

Onderzoeksresultaten gestrande bultrug, gewone spitssnuitdolfijn en orka (2022)

Pathologie, biologische gegevens & dieet onderzoek

Lonneke L. IJsseldijk (Editor)



Universiteit Utrecht

Intern rapport

Faculteit Diergeneeskunde

Dep. Biomolecular Health Sciences

Afdeling Pathologie

Referentie

Lonneke L. IJsseldijk (Ed), 2022. Onderzoeksresultaten gestrande bultrug, gewone spitsnuitdolfijn en orka (2022). Pathologie, biologische gegevens en dieet onderzoek. Rapport Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Departement Biomolecular Health Sciences, Afdeling Pathologie.

Trefwoorden: postmortaal onderzoek, autopsie, walvissen, strandingen, Noordzee, dieet

In samenwerking met: Wageningen Marine Research



Cover foto: Bas Niemans

© 2022

Faculteit Diergeneeskunde

Universiteit Utrecht

Yalelaan 1, 3484 CL, Utrecht

Tel: (030) 253 5312 ; e-mail: l.l.ijsseldijk@uu.nl

Deze rapportage is een uitgave van de afdeling Pathologie, van de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht. Deze rapportage is opgesteld in samenwerking met Wageningen Marine Research. Dit rapport is, na afronding van deze opdracht, online verkrijgbaar via www.uu.nl/strandingsonderzoek.

Deze rapportage is het resultaat van een onderzoeksopdracht van en gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) met ordernummer 202112086.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. De uitgever aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Intern rapport UU – November 2022

Woord vooraf

Wanneer in Nederland dode zeezoogdieren worden gevonden staan de mensen van het Nederlandse, vrijwillige strandingsnetwerk klaar om hulp te bieden, onder andere door dieren te melden en, als mogelijk, verzamelen voor onderzoek. Het postmortaal onderzoek is volledig afhankelijk van deze vrijwilligers en ik ben al deze mensen dan ook enorm dankbaar voor hun toewijding. Bij de strandingen, waarover dit jaarrapport gaat, waren verschillende mensen en organisaties betrokken. Ik ben vooral dankbaar voor de betrokkenheid en inzet van de medewerkers van Stichting SOS Dolfijn, de medewerkers van Ecomare en de medewerkers van ReddingsTeam Zeedieren (RTZ). Daarnaast danken wij Rijkswaterstaat, BDS Harlingen en de walvissnijploeg van Naturalis voor de logistieke- en snij hulp tijdens het bultrug onderzoek, en Rijkswaterstaat en aannemer Jaro voor logistieke hulp bij het transport van de spitsnuitdolfijn en de orka naar de faculteit Diergeneeskunde in Utrecht.

De medewerkers van de Utrechtse onderzoeksteams bij deze strandingen waren: Arnold de Ruiter, Bas Niemans, Dagmar Roelofs, Darryl Leydekkers, Erwin de Bruin, Eva Schotanus, Judith van den Brand, Karlijn van den Brand, Krijn Reijalt, Linde van Schalkwijk, Louis van den Boom, Luuk van den Boom, Manon Lock, Natashja Ennen-Buijs, Thomas Spliethof en Tim van Olmen. Het dieet- en plastic onderzoek is uitgevoerd door Mardik Leopold van Wageningen Marine Research (WMR), met hulp van Anita van Nierop, Elisa Bravo-Rebolledo, Guido Keijl en Susanne Kuehn. Bram Couperus (WMR) hielp met het verzamelen van zilverkabeljauwen ter referentie. Zonder de enorme toewijding en het grote enthousiasme van al deze mensen zou dit onderzoek niet mogelijk zijn geweest. Het onderzoek is gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV), waarvoor wij in het bijzonder Anne-Marie Svoboda en Geert Hoogerduijn dankbaar zijn.



Lonneke IJsseldijk

Utrecht, 09 November 2022

Inhoudsopgave

Woord vooraf	4
Inhoudsopgave	5
1 Inleiding	6
2 Pathologisch onderzoek	8
2.1 Materialen en methoden	8
2.1.1 Autopsie, macro- en microscopie	8
2.1.2 Bacteriologie	8
2.1.3 Virologie	8
2.1.4 Leeftijdsbepaling en reproductie status	9
2.2 Resultaten en discussie	9
2.2.1 Bultrug	9
2.2.2 Gewone spitssnuitdolfijn	10
2.2.3 Orka	11
3 Dieet- en plastic onderzoek	13
3.1 Materialen en methoden	13
3.2 Resultaten en discussie	13
3.2.1 Bultrug	13
3.2.2 Gewone spitssnuitdolfijn	14
3.2.3 Orka	15
4 Additioneel onderzoek	16
4.1 Contaminanten onderzoek orka	16
4.1.1 Materialen en methoden	16
4.1.2 Resultaten en discussie	16
4.2 Gehoorschade onderzoek orka	16
4.2.1 Materialen en methoden	16
4.2.2 Resultaten en discussie	16
5 Conclusies	17
Literatuur	18

1 Inleiding

In 2022 werden naast honderden gestrande bruinvissen (*Phocoena phocoena*), ook een viertal bijzondere walvissoorten op het Nederlandse strand aangetroffen. Zo werd er in juli op de Vliehors een dode bultrug (*Megaptera novaeangliae*) gevonden, in augustus een dode gewone spitsnuitdolfijn (*Mesoplodon bidens*) op het Noordzeestrand van Texel, in oktober een dode gewone vinvis (*Balaenoptera physalus*) bij Westkapelle en later die maand een orka (*Orcinus orca*) die levend strandde nabij Cadzand. Drie van de vier dieren zijn binnen het strandingsonderzoek van de Universiteit Utrecht (UU) verder onderzocht. Strandingsonderzoek vindt in Nederland sinds 2008 plaats bij de afdeling Pathologie van de Faculteit Diergeneeskunde van de UU in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV). Het hoofddoel van het onderzoek is het vaststellen van de doodsoorzaken van de onderzochte dieren, waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen natuurlijke en antropogene oorzaken. Daarnaast worden weefsels verzameld waarmee aanvullende onderzoeken kunnen worden uitgevoerd. Zo wordt er onder andere standaard dieet onderzoek uitgevoerd, door Wageningen Marine Research (WMR).

In deze rapportage worden de (voorlopige) resultaten van het pathologisch- en dieet onderzoek van drie walvisachtigen beschreven: de bultrug, gewone spitsnuitdolfijn en orka. De eerder genoemde, gewone vinvis werd dagen voor stranding drijvend in Belgische wateren waargenomen en was ten tijde van de stranding al in vergaande staat van ontbinding. De snijteams van UU en Naturalis hebben Rijkswaterstaat geassisteerd bij de berging van het kadaver, maar verder onderzoek naar de doodsoorzaak is niet uitgevoerd. Deze casus is daarom geen onderdeel van deze rapportage.

Het doel van alle onderzoeken gecombineerd is het achterhalen van de gezondheidsstatus, herkomst en doodsoorzaak van deze dieren, en om een antwoord te genereren op vragen als: zijn deze dieren overleden door menselijk toedoen; zijn er potentieel zoönotische micro-organismen in deze dieren aangetroffen; en kan de herkomst (op basis van dieet) van deze walvissen worden achterhaald.

Achtergrond van de casussen 2022

Op 23 mei werd voor de kust van Zeeland een bultrug waargenomen. Het dier liet zich daarna nog een paar keer zien, voor het laatst op 23 juni in het Marsdiep (gebied tussen Den Helder en Texel). Medewerkers van Defensie vonden op dinsdag 5 juli een dode bultrug op het militaire terrein van de Vliehors. Aan de hand van de vorm en pigmentatie op de staart kon worden vastgesteld dat het om dezelfde bultrug ging die sinds mei voor onze kust zwom. In overleg met het Ministerie, Rijkswaterstaat en de onderzoeksinstanties, is het onderzoeksteam van de Faculteit Diergeneeskunde de volgende dag naar Harlingen afgereisd om daar, samen met medewerkers van Naturalis, de bultrug te ontleden.

Op 19 juli werden er in Zandvoort drie levende spitsnuitdolfijnen waargenomen, waarvan één uiteindelijk strandde, maar door omstanders weer naar dieper water werd geduwd. Stichting SOS Dolfijn is op pad gegaan en de bemanning van de lokale reddingsbrigade KNRM hebben de dieren nauwlettend in de gaten gehouden. Op beeld kon worden waargenomen dat ten minste één van de spitsnuitdolfijnen huidproblemen had, wat een indicatie is voor een verminderde gezondheid. Spitsnuitdolfijnen leven in de diepere zeeën en kunnen zich niet in de ondiepe zuidelijke Noordzee redden. Hoewel de dieren uiteindelijk op en na 19 juli niet meer werden gezien in midden Nederland, volgde wel waarnemingen en strandingen in omliggende gebieden. Zo werd op 29 juli op het strand van Wenduine (België) een levende spitsnuitdolfijn aangetroffen, welke ook werd teruggeleid naar zee. Rond dezelfde periode werden twee dieren waargenomen voor de Schotse kust en ook was er een melding van een gestrande spitsnuitdolfijn in Denemarken, die daar uiteindelijk overleed. Op 15 augustus werd een dode spitsnuitdolfijn gevonden op het strand van Seaton Carew in noordoost Engeland. Op 17 augustus werden twee verse dode spitsnuitdolfijnen aangetroffen in de Morray Firth. Op 18 augustus spoelde de dode spitsnuitdolfijn aan op het strand van Texel nabij paal 28. Dit dier is naar de afdeling pathologie van de Faculteit Diergeneeskunde getransporteerd voor onderzoek. Of dit één van de eerder levend gestrande spitsnuitdolfijnen in Zandvoort of elders was, blijft onduidelijk.

Op 15 oktober omstreeks 15:30 uur belde de Kustwacht de stranding coördinator van LNV om melding te maken van twee levende orka's in ondiep water nabij Cadzand. Gezien de soort en dreigende strandingssituatie is onmiddellijk de "Leidraad stranding levende grote walvisachtigen" gevolgd. Eén orka is vrijwel direct na de eerste melding gestrand en door medewerkers van de lokale reddingsbrigade KNRM teruggezet. Na her-stranding is besloten om te wachten op de aankomst van de stranding coördinator en dierenarts van LNV en Stichting SOS Dolfijn. Uiteindelijk is de orka omstreeks 23:30 uur onder sedatie overleden. Vrijwel direct daarna is het dier op transport naar de faculteit Diergeneeskunde gegaan om daar de volgende ochtend te worden onderzocht. Of er sprake is geweest van een tweede orka blijft onduidelijk, maar dat is in ieder geval niet op basis van beeld vastgesteld.

Beeldmateriaal van de orka stranding is de wereld over gegaan. Dit resulteerde onder andere in een match met een catalogus van orka onderzoekers uit Spanje. Zo kon worden vastgesteld dat het dier, een volwassen vrouwtje genaamd Gala (catalogus nummer IB6), al minimaal 20 jaar in Spaans-Portugese wateren werd gezien en nooit eerder zo ver noordelijk is waargenomen als waar ze uiteindelijk is gestrand.

2 Pathologisch onderzoek

Door: Lonneke L. IJsseldijk, Linde van Schalkwijk, Marja J.L. Kik, Judith van den Brand & Andrea Gröne. *Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht*

2.1 Materialen en methoden

2.1.1 Autopsie, macro- en microscopie

De drie walvisachtigen zijn gemeten, het geslacht is bepaald en de dieren zijn, voor zover mogelijk, volledig gefotografeerd. De spitsnuitdolfijn en orka konden worden gewogen, bij de bultrug is het gewicht ingeschat op basis van destructiegewicht en de lengte van het dier. Blubberdiktes zijn gemeten op drie locaties (dorsaal, lateraal en ventraal) vlak voor de rugvin. De autopsies zijn, voor zover mogelijk, uitgevoerd volgens eerder beschreven protocollen en methoden (IJsseldijk, Brownlow & Mazzariol 2019). Het onderzoek bestond uit een uitgebreid uitwendig en een inwendig onderzoek, waarbij alle aanwezige organen en afwijkingen daaraan beoordeeld, beschreven en bemonsterd werden. Er werden weefsels bemonsterd voor aanvullend (microbiologisch) onderzoek, welke vervolgens zijn ingevroren zijn op -20 en -80 graden Celsius. Ook is de aanwezigheid van parasieten gedocumenteerd, welke vervolgens zijn verzameld in 70% ethanol en door een parasitoloog op soort zijn bepaald op basis van de morfologie.

Voor het histologisch onderzoek werden kleine stukjes weefsel verzameld, in formaline gefixeerd en volgens standaardprocedure in paraffine ingebed en gesneden, waarna de coupes werden gekleurd met hematoxyline en eosine (H&E). Daarna werden ze beoordeeld door een patholoog om eventuele afwijkingen op celniveau vast te stellen ten behoeve van het determineren van de gezondheidsstatus en de doodsoorzaak.

2.1.2 Bacteriologie

Bacteriologisch onderzoek middels kweek is ingezet op organen van de bultrug: long en hersenen, en van de orka: darminhoud, long en hersenen, en swabs van baarmoeder, middenoor en tandholte. Van de spitsnuitdolfijn is geen kweek ingezet omdat daar geen aanleiding toe was op basis van het macroscopisch en microscopisch onderzoek. Geselecteerde organen of swabs werden op twee bloedagarplaten en één MacConkeyagarplaat aangebracht. Eén bloedagarplaat werd anaeroob bebroed (2x24h bij 37°C), de andere bloedagarplaat en MacConkeyplaat werden aeroob bebroed (2x24h bij 37°C). Bij long weefsel werd daarnaast een extra plaat ingezet (zgn. chocoladeplaat); deze werd microaërofiel 2x48h bij 37°C bebroed. Alle platen werden dagelijks beoordeeld op bacteriegroei. Verdachte kolonies werden geïdentificeerd met behulp van MALDI-TOF. Bacteriologisch onderzoek werd uitgevoerd bij het Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum van de Faculteit Diergeneeskunde.

Ook werd er een *Brucella* PCR uitgevoerd op long- en hersenweefsel van alle drie de walvisachtigen volgens eerder beschreven methode (Maio et al. 2014).

2.1.3 Virologie

Verschillende monsters werden onderzocht op de aanwezigheid van verschillende virussen. Huidlaesies van de bultrug en de orka werden getest op de aanwezigheid van herpesvirus. Ook werden de longen en hersenen van alle drie de dieren onderzocht op de aanwezigheid van Morbillivirussen en de long en hersenweefsels van de orka daarnaast voor de aanwezigheid van Influenza A virus. DNA en RNA werd geïsoleerd uit orgaan homogenaten en swabs. Voor de herpesvirus PCR werden primers gebruikt welke het polymerase gen fragment herkennen, volgens eerder beschreven methoden (VanDevanter et al. 1996; Smolarek-Benson et al. 2006). Voor de Morbillivirus RT-PCR werden primers gebruikt welke het phosphoproteïne gen fragment herkennen, volgens eerder beschreven methoden (Van Elk et al. 2014). Voor de Influenza A PCR werd gebruik gemaakt van een intern protocol.

2.1.4 Leeftijdsbepaling en reproductie status

Op basis van de lengte en beoordeling van de geslachtsorganen van de dieren is een inschatting van de leeftijdsklasse gemaakt. Bij tandwalvisachtigen kan door middel van een longitudinale doorsnede door een tand groeiringen worden afgelezen om de leeftijd te bepalen (Perrin & Myrick 1980). Dit onderzoek wordt uitgevoerd door specialisten van de Veterinaire Universiteit in Hannover, Duitsland. De gewone spitsnuitdolfijn was een vrouwtje en had daarom geen (zichtbare) tanden. De orka had rotting en slijtage van de tanden, wat leeftijd determinatie vermoelijk. Desondanks is dit voor de orka toch ingezet, waarvan de resultaten in 2023 volgen.

2.2 Resultaten en discussie

De gestrande bultrug en de gewone spitsnuitdolfijn waren allebei juveniele vrouwelijke dieren, de orka was een adult vrouwtje (Tabel 1).

Tabel 1. *Algemene informatie*

ID	Geslacht	Leeftijdscategorie	Lengte	Gewicht (*= geschat)	Gemiddelde blubberdikte
Bultrug (MN2)	Vrouw	juveniel	638 cm	4000 kg*	78 mm
Spitsnuitdolfijn (MB9)	Vrouw	juveniel	400 cm	550 kg	37 mm
Orka (OO1)	Vrouw	adult	517 cm	2003 kg	42 mm

2.2.1 Bultrug

Macroscopisch- en histologisch onderzoek

Bij de gestrande bultrug (MN2) was sprake van uitgebreide huidontstekingen, met overmatige aantallen parasieten (Figuur 1, walvisluis van de soort *Cyamidae*). Walvisluizen maken zelf geen huidlaesies, maar de aanwezigheid in wonden houden deze wel open en kunnen de wonden ook verergeren (Lehnert et al. 2021). De oorzaak van de huidontstekingen is onduidelijk, maar er werden geen aanwijzingen gevonden voor herpesvirussen middels de uitgevoerde histologie en PCRs. De huidontsteking werd niet als zodanig ernstig en belemmerend ingeschat dat het direct aan de doodsoorzaak van het dier te relateren was. Wel is het een teken van een algehele verslechterde gezondheidstoestand.

Naar aanleiding van de sectie kon worden vastgesteld dat de bultrug niet recent gegeten had (zie ook het volgend hoofdstuk) en was vermagerd. Het ging om een heel jong dier welke vermoedelijk nog maar net zelfstandig leefde. Bultruggen zijn zo'n 4 meter lang als ze worden geboren en worden veelal tot rond de 8 meter lichaamslengte nog met de moeder gezien (Clapham 2018). Dit vrouwtje was bijna 6,5 meter (Tabel 1) en vermoedelijk dus nog maar net bij moeder weg. Tijdens het onderzoek zijn uitdrogingsverschijnselen ontdekt die waarschijnlijk zijn ontstaan door een gebrek aan goed, vochtig voedsel. Helaas was het weefsel van de organen al in vergaande staat van ontbinding waardoor de beoordeling van de weefsels onder de microscoop werd bemoeilijkt. Het niet recent gegeten hebben en hierdoor de vermagering heeft er vermoedelijk voor gezorgd dat dit nog jonge bultrugvrouwtje zich niet heeft weten te redden. Ten slotte werden enkele gebroken botten ontdekt die voor of na het overlijden (tijdens de stranding) ontstaan kunnen zijn.



Figuur 1. Grote aantallen walvisluizen van de soort *Cyamidae* op de huid van de bultrug. Foto: Bas Niemans

Aanvullend microbiologisch onderzoek

Long en hersenweefsel van de bultrug werden op kweek gezet. Zowel uit de long als uit de hersenen werden *Proteus vulgaris* gekweekt in een groot aantal en in mengculturen met nog twee soorten anaerobe bacteriën en gram negatieve staven. *Proteus vulgaris* is commensaal in de flora van het maagdarmkanaal, maar kunnen ook worden gevonden in water en bodem. Het gaat hier vermoedelijk om postmortale groei en/of bezoedeling en dus zonder klinische relevantie.

Er werden geen aanwijzingen voor *Brucella spp.* en herpesvirusinfectie gevonden (PCRs voor *Brucella spp.* op long en hersenweefsel en de PCRs voor herpesvirus op huidlaesies waren negatief). De PCR op hersenweefsel voor Morbillivirus was ook negatief, maar bij de Morbillivirus PCR met longweefsel werd wel een positieve band gezien. Momenteel is verder onderzoek ingesteld om een eventuele Morbillivirusinfectie te bevestigen, waarover in 2023 kan worden gerapporteerd.

2.2.2 Gewone spitssnuitdolfijn

Macroscopisch- en histologisch onderzoek

Tijdens het inladen van het kadaver is een gat in de rechterzijde van dit dier ontstaan, waardoor nagenoeg alle buikorganen miste. De mate van rotting van dit dier heeft daarnaast de macroscopische en histologische beoordeling van met name de (nog aanwezige) inwendige organen beperkt. Er werden geen tekenen van acuut of chronisch trauma en/of verstrikking gevonden. Ook werden er geen aanwijzingen voor significante ziekten of andere afwijkingen aangetroffen. Er was geen teken van recente voedselinname (zie verder het volgende hoofdstuk). Het dier was matig bespied en er waren uitdrogingsverschijnselen. Deze bevindingen passen bij een out-of-habitat soort, zoals eerder bij gestrande, gewone spitssnuitdolfijnen op de Nederlandse kust werd geconcludeerd (IJsseldijk et al. 2022).

Aanvullend microbiologisch onderzoek

Van de gewone spitssnuitdolfijn zijn geen organen of weefselswabs op kweek gezet. De PCRs voor *Brucella spp.* en Morbillivirus waren negatief.

2.2.3 Orka

Macroscopisch- en histologisch onderzoek

Extern werden enkele beschadigen gezien die vermoedelijk tijdens de stranding of het transport zijn ontstaan. Daarnaast waren er aanwijzingen voor een milde, virale huidinfectie op delen van de kop, op basis van de morfologie passend bij een pokkenvirusinfectie, wat verder moet worden onderzocht. Extern waren geen aanwijzingen voor eerdere verstrikkingen of aanvaringen of ander letsel. Inwendig was de meest significante bevinding een ernstige tandvleesontsteking. Alle tanden van de orka waren versleten, zaten los en waren aan het rotten (Figuur 2). Dit was een proces wat vermoedelijk al maanden speelde en erg pijnlijk moet zijn geweest, vooral met eten. Naast de tand- en tandvleesontsteking bleken er ook ontstekingen in meerdere inwendige organen aanwezig wat ook histologisch is bevestigd, waaronder op een hartklep, in het hersenvlies en in het geslachtsorgaan. Daarnaast waren er aanwijzingen voor een chronische leverontsteking en ontstekingen in de alvleesklier, beiden vermoedelijk als gevolg van trematoden infestatie, die overigens op het oog niet (meer) aanwezig waren in de lever of galwegen en de alvleesklier. Ook had de orka een longaandoening. Het is dus met zekerheid te zeggen dat het om een ernstig ziek en verzwakt dier ging. Om erachter te komen of alle ontstekingen eenzelfde of een verschillende oorzaak hadden, is aanvullend onderzoek ingesteld.



Figuur 2. Afgesleten en zwarte tanden van de orka. Foto: Bas Niemans

Er is naar aanleiding van het levend stranden van de orka aanvullend klinisch chemisch onderzoek ingesteld. In het bloed zijn de creatinekinase (CK) waarden gemeten. CK speelt een rol in de energievoorziening van de spier en komt vrij wanneer spiercellen kapot gaan. Hoge CK waarden zijn een indicatie voor spierschade, wat bij walvisachtigen een direct gevolg van levend stranden kan zijn maar ook door hartfalen kan komen (Dierauf & Gulland 2001, Herráez et al. 2013). CK waarden beginnen 4 tot 9 uur na een stressvolle gebeurtenis te stijgen en pieken na 24 uur, waarna de CK waarden weer terugzakken naar normale levels zo'n 48-72 uur na een stressvolle gebeurtenis (Câmara et al. 2019, Lewandrowski et al. 2002). De CK-waarde was 17557 U/L in serum.

Hoewel er geen referentie/normaalwaarden voor walvisachtigen bekend zijn, kan wel met zekerheid worden gesteld dat dit een zeer hoge CK waarde is. Ter vergelijking: Câmara et al. (2019) schreven over een levend gestrande Brydevinvis (*Balaenoptera brydei*) neonaat dat de CK waarden van 460 U/L een indicatie waren voor skeletspier beschadiging door het levend stranden. Câmara et al. (2019) vergeleek deze waarden met die bij mensen en in gevangenschap levende tuimelaars (*Tursiops truncatus*). Bij mensen werden CK waarden tussen de 30-170 U/L als normaal gezien en bij tuimelaars was dat 100-250 U/L. De CK waarden van twee gewone spitssnuitdolfijnen die in 2021 in Nederland strandden en bij de Faculteit Diergeneeskunde werden onderzocht, waren respectievelijk 404400 U/L en 141373 U/L (IJsseldijk et al. 2022). Wat betreft de waarde in het serum van de orka kunnen we concluderen dat het dier inderdaad tekenen van spierschade had. Orka's, net als andere walvissen, zijn volledig aangepast aan een leven onder water. De zwaartekracht die bij stranding op een dier drukt is heel zwaar. Dat heeft allerlei gevolgen voor de bloedsomloop, ademhaling en dus de algehele overlevingskansen. Het levend stranden is de orka daarom uiteindelijk fataal geworden.

Aanvullend microbiologisch onderzoek

Er werden geen significante bacteriën gekweekt uit de organen en weefselswabs. Een darminhoud monster wordt nog onderzocht om het microbioom van de orka bekend te maken. Verder zijn we nog in afwachting van PCR resultaten van de verschillende virussen waarop wordt getest. Dit zal in 2023 worden gerapporteerd.

Leeftijd en reproductiestatus

Op basis van de geslachtsorganen werd duidelijk dat het hier ging om een volwassen vrouwtje. Ze was niet drachtig en niet lacterende. Er waren duidelijke afwijkingen aan de geslachtsorganen, waaronder een cyste van 25 cm in diameter in de rechter eierstok en een infectie van het baarmoederslijmvlies (endometrium). Aanvullende chemische analyses zullen moeten uitwijzen in hoeverre toxische stoffen mogelijk hebben geresulteerd in reproductie falen, zoals eerder voor orka's is gerapporteerd (Jepson et al. 2016, Desforges et al. 2018). Daarnaast zijn we nog in afwachting van resultaten van de leeftijd determinatie. Beiden aanvullende onderzoeken zullen in 2023 worden gerapporteerd.

3 Dieet- en plastic onderzoek

Door: Mardik F. Leopold. *Wageningen Marine Research*

3.1 Materialen en methoden

De maag en darmen van de bultrug zijn tijdens de sectie in Harlingen bekeken, met behulp van Elisa Bravo Rebolledo (BuWa). Na de secties op de gewone spitsnuitdolfijn en orka zijn de (bijna) complete maagdarmstelsels tijdelijk ingevroren op UU op -20°C en later getransporteerd naar het laboratorium van WMR in Den Helder en daar verder onderzocht. Dit werd gedaan met hulp van Guido Keijl (Naturalis), Elisa Bravo Rebolledo (BuWa), en Anita van Nierop (WMR).

In het kort: de magen en darmen zijn uitgespoeld, waarbij het effluent over een 1 mm zeef is gespoeld om ook kleine, lichte voorwerpen (zoals kleine stukjes plastic) te verzamelen (conform Bravo Rebolledo et al. 2013, van Franeker et al. 2018). De otolieten werden gebruikt om vissoorten te identificeren en om de lengte en massa van de vissen te reconstrueren, volgens de methoden beschreven in Leopold et al. (2001).

3.2 Resultaten en discussie

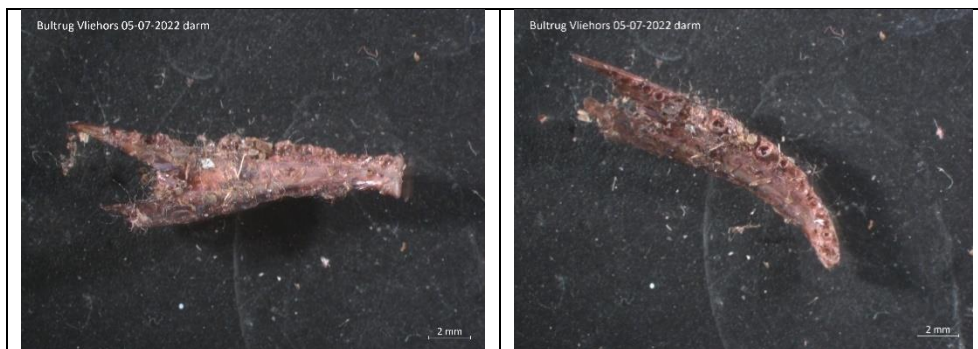
3.2.1 Bultrug

De sectie op het -niet zeer verse- dier werd verricht in Harlingen. Maag en darm werden als één, lekkend, pakket uit het dier gehaald, aanvankelijk op de betonnen vloer gelegd en even later als geheel in een grote krat geplaatst. Omdat zowel maag als darm niet intact was en er inhoud weglekte, konden maag- en darminhoud niet met zekerheid van elkaar worden gescheiden en is het hele maagdarm pakket als één geheel behandeld. De maag was zo goed als leeg, in de darm bevond zich hier en daar nog wat bruine smurrie. De maag en de darm werden in hanteerbare stukken gesneden die een voor een boven een grote (1x1 m) zeef met gaatjes van 1 mm werden uitgespoeld. Het spoelwater werd opgevangen in een zak van planktongaas met gaatjes van 0.3 mm. Dit resulteerde in enkele kilo's opgevangen materiaal, met daarin nog verstopt, hopelijk enkele harde, determineerbare prooiresten. Tijdens het spoelwerk werden enkele kleine visbotjes op de zeef aangetroffen, die bij het materiaal in de opvangzak werden gevoegd. De zak met opgevangen materiaal werd volgens de standaardprocedure voor dergelijk materiaal gewassen (Bravo Rebolledo et al. 2013, 2016) en vervolgens werden de aangetroffen visresten verzameld, gedroogd, gedetermineerd en opgemeten. Op basis van de aangetroffen wervels konden de lengtes van de gegeten vissen worden geschat, aan met behulp van een regressievergelijking uit Watt et al. (1997).

In het maagdarmkanaal van de bultrug werden wervels en een halve onderkaak gevonden van een kleine wijting, met een berekende lengte van 21.2 cm (van "neus"punt tot staartpunt) en een gewicht van 74.2 gram, en wervels van een zeer kleine wijting, van 13.7 cm; 19.3 gram (Figuur 3-4). Meer prooiresten werden niet aangetroffen: deze bultrug had enige tijd voor haar dood niet meer gegeten.



Figuur 3. Wervels van een wijting met een geschatte lengte van 21.2 cm (links) en wervels van een wijting met een geschatte lengte van 13.7 cm (rechts) uit het maagdarmkanaal van Bultrug MN2. NB: foto's met verschillende vergroting, zie schaalbalk rechts onder.

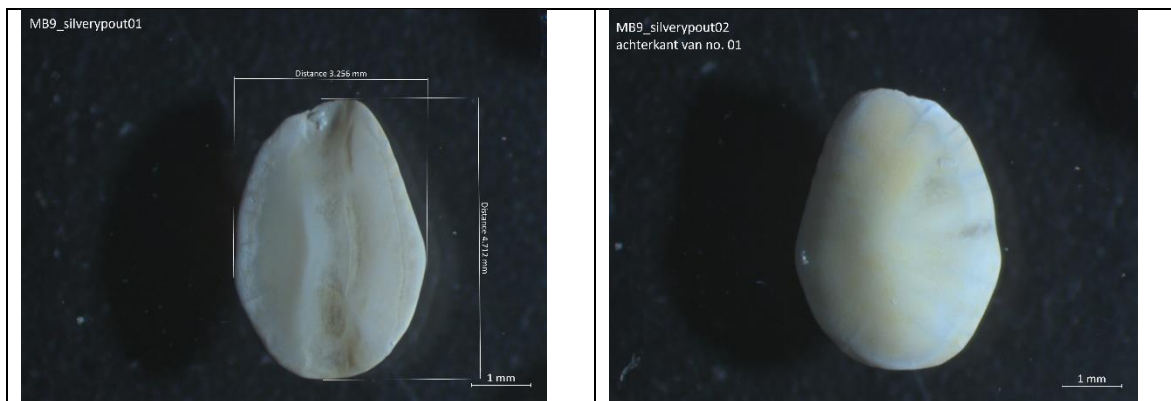


Figuur 4. Halve onderkaak van een wijting met een geschatte lengte van 21.2 cm (zijaanzicht, links en met zicht op de enkele rij tandenpockets, rechts) van een wijting uit het maagdarmkanaal van Bultrug MN2.

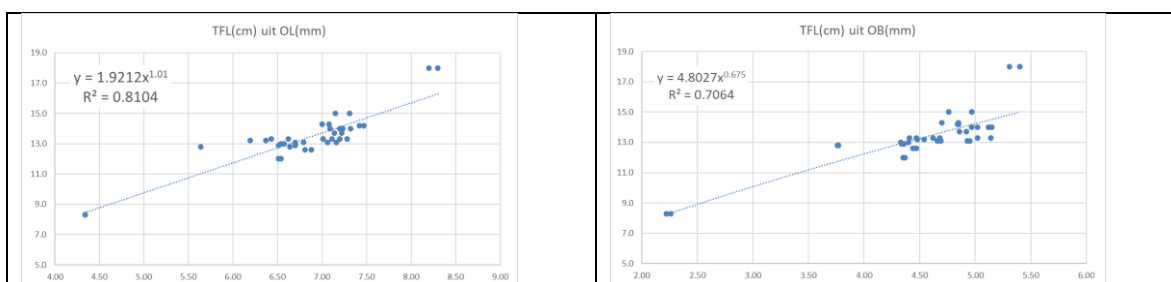
3.2.2 Gewone spitssnuitdolfijn

Hoewel de gewone spitssnuitdolfijn verre van vers en intact was ten tijden van de sectie, konden maag en darm nog gescheiden onderzocht worden op voedselresten. In de eerste maag werd een groot aantal ($n=101$) otolieten aangetroffen van kever, een kleine kabeljauwachtige, plus een enkele otoliet van blauwe wijting, plus 32 otolieten van (noordelijke) zilverkabeljauw (Figuur 5); in maag 2 werd nog een 33^{ste} zilverkabeljauwotoliet aangetroffen. Alle otolieten waren nog wel op soort te brengen, al waren ze zwaar versleten. Voor kever en blauwe wijting zijn regressievergelijkingen beschikbaar (Leopold et al. 2001) waarmee op basis van otolietlengte en -breedte de lengte en het gewicht van de bijbehorende vissen kan worden berekend. Voor zilverkabeljauw was slechts een regressievergelijking beschikbaar in Härkönen (1986), waarvan de auteur zelf zegt dat deze is gebaseerd op weinig referentiemateriaal, en dus weinig betrouwbaar is. Omdat voorzien was, dat deze soort op enig moment zou kunnen opduiken in te onderzoeken dieetmateriaal, was al eerder aan collega's van WMR IJmuiden gevraagd om aanvullend referentiemateriaal te verzamelen. Bij navraag bleek dit te zijn gebeurd en kon het materiaal van Härkönen worden aangevuld, zodat betere regressievergelijkingen konden worden verkregen (Figuur 6).

Gezamenlijk waren de otolieten goed voor 1.6 kg vis: 1368 gram kever, 196 gram zilverkabeljauw en 38 gram blauwe wijting. In de maag van de diep-duikende spitssnuitdolfijn werden geen inktvisbekjes aangetroffen. Dit is in overeenstemming met wat er bekend is van deze soort: een consument van vooral mesopelagische en demersale vissen. Het prooispectrum is wel opmerkelijk voor een dier dat op Texel aanspoelt. De drie gevonden prooisorten komen in de Noordzee alleen voor in het noorden en noordwesten (voorbij de Doggersbank), maar vooral ten westen van Schotland en Ierland (Heessen et al. 2015). Het is mogelijk dat deze spitssnuitdolfijn daar ergens het laatste maal vis heeft gegeten, daar is gestorven en vervolgens in een paar weken tijd ofwel vanuit de noordelijke Noordzee, of wel om Engeland heen, via Het Kanaal, naar Texel komen drijven. Het dier heeft met zekerheid niet in Nederlandse wateren gegeten.



Figuur 5. Voor- en achterkant van de minst versleten otoliet van noordelijke zilverkabeljauw, *Gadiculus argenteus*, uit de maag van de spitssnuitdolfijn.

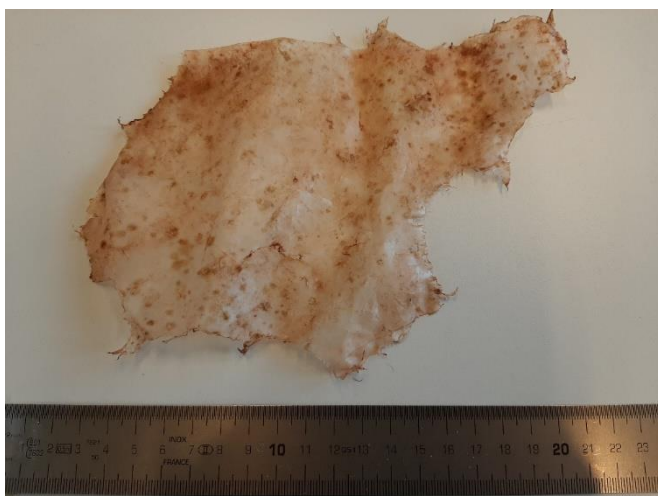


Figuur 6. Vislengte (cm) als functie van otolietlengte (mm, links) en otolietbreedte (mm, rechts). Drie vissen, met lengtes: 8.3, 12.8 en 18.0 cm, zijn van Härkönen (1986), de overige zijn nieuw referentie materiaal van WMR. De relatie tussen gewicht (in grammen) en lengte (in cm) van deze soort kan nu, op basis van het verzamelde materiaal worden beschreven als: $\text{Gewicht} = 0.0027 L^{3.4312}$

3.2.3 Orka

Op foto's gemaakt ten tijde van de stranding en bij de sectie op de orka van Cadzand was al te zien dat het dier ernstig was vermagerd. Nadere inspectie liet zien dat het dier een rottend gebit had, waarvan het tijdens het eten veel last gehad moet hebben. De voortekenen voor dieetonderzoek waren dus ongunstig.

De eerste maag bleek leeg, op een vel plastic na (Figuur 7), ter grootte van een hand en 2.65 gram zwaar. Ook in de 30.6 meter lange darm was geen enkele voedselrest meer te vinden. Deze orka had dus, op haar tocht naar Nederland, honger geleden.



Figuur 7. Plastic uit de eerste maag van de orka die strandde bij Cadzand.

4 Additioneel onderzoek

4.1 Contaminanten onderzoek orka

4.1.1 Materialen en methoden

Tijdens de autopsie in Utrecht zijn voor contaminanten analyses spier en blubber weefsels verzameld en naar Wageningen Marine Research in IJmuiden getransporteerd. De monsters zijn genomen en opgeslagen volgens standaardprotocollen voor contaminantenonderzoek. Monsteropslag is bij -20 °C. Analyses worden uitgevoerd volgens eerder gepubliceerde methodiek (zie: van den Heuvel-Greve et al. 2018; 2021) in 2023.

4.1.2 Resultaten en discussie

In afwachting van resultaten, welke in 2023 zullen worden gerapporteerd.

4.2 Gehoorschade onderzoek orka

4.2.1 Materialen en methoden

Gehoorbenen van walvisachtigen hebben twee kenmerkende componenten: het periotisch en het tympanisch bot, welke samen het tympano-periotisch complex vormen. Het binnenoor is onderdeel van het periotisch gedeelte en bestaat uit het evenwichtsorgaan en de cochlea (het slakkenhuis). De cochlea is onderdeel van het auditief systeem (gehoor) en bevat de gedeeltes waarmee geluidsfrequenties worden waargenomen (Ketten 1993, Morell et al. 2015, Cozzi et al. 2016). De cochlea heeft een spiraalvormige holte, waar zich in de wand haarcellen (ook wel zintuigcellen genoemd) bevinden, ook wel bekend als 'het orgaan van Corti'. Er zijn over het algemeen vier rijen haarcellen te onderscheiden: één rij van binnenste haarcellen en drie rijen van buitenste haarcellen (Morell et al. 2021). Gehoorschade door geluid is een resultaat van het over stimuleren van de haarcellen waarbij beschadigingen van de haarcellen het gehoor verminderen. Schade van de binnenste haarcel rij is permanent (PTS); deze kan zich niet herstellen, in tegenstelling tot de buitenste haarcellen waarbij herstel wel mogelijk is. Herstel na beschadiging betekent een tijdelijk gehoorverlies (TTS) (Ketten 1993, Ketten 2012). Door middel van beoordeling van de haarcellen kan dus onderzocht worden of walvisachtigen gehoorschade hadden toen ze strandden. Door beoordeling van de staat van de haarcellen en locatie van een aanwezige beschadiging kan een inschatting worden gemaakt van de ernst en oorzaak van de beschadiging.

Tijdens de autopsies van de orka zijn de hierboven beschreven gehoorbeentjes verzameld, geïnjecteerd en gefixeerd zodat het materiaal door ontbinding geen kwaliteit meer verloor. Het gebruikte fixatiemiddel was paraformaldehyde. Het veiligstellen van de weefsels is gedaan volgens eerder beschreven protocollen en methoden (Morell & André 2009). Het tijdstip van overlijden van de orka was bekend. Injectie vond plaats 12-14 uur na het tijdstip van overlijden. Het veiligstellen van de weefsels is binnen de kaders van deze onderzoeksopdracht uitgevoerd. De analyse wordt verder uitgevoerd door Dr. Maria Morell. Ontkalking van de gehoorbeentjes kan 6-9 maanden duren omdat het hier om botmateriaal gaat met een hoge dichtheid. Medium voor de ontkalking wordt wekelijks vervangen tot het materiaal geanalyseerd kan. Afhankelijk van de kwaliteit worden de gehoorbeentjes onderzocht door middel van elektronen microscopie (EM) of met immunofluorescentie, volgens methoden beschreven in Morell et al. (2015, 2017). Met deze analyse kan alleen letsel worden opgepikt wat een permanent trauma voor het dier heeft betekent. Een functionele verstoring die geen letsel veroorzaakt, kan niet worden gedetecteerd.

4.2.2 Resultaten en discussie

In afwachting van resultaten, welke in 2023 zullen worden gerapporteerd.

5 Conclusies

Op basis van alle tot nu toe beschikbare onderzoeksresultaten kan worden vastgesteld dat de drie onderzochte walvisachtigen waarop deze rapportage ingaat, allen een tekort aan voeding te grondslag aan hun doodsoorzaak hadden. De nog erg jonge bultrug was ernstig vermagerd en in slechte conditie, met onder andere veel plekken met parasieten op de huid. Mogelijk kampte dit dier met een virale infectie, maar dat wordt nader onderzocht. Ook werd een combinatie van verhongering en uitdroging vastgesteld naar aanleiding van het postmortale onderzoek op de gewone spitsnuitdolfijn. Dit dier is, net zoals vele voorgangers van dezelfde familie, door onduidelijke oorzaak uit de normale habitat geraakt en de zuidelijke Noordzee ingezwommen, of ingedreven. De orka kampte met een ernstige tandvleesontsteking en was vermoedelijk daardoor vermagerd. Daarnaast waren er ontstekingen in meerdere inwendige organen. De hersenvliesontsteking kan verklarend zijn voor de aanwezigheid van dit dier in de zuidelijke Noordzee. Het levend stranden is de orka uiteindelijk fataal geworden. De oorzaak of oorzaken van de verschillende inwendige ontstekingen wordt nog onderzocht.

De enige (tot nu toe) duidelijk antropogene invloed op deze dieren was de aanwezigheid van het plastic vel in de maag van de orka, wat niet doodsoorzaak gerelateerd was. Daarnaast had de bultrug enkele gebroken wervels, wat eventueel kan passen bij trauma zoals bijvoorbeeld een aanvaring, maar daarvan kon door de staat van ontbinding van het dier, niet worden vastgesteld of deze voor of na de dood zijn gebroken. We zijn nog in afwachting van een aantal aanvullende onderzoeken, onder andere naar contaminanten in en gehoorschade van de orka. Ten slotte is het goed om nogmaals te noemen dat indirecte oorzaken van menselijk handelen, zoals verstoring, moeilijk te meten zijn maar wel een effect kunnen hebben op de gezondheidsstatus, inclusief de werking van het immuunsysteem, van individuen. De informatie die verzameld kon worden tijdens de secties, alsmede de monsters opgeslagen in de tissuebank, kunnen in de toekomst worden gebruikt voor tal van aanvullende onderzoeken, waaronder naar opkomende natuurlijke en antropogene bedreigingen.

Literatuur

- Bravo Rebolledo E.L., IJsseldijk L.L., Solé L., Begeman L., de Vries S., van den Boom L., Camalich Carpizo J. & Leopold M.F. 2016. Unorthodox sampling of a fin whale's (*Balaenoptera physalus*) diet yields several new mesopelagic prey species. *Aquatic Mammals* 42: 417-420.
- Bravo Rebolledo E.L., van Franeker J.A., Jansen O.E. & Brasseur S.M.J.M. 2013. Plastic ingestion in harbour seals (*Phoca vitulina*) in the Netherlands. *Marine Pollution Bulletin*, 67, 200-202.
- Câmara, N., Sierra, E., Fernández, A., Suárez-Santana, C.M., Puig-Lozano, R., Arbelo, M., & Herráez, P. 2019. Skeletal and cardiac rhabdomyolysis in a live-stranded neonatal Bryde's Whale with fetal distress. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 476.
- Clapham, P. J. (2018). Humpback whale: *Megaptera novaeangliae*. In *Encyclopedia of marine mammals* (pp. 489-492). Academic Press.
- Cozzi, B., Huggenberger, S., & Oelschläger, H. 2016. Anatomy of dolphins: Insight into body structures and function. Academic Press Elsevier, London, pp 438.
- Desforges, J.P., Hall, A., McConnell, B., Rosing-Asvid, A., Barber, J.L., Brownlow, A., ... & Dietz, R. (2018). Predicting global killer whale population collapse from PCB pollution. *Science*, 361(6409), 1373-1376.
- Dierauf, L., & Gulland, F. M. (Eds.). 2001. CRC handbook of marine mammal medicine: Health, disease, and rehabilitation. CRC press.
- Härkönen T. 1986. Guide to the otoliths of the bony fishes of the northeast Atlantic. Danbiu ApS., Hellerup, 256 p.
- Heessen H.J.L., Daan N. & Hislop J.R. 2015. Fish atlas of the Celtic Sea, North Sea, and Baltic Sea. KNNV Publishing, Wageningen Academic Publishers, 572p.
- Herráez, P., De Los Monteros, A. E., Fernández, A., Edwards, J. F., Sacchini, S., & Sierra, E. 2013. Capture myopathy in live-stranded cetaceans. *The Veterinary Journal*, 196(2), 181-188.
- IJsseldijk, L.L., Brownlow, A.C., & Mazzariol, S. (Eds.) 2019. Best practice on cetacean post-mortem investigation and tissue sampling. Joint ACCOBAMS and ASCOBANS document. In: osf.io/zh4ra.
- IJsseldijk, L.L., van Schalkwijk, L. & Gröne, A. (Eds), 2022. Onderzoeksresultaten gestrande gewone spitsnuitdolfijnen Ter Heijde (2021). Pathologie, biologische gegevens en dieet onderzoek. Rapport Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Departement Biomoleculaire Health Sciences, Afdeling Pathologie.
- Jepson, P.D., Deaville, R., Barber, J.L., Aguilar, À., Borrell, A., Murphy, S., ... & Law, R.J. (2016). PCB pollution continues to impact populations of orcas and other dolphins in European waters. *Scientific Reports*, 6(1), 1-17.
- Ketten, D.R. 1993. 'The cetacean ear: form, frequency and evolution'. In: *Marine Mammal Sensory Systems*. Plenum Press New York, 53-75.
- Ketten, D.R. 2012. Marine Mammal Auditory System Noise Impacts: Evidence and Incidence. *The Effects of Noise on Aquatic Life*, 207-212.
- Lehnert, K., IJsseldijk, L.L., Uy, M. L., Boyi, J. O., van Schalkwijk, L., Tollenaar, E.A., ... & Siebert, U. (2021). Whale lice (*Isocyamus deltobranchium* & *Isocyamus delphinii*; *Cyamidae*) prevalence in odontocetes off the German and Dutch coasts—morphological and molecular characterization and health implications. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 15, 22-30.
- Leopold M.F., Damme C.J.G. van, Philippart C.J.M. & Winter C.J.N. 2002. Otoliths of North Sea fish: interactive guide of identification of fish from the SE North Sea, Wadden Sea and adjacent fresh waters by means of otoliths and other hard parts. CD-ROM, ETI, Amsterdam; http://otoliths-northsea.linnaeus.naturalis.nl/linnaeus_ng/app/views/matrixkey/?epi=87
- Leopold, M.F. (2020). Dieet- en plastic onderzoek. In: IJsseldijk, L.L. (Ed) Onderzoeksresultaten gestrande walvisachtigen 2020. Pathologie, life history en dieet onderzoek. Rapport Universiteit Utrecht, Departement Biomoleculaire Health Sciences, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht.

-
- Lewandrowski K, Chen A, & Januzzi J. 2002. Cardiac markers for myocardial infarction: a brief review. *American Journal of Clinical Pathology, Pathology Patterns Reviews*, 118, 93-9.
- Maio, E., Begeman, L., Bisselink, Y., van Tulden, P., Wiersma, L., Hiemstra, S., ... & van der Giessen, J. 2014. Identification and typing of *Brucella* spp. in stranded harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) on the Dutch coast. *Veterinary microbiology*, 173(1-2), 118-124.
- Morell, M. & André, M. 2009. Ear extraction and fixation protocol. Available from: http://www.zoology.ubc.ca/files/Ear_extraction_and_fixation_protocol_UBC.pdf
- Morell, M., Brownlow, A., McGovern, B., Raverty, S.A., Shadwick, R.E., & André, M. 2017. Implementation of a method to visualize noise-induced hearing loss in mass stranded cetaceans. *Scientific Reports*, 7, 41848.
- Morell, M., IJsseldijk, L. L., Piscitelli-Doshkov, M., Ostertag, S., Estrade, V., Haulena, M., ... & Shadwick, R. E. 2021. Cochlear apical morphology in toothed whales: Using the pairing hair cell—Deiters' cell as a marker to detect lesions. *The Anatomical Record*.
- Morell, M., Lenoir, M., Shadwick, R.E., Jauniaux, T., Dabin, W., ... & André, M. 2015. Ultrastructure of the Odontocete Organ of Corti: Scanning and transmission electron microscopy. *Journal of Comparative Neurology*, 523 (3), 431-448.
- Perrin, W.F., & Myrick, A.C. (Eds.) 1980. Age determination of toothed whales and sirenians (No. 3). International Whaling Commission.
- Smolarek-Benson, K. A., Manire, C. A., Ewing, R. Y., Saliki, J. T., Townsend, F. I., Ehlers, B., & Romero, C. H. 2006. Identification of novel alpha-and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. *Journal of virological methods*, 136(1-2): 261-266.
- Van den Heuvel-Greve, M.J., Kwadijk, C., & Kotterman, M. 2018. Contaminanten onderzoek. In: Lonneke L. IJsseldijk & Andrea Gröne (Eds.) 2018. Onderzoeksresultaten potvis Petten 2018: Pathologie, dieet en vervuiling. Intern rapport UU, Departement Pathobiologie, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht.
- van den Heuvel-Greve, M.J., van den Brink, A.M., Kotterman, M.J., Kwadijk, C.J., Geelhoed, S.C., Murphy, S., ... & IJsseldijk, L.L. 2021. Polluted porpoises: Generational transfer of organic contaminants in harbour porpoises from the southern North Sea. *Science of the Total Environment*, 796, 148936.
- Van Elk, C. E., Van de Bildt, M. W. G., Jauniaux, T., Hiemstra, S., Van Run, P. R. W. A., Foster, G., ... & Kuiken, T. 2014. Is dolphin morbillivirus virulent for white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris*)?. *Veterinary Pathology*, 51(6): 1174-1182.
- Van Franeker, J.A., Rebolledo, E.L.B., Hesse, E., IJsseldijk, L.L., Kühn, S., Leopold, M., & Mielke, L. 2018. Plastic ingestion by harbour porpoises *Phocoena phocoena* in the Netherlands: Establishing a standardised method. *Ambio*, 47(4), 387-397.
- VanDevanter, D.R., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1666-1671.
- Watt J., Pierce G.J. & Boyle P.R. 1997. Guide to the identification of North Sea fish using premaxillae and vertebrae. ICES Coop. Res. Report No. 220, International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen. https://ices-library.figshare.com/articles/report/Guide_to_the_identification_of_North_Sea_fish_using_Premaxillae_and_Vertebrae/18624431.