Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Rijksinstituut voor Visserijonderzoek

Botulisme in aquatische ecosystemen en de gevaren daarvan voor de mens - een literatuurstudie

BIBLIOTHEEK
RIJKSINSTITUUT VOOR
VISSERIJONDERZOEK

Mw. M. Brak en P. Hagel

rivo-dlo

RAPPORT 94.012
December 1994

RIVO Rapport 94.012

Botulisme in aquatische ecosystemen en de gevaren daarvan voor de mens - een literatuurstudie

Mw. M. Brak en P. Hagel

December 1994

DLO-Rijksinstituut voor Visserijonderzoek
Haringkade 1
Postbus 68
AB IJmuiden
Telefoon: 02550 64646
Telefax: 02550-64644

De Directie van het RIVO-DLO is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het RIVO-DLO; opdrachtgever vrijwaart het RIVO-DLO van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Prijs: f 26,50 (incl. BTW)

228 8144

Inhoudsopgave:

Samenvatting 3
Inleiding 4
1. Botulisme 5
1.1 Clostridium botulinum 5
1.2 De werking van het toxine 6
2. Bepalingsmethoden voor botulinumtoxinen 7
2.1 De muis bio-assay 7
2.2 De PCR methode 9
2.3 De ELISA methode 9
3. Botulisme bij watervogels 11
3.1 Symptomen van botulisme bij watervogels 11
3.2 Botulisme uitbraken bij watervogels 11
3.3 Het voorkomen van Clostridium botulinum in verband met botulisme bij watervogels 13
3.4 De gevoeligheid van watervogels voor botulinumtoxinen 14
4. Botulisme bij vis 16
4.1 Symptomen van botulisme bij vis 16
4.2 Botulisme uitbraken bij vissen 16
4.3 Het voorkomen van Clostridium botulinum in verband met botulisme bij vis 20
4.4 De gevoeligheid van vis voor botulinumtoxinen 22
5. Maatregelen ter voorkoming van botulisme in aquatische ecosystemen 24
5.1 Waterstaatkundige maatregelen 24
5.2 Maatregelen in viskwekerijen 24
5.3 Het belang van het opruimen van kadavers 26
6. Botulisme bij de mens 28
6.1 Symptomen van botulisme bij de mens 28
6.2 Botulisme uitbraken bij de mens 28
7. Maatregelen ter voorkoming van botulisme bij de mens 32
7.1 Algemene gevaren 32
7.2 Ontwikkeling van botulinumtoxine in vis bij verlengde houdbaarheid 32
7.3 Maatregelen om de groei van Clostridium botulinum en toxinevorming in vis te remmen 34
7.4 Maatregelen om Clostridium botulinum en toxinen in vis te inactiveren 36
Conclusie 38
Referenties 39

Samenvatting

Botulisme is een vergiftiging, veroorzaakt door opname van de toxinen van de bacterie *Clostridium botulinum*. Botulisme in aquatische ecosystemen kan zowel gevaren opleveren voor watervogels en vis als voor de mens.

Botulinumtoxinen kunnen onderverdeeld worden in zeven types: A, B, C, D, E, F en G. Watervogels zijn het meest gevoelig voor type C, terwijl vissen het meest gevoelig zijn voor type C en E. Mensen zijn het meest gevoelig voor type A, B en E.

Clostridium botulinum komt vrijwel overal in Nederland in (water)bodems, oppervlaktewater en slib voor, maar er hebben zich, anders dan in bijvoorbeeld Denemarken, tot nu toe nog geen grootschalige botulisme uitbraken bij vissen voorgedaan. Wel komen regelmatig botulisme uitbraken bij watervogels voor, vooral in de randstad. Om deze botulisme uitbraken te voorkomen dan wel te beperken dienen kadavers van watervogels en vissen zo snel mogelijk verwijderd te worden.

Bij de mens komen door consumptie van voedingsmiddelen vooral vergiftigingen met de botulinumtoxinen type A en B voor, in Amerika vooral type A, in Europa vooral type B. Visserijprodukten leiden tot vergiftigingen met botulinumtoxine type E. Aangezien de botulinumtoxinen door hogere temperaturen geinactiveerd worden, is botulisme alleen denkbaar in gevallen, dat de betrokken voedingsmiddelen vóór consumptie geen effectieve hittebehandeling (zoals bakken, pasturiseren of koken) hebben ondergaan. Heet roken ("stomen") van visserijprodukten is in dit verband onvoldoende.

Om botulisme door consumptie van visserijprodukten te voorkomen is het belangrijk om de ontwikkeling van botulinumtoxinen tijdens bewaren en verwerking te voorkomen.
Bewaren van visserijprodukten bij temperaturen beneden de 3°C, al dan niet in combinatie met deugdelijke conserveringsmethoden, voorkomt de vorming van botulinumtoxinen. Verwerking van visserijprodukten kan daarbij het beste zodanig geschieden, dat al duidelijk waarneembaar bederf optreedt voordat zich aanzienlijke hoeveelheden botulinumtoxinen hebben kunnen vormen.

Inleiding

Botulisme (van het Latijnse botulus = worstje) is een vergiftiging, veroorzaakt door de opname van toxinen (giftige stoffen) die gevormd zijn door de bacterie *Clostridium botulinum* [1]. Botulinumtoxinen worden gevormd tijdens de ontwikkeling van *Clostridium botulinum* tijdens de afbraak van organische materialen. De eiwitachtige botulinumtoxinen zijn de sterkste toxinen die in de natuur bekend zijn. Na opname via voedsel of water (zelden) veroorzaakt het toxine verlammingsverschijnselen, doordat de prikkeloverdracht van de zenuwen naar de spieren geblokkeerd wordt. De vorming van botulinumtoxinen vindt vooral plaats in een eiwitrijke omgeving, bij absolute afwezigheid van zuurstof en bij een minimale temperatuur van ongeveer 13 °C.

Bij botulisme bij de mens kunnen ondermeer vlees- en visprodukten een belangrijke rol spelen. De eerste gevallen van botulisme bij de mens zijn in 1785 in Duitsland beschreven na het eten van met botulinumtoxinen besmette worst ("Wurstkrankheit"). Ernstige gevallen van botulisme komen in Nederland nauwelijks meer voor, maar in Engeland stierven er in 1978 toch nog drie mensen aan.

In 1970 werd botulisme voor het eerst in Nederland ook onder watervogels met zekerheid vastgesteld. Sindsdien is deze ziekte onder watervogels elke zomer opnieuw opgetreden [2].

De besmetting van levende vis met *Clostridium botulinum* is al jaren bekend. Vooral in Scandinavië komt de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* in vis erg vaak voor [3]. In Nederland werd het belang van onderzoek naar botulisme in vis duidelijk, toen tijdens een studie naar botulisme in watervogels bleek dat dode palingen uit het koelcircuit van het gemeentelijk gas- en electriciteitsbedrijf in Den Haag hoge concentraties toxine type C bevatten. Onduidelijk was of het toxine na de dood van de paling gevormd werd als gevolg van de ontwikkeling van *Clostridium botulinum* bij de aanwezige hoge watertemperatuur, of dat de palingen waren overleden als gevolg van vergiftiging met botulinumtoxine type C uit hun voedsel [4].

Het doel van dit rapport is het beschrijven van het voorkomen van botulisme in aquatische ecosystemen. Naast maatregelen die genomen kunnen worden om het optreden van botulisme bij watervogels en vis te voorkomen, wordt ingegaan op de gevaren van botulisme in aquatische ecosystemen voor de mens, met name in verband met de consumptie van visserijprodukten.

1. Botulisme

1.1 Clostridium botulinum

Botulisme wordt veroorzaakt door de opname van toxinen van de bacterie *Clostridium botulinum* en komt bij de mens en vele diersoorten voor. Op basis van de antigene eigenschappen van de toxinen worden zeven toxine producerende types onderscheiden binnen de species *Clostridium botulinum*: A, B, C, D, E, F en G. De *Clostridium botulinum* types A, B, E, F en G produceren slechts één toxine (respectievelijk A, B, E, F en G). De types C en D vormen een combinatie van de toxinen C_1, C_2 en D [5].

Clostridium botulinum is een gram-positieve sporevormer die strikt anaëroob is (alleen bij absolute afwezigheid van zuurstof groeit). Gedurende de groei worden de toxinen geproduceerd die vrijkomen wanneer de bacterie lyseert (uiteenvalt). Voor toxineproductie moet aan een aantal voorwaarden worden voldaan. *Clostridium botulinum* moet zich in een mengflora kunnen handhaven, er moet een voldoende eiwitrijk substraat aanwezig zijn, er mag geen zuurstof aanwezig zijn en de temperatuur en zuurgraad (pH) moeten gunstig zijn. De optimale groeitemperatuur ligt voor de meeste *Clostridium botulinum* stammen tussen 25 °C en 37 °C en de optimale pH tussen 7,0 en 7,6. Bepaalde stammen kunnen bij een temperatuur van 3 °C en een licht zuur milieu ook nog groeien. Alle toxine-producerende types zijn aanwezig in de bodem, in slib en/of in afgestorven vegetatie, waar ze zich gedurende lange tijd in sporenvorm kunnen handhaven. In kadavers van afgestorven dieren kunnen alle types sterk vermeerderen en daarbij grote hoeveelheden toxines produceren [5].

Clostridium botulinum stammen kunnen in vier groepen ingedeeld worden [6]:

Groep 1: Proteolytische (het vermogen om eiwitten af te breken) stammen, dat wil zeggen stammen die een proteolytisch enzym uitscheiden. Hiertoe behoren alle type A stammen en de proteolytische stammen van type B en F. Ze hebben een optimale groeitemperatuur van 37 °C en vormen sporen, die bestand zijn tegen hogere temperaturen.

Groep 2: Niet-proteolytische stammen. Hiertoe behoren alle type E stammen en de niet-proteolytische stammen van type B en F. Ze hebben een optimale groeitemperatuur van 30 °C of minder, maar kunnen ook nog groeien bij koelkasttemperaturen (4-7 °C) en vormen sporen, die niet bestand zijn tegen hogere temperaturen.

Groep 3: Stammen die C_1, C_2 en D kunnen produceren. Hiertoe behoren alle type C en D stammen. Deze stammen zijn over het algemeen niet-proteolytisch. Ze

hebben een optimale groeitemperatuur van 40 °C en vormen sporen met een matige warmteweerstand.

Groep 4: Stammen die wel proteolytisch zijn, maar niet saccharolytisch (het vermogen om saccharose af te breken). Hiertoe behoren alle type G stammen. Ze hebben een optimale groeitemperatuur van 37 °C en vormen sporen met een matige warmteweerstand.

1.2 De werking van het toxine

Alle toxinen van *Clostridium botulinum*, met uitzondering van C_2, hebben een vergelijkbare neurotoxische werking. Het toxine C_2 is geen neurotoxine, maar beïnvloedt de eiwitsynthese [5]. Na opname ontplooien de botulinum neurotoxinen activiteiten, die de prikkeloverdracht van de zenuwen blokkeren, zowel van het willekeurige zenuwstelsel als van het autonome zenuwstelsel [7]. Het proces verloopt in drie stappen :

1: Het toxine molecuul bindt aan de receptoren van de zenuwuiteinden.

2: Het toxinemolecuul, of een deel daarvan, wordt opgenomen in de zenuwcel.

3: Het toxine blokkeert het vrijkomen van acetylcholine in de zenuwcel door een nog onbekend mechanisme [6].

Door blokkade van de prikkeloverdracht ontstaat het beeld van algehele spierzwakte en verlamming [7].

De gevoeligheid van mens en dier is niet voor alle toxinen hetzelfde. Zo zijn runderen zeer gevoelig voor type C en D en soms voor type B [7]. Nertsen zijn alleen gevoelig voor type C [1]. Paarden zijn net als runderen zeer gevoelig voor type C en D en soms voor type B [5]. Kippen en watervogels zijn het meest gevoelig voor type C, terwijl roofvogels en aasetende vogels weinig gevoelig zijn. De meeste roofdieren, zoals katachtigen en honden en alleseters zoals varkens, zijn ongevoelig voor alle toxinetypen [1]. De mens is gevoelig voor type A, B en E [8]. Vis is het meest gevoelig voor type C en E [3].

2. Bepalingsmethoden voor botulinumtoxinen

2.1 De muis bio-assay

De meest gebruikte en tot nu toe meest gevoelige test voor het aantonen en de typering van botulinumtoxinen is de muis bio-assay. Botulinumtoxinen veroorzaken bij muizen een typisch ziektebeeld, die door een specifieke botulinum-antitoxinen geneutraliseerd kunnen worden [9].

In het verleden was de kwantitatieve bepaling van botulinumtoxinen erg moeilijk en verkregen verschillende laboratoria sterk uiteenlopende resultaten. De redenen voor deze variaties bleken vooral te wijten aan de verschillen in gebruikte muisstammen, de condities waaronder de muizen gehouden werden en de gebruikte onderzoek technieken van de onderzoekers. Om meer nauwkeurige resultaten met de muis bio-assay te verkrijgen, werd in 1978 een referentiestandaard voor botulinumtoxine type A ontwikkeld en een standaard bepalingsprocedure voorgesteld [10].

Voor het aantonen van botulinumtoxinen in vast onderzoekingsmateriaal is de bereiding van extracten nodig. Grote hoeveelheden materiaal, zoals organen van grotere dieren, worden in een mixer fijngemalen; kleinere hoeveelheden materiaal, bijvoorbeeld maden, poppen of vliegen, worden in een mortier fijngewreven. Door toevoeging van runderbouillon wordt een 20-50% suspensie verkregen, waaruit na centrifugeren gedurende 15 minuten bij 3000 rpm de grovere bestanddelen verwijderd worden. Complicaties van bacteriële aard worden bij de in te spuiten muizen voorkomen door aan de bovenstaande vloeistof 1000 E penicilline en 1000 E streptomycine per ml toe te voegen. Vloeibaar onderzoekingsmateriaal, zoals onstolbaar gemaakt bloed of bloedserum, water en ophopingsculturen, wordt met eenzelfde hoeveelheid antibiotica behandeld. Na een inwerkingsduur van de antibiotica van 30 minuten bij kamertemperatuur wordt per muis 0,5 ml intraperitoneaal (in de buikholte) ingespoten, waarbij per monster meestal twee muizen worden genomen [9]. Gebruikt worden witte muizen van 18 à 22 gram [10]. Over het algemeen kan het materiaal onverdund ingespoten worden. Soms is een verdunning met runderbouillon nodig om aspecifieke sterfte te voorkomen [9].

De muizen worden na de injectie gedurende vier dagen nauwkeurig geobserveerd. Ziekteverschijnselen ontwikkelen zich meestal 2-24 uur na de injectie. Bij botulisme treden vooral ademhalingsmoeilijkheden op de voorgrond: de ademhalingsspieren worden door het botulinumtoxine verlamd, de frequentie van de ademhaling daalt en bij het voortschrijden van het ziekteproces ontstaat tenslotte bij elke ademhaling een diepe

insnoering in de flanken, de zogenaamde wespetaille. In het eindstadium wordt bij elke inhalatie de mond wijd opengesperd en krampachtig gesloten (luchthappen). Vaak is ook het bewegingsapparaat min of meer verlamd en de muizen sterven tenslotte onder symptomen van ernstige benauwdheid. Bij een langzamer verlopend ziekteproces (48 tot 96 uur) sterven de muizen meestal nadat zij in coma zijn geraakt [9].

De verdere identificatie van botulinumtoxinen vindt plaats middels een neutralisatietest in muizen met behulp van specifieke antitoxinen. Hiertoe worden in afzonderlijke buisjes het te onderzoeken toxische materiaal en verschillende antitoxinen in een bepaalde verhouding bij elkaar gebracht en goed gemengd. Bij de keuze van de antitoxinen kan men zich vaak laten leiden door de resultaten van eerdere onderzoeken. Als contrôle op de aanwezigheid van voldoende toxine, wordt in een puntbuis het te onderzoeken toxische materiaal gemengd met normaal paardeserum, in dezelfde verhouding. Aan alle toxine-serum-mengsels wordt per ml 1000 E penicilline en 1000 E streptomycine toegevoegd. De toxine-antitoxine-mengsels en de buis met het toxine-normaal serum-mengsel worden gedurende 30 minuten bij 20 °C geïncubeerd. Na de incubatieperiode worden muizen intraperitoneaal ingespoten met 0,5 ml van de toxine-antitoxine-mengsels en het toxine-normaal serum-mengsel. De muizen worden gedurende vier dagen geobserveerd. Alleen de muizen, die ingespoten zijn met het mengsel waarvan het specifieke antitoxine het aanwezige botulinumtoxine heeft geneutraliseerd, blijven in leven. Het kan voorkomen dat alle met toxine-antitoxine-mengsels ingespoten muizen sterven onder typische verschijnselen van botulisme. In dit geval kan een mengsel van twee (of meer) botulinumtoxinen aanwezig zijn. De neutralisatietest wordt dan herhaald, waarbij nu aan het toxische materiaal een mengsel van twee (of meer) verschillende antitoxinen in onderlinge gelijke hoeveelheden wordt toegevoegd. Als maat voor de aanwezigheid van de afzonderlijke botulinumtoxinen dienen hierbij toxine-antitoxine-mengsels, waaraan slechts één van de betrokken antitoxinen is toegevoegd [9].

Van alle beschikbare testmethoden is de muis bio-assay tot nu toe de meest gevoelige test voor de bepaling van botulinumtoxinen [11]. Aan deze test zijn echter nadelen verbonden. Door competitie met andere bacteriën is *Clostridium botulinum* in bepaalde gevallen niet in staat om te groeien, waardoor het onderzoek vals negatief kan verlopen. Tevens kan het toxine van *Clostridium botulinum* door proteolytische enzymen van andere bacteriën afgebroken worden waarna de toxine test ook vals negatief verloopt [12]. Verder kost de muis bio-assay zeer veel muizelevens en duurt erg lang (vier dagen) in vergelijking met de hierna besproken bepalingsmethoden. Dit kan problemen geven wanneer bijvoorbeeld een acute explosie van botulisme onder vissen of watervogels optreedt. De muis bio-assay kan ook problemen geven in het geval van een aspecifieke dood. Haagsma [9] geeft een voorbeeld van een combinatie van botulinumtoxine en

tetanustoxine, maar combinaties van botulinumtoxine en andere toxinen zijn ook mogelijk.

2.2 De PCR methode

De PCR (Polymerase Chain Reaction) test is een op DNA-identificatie gebaseerde techniek. De PCR detecteert de genen die de botulinum neurotoxinen coderen [8]. Eerst wordt het DNA vrijgemaakt uit een bacteriekweek van het verdachte materiaal. Dit DNA wordt vervolgens via een groot aantal stappen gezuiverd [13]. Het verkregen gezuiverde DNA wordt vermeerderd ("gecloneerd") via enkele tientallen cycli van een reactie met polymerase (een DNA vormer), in aanwezigheid van een primer die specifiek is voor het toxine-vormend gen van *Clostridium botulinum*. Aangezien de primer specifiek is voor dit gen, wordt bijna alleen het DNA van dit gen vermeerderd. De PCR produkten (de DNA-clonen) worden daarna met behulp van electroforese gescheiden en geïdentificeerd [13].

De PCR methode is betrekkelijk snel, naar verhouding weinig arbeidsintensief, zeer gevoelig en kost geen muizelevens: 10 fg DNA kan nog bepaald worden [13]. De aanwezigheid van *Clostridium botulinum* kan binnen één werkdag vastgesteld worden. De PCR kan in een praktische kit geleverd worden, zodat alleen een gezuiverd DNA extract toegevoegd moet worden. Een groot nadeel aan de PCR test is dat de test alleen de aanwezigheid van de genen van *Clostridium botulinum* bepaald, die de botulinum neurotoxinen coderen en niet de neurotoxinen zelf. Dit kan vals positieve resultaten opleveren, want *Clostridium botulinum* kan in gezonde dieren aanwezig zijn zonder dat er toxinen gevormd worden. Vals negatieve resultaten zijn ook mogelijk, wanneer vlees- en visserijprodukten toxinen bevatten , terwijl *Clostridium botulinum* niet meer aanwezig is [8].

2.3 De ELISA methode

Een andere methode, die eventueel de muis bio-assay zou kunnen vervangen, is de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) methode. Deze test is gebaseerd op een reactie tussen het botulinumtoxine en specifieke antilichamen [14]. In 1992 was er een ELISA ontwikkeld die geen vals-negatieve resultaten opleverde (in vergelijking met de muis bio-assay), maar wel vals-positieve. Deze vals-positieve resultaten waren waarschijnlijk te wijten aan geinactiveerd toxine of toxine concentraties die geen sterfte bij muizen veroorzaakten. Deze ELISA was voor type B en E wel gevoelig genoeg, maar voor type A niet, namelijk 9 muis LD_{50} (1 muis LD_{50} de dosis die bij 50% van de muizen sterfte

veroorzaakt) [15]. Momenteel is er een nieuwe test in de handel, de ELISA-ELCA assay van Elcatech uit Winston-Salem, U.S.A. Geclaimd wordt dat deze test, in ieder geval voor type E, gevoeliger is dan de muis bio-assay [14].

In de eerste fase van deze ELISA gaat het toxine een complex aan met een kip anti-botulinum antilichaam en een paard RVV-XA (Russell's Viper Venom factor X Activating enzyme) gelabeld anti-botulinum antilichaam. Een plaat is gecoat met anti-kip anti-botulinum antilichamen, welke de kip anti-botulinum antilichamen binden. Wanneer het complex van het toxine en de twee antilichamen aan de plaat wordt toegevoegd, wordt het complex dus aan de plaat gebonden. In de tweede fase wordt de plaat gewassen en wordt een mix van stollingsfactoren II, V en X toegevoegd. Wanneer het complex aanwezig is (en dus dat bepaalde toxine), gaat RVV-XA een reactie aan met de stollingsfactoren II, V en X en wordt thrombine gevormd. Daarna wordt alkalische fosfatase gelabeld fibrinogeen toegevoegd (gecoat op polystyreen "pennetjes"). Bij aanwezigheid van thrombine wordt fibrinogeen naar fibrine omgezet. In de laatste fase worden de "pennetjes" gewassen en in een nieuwe plaat gebracht, die alkalische fosfatase substraat bevat. Met behulp van fenolftaleïne-monofosfaat wordt bij de gebruikte alkalische pH de helder roze kleur van fenolftaleïne verkregen wanneer alkalische fosfatase aanwezig is. De roze kleur duidt op een toxinehoeveelheid van minstens 1 MLD (Muis Lethale Dosis) [14].

De voordelen van de ELISA methode zijn dat deze test geen muizelevens kost, de test binnen een paar uur uit te voeren is en de kosten veel lager zijn dan de kosten van de muis bio-assay [15]. Het nadeel is echter, dat deze test er momenteel alleen voor type A, B en E is (de voor de mens gevaarlijke toxinen). Aan de testen voor type F en C wordt nog gewerkt [14]. Bij het ID-DLO (Instituut voor Veehouderij en Diergezondheid-Dienst Landbouwkundig Onderzoek) te Lelystad zal de ELISA-ELCA assay nog uitgetest worden [11].

3. Botulisme bij watervogels

3.1 Symptomen van botulisme bij watervogels

Op grond van experimentele ziektegevallen en van waarnemingen in het veld, blijken de volgende ziekteverschijnselen bij watervogels diagnostische waarde voor botulisme te hebben.
Verlammingsverschijnselen treden sterk op de voorgrond. Als eerste ziekteverschijnsel wordt een verminderd vliegvermogen opgemerkt; bij het voortschrijden van de ziekte kunnen de vogels niet meer vliegen. Er treden daarna ook loopstoornissen op en tenslotte zitten de dieren in elkaar gezakt met afhangende vleugels. Zwembewegingen kunnen eerst nog wel worden gemaakt, maar duiken is al spoedig niet meer mogelijk. De vogels zijn gemakkelijk te vangen en blijken geen geluid meer te kunnen voortbrengen. Er treedt vervolgens ook een verlamming van de halsspieren op (de zogenaamde "limberneck"). Door het verdwijnen van de ooglidreflex ontwikkelt zich veelal een kerato-conjunctivitis (besmettelijke en etterige ontsteking van het bindvlies van het oog). In het eindstadium van de ziekte ontwikkelen zich ernstige ademhalingsstoornissen, waarbij de dieren met krampachtige bewegingen en open snavel trachten voldoende lucht te inhaleren. Soms sterven de dieren in coma, vaak door verdrinking omdat ze hun kop niet meer boven water kunnen houden [9].

Het ziekteverloop is sterk afhankelijk van de opgenomen hoeveelheid toxine. Bij opname van een veelvoud van de letale dosis is het ziekteproces binnen 24 uur afgelopen; bij kleinere hoeveelheden toxine ontwikkelt zich een meer chronisch beeld, dat zich over meerdere dagen kan uitstrekken. Hierbij treedt soms zelfs spontane genezing op [9].

3.2 Botulisme uitbraken bij watervogels

Bij onderzoek onder in het wild levende vogels, blijkt botulisme sinds 1970 een belangrijke oorzaak van sterfte te zijn. Op grond van globale schattingen zijn in Nederland in de periode van 1970 tot 1972 tussen 5.000 en 10.000 vogels aan botulisme gestorven [9].
Botulisme treedt vooral in de zomer op tijdens en na perioden met warm weer. Daarnaast is er ook botulisme vastgesteld in de herfst en winter: op enkele plaatsen veroorzaakt door thermische verontreiniging van het oppervlaktewater, op meer plaatsen veroorzaakt door persisterend toxine dat in de warme zomermaanden gevormd is [16]. Botulisme treedt vooral op in verstedelijkte gebieden, omdat daar veel

sierwateren te vinden zijn die ondiep zijn en stilstaand water bevatten, zodat de watertemperatuur in de zomer snel kan oplopen [2]. Zo blijkt dat in de Randstad (Noord- en Zuid-Holland) het percentage in het wild levende vogels met botulisme het hoogst te zijn (tabel 1) [16].

Tabel 1: Percentage in het wild levende vogels met botulisme in Nederland per provincie [16].

	1975	1976	1977	1978
Zeeland	0	2,4	8,7	5
Zuid-Holland	63,5	49,8	38,4	40
Noord-Holland	6,7	27,2	32,6	30
Utrecht	1,4	1,7	2,6	0,3
Noord-Brabant	5,7	4,9	3,2	1
Limburg	0	0,1	0	12,1
Gelderland	0,3	0,8	0,07	0,4
Flevopolder	13,5	0,8	4,0	0
Overijssel	1,9	2,0	0,7	0
Drente	2,9	6,2	3,6	7,5
Groningen	3,8	4,0	6,0	3,6
Friesland	0,3	0,04	0,1	0,1
Totaal	100	100	100	100
Aantal vogels	10.500	60.600	5.200	1.000

Watervogels krijgen botulisme door het eten van deeltjes van giftige kadavers of van vliegemaden welke van dergelijke kadavers afkomstig zijn. Vliegemaden zijn zelf ongevoelig voor dit gif. Waar watervogels fourageren, nemen zij ook gronddeeltjes op, welke mogelijk besmet zijn met de bacterie *Clostridium botulinum*: zij zijn dan een gezonde drager van *Clostridium botulinum*. Als een dergelijke watervogel om welke reden dan ook dood gaat en in water van 20 °C of hoger ligt, kan zich in zo een besmet kadaver toxine vormen en het begin van een botulisme uitbraak is een feit [16].

Van 1970 tot en met 1972 is een uitgebreid onderzoek gedaan naar botulisme in zes gebieden in verband met de bijzondere aspecten die zich daar voordeden. In twee gebieden, namelijk Hilvarenbeek en Zuidelijk Flevoland, kwamen de botulismegevallen uitsluitend in het warme jaargetijde voor, dus van juni tot september; hier speelden de klimatologische omstandigheden kennelijk een belangrijke rol. Toch moeten er ook andere factoren van invloed zijn geweest: in Hilvarenbeek kwam in 1970 massale sterfte door botulisme voor en in 1971 slechts enkele gevallen, terwijl in Zuidelijk Flevoland in

1971 juist op grote schaal botulisme optrad. De vier andere gebieden die werden onderzocht zijn 's-Gravenhage, Amsterdam, Groningen en Leiden/Voorschoten. Het gaat hier om gevallen van botulisme in grote bevolkingscentra. De grootste sterfte deed zich ook hier weer voor in de warme zomermaanden, maar ook in de herfst en winter ontwikkelde zich botulismegevallen. De verzamelde gegevens wijzen erop dat thermische verontreiniging van het oppervlaktewater door electriciteitsbedrijven hier een belangrijke rol speelt [9].

3.3 Het voorkomen van *Clostridium botulinum* in verband met botulisme bij watervogels

Van 1970 tot en met 1972 heeft Haagsma [9] onderzocht in hoeverre *Clostridium botulinum* in Nederland in slib, water en de bodem voorkwam. In dit onderzoek is aangetoond dat *Clostridium botulinum* type A, B, C en E in Nederland in de bodem voorkomen. De percentages waarin de laatste drie toxinentypen werden gevonden, bleken in willekeurig verzamelde bodemmonsters en in bodemmonsters, die uit botulismevrije watergebieden met veel watervogels afkomstig waren, ongeveer gelijk te zijn (tabel 2). 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 waar type C werd aangetoond eerst na 1970 besmet kunnen zijn geraakt. Onderzoek van grondmonsters heeft echter bewezen dat *Clostridium botulinum* ook voor 1970 (dus voor de ernstige botulisme epidemieën bij watervogels) reeds verspreid in de bodem voorkwam [9]. *Clostridium botulinum* type D en F werden in dit onderzoek niet gevonden, terwijl type A slechts één maal werd aangetoond.

Tabel 2: Voorkomen van *Clostridium botulinum* in de Nederlandse bodem [9].

Herkomst monsters	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieve monsters	Toxinetype in procenten			
			C	B	E	A
Gebieden met botulisme	257	195	71,6	3,9	14,4	0
Botulismevrije vogelgebieden	141	46	4,2	5,6	21,2	0
Willekeurige gebieden	135	39	0,7	6,6	20,7	0
Stiboka	205	21	3,9	6,4	0,5	0,5

In gebieden in Nederland, waar botulisme bij watervogels was opgetreden, werden de typen B en E ongeveer in dezelfde mate aangetroffen. Opmerkelijk was echter dat deze gebieden zeer intensief besmet bleken te zijn met *Clostridium botulinum* type C (tabel 2). Deze besmetting was één jaar nadat de laatste gevallen van botulisme waren voorgekomen, nog niet merkbaar afgenomen [9].

In 1977 tot en met begin 1979 werd er opnieuw onderzoek gedaan naar het vookomen van *Clostridium botulinum* in de bodem. Uit dit onderzoek is gebleken dat *Clostridium botulinum* type C, de veroorzaker van botulisme bij watervogels, in aantallen zijn afgenomen. In enkele gebieden kon *Clostridium botulinum* type C zelfs niet meer worden aangetoond. De besmetting van de onderzochte gebieden met voor de mens pathogene *Clostridium botulinum* type B en E is de laatste jaren echter sterk toegenomen. De oorzaak van deze toename is vooralsnog onduidelijk [17].

3.4 De gevoeligheid van watervogels voor botulinumtoxinen

De meest door botulisme getroffen vogelsoort is de "wilde" eend. In tabel 3 is een overzicht gegeven van de soorten, waarbij in minstens twee jaar botulisme kon worden vastgesteld. Bij de als "rest" in de tabel vermelde vogelsoorten kwamen wel enkele opvallende soorten voor, zoals purperreiger, wulp, fuut, krakeend, tafeleend, oeverloper en eidereend. Evenals in 1977 werden in 1978-1980 geen botulismegevallen vastgesteld bij roofvogels of kraaiachtigen. Dit is naast een geringere gevoeligheid mede toe te schrijven aan de veel lagere toxineconcentraties, die in de natuur aanwezig waren in deze jaren. Dit in tegenstelling tot de warme zomers van 1975 en 1976, toen wel gevallen van botulisme zijn waargenomen bij roofvogels en kraaiachtigen [18]. Tabel 4 laat zien met welk type toxine de vogels besmet waren.

Tabel 3: Meest getroffen vogelsoorten in Nederland [17].

	1978	1979	1980	Totaal
Wilde eend	117	138	100	355
Kokmeeuw	17	13	26	56
Meerkoet	3	15	2	20
Zilvermeeuw	3	1	14	18
Bergeend	-	1	6	7
Knobbelzwaan	5	-	1	6
Kuifeend	-	2	1	3
Wintertaling	-	1	2	3
Rest	15	12	13	40
Totaal	160	183	165	508

Tabel 4: Type botulisme bij getroffen vogelsoorten in Nederland [17].

Jaar	Aantal onderzochte organen	% besmet met type			
		B	C	D	E
1977	1826	2,3	26,2	0,4	0,6
1978	1048	2,1	16,9	0,2	1,3
1979	509	0,4	28,1	1,2	0,2
1980	573	0,3	28,6	0,7	0,5

4. Botulisme bij vis

4.1 Symptomen van botulisme bij vis

Karakteristieke ziekteverschijnselen van botulisme bij vis zijn erg onduidelijk. Waargenomen is dat de vissen traag en verward rondzwemmen, lusteloos zijn en beurtelings gaan drijven en zinken, voordat ze een tijdelijke opleving vertonen. Dit patroon wordt herhaald totdat de vissen sterven [19].

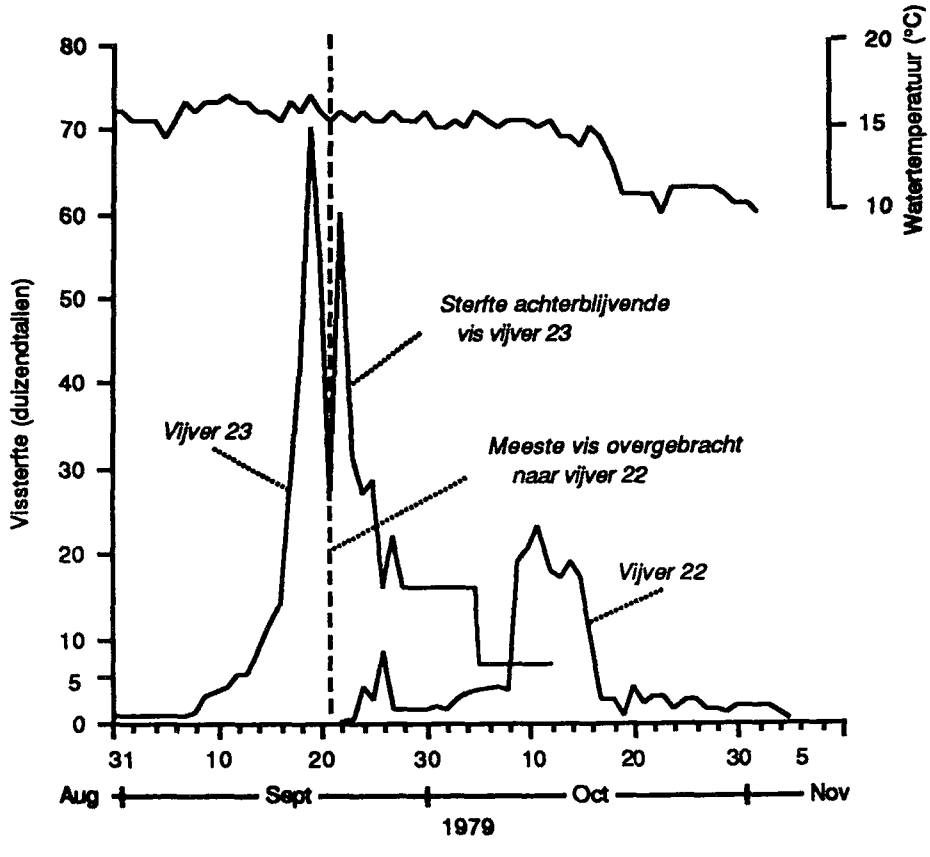
Ook palingen, die recent positief bevonden werden op botulinumtoxine type E door G.J.Tetenburg van het ID-DLO, vertoonden geen duidelijke ziekteverschijnselen. De palingen lagen bewegingloos op de bodem van het aquarium en de oogreflex was verdwenen, maar verdere kenmerken van botulisme waren niet duidelijk zichtbaar [11].

4.2 Botulisme uitbraken bij vissen

De eerste keer dat botulisme als een ziekte bij vissen werd beschreven was in Denemarken. Sinds 1966 traden iedere zomer in vele viskwekerijen in Denemarken ernstige ziekteverschijnselen op [20]. Deze ziekte veroorzaakte vooral onder jonge forellen sterfte en werd door de viskwekers vanwege zijn desastreuse verloop ook wel de "bankrupt disease" genoemd. Pas in 1974 werd duidelijk dat het hier om botulisme type E ging. De ziekte kwam in twee vormen voor, namelijk acute botulisme en chronische botulisme. Acute botulisme ontstond toen forellen van vier forelkwekerijen gevoerd werden met afvalvis, welke bij te hoge temperaturen bewaard was. Eén van de viskwekerijen verloor gedurende een week 2.200 kg vis per dag, terwijl de andere drie "slechts" 1.000 tot 2.000 kg vis per dag verloren gedurende 2 à 3 dagen. Chronisch botulisme ontstond doordat zowel vijversediment als invertebraten besmet waren met *Clostridium botulinum,* met als gevolg dat ook vrijwel alle vissen *Clostridium botulinum* bevatten. Wanneer onder deze omstandigheden vissen bij warm weer sterven en een paar dagen op de bodem van de vijver liggen, bestaat een grote kans op een kettingreactie door opname van het inmiddels gevormde botulinumtoxine door andere vissen. Kannibalisme is immers niet ongewoon onder forellen [20].

In de Verenigde Staten werd voor het eerst in 1979 een botulisme uitbraak onder vissen herkend in een zalmkwekerij [21]. Eind augustus vertoonden de jonge zalmen (*Oncorhynchus kisutch*) in vijver 23 een nerveus en overgevoelig gedrag. Binnen drie dagen steeg de vissterfte in deze vijver van 20 naar 800 vissen per dag. De sterfte van

800 vissen per dag bleef ongeveer constant gedurende een week, waarna de mortaliteit iedere dag verdubbelde tot een maximum verlies van 70.000 vissen per dag. Eind september werd het grootste deel van de overlevende vissen naar vijver 22 overgebracht. Van de achtergebleven vissen was er na drie weken geen enkele meer in leven. De vissterfte bij de overgebrachte vissen in vijver 22 nam af naar 2.000 vissen per dag, doch steeg na twee weken weer naar 22.000 vissen per dag. Deze massale vissterfte duurde vier dagen, waarna de vissterfte afnam tot 2.000 vissen per dag totdat de botulisme uitbraak in november eindigde (figuur 1) [21].



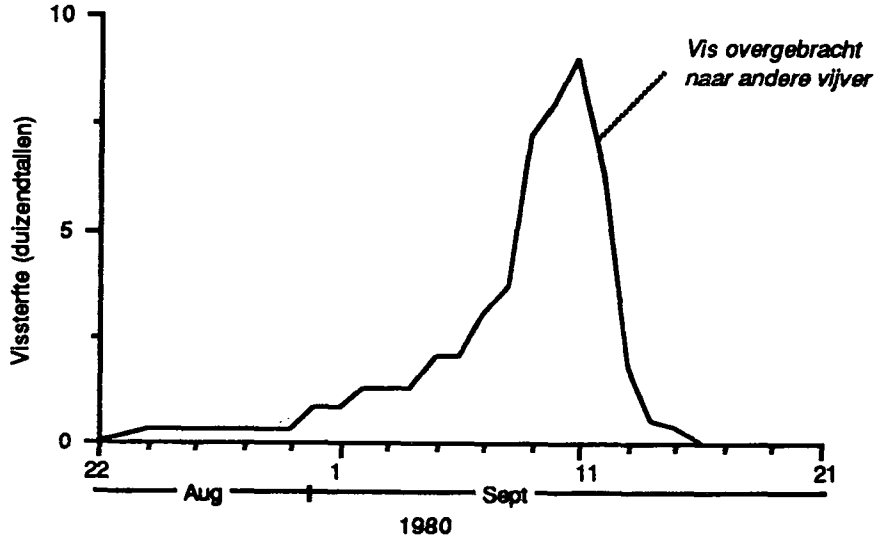
Figuur 1: Vissterfte door een botulisme uitbraak in de Elokomin viskwekerij (U.S.A.) in 1979 [21].

Na de botulisme uitbraak van 1979 werd het sediment van vijver 23 verwijderd en vervangen door nieuw bodemmateriaal [21]. In december 1979 werden 1 miljoen nieuwe jonge zalmen in de vijver geplaatst. Periodiek werden er sediment monsters onderzocht op de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* type E. De hoeveelheid type E organismen steeg van 400 per gram sediment in maart 1980 tot een maximum van 240.000 organismen per gram sediment op 24 september 1980 (tabel 5). De vissterfte bleef van december 1979 tot september 1980 stabiel op een hoeveelheid van minder

dan 20 vissen per dag. In september steeg de vissterfte echter weer (figuur 2) tot een maximum van 9.000 vissen per dag. De vissen werden naar een andere vijver verplaatst met als gevolg dat de vissterfte direkt afnam. Binnen vijf dagen was het verlies aan vis minder dan honderd per dag [21].

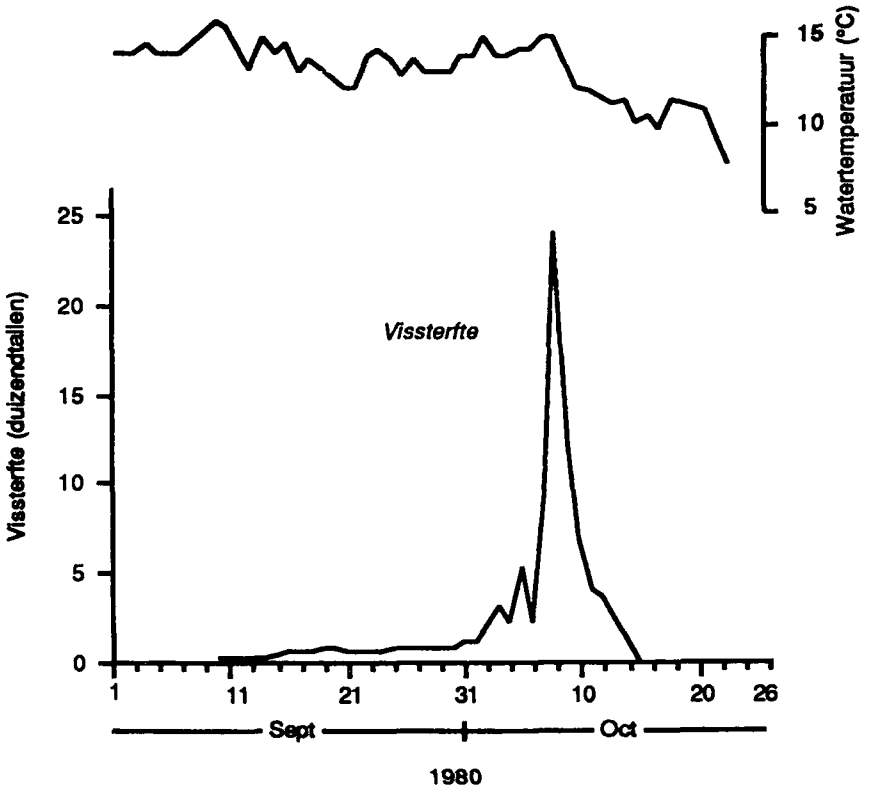
Tabel 5: Aantal *Clostridium botulinum* type E organismen per gram sediment in de Elokomin viskwekerij (U.S.A.) in 1980 [21].

Maand	Watertemperatuur (°C)	Type E organisme per gram sediment
Maart	5,0 - 8,3	400
April	6,1 - 11,8	1.500
Mei	7,2 - 10,6	24.000
July	11,1 - 20,0	15.000
Augustus	6,1 - 18,3	15.000
september	10,6 - 13,3	240.000
september	10,6 - 13,3	240.000
Oktober	6,1 - 14,4	150.000



Figuur 2: Vissterfte door een botulisme uitbraak in de Elokomin viskwekerij (U.S.A.) in 1980 [21].

In 1980 vond een soortgelijke botulisme uitbraak plaats in de Klaskanine viskwekerij in de U.S.A. [21]. In deze viskwekerij hadden zich al eerder besmettelijke ziekten met een onbekende oorzaak onder de vissen voorgedaan, maar pas in 1980 werd bekend dat botulisme de veroorzaker van de vissterfte was, nadat het type E toxine werd aangetoond in de darmen en het vlees van dode vissen. De botulisme uitbraak van 1980 resulteerde in het verlies van 260.000 van de 871.000 jonge zalmen. Het mortaliteitspatroon verliep ongeveer hetzelfde als in de Elokomin kwekerij, met als enig verschil dat deze botulisme uitbraak vanzelf stopte. De vissterfte steeg op 14 september van 20 naar 200 vissen per dag. De volgende twee weken stierven er 800 vissen per dag, waarna de vissterfte steeg tot een maximum van 24.000 vissen op 9 oktober (figuur 3). Na 9 oktober daalde de vissterfte en binnen twee weken was de botulisme uitbraak voorbij. Het sediment van de Klaskanine kwekerij bevatte minder *Clostridium botulinum* type E organismen dan de Elokomin vijver, namelijk 2.400 tot 11.000 organismen per gram sediment. Het sediment van de Klaskanine viskwekerij bleek ook andere bacteriën te bevatten, die mogelijk het type E toxine hebben kunnen inactiveren [21].

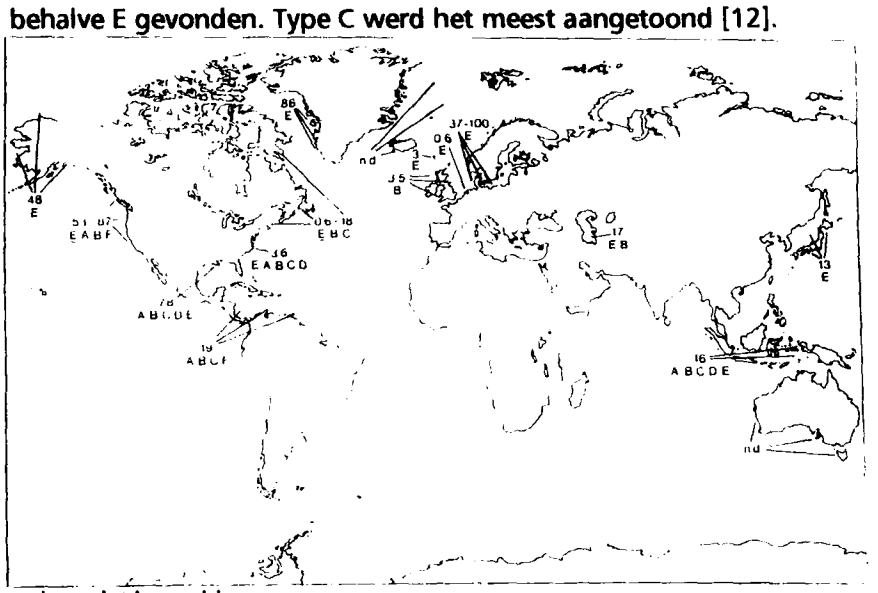


Figuur 3: Vissterfte door een botulisme uitbraak in de Klaskanine viskwekerij (U.S.A.) in 1980 [21].

In augustus 1980 begon een botulisme uitbraak in Groot-Brittanië onder regenboogforellen (*Salmo gairdneri* Richardson) met enkele dode vissen in één vijver [19]. Binnen een paar weken waren vijf vijvers besmet en stierven de vissen in aantallen van 30 tot 40 vissen per vijver per dag. In eerste instantie werd deze vissterfte door het kwekerij personeel toegeschreven aan furunculosis (bloedvinzweren), maar onderzoek wees uit dat dit de oorzaak van de vissterfte niet kon zijn. De vissterfte duurde voort tot de kwekerij eigenaar eind oktober de mogelijkheid van botulisme liet onderzoeken. De definitieve diagnose van botulisme werd gesteld toen toxine type E in het bloed en in de ingewanden van zieke vissen kon worden aangetoond [19].

4.3 Het voorkomen van *Clostridium botulinum* in verband met botulisme bij vis

De geografische spreiding van *Clostridium botulinum* in marine sedimenten is uitgebreid onderzocht [12]. Type E blijkt het meest voorkomende *Clostridium botulinum* type is in sub-noordelijke en gematigde klimaat zones te zijn. Scandinavische kustwateren zijn, tot nu toe, geïdentificeerd als gebieden met de hoogste concentraties type E sporen, hoewel in de kustwateren van Groenland, Noord-Amerika en Japan en in de Kaspische Zee ook hoge concentraties type E sporen zijn gevonden. Daarentegen is *Clostridium botulinum* type E vrijwel afwezig in marine sedimenten van Britse kustwateren, de Faroer eilanden, IJsland, de noordelijke visgebieden en tropische wateren (figuur 4). *Clostridium botulinum* komt echter wel voor in enkele van deze gebieden. Ongeveer 3,5% van de sedimentmonsters van de Britse kustwateren bevatte type B sporen en in sedimenten van tropische wateren werden praktisch alle types behalve E gevonden. Type C werd het meest aangetoond [12].

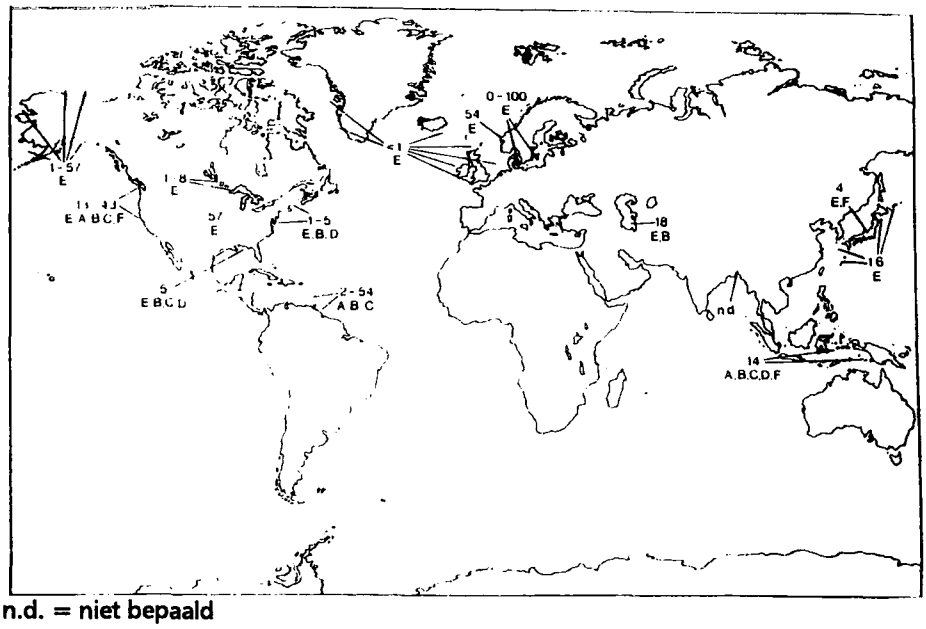


n.d. = niet bepaald

Figuur 4: Voorkomen (%) *Clostridium botulinum* in marine sedimenten [12].

Zoetwater sedimenten zijn vooral in de grote meren in de U.S.A. veel onderzocht [12]. Type E werd in een hoge mate (68-98% van de monsters) in sedimenten van Green Bay en Northern Lake Michigan aangetoond en in mindere mate (10-50%) in oevermonsters van deze meren en rivieren die in de meren uitmonden. In sedimentmonsters van andere meren en rivieren was de hoeveelheid *Clostridium botulinum* type E beduidend lager (4-39%). In Japan werd type E gevonden in 169 (18,8%) van de 900 sedimentmonsters van 15 meren en 15 rivieren. In sedimentmonsters uit Groot-Brittanië en Ierland komt *Clostridium botulinum* veel voor (35-98%). Type B werd het meest geïdentificeerd, terwijl type E slechts in 15 (2,7%) van de 554 monsters aanwezig was. In Scandinavië vond Johannsen [uit 12] in 1963 in 8 (44%) van de 18 monsters uit vijvers en riviertjes *Clostridium botulinum* type E, terwijl Huss [12] in 1980 dit organisme in alle van de 55 monsters uit natuurlijke meren en in 20 van de 32 monsters uit kunstmatige meren aantoonde. Een zeer hoge mate (tot 100%) van type E besmetting werd door Huss gevonden in vijversediment van forelkwekerijen [12].

Op enkele uitzonderingen na volgt de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* in vis het patroon van de spreiding van *Clostridium botulinum* in het sediment (figuur 5) [12]. Zo werd er een zeer hoge besmetting van vis aangetoond in de Scandinavische kustwateren en de Kaspische Zee. Type E komt ook vaak voor in vis uit de kustwateren van Noord-Amerika en Japan, terwijl andere typen *Clostridium botulinum*, vooral type C, worden gevonden in vissen uit warme wateren. Type E wordt niet gevonden in vissen uit de niet-kustwateren van de Noordzee en de Noord-Atlantische oceaan. Het is echter wel opmerkelijk dat Cann in 1967 een hoge mate van besmetting met type E van vis in de zee bij Noorwegen vond, terwijl in het bodemsediment van hetzelfde gebied geen type E aangetoond kon worden [12].



n.d. = niet bepaald

Figuur 5: Voorkomen (%) van *Clostridium botulinum* in vis [12].

In de U.S.A. werd een hoge mate (tot 57%) van besmetting met type E gevonden in zoetwatervis uit de Green Bay en het noordelijke gedeelte van Lake Michigan, maar in de andere delen van Lake Michigan bevatte slechts 1% van de vissen de bacterie [12]. Ook in Japan kwam in weinig van de wilde zoetwatervissen *Clostridium botulinum* voor, terwijl type E in 71 vissen uit de Deense meren al helemaal niet aangetoond kon worden. Een hoge graad van besmetting (7-82%) met *Clostridium botulinum* werd daarentegen aangetoond in gekweekte zoetwater forellen in Denemarken, Groot-Brittanië, Noorwegen en Finland. De bacterie werd echter weer niet gevonden in 40 darmmonsters van gekweekte forellen van de Faroer eilanden. Deze gegevens tonen aan dat het zeer moeilijk is om vis op het noordelijk halfrond te kweken zonder het risico dat deze vis besmet is met *Clostridium botulinum* [12]

4.4 De gevoeligheid van vis voor botulinumtoxinen

In de jaren 70 heeft een uitgebreid onderzoek plaatsgevonden naar de gevoeligheid van paling (*Anquilla anquilla*) en karpers (*Cyprinus carpio*) voor botulinumtoxine type C en E door Haagsma [4]. Dit onderzoek toonde aan dat paling, ondanks het feit dat het een aaseter is, wel degelijk gevoelig is voor toxine type E wanneer dit toxine oraal aan de paling wordt toegediend. De paling is overigens niet erg gevoelig voor het toxine: een orale toediening van 4.400 muis LD_{50} voor een paling tussen de 140 en 180 gram is minimaal nodig om de paling te doen sterven, dit komt overeen met een dosis van 27.500 muis LD_{50} per kilogram lichaamsgewicht. De palingen waren ongevoelig voor het toxine type C. Karpers zijn gevoelig voor zowel het botulinumtoxine type E als het type C. De gevoeligheid van karpers voor toxine type E is oraal en intraperitoneaal onderzocht. De karpers waren gevoeliger voor het toxine als het oraal toegediend werd: voor orale toediening is 236 muis LD_{50} per kilogram lichaamsgewicht de minimale dosis, voor intraperitoneale toediening is 638 muis LD_{50} per kilogram lichaamsgewicht de minimale dosis om de karper te doen sterven. Karpers zijn dus aanzienlijk gevoeliger voor toxine type E dan palingen. In tegenstelling tot palingen zijn karpers ook gevoelig voor botulinumtoxine type C. De gevoeligheid van karpers voor dit toxine werd alleen oraal onderzocht. De gevoeligheid van karpers voor het botulinumtoxine type C is niet groot: een dosis van 457.000 muis LD_{50} per kilogram lichaamsgewicht is nodig om een karper te doen sterven [4].

De gevoeligheid van palingen voor het toxine type E is eigenlijk in strijd met de verwachting. Paling is een aaseter en zou dus niet gevoelig moeten zijn voor één van de botulinumtoxinen, wil de soort overleven [22]. Momenteel wordt de gevoeligheid van palingen voor botulinumtoxinen opnieuw getest in het ID-DLO in Lelystad[11]. De testen

hebben betrekking op de gevoeligheid van palingen voor de toxinen type C, D en E. Er zijn drie groepen palingen: een groep palingen waarbij het toxine éénmaal oraal wordt toegediend, een groep palingen waarbij het toxine vijfmaal oraal wordt toegediend en een groep palingen waarbij het toxine éénmaal intraperitoneaal wordt toegediend. Met dit onderzoek is inmiddels bevestigd dat palingen gevoelig zijn voor het botulinumtoxine type E, maar verdere resultaten zijn nog niet beschikbaar [11].

5. Maatregelen ter voorkoming van botulisme in aquatische ecosystemen

5.1 Waterstaatkundige maatregelen

Hoge watertemperaturen zullen zich gemakkelijk ontwikkelen in ondiep, stilstaand water. Het bevorderen van een goede doorstroming zal dus altijd in de goede richting werken, maar dit is niet in alle gebieden te realiseren. Daarnaast kan men gaan manipuleren met het waterpeil en staat men voor de keuze het waterpeil te laten stijgen dan wel dalen [2].

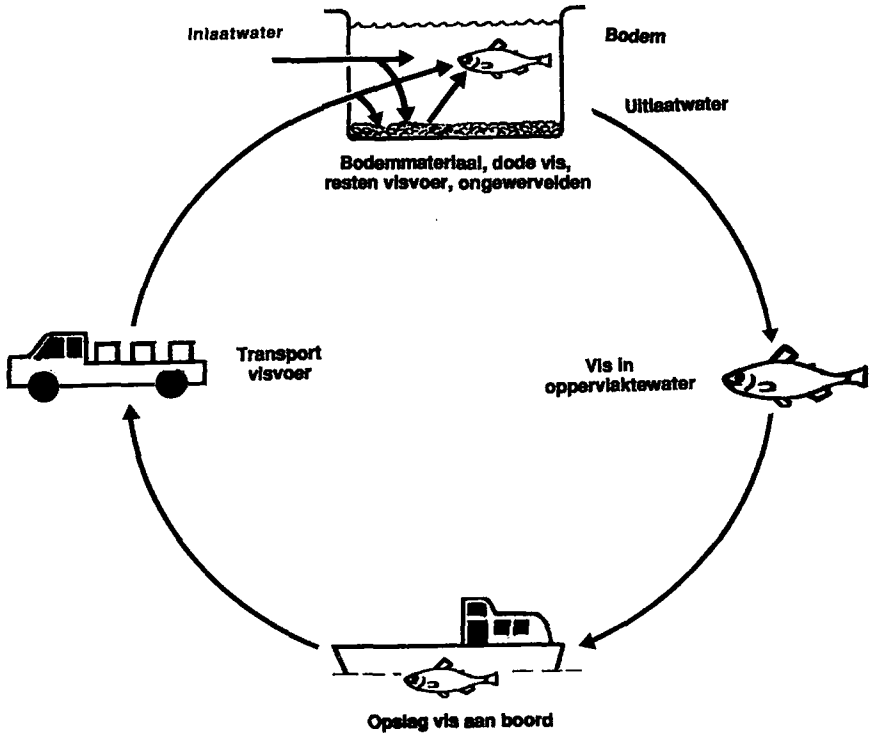
Het verhogen van het waterpeil lijkt in eerste instantie logischer, want de temperatuur zal in dieper water minder snel stijgen. Bovendien zal het giftige materiaal, dat zich in de bovenste lagen van het bodemsediment bevindt, minder bereikbaar worden voor de meeste watervogels. Dit gunstige effect zal echter tijdelijk zijn wanneer door de verhoging van het waterpeil weer nieuwe ondiepe waterpartijen in de oeverzones ontstaan. Het is helaas zo dat de watergebieden die voor watervogels het meest aantrekkelijke biotoop zijn, tegelijkertijd het meeste gevaar opleveren voor het optreden van botulisme.

Verlaging van het waterpeil zal als bestrijdingsmaatregel van botulisme minder snel in aanmerking komen. Alleen als ondiepe oeverzones droogvallen en er verder uitsluitend diep water overblijft is een beperkte verlaging van het waterpeil te overwegen. In zeer extreme gevallen van massale sterfte door botulisme kan het waterpeil zo sterk verlaagd worden dat het hele terrein droogvalt en de watervogels naar een ander gebied trekken. De vraag rijst dan hoe lang het waterpeil laag moet blijven. Zodra het koele herfstweer haar intrede heeft gedaan zou de verlaging van het waterpeil in principe opgeheven kunnen worden. Moeilijkheden zijn echter te verwachten wanneer zich vóór de waterhuishoudkundige ingreep reeds veel botulismegevallen hebben voorgedaan, omdat botulinumtoxinen in kadaverresten zeer persistent is. Dit probleem doet zich bijvoorbeeld voor in de Oostvaardersplassen [2].

5.2 Maatregelen in viskwekerijen

Vissen in viskwekerijen kunnen op verschillende manieren met *Clostridium botulinum* en/of botulinumtoxinen besmet worden, namelijk via voedsel, de bodem van de kweekvijver, ongewervelde dieren die in en op de bodem van de kweekvijver leven, het water en kadavers van door botulisme gestorven vissen (figuur 6). Huss, Pedersen en

Cann hebben onderzoek gedaan naar de maatregelen die genomen moeten worden om deze vormen van besmetting te voorkomen [3].



Figuur 6: Bronnen van botulisme in viskwekerijen [3].

Voedselcontrôle in viskwekerijen is van groot belang. Forellen worden vaak gevoerd met fijngehakte vis-afval dat besmet kan zijn met *Clostridium botulinum,* afhankelijk van waar de oorspronkelijke vis gevangen is. Wanneer deze afvalvis niet goed bewaard wordt, kan vermeerdering van *Clostridium botulinum* en toxinevorming plaatsvinden. Tot ongeveer 1974 werd de als forellenvoer gevangen vis niet of nauwelijks gekoeld bewaard [3].

De behandeling van met *Clostridium botulinum* besmette vijverbodems is op twee manieren onderzocht. De eerste behandeling was een hitte behandeling; direkte hitte van een tuinbouwvlammenwerper werd 2 minuten lang op de bodem van een lege vijver toegepast. De temperatuur van de vijverbodem steeg tot 70 °C op 1 cm diepte. Er werden voor en na de hittebehandeling monsters van de vijverbodem genomen. Het onderzoek wees uit dat geen reductie van de hoeveelheid *Clostridium botulinum* had plaatsgevonden. De tweede behandeling was een "ongebluste" kalk behandeling: de vijverbodem werd behandeld met 1,6 kg van deze kalk (CaO) per m^2, die in de bovenste lagen van de vijverbodem geharkt werd. Er werd voor, en 18 uur en 7 dagen na de kalkbehandeling bodemmateriaal verzameld. Na 18 uur was er geen verandering in de

hoeveelheid *Clostridium botulinum* waarneembaar, maar na 7 dagen kon *Clostridium botulinum* niet meer aangetoond worden. De behandeling met "ongebluste" kalk (CaO) is dus een bruikbare methode om *Clostridium botulinum* te vernietigen. De behandeling zou een paar keer per jaar toegepast moeten worden om een toename van in de hoeveelheden *Clostridium botulinum* in vijverbodems te voorkomen [23].

Een ander belangrijk punt is een goede hygiëne. Dit betekent dat het aangeleverde water van een goede kwaliteit moet zijn en, wanneer een viskwekerij gebruik maakt van langsstromend water van een rivier of beekje, het gebruik van recirculerend kwekerijwater zoveel mogelijk vermeden wordt. Ook moet vissenvoer dat niet direkt gegeten wordt voor zover dat mogelijk is verwijderd worden [23].

5.3 Het belang van het opruimen van kadavers

De belangrijkste maatregel om botulisme uitbraken onder diverse omstandigheden te bestrijden is het opruimen van de kadavers van dode dieren. Dit geldt niet alleen voor watervogels en vissen, maar ook voor dieren zoals katten, ratten, hazen en andere vogels. Zo kunnen runderen besmet raken met botulinumtoxine type C en D wanneer strooisel afkomstig van pluimveebedrijven als bodembedekking in stallen van runderen wordt gebruikt. In het strooisel kunnen restanten van met type C of D besmette pluimveekadavers achtergebleven zijn, met daarin hoge concentraties botulinumtoxine. Het strooisel bevat ook meelresten en runderen nemen met dit meel tevens de kadaverresten op. Het strooisel kan ook gebruikt worden als bemesting op het land. Runderen nemen dan bij het grazen toxische resten op of komen later met het toxine in aanraking als het gras is verwerkt tot hooi of kuilgras. Ook resten van kadavers van bijvoorbeeld watervogels, ratten of katten kunnen als ze op het grasland terecht komen botulisme bij runderen veroorzaken [7].

De invloed van kadavers in het water op gezonde watervogels is door T.M. Reed en T.E. Rocke onderzocht [24]. Dit onderzoek werd uitgevoerd door in twee plassen een aantal gebieden te omheinen en af te sluiten met netten. In ieder gebied werden dertig eenden geplaatst. Het onderzoek was in drie testen opgesplitst: een gebied waarin kadavers van door botulisme gestorven watervogels werden geplaatst, een gebied waarin kadavers van gedode gezonde watervogels werden geplaatst en een gebied die als contrôle diende, dus zonder kadavers. Het onderzoek wees uit dat sterfte onder de eenden 1-4 dagen na het verschijnen van maden op de kadavers begon. Het maakte weinig uit of de kadavers afkomstig waren van door botulisme gestorven vogels of van gedode gezonde vogels: in beide gebieden was de kans op sterfte van de watervogels 4,5 maal groter dan

in het contrôle gebied. In het contrôlegebied kwam ook vogelsterfte door botulisme voor, terwijl er geen botulisme uitbraken onder buiten het controlegebied in het wild levende watervogels voorkwamen. Deze sterfte werd toegeschreven aan het feit dat het contrôlegebied te dicht bij de testgebieden lag en dat de ziekte overgebracht was door maden en andere invertebraten [24].

Ook het opruimen van kadavers in viskwekerijen is zeer belangrijk, omdat daar veel vissen in een relatief kleine ruimte leven. Als een vis sterft aan botulisme of een andere oorzaak terwijl de vis besmet is met *Clostridium botulinum,* en gezonde vissen komen in aanraking met de kadaverresten, dan kan dit bij hogere watertemperaturen een ware explosie van vissterfte veroorzaken [25].

6. Botulisme bij de mens

6.1 Symptomen van botulisme bij de mens

Wanneer mensen het toxine opnemen (minder dan 1 µg kan voor een volwassene al dodelijk zijn) beginnen de verschijnselen één tot drie dagen na de consumptie van het toxine bevattend voedsel [12]. De belangrijkste verschijnselen zijn: zwakte, dubbelzien, spraak- en slikmoeilijkheden en verlammingsverschijnselen. Er is geen koorts. Meestal is er hardnekkige obstipatie. De dood treedt na zeven tot tien dagen in door ademhalingsverlamming of hartstilstand. In lichtere gevallen is herstel langzaam en bepaalde verlammingen, vooral van de oogspieren, kunnen maanden blijven bestaan. Behandeling bij de mens geschiedt met injecties van bij paarden bereide antitoxinen.

6.2 Botulisme uitbraken bij de mens

Botulisme bij de mens wordt meestal veroorzaakt door botulinumtoxine type A, B of E. In Amerika en Australië komt vooral het type A voor, in Europa vooral het type B. In Canada, Denemarken, Japan en Noorwegen overweegt het botulinumtoxine type E. In sommige gevallen veroorzaakt ook type F botulisme bij de mens. Het land waar de meeste botulisme uitbraken gerapporteerd worden is Polen, (tabel 6). Het hoogste sterfte percentage bij botulisme blijkt voor te komen in Argentinië: 36% (tabel 7). In de meeste landen ligt dit sterfte percentage echter beneden de 10% (tabellen 7 en 8). Botulisme uitbraken bij mensen komen in Europa en in Nederland gelukkig niet vaak voor. Van 1977 tot 1989 werden in Nederland slechts twee gevallen gemeld, namelijk in 1981 en in 1987 (tabel 8). Deze uitbraken waren het gevolg van het eten van met botulinumtoxine type B vergiftigde worst [6]. In Engeland stierven er echter in 1978 nog drie mensen aan botulisme (tabel 8).

De meeste gevallen van botulisme worden veroorzaakt door het eten van bedorven vleesprodukten. Daarnaast spelen ook vis en groente/fruit nog een belangrijke rol. Een bekende oorzaak van botulisme bij de mens is het verduurzamen van levensmiddelen in het huishouden, b.v. door het zogenaamde wecken. Botulisme uitbraken bij de mens worden daardoor in de meeste gevallen veroorzaakt door niet-commerciële voedingsmiddelen, die thuis niet goed zijn bereid of bij te hoge temperaturen zijn bewaard [6].

Tabel 6: Botulisme veroorzakende typen *Clostridium botulinum* [6].

Land	Aantal botulisme uitbraken	% besmet met type			
		A	B	E	Diversen
USA	252	61	21	17	0,4 (F)
Canada	76	4	8	88	0
Argentinië	13	77	8	0	15 (A+F)
Polen	830	3	94	3	0
Tsjecho-Slowakije	6	17	83	0	0
Hongarije	31	0	100	0	0
Duitsland			>90		
België	11	0	55	9	36 (B+C)
Frankrijk	171	0	97	2	0,6 (A+B)
Italië	15	20	60	7	13 (A+B)
Spanje	36	0	92	3	6 (A+B)
Portugal	18	0	100	0	0
Denemarken	11	0	0	100	0
Noorwegen	19	0	47	47	0
Japan	97	2	2	96	0

Visserijprodukten leiden voor zover bekend uitsluitend tot vergiftigingen met botulinumtoxine type E. In Denemarken werd in de periode 1951-1984 bijna 80% van de Deense botulisme uitbraken veroorzaakt door toxine type E [6]. Al deze botulisme uitbraken werden veroorzaakt door het eten van met type E vergiftigde vis. In de periode van 1984-1989 waren er echter botulisme uitbraken in Denemarken als gevolg van het eten van vergiftigd vlees (zeehondenvlees en schapevlees), terwijl het verantwoordelijke toxine ook hier type E was. De besmetting van dit vlees met type E werd hier echter veroorzaakt doordat de mensen, die de dieren geslacht hadden, ook werkzaam waren in de visserij industrie en zo het vlees met sporen van type E besmet hadden [6].

Ook in Japan, waar veel visserijprodukten zonder voorafgaande hittebehandeling worden gegeten, wordt botulisme in bijna alle gevallen veroorzaakt door botulinumtoxine type E. Waarom ook in Canada het overgrote deel van de botulisme uitbraken wordt veroorzaakt door botulinumtoxine type E is onduidelijk. Mogelijk speelt de traditionele (langdurige) wijze van roken van vis hier een rol.

Tabel 7: **Botulisme uitbraken per land [6].**

Land	Periode	Aantal botulisme uitbraken	Aantal gevallen	% dodelijk
USA	1971-89	272	597	11
Alaska	1971-89	51	122	7
Canada	1971-89	79	202	14
Argeninië	1980-89	16	36	36
Polen	1984-87	1301	1791	3
Tsjecho-Slowakije	1979-84	17	20	0
Hongarije	1985-89	31	57	2
Yugoslavië	1984-89	12	51	0
Duitsland	1984-89	96	206	5
België	1982-89	11	25	4
Frankrijk	1978-89	175	304	2
Italië	1979-87		310	0
Spanje	1969-88	63	198	6
Portugal	1970-89	24	80	0
Denemarken	1984-89	11	16	13
Noorwegen	1961-90	19	42	7
Japan	1951-87	97	479	23

Tabel 8: Landen met weinig tot geen botulisme uitbraken [6].

Land	Periode	Aantal botulisme uitbraken	Aantal gevallen	% Dodelijke	Besmet met type
Mexico	1975-89	2	4	75	A
Brazilië	1958-90	4	19	47	A
Oostenrijk	1980-89	0	0	0	
Zwitserland	1973-89	5	57	0	A,B
Bulgarije	1987-88	1	6	0	
Griekenland	1975-89	0	0	0	
Nederland	1977-89	2	3	0	B
Zweden	1969-89	6	6	0	A,E
Finland	1975-87	1	2	0	
IJsland	1981-89	2	7	0	B
Ierland	1981-84	0	0	0	
Engeland	1955-89	3	33	9	A,B,E
Australië	1942-89	5	53	17	A
New Zeeland	-89	1	2	50	A

Tabel 9: **Bij botulisme uitbraken betrokken voedselsoorten [6].**

Land	Uitbraken waarbij voedselsoort bekend	Voedselsoort (%)				Voedselbron %	
		Vlees	Vis	Groente en Fruit	Diversen	Huis-houdelijk	Commer-cieël
USA	222	16	17	59	0	92	8
Canada	75	72	20	8	0	96	4
Argentinië	14	29	21	36	14	79	21
Polen	1500	83	12	5	0	75	25
Tsjecho-Slovakije	14	72	7	14	7	100	0
Hongarije	28	89	0	4	7	100	0
Joegoeslavië	8	100	0	0	0	100	0
Duitsland	86	69	17	13	1	91	9
Nederland	2	100	0	0	0	-	-
België	8	75	12	12	0	62	38
Frankrijk	123	89	3	6	2	88	12
Italië	13	8	8	77	8	-	-
Spanje	48	38	2	60	0	90	10
Portugal	23	91	9	0	0	100	0
Denemarken	10	100	0	0	0	100	0
Noorwegen	19	16	84	0	0	100	0

7. Maatregelen ter voorkoming van botulisme bij de mens

7.1 Algemene gevaren

Wanneer vissen bij de vangst al duidelijk enige tijd dood zijn, bestaat de kans dat deze vissen aan botulisme gestorven zijn of dat het botulinumtoxine inmiddels in de vissen gevormd is. Deze vissen zouden dan ook beter niet voor consumptie verwerkt moeten worden. Ook vissen met een afwijkend gedrag of uiterlijk zouden niet verwerkt moeten worden in verband met het gevaar van botulisme besmetting [22]. Alleen gezonde vissen komen voor de verwerking tot consumptieprodukten in aanmerking. Ook dan echter bestaat er altijd nog een kans, dat het botulinumtoxine zich tijdens de bewaring of verwerking van de vis ontwikkelt.

7.2 Ontwikkeling van botulinumtoxine in vis bij verlengde houdbaarheid

Het bewaren van vis in een modified atmosphere ("gewijzigde atmosfeer") bij koelkasttemperaturen weerhoudt bacteriën, zoals *Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter* en *Flavobacterium,* van groeien en stelt daardoor het punt van bederven van het produkt aanzienlijk uit [6]. Bij modified atmospheres wordt de lucht uit een verpakking verwijderd en vervangen door een mengsel van kooldioxyde, stikstof en zuurstof. De benodigde verhouding van de gassen varieert voor elke vissoort, bijvoorbeeld kooldioxyde: stikstof: zuurstof (40:30:30) voor witte zeevis en kooldioxyde: stikstof (60:40) voor haring, makreel en gerookte vis [26]. Kooldioxyde remt de groei van bedervende bacteriën, schimmels en gisten. Stikstof is een inert gas en wordt voornamelijk gebruikt om de concentratie kooldioxyde te verlagen. Zuurstof werd aanvankelijk toegevoegd om de groei van anaërobe bacteriën te vertragen en om, in sommige gevallen, een mooie produktkleur te behouden. Latere onderzoeken wezen uit dat zuurstof in modified atmospheres weinig effect heeft op de groei van *Clostridium botulinum* in rauwe visserijprodukten [6]. Modified atmosphere verpakken van vis kan potentiële botulisme problemen zelfs vergroten wanneer de produkten niet gekoeld of lang in een koelkast bewaard worden. Dit vergrote risico wordt veroorzaakt door de remming van de gram-negatieve bedervende bacteriën, hetgeen de voor bederf karakteristieke organoleptische veranderingen voorkomt, welke voor de consument juist veiligheidssignalen zijn. De gram-positieve bacteriën (waaronder *Clostridium botulinum*) verdragen de modified atmospheres gassen daarentegen veel beter en kunnen daardoor

zelfs dominant worden. De groei van deze gram-positieve bacteriën is langzaam en gaat gepaard met zodanig milde organoleptische veranderingen, dat deze door de consument meestal niet als bederf onderkend worden [6].

Om de potentiële gevaren van het onder modified atmosphere bewaren van vis voor de volksgezondheid te kunnen beoordelen zijn er veel onderzoeken gedaan met verschillende visserijprodukten en verschillende gasmengsels. Het belangrijkste doel van deze onderzoeken was het bepalen of het botulinumtoxine al gevormd kon zijn terwijl het produkt organoleptisch nog acceptabel was. De resultaten van deze studies gaven geen eenduidig antwoord op de vraag of *Clostridium botulinum* kan groeien en toxine produceren in visprodukten, die verpakt zijn onder modified atmosphere, voordat deze produkten bederven en onacceptabel voor de consument zijn geworden. Dit gebrek aan eenduidigheid kan worden verklaard uit de oorspronkelijke kwaliteit van het produkt, de populatie van de bederf veroorzakende bacteriën aan het begin van het experiment, de mate van de *Clostridium botulinum* sporen enting, het soort visserijprodukt, bewaartemperaturen en de procedures die gebruikt worden voor de botulinumtoxine bepaling. In het algemeen is men het erover eens dat de opslag van visserijprodukten onder modified atmospheres bij temperaturen van lager dan 5 °C geen potentiële botulisme problemen (binnen een bepaalde tijd) behoeven te veroorzaken [6]. In onderzoeken waar een bewaartemperatuur van meer dan 10 °C werd gebruikt, bleek de kans ontwikkeling van *Clostridium botulinum* en toxinevorming echter aanzienlijk toe te nemen [6].

Wanneer visserijprodukten vacuüm bewaard worden in verpakkingsmaterialen met een lage gas-permeabiliteit, ontstaat in een relatief korte tijd een kooldioxyderijk en zuurstofarm milieu. Tijdens vacuüm verpakken wordt de meeste lucht verwijderd. De overgebleven hoeveelheid zuurstof wordt snel verminderd door het metabolisme van de bederf veroorzakende bacteriën onder vorming van kooldioxyde. De kooldioxyde concentratie bereikt weliswaar de waarde van de kooldioxyde concentratie in de meeste modified atmosphere systemen niet, maar voldoende kooldioxyde accumuleert om de houdbaarheid van de visserijprodukten te verlengen. Bij te hoge temperaturen is het onder deze omstandigheden mogelijk, dat botulinumtoxinen gevormd worden in vacuüm verpakte visserijprodukten voor het tijdstip van duidelijk bederf. De verlenging van de houdbaarheid hangt ook hier af van de oorspronkelijke bacterie populatie, alsmede het tijdsverloop tussen vangst, verwerken en verpakken van de vis en de temperatuur [6]. Met het oog op het voorkomen van de vorming van botulinumtoxinen wordt in bijvoorbeeld Engeland, de USA en Canada alleen het verhandelen van bevroren vacuum verpakte visserijprodukten toegestaan.

Het gebruik van straling om de houdbaarheid van visserijprodukten te verlengen is ook onderzocht. Het verschil tussen deze methode en de kooldioxyde modified atmospheres is dat de bederf veroorzakende micro-organismen door straling rechtstreeks geïnactiveerd worden. Met de gebruikte dosis wordt meer dan 99% van de micro-organismen geïnactiveerd, waardoor de houdbaarheidstijd twee- of drievoudig verlengd kan worden [6]. Het grootste nadeel van deze methode is dat de straling weinig tot geen effect op de sporen van *Clostridium botulinum* heeft. Resultaten van onderzoeken wijzen ook hier uit dat de mate van spore enting, de vissoort, het verpakkingsmateriaal, de stralingsdosis en de bewaartemperatuur zeer belangrijk zijn om de potentiële gevaren van de stralingsmethode voor de volksgezondheid te kunnen beoordelen. Onderzoeken hebben aangetoond, dat het stralingsproces de potentiële gevaren van *Clostridium botulinum* vergroot wanneer de stralingsdosis groter dan 1 kGy is en het produkt boven de 3 °C bewaard wordt. Een dosis onder de 1kGy wordt geprefereerd omdat sommige bedervende micro-organismen het stralingsproces dan overleven en het produkt kunnen doen bederven voordat botulinumtoxinen bij goede koeling (3 tot 5 °C) gevormd worden [6].

7.3 Maatregelen om de groei van *Clostridium botulinum* en toxinevorming in vis te remmen

Zouten

Het gebruik van zout voor de conservering van vis is waarschijnlijk de oudste methode van conserveren die er is en wordt in sommige delen van de wereld al eeuwenlang toegepast. In het verleden bevatten de visserijprodukten hoge zout concentraties en werden botulisme gevaren vermeden als het zouten goed uitgevoerd was. De laatste jaren maken consumenten zich zorgen over het zoutgebruik en daarom bevatten sommige produkten nu minder zout. Er zijn dan ook botulisme uitbraken veroorzaakt door onvoldoende gezouten vis, gezouten en gedroogde vis, zoals Kapchunka, en ook door gezouten viseitjes [6]. In al deze gevallen bevatten de produkten te weinig zout of was het neurotoxine al gevormd voordat voldoende zout de vis binnengedrongen was. Om botulisme uitbraken te voorkomen en bij omgevingstemperaturen de groei en toxinevorming van de proteolytische typen van *Clostridium botulinum* te remmen moet de waterfase van de vis meer dan 10% aan zout bevatten. Wanneer de produkten gekoeld worden en de proteolytische *Clostridium botulinum* type A, B en F dus geïnaktiveerd zijn, is 5% zout in de waterfase van de vis genoeg om de niet-proteolytische groepen te remmen. De benodigde zoutconcentratie wordt ook beïnvloed door de pH: hoe lager de pH, hoe minder zout er nodig is om de groei van

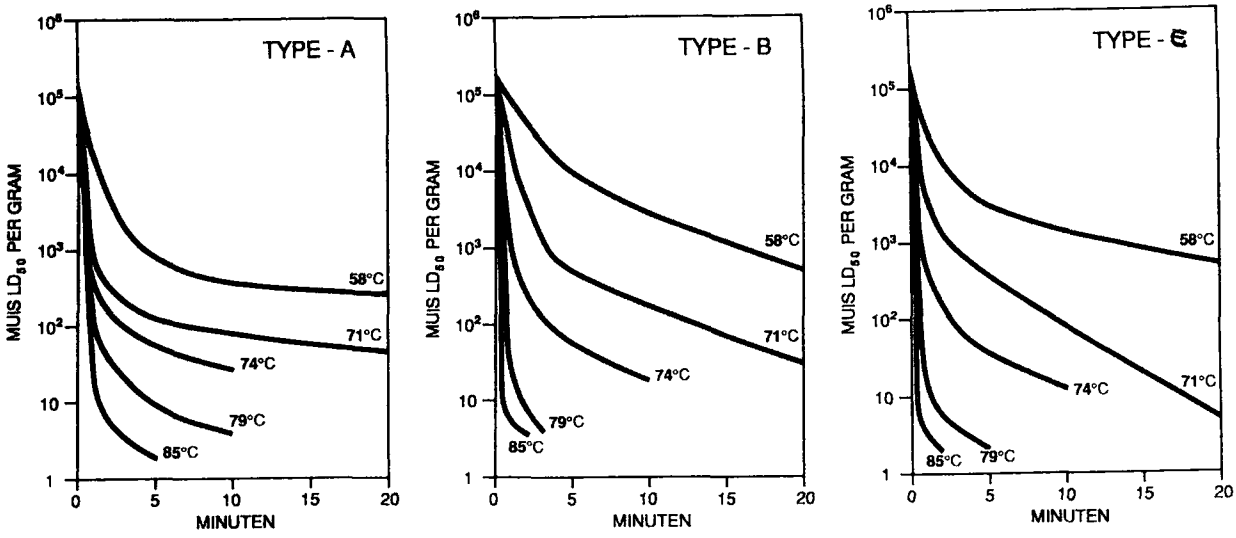
Clostridium botulinum te remmen (bijvoorbeeld 5,6% zout bij pH 5,6 en 4,0% keukenzout bij pH 5,0) [6].

Fermentatie

Het verlagen van de pH in vis om de groei van *Clostridium botulinum* te remmen kan bereikt worden door gisting of door een zuurbehandeling. Produkten van beide processen zijn echter toch betrokken geweest bij botulisme uitbraken. In bijvoorbeeld Azië worden verschillende soorten vis ingemaakt door fermentatie. De meeste produkten hebben lage zoutgehalten om de groei van fermenterende bacteriën niet te storen [6]. Het natuurlijke gistingsproces is langzaam en er zijn gewoonlijk te weinig koolhydraten aanwezig om de pH tot remmende waarden te brengen (pH ≤ 5,0 voor niet-proteolytische stammen en pH ≤ 4,6 voor proteolytische stammen). De veiligheid van de gistingsmethode hangt dan af van toevoeging van voldoende keukenzout of gisting bij een lage temperatuur tot de benodigde pH is bereikt. Zowel een lage temperatuur als een hoog zoutgehalte kunnen de groei van melkzuur bacteriën, die verantwoordelijk voor de fermentatie zijn, remmen [6]. De veiligheid van het inmaken van vis in het zuur hangt daarom af van het zoutgehalte en van een goede inmaakvloeistof om de pH van het produkt tot de juiste waarde te verlagen. Om botulisme te voorkomen is het belangrijk dat het proces beneden de 3 °C uitgevoerd wordt en dat een lage pH snel bereikt wordt. In sommige produkten is het belangrijk om de groei van andere gisten en schimmels te voorkomen, omdat deze micro-organismen organische zuren afbreken en daardoor de pH in sommige delen van het produkt juist weer verhogen [6].

Roken

De manier van het roken van vis als conserveringsmethode en als een methode om de groei van *Clostridium botulinum* te remmen varieert aanzienlijk in de verschillende delen van de wereld. Hoewel er zeer veel kennis en ervaring bestaat over het roken van vis, zijn er toch botulisme uitbraken door gerookte vis voorgekomen. Veel van deze uitbraken werden veroorzaakt door een gebrek aan begrip voor het feit dat gerookte visserijprodukten gevaarlijk kunnen zijn als het rookproces niet goed wordt uitgevoerd of als het gerookte produkt niet gekoeld wordt bewaard [6]. De gerookte visserijprodukten van tegenwoordig bevatten minder zout en worden korter gerookt dan voorheen, waardoor zij hogere vochtgehalten hebben. In Nederland vereist het rookproces minimaal gedurende 30 minuten een temperatuur van 62 °C in de vis [22]. Het Deense traditionele rookproces wordt uitgevoerd bij 60-70 °C gedurende ongeveer 45 minuten. Onderzoek heeft echter uitgewezen dat deze temperaturen niet voldoende zijn om een natuurlijke besmetting van vis met botulinumtoxinen te elimineren (figuur 7) of om de groei van *Clostridium botulinum* en daarmee de vorming van toxinen voldoende te remmen [12].



Figuur 7: Warmte inactivatie van respectievelijk type A, B en E toxinen [6].

7.4 Maatregelen om *Clostridium botulinum* en toxinen in vis te inactiveren

De best werkende manier om *Clostridium botulinum* en botulinumtoxinen te inactiveren is het verhitten van de visserijprodukten. Verhitten leidt enerzijds tot het afdoden van de bacterie zelf en anderzijds tot denaturatie en daardoor inactivering van het eiwittoxine. In geval de consument ook om andere dan gekookte of gebakken vis vraagt, is pasteuriseren een redelijk goed alternatief.

Het pasteuriseren van blauwe krab in hermetisch afgesloten blikken werd in de Amerikaanse industrie geïntroduceerd om de houdbaarheid van krab in de koelkast te verlengen [6]. Gepasteuriseerde krab heeft een koelkast houdbaarheidstijd van 6 maanden. Gedurende 34 jaar van produktie heeft zich onder deze omstandigheden nog nooit een geval van botulisme voorgedaan. Een thermoproces van 1 minuut bij 85 °C inactiveert het toxine type E en reduceerde het aantal *Clostridium botulinum* zodanig, dat het gepasteuriseerde vlees gedurende 6 maanden bij 4-6 °C nontoxisch bleef. Hierbij moet wel vermeld worden dat krabvlees waarschijnlijk een slecht substraat voor type E sporen is [6].

Hoewel de sporen van niet-proteolytisch *Clostridium botulinum* relatief warmte gevoelig zijn in vergelijking met proteolytische stammen, waren pogingen om de sporen

te inactiveren door middel van hogere temperaturen bij het roken van de vis niet succesvol, vanwege de ongunstige effecten op het produkt en het verlies van acceptatie door de consument. Het pasteuriseren van gerookte vis tot een aanvaardbaar produkt is echter wel mogelijk. Na het roken wordt de vis vacuüm verpakt. Pasteuriseren van 55, 65 of 75 minuten in een waterbad van respectievelijk 92, 89 en 85 °C is dan voldoende om 10^6 type E sporen en de toxinen van type A, B en E (figuur 7) te inactiveren. Langere tijden (65, 85 en 175 minuten) inactiveren ook een groot deel van de niet-proteolytische type B sporen [6]. Dit proces verlengt dus niet alleen de houdbaarheid, maar verbeterd ook de veiligheid van gerookte vis zonder de produktkwaliteit in gevaar te brengen Het is overigens wel een duur proces. Hoewel de *Clostridium botulinum* sporen van de niet-proteolytische groep 2 (type B, E en F) door dit proces voor het grootste deel geïnactiveerd worden, worden de meer warmte-resistente stammen van groep 1 (type A en de proteolytische stammen van type B en F) niet geïnactiveerd en zullen kunnen groeien en een voor de mens schadelijke hoeveelheid toxine produceren als het produkt bij te hoge temperaturen wordt bewaard [6]

De meeste visserijprodukten worden voor consumptie aan een hittebehandeling (zoals bakken, pasturiseren (85 - 95°C) of koken) onderworpen. Alle aanwezige botulinum-toxinen worden onder deze omstandigheden geïnactiveerd. Alleen in gevallen waarbij een dergelijke hittebehandeling achterwege blijft zou botulisme in aquatische ecosystemen gevaren kunnen opleveren voor de mens. Het roken ("stomen") van visserijprodukten (60-70 °C) is in dit verband onvoldoende.

Conclusie

Grootschalige botulisme uitbraken bij vissen zijn in Nederland tot op heden niet voorgekomen. Er wordt wel eens een enkele dode vis gevonden die mogelijk aan botulisme is overleden, maar botulisme uitbraken zoals in de viskwekerijen in Denemarken, Groot-Brittanië en de U.S.A. zijn in Nederland nog niet gemeld. Botulisme uitbraken bij watervogels komen wel regelmatig voor in Nederland. Vooral in de Randstad waar veel ondiepe sierwateren zijn, kan de watertemperatuur bij warme zomerdagen snel oplopen, waarmee een botulisme uitbraak bijna al vaststaat gezien het feit dat *Clostridium botulinum* vrijwel overal in Nederland in de (water)bodem, oppervlaktewater en slib aanwezig is.

Wanneer botulisme uitbraken zich in aquatische ecosystemen voordoen, is het van groot belang dat de kadavers van vissen, watervogels en eventuele andere dieren direkt verwijderd worden. Dit om besmetting van gezonde dieren te voorkomen. Ook moet getracht worden de watertemperaturen voor zover mogelijk te beperken, bijvoorbeeld door verhoging van het waterpeil, een sterkere doorstroming en het beperken van koelwaterlozingen.

Wanneer vis (of eventueel watervogels zoals eend) voor consumptie verwerkt wordt is het om alle risico's te vermijden belangrijk om de ontwikkeling van botulinumtoxinen tijdens bewaring en verwerking te voorkomen. De tegenwoordig gebruikte conserveringstechnieken inactiveren niet alle *Clostridium botulinum* soorten en wanneer de visserijprodukten bij te hoge temperaturen bewaard worden, bestaat er een kans dat de produkten na verloop van tijd botulinumtoxinen gaan bevatten. Daarom is het verstandig visserijprodukten altijd bij een temperatuur van 3 °C of lager te bewaren. Het bewaren moet voorts zodanig worden uitgevoerd, dat vaststaat dat de vis al bedorven is, vóórdat zich aanmerkelijke hoeveelheden botulinumtoxinen hebben kunnen vormen. Het is daarbij duidelijk, dat als visserijprodukten ook maar enigszins bedorven lijken, zij niet meer voor consumptie geschikt zijn..

Hoewel botulisme door het consumeren van vis bij de mens in Nederland nog nooit is vastgesteld, bestaat hierop in principe de mogelijkheid wanneer visserijprodukten voor consumptie niet meer verhit (gekookt, gepasturiseerd of gebakken) worden. Heet roken van visserijprodukten biedt in dit verband onvoldoende bescherming.

Referenties

[1] Haagsma J., Botulisme; een hardnekkig probleem, *Veehouder en Dierenarts*, 1993, **3**, p.9-10

[2] Haagsma J., Kunnen waterstaatkundige maatregelen botulismus bij watervogels voorkomen?,*Vogels*, 1984, **4**, p.110

[3] Huss H.H., Pedersen A., Cann D.C., The incidence of *Clostridium botulinum* in Danish trout farms: I. Distribution in fish and their environment, *Journal of Food Technology*, 1974, **9**, p.445-450

[4] Haagsma J., Sensitivity of eels (*Anquilla anquilla*) and carp (*Cyprinus carpio*) to type C and E botulinum toxin, *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene*, 1975, **230**, p.59-66

[5] Haesebrouck F., Haagsma J., Devriese L., Bertels G., D`Hollander L., Een uitbraak van botulisme bij paarden met atypische symptomen, *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 1990, **59**, p.234-236

[6] Hauschild A.H.W., Dodds K.L., *Clostridium botulinum,* Marcel Dekker, New York, Verenigde Staten, 1993, p.8, 9, 70-73, 88-89, 214-222, 226-228, 327, 329-330

[7] Haagsma J., Botulismus bij runderen, een overzicht, *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 1991, **13**, p.663-669

[8] Szabo E.A., Pemberton J.M., Gibson A.M., Eyles M.J., Desmarchelier P.M., Polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* types A, B and E in food, soil, and infant faeces, *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, **76**, p.539-545

[9] Haagsma J., De etiologie en epidemiologie van botulismus bij watervogels in Nederland, Bronder-offset B.V., Rotterdam, Nederland, 1973, p.41-43, 48-52, 104-107

[10] Schantz E.J., Kautter D.A., Standardized assay for *Clostridium botulinum* toxins, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1978, **1**, p.96-99

[11] Tetenburg G.J., ID-DLO, mondelinge communicatie

[12] Huss H.H., *Clostridium botulinum* type E and botulism, Ministry of Fisheries, Technological Laboratory, Technical University, Lyngby, Denemarken, 1981, p.18, p.22, 28-34, 41

[13] Szabo E.A., Pemberton J.M., Desmarchelier P.M., Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction, *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **9**, p.3011-3020

[14] Doellgast G.J., Letter Elcatech to Vecht U., 1994, Februari 13

[15] Potter M.D., Jianghong M., Kimsey P., An ELISA for detection of botulinal toxin types A, B and E in inoculated food samples, *Journal of Food Protection*, 1993, **10**, p.856-861

[16] Ter Laak E.A., Botulismus bij watervogels, *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 1980, **17**, p.719-723

[17] Notermans S.H.W., Dufrenne J.B., van Schothorst M., Voorkomen van *Clostridium botulinum* in enkele gebieden waar botulismus onder watervogels is opgetreden, Interim rapport nr. 14/79 RIVM, 1979, p.2

[18] Haagsma J., Kuik-Simons M., ter Laak E.A., Botulismus bij watervogels in Nederland in 1978-1980, *Tijdschrift voor Vogelstudie en Vogelbescherming*, 1981, **2**, p.56-59

[19] Cann D.C., Taylor L.Y., An outbreak of botulism in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, farmed in Britain, *Journal of Fish Diseases*, 1982, **5**,p.393-399

[20] Huss H.H., Eskildsen U., Botulism in farmed trout caused by *Clostridium botulinum* type E, *Nordic Journal of Veterinary Medicine*, 1974, **26**, p.733-738

[21] Eklund M.W., Peterson M.E., Poysky F.T., Peck L.W., Conrad J.F., Botulism in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in the United States, *Aquaculture*, 1982, **27**, p.1-11

[22] Hagel P., fax aan Jansen J.T., 1994, Augustus 16

[23] Huss H.H., Pedersen A., Cann D.C., The incidence of *Clostridium botulinum* in Danish trout farms: II.measures to reduce contamination of the fish, *Journal of Food Technology*, 1974, **9**, p.451-458

[24] Reed T.M., Rocke T.E., The role of avian carcasses in botulism epizootics, Wildlife Society Bulletin, 1992, **20**, p.175-182

[25] Cann D.C., Taylor L.Y., An evaluation of residual contamination by *Clostridium botulinum* in a trout farm following an outbreak of botulism in the fish stock, *Journal of Fish Diseases*, 1984, **7**, p.391-396

[26] Reddy N.R., Armstrong D.J., Rhodehamel E.J., Kautter D.A., Shelf-life extention and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review, *Journal of Food Safety*, 1992, **12**, p.87 -118