

# De etiologie en epidemiologie van Botulismus bij watervogels in Nederland\*)

## Inleiding

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). 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 *Cl. botulinum*-cultuur. Sindsdien is gebleken dat, op grond van antigene verschillen tussen de gevormde toxinen, meerdere typen van *Cl. botulinum* kunnen worden gedifferentieerd. Tot voor kort onderscheidde men 6 toxinetypen, die met de letters A tot en met F worden aangeduid (Dolman en Murakami, 1961).



DR. J. HAAGSMA  
Centraal Diergeneeskundig  
Instituut, afd. Rotterdam

In Zuid-Amerika lijkt echter in 1970 een nieuw toxinetype te zijn geïsoleerd, waaraan voorlopig de letter G is toegekend (Giménez en Ciccarelli, 1970). Type C wordt nog onderverdeeld in de subtypen C $\alpha$  en C $\beta$ .

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.

Bij watervogels dateert de eerste beschrijving vermoedelijk 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 sinds 1910 regelmatig massale sterfte door botulismus bij watervogels vastgesteld (Kalmbach, 1968). Ook in Australië zijn enkele botulismusuitbraken bij watervogels beschreven (Pullar, 1934; Grubb, 1964; Martinovich et al, 1972).

In Europa zijn pas in de laatste jaren enkele vrij ernstige gevallen van botulismus bij watervogels vastgesteld, namelijk in Zweden (Niléhn en Johannsen, 1965), in

Denemarken (Müller, 1967) en in Engeland (Blandford et al, 1969; Roberts et al, 1972). In Nederland werd massale sterfte door botulismus bij watervogels voor het eerst in 1970 vastgesteld (Haagsma et al, 1971). In 1971 en 1972 trad de ziekte opnieuw op, waarbij problemen, verband houdende met de milieuverontreiniging en de volksgezondheid, aan het licht kwamen. Het onderzoek dat hierop werd ingesteld en in het proefschrift is beschreven, concentreerde zich vooral op de volgende punten:

1. Wat is de verspreiding van *Cl. botulinum* in Nederland?
2. Onder welke omstandigheden vindt de vorming van het botulinumtoxine plaats, zodat uitgebreide 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?

## Materialen en methodieken

Het aantonen van *Cl. botulinum* in op-hopingsculturen en de isolatie in reïncultuur geschiedde met algemeen bij de anaërobe kweek gebruikte voedingsmedia en methodieken. De antitoxische sera waren afkomstig van het 'Institut Pasteur' te Parijs en het 'Center for Disease Control' te Atlanta. Voor de typering van het type C-toxine werd hoofdzakelijk gebruik gemaakt van een eigen voor dit onderzoek bereid antitoxine type C-mink (stam Dinter en Kull), dat bij controle ten aanzien van de toxinen type A, B, E en F specifiek bleek te zijn.

Het botulinumtoxine werd aangetoond volgens voorschriften van het 'Center for Disease Control' te Atlanta. Het bleek dat er soms meerdere typen toxine aanwezig waren; de differentiatie van deze verschillende toxinen is apart beschreven. De concentratie van het toxine bleek soms zeer gering te zijn. Tijdens dit onderzoek werd een nieuwe methodiek ingevoerd, waarbij het toxine geconcentreerd werd met

behulp van centriflo membraanfilters (Amicon).

## Resultaten en conclusies

### 1. Het voorkomen van *Cl. botulinum* in verband met het optreden van botulismus bij watervogels

In dit onderzoek werd 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 botulismus-vrije watergebieden met veel watervogels afkomstig waren, ongeveer gelijk te zijn (tabel I). 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 een serie grondmonsters van de 'Stichting voor Bodemkartering' heeft echter bewezen dat *Cl. botulinum* 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 eenmaal werd aangetoond.

Een vergelijking met de omliggende West-Europese landen is slechts op beperkte schaal mogelijk. In het algemeen kan echter worden geconcludeerd dat de toxinetypen B en E het meest werden gevonden, terwijl de typen A en C soms ook voorkwamen; een beeld dus zoals dat ook in Nederland werd aangetroffen.

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 I). Deze besmetting was 1 jaar, nadat de laatste gevallen van botulismus waren voorgekomen, nog niet merkbaar afgenomen.

TABEL I - Voorkomen van *Cl. botulinum* in de bodem.

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	14,1	0
Botulismuvrije vogelgebieden	141	46 *)	4,2	5,6	21,2	0
Willekeurige bodemmonsters	135	39	0,7	6,6	20,7	0
Stichting voor bodemkartering	203	21	3,9	6,4	0,5	0,5

\*) Autoreferaat van proefschrift, Utrecht 1973.

\*) Drie positieve culturen werden niet getypeerd.

TABEL II - Voorkomen van *Cl. botulinum* bij dieren in gebieden waar botulismus bij watervogels was opgetreden en in botulismusrvrije gebieden.

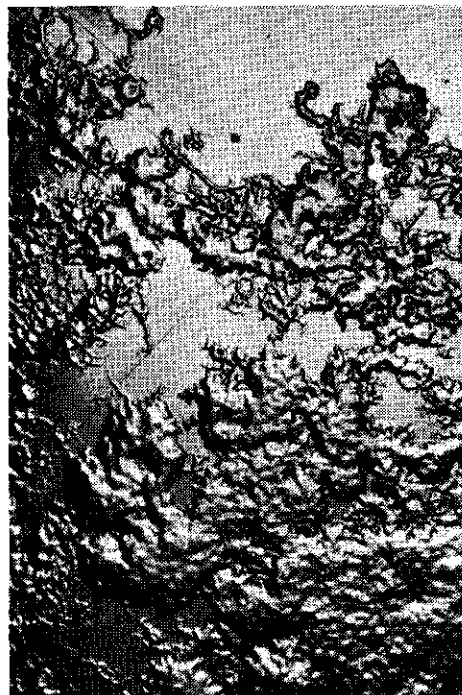
diersoort en herkomst	aantal onderzochte monsters	aantal positieve monsters	toxinetypen		
			C	B	E
<b>A. Gebieden met botulismus</b>					
Vogels	120	78	76	3	1
Zoogdieren	17	4	4	0	0
Vissen	25	4	4	0	0
Diptera	75	28	13	0	22
Mollusca	57	23	22	1	0
	294	137	119 (40,5%)	4 (1,4%)	23 (7,8%)
<b>B. Botulismusrvrije gebieden</b>					
Vogels	76	9	5	3	2
Zoogdieren	16	4	4	0	0
Vissen	3	1	0	0	1
Diptera	214	5	4	0	1
Mollusca	59	10	2	5	2
	368	29	15 (4,1%)	8 (2,2%)	6 (1,6%)

Indien dieren — zowel vertebraten als invertebraten —, werden onderzocht, kwam eenzelfde verdeling te voorschijn. Watervogels, die aan botulismus leden of waren gestorven, bleken ernstig besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C. 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. Enkele malen werd bij een watervogel, die aan botulismus was gestorven, *Cl. botulinum* type B of E in de inwendige organen aangetoond. Vogels die in deze botulismusrvrije gebieden aan andere ziekten waren gestorven, bleken eveneens met *Cl. botulinum* type C te zijn besmet, doch het percentage besmette vogels was beduidend lager. Gezonde vogels uit dezelfde gebieden, die voor dit onderzoek speciaal waren verzameld, bleken in ongeveer dezelfde mate besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C.

Deze besmetting met type C strekte zich uit tot zoogdieren, vissen, in het water levende *Mollusca* en de larvale stadia van zoöphage levende *Insecta* (tabel II). *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 II). Tijdens een uitbraak van botulismus bij watervogels bleken zoöphage vliegen echter niet alleen veelvuldig besmet te zijn met type C, maar zelfs nog iets vaker met type E. In de gebieden waar botulismus niet was

waargenomen bleken dieren slechts in geringe mate besmet te zijn met *Cl. botulinum* type B, C of E (tabel II). 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 onderzoek bleken wilde eenden minstens 14 dagen met type C besmet te kunnen blijven. In *Mollusca*, speciaal de consumptiemossel *Mytilus edulis*, werd type B relatief vaak aangetoond.

Afb. 1 - *Cl. botulinum* type C stam 61884. Kolonietype 2, groei op HIS na een incubatieperiode van 48 uur bij 37 °C. Vergroting 10 x.



Samenvattend kan worden geconcludeerd dat er voor de verspreiding van *Cl. botulinum* tal van mogelijkheden aanwezig zijn; vogels leken 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. In een aantal geselecteerde gevallen werd getracht *Cl. botulinum* in reïncultuur te isoleren. De isolatie uit ernstig verontreinigd materiaal leverde, zoals was te verwachten, grote moeilijkheden op en was alleen met enige kans op succes mogelijk, indien het materiaal voldoende kiemen en sporen van *Cl. botulinum* bevatte. Er werd de meeste aandacht aan de isolatie in reïncultuur van type C geschonken en het gelukte 10 stammen te isoleren. Van type E werden 2 stammen in reïncultuur geïsoleerd en van type A en B elk één. Met deze reïnculturen werden morfologische, culturele, biochemische en serologische onderzoeken verricht, waarbij een vergelijking plaatsvond met enkele buitenlandse stammen. Het bleek niet mogelijk te zijn de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type C-stammen met zekerheid in te delen bij het subtype C<sub>α</sub> of C<sub>β</sub>. De resultaten van het onderzoek wijzen er echter op dat deze type C-stammen alle tot eenzelfde subtype 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 toxinecomponent van subtype C<sub>α</sub>.

De biochemische eigenschappen van de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type B wezen uit dat deze stam WB1971 een nonproteolytische, typische Europese B-stam is, die grote overeenkomst vertoont met de oorspronkelijke stam van Van Ermengem.

De eigenschappen van de in Nederland geïsoleerde *Cl. botulinum* type A-stam en de twee type E-stammen kwamen overeen met de gegevens, die in de literatuur worden vermeld (Dolman en Murakami, 1961).

## 2. Een onderzoek naar de vorming en het voorkomen van het botulinumtoxine type C en naar de gevoeligheid van eenden voor het botulinumtoxine

De gevoeligheid van eenden voor de verschillende botulinumtoxinen bleek sterk te variëren, waarbij voor het type C-toxine de grootste gevoeligheid werd vastgesteld. 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

\* Met LD<sub>50</sub> wordt in de verdere tekst steeds een muis intraperitoneale LD<sub>50</sub> aangeduid.

316.000 LD<sub>50</sub> en voor wilde eenden  
360.000 LD<sub>50</sub>.

Voor botulinumtoxine type A bleek de gevoeligheid geringer te zijn en bedroeg de MLD per os bij Peking eenden 1.280.000 LD<sub>50</sub> per kg lichaamsgewicht. Deze eenden waren voor het type B-toxine vrijwel ongevoelig, terwijl met type E-toxine geen ziekteverschijnselen meer konden worden opgewekt, ook niet na de intramusculaire applicatie van 192.000 LD<sub>50</sub> toxine.

Bij het botulinumtoxine type C bleek na de applicatie van multi-pele subletale doses een accumulatie van het toxine op te treden, zonder dat er sprake was van een sensibilisatie (Behring phenomeen). Dit betekent dat er voor het optreden van botulismus een dagelijkse opname van minstens 25.000 tot 35.000 LD<sub>50</sub> van het meest virulente botulinumtoxine type C nodig is. Daar algemeen wordt aangenomen dat botulismus ook bij watervogels wordt veroorzaakt door de opname van 'preformed' toxine, betekent dit dat het toxine in de natuur in deze hoge concentraties aanwezig moet zijn. Tijdens het optreden van botulismus bij watervogels werden deze hoge concentraties alleen 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. Ook in kadavers van kleine zoogdieren (katten) en vissen (paling) bleek een belangrijke vorming van botulinumtoxine type C mogelijk te zijn. Het type C-toxine werd echter niet aangetroffen in water en slib, dat verzameld was op plaatsen waar zich bij watervogels de grootste sterfte door botulismus had voorgedaan. Poppen en volwassen zoöphage vliegen bleken evenmin een bron van het botulinumtoxine te zijn.

Onder experimentele omstandigheden werd in water en slib uit de botulismusgebieden, die intensief besmet waren met *Cl. botulinum* type C en bij de optimale temperatuur van 30 °C werden geïncubeerd, ook geen botulinumtoxine gevormd. Er bleek pas een geringe productie van type C-toxine tot stand te komen indien de slibmonsters werden verrijkt met dierlijk materiaal in de vorm van lever- en vleespartikels. Er werd daarentegen geen toxineproductie vastgesteld, indien zoetwaterslakken (*Lymnaea truncatula*) werden toegevoegd.

Een belangrijke bevinding was verder dat het botulinumtoxine type C in een milieu waar botulismus was opgetreden, gedurende minstens 9 maanden persisteerde zonder dat een 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. Met dit onderzoek werd aange-

toond dat een gebied, dat tijdens een een botulismusuitbraak door een opeenhoping van toxische kadavers met botulinumtoxine is gecontamineerd, gedurende vele maanden voor fouragerende watervogels een potentieel gevaar kan vormen.

Wilde eenden bleken na het herstel van botulismus geen effectieve immuniteit te bezitten, zelfs niet voor 1 MLD toxine. Er konden evenmin toxineneutraliserende antistoffen worden aangetoond, ook niet na de applicatie van multi-pele subletale doses botulinumtoxine type C.

### 3. De relatie met bepaalde vormen van milieuverontreiniging, in het bijzonder een thermische pollutie van het oppervlaktewater

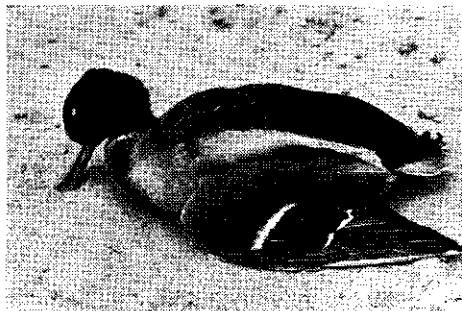
Voor dit onderzoek werden de ziekteuitbraken, die zich in 1970, 1971 en 1972 hebben voorgedaan, zoveel mogelijk vervolgd. Op grond van een globale schatting zijn van 1970 tot 1972 minstens 5.000 tot 10.000 vogels aan botulismus gestorven. Het bleek dat zich bij de individuele diagnostiek van botulismus bij watervogels grote moeilijkheden kunnen voordoen, aangezien in vrij veel gevallen slechts weinig toxine beschikbaar is voor onderzoek. Door gebruik te maken van centriflo membraanfilters, bleek het mogelijk een aantal gevallen te diagnostiseren, die anders niet waren onderkend. In dit onderzoek werd geen diagnostische waarde toegekend aan de isolatie van de bacterie *Cl. botulinum*. Bij gestorven vogels dient het te onderzoeken materiaal te worden geselecteerd, daar onderzoek van minder verse kadavers voor de individuele diagnostiek onbetrouwbaar is in verband met de mogelijkheid dat reeds een postmortale toxineproductie tot stand is gekomen. In 6 gebieden werd het optreden van botulismus aan een uitgebreider onderzoek onderworpen in verband met de bijzondere aspecten die zich hierbij voordeden. Twee botulismusuitbraken traden op gedurende de warmere zomermaanden in

natuurgebieden, namelijk in Hilvarenbeek en in Zuidelijk Flevoland; het voorkomen leek in hoge mate afhankelijk te zijn van de klimatologische omstandigheden, met name van de temperatuur.

In de steden 's-Gravenhage, Amsterdam, Groningen en Leiden/Voorschoten bleken de klimatologische omstandigheden niet alleen van belang te zijn; hier werd een relatie aangetoond met een thermische waterverontreiniging, die door elektriciteitscentrales met ongunstig gesitueerde koelwatercircuits werd veroorzaakt. Een bijzonder gevolg van de thermische pollutie van het oppervlaktewater 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 mede toe te schrijven aan de concentratie van watervogels in het verwarmde kanaalwater, doordat elders, speciaal langs de oevers, geen open water meer aanwezig was.

De invloed van de temperatuur bij de vorming van het botulinumtoxine type C werd experimenteel nagegaan door de productie van het toxine in reïnculturen van verschillende stammen van *Cl. botulinum* type C bij lagere temperaturen te volgen. Bij 10 °C werd geen toxine gevormd, terwijl bij 12,5 °C de toxineproductie slechts gering was: als hoogste concentratie van het toxine werd 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, zodat na 37 dagen een maximumconcentratie van 200.000 MLD per ml werd gevormd. Bij 20 °C verliep de toxineproductie veel sneller, zodat na 9 dagen reeds een concentratie van 200.000 MLD per ml werd aangetoond. Bij 30 °C werd deze concentratie al na 6 dagen bereikt. Bij een toxineconcentratie van 200.000 MLD per ml is een niveau bereikt, waarbij de directe orale opname van een letale dosis van het botulinumtoxine zonder meer mogelijk is. Bij 20 °C werden na 6 dagen reeds concentraties van 20.000 MLD per ml cultuurmedium gevonden, een waarde die hoog genoeg is om door accumulatie van het toxine botulismus te veroorzaken. Een temperatuur van 20 °C is daarom zeker hoog genoeg om sterfte van enige omvang door botulismus bij watervogels te doen optreden. Dit werd bij het verzamelen van de ecologische gegevens tijdens de belangrijke uitbraken van botulismus bevestigd. De temperatuur van het milieu bleek de belangrijkste ecologische factor te zijn.

Afb. 2 - Wilde eend met de verlamningsverschijnselen door botulismus; enkele uren ante mortem.



In de gevallen waarbij de pH of het zuurstofgehalte van een waterpand tijdens een botulismusuitbraak werd bepaald, bleken deze geen opvallende afwijkingen te vertonen.

#### 4. Volksgezondheidsaspecten bij het optreden van botulismus bij watervogels

Een belangrijke bevinding voor de volksgezondheid is geweest dat in Nederland *Cl. botulinum* type A, B en E voorkomen. 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) en Matveev et al (1967) vermelden enkele gevallen, doch men kan stellen dat de diagnose niet in alle gevallen volledig betrouwbaar is geweest. Indien er van wordt uitgegaan dat de mens een zekere, zij het geringe, gevoeligheid heeft voor het type C-toxine, dan is een uitbreiding van het aantal gevallen van botulismus bij watervogels als zeer ongewenst voor de volksgezondheid te beschouwen.

De situatie wordt nog bedenkelijker indien in ogenschouw wordt genomen dat ook de typen A, B of E bleken voor te komen bij 1 op de 25 watervogels, die aan botulismus waren gestorven. Indien de kadavers van watervogels niet tijdig worden vernietigd, zal niet alleen een steeds sterkere besmetting van deze gebieden met *Cl. botulinum* type C plaatsvinden, maar ook met de typen A, B en E. Een verdere verspreiding vanuit deze gebieden bleek op vele manieren mogelijk, o.a. via zoöphage vliegen. Mocht hierbij voor menselijke consumptie bestemd voedsel worden besmet met *Cl. botulinum* dan is dit als hoogst ongewenst te beschouwen: de vorming van het botulinumtoxine is dan immers afhankelijk geworden van de zorg, waarmede dit voedsel verder zal worden behandeld (Foster et al, 1965). 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 bij watervogels in duinpannen, die in gebruik waren voor de drinkwatervoorziening. 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. Tenslotte kan de ernstige infectie van het milieu met *Cl. botulinum* type C ook tot gevolg hebben dat het aantal gevallen van botulismus bij landbouwhuisdieren gaat toenemen. Gevallen van botulismus gedurende de laatste 3 jaren bij runderen, schapen en mestkuijken zouden hierop kunnen duiden. Vooral bij de zeer grote en langdurige sterfte op een mestkuijkenbedrijf was ook de volksgezondheid indirect betrokken.

Evenals bij gevallen van botulismus bij watervogels, bleken ook mestkuijken, die aan botulismus leden of waren gestorven, in de parenchymateuze organen en in de digestietractus besmet te zijn met *Cl. botulinum* type C. Het is dan ook te verwachten dat bij de geslachte mestkuijken, die van het bedrijf afkomstig waren, een beduidend aantal karkassen met *Cl. botulinum* waren besmet en als zodanig de consument zullen hebben bereikt. Deze botulismusuitbraak illustreert wel zeer duidelijk de ongewenste gevolgen van voortgaande besmetting van het leefmilieu van mens en dier met *Cl. botulinum*, zowel met type C als met de andere toxinetypen.

#### Literatuur

- 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).  
 Dolman, C. E. and Murakami, L.: *Clostridium botulinum type F with recent observation on other types*. J. inf. Dis., 109, 107 (1961).  
 Eklund, M. W. and Poysky, F. T.: *Activation of a toxic component of Clostridium botulinum types C and D by trypsin*. Appl. Microbiol., 24, 108 (1972).  
 Foster, E. M., Deffner, J. S., Bott, T. L. and McCoy, E.: *Clostridium botulinum food poisoning*. J. Milk Food Technol., 28, 86 (1965).  
 Giménez, D. F. and Ciccarelli, A. S.: *Another type of Clostridium botulinum*. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 215, 221 (1970).  
 Grubb, W. B.: *Avian botulism in Western Australia*. Austral. J. exp. Biol., 42, 17 (1964).  
 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).  
 Jansen, B. C.: *The toxic antigenic factors produced by Clostridium botulinum types C and D*. Onderstepoort J. vet. Res., 38, 93 (1971).  
 Kalmbach, E. R.: *Type C botulism among wild birds - A historical sketch*. Sport, Fisheries and Wildlife. Report no. 110 (1968).  
 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).  
 Matveev, K. I., Nefedjeva, N. P., Bulatova, T. I. and Sokolov, I. S.: *Epidemiology of botulism in the USSR*. Proc. 5th. int. Symp. Food Microbiol. I. (1967). Chapman and Hall Ltd., London.  
 Meyer, K. F.: *Food poisoning*. New Engl. J. Med., 249, 765, (1953).  
 Müller, J.: *First outbreaks of botulism in wild*

- ducks in Denmark*. Ref. Vet. Bull., 38, 508, (1968). Orig.: Medlemsbl. danske Dyrlaegeforening, 50, 887, (1967).  
 Nilëhn, P.O. och Johannsen, A.: *Ett utbrott av aviär botulism*. Nord. Vet.-Med., 17, 685, (1965).  
 Pullar, E. M.: *Enzootic botulism amongst wild birds*. Austr. vet. J., 10, 128, (1934).  
 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).

