöphage vliegen, die zich in toxische kadavers hebben ontwikkeld, een belangrijke rol spelen bij de overdracht van het botulinumtoxine. Vanaf de eerste botulismusevallen in 1970 is meermalen vastgesteld dat watervogels deze maden gaarne consumeren, niet alleen als deze op het water rondrijven, maar ook rechtstreeks van het kadaver. Uit het onderzoek beschreven in hoofdstuk 6 blijkt

dat 2 maden reeds 1 MLD voor wilde eenden kunnen bevatten. De toxineconcentratie bleek in kadavers in sommige gevallen nog veel groter te zijn, zodat minder dan 1 g weefsel reeds 1 MLD voor wilde eenden herbergde.

Dat kadavers, speciaal van watervogels die aan botulismus waren gestorven, de bron van het botulinumtoxine type C waren, werd bevestigd door het feit dat het opruimen van deze kadavers in 's-Gravenhage en Hilvarenbeek een waardevolle bestrijdingsmaatregel bleek te zijn, alhoewel het vaak moeilijk uitvoerbaar was, ook in de grote steden, tijdig alle kadavers te verzamelen.

De aanwezigheid van kadavers in verschillende stadia van decompositie, is in de natuur op zichzelf reeds als een afwijkende omstandigheid te beschouwen. Indien een biologisch evenwicht aanwezig is tussen de verschillende diersoorten, zullen zieke en verzwakte exemplaren reeds tijdig door hun natuurlijke vijanden worden geëlimineerd. Het is zodoende denkbaar dat de teruggang van de roofvogelstand in grote delen van ons land (vooral door bestrijdingsmiddelen in de land- en tuinbouw) indirect een rol heeft gespeeld bij het ontstaan van botulismus bij watervogels buiten de grote steden.

Uit het onderzoek weergegeven in hoofdstuk 5 is gebleken dat met name in de botulismusgebieden veel vogels besmet waren met *Cl. botulinum* type C, zelfs nog 1 jaar nadat de laatste gevallen van botulismus waren vastgesteld. In zulke gebieden kan botulismus bij watervogels bij ongunstige ecologische omstandigheden gemakkelijk recidiveren; in enkele gebieden werd dit in 1971 en 1972 inderdaad waargenomen. Er is geen zekerheid dat watervogels ook vóór 1970 reeds besmet waren met type C. *Cl. botulinum* type C is echter wel in grondmonsters aangetoond, die voor 1970 waren verzameld. Voor 1970 was bovendien reeds vastgesteld dat botulismus bij nertsen en paarden door type C werd veroorzaakt. Het is zodoende te verwachten dat ook vóór 1970 reeds incidenteel vogels en kleine zoogdieren besmet waren met type C. De eerste gevallen van botulismus in 1970 in 's-Gravenhage en Hilvarenbeek zouden dan zijn te verklaren door aan te nemen dat bij ongunstige ecologische omstandigheden voldoende botulinumtoxine is gevormd in kadavers van zulke besmette dieren.

Uit het onderzoek beschreven in hoofdstuk 7 blijkt dat eenden, die van botulismus zijn hersteld of oraal multipele subletale doses van het botulinumtoxine hebben opgenomen, geen serologisch aantoonbare immuniteit bezaten. Het verloop van een botulismusuitbraak lijkt dus niet te worden beïnvloed door een zich ontwikkelende immuniteit bij de autochtone watervogels. Er werden evenmin aanwijzingen gevonden dat eenden na de opname van multipele subletale doses door sensibilisatie gevoeliger werden voor het botulinumtoxine. Het bleek dat er wel een accumulatie van het botulinumtoxine plaats vond, waarbij bij Pekingeenden de opname van  $5 \times 1/16$  MLD per week na 16 tot 19 dagen symptomen van botulismus veroorzaakte. Indien dit gegeven ook voor andere watervogels geldt, dan is hieruit te berekenen dat voor het optreden van botulismus een dagelijkse opname van minstens 25.000 LD<sub>50</sub> van het meest virulente



botulinumtoxine nodig is. Bij het onderzoek naar de resistentie van het botulinumtoxine in de vrije natuur bleek dat in dierlijk materiaal als lever- en vleespartikels een dergelijke concentratie van het toxine gedurende minstens 9 maanden aanwezig kan blijven (figuur 3).

Bij botulismusuitbraken onder watervogels in de Verenigde Staten en Australië is eveneens aandacht besteed aan de rol van kadavers en sarcophage vliegen (Kalmbach, 1932; Richardson, 1965). Uit de literatuur blijkt verder dat kadavermateriaal eveneens de bron van het botulinumtoxine is geweest bij gevallen van botulismus bij paarden, runderen, schapen, en vogels als kippen en fazanten. Alhoewel botulismus niet besmettelijk is, kunnen bij vogels toch gemakkelijk secundaire ziektegevallen optreden (Kalmbach, 1930).

Pullar (1934) en Quortrup en Holt (1940) meenden dat in water en slib van botulismusegebieden voldoende botulinumtoxine aanwezig zou zijn om botulismus bij watervogels te veroorzaken. Zij vonden nl plaatsen tijdens een massale sterfte bij watervogels door botulismus, waar in water of slib botulinumtoxine was aan te tonen. De concentratie van het toxine werd echter slechts een enkele maal bepaald: Pullar toonde per ml water 1 MLD voor caviae per os aan, terwijl Quortrup en Holt plaatsen vonden waar 10 ml water reeds een voor eenden letale dosis toxine bevatte. Het toxine werd gevonden op plaatsen waar zich in ondiep water grote massa's rottend plantaardig en dierlijk materiaal hadden verzameld, meestal na langdurige perioden van droogte bij een dalende waterspiegel. Deze onderzoekers hebben niet nagegaan in hoeverre het hier toxine zou kunnen betreffen, dat afkomstig was van kadavers van gestorven watervogels, die zich tussen en in de onmiddellijke omgeving van deze rottende materie bevonden.

De milieu's, waar in Nederland botulismus bij watervogels voorkwam, weken af van de omstandigheden, zoals die in de Verenigde Staten en Australië zijn beschreven. De resultaten van de productie van botulinumtoxine onder experimentele omstandigheden en van de veldproef met wilde eenden, vormen verder een bevestiging van de veronderstelling, dat de productie van botulinumtoxine buiten de kadavers van watervogels en eventueel kleine zoogdieren b.v. ratten, geen rol van betekenis speelt bij de epidemiologie van botulismus bij watervogels in Nederland.

### **10.3. DE INVLOED VAN THERMISCHE WATERVERONTREINIGING BIJ HET OPTREDEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS**

Bij dit onderzoek bleek de temperatuur van het milieu de belangrijkste ecologische factor te zijn. In de gevallen waarbij de pH of het zuurstofgehalte van een waterpand tijdens een botulismusuitbraak werd bepaald, bleken deze geen opvallende afwijkingen te vertonen.

Uit het onderzoek dat in hoofdstuk 9 is beschreven, blijkt dat bij 20°C na relatief korte tijd reeds hoge concentraties van het botulinumtoxine kunnen zijn

gevormd. Na 6 dagen werden reeds concentraties van 20.000 LD<sub>50</sub> per ml cultuurmedium gevonden, een waarde die hoog genoeg is om botulismus te veroorzaken door accumulatie van het toxine in het lichaam. Na 9 dagen werd bij 20°C een toxineconcentratie van 200.000 LD<sub>50</sub> per ml cultuurmedium gevonden, een toxineniveau waarbij de directe orale opname van een letale dosis van het botulinumtoxine zonder meer mogelijk is. Naarmate de optimale temperatuur van 30°C dichter wordt benaderd, zal een dergelijke hoge concentratie van het botulinumtoxine sneller worden bereikt. Het onderzoek weergegeven in hoofdstuk 6, wijst er bovendien op dat in putride kadavers hogere concentraties van het botulinumtoxine bereikt kunnen worden dan met reïnculturen in voedingsmedia, zoals die bij het experimentele onderzoek (hoofdstuk 9) werden gebruikt. Daarom is een watertemperatuur van 20°C zeker hoog genoeg om een snelle en hoge productie van het botulinumtoxine te waarborgen in kadavermateriaal, dat zich in dit water bevindt.

Naarmate de temperatuur verder beneden 20°C daalt, zal de productie van het botulinumtoxine langzamer verlopen. Onder experimentele omstandigheden werd bij 15°C pas na 30 dagen een toxineconcentratie van 20.000 LD<sub>50</sub> per ml bereikt. Het is onwaarschijnlijk dat bij een dergelijke temperatuur nog sterfte van enige omvang door botulismus bij watervogels zal optreden.

Deze veronderstelling wordt ook door de praktijk bevestigd. In Noord-Amerika en Australië is uitsluitend sterfte door botulismus bij watervogels in het warme jaargetijde vastgesteld (Kalmbach, 1930, 1935 en 1968; Pullar, 1934; Grubb, 1964; Martinovich *et al*, 1972). Hetzelfde geldt voor de botulismusevallen, die in Europese landen werden vastgesteld gedurende de laatste jaren (Niléhn en Johannsen, 1965; Müller, 1967<sup>a</sup> en 1972; Blandford *et al*, 1969; Keymer *et al*, 1972; Roberts *et al*, 1972).

Dat in een natuurlijk biotoop 's zomers bij voldoende hoge lucht- en watertemperaturen niet frequenter botulismus bij watervogels voorkomt, zal vooral zijn toe te schrijven aan het feit dat veelal niet aan alle essentiële voorwaarden is voldaan. Op grond van dit onderzoek blijkt de aanwezigheid van kadavermateriaal dat besmet is met *Cl. botulinum* type C en de aanwezigheid van zoöphage vliegen van grote importantie te zijn.

Volstrekt afwijkend van de situatie in het buitenland is echter het feit dat in Nederland in de jaren 1970, 1971 en 1972 ook in de herfst en in de winter nog gevallen van botulismus voorkwamen. Het onderzoek, dat in de hoofdstukken 4 en 9 is beschreven, heeft aangetoond dat deze gevallen het gevolg zijn van een thermische pollutie door koelwater van electriciteitscentrales in ongunstig gesitueerde koelcircuits. In deze waterpanden met een sterk verhoogde watertemperatuur zal bij aanwezigheid van een gunstige voedingsbodem, een snellere en grotere productie van botulinumtoxine plaatsvinden. Dit warmere water zal bovendien in het koude jaargetijde een extra aantrekkingskracht uitoefenen op watervogels, waardoor onevenredig grote aantallen watervogels leven in een klein

gebied. De gevolgen van een dergelijke ontwikkeling zijn wel zeer duidelijk aan het licht gekomen in Groningen door de gevallen van botulismus in januari 1972. Hoezeer de situatie in Nederland afwijkt van de in het buitenland beschreven botulismusgevallen, blijkt ook uit het feit dat in een koelere zomer als 1972 botulismus vrijwel uitsluitend voorkwam in de grote steden en de directe omgeving, waarbij in 's-Gravenhage, Amsterdam en Leiden na 1970 sprake was van een recidief in 2 opeenvolgende jaren. Deze gebieden zijn ook een potentieel gevaar voor andere waterwildgebieden omdat zowel de bodem als de daar levende dieren (vooral watervogels) in ernstige mate besmet zijn met *Cl. botulinum* type C, zodat migrerende watervogels andere natuurgebieden met *Cl. botulinum* type C kunnen besmetten. In warmere zomers is nu ook in deze natuurgebieden de mogelijkheid aanwezig dat zich een botulismusuitbraak gaat ontwikkelen. Indien dit waterwildreservaten en andere vogelgebieden zou betreffen, is ernstige schade aan de fauna (vooral aan watervogels) te verwachten, waarbij speciaal het verlies van kostbare en zeldzame soorten in hoge mate zou zijn te betreuren.

De ernst van de situatie wordt echter niet alleen veroorzaakt door het verlies van watervogels en de daarmee samenhangende onrust bij ornithologen en andere personen die met deze vogelsterfte worden geconfronteerd. Veel ernstiger is het feit dat botulismus bij watervogels is aan te merken als een duidelijk waarneembare indicator voor een steeds toenemende milieuverontreiniging waarvan een voortschrijdende ontwrichting van het biologisch evenwicht één der gevolgen is. De toenemende thermische pollutie is een zeer bedenkelijk aspect omdat in Nederland in de nabije toekomst de koelcapaciteit van alle grotere oppervlakte wateren zal zijn benut, indien aan de door Went (1970) en Keller (1970) gestelde voorwaarden moet worden voldaan.

Bij het optreden van botulismus bij watervogels zijn ten aanzien van de rol die koelcircuits van electriciteitscentrales spelen, slechts enkele preventieve maatregelen aan te geven. Een afdoende maatregel zou zijn er voor te zorgen dat de temperatuur van het water in het koelcircuit beneden 20°C blijft. 's Zomers zal deze grens echter, onder invloed van de klimatologische omstandigheden, zeker worden overschreden. Het is daarom van belang tevens enkele secundaire maatregelen aan te geven, die eveneens een gunstig effect kunnen sorteren, nl het tijdig verzamelen van zieke en gestorven dieren, het uitbaggeren van ondiepe gedeelten van het koelcircuit en te zorgen voor goed beschoeide walkanten langs het gehele circuit. Andere maatregelen, zoals de therapeutische behandeling met een hoogwaardig immuunserum of de preventieve vaccinatie met een toxoidvaccin, lijken vooralsnog weinig praktisch.

Overigens moet worden gesteld dat niet alle botulismusgevallen, die in de herfst en winter voorkomen, zijn toe te schrijven aan de rechtstreekse gevolgen van thermische waterverontreiniging. Er deden zich in de herfst en winter van 1971 en 1972 ook enkele gevallen voor in vijvers met normale watertemperatuur; hierbij was met zekerheid bekend dat het watervogels – meest ganzen en

zwanen – betrof, die nimmer dat gebied hadden kunnen verlaten. Het ontstaan van deze botulismusevallen is te verklaren door aan te nemen dat de watervogels botulinumtoxine hebben opgenomen dat reeds in de voorafgaande zomer bij hogere temperaturen was gevormd. Bij het onderzoek dat in hoofdstuk 6 is beschreven, is reeds gebleken dat de resistentie van het botulinumtoxine voldoende groot is om gedurende verscheidene maanden aanwezig te blijven zonder dat een aantoonbaar verlies van de concentratie van het toxine optreedt. Hierbij dient nog te worden opgemerkt dat de hiervoor bedoelde gevallen uitsluitend zijn gesignaleerd in waterpanden waar in de voorafgaande zomer reeds verscheidene gevallen van botulismus waren voorgekomen, zoals het Zuiderpark in 's-Gravenhage en het Vondelpark in Amsterdam.

#### 10.4. VOLKSGEZONDHEIDSASPECTEN BIJ HET OPTREDEN VAN BOTULISMUS BIJ WATERVOGELS

Tot nu toe was in Nederland het voorkomen bekend van *Cl. botulinum* type B en type C. Door het type B-toxine zijn in Nederland enkele ziektegevallen bij de mens vastgesteld (Clarenburg en Fijen, 1937; Schoonhoven van Beurden en Clarenburg, 1937).

In dit onderzoek (hoofdstuk 5) werd het voorkomen van type B en C bevestigd, maar het bleek dat *Cl. botulinum* type A en E in Nederland eveneens voorkomen; type A werd slechts sporadisch gevonden, doch type E tamelijk frequent, met name in waterrijke gebieden (tabel 35). De mens is, behalve voor type B, ook zeer gevoelig voor de toxinetypen A en E. In verband met deze nieuwe gegevens zou men thans kunnen veronderstellen dat de ernstige botulismusepidemie bij Nijmegen (Bekker, 1944; Enneking, 1944) door botulinumtoxine type E is veroorzaakt. Het geïsoleerde toxine kon nl niet worden getypeerd met de toen ter beschikking staande antitoxinen type A en B; van de thans in Nederland gevonden toxinetypen, waarvoor de mens zeer gevoelig is, blijft aldus per exclusionem type E over. Dat varkensham het toxische voedsel vormde, behoeft hiermede niet in strijd te zijn, omdat ook andere auteurs gevallen vermelden, waarbij type E-toxine in ham of andere vleesproducten werd aangetoond (Meyer, 1956; Matveev *et al*, 1967).

##### *Cl. botulinum* type C.

Bij de beoordeling van de gevaren voor de volksgezondheid, die verbonden zijn aan het massaal optreden van botulismus bij watervogels, is van fundamenteel belang de vraag in hoeverre de mens gevoelig is voor het botulinumtoxine type C. Dolman en Murakami (1961) bespreken vrij uitvoerig 2 gevallen van botulismus bij de mens die aan type C werden toegeschreven. Men kan echter stellen dat de diagnose in deze gevallen niet volledig betrouwbaar is geweest: er was wel sprake van een op botulismus wijzend ziektebeeld, maar er kon geen

botulinumtoxine bij de 2 patiënten worden aangetoond. Dat toch werd aangenomen dat deze patiënten aan een intoxicatie met type C hadden geleden, werd gebaseerd op het feit dat de aanwezigheid van *Cl. botulinum* type C werd aangetoond in de maaginhoud van één der patiënten en in het andere geval in het verdachte voedsel.

Matveev *et al* (1967) vermelden in hun overzicht, betreffende de epidemiologie van botulismus in Rusland, dat gedurende de laatste 2 jaar 2 gevallen van botulismus bij de mens door type C zijn veroorzaakt. De betrouwbaarheid van de diagnostiek is in deze gevallen niet te beoordelen, omdat verdere gegevens ontbreken.

Dat de mens een zekere gevoeligheid voor het type C-toxine kan bezitten, is misschien ook te concluderen uit proeven die Dolman en Murakami (1961) voor dit doel met rhesusapen hebben verricht. Bij orale applicatie bleek de MLD voor deze apen per kg lichaamsgewicht in intraperitoneale muizen MLD, voor type B 180, voor type A 650, voor type C $\beta$  en E 1.500 tot 2.500, voor type F 50.000 tot 75.000 voor type C $\alpha$  100.000 tot 250.000 en voor type D 600.000 te bedragen. Het verschil tussen het C $\alpha$ - en het C $\beta$ -toxine is opvallend groot. Over de gebruikte type C-stammen wordt vermeld dat de C $\alpha$ -stam afkomstig was uit de Verenigde Staten uit gevallen van botulismus bij watervogels en de C $\beta$ -stam uit Europa (Instituut Pasteur te Parijs) uit een geval van botulismus bij paarden.

Het is duidelijk dat, indien er van wordt uitgegaan dat de mens een zekere, zij het geringe, gevoeligheid heeft voor het type C-toxine, een uitbreiding van het aantal gevallen van botulismus bij watervogels als zeer ongewenst voor de volksgezondheid is te beschouwen. Watergebieden, waar botulismus voorkwam, zijn tevens recreatiegebieden; aan een ernstige contaminatie van deze gebieden met botulinumtoxine en met *Cl. botulinum* type C zijn dan reeds direct gevaren verbonden.

#### *Cl. botulinum* type A, B en E

De situatie wordt nog bedenkelijker indien in ogenschouw wordt genomen dat ook de typen B en E in deze gebieden veelvuldig werden aangetoond, zowel in de bodem als bij de in dit gebied levende dieren en bij aan botulismus gestorven watervogels. Na afsluiting van het onderzoek dat in hoofdstuk 5 is beschreven, bleek ook type A te kunnen voortkomen bij watervogels die aan botulismus zijn gestorven: uit een wilde eend die in januari 1973 in Leiden aan botulismus was gestorven, werd nl. *Cl. botulinum* type A uit de parenchymateuze organen en hartspier geïsoleerd. Indien de kadavers van watervogels niet tijdig worden vernietigd, zal niet alleen een sterke besmetting van deze gebieden met *Cl. botulinum* type C plaatsvinden, maar ook met de typen B, E en A. Een verdere verspreiding vanuit deze gebieden is op vele manieren denkbaar, o.a. via zoöphage vliegen (hoofdstuk 5). Mocht hierbij voor menselijke consumptie bestemd voedsel worden besmet met *Cl. botulinum* dan is dit als hoogst ongewenst te

beschouwen: de vorming van botulinumtoxine is dan immers afhankelijk geworden van de zorg waarmede dit voedsel verder zal worden behandeld (Forster *et al.*, 1965).

#### *Drinkwaterbedrijven*

Bij het optreden van botulismus bij watervogels dient de volksgezondheid ook nog op een geheel andere wijze in discussie te worden gebracht, omdat in één van de grote steden botulismus is voorgekomen in duinpannen die in gebruik waren voor de drinkwatervoorziening. De waterbassins, gelegen in een afgesloten natuurgebied in de duinen, trekken veel watervogels aan. In 1971, toen in 's-Gravenhage steeds meer gevallen van botulismus buiten het verversingskanaal bleken voor te komen, is ook in deze duinpannen sterfte onder watervogels door botulismus vastgesteld. In water en slib van deze bassins werd bij herhaling *Cl. botulinum* type C aangetoond. Het was niet te vermijden dat in deze duinpannen kadavers van aan botulismus gestorven watervogels terecht kwamen. Het monster water uit een gebied met botulismus, waarin botulinumtoxine werd aangetoond (tabel 38), was afkomstig van één van deze duinpannen uit de onmiddellijke omgeving van het geputriceerde kadaver van een fazant. De sterfte door botulismus verdween in september, toen de lucht- en watertemperaturen daalden. In 1972 is de ziekte hier niet opnieuw signaleerd.

Rechtstreeks gevaar voor de volksgezondheid door de aanwezigheid van type C-toxine in het drinkwater is onaannemelijk, omdat het water uit de duinpannen nog de zandlagen van de bodem van deze pannen moet passeren en daarna een behandeling met norit ondergaat. Bovendien zal er een enorme verdunning van het toxine optreden door de snelle doorstroming van het water, die nodig is om aan de behoefte van drinkwater te voldoen.

Een ander probleem is echter dat de resistente sporen van *Cl. botulinum* type C de zandlagen van de duinpannen zouden kunnen passeren. Deze sporen zouden dan met het water in een grote verzamelkom terecht komen. Het water wordt hieruit over kiezel- en zandfilters geleid, alvorens het wordt afgegeven aan de buizen van het drinkwaternet naar de stad. In de bovenste laag van de zandfilters vindt een biologische reiniging plaats, waarbij normaliter alle vegetatieve kiemen worden geëlimineerd. Er is echter geen zekerheid dat dit ook gebeurt met clostridiumsporen. Een distributie van *Cl. botulinum* type C sporen via het drinkwaternet van een grote stad dient echter wel als een zeer ongewenste ontwikkeling te worden aangemerkt.

In het kader van dit onderzoek kwamen nog geheel andere feiten aan het licht. Bij het vervolgen van de besmetting met *Cl. botulinum* type C over het terrein van een drinkwaterbedrijf, werd ook de verzamelkom onderzocht omdat in dit open waterbekken kuifeenden werden signaleerd. Slib van de bodem van deze kom bleek niet besmet te zijn met type C, maar wel met *Cl. botulinum* type B. In sommige slibmonsters was de besmetting zeer intensief, zodat 10 mg mate-

riaal reeds voldoende was voor het verkrijgen van een toxische ophopingscultuur. Het slib van de bodem van dit waterbekken wordt ter reiniging op gezette tijden opgezogen en verwijderd, maar *Cl. botulinum* type B bleef ook na dit proces nog aantoonbaar in het bodemslib. Uit één van deze slibmonsters werd een zeer toxogene stam van type B in reïncultuur geïsoleerd (stam WB 1971, tabel 33). Als besmettingsbron werd bij verder onderzoek het omringende grasveld aangegeven, nadat type B in de bodemmonsters werd aangetoond, met name in monsters van regengoten die naar de verzamelkom liepen. Een besmetting via het aangevoerde water kon niet worden aangetoond, terwijl een vermeerdering van type B in het bodemslib van de verzamelkom zeer onwaarschijnlijk was in verband met de lage temperatuur, alhoewel het slib wel anaëroob was. Door de lokalisatie zouden de type B-sporen het drinkwaternet eerder kunnen bereiken dan de type C-sporen die in de duinpannen voorkwamen. Bij onderzoek werd type C niet, maar type B wel aangetoond in 2 van 3 onderzochte zandfilters. Het onderzoek op *Cl. botulinum* van 10 l drinkwater, geconcentreerd door filtratie, verliep negatief.

Bij de aanleg van nieuwe drinkwaterterreinen – waarbij men open waterbassins aanlegt om gebruik te kunnen maken van filtratie van het water door zandlagen van de bodem van deze bassins – dient men zich bewust te zijn van de aspecten die zijn verbonden met het aantrekken van watervogels naar deze gebieden. Dit onderzoek heeft aangetoond dat in de zomermaanden het optreden van botulismus bij watervogels als een reële mogelijkheid dient te worden beschouwd.

#### *Landbouwhuisdieren*

Het is mogelijk dat de volksgezondheid ook nog op een andere wijze in gevaar wordt gebracht. De ernstige infectie van het milieu met *Cl. botulinum* type C, die optreedt bij een massale sterfte van watervogels door botulismus, zou nu tot gevolg kunnen hebben dat het aantal gevallen van botulismus bij landbouwhuisdieren ook gaat toenemen. Sterfte door botulismus werd bij deze dieren tot 1970 in Nederland slechts een enkele keer met zekerheid vastgesteld; zo werd in de laatste 10 jaar één geval bij paarden (Cysouw en Tesink, 1968; Haagsma, 1968) en één geval bij runderen (Haagsma, 1969) aangetoond. In de laatste 2 jaar is het aantal gevallen verhoudingsgewijs toegenomen; er werd een geval bij runderen vastgesteld in 1971 (Koopman *et al*) en daarna gevallen bij runderen, heideschape en mestkuijken (Haagsma, 1972). Bij de gevallen van het paard en het rund bleek de bron van het botulinumtoxine type C het kadaver van een kat te zijn, die in het hooi of de voordroogkuil was terechtgekomen. Bij het optreden van botulismus bij enkele schape werd de herkomst van het toxine niet aangetoond en dat was eveneens het geval bij de zeer grote en langdurige sterfte bij mestkuijken op een bedrijf in de omgeving van Breda. In dit laatste geval konden slechts 2 gemummificeerde kadavertjes van zeer jonge kuikentjes worden onder-

zoekt. Het bleek dat dit bedrijf zeer ernstig besmet was met *Cl. botulinum* type C, een besmetting die leek te zijn veroorzaakt doordat de hokken werden schoongemaakt met water uit de Chaamse beek, die – zoals later onderzoek aantoonde – ter plaatse besmet was met *Cl. botulinum* type C. Evenals bij gevallen van botulismus bij watervogels (hoofdstuk 5) bleken ook mestkuikens, die aan botulismus leden of waren gestorven, in de parenchymateuze organen en in de digestietractus besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C. Uit de lever van één der kuikens werd stam 74902 geïsoleerd (zie 8.2.). Omdat de kuikens tijdelijk ook nog met *Cl. botulinum* besmet drinkwater hebben gekregen, is het te verwachten dat bij de geslachte mestkuikens die van het bedrijf afkomstig waren, een beduidend aantal karkassen met *Cl. botulinum* type C waren besmet en als zodanig de consument zullen hebben bereikt.

Deze botulismusuitbraak illustreert wel het duidelijkst de ongewenste gevolgen van een voortgaande besmetting van het leefmilieu van mens en dier in Nederland met *Cl. botulinum*, zowel met type C als met de andere toxinetypen. Een bezinning op de gedurende de laatste 3 jaar veranderde situatie lijkt daarom alleszins noodzakelijk.



## SAMENVATTING EN CONCLUSIES

De resultaten van een uitvoerig onderzoek naar de etiologie en de epidemiologie van botulismus bij watervogels in Nederland zijn in dit proefschrift weergegeven. De ernstige gevallen van botulismus, die in 1970 werden vastgesteld, vormden de aanleiding tot een nader onderzoek; dit concentreerde zich vooral op de vragen:

- 1) Hoe is de verspreiding van de verschillende typen van *Cl. botulinum* in Nederland?
- 2) Onder welke omstandigheden heeft een zodanige vorming van het botulinumtoxine plaats, dat massale sterfte bij watervogels en eventueel andere dieren het gevolg kan zijn?
- 3) Is er een relatie met bepaalde vormen van milieuverontreiniging?
- 4) Welke zijn de consequenties voor de volksgezondheid?

In hoofdstuk 2 wordt in een algemeen gedeelte een overzicht gegeven van de literatuur, waarbij achtereenvolgens worden behandeld: historisch overzicht en gegevens over het voorkomen van botulismus, de etiologie met de belangrijkste bacteriologische kenmerken, de pathogenese, de symptomatologie van de ziekte, de post-mortem bevindingen, de diagnostiek en de prophylactische en therapeutische mogelijkheden.

In een apart gedeelte worden daarna de literatuur over de etiologie en de epidemiologie van botulismus bij watervogels samengevat. De meeste gegevens hebben betrekking op onderzoeken die in de dertiger jaren in de Verenigde Staten zijn uitgevoerd. Uit het literatuuronderzoek bleek dat pas in de laatste jaren in Europa enkele gevallen van botulismus bij watervogels zijn vastgesteld. Men bleek algemeen van mening, dat bij watervogels – evenals bij andere dieren en de mens – botulismus ontstaat door de opname van reeds gevormd (“pre-formed”) toxine.

In hoofdstuk 3 worden de materialen en methodieken beschreven, die in dit onderzoek zijn gebruikt. Voor de groei van *Cl. botulinum* in vlocibare voedings-

media werden leverbouillon, cooked meat medium, fortified egg meat medium en het medium volgens Cardella gebruikt. De kweek op vaste voedingsbodems geschiedde op hartinfuus-schapebloedagarplaten, brain heart runderbloed-agarplaten en glucose-runderbloedagarplaten in een anaërobenvat volgens de principes van McIntosh en Fildes.

De *Cl. botulinum* antitoxinen waren afkomstig van het "Instituut Pasteur" te Parijs en het "Center for Disease Control" te Atlanta. Er werd bovendien gebruik gemaakt van een type C-antitoxine, dat voor dit onderzoek werd bereid met behulp van anatoxine (toxoid) van *Cl. botulinum* type C-mink (Dinter en Kull).

Als proefdieren voor het aantonen van het botulinumtoxine werden Swiss Random muizen van 18 tot 20 g gebruikt. De typering van het botulinumtoxine geschiedde volgens richtlijnen van het "Center for Disease Control" te Atlanta.

Tijdens het onderzoek werd een methodiek uitgewerkt, die het mogelijk maakte botulinumtoxinen met behulp van centriflo membraanfilters (Amicon) te concentreren. Deze methodiek bleek van grote waarde bij het aantonen en typeren van geringe hoeveelheden toxine.

In hoofdstuk 4 wordt een onderzoek gegeven van de botulismusgevallen die in Nederland in 1970, 1971 en 1972 bij watervogels zijn vastgesteld. Vóór 1970 was de ziekte niet onderkend.

Bij de diagnostiek bleken de klinisch waarneembare ziekteverschijnselen, waarbij de verlamingsverschijnselen op de voorgrond traden, belangrijke aanwijzingen te kunnen verschaffen. Bij het post-mortem werden geen pathognomonische laesies waargenomen. Wilde eenden, die aan botulismus hadden geleden, waren in enkele gevallen besmet met bloedzuigers (*Theromyzon tessulatum*). Deze parasieten kunnen als secundaire infectie aanleiding hebben gegeven tot een bemoeilijkte luchtpassage in de neusholte.

De definitieve diagnose berustte steeds op het aantonen van het botulinumtoxine, dat bij typering in alle gevallen type C bleek te zijn. In vrij veel gevallen bleek de hoeveelheid toxine in het bloedserum of de leversuspensie, die voor de diagnostiek beschikbaar was, nauwelijks 1 MLD voor muizen te zijn. In sommige gevallen waarbij nog minder toxine aanwezig was, werd het botulinumtoxine met succes geconcentreerd met behulp van centriflo membraanfilters. Bij levende botulismuspatiënten werden de beste resultaten verkregen bij onderzoek van het bloedserum. Bij gestorven vogels leverde de diagnostiek soms meer moeilijkheden op, omdat men dan was aangewezen op het onderzoek van de lever en de digestietractus.

In dit onderzoek is geen diagnostische waarde toegekend aan de isolatie van *Cl. botulinum*. Achteraf bleek dit juist te zijn omdat het oorzakelijke micro-organisme ook wel bij dieren, waarbij een andere doodsoorzaak werd vastgesteld, bleek voor te komen.

Het optreden van botulismus werd in 6 gebieden aan een uitbreider onder-

zoek onderworpen in verband met de bijzondere aspecten die zich hierbij voordeden. Twee botulismusuitbraken traden in natuurgebieden op, nl in Hilvarenbeek en in Zuidelijk Flevoland. De 4 andere botulismusgevallen kwamen voor in parken, vijvers en grachten van de steden 's-Gravenhage, Amsterdam, Groningen en Leiden. In deze laatste gebieden werden ook nog gevallen van botulismus vastgesteld in de herfst en in de winter. De bijzondere ecologische aspecten, die aan het optreden van botulismus in deze gebieden waren verbonden, zijn in hoofdstuk 9 beschreven.

Ook in 9 andere gebieden werden in de zomermaanden gevallen van botulismus gesignaleerd. De geographische ligging van deze gebieden en het tijdstip waarop de ziekte optrad, doen vermoeden dat het meestal secundaire gevallen betrof, die verband hielden met de eerder genoemde 6 bijzondere botulismusgebieden.

In hoofdstuk 5 zijn de resultaten vermeld van het onderzoek dat tot doel had het voorkomen van *Cl. botulinum* na te gaan in verband met het optreden van botulismus bij watervogels. Daartoe werden een groot aantal bodemmonsters en diverse dieren – zowel vertebraten als invertebraten – in onderzoek genomen.

In de gebieden waar botulismus bij watervogels was voorgekomen, bleek water maar vooral slib veelvuldig en intensief besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C. Op de walkanten was de grond op de roestplaatsen van de watervogels eveneens vaak besmet met *Cl. botulinum* type C. Naast type C werden in deze botulismusgebieden ook de typen B en E aangetoond (tabel 14). Eén jaar na de laatste gevallen van botulismus was er nog geen vermindering vast te stellen in de besmettingsgraad van de bodem van deze gebieden met type C.

In bodemmonsters, verzameld in vogelgebieden waar geen botulismus was voorgekomen, werd *Cl. botulinum* type C slechts in enkele slibmonsters gevonden (tabel 17). Deze monsters bleken bij kwantitatief onderzoek bovendien veel minder intensief te zijn besmet dan in de botulismusgebieden. De typen B en E werden in de botulismuvrije vogelgebieden relatief even vaak gevonden als in de botulismusgebieden.

Het voorkomen van *Cl. botulinum* in de bodem van vogelgebieden waar botulismus wel of niet was voorgekomen, werd tenslotte vergeleken met slib- en grondmonsters, die verspreid over Nederland werden verzameld op plaatsen waar geen concentraties van watervogels werden gezien. Type C werd bij dit onderzoek slechts in 0,7% van de monsters gevonden, terwijl de typen B en E weer in dezelfde percentages voorkwamen als in de vogelgebieden (tabel 19). Het optreden van botulismus bij watervogels, blijkt dus te leiden tot een intensieve besmetting van deze gebieden met *Cl. botulinum* type C. Type C was echter ook al voor 1970, dus voor de eerste ernstige gevallen van botulismus bij watervogels, in Nederland in de bodem aanwezig, zoals bleek uit een onderzoek van gedroogde bodemmonsters (tabel 20). Bij het onderzoek van deze collectie werd ook

voor het eerst in één monster *Cl. botulinum* type A aangetoond. De geografische spreiding van *Cl. botulinum* op grond van het onderzoek in willekeurig verzamelde bodemmonsters is weergegeven in tabel 21; het is hierbij opvallend dat type E relatief frequent werd gevonden in de bodem van het voormalige IJsselmeer.

Naast bodemmonsters werd ook een groot aantal dieren op *Cl. botulinum* onderzocht. Het onderzoek concentreerde zich vooral op watervogels, doch ook andere vogels, zoogdieren, vissen en diverse invertebraten werden in het onderzoek betrokken.

Watervogels, die aan botulismus leden of waren gestorven, bleken besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C (tabel 23 ad A). Bij 43% van de botulismuspatiënten kon type C in de parenchymateuze organen en hartspier worden aangetoond en bij 78% in de digestietractus. Bij 71% werd type C uitwendig – op de zwemvliezen en de buikhuid – gevonden. Sporadisch werd bij een watervogel, die aan botulismus was gestorven, *Cl. botulinum* type B of E in de inwendige organen aangetoond.

Vogels die in deze botulismusgebieden aan andere ziekten waren gestorven, bleken in mindere mate besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C (tabel 23 ad B).

Gezonde vogels uit de botulismusgebieden, die speciaal voor dit onderzoek waren verzameld, bleken eveneens besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C (tabel 23 ad C). Het percentage was zelfs iets hoger dan bij de andere ziektegevallen.

Het voorkomen van *Cl. botulinum* bij vogels uit de botulismusgebieden werd vergeleken met vogels, die zo ver mogelijk van deze gebieden verwijderd werden verzameld. Bij deze vogels werd type C slechts in een enkel geval aangetoond (tabel 25 ad A en C). Kennelijk zijn watervogels en andere vogels normaliter slechts in een gering percentage met *Cl. botulinum* type C besmet. De typen B en E werden bij deze vogels eveneens aangetoond.

Kleine zoogdieren als de bruine rat, bisamrat, woelrat, kat en haas, afkomstig uit verschillende plaatsen in Nederland, bleken eveneens besmet te kunnen zijn met *Cl. botulinum* type C (tabel 26).

Er werden ook een aantal vissen onderzocht. In 4 palingen, uit een botulismusgebied afkomstig, werd *Cl. botulinum* type C aangetoond en in 1 baars uit een botulismuvrij gebied type E.

Van de invertebraten werden *Insecta* (*Diptera* en *Coleoptera*) en *Mollusca* (zoetwaterslakken en mosselachtigen) in het onderzoek betrokken.

Maden van de zoöphage vliegen *L. illustris* en *C. erythrocephala*, verzameld van kadavers van watervogels tijdens een uitbraak van botulismus, bleken steeds besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C. In maden van zoöphage vliegen uit botulismuvrije gebieden werd daarentegen *Cl. botulinum* type C niet aangetoond.

Zoöphage vliegen, die in een vliegenvaak werden verzameld in een gebied waar

botulismus bij watervogels voorkwam, bleken eveneens besmet te zijn met *Cl. botulinum*, zowel met type C als met E (tabel 28). *Cl. botulinum* werd niet meer aangetoond bij deze vliegen nadat de sterfte door botulismus was opgehouden. Zoöphage vliegen, op dezelfde wijze en in dezelfde periode verzameld in een botulismusrvrij gebied, bleken slechts sporadisch besmet te zijn met *Cl. botulinum*, waarbij eveneens de typen C en E werden aangetoond (tabel 29).

In *Mollusca*, die tot het voedselpakket van de watervogels zouden kunnen behoren en die verzameld waren in botulismusegebieden, werd veelvuldig *Cl. botulinum* type C aangetoond (tabel 30); type B werd 1 maal aangetoond en type E nimmer. In botulismusrvrije gebieden werd bij deze *Mollusca* slechts 1 maal *Cl. botulinum* type C gevonden (tabel 31).

In mosselen (*Mytilus edulis*), die voor de Nederlandse kust in de Noordzee en de Waddenzee werden verzameld, werd zowel *Cl. botulinum* type B, C als E aangetoond, waarbij type B domineerde (tabel 32).

In de tabellen 34 en 35 wordt tenslotte een samenvattend overzicht gegeven van het voorkomen van *Cl. botulinum* in de gebieden met en zonder botulismus bij watervogels. Het grote verschil is, dat de gebieden waar botulismus is voorgekomen, zeer intensief besmet zijn met *Cl. botulinum* type C. De typen B, C en E blijken in beide gebieden ubiquitair voor te komen, waarbij een tamelijk nauwe relatie bodem-dier aanwezig lijkt te zijn.

In een aantal geselecteerde gevallen werd getracht *Cl. botulinum* in rein-cultuur te isoleren. In verband met het feit dat botulismus bij watervogels door type C wordt veroorzaakt, werd de meeste aandacht aan de isolatie van stammen van dit type geschonken. Van de typen A, B en E werden echter ook enkele reïnculturen geïsoleerd (tabel 33).

In hoofdstuk 6 wordt het onderzoek beschreven dat gericht was op het voorkomen van het botulinumtoxine type C in de natuur. Indien men immers aanneemt dat botulismus bij watervogels wordt veroorzaakt door de opname van "preformed" toxine, betekent dit dat het toxine in de natuur in voldoende hoge concentraties aanwezig moet zijn. Tijdens het optreden van botulismus bij watervogels werden deze hoge concentraties aangetroffen in putride kadavers van watervogels — die bij sterfte van enige omvang steeds voldoende aanwezig zijn — en in de daarin aanwezige maden van zoöphage vliegen (tabel 36 en 37). Ook in de kadavers van kleine zoogdieren (katten) en vissen (paling) bleek een belangrijke vorming van botulinumtoxine type C mogelijk te zijn.

Poppen en volwassen zoöphage vliegen bleken als bron van het botulinumtoxine type C geen rol te spelen. Dit toxine werd evenmin aangetroffen in water en slib, dat verzameld was op de plaatsen waar zich bij watervogels de grootste sterfte door botulismus voordeed (tabel 38). Slechts in 1 monster water uit de directe omgeving van een geputriceerd kadaver van een fazant werd type C-toxine aangetoond. Botulinumtoxine type C bleek evenmin te worden gevormd

indien water en slib uit de botulismusegebieden, die intensief besmet waren met *Cl. botulinum* type C, onder experimentele omstandigheden bij de optimale temperatuur van 30° werd geïncubeerd. Pas nadat deze monsters verrijkt werden met dierlijk materiaal in de vorm van lever- en vleespartikels, bleek een geringe productie van botulinumtoxine type C tot stand te komen. Er werd geen toxineproductie vastgesteld, indien zoetwaterslakken (*Lymnaea truncatula*) werden toegevoegd.

Dat water en slib niet de bron van het botulinumtoxine was, bleek ook uit de resultaten van een veldproef met 40 wilde eenden, die in grote kooien met wijdmazig gaas in een gebied met de grootste sterfte door botulismus waren geplaatst. Slechts 1 wilde eend stierf na 15 dagen aan botulismus.

Het botulinumtoxine type C, onder experimentele omstandigheden in een milieu gebracht waar in ernstige mate botulismus bij watervogels was opgetreden, bleek zo stabiel te zijn dat zelfs na 9 maanden nog geen daling van de concentratie van het toxine waarneembaar was. Hogere zomertemperaturen en variaties in de pH van 6,1 tot 8,4 hadden hierop geen invloed (tabel 39 en 40). Met dit onderzoek werd aangetoond dat een milieu, dat tijdens een botulismusuitbraak door een opeenhoping van toxische kadavers met botulinumtoxine is gecontamineerd, gedurende vele maanden voor fouragerende watervogels een potentieel gevaar kan vormen.

De gevoeligheid per os van wilde eenden, Khaki Campbell eenden en Peking eenden voor de botulinumtoxinen type A, B, C en E is in hoofdstuk 7 beschreven.

Er bleek enig verschil te bestaan in gevoeligheid voor de botulinumtoxinen van de 3 onderzochte *Cl. botulinum* type C stammen. Voor het meest virulente type C-toxine bedroeg de orale MLD per kg lichaamsgewicht voor Khaki Campbell eenden 130.000 LD<sub>50</sub>, voor Peking eenden 316.000 LD<sub>50</sub> en voor wilde eenden 360.000 LD<sub>50</sub> (tabel 41, 42 en 43).

Voor botulinumtoxine type A waren Peking eenden ook gevoelig, de MLD per os bedroeg 1.280.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht. Voor type B-toxine waren deze eenden vrijwel ongevoelig (tabel 44). Het klinische herstel van botulismus bij deze toxinetypen verliep, in vergelijking met type C, opvallend traag.

Met type E konden geen ziekteverschijnselen worden opgewekt, ook niet na de intramusculaire applicatie van 192.000 LD<sub>50</sub> toxine (tabel 45).

De MLD voor eenden voor het botulinumtoxine type C werd niet verlaagd, indien het toxine in multiële subletale doses werd toegediend. Bij deze applicatiewijze zou een grotere gevoeligheid kunnen optreden door sensibilisatie (Behring phenomeen). Dit phenomeen werd evenmin bij muizen en caviae waargenomen. De proefdieren succombeerden pas nadat ongeveer 1 MLD van het botulinumtoxine was toegediend, wat er op wijst dat er sprake was van een

accumulatie van het toxine en niet van een sensibilisatie.

Na het herstel van botulismus bleken wilde eenden geen effectieve immuniteit te bezitten, zelfs niet voor 1 MLD toxine. Evenmin konden toxineutraliserende antistoffen worden aangetoond na de orale toediening van multiële subletale doses botulinumtoxine type C.

In hoofdstuk 8 worden de morfologische, culturele, biochemische en serologische eigenschappen van de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum*-culturen beschreven.

De morfologische en culturele eigenschappen werden onderzocht op hart-infuus-schapebloedagarplaten en op brain heart runderbloedagarplaten, waarbij de type C-stammen bij 37°C werden geïncubeerd en de typen A, B en E bij 30°C. Er vond bij alle typen een vergelijking plaats met stammen uit de "National Collection of type Cultures" te Londen. Bij het culturele onderzoek van de type C-stammen op vaste voedingsmedia bleek er nog al enige variatie in het kolonietype aanwezig te zijn. Deze variatie was vooral toe te schrijven aan een verschillende neiging tot zwermgroei (zie foto's). De biochemische eigenschappen van de type C-stammen zijn weergegeven in tabel 47. De saccharolytische activiteiten kwamen tamelijk goed overeen met de beschrijvingen die in de Verenigde Staten van type C $\alpha$  werden gegeven en doet de Nederlandse type C-stammen afwijken van het type C $\beta$  stam Seddon, die geen enkele koolhydraatvergistte (Gunnison and Meyer, 1929<sup>b</sup>). De Nederlandse type C-stammen vertoonden onderling slechts geringe biochemische verschillen, die onafhankelijk waren van de herkomst van de stammen.

Deze type C-stammen bleken ook immunologisch een nauwe verwantschap te bezitten, omdat het toxineutraliserend vermogen van het C-mink antitoxine tegenover de toxinen van alle stammen van gelijke potentie was (tabel 53). In een kruisimmuniteitstest bleken de antigene componenten van dit C-mink antitoxine gelijk te zijn aan die van het C-Pasteur antitoxine (tabel 51), terwijl verder onderzoek er op wees dat deze ook nauw overeenkwamen met die van het Internationale Standaard type C antitoxine. Het was niet mogelijk de Nederlandse type C-stammen door vergelijking met 2 stammen uit de "National collection of type Cultures" (C $\alpha$ -8264 en C $\beta$ -8548), in te delen bij subtype C $\alpha$  of C $\beta$ . De resultaten van het onderzoek van de biochemische en serologische eigenschappen wijzen er echter op dat al deze type C-stammen een eenheid vormen met één gemeenschappelijke, dominerende toxinefactor. Publicaties van Jansen (1971) en Eklund en Poysky (1972) pleiten er voor dat dit de toxinefactor C<sub>1</sub> is, de belangrijkste toxinefactor van subtype C $\alpha$ .

De in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type B stam WB 1971 bleek een nonproteolytische, typische Europese B-stam te zijn, die biochemisch grote overeenkomst vertoonde met de oorspronkelijke stam van van Ermengem (tabel 48).

De culturele en biochemische eigenschappen die bij de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type A en E stammen werden vastgesteld, kwamen overeen met de beschrijvingen die in de literatuur worden gegeven (Dolman en Murakami, 1961).

In hoofdstuk 9 is de invloed beschreven, die de temperatuur heeft bij het optreden van botulismus bij watervogels.

Bij een aantal *Cl. botulinum* type C-stammen van verschillende herkomst werd de productie onderzocht van botulinumtoxine bij lagere temperaturen. Bij 10°C werd geen toxine gevormd, maar bij 12,5°C werd door 3 van de 5 stammen wel een geringe hoeveelheid toxine gevormd. Dit toxine was echter pas na 56 dagen aantoonbaar, waarbij eerst na 77 dagen een hoogste toxineconcentratie van 2.000 MLD per ml werd gevonden (tabel 54). Bij 15°C werd door alle 8 onderzochte stammen botulinumtoxine gevormd, dat vanaf de 15e dag aantoonbaar was. Na 37 dagen werd bij één stam een hoogste toxineproductie van 200.000 MLD per ml bereikt (tabel 55). Bij 20°C verliep de vorming van botulinumtoxine aanmerkelijk sneller, zodat na 9 dagen reeds een toxineconcentratie van 200.000 MLD per ml werd vastgesteld (tabel 56).

Deze gegevens zijn van groot belang bij de verklaring van de etiologie en de epidemiologie van botulismus, zoals dat in de jaren 1970, 1971 en 1972 in Nederland bij watervogels werd gediagnostiseerd. In 2 gebieden, Hilvarenbeek en Zuidelijk Flevoland, kwam botulismus alleen in de zomermaanden voor. De ziekte trad hier op in een natuurlijk biotoop, en het voorkomen leek in hoge mate afhankelijk te zijn van de klimatologische omstandigheden, met name van de temperatuur.

In 4 andere gebieden bleken de klimatologische omstandigheden echter niet de belangrijkste factor te zijn. In 's-Gravenhage, Amsterdam Groningen en Leiden werd een relatie aangetoond met een thermische waterverontreiniging, die vooral door electriciteitscentrales met ongunstig gesitueerde koelwatercircuits werd veroorzaakt. Een overzicht van watertemperaturen in deze gebieden is gegeven in de tabellen 59, 60 en 61. Een bijzonder gevolg van deze thermische pollutie was dat in deze steden ook in de herfst- en wintermaanden nog sterfgevallen bij watervogels door botulismus voorkwamen. In Groningen trad de grootste sterfte zelfs op in januari 1972 tijdens een korte vorstperiode. Dit was toe te schrijven aan de concentratie van watervogels in het verwarmde kanaalwater doordat elders, speciaal langs de oevers, geen open water aanwezig was.

Kort samenvattend kan op grond van de resultaten van dit onderzoek het volgende worden geconcludeerd:

- 1) In Nederland komen *Cl. botulinum* type A, B, C en E voor. Van deze typen blijkt type A slechts zeer sporadisch voor te komen.
- 2) In gebieden, waar botulismus bij watervogels is voorgekomen, is de bodem



intensief besmet met *Cl. botulinum* type C. Buiten deze gebieden wordt type C slechts weinig in de bodem aangetroffen.

- 3) In gebieden, waar botulismus bij watervogels voorkomt, zijn veel watervogels en andere dieren – zowel vertebraten als invertebraten – besmet met *Cl. botulinum* type C; er is een nauwe relatie bodem-dier aanwezig. Buiten deze gebieden zijn slechts weinig dieren met type C besmet.
- 4) *Cl. botulinum* type B en E komen in de gebieden, waar botulismus is voorgekomen, zowel in de bodem als bij dieren voor; hierdoor kunnen voor de volksgezondheid bedenkelijke situaties ontstaan.
- 5) Botulismus bij watervogels ontstaat door de orale opname van botulinumtoxine type C, dat gevormd wordt in kadavers van watervogels die veelal eveneens aan botulismus zijn gestorven. Maden van zoöphage vliegen vervullen een belangrijke rol bij de overdracht van het toxine.
- 6) Eenden zijn bij orale opname van het botulinumtoxine niet alleen gevoelig voor type C, maar ook voor type A. De orale MLD voor wilde eenden van het botulinumtoxine type C is relatief groot, nl. minimaal 360.000 LD<sub>50</sub>.
- 7) In Nederland blijkt het optreden van botulismus bij watervogels in enkele grote steden samen te hangen met een thermische pollutie van het oppervlaktewater door lokale electriciteitscentrales.
- 8) Onderzoekingen met in reïncultuur geïsoleerde *Cl. botulinum* type C stammen wijzen er op dat deze behoren tot subtype C $\alpha$ .

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

This thesis contains the results of extensive research into the etiology and epidemiology of botulism in waterfowl in the Netherlands. The serious cases of botulism diagnosed in 1970 prompted further research, which centred particularly on the following questions:

- 1) What is the incidence of the various types of *Cl. botulinum* in different parts of the Netherlands?
- 2) In what circumstances is sufficient botulinum toxin formed to cause widespread mortality among waterfowl, and possibly other fauna?
- 3) Is botulism connected with certain forms of environmental pollution?
- 4) What effects does it have on public health?

Chapter 2 opens with a general section containing a summary of the relevant literature, and deals successively with the history of botulism and its incidence, with its etiology and main bacteriological characteristics, its pathogenesis and symptomatology, and with post-mortem findings, diagnosis and how the disease can be prevented and cured.

Then follows a separate section dealing briefly with the literature on the etiology and epidemiology of botulism in waterfowl. Most of the data relate to investigations carried out in the United States in the 'thirties'. Study of the relevant literature has shown that it was not until recent years that a few cases of botulism in waterfowl were diagnosed in Europe. The general view was found to be that the disease had been caused – as it is in man and other animals – by the ingestion of “performed” toxin.

Chapter 3 contains descriptions of the materials and methods employed in the research. For cultivating *Cl. botulinum* in liquid nutrients, the media used were liver bouillon, cooked meat medium, fortified egg meat medium and Cardella's medium. Cultures on solid nutrient media were streaked on heart infusion sheep blood agar plates, brain heart ox blood agar plates and glucose ox blood agar plates, and incubated in an anaerobic jar by McIntosh and Fildes's method.

The *Cl. botulinum* antitoxins came from the “Pasteur Institute” in Paris and the “Center for Disease Control” in Atlanta. A type C antitoxin was also used,

which had been prepared for this research with anatoxin (toxoid) from *Cl. botulinum* type C-mink (Dinter and Kull).

The experimental animals used to demonstrate the presence of botulinum toxin were Swiss Random mice weighing from 18 to 20 g. The types of botulinum toxin were classified in accordance with guidelines received from the "Center for Disease Control" in Atlanta.

During the investigation a method was worked out by which the botulinum toxins could be concentrated, using Amicon centriflo membrane filters. It was found to be very useful for detecting and classifying small quantities of toxin.

Chapter 4 contains a survey of the cases of botulism in waterfowl diagnosed in the Netherlands in 1970, 1971 and 1972. The disease was not identified until 1970.

When diagnosing, it was found that the clinically observable symptoms (mainly paralysis) could provide important clues. No pathognomonic lesions were observed during post-mortems. A few mallards that had suffered from botulism were found to be infected with leeches (*Theromyzon tessulatum*). Secondary infection by these parasites may have impeded the passage of air in the nasopharynx.

The definitive diagnoses were based on the presence of botulinum toxin, which in all cases was classified as type C. In quite a number of instances the quantity of toxin in the blood serum or liver suspension available for diagnosis was barely one minimum lethal dose for mice. In some cases where even less toxin was present, the botulinum toxin was successfully concentrated by means of centriflo membrane filters. When living botulism patients were involved, the best results were obtained by examining blood serum. In the case of dead birds diagnosis was more difficult, because only the liver and the digestive tract could be examined.

In the present investigation no diagnostic value was attached to the isolation of *Cl. botulinum*. Later this has been justified, since the causative micro-organism was also found in animals known to have died from other causes.

In six areas the incidence of botulism was made the subject of more extensive investigation on account of the special circumstances in which it occurred. There were two outbreaks of the disease in nature reserves, viz. in Hilvarenbeek and Southern Flevoland, and four in parks, ponds and canals in The Hague, Amsterdam, Groningen and Leiden, where cases of botulism were diagnosed even in autumn and winter. The peculiar ecological circumstances surrounding the incidence of botulism in those areas are described in Chapter 9.

In nine other areas, cases of botulism were reported in the summer months. In view of the geographical position of the areas concerned and the moment at which the disease occurred, they are thought to have been secondary cases connected with the six special botulism areas already referred to.

Chapter 5 contains the results of the research carried out into the incidence of *Cl. botulinum* in connection with the occurrence of botulism in waterfowl. To this end a large number of soil samples and various animals, both vertebrates and invertebrates, were examined.

In areas where cases of botulism in waterfowl had occurred, water – and to an even greater degree mud – was frequently found to be heavily infected with *Cl. botulinum* type C. On canal banks the soil where the waterfowl roosted was often found to be infected with *Cl. botulinum* type C. Types B and E also were demonstrated in these botulism areas (Table 14). As long as twelve months after the last cases of botulism had occurred, no decline could be observed in the degree to which the soil of these areas was infected with type C.

In soil samples collected in areas where botulism had not occurred in waterfowl, *Cl. botulinum* type C was only found in a few mud samples (Table 17). When subjected to a quantitative examination, these samples were moreover found to be far less heavily infected than the mud in the botulism areas. Types B and E were found with relatively equal frequency in botulism-free bird areas and the botulism areas.

Lastly, a comparison was made between the occurrence of *Cl. botulinum* in the soils of bird areas where botulism had or had not occurred, and in mud and soil samples collected from various places all over the Netherlands where there were no concentrations of waterfowl. During this investigation, type C was found in only 0.7% of the samples, whereas types B and E occurred once again in the same percentages as in the bird areas (Table 19). The incidence of botulism in waterfowl has been found to cause intensive infection of these areas with *Cl. botulinum* type C. However, even before 1970 – the year in which the first serious outbreaks of botulism in waterfowl occurred – examination of dried soil samples had revealed the presence of type C (Table 20). It was when examining one of the samples from this collection that *Cl. botulinum* type A was first found. Table 21 shows the geographical distribution of *Cl. botulinum* found when examining a random collection of soil samples. The researcher was struck by the relatively frequent presence of type E in the soil of what used to be Lake Yssel.

Not only soil samples but a large number of animals, too, were tested for *Cl. botulinum*. The tests were mainly carried out on waterfowl, but also included other birds, mammals, fish and various invertebrates.

Waterfowl that were suffering from botulism or had died of it were found to be heavily infected with *Cl. botulinum* type C (Table 23 A). In 43% of the botulism patients type C was found in the parenchymatous organs and the cardiac muscle, in 78% in the digestive tract, and in 71% externally, on the webs of their feet and the skin of the belly. Now and again *Cl. botulinum* type B or E was demonstrated in the internal organs of an aquatic bird that had died of botulism.

Birds in these botulism areas that had died of other diseases were found to be infected to a lesser degree with *Cl. botulinum* type C (Table 23 B).

Healthy birds from the botulism areas, which had been collected expressly for the investigation, were also found to be infected with *Cl. botulinum* type C (Table 23 C). The percentage was in fact rather higher than that in birds suffering from other diseases.

The occurrence of *Cl. botulinum* in birds from the botulism areas was compared with that in birds collected as far away as possible from those areas. In the latter, type C was only found sporadically (Table 25, A and C). Obviously, only a small percentage of waterfowl and other birds are normally infected with *Cl. botulinum* type C. Types B and E were also found in these birds.

It was also found that small mammals such as the brown rat, musk-rat, water vole, cat and hare, brought from various places in the Netherlands, might be infected with *Cl. botulinum* type C (Table 26).

A number of fishes were also examined. *Cl. botulinum* type C was found in four eels brought from a botulism area, and type E in one perch from a botulism-free area.

Insects (*Diptera* and *Coleoptera*) and molluscs (freshwater snails and bivalves) were included in the examination of the invertebrates.

Maggots of the zoophagous flies *L. illustris* and *C. erythrocephala* taken from cadavers of waterfowl during an outbreak of botulism were found in all cases to be infected with *Cl. botulinum* type C. On the other hand, *Cl. botulinum* type C was not found in the maggots of zoophagous flies from botulism-free areas.

Zoophagous flies caught in a fly-trap in an area where botulism was prevalent among waterfowl were also found to be infected with *Cl. botulinum* types C and E (Table 28). *Cl. botulinum* was no longer found in these flies, once the waterfowl stopped dying of botulism.

Only occasionally were zoophagous flies collected in the same manner and in the same period in a botulism-free area found to be infected with *Cl. botulinum*, again including types C and E (Table 29).

*Cl. botulinum* type C was frequently found in molluscs, which might form part of the waterfowls' food intake and which were brought from botulism areas (Table 30); type B was found in one instance, and type E not at all. In botulism-free areas, *Cl. botulinum* type C was only found in these molluscs once (Table 31).

*Cl. botulinum* types B, C and E were found in mussels (*Mytilus edulis*) collected in the North Sea on the coast of the Netherlands and in the Wadden Sea, type B predominating (Table 32).

Tables 34 and 35 give a survey of the incidence of *Cl. botulinum* in waterfowl in areas with and without botulism. The great difference is that the areas where botulism has occurred are very heavily infected with *Cl. botulinum* type C. Types B, C and E are found throughout both types of area, and there appears

to be a fairly close soil/animal relation.

An endeavour was made in a number of selected cases to isolate *Cl. botulinum* in a pure culture. Since the disease in waterfowl is caused by type C, efforts were directed chiefly at isolating culteres of this type. Of types A, B and E, however, only a few pure cultures were isolated (Table 33).

Chapter 6 contains a description of the investigation into the occurrence of botulinum toxin type C in nature. For if it is assumed that botulism in waterfowl is caused by the ingestion of "preformed" toxin, it follows that the toxin must be present in nature in sufficiently high concentrations. When botulism was prevalent in waterfowl, these high concentrations were found in putrid waterfowl – of which there are always sufficient when mortality is considerable – and in the maggots of zoophagous flies contained therein (Tables 36 and 37). It was found that there could also be considerable botulinum toxin (type C) formation in the cadavers of small mammals (cats) and fishes (eels).

Pupae of zoophagous flies and adult flies were found not to be a source of botulinum toxin type C. Nor was this toxin encountered in mud and water collected in the places where botulism mortality among waterfowl was highest (Table 38). Only in a single sample of water from the direct environment of the decomposed cadaver of a pheasant was type C toxin found. It was also discovered that botulinum toxin type C was not formed if samples of mud and water from the botulism areas, heavily infected with *Cl. botulinum* type C, were incubated under experimental conditions at the optimum temperature of 30°C. Not until the samples were enriched with animal material in the form of liver and meat particles did a slight production of botulinum toxin type C occur. No toxin production was observed if freshwater snails (*Lymnaea truncatula*) were added.

The fact that mud and water was not the source of the botulinum toxin also became evident from the results of a field experiment with 40 mallards, which had been put into large cages with wide-meshed netting in one of the areas with the highest botulism mortality. Only one mallard died of botulism, after 15 days.

Botulinum toxin type C, transferred under experimental conditions to an environment where there had been a severe outbreak of botulism among waterfowl, proved so stable that even after nine months there was no appreciable decline in the concentration of the toxin. High summer temperatures and variations in the pH from 6.1 tot 8.4 had no effect on it (Tables 39 and 40). The experiment showed that an environment contaminated with botulinum toxin by an accumulation of toxic cadavers during an outbreak of botulism may be a potential danger to foraging waterfowl for many months.

The sensitivity per os of mallards, Khaki Campbells and Pekins to botulinum

toxins of types A, B, C and E is described in Chapter 7. There was found to be some difference in their sensitivity to the botulinum toxins of the three *Cl. botulinum* type C strains examined. The oral MLD of the most virulent type C toxin per kg of body weight was 130.000 LD<sub>50</sub> for Khaki Campbells, 316.000 LD<sub>50</sub> for Pekins and 360.000 LD<sub>50</sub> for mallards (Tables 41, 42 and 43).

Pekins were also sensitive to botulinum toxin type A, the MLD per os being 1.280.000 LD<sub>50</sub> per kg of body weight, but they were virtually insensitive to type B toxin (Table 44). Clinical recovery from botulism due to these types of toxin was noticeably slower than from that due to type C.

No symptoms of disease could be induced by means of type E, even after intramuscular administration of 192.000 LD<sub>50</sub> toxin (Table 45).

The MLD of botulinum toxin type C for ducks was not lowered if the toxin was administered in multiple sublethal doses – a mode of administration that can cause greater sensitivity through sensitization (Behring's phenomenon) – nor was this phenomenon observed in mice and guinea pigs. The experimental animals did not succumb until about 1 MLD of the botulinum toxin had been administered, which shows that there can be said to have been accumulation of the toxin rather than sensitization.

After recovering from botulism, mallards were found to possess no effective immunity, even to 1 MLD of toxin. Nor could toxin-neutralizing antibodies be found after oral administration of multiple sublethal doses of botulinum toxin type C.

The morphological, cultural, biochemical and serological characteristics of the *Cl. botulinum* cultures isolated in the Netherlands are described in Chapter 8. The morphological and cultural characteristics were examined on heart infusion sheep blood agar plates, the type C strains being incubated at 37°C and types A, B and E at 30°C. All types were compared with strains from the National Collection of Type Cultures in London. Cultural examination of the type C strains on solid nutrient media revealed that there was a noticeable variation in colony types, due mainly to differing swarm growth tendencies (see photographs). The biochemical characteristics of the type C strains are shown in Table 47. The saccharolytic activity corresponded more or less the description given of type C $\alpha$  in the United States, and distinguished the Dutch type C strains from the Seddon type C $\beta$  strain, which did not ferment a single carbohydrate (Gunnison and Meyer, 1929<sup>b</sup>). There were only slight biochemical differences between the Dutch type C strains, and they were unrelated to their origin. These type C strains were also found to exhibit a close immunological relationship, because the C-mink antitoxin was equally effective in neutralizing the toxins of all strains (Table 53). In a cross-immunity test, the antigenic components of the C-mink antitoxin proved to be equal to those of the C-Pasteur antitoxin (Table 51), while further tests indicated that they also corresponded closely to the Inter-

national Standard type C antitoxin. Comparison with two strains from the National Collection of Type Cultures (C $\alpha$ -8264 and C $\beta$ -8548) did not enable the Dutch type C strain to be classed under subtype C $\alpha$  or C $\beta$ . Nevertheless, the results of investigations into their biochemical and serological characteristics indicate that all these type C strains constitute a unity having a common, predominant toxin factor. Publications by Jansen (1971) and by Eklund and Poysky (1972) contain the suggestion that this toxin factor is C<sub>1</sub>, the principal toxin factor of subtype C $\alpha$ .

The *Cl. botulinum* type B strain WB 1971 isolated in the Netherlands was found to be a non-proteolytic, typically European B strain that showed great biochemical similarity to the original Van Ermengem's culture (Table 48).

The cultural and biochemical characteristics observed in the *Cl. botulinum* type A and E strains isolated in the Netherlands allied with the descriptions given in the literature on the subject (Dolman and Murakami, 1961).

The effect of temperature on the incidence of botulism in waterfowl is described in Chapter 9.

Research has been carried out on the production of botulinum toxin at low temperatures by a number of *Cl. botulinum* type C strains of differing origin. No toxin was produced at 10°C, but three of the five strains produced a small quantity at 12.5°C. However, not until 56 days later could the presence of the toxin be demonstrated, and it was 77 days before a maximum toxin concentration of 2.000 MLD per ml was found (Table 54). At 15°C the eight strains examined all produced botulinum toxin, the presence of which could be demonstrated from the 15th day. After 37 days, one strain had achieved a maximum toxin production of 200.000 MLD per ml (Table 55). At 20°C, botulinum toxin was produced much more rapidly, a toxin concentration of 200.000 MLD per ml being reached after nine days (Table 56). These figures go far towards explaining the etiology and epidemiology of botulism as diagnosed among waterfowl in the Netherlands in the years 1970, 1971 and 1972. In two areas, viz. Hilvarenbeek and Southern Flevoland, botulism only occurred in the summer months and in natural biotopes, and its incidence seemed to be largely dependent on climatic conditions, especially temperature.

In four other areas, however, climatic conditions were not found to be the main ecological factor. In The Hague, Amsterdam, Groningen and Leiden a relation was found to exist between botulism and thermal pollution, caused especially by power stations with badly placed cooling-water circuits. Readings of water temperatures in these areas are given in Tables 59, 60 and 61. A remarkable effect of thermal pollution was that even in the autumn and winter months there were cases of waterfowl dying of botulism in these towns. In fact, in Groningen the highest mortality occurred in January 1972 during a short period of frost. This was attributable to the congregation of waterfowl in the



heated canal water because there was no open water elsewhere, especially not along the banks.

Briefly, then, the results of this research prompt the following conclusions:

- 1) *Cl. botulinum* types A, B, C and E are found in the Netherlands, though type A is very rare.
- 2) The soil is heavily infected with *Cl. botulinum* type C in areas where botulism has occurred in waterfowl. Elsewhere, little type C is found in the soil.
- 3) Many waterfowl and other animals – vertebrates and invertebrates – are infected with *Cl. botulinum* type C in areas where there is botulism among waterfowl; there is a close soil/animal relation. Elsewhere, only few animals are infected with type C.
- 4) *Cl. botulinum* types B and E are found, in soil and animals alike, in areas where botulism has occurred. They could therefore become a hazard to public health.
- 5) Botulism in waterfowl is caused by oral ingestion of botulinum toxin type C formed in cadavers of waterfowl, many of which have died of botulism. Maggots of zoophagous flies play an important role in transmitting the toxin.
- 6) Ducks ingesting botulinum toxin orally are sensitive to type A as well as to type C. The oral MLD of botulinum toxin type C for mallards is large, i.e. at least 360.000 LD<sub>50</sub>.
- 7) The incidence of botulism in waterfowl in a few large towns in the Netherlands seems to be connected with thermal pollution of the surface water by local power stations.
- 8) Research on *Cl. botulinum* type C strains, isolated in pure culture, indicates that they belong to subtype C $\alpha$ .

## LITERATUUR

- AKKERMANS, J.P.W.M.: Ziekten bij de nerts in Nederland. Tijdschr. Diergeneesk., **86**, 799, (1961).
- ANONYMUS: Botulism in the United States. C.D.C. vet. Publ. Health Notes, **10**, January, (1964).
- ANONYMUS: Wildlife disease and parasites. Wildlife research problems programs progress, U.S. Dept. Interior, Research publ., **23**, (1965).
- AVERY, R.J., DOLMAN, C.E., STROVELL, P.L. and WOOD, A.J.: A natural outbreak of *Clostridium botulinum* type C intoxication in ranch mink arising from pork liver. Can. J. comp. Med. vet. Sci., **23**, 203, (1959)
- BEHRING, E. VON: Die Gewinnung der Blutantitoxine und die Classificirung der Heilbestrebungen bei ansteckende Krankheiten. Dtsch. med. Wschr., **19**, 1253, (1893).
- BEIERS, P.R. and SIMMONS, G.C.: Botulism in pigs. Austral. vet. J., **43**, 270, (1967).
- BEKKER, J.H.: Botulisme in Hees. Ned. Tijdschr. Geneesk., **88**, NN VII, 69, (1944).
- BENGSTON, I.A.: Preliminary note on a toxin producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*. Public Health Rep., **37**, 164, (1922).
- BENNETTS, H.W. and HALL, H.T.B.: Botulism of sheep and cattle in Western Australia: Its cause and its prevention by immunization. Austral. vet. J., **14**, 106, (1938).
- BLANDFORD, T.B., ROBERTS, T.A. and ASHTON, W.L.G.: Losses from botulism in mallard duck and other waterfowl. Vet. Rec., **85**, 541, (1969).
- BLANDFORD, T.B. and ROBERTS, T.A.: An outbreak of botulism in broiler chickens. Vet. Rec., **87**, 258, (1970).
- BOROFF, D.A. and REILLY, J.R.: Studies of the toxin of *Clostridium botulinum*. V. Prophylactic immunization of pheasants and ducks against avian botulism. J. Bact., **77**, 142, (1959).
- BOROFF, D.A. and REILLY, J.R.: Studies of the toxin of *Clostridium botulinum*. VI. Botulism among pheasants and quail, mode of transmission, and degree of resistance offered by immunization. Int. Arch. Allergy, **20**, 306, (1962).
- BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. and SMITH, N.R.: Bergey's manual of determinative Bacteriology. 7th, ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1957.
- BUCHLI, K.: Bloedzuigers in de neusholte van eenden. Tijdschr. Diergeneesk., **51**, 135, (1924).
- BULATOVA, T.I., MATVEEV, K.I. and SAMSONOVA, V.S.: Biological characteristics of *Cl. botulinum* type C strains isolated from minks in the U.S.S.R. Proc. 5th. int. Symp. Food Microbiol., 391, (1967). Chapman and Hall, Ltd., London.
- BURKE, G.S.: The occurrence of *Bacillus botulinus* in nature. J. Bact., **4**, 541, (1919).
- BURKE, G.S.: Studies on the thermal death time of spores of *Cl. botulinum*. J. inf. Dis., **32**, 433, (1923).

- BURKE, V., ELDER, J.C. and PISCHEL, D.: Treatment in botulism. *Arch. int. Med.*, **27**, 265, (1921).
- CARDELLA, M.A., DUFF, J.T., GOTTFRIED, C. and BEGEL, J.S.: Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. IV. Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid. *J. Bact.*, **75**, 360, (1958).
- CLARENBURG, A. en FIJEN, J.N.: Voedselvergiftiging door *Bacillus botulinus* type B. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, **81**, 4806, (1937).
- COLEMAN, G.E. and MEYER, K.F.: Some observations on the pathogenicity of *B. botulinus*. *J. inf. Dis.*, **31**, 622, (1922).
- CYSOUW, C.J. en TESINK, J.: Twee gevallen van botulisme bij het paard. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **93**, 1547, (1968).
- DINTER, Z. und KULL, K.E.: Aktive Immunisierung gegen den Botulismus beim Nerz. *Nord. Vet. Med.*, **2**, 906, (1950).
- DINTER, Z. und KULL, K.-E.: Über einen Ausbruch des Botulismus bei Fasanenküken. *Nord. Vet.-Med.*, **6**, 866, (1954).
- DINTER, Z. und KULL, K.-E.: Über die Empfänglichkeit des Nerzes für die Botulinus-Toxine A und C. *Nord. Vet.-Med.*, **7**, 549, (1955).
- DOBBERSTEIN, J. und PIENING, C.: Botulismus bei Schwänen. *Berl. tierärztl. Wschr.*, **35**, 549, (1933).
- DOLMAN, C.E. and MURAKAMI, L.: *Clostridium botulinum* type F with recent observation on other types. *J. inf. Dis.*, **109**, 107, (1961).
- DOUTRE, M.P. et CHAMBON, J.: Le botulisme des ruminants et des équidés au Sénégal et en Mauritanie; conséquence pathologique des troubles nutritionnels. VIIe Journées Médicales de Dakar, Janvier 1971.
- DUBOVSKY, B.J. and MEYER, K.F.: An experimental study of the methods available for the enrichment, demonstration and isolation of *B. botulinus* in specimens of soil and its products, in suspected food, in clinical and in necropsy material. I. *J. inf. Dis.*, **31**, 501, (1922<sup>a</sup>).
- DUBOVSKY, B.J. and MEYER, K.F.: The occurrence of the spores of *B. botulinus* in Belgium, Denmark, England, The Netherlands and Switzerland. VI. *J. inf. Dis.*, **31**, 600, (1922<sup>b</sup>).
- DUCHEN, L.W. and STRICK, S.J.: The effect of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. *Quart. J. exp. Physiol.*, **53**, 84, (1968).
- DUFF, J.T., WRIGHT, G.G. and YARINSKY, A.: Activation of *Cl. botulinum* type E toxin by trypsin. *J. Bact.*, **72**, 455, (1956).
- EKLUND, M.W., POYSKY, F.T. and WIELER, D.: Demonstration and isolation of *Cl. botulinum* type F from the pacific coast of the United States. *Proc. 5th. Int. Symp. Food Microbiol.*, 433, (1967). Chapman and Hall, Ltd., London.
- EKLUND, M.W., POYSKY, F.T., REED, S.M. and SMITH, C.A.: Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. *Science*, **172**, 480, (1971).
- EKLUND, M.W. and POYSKY, F.I.: Activation of a toxic component of *Clostridium botulinum* types C and D by trypsin. *Appl. Microbiol.*, **24**, 108, (1972).
- ENNEKING, J.A.M.J.: Botulisme in Hees. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, **88**, NN. VII, 65, (1944).
- ERMENGEM, E. VAN: Untersuchungen über Fälle von Fleischvergiftung mit Symptomen von Botulismus. *Zentralbl. Bakt. I. Orig.*, **19**, 442, (1896).
- ERMENGEM, E. VAN: Ueber einen neuen anaëroben *Bacillus* und Seine Beziehungen zum Botulismus. *Zeitschr. für Hyg. Inf.*, **26**, 1, (1897).
- FAY, L.D., KAUFMANN, O.W. and RYEL, L.R.: Mass mortality of water-birds in Lake Michigan 1963-64. Publication no. 13, Great Lakes Res. Div., The Univ. Michigan. Ref in: *Proc. 5th. int. Symp. Food Microbiol.*, 400, (1967). Chapman and Hall, Ltd., London.

- FISH, N.A., MITCHEL, W.R. and BARNUM, D.A.: A report of a natural outbreak of botulism in pheasants. *Can. vet. J.*, **8**, 10, (1967).
- FJOLSTAD, M. and KLUND, T.: An outbreak of botulism among ruminants in connection with ensilage feeding. *Nord. Vet.-Med.*, **21**, 609, (1969).
- FOSTER, E.M., DEFFNER, J.S., BOTT, T.L. and MCCOY, E.: Clostridium botulinum food poisoning. *J. Milk Food Technol.*, **28**, 86, (1965).
- GELD, J. VAN DER: Talloze dode vogels in de polder Zuidelijk Flevoland. *Het Vogeljaar*, **19**, 602, (1971).
- GENDEREN, H. VAN: Research on side-effects of pesticides and related compounds. Concluding remarks. *TNO-Nieuws*, **27**, 631, (1972).
- GERWING, J., DOLMAN, C.E. and KO, A.: Mechanism of tryptic activation of Clostridium botulinum type E toxin. *J. Bact.*, **89**, 1176, (1965).
- GEWIN, J.: Botulisme, casuïstische mededelingen. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, **62**, 89, (1918).
- GILTNER, L.T. and COUCH, J.F.: Western duck sickness and botulism. *Science*, **72**, 660, (1930).
- GRAHAM, R. and BRUECKNER, A.L.: Studies in forage poisoning. The relation of B. botulinus to forage poisoning or cerebrospinal meningitis in horses. *J. Bact.*, **4**, 1, (1919).
- GRAHAM, R. and ERIKSEN, S.: Experimental botulism in dogs. *J. inf. Dis.*, **31**, 402, (1922).
- GRAHAM, R. and BOUGHTON, I.B.: Clostridium botulinum type C associated with a limberneck-like disease in chickens and ducks. *J. Am. vet. med. Ass.*, **64**, 723, (1924).
- GROSS, W.B. and SMITH, L.D.S.: Experimental botulism in gallinaceous birds. *Av. Diseases*, **15**, 716, (1971).
- GRUBB, W.B.: Avian botulism in Western Australia. *Austral. J. exp. Biol.*, **42**, 17, (1964).
- GUNDERSON, M.F.: Presence of Clostridium botulinum in livers of birds not affected with botulism. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **30**, 747, (1933).
- GUNDERSON, M.F.: Insects as carriers of Clostridium botulinum. *J. Bact.*, **30**, 333, (1935).
- GUNNISON, J.B. and MEYER, K.F.: The occurrence of nontoxic strains of Cl. parabotulinum. *J. inf. Dis.*, **45**, 79, (1929<sup>a</sup>).
- GUNNISON, J.B. and MEYER, K.F.: Cultural study of an international collection of Clostridium botulinum and parabotulinum. *J. inf. Dis.*, **45**, 119, (1929<sup>b</sup>).
- GUNNISON, J.B. and COLEMAN, G.E.: Clostridium botulinum type C associated with western duck disease. *J. inf. Dis.*, **51**, 542, (1932).
- GUNDERSON, M.F.: Presence of Clostridium botulinum in livers of birds not affected with botulism. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **30**, 747, (1933).
- HAAGSMA, J.: Ziekten bij de nerts (Mustela vison) in Nederland. *Diergeneesk. Memorandum*, **12**, 259, (1965).
- HAAGSMA, J.: Twee gevallen van botulisme bij het paard; rubriek: Ingezonden. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **93**, 1689, (1968).
- HAAGSMA, J.: Niet gepubliceerde gegevens, (1969).
- HAAGSMA, J., OVER, H.J., SMIT, TH. en HOEKSTRA, J.: Een onderzoek naar aanleiding van het optreden van botulismus bij watervogels in 1970 in Nederland. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **96**, 1072, (1971).
- HAAGSMA, J.: Niet gepubliceerde gegevens, (1972).
- HAUGE, S.: Cases of botulism in Norway in the course of the last 5-6 years. *Ref. Vet. Bull.*, **40**, 832, (1970). *Orig.: Norsk Vet. Tidsskr.*, **5**, 259, (1970).
- HAWKYARD, P.A.: Botulism in farm mink. *Brit. Fur Farmers Gaz.*, **15**, 20, (1965).

- HENNING, M.W.: Animal disease in South Africa; 3th. ed. Johannesburg, Central New Agency, 515, 1956.
- HIRSCH, A. and GRINSTED, E.: Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, **21**, 101, (1954).
- HOBMAIER, M.: Dick disease caused by the toxin of *Cl. botulinum* type C. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **28**, 339, (1930).
- JANSEN, B.C.: The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. *Onderstepoort J. vet. Res.*, **38**, 93, (1971).
- JANSEN, B.C. and KNOETZE, P.C.: Tryptic activation of *Clostridium botulinum* type C $\beta$  toxin. *Onderstepoort J. vet. Res.*, **38**, 237, (1971).
- JENSEN, W.J. and GRITMAN, R.B.: An adjuvant effect between *Cl. botulinum* types C and E toxins in the mallard duck (*Anas platyrhynchos*). *Proc. 5th. Int. Symp. Food Microbiol.*, 407, (1967).
- JOHANNSSEN, A.: *Clostridium botulinum* in Sweden and the adjacent waters. *J. appl. Bact.*, **26**, 42, (1963).
- JOHANNSSEN, A.: A simple method for isolation and photography of *Clostridium botulinum* colonies from surface cultures on agar plates. *Acta vet. Scand.*, **5**, 1, (1964).
- JOHANNSSEN, A.: Botulism hos hund. *Nord. Vet. Med.*, **17**, 680, (1965).
- JORDAN, E.O.: Food poisoning. Chicago, 1917; ref. in Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity, 4th. ed.. Edward Arnold Ltd., London, 1957.
- KALMBACH, E.R.: Western duck sickness produced experimentally. *Science*, **72**, 658, (1930).
- KALMBACH, E.R.: Progress in western duck sickness studies. *Science*, **75**, 57, (1932).
- KALMBACH, E.R.: Will botulism become a world-wide hazard to wild fowl? *J. Am. vet. med. Ass.*, **87**, 183, (1935).
- KALMBACH, E.R.: Type C botulism among wild birds - A historical sketch. *Sport, Fisheries and Wildlife, Report no. 110* (1968).
- KAUFMANN, O.W. and FAY, L.D.: *Cl. botulinum* type E toxin in tissues of dead loons and gulls. *Q. Bull. Mich. St. Univ. agric. Exp. Stn.*, **47**, 236, (1964). Ref: *Proc. 5th. int. Symp. Food Microbiol.*, 400, (1967). Chapman and Hall, Ltd., London.
- KELLER, K.J.: Lozing van koelwater in de toekomst. *Water*, **54**, 435, (1970).
- KEYMER, I.F., SMITH, G.R., ROBERTS, T.A. and HEANEY, S.I.: Botulism as a factor in waterfowl mortality at St. James's Park, London. *Vet. Rec.*, **90**, 112, (1972).
- KOOPMAN, J.J., REUS, A.J. en HAAGSMA, J.: Een geval van botulisme bij runderen. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **96**, 1396, (1971).
- KRAVCHENKO, A.T. and SHISHULINA, L.M.: Distribution of *Cl. botulinum* in soil and water in the U.S.S.R. *Proc. 5th. int. Symp. Food Microbiol.*, **13**, (1967). Chapman and Hall, Ltd., London.
- LAMANNA, C.: The most poisonous poison. *Science*, **130**, 763, (1959).
- LAMANNA, C. and SAKAGUCHI, G.: Botulinal toxins and the problem of nomenclature of simple toxins. *Bact. Reviews*, **35**, 242, (1971).
- LEE, W.H. and RIEMANN, H.: The genetic relatedness of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. *J. gen. Microbiol.*, **64**, 85, (1970).
- MARTINOVICH, D., CARTER, M.E., WOODHOUSE, D.A. and MCCAUSLAND, J.P.: An outbreak of botulism in wild waterfowl in New Zealand. *New Zeal. vet. J.*, **20**, 61, (1972).
- MASON, J.H. and ROBINSON, E.M.: The antigenic components of the toxins of *Cl. botulinum* C and D. *Onderstepoort J. vet. Res.*, **5**, 65, (1935).

- MATVEEV, K.I.: Effect of sublethal doses of botulinum toxin on the organism following multiple administrations. *Zhurnal Mikrobiol.*, **30**, 71, (1959).
- MATVEEV, K.I., NEFEDJEVA, N.P., BULATOVA, T.I. and SOKOLOV, I.S.: Epidemiology of botulism in the U.S.S.R. Proc. 5th. int. Symp. Food Microbiol., **1**, (1967). Chapman and Hall, Ltd., London.
- MCINTOSH, J. and FILDES, P.: A new apparatus for the isolation and cultivation of anaerobic micro-organisms. *Lancet*, **1**, 768, (1916).
- MEYER, K.F. and DUBOVSKY, B.J.: The distribution of the spores of *B. botulinus* in the United States. IV. *J. inf. Dis.*, **31**, 592, (1922<sup>a</sup>).
- MEYER, K.F. and DUBOVSKY, B.J.: The occurrence of the spores of *B. botulinus* in Belgium, Denmark, England, The Netherlands and Switzerland. VI. *J. inf. Dis.*, **31**, 600, (1922<sup>b</sup>).
- MEYER, K.F. and GUNNISON, J.B.: European strains of *Cl. botulinum*. *J. inf. Dis.*, **45**, 96, (1929<sup>a</sup>).
- MEYER, K.F. and GUNNISON, J.B.: Botulism due to home canned Bartlett pears. *J. inf. Dis.*, **45**, 135, (1929<sup>b</sup>).
- MEYER, K.F.: Food poisoning. *New Engl. J. Med.*, **249**, 765, (1953).
- MEYER, K.F.: The status of botulism as a world health problem. *Bull. World Health Org.*, **15**, 281, (1956).
- MINERVIN, S.M.: On the parenteral-enteral method of administering serum in cases of botulism. Proc. 5th. int. Symp. Food Microbiol., 336, (1967). Chapman and Hall, Ltd., London.
- MÖLLER, V. and SCHEIBEL, I.: Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Cl. botulinum*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **48**, 80, (1960).
- MÜLLER, J.: Experimental type C botulism in horses. *Nord. Vet.-Med.*, **14**, (Suppl. 2), 21, (1962).
- MÜLLER, J.: Equine and bovine botulism in Denmark. *Bull. Off. int. Epiz.*, **59**, 1379, (1963).
- MÜLLER, J.: First outbreaks of botulism in wild ducks in Denmark. *Ref. Vet. Bull.*, **38**, 508, (1968). Orig.: *Medlemsbl. danske Dyrlaege-forening*, **50**, 887, (1967<sup>a</sup>).
- MÜLLER, J.: On the occurrence of *Cl. botulinum* type C beta in the livers of slaughter animals in Denmark. *Bull. Off. int. Epiz.*, **67**, 1473, (1967<sup>b</sup>).
- MÜLLER, J.: Pers. mededeling, 1972.
- NILÉHN, P.O. och JOHANNSEN, A.: Ett utbrott av aviär botulism. *Nord. Vet.-Med.*, **17**, 685, (1965).
- OSIECK, E.R. en ROSELAAR, C.S.: Massale vogelsterfte in Zuidelijk Flevoland. *Het Vogeljaar*, **19**, 604, (1971).
- PESCE DE FAGONDE, A. en SARDI, H.F.: Botulismo aviär, primar caso comprobado en la República Argentina. *Bull. Off. int. Epiz.*, **57**, 1479, (1967).
- PFENNINGER, W.: Toxic-immunologic and serologic relationship of *B. botulinus*, type C, and *B. parobotulinus*, "Seddon". *J. inf. Dis.*, **35**, 347, (1924).
- PIGOURY, L., CHABASSOL, C. et STELLMANN, C.: Technique sensible de détection dans l'eau de la toxine botulique C précipitée par le méthanol. *Bull. l'acad. vet. France*, **38**, 319, (1965).
- PRÉVOT, A.R. et BRYGOO, E.R.: Nouvelles recherches sur le botulisme et ses cinq types toxiques. *Ann. Inst. Pasteur*, **85**, 544, (1953).
- PULLAR, E.M.: Enzootic botulism amongst wild birds. *Austr. vet. J.*, **10**, 128, (1934).
- QUORTRUP, E.R. and HOLT, A.L.: Detection of potential botulinum-toxin-producing areas in western duck marshes with suggestions for control. *J. Bact.*, **41**, 363, (1940).
- QUORTRUP, E.R. and SUDHEIMER, R.L.: Some ecological relations of *Pseudomonas aeruginosa* to *Clostridium botulinum* type C. *J. Bact.*, **45**, 551, (1943).

- QUORTRUP, E.R. and GORHAM, J.R.: Susceptibility of furbearing animals to the toxins of *Clostridium botulinum* types, A, B, C and E. *Am. J. vet. Res.*, **10**, 268, (1949).
- REED, L.J. and MUENCH, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493, (1938).
- RICHARDSON, J.H., BREWER, G.L. and HOLDEMAN, L.V.: Type C *Clostridium botulinum* intoxication in domestic ducks in Georgia. *J. Am. vet. med. Assoc.*, **146**, 737, (1965).
- RIEMANN, H. and GENIGEORGIS, C.: Detection of bacterial toxins in foods. *Handbook World vet. Congr.*, **1**, 104, (1971).
- ROBERTS, T.A., KEYMER, I.F., BORLAND, E.D. and SMITH, G.R.: Botulism in birds and mammals in Great Britain. *Vet. Rec.*, **91**, 11, (1972).
- ROBINSON, E.M.: The bacteria of the *Clostridium botulinum* C and D types. 16th. Rep. D.V.S., 107, (1930).
- ROLLINSON, D.H.L., SOLIMAN, K.N. and MANN, K.H.: Deaths in young ducklings associated with infestations of the nasal cavity with leeches. *Vet. Rec.*, **62**, 225, (1950).
- SAKAGUCHI, G., SAKAGUCHI, S. and KONDO, H.: Rapid in vivo and in vitro determinations of *Clostridium botulinum* type E toxin in food. *Handbook World vet. Congr.*, **1**, 108, (1971).
- SCHOONHOVEN VAN BEURDEN, A.J.R.E. en CLARENBURG, A.: Botulisme in Nederland. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, **81**, 6024, (1937).
- SEDDON, H.R.: Bulbar paralysis in cattle due to the action of a toxicogenic *Bacillus*, with a discussion on the relationship of the condition to forage poisoning (botulism). *J. comp. Pathol. Ther.*, **35**, 147, (1922).
- SEGNER, W.P., SCHMIDT, C.F. AND BOLTZ, J.K.: Enrichment, isolation and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* Type C. *Appl. Microbiol.*, **22**, 1017, (1971<sup>a</sup>).
- SEGNER, W.P., SCHMIDT, C.F. and BOLTZ, J.K.: Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity and toxin production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. *Appl. Microbiol.*, **22**, 1025, (1971<sup>b</sup>).
- SEGNER, W.P. and SCHMIDT, C.F.: Heat resistance of spores of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. *Appl. Microbiol.*, **22**, 1030, (1971).
- SHAW, R.M. and SIMPSON, G.S.: *Clostridium botulinum* type C in relation to duck sickness in the province of Alberta. *J. Immunol.*, **32**, 79, (1936).
- SIMMONS, G.C. and TAMMEMAGI, L.: *Cl. botulinum* type D as a cause of bovine botulism in Queensland. *Austr. vet. J.*, **40**, 123, (1964).
- SMITH, L.D., DAVIS, J.W. and LIBKE, K.G.: Experimentally induced botulism in weanling pigs. *Am. J. vet. Res.*, **32**, 1327, (1971).
- STABLEFORTH, A.W. and GALLOWAY, I.A.: *Infectious diseases of animals*. London, Butterworth, 1959.
- STARIN, W.A. and DACK, G.M.: Pathogenicity of *Cl. botulinum*. *J. inf. Dis.*, **36**, 383, (1925).
- STERNE, M. and THOMSON, A.: The isolation and identification of *Clostridia* from pathological conditions of animals. *Bull. Off. int. Epiz.*, **59**, 1487, (1963).
- STEVENSON, J.W. and GIRVIN, G.T.: The effect of botulinum toxin on the bacterial acetylation of choline. 6e Congr. intern. Microbiol., vol. 2, Sezione VII-XVI, 583, (1953).
- SUZUKI, J.B., BOOTH, R., BENEDIK, A. and GRECZ, N.: Pathogenesis of *Clostridium botulinum* type A: Study of in vivo toxin release by implantation of diffusion chambers containing spores, vegetative cells, and free toxin. *Infection and Imm.*, **3**, 659, (1971).

- TANNER, F.W. and TANNER, L.P.: Food-borne infections and intoxications. 2th. ed. The Garrard Press, Champaign, Illinois (1953).
- THEILER, A. and ROBINSON, E.M.: Der Botulismus der Haustiere. Zeitschr. für Infkr., 31, 165, (1927).
- TOWNSEND, C.T.: Comparative study of nontoxic and toxic strains of *Clostridium parabotulinum*. J. inf. Dis., 45, 87, (1929).
- VALLEE, A., KREGUER, A. et EYQUEM, A.: Botulisme canin: Première souche isolée en France. Bull. Acad. Vét., 29, 419, (1956).
- WENT, J.J.: Water als koelmiddel voor electriciteitsopwekking en de daaraan verbonden problemen. H<sub>2</sub>O, 3, 68, (1970).
- WILKINS, S.D. and DUTCHER, R.A.: Limberneck in poultry. J. Am. vet. med. Ass., 57, 653, (1920).
- WILLIAMS, W.: A research project into biology of the duck leech *Theromyzon tessulatum* (O.F. Muller) 1774. Annual report and year book Wagbi (Wildfowlers ass. Great Britain and Ireland), Chester, Grosvenor House, 1970.
- WILSON, G.S. and MILES, A.A.: Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. 4th. ed. Edward Arnold Ltd., London (1957).
- WINSLOW, C.-E.A., BROADHURST, J., BUCHANAN, R.E., KRUMWIEDE, C., ROGERS, L.A. and SMITH, G.H.: The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the committee of the society of American bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. J. Bact., 2, 505, (1917).
- YNDESTAD, M. and LOFTSGÅRD, G.: Susceptibility of mink to *Clostridium botulinum* type C toxin. Acta vet. Scand., 11, 594, (1970).



## REGISTER MET VOGELNAMEN

De term watervogels is bij ornithologen niet exact omschreven.

In dit onderzoek zijn met watervogels aangeduid die vogels die op of bij het water leven, zoals:

Podicipidae	(futen)
Ardeidae	(reigers en roerdompen)
Anatidae	(eenden, ganzen en zwanen)
Rallidae	(bleshoenders en rallen)
Scolopacidae	(snippen, ruiters, wulpen, grutto's en strandlopers)
Recurvirostridae	(kluten)
Laridae	(meeuwen en sterns)

Onderstaand volgt een overzicht van de vogelsoorten die bij dit onderzoek in de tekst zijn genoemd. Hierbij is de volgorde aangehouden van de "Field guide to the birds of Britain and Europe" van R.T. Peterson, G. Mountfort en P.A.D. Hollom ("Vogelgids", Nederlandse vertaling van Mr. J. Kist).

Nederlandse naam	Wetenschappelijke naam
Fuut	<i>Podiceps cristatus</i>
Dodaars	<i>Podiceps ruficollis</i>
Blauwe reiger	<i>Ardea cinerea</i>
Lepelaar	<i>Platalea leucorodia</i>
Wilde eend	<i>Anas platyrhynchos</i>
Wintertaling	<i>Anas crecca</i>
Zomertaling	<i>Anas querquedula</i>
Smient	<i>Anas penelope</i>
Pijlstaarteend	<i>Anas acuta</i>
Slobeend	<i>Spatula clypeata</i>
Mandarijneend	<i>Aix galericulata</i>
Krooneend	<i>Netta rufina</i>
Kuifeend	<i>Aythya fuligula</i>
Eidereend	<i>Somateria molissima</i>
Bergeend	<i>Tadorna tadorna</i>
Grauwe gans	<i>Anser anser</i>
Koigans	<i>Anser albifrons</i>

Nederlandse naam	Wetenschappelijke naam
Rietgans	<i>Anser fabalis</i>
Rotgans	<i>Branta bernicla</i>
Knobbelzwaan	<i>Cygnus olor</i>
Torenvalk	<i>Falco tinnunculus</i>
Fazant	<i>Phasianus colchicus</i>
Waterral	<i>Rallus aquaticus</i>
Porseleinhoen	<i>Porzana porzana</i>
Waterhoen	<i>Gallinula chloropus</i>
Meerkoet	<i>Fulica atra</i>
Scholekster	<i>Haematopus ostralegus</i>
Bontbekplevier	<i>Charadrius hiaticula</i>
Goudplevier	<i>Charadrius apricarius</i>
Watersnip	<i>Capella gallinago</i>
Tureluur	<i>Tringa totanus</i>
Zwarte ruiter	<i>Tringa erythropus</i>
Poelruiter	<i>Tringa stagnatilis</i>
Kluut	<i>Recurvirostra avosetta</i>
Stormmeeuw	<i>Larus canus</i>
Kokmeeuw (= kapmeeuw)	<i>Larus ridibundus</i>
Zwarte stern	<i>Chlidonias niger</i>
Visdiefje	<i>Sterna hirundo</i>
Dwergstern	<i>Sterna albifrons</i>
Houtduif	<i>Columba palumbus</i>
Veldleeuwerik	<i>Alauda arvensis</i>
Zwarte kraai	<i>Corvus corone</i>
Kauw	<i>Corvus monedula</i>
Zanglijster	<i>Turdus ericetorum</i>
Merel	<i>Turdus merula</i>
Graspieper	<i>Anthus pratensis</i>
Spreeuw	<i>Sturnus vulgaris</i>
Vink	<i>Fringilla coelebs</i>
Rietgors	<i>Emberiza schoeniclus</i>
Huisemus	<i>Passer domesticus</i>
Ringmus	<i>Passer montanus</i>
Carolina eend*	<i>Anas sponsa</i>
Indische vlekbeekend*	<i>Anas paucilorhyncha paucilorhyncha</i>
Baikaleend*	<i>Anas formosa</i>
Muskuseend*	<i>Cairina moschata</i>
Nijlgans*	<i>Alopochen aegyptiacus</i>

\* Sierwatervogels, niet in de "Vogelgids" vermeld.

Opmerking: tamme en halfwilde "stadseenden" zijn in dit onderzoek bij de "wilde eenden" gevoegd, omdat het niet mogelijk bleek deze soorten steeds voldoende van elkaar te onderscheiden.

## CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 3 februari 1933 te Wymbritseradeel geboren. Hij behaalde in 1951 te Sneek het eindexamen HBS-B en voltooide op 6 februari 1958 de studie in de diergeneeskunde. Onmiddellijk hierna werd hij opgeroepen voor de vervulling van zijn militaire dienstplicht. Hieruit volgde in 1959 voortijdig ontslag door in dienst te treden van het Gouvernement van het voormalige Nederlands Nieuw-Guinea. Van 1959 tot 1962 was hij gouvernementsveearts voor de residenties West-Nieuw-Guinea en Fak-Fak met als standplaats Manokwari.

Vanaf februari 1963 is hij verbonden aan het Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Rotterdam, waar hij aanvankelijk was betrokken bij het rabies-onderzoek. Daarna heeft hij zich bezig gehouden met diverse microbiologische en pathologisch-diagnostische onderzoeken, in het bijzonder in verband met infectieziekten bij pelsdieren en gezelschapsdieren.