

**Overlevelse af enterokokker og
protozoen *Cryptosporidium parvum*
i urin fra mennesker**

Overlevelse af enterokokker og protozoen *Cryptosporidium parvum* i urin fra mennesker

Lise Tønner Jørgensen, Anita Forslund og Anders Dalsgaard
Den Kongelige veterinær- og landbohøjskole

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	11
1 INDLEDNING OG BAGGRUND FOR UNDERSØGELSERNE	15
1.1 MIKROORGANISMER OG SMITSTOFFER I URIN OG FÆKALIER	15
1.1.1 <i>Urin</i>	15
1.1.2 <i>Fækalier</i>	16
1.2 INDIKATORER TIL UNDERSØGELSE FOR FOREKOMST AF SMITSTOFFER	17
1.2.1 <i>Bakterielle indikatorer</i>	17
1.2.2 <i>Virale indikatorer</i>	18
1.2.3 <i>Parasitære indikatorer</i>	19
1.2.4 <i>Valg af måleparametre</i>	21
2 MATERIALER OG METODER	23
2.1 FORSØGSDESIGN	23
2.1.1 <i>Beskrivelse af lokaliteter og tanke for udtagelse af urin</i>	23
2.1.2 <i>Udtagelse af prøver på lokaliteterne</i>	24
2.1.3 <i>Opsætning af forsøg</i>	24
2.1.4 <i>Tidsplan for udtagelse af prøver</i>	26
2.1.5 <i>Måleprogram</i>	27
2.2 METODER	27
2.2.1 <i>Fysisk-kemiske metoder</i>	27
2.2.2 <i>Bakteriologiske metoder</i>	28
2.2.3 <i>Parasitologiske metoder</i>	30
2.2.4 <i>Statistisk analyse af resultater</i>	30
3 RESULTATER – PROJEKT 1 BAKTERIOLOGI	31
3.1 FYSISK-KEMISKE MÅLINGER	31
3.1.1 <i>Temperatur</i>	31
3.1.2 <i>pH</i>	31
3.1.3 <i>Ammoniumkoncentration</i>	32
3.1.4 <i>Sammenhæng mellem pH og ammoniumkoncentration</i>	34
3.2 BAKTERIOLOGISKE MÅLINGER	34
3.2.1 <i>Enterokokker</i>	34
3.2.2 <i>Suspekterte termotolerante coliforme</i>	45
3.3 DELKONKLUSIONER – PROJEKT 1 BAKTERIOLOGI	45
4 RESULTATER – PROJEKT 2 PARASITOLOGI	47
4.1 FYSISK-KEMISKE MÅLINGER	47
4.1.1 <i>Temperatur</i>	47
4.1.2 <i>pH</i>	47
4.1.3 <i>Ammoniumkoncentration</i>	47
4.2 PARASITOLOGISKE MÅLINGER	48
4.2.1 <i>Viabilitetsundersøgelser</i>	48
4.2.2 <i>Podningsforsøg</i>	48

4.3	BAKTERIOLOGISKE MÅLINGER	49
4.4	DELKONKLUSIONER – PROJEKT 2 PARASITOLOGI	49
5	DISKUSSION	51
5.1	PROJEKT 1 BAKTERIOLOGI	51
5.2	PROJEKT 2 PARASITOLOGI	52
6	KONKLUSION	55
6.1	PROJEKT 1 – BAKTERIOLOGI	55
6.2	PROJEKT 2 – PARASITOLOGI	56
7	LITTERATURLISTE	57

Bilag A Metodebeskrivelser for bakteriologiske undersøgelser

Bilag B Metode for viabilitetsundersøgelse af oocyster (æg) af *C. parvum* og for udtagelse af tarmsæt fra mus, samt oprensning af æg fra tarmsæt

Bilag C Antal suspekter termotolerante coliforme bakterier – Projekt 1

Bilag D Bakteriologiske målinger – Projekt 2

Forord

Denne rapport er en fælles afrapportering af resultaterne fra de to projekter "Undersøgelse af overlevelse og vækst af enterokokker og kimtal ved 37°C i lagret separeret urin" og "Undersøgelse af overlevelse, viabilitet og infektivitet af *Cryptosporidium parvum* og *Giardia* spp. i lagret separeret human urin" som blev gennemført i perioden 2002-2003.

Baggrunden for projekterne var resultater fra et tidligere projekt "Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land – Mikrobiologiske undersøgelser af lagret urin fra separationstoiletter" (Dalsgaard og Tarnow, 2001) finansieret af Miljøstyrelsen, som indikerede at nogle indikatorbakterier kunne udvise vækst i separeret lagret human urin. Der fandtes endvidere få protozoæg af *Cryptosporidium parvum* i enkelte urinopsamlingstanke som overlevede selv efter lang tids lagring, ligesom sådanne æg også kunne give infektion af mus. På denne baggrund ønskede Miljøstyrelsen at få disse problemstillinger yderligere belyst i kontrollerede laboratorieforsøg med henblik på at indhente data som ville kunne bruges til fastsættelse af hygienekrav og lagringstider for human urin som påtænkes anvendt til landbrugs- og havebrugsformål.

Undersøgelserne var opdelt i en bakteriologisk og en parasitologisk del som havde følgende formål:

1. **Bakteriologisk del, projekt 1:** at fastlægge om antal bakteriekim v/ 37°C og enterokokker øges ved lagring af human urin fra urinseparerende toiletter, samt at arts- og typebestemme bakterieisolater ved eventuel eftervækst.
2. **Parasitologisk del, projekt 2:** at fastlægge viabilitet af *Cryptosporidium parvum* oocyster i lagret separeret human urin, samt at bestemme infektivitet af lagrede *C. parvum* oocyster ved podningsforsøg i mus.

Projekterne, herunder laboratorieforsøgene, blev udført ved Institut for Veterinær Mikrobiologi, KVL. Undersøgelserne af overlevelse og infektivitet af *C. parvum* blev lavet i samarbejdet med afdeling for Patologi og Epidemiologi, Danmarks Veterinærinstitut.

Projekterne er blevet fulgt af en Styregruppe bestående af Linda Bagge fra Miljøstyrelsen, samt Anders Dalsgaard og Lise Tønner Jørgensen fra Institut for Veterinær Mikrobiologi, KVL.

Sammenfatning og konklusioner

Baggrunden for undersøgelserne i denne rapport var resultater fra et tidligere projekt finansieret af Miljøstyrelsen: "Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land – Mikrobiologiske undersøgelser af lagret urin fra separationstoiletter" (Dalsgaard og Tarnow, 2001), som indikerede at nogle indikatorbakterier kunne udvise vækst i separeret lagret human urin. Der fandtes endvidere få protozoæg af *Cryptosporidium parvum* i enkelte urinopsamlingsstanke som overlevede selv efter lang tids lagring, ligesom sådanne æg også kunne give infektion af mus. På denne baggrund ønskede Miljøstyrelsen at få disse problemstillinger yderligere belyst i kontrollerede laboratorieforsøg med henblik på at indhente data som ville kunne bruges til fastsættelse af hygienekrav og lagringstider for human urin som eventuelt påtænkes anvendt til landbrugs- og havebrugsformål.

Undersøgelserne bestod af to dele; dels en bakteriologisk del som adresserede spørgsmålet om mulig eftervækst af enterokokker og kimtal ved 37°C i lagret separeret urin fra mennesker og dels en parasitologisk del som undersøgte spørgsmålet om protozoen *C. parvum*'s overlevelse i lagret separeret urin fra mennesker.

Bakteriologisk del

Der blev udtaget urin fra 4 forskellige lokaliteter, repræsenterende dels tættere boligbyggeri (Lokalitet 1 og 2) og dels kolonihavehusstande (Lokalitet 3 og 4). Urinen blev lagret ved 4, 10 og 20°C i 6 måneder. Med ca. 1 måneds intervaller blev pH og ammoniumkoncentration målt samtidig med at den mikrobiologiske kvalitet blev bedømt ud fra antallet af indikatorbakterierne enterokokker, kimtal ved 37°C og suspekterede termotolerante coliforme.

pH holdt sig stabilt omkring en værdi på 8,5 til 9, men var højest i urin fra lokalitet 3 og 4 hvor der havde været mindst tilblending af vand fra toiletskyl. Ammoniumkoncentrationen var ligeledes stabil og højest ved Lokalitet 3 og 4 (ca. 8 ppm for åben tank og 16-17 ppm for lukket tank). Det højere pH og ammoniumniveau i den relativt mere koncentrerede urin fra lokaliteterne korrelerede med lavere startkimtal og dårligere kimtalsoverlevelse.

Efter en generel reduktion i antal enterokokker til under detektionsgrænsen (1 cfu per ml.) efter 1-4 måneders lagring, blev der efter 5-6 måneders lagring observeret en svag stigning i antal enterokokker efter lagring ved 4, 10 og 20°C. Denne stigning tyder på en øget overlevelse og/eller evne til multiplikation af enterokokker ved langvarig lagring af urin ved flere temperaturer. Enterokokker syntes derfor uegnede som indikatorer på fækel forurening i urin, idet deres forekomst kan indikere en længere overlevelse af eventuelt tilstedeværende patogene bakterier end hvad der reelt er tilfældet. Det bør istedet overvejes at anvende *E. coli* som indikator da denne syntes mere følsom i urin sammenlignet med enterokokker.

Da andre bakterieslægter og arter end *Enterococcus* eventuelt kan vokse på Slanetz & Bartley agarplader var det vigtigt at få bestemt slægt og art af de bakteriekolonier som voksede på agarpladerne. Det var endvidere også vigtigt

at få fastlagt om det var enkelte bakteriestammer (kloner) eller mange forskellige stammer som kunne overleve og opformeres i lagret urin. Dette blev fastlagt ved Pulsed Field Gel Elektroforese (PFGE; "DNA fingeraftryk") typning af bakterieisolaternes DNA.

Der blev ialt udvalgt 34 bakterieisolater fra Slanetz & Bartley agarplader, som alle kunne identificeres som tilførende slægten *Enterococcus* ved traditionel biokemisk karakterisering og PCR. Langt hovedparten af testede isolater fra Lokalitet 1 var *E. faecium*, som havde identisk PFGE type A. Dette indikerer, at disse isolater er tæt beslægtet, eksempelvis kan de stamme fra samme person og/eller de er klonalt relateret som følge af opformering i urinen. Det ser således ud til at en identisk *E. faecium* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre temperaturer. *E. faecium* betragtes normalt som en strikt fækal enterokokart, som kun i yderst begrænset omfang kan forekomme og overleve i det eksterne miljø.

Typning af *E. faecium* isolater fra Lokalitet 2 viste tre forskellige PFGE typer. Der forekom således flere forskellige *E. faecium* stammer i urinen som overlevede længere tids lagring og/eller havde evnen til at kunne opformeres. I urin fra Lokalitet 2 blev alle 12 bakterieisolater bestemt som *E. gallinarum*, en enterokokart som normalt forekommer hos fjerkræ. *E. gallinarum* blev isoleret fra såvel åben og lukket tank ved de tre undersøgte temperaturer og havde alle en identisk PFGE type F. Det ser således ud til at en identisk *E. gallinarum* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre temperaturer. Det er uvist om *E. gallinarum* stammen er blevet tilført urinopbevaringsbeholderne via afføring eller fra jordmiljøet, eksempelvis via utætheder i beholderne.

Der blev kun påvist en begrænset reduktion i kimtal ved 37°C i løbet af 6 måneders lagring af urin og også for denne parameter fandtes der tegn på genvækst. Anvendelse af kimtal ved 37°C til vurdering af den hygiejniske kvalitet af lagret urin syntes således begrænset på grund af genvækst.

Parasitologisk del

Der blev udtaget urin fra 2 forskellige lokaliteter, repræsenterende tættere boligbyggeri (Lokalitet 1 og 2). Urinen blev lagret ved 4, 10 og 20°C og med ca. en måneds interval målt der pH, ammoniumkoncentration samtidig med at den mikrobiologiske kvalitet blev bedømt udfra antallene af indikatorbakterierne enterokokker, kimtal ved 37°C og suspekterte termotolerante coliforme. Semipermeable kapsler indeholdende æg af protozoen *C. parvum* blev tilsat og udtaget efter 14 dage, 1 måned og 2 måneder. Æggene (oocysterne) blev dernæst undersøgt for deres levedygtighed (viabilitet) og smitsomhed (infektivitet) i mus.

Oocyster af *C. parvum* overlevede relativt kort tid i human urin, <14 dage ved 20°C og 1-2 måneder ved 10 og 4°C, ligesom ingen mus kunne inficeres med oocyster fra urin der havde været lagret 14 dage ved 20°C, 1 måned ved 10°C og 2 måneder ved 4°C. Der var således god overensstemmelse mellem resultater fra viabilitetsundersøgelser og podningsforsøg. Bestemmelse af manglende levedygtighed (<2% viable æg) med den anvendte cellefarvningsmetode til differentiering af levende og døde æg syntes således at kunne bruges som indikator for æggenes manglende smitsomhed .

I modsætning til tidligere danske undersøgelser, men i overensstemmelse med svenske undersøgelser, fandtes det derfor at urin der har været lagret i

minimum 2 måneder var fri for levedygtige (viable) og smitsomme (infektive) æg af *C. parvum*. En lagring på to måneder ville også betyde elimination af *Giardia* æg, idet denne protozo vides at være mere følsom overfor miljøpåvirkninger end *Cryptosporidium*. Der er derfor ikke lavet forsøg med overlevelse af *Giardia* i dette projekt.

Summary and conclusions

The background for the studies described in this report was the outcome of a previous project financed by the Danish EPA "Evaluation of the possibilities and constraints for re-circulating nutrients from cities to agriculture – microbiological studies of stored urine from urine separating toilets" (Dalsgaard and Tarnow, 2001). The former study indicated that some indicator bacteria could multiply in stored urine from separation toilets, and, thus, questioned the usefulness of using such indicators for assessing the hygienic quality of stored urine. Furthermore, a low number of protozoan oocysts (eggs) of *Cryptosporidium parvum* were found in a few urine storage tanks. These oocysts survived long-term storage and could infect mice in experimental infections. To follow up these findings, the Danish EPA wished to initiate controlled laboratory experiments for further assessments of these problems, with the aim of obtaining information that could possibly be used to define hygienic guidelines and suggest required storage times for human urine to be used in agri- and horticulture.

The studies were divided into two parts. The first part investigated the question of possible (re)growth of enterococci and total viable counts at 37°C in stored, separated human urine, and the second part investigated the survival of the protozoa *C. parvum*'s in stored, separated human urine.

Bacteriological part

Urine samples for the experiments were collected from four different localities and urine storage tanks representing densely populated urban housing areas (localities 1 and 2), and from garden allotments (localities 3 and 4). The urine was stored at 4, 10 and 20°C for up to six months. The pH, the ammonia concentration and microbiological parameters were measured at one month intervals. The microbiological quality of the urine was assessed based on numbers of the indicator bacteria enterococci, total viable counts at 37°C and suspected numbers of thermotolerant coliforms.

The pH values were stable around 8.5 to 9 and highest in urine from localities 3 and 4, where the use of water for flushing the toilets had been smaller. The ammonia concentration was also stable, with the highest concentrations found in urine from localities 3 and 4 (approx. 8 ppm for urine collected from open storage tanks and 16-17 ppm in urine from closed storage tanks). The higher pH and ammonia concentration in the relatively more concentrated urine from these localities correlated well with lower initial bacterial counts and reduced bacterial survival.

After 1-4 months storage, a general reduction was found in the number of enterococci, to below the detection limit (1 cfu per ml.). However, after 5-6 months a slight increase in numbers of enterococci was seen after storage at 4, 10 and 20°C. This indicates that enterococci can survive and/or multiply during long-term storage of human urine at different temperatures. Enterococci may therefore be poor indicators of faecal pollution of urine, because their occurrence will then indicate a longer survival of pathogens than is really the case. It should therefore be considered to use *E. coli* as an

indicator of faecal pollution, because the survival of *E. coli* seems more sensitive to the urine environment compared with enterococci.

As bacterial genres and species other than *Enterococcus* may grow on Slanetz & Bartley agar, it was important to determine the genus and species of the different bacterial colony types that grew on the agar plates. Furthermore, it was important to determine if only few bacterial types (clones) or many different bacterial types could survive and multiply in stored urine. Typing by the Pulsed Field Gel Electrophoresis technique (PFGE; "DNA finger printing") was used to show if few or many different bacterial types were isolated on Slanetz & Bartley agar.

All 34 bacterial isolates selected from the Slanetz & Bartley agar plates could be identified as belonging to the genus *Enterococcus* by traditional biochemical testing and PCR. The majority of tested isolates from locality 1 were *E. faecium* with an identical PFGE type A. This indicates that these isolates are closely related, i.e. the isolates may originate from the same person and/or the isolates belong to the same clone that has multiplied in the urine. Thus, it looks as if an identical *E. faecium* strain showed better survival and/or ability to multiply in the urine flasks stored at the three temperatures. The origin of *E. faecium* is normally seen as being strictly faecal, and it may only to a very limited degree be present and survive outside the gastro-intestinal tract.

PFGE typing of *E. faecium* isolates from locality 2 revealed three different PFGE types, which indicates that different *E. faecium* strains were present in the urine where they survived long-term storage and/or had the ability to multiply. All 12 bacterial isolates tested from locality 2 were identified as *E. gallinarum*, which is normally associated with poultry. *E. gallinarum* was isolated from both urine that originated from open and closed urine storage tanks at the three different temperatures under study, and all isolates had an identical PFGE type F. This suggests that an identical *E. gallinarum* strain showed increased survival and/or the ability to multiply in the urine flasks stored at the three different temperatures. It could not be determined if the *E. gallinarum* strains were introduced into the urine storage tanks through human faeces or from the soil environment, e.g. through leaks in the storage tanks.

Only a limited reduction was seen in total viable counts at 37°C during the six months storage. Slight increases in viable counts were seen in some urine flasks suggesting bacterial multiplication. The use of total viable counts at 37°C to assess the hygienic quality of stored urine seems limited because of an apparent ability for naturally occurring bacteria to multiply.

Parasitological part

Urine was collected and analyzed from two different localities representing densely populated urban areas (localities 1 and 2). Urine was stored at 4, 10 and 20°C with measurements of pH and ammonia being made monthly together with analyses of the microbiological quality, which was determined by enumerating the indicator bacteria: enterococci, total viable counts at 37°C, and suspected thermotolerant coliforms. Semi-permeable capsules containing *C. parvum* oocysts were inoculated into the urine, and samples were obtained for analysis after 14 days, one month, and after two months storage. The viability of the oocysts was then determined in colour staining assays, and the infectivity of the oocysts was assessed in experimental infection of mice.

Oocysts of *C. parvum* survived for a relatively short time in human urine, <14 days at 20°C and 1-2 months at 10 and 4°C. It was not possible to infect mice with oocysts from urine that had been stored for 14 days at 20°C, one month at 10°C and two months at 4°C. Thus, a good correlation was found between the results from the viability testing and the infection experiments with mice. The assessment of lack of viability (<2% viable oocysts) with the colour staining assay, which makes it possible to differentiate between live and dead oocysts, seems then to be a good indicator of the oocysts' ability to infect mice. Oocysts that can infect mice would normally also be able to infect humans.

In contrast to the previous Danish study (Dalsgaard and Tarnow, 2001), but in agreement with a Swedish study, it was shown that urine that had been stored for a minimum of two months did not contain viable and infective *C. parvum* oocysts. Two months storage would also eliminate eggs (ocysts) of *Giardia*, because this protozoa is seen as being more sensitive to environmental stress than *Cryptosporidium*. Accordingly, this project did not include any survival studies of *Giardia*.

1 Indledning og baggrund for undersøgelserne

Resultaterne af en tidligere undersøgelse finansieret af Miljøstyrelsen (Dalsgaard og Tarnow, 2001) indikerede, at kimalt 37°C og antal enterokokker, efter et markant fald efter 1-2 måneders lagring af separeret human urin, blev øget ved en efterfølgende 3-6 måneders lagring. Resultaterne tillod dog ikke en sikker vurdering af om der var tale om en reel vækst af kimalt 37°C og antal enterokokker.

Den samme undersøgelse viste også, at der forekom æg (oocyster) af parasitterne *Cryptosporidium parvum* og *Giardia* spp. i flere opsamlingstanke med human urin. Begge parasitter er protozoer og vigtige årsager til tarminfektioner hos mennesker. Deres udbredelse er dog ukendt i Danmark. Undersøgelserne viste endvidere, at æg af *C. parvum* var levende og medførte infektion i mus. Antal æg i urinprøverne var dog for lavt til gennemførelse af regelrette infektionsundersøgelser i mus.

Der var således et behov for at få fastlagt om antal kim ved 37°C og enterokokker vil kunne øges ved lagring af separeret urin. En eventuel vækst af disse bakteriegrupper vil kunne indikere, at egentlige bakterielle smitstoffer også vil kunne vokse i lagret urin, ligesom en kimaltvækst ville kunne stille spørgsmål ved anvendeligheden af de to parametre som bakterielle hygiejneindikatorer i urin. Trods påvisningen af *C. parvum* og *Giardia* spp. i separeret urin er det dog usikkert hvor længe parasitæggene kan overleve og opretholde deres infektivitet efter eksponering i lagret urin.

Projektet havde følgende formål:

Bakteriologisk del, projekt 1:

- at fastlægge om antal kim ved 37°C og enterokokker øges ved lagring af separeret urin
- at arts- og type (DNA-fingeraftryk) bestemme bakterieisolater som giver anledning til vækst/eftervækst.

Parasitologisk del, projekt 2:

- at fastlægge viabilitet af *C. parvum* og *Giardia* spp. æg i lagret separeret human urin
- at fastlægge infektiviteten af *C. parvum* og eventuel *Giardia* spp. æg ved podningsforsøg med mus.

1.1 Mikroorganismer og smitstoffer i urin og fækalier

1.1.1 Urin

Hos raske personer er urinen i urinblæren samt den øvre del af urinrøret steril. Ved transport af urinen i og ud af urinrøret blandes urinen med forskellige typer hudbakterier og når urinen forlader kroppen indeholder den typisk <10.000 bakterier per ml (Jönsson *et al.*, 2000).

1.1.1.1 Urinvejsinfektion

Ved urinvejsinfektion udskilles urin med høje koncentrationer ($> 10^5$ per ml) af patogene (smittsomme) bakterier (Thaysen *et al.*, 1986), der i 80% af tilfældene er *E. coli*. *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter* gruppen og enterokokker findes dog også som årsag til urinvejsinfektioner hos mennesker (Murray *et al.*, 1995). Det er usikkert i hvor stor udstrækning, at disse patogene mikroorganismer overlever og spredes i miljøet (Jönsson *et al.*, 2000). Der findes andre smitstoffer som kan spredes fra mennesker med urinen, herunder bakterierne *Leptospira* og *Salmonella typhi/paratyphi*, hvor spredning først er muligt når infektionen bliver systemisk, samt parasitten *Schistosoma* spp. som forårsager bilharziose hos mennesker. Disse sygdomme er dog meget sjældne under danske forhold, og man må formode at sandsynligheden for at finde disse smitstoffer i urin fra mennesker er lav.

1.1.2 Fækalier

I et urinseparerende toilet er den største risiko for tilførsel af smitstoffer til urinen forurening med fækalier. Risikoen synes størst, når brugerne er børn eller ved diarrétilfælde, men toiletudforming og brugererfarenhed har også betydning for tilblanding af urinen med fækalier. Diarrétilfælde, hvor smitstoffer findes i afføringen i høje koncentrationer ($>10^7$ bakterier pr. gram), repræsenterer den største risiko for tilførsel af smitstoffer til urinen.

1.1.2.1 Bakterier

De vigtigste bakterier som forårsager mave-tarminfektioner under danske forhold og som kan forventes at findes i fækalt-forurenede urin tilhører slægterne *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* samt visse typer af *E. coli*. Andre smitstoffer som kan findes i fækalier inkluderer slægterne *Listeria*, *Clostridium* og *Bacillus*. Disse bakterier er dog relativt sjældne årsager til sygdom hos mennesker. Under tropiske forhold er også *Vibrio cholerae* og *Shigella* typiske årsager til diarré hos mennesker. Ved diarré forårsaget af smitssomme bakterier vil et menneske i den akutte sygdomsfase typisk udskille $>10^7$ bakterier per gram fæces. Bakterier vil dog også blive udskilt i varierende tidsperioder før og især efter sygdomssymptomer optræder.

1.1.2.2 Virus

De vigtigste virus der kan spredes med humane fækalier er enterovirus (poliovirus, coxsackie virus), Hepatitis A, Norwalk like-virus (calicivirus), adenovirus og rotavirus (B. Böttiger, Statens Serum Institut, personlig meddelelse) (Murray *et al.*, 1995). Ved diarré forårsaget af virus vil et menneske typisk udskille 10^7 - 10^{10} vira per gram fæces. Selvom der forekommer begrænset viden om hyppigheden af mavetarm-infektioner forårsaget af virus, bl.a. grundet mangelfulde påvisningsmetoder, menes virus at være en hyppig årsag til sådanne infektioner. Virus må derfor forventes at være tilstede i fækalt-forurenede urin.

1.1.2.3 Parasitter

De vigtigste parasitter der kan tilføres urin i Danmark tilhører grupperne rundorme, bændelorme og protozoer. De hyppigste forekomne arter er: *Ascaris lumbricoides* (spolorm), *Enterobius vermicularis* (børneorm), *Taenia saginata* (bændelorm), *Dipyllobotrium latum* (menneskets brede bændelorm), samt protozoerne *Cryptosporidium parvum* og *Giardia duodenalis*. Mennesker kan smittes med spolorm og børneorm direkte ved kontaktsmitte eller ved oral

indtagelse af fækalt forurenede fødevarer. *C. parvum* og *G. duodenalis* kan smitte via fækalier fra dyr og mennesker. Betegnelsen *Giardia* diskuteres stadig i fagkredse, men der synes enighed om anvendelse af betegnelsen *Giardia duodenalis* (før benævnt *Giardia lamblia* eller *intestinalis*), og denne betegnelse vil efterfølgende blive brugt i rapporten. Æggene fra bændelorm skal optages og udvikles i en mellemvært (pattedyr eller fisk), før en infektion kan viderebringes til et andet menneske.

Hvis en person som benytter et separationstoilet udskiller parasitter med fækalier, kan disse tilføres urinen gennem fækal forurening. Selvom parasitter kan forårsage sygdomssymptomer, vil mennesker ofte have parasitinfektioner uden at vise sygdomstegn og den udskilte parasitmængde (æg) hos sådanne individer varierer betydeligt.

Forekomsten af rundorme, bændelorm og protozoer er ukendt, men menes lav i den danske befolkning.

1.2 Indikatorer til undersøgelse for forekomst af smitstoffer

1.2.1 Bakterielle indikatorer

Enterokokker

Enterokokker anvendes i flere sammenhænge som indikator på fækal forurening. Enterokokker er Gram-positive, katalase-negative kokker, der optræder parvis eller i korte kæder.

Definitionen af slægten *Enterococcus* omfatter nu 23 arter herunder arterne: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* og *E. malodoratus* (Facklam *et al.* 2002). Enterokokker udgør en del af gruppen af fækale streptokokker som inkluderer *S. bovis*, *S. suis*, og *S. equinus*. Analyse for enterokokker foretrækkes i dag i stedet for analyse for fækale streptokokker. De to betegnelser anvendes ofte synonymt, selvom dette ikke er helt korrekt.

Enterokokker findes i menneskers og dyrs tarmkanal og udviser generelt større resistens overfor udtørring, varme og andre ydre påvirkninger end *E. coli*, *Salmonella* og de fleste andre Gram-negative sygdomsfremkaldende bakterier. Ved at anvende enterokokker som indikatorbakterium synes der at være en god sikkerhed for, at henfaldet af disse modsvares af et tilsvarende eller hurtigere henfald af sygdomsfremkaldende bakterier.

Coliforme bakterier

Gruppen af coliforme bakterier er Gram-negative, stavformede, ikke-sporedannende bakterier som er laktose fermenterende ved 35-37°C med produktion af syre og gas. Bakterier der opfylder disse betingelser tilhører familien *Enterobacteriaceae*, som inkluderer *E. coli*, samt medlemmer af slægterne *Enterobacter*, *Klebsiella* og *Citrobacter* (Hurst *et al.*, 1997). Værdien af coliforme bakterier som fækale indikatorbakterier er tvivlsom, da bakterierne kan stamme fra andre miljøer end menneskers og dyrs mavetarmkanal, eksempelvis ikke-fækalt materiale tilført komposttoiletter. De er derfor mindre egnede som indikatorer for fækal forurening.

Termotolerante coliforme (fækale coliforme) bakterier

Gruppen af termotolerante coliforme bakterier opfylder alle kriterierne i definitionen af totale coliforme bakterier. De skal endvidere kunne fermentere laktose med produktion af syre og gas ved 44,0°C. Ved optælling af bakteriekolonier uden efterfølgende test for produktion af syre og gas kan

disse antal angives med betegnelsen suspekter. Disse udvidede testkriterier sammenlignet med gruppen af coliforme bakterier betyder, at bakterierne næsten udelukkende stammer fra menneskers og dyrs tarmkanal. En undtagelse er dog slægten *Klebsiella*, der er blevet isoleret fra miljøprøver uden fækal forurening (Hurst *et al.*, 1997). Termotolerante coliforme er således en bedre og mere specifik indikator for fækal forurening end totale coliforme bakterier.

E. coli

E. coli tilhører gruppen af termotolerante coliforme og findes udelukkende i dyrs og menneskers tarmkanal. Dette gør *E. coli* til den bedste indikator for fækal forurening i gruppen af coliforme bakterier. *E. coli* adskilles fra andre termotolerante coliforme ved mangel på urease enzymet og tilstedeværelse af enzymet beta-glucuronidase. Som indikatorbakterium er *E. coli* således velegnet til indikation på en frisk fækal forurening. *E. coli* overlever oftest kortere tid end enterokokker i det ydre miljø.

Antal udskilte indikatorbakterier i fækalier

I fækalier findes høje koncentrationer af de nævnte indikatorbakterier. Et raskt menneske udskiller i alt ca. 10^7 - 10^9 indikatorbakterier pr. gram fæces med nogen variation mellem de enkelt indikatorer.

Kimtal ved 37°C

De hyppigste anvendte metoder til påvisning af det totale antal af bakterier, som kan vokse ved 37°C, vil påvise enterokokker, *E. coli* og flere andre fækale indikatorbakterier, dog undtaget slægten *Clostridium*, som kun vokser ved strikt anaerobe forhold (iltfrie forhold). Bakterier, som vokser ved 37°C, vil dog også tilhøre en række andre slægter, der findes i fækalier, hvoraf flere kan forårsage sygdom hos mennesker. Kimtal ved 37°C anvendes derfor som en generel indikator for tilstedeværelsen af smitstoffer, ligesom et øget antal også kan indikerer en eventuel bakteriel vækst i lagret urin.

1.2.2 Virale indikatorer

Bakteriofager er virus som kun inficerer bakterier. Fagernes overlevelse i miljøet anvendes i stigende grad til at studere overlevelsen af sygdomsfremkaldende virus i miljøet. Flere forskellige bakteriofager har været foreslået som indikatorer bl.a. F-specifikke bakteriofager og colifager (Lewis, 1995; Tree *et al.*, 1997; Armon *et al.*, 1995). F-specifikke bakteriofager er især aktuelle som indikatorer, da de udviser stor resistens i miljøet og kan påvises ved relative simple og billige laboratoriemetoder. Betegnelsen F henviser til fagernes affinitet for bakteriers flageller.

Salmonella typhimurium fag 28B (Lilleengen 1948) har p.g.a. en relativ høj overlevelsessevne i miljøet sammenlignet med andre fager været anvendt i sporingsstudier til påvisning af forurening mellem afløb og rentvandsreservoir (Stenström 1996) og til at spore forurening af grundvand ved vanding med afløbsvand (Carlander *et al.* 2000, Johansson *et al.* 1998). *S. typhimurium* fag 28B har desuden været anvendt som hygiejneindikator ved kontrollering af termofile processer f.eks. ved vådkompostering (Eller 1995, Norin *et al.* 1996) og pasteurisering (Sahlström *et al.* 2003). Fag 28B er 60 nm i diameter og resistent overfor høje pH-værdier.

1.2.3 Parasitære indikatorer

I dette projekt blev *Cryptosporidium parvum* benyttet som indikator på protozoers overlevelse i lagret urin fra mennesker. Protozoer er små encellede parasitter som udvikles i tarmkanalen af fugle og pattedyr, inklusive mennesket. Der findes forskellige undertyper af *Cryptosporidium* hvoraf *C. parvum* og *C. hominis* kan smitte mennesker. *C. parvum* er en relativ almindelig infektion i kvægbruget, som især giver sygdomsproblemer hos spædkalve (Enemark, 2002). Da *Giardia* æg er mere følsom overfor miljøpåvirkninger end *Cryptosporidium* er der ikke lavet forsøg med overlevelse af *Giardia* i dette projekt.

C. parvum blev første gang sat i forbindelse med infektion hos mennesker i midten af 70'erne og der er siden da rapporteret et stigende antal tilfælde af infektion med denne parasit både i udviklingslande og i den industrialiserede del af verden. Udbrud i den industrialiserede del af verden skyldes ofte en forurening af vandreservoirer og overfladevand som benyttes til drikkevand, hvorimod en forurening af grundvand med denne parasit ikke anses for at være særlig sandsynlig. Til de største udbrud af *C. parvum*-infektion hører et udbrud i 1994 i Milwaukee i USA, hvor mere 400.000 mennesker blev angrebet af diarré (Mac Kenzie *et al.*, 1994).

I Danmark blev der i 2002 diagnosticeret i alt 38 tilfælde af cryptosporidiose ved Statens Seruminstitut (Anonymous, 2003). Tidligere undersøgelser har vist at i ca. 80% af diagnosticerede tilfælde af cryptosporidiose er der tale om infektioner erhvervet i udlandet.

Hos mennesket er infektionen problematisk og i visse tilfælde livstruende hos individer med et svækket immunforsvar (specielt AIDS patienter). Hos voksne raske individer er infektionen derimod selvbegrænsende med en inkubationstid på 2-10 dage samt et sygdomsforløb på op til 2 uger med vandig diarré, mavekrampe og let feber. Hos nogle individer ses et symptomløst forløb.

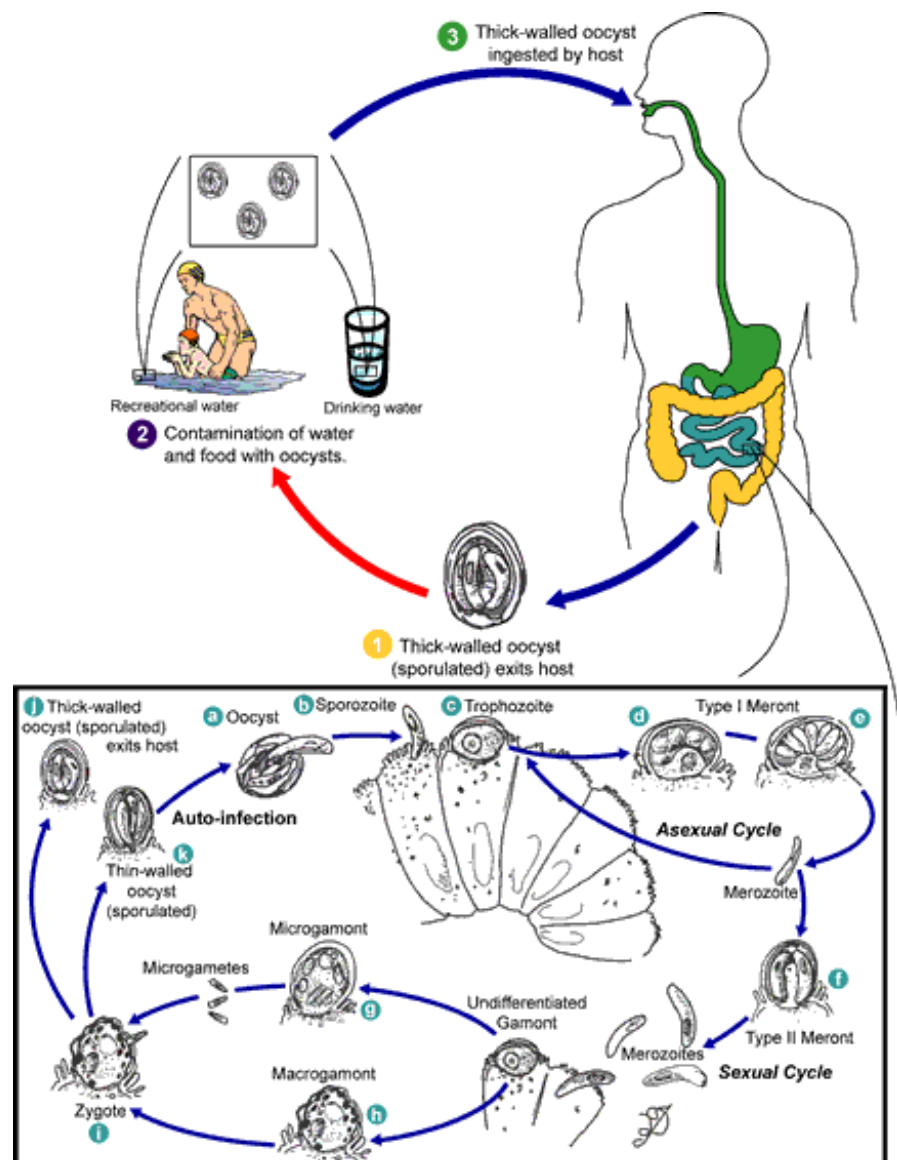
C. parvum er en obligat intracellulær parasit, som gennemgår sin ukønnede og kønnede formering inden i tarmslimhindecellerne. Livscyklus, som er skitseret i figur 1, består kort af de følgende faser. De angivne numre og bogstaver i parentes henviser til figuren:

- oocyster/æg af *C. parvum* optages via fækal forurennet vand eller fødevarer (3)
- i mavetarmkanalen frigiver æggene såkaldte sporozoiter, som er i stand til at fastgøre sig til tarmslimhindecellerne og smitte disse
- ukønnet formering som producerer merozoiter der kan smitte flere tarmslimhindeceller (c, d, e)
- kønnet formering som resulterer i produktion af nye æg indeholdende de smitsomme sporozoiter (f, g, h, i, j, k).
- de smitsomme æg udskilles dernæst med værtsdyrets/menneskets fækalier (1)

Perioden fra de smitsomme æg optages til nye æg kan findes i det smittede individs fækalier benævnes præpatensperioden og er for *C. parvum*s vedkommende 2-14 dage afhængig af hvilken dyreart eller menneske der er vært for infektionen.

Figur 1 *C. parvum* livscyklus.

Nærmere detaljer af livscyklus er beskrevet i teksten ovenfor.



Fra hjemmesiden for: Division of Parasitic Diseases, Center for Disease Control and Prevention, USA[ad2]; http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm

C. parvum har en relativ god overlevelse i miljøet. Overlevelse i vand har vist sig at være op til ca. seks måneder ved temperaturer omkring 4°C (Fayer *et al.*, 1998; Olsson *et al.*, 1999), hvorimod overlevelsen i urin ifølge svenske undersøgelser er markant kortere, nemlig omkring to måneder ved 4°C (Höglund og Stenström, 1999). Danske undersøgelser fra 2001 har dog peget på en noget længere overlevelse af æg af *C. parvum* i lagringstanke til urin fra mennesker, nemlig op til seks måneders overlevelse ved temperaturer under 10°C (Dalsgaard og Tarnow, 2001). Udover temperatur er koncentrationen af ammoniak også af betydning for *C. parvum* æggenes overlevelse i miljøet. Således overlever æggene kortere tid ved høj temperatur og ammoniak koncentration i det omgivende miljø.

I dette projekt blev mus benyttet til podningsforsøg for med stor sikkerhed at kunne fastlægge at æg af *C. parvum* som var fundet ikke levende i et farveassay heller ikke var smitsomme. Den anvendte metode til at teste om æggene er smitsomme ved podningsforsøg i museunger er almindelig anerkendt og beskrevet i rapportens metodeafsnit. Det skal dog bemærkes, at man i nær fremtid forventes at kunne udføre testen for ægs smitsomhed med større sikkerhed i celle assays. Assays baseret på forskellige cellelinier bliver i disse år udviklet og vil i vid udstrækning kunne reducere brugen af levende forsøgsdyr.

1.2.4 Valg af måleparametre

1.2.4.1 Mikrobiologiske måleparametre

Med henvisning til projekternes formål beskrevet i forordet og kapitel 1, blev overlevelse af følgende mikrobiologiske parametre i separeret lagret human urin undersøgt:

- Enterokokker
- Kintal ved 37°C
- Æg (oocyster) af protozoen *C. parvum*

Protozoer af arten *Giardia* spp. blev ikke undersøgt for deres overlevelse i human urin, idet *C. parvum* anses for at være repræsentativ for protozoers overlevelse i urin. Tidligere sammenlignende undersøgelser af disse to protozoers overlevelse har vist, at *Giardia* er langt mere følsom overfor miljøpåvirkninger end *Cryptosporidium* (Olson *et al.*, 1999). Det må derfor antages, at *Cryptosporidium* er en bedre indikator end *Giardia* til fastlæggelse af overlevelsestider for protozoer.

1.2.4.2 Fysisk-kemiske måleparametre

Følgende fysisk-kemiske måleparametre blev målt i den separerede lagrede human urin:

- pH
- Ammonium

Disse parametre vides at være af betydning for mikroorganismers overlevelse i forskellige medier, inklusiv i urin.

I urinlagringstanke vil pH relativt hurtigt stabilisere sig på omkring 9, idet kvælstof bundet i urea frigøres som ammonium-ioner der så igen vil frigøres som ammoniak (NH_3). Der etableres derefter hurtigt en ligevægt mellem ammoniak og ammonium (NH_4^+). Ved at måle ammonium koncentration i urinen får man et indirekte mål på den aktuelle ammoniak-koncentration, som er relativt stabil ved et pH på ca. 9.

Det er vist, at *C. parvum* æg og bakteriers overlevelse i urin ikke alene er bestemt af pH men også af ammoniak koncentrationen (Höglund *et al.*, 1999), samt at den negative effekt af ammoniak på overlevelsen af *C. parvum* æg er større ved høje temperaturer (Jenkins *et al.*, 1998).

2 Materialer og metoder

2.1 Forsøgsdesign

2.1.1 Beskrivelse af lokaliteter og tanke for udtagelse af urin

Lokalitet 1 var en relativ nyetableret økologisk bebyggelse. Alle husstande har installeret urinseparerende toiletter. Der blev til undersøgelserne udtaget urin fra en tank der havde været aflukket i ca. 2 måneder, samt fra en tank der var ved at blive fyldt. Begge tanke var tilsluttet familieboliger.

Lokalitet 2 var et alment boligbyggeri, som er repræsentativt for tæt, lavt almennyttigt boligbyggeri i Danmark. Der var i alt 390 lejligheder og 800 beboere. Urinseparerende toiletter var installeret i 9 lejligheder med i alt 16 voksne og 10 børn. Toiletterne var af typen WM ekologen, hvor vandforbruget er ca. 1-3 dl ved urinskyl. Urinen blev opsamlet fra husstandene og tilledt fem tanke på hver 15 m³. Til undersøgelserne blev der udtaget urin fra en tank der havde været aflukket i ca. 1 måned, samt fra en tank der var under opfyldning.

Lokalitet 3 og 4 var kolonihaver, hvor der blev udtaget urin fra to husstande med urinseparerende toilet, begge ved ældre ægtepar med børn og børnebørn. I begge husstande var tankene i brug ved udtagelsen af prøverne. De undersøgte kolonihaver repræsenterer lavteknologiske toiletsystemer med kort afstand mellem toilet og opsamlingsbeholder. Der var i alt 100 haver med separationstoiletter og urinen blev typisk opsamlet i 25-liters beholdere. Dog havde to udvalgte haver urinopsamlingsbeholdere på 220 liter.

Tabel 1. Projekt 1 - Bakteriologi. Generelle oplysninger om de udtagne urinprøver (urin udtaget 7. og 8. oktober 2002)

Lokalitet	Tank nr.	Tankvolumen (Liter)	Brugere	Volumen af vandskyl	Status mht. urintilførsel	Temperatur ved prøveudtagelse (°C)	pH ved prøveudtagelse ^a	Urinens farve
1	2	16000	Familier	1-2 dl/toiletbesøg	Åbnet: 1/5 Lukket: 11/8	12,5	S: 8,9 Ø: 8,4	S: oliven Ø: gulgrøn
1	4	16000	Familier	1-2 dl/toiletbesøg	Åbnet: 11/8 Lukket: nej	11,8	S: 9,0 Ø: 8,7	S: mørk, gul Ø: gul
2	3	3000	Familier	Ikke oplyst	Åbnet: 28/5 Lukket: 9/9	14,5	S: 8,5 Ø: 8,7	S: gul, klar Ø: gul, klar
2	4	3000	Familier	Ikke oplyst	Åbnet: 9/9 Lukket: nej	14,0	S: 8,7 Ø: 8,7	S: gul, klar Ø: gul, klar
3	-	220	Ægtepar, børn og børnebørn	en kop vand engang imellem	Åbnet: 1/3 Lukket: 1/10	11,8	S: 8,9 Ø: 8,9	S: mørk brun Ø: mørk brun
4	-	220	Ægtepar, børn og børnebørn	en kop vand engang imellem	Åbnet: 15/8 Lukket: nej	11,2	S: 9,0 Ø: 9,0	S: gulorange, hvidt bundfald Ø: gulorange

^a S = sediment i urinlagringstank; Ø = øvrig urin

2.1.2 Udtagelse af prøver på lokaliteterne

Ved udtagelsen af prøverne blev der benyttet en steril plastiksonde med en indre diameter på 1 cm. Sonden blev fastgjort med plastictape på et plastisoleringsrør, således at spidsen af sonden kunne føres helt ned til bunden af de enkelte tanke. Mellem brug af sonde og rør blev disse rengjort grundigt og sonden blev efterfølgende autoklaveret. Til udtagelse af prøver blev en 140-ml engangsplastsprøjte monteret på den ene ende af plastisonden og herigennem blev prøverne fra bunden af tankene ("sediment") udtaget. I alt 1,5 liter sediment blev udtaget og opbevaret i en steril glasflaske på køl indtil forsøget blev igangsat. De såkaldte sedimentprøver var således en blanding af sediment og vand. Dernæst blev der udtaget 15 liter af urinen øverst i tanken ved hjælp af en 10-liters plastikspand. Urinen fra den øvre del af tanken blev opbevaret i 5-liters plastdunke på køl indtil forsøget blev igangsat. Ved udtagelsen af urin målte pH og temperatur umiddelbart efter udtagelse samt ved hjemkomst til laboratoriet. Ligeledes blev urinens udseende bedømt umiddelbart efter udtagelse.

Der blev udtaget prøver til analyse af såvel sediment og urin, idet den højeste koncentration af fækale indikatorer (både bakterielle og parasitære) forventes at være i sedimentprøver fra bunden af tankene. De to prøvetyper blev udtaget idet en egentlig opblanding af sediment med øvrig urin i selve tanken ikke var mulig.

2.1.3 Opsætning af forsøg

Den udtagne urin blev opbevaret i 2-L sterile glasflasker og lagret i køleskabe eller varmeskabe ved 4, 10 og 20°C. Flaskerne var under lagringen omviklet med sorte plasticposer for at forhindre lysgennemtrængning.

2.1.3.1 Valg af temperaturer

Temperaturerne 4 og 10°C repræsenterer temperaturer i nedgravede urinlagringstanke. En temperatur på 4°C repræsenterer desuden et 'worst case' scenario, idet de fleste mikroorganismer generelt overlever længst ved

sådanne lave temperaturer. I rapporten fra 2001 (Dalsgaard og Tarnow, 2001) blev der målt ned til 5,5°C i nedgravede urinlagringstanke og i Sverige har man målt mellem 0 og 10°C i nedgravede tanke (Jönsson *et al.*, 1997). Valg af den laveste lagringstemperatur til 4°C gjorde det endvidere muligt umiddelbart at kunne sammenligne med resultaterne fra en række svenske undersøgelser, både m.h.t. bakteriologiske og parasitologiske fund. Dalsgaard og Tarnow (2001) fandt en sandsynlig eftervækst af enterokokker i urinlagringstanke omkring maj til juni måned når temperaturen i disse nåede op på ca. 10°C og da *Enterococcus* spp. vokser bedst ved 10-45°C, var det derfor hensigtsmæssigt at have en inkubations-temperatur på 10°C.

Med hensyn til protozoen *Cryptosporidium*, overlever denne længst ved en temperatur på 4°C, men 10 og 20°C blev også undersøgt for at kunne relatere parasiternes overlevelse til de faktiske temperaturforhold i nedgravede og ikke-nedgravede urinlagringstanke.

2.1.3.2 Valg af volumen

I de svenske og andre undersøgelser er der i undersøgelser af *Cryptosporidium* ægs overlevelse i vand og urin anvendt små volumener, ex. 1, 2, 4 og 5 ml (Fayer *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 1999; Höglund og Stenström, 1999; Freire-Santos *et al.*, 2000). Ved at anvendte større urinvolumener i dette projekt (2 liter) opnåes en bedre model for en urinlagringstank. Der vil bl.a. være en større bundflade til etablering af sediment og biofilm, som menes at være af betydning for både bakteriers og parasiters overlevelse i urinlagringstanke (Sundin *et al.*, 1999; Schönning *et al.*, 2002). Desuden vil der lettere kunne opretholdes et stabilt niveau af pH og ammoniak svarende til forholdene i en urinlagringstank.

Inden forsøget blev sat op blev der foretaget bakteriologiske målinger på urinen for at vurdere om ekstra tilsætning af fækalier var nødvendig. Der fandtes mellem 10¹ og 10⁴ cfu/ml af enterokokker og mellem 10² og 10⁶ af kim ved 37°C. Dette blev vurderet som tilstrækkeligt udgangsmateriale for de videre undersøgelser og der blev derfor ikke tilsat ekstra fækalier til urinen.

I parasitologiske undersøgelser af urinen inden igangsætning af forsøget fandtes ingen æg af *C. parvum* eller æg af rundormparasitter.

2.1.3.3 Projekt 1 – Bakteriologi

Der blev opsat to flasker (replikater) for hver kombination af lokalitet, tank og temperatur. I hver flaske blev 200 ml fra sedimentet i en given urinlagringstank blandet med 1.800 ml urin fra den samme tank. Der blev tilsat en steril magnet til hver glasflaske, så omrøring var mulig forud for prøveudtagning.

Der blev foretaget fysisk-kemiske og bakteriologiske målinger ved lagringens start (T-0) og derefter med ca. 1 måneders interval op til T-6, dvs. efter seks måneders lagring (Tabel 2). Til undersøgelse af mulig eftervækst af enterokokker blev det besluttet at udtage en ekstra prøve efter otte måneders lagring (T-8) fra flasker hv or der havde været positivt fund af enterokokker ved T-6.

2.1.3.4 Projekt 2 – Parasitologi

I denne del af forsøget blev der brugt urin fra en åben tank ved lokalitet 1 og en åben tank ved Lokalitet 2. Der blev opsat en flaske for hver kombination af lokalitet, tank og temperatur. I hver flaske blev 200 ml fra sedimentet i en

given urinlagringstank blandet med 1.800 ml urin fra den samme tank. Til disse flasker blev der tilsat 2 semipermeable kapsler til hver prøveudtagningstidspunkt, ialt 18 kapsler per flaske. Der blev desuden opsat kontrolflasker indeholdende 1 liter fosfatbuffer (PBS) hvortil kapsler indeholdende parasitæg også blev tilsat.

Semipermeable kapsler blev benyttet til de parasitologiske undersøgelser, da det dels var ønskeligt at undgå spredning af de smitsomme parasitæg til hele urinvolumen og kapslerne gjorde det endvidere muligt at opretholde en relativ høj koncentration af æg. Sidstnævnte var nødvendig da der var et begrænset antal parasitæg til rådighed. Kapslerne er beskrevet i detaljer under afsnittet om parasitologiske metoder.

Der blev foretaget fysisk-kemiske og parasitologiske målinger ved lagringens start (T-0) og derefter med ca. 1 måneds interval op til T-2 for alle temperaturer. Forsøget blev afsluttet ved T-2 eftersom *C. parvum* æggene alle var døde og ikke infektiøse på dette tidspunkt (Tabel 3). For urin lagret ved 20°C blev der også udtaget prøver efter 14 dages lagring (T-14 dage) idet æg normalt vil dø relativt hurtigt ved denne temperatur.

2.1.4 Tidsplan for udtagelse af prøver

Der blev undtaget prøver med 1 måneds tidsintervaller med start tidspunkt angivet som T-0.

Tabel 2 Prøveudtagningstidspunkter projekt 1, Bakteriologisk del

Lokalitet	Tank Type	Lagrings-temperatur (°C)	Prøveudtagningstidspunkt (måned) efter T-0					
			T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6
1	Åben	4	X	X	X	X	X	X
1	Åben	10	X	X	X	X	X	X
1	Åben	20	X	X	X	X	X	X
1	Lukket	4	X	X	X	X	X	X
1	Lukket	10	X	X	X	X	X	X
1	Lukket	20	X	X	X	X	X	X
2	Åben	4	X	X	X	X	X	X
2	Åben	10	X	X	X	X	X	X
2	Åben	20	X	X	X	X	X	X
2	Lukket	4	X	X	X	X	X	X
2	Lukket	10	X	X	X	X	X	X
2	Lukket	20	X	X	X	X	X	X
3	Lukket	4	X	X	X	X	X	X
3	Lukket	10	X	X	X	X	X	X
3	Lukket	20	X	X	X	X	X	X
4	Lukket	4	X	X	X	X	X	X
4	Lukket	10	X	X	X	X	X	X
4	Lukket	20	X	X	X	X	X	X

X = der blev udtaget prøver til bakteriologisk undersøgelse, samt prøver til pH-måling og ammoniumbestemmelse.

Tabel 3 Prøveudtagningstidspunkter projekt 2, parasitologisk del
(Cryptosporidium parvum overlevelse i urin)

Lokalitet	Tank	Lagrings- temperatur (°C)	Prøveudtagningstidspunkt (måned) efter T-0		
			T-14 dage	T-1	T-2
Lokalitet 1	Åben	4		X	X
Lokalitet 1	Åben	10		X	X
Lokalitet 1	Åben	20	X	X	
Lokalitet 2	Åben	4		X	X
Lokalitet 2	Åben	10		X	X
Lokalitet 2	Åben	20	X	X	
Kontrol	PBS	4		Y	Y
Kontrol	PBS	10		Y	Y
Kontrol	PBS	20	Y	Y	

X = der blev udtaget 2 kapsler fra hver 2-liters beholder og der blev ligeledes udtaget prøver til bakteriologisk undersøgelse, pH-måling og til ammoniumbestemmelse.

Y = der blev udtaget 1 kapsel fra hver 2-liters beholder og der blev ligeledes udtaget prøver til bakteriologisk undersøgelse, pH-måling og til ammoniumbestemmelse.

PBS = fosfat buffer

2.1.5 Måleprogram

I tabel 4 nedenfor er angivet måleprogrammet for de bakteriologiske og parasitologiske undersøgelser sammen med de anvendte metoder. Metoderne er beskrevet i detalje nedenfor.

Tabel 4 Måleprogram for projekt 1 (bakteriologisk del) og projekt 2 (parasitologisk del).

Parametre	Metode	Projekt 1	Projekt 2
pH	Calomel elektrode	X	X
Ammoniumkoncentration	Flow-injektionsanalyse og gas diffusion	X	X
Enterokokker	DS 2401	X	X
Kimtal ved 37°C	DS/EN ISO 6222	X	X
Termotolerante coliforme	Mod. ISO/DIS 9308-1	X	X
<i>Cryptosporidium</i> viabilitet	DAPI/PI farvning	-	X
<i>Cryptosporidium</i> infektivitet	Podning i mus	-	X

2.2 Metoder

2.2.1 Fysisk-kemiske metoder

2.2.1.1 Temperatur

Temperatur i inkubatorer og kølerum blev målt 2 gange per uge.

2.2.1.2 pH

Der blev udtaget 25 ml urin ved hver prøveudtagning til måling af pH. pH-meter (Radiometer) med Calomel elektrode blev benyttet til pH-målinger.

2.2.1.3 Ammonium koncentration

Der blev ved hver prøveudtagning udtaget 1 ml prøver fra alle 2-liters flasker med urin. Prøverne blev fortyndet med sterilt vand, og urin fra Lokalitet 1 og 2 blev således fortyndet 100 x, og urin fra Lokalitet 3 og 4 blev fortyndet 150 x. pH blev efterfølgende justeret til mellem 3,5 og 4,5.

Volumener af ca. 10 ml blev derefter sterilfiltreret igennem et 0,2 µm membranfilter og prøverne blev efterfølgende opbevaret ved -20°C indtil den videre analyse blev foretaget ved Kemisk Institut, KVL. Der blev udført

dobbeltbestemmelser på prøverne og et gennemsnit af de to målinger blev beregnet.

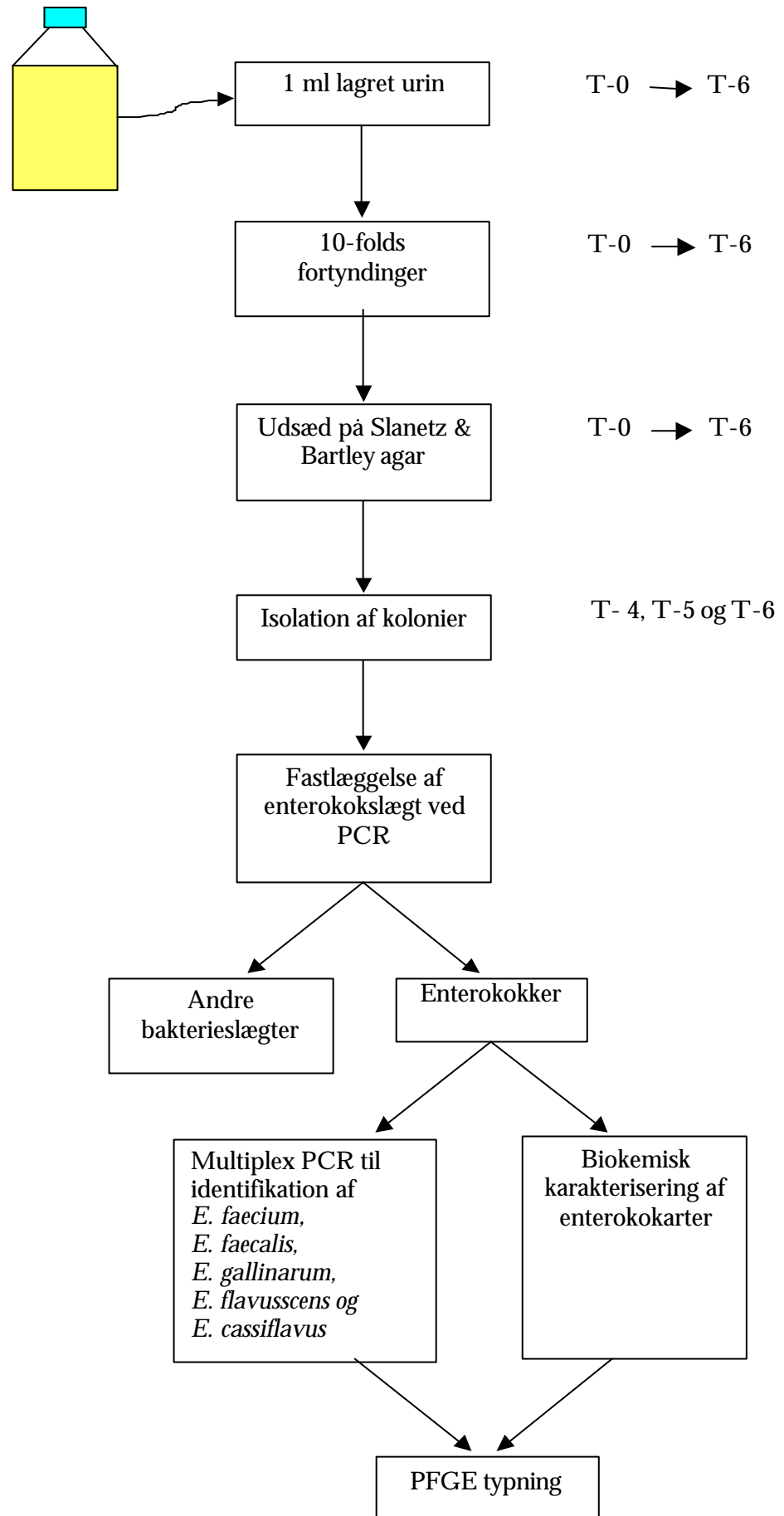
Analyse for ammonium ved flow-injektionsanalyse og gas diffusion foregik ved at en prøve, tilpas fortyndet med vand, blev ledt ind i en mikrokanaal hvor natriumhydroxid blev tilblandet. Dette forårsager at alt ammonium omdannes til gassen ammoniak som derefter kan passere gennem en membran. Koncentrationen af den frigivne ammoniak bestemmes ved hjælp af en indikator og måling af dennes farveintensitet ved en bestemt bølgelængde.

2.2.2 Bakteriologiske metoder

2.2.2.1 *Enterokokker*

Antal enterokokker blev bestemt ved tælling af typiske røde-rødbrune kolonier på Slanetz & Bartley agar ved 44°C i 48 timer \pm 4 timer (DS 2401). Denne metode blev tidligere fundet velegnet til bestemmelse af enterokokker i urin (Dalsgaard og Tarnow, 2001). Detektionsgrænsen for undersøgelsen var 1 cfu/ml. Glasflaskerne blev placeret på en magnetomrører i 60 sekunder før prøveudtagning for at opnå homogen opblandning af urin og sediment. Urinprøverne (1 ml) blev udtaget sterilt fra glasflaskerne og fortyndet ved 10-folds fortyndinger. Figur 2 viser forløbet fra udtagelse af prøver fra urinflasker til karakterisering og typning af isolater fra Slanetz & Bartley agar.

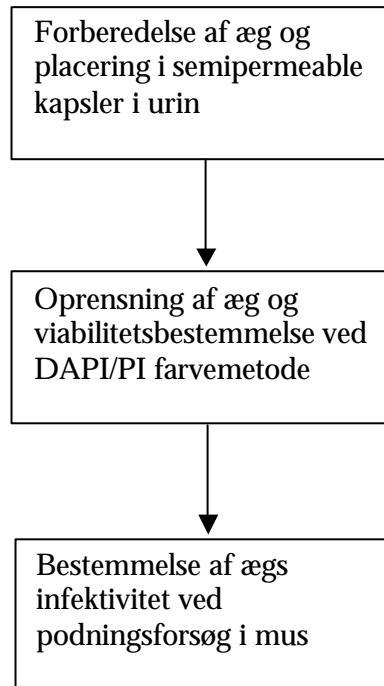
Figur 2 metodebeskrivelse for udtagelse af prøver fra lagret urin, isolation og typning af enterokokisolater fra Slanetz & Bartley agar.



2.2.3 Parasitologiske metoder

Detaljerne af de parasitologiske metoder er beskrevet i Bilag B, ligesom principperne i undersøgelserne er vist i figur 3.

Fig.3 Metodebeskrivelse for undersøgelse af *C. parvum* ægs viabilitet (levedygtighed) og infektivitet (smitsomhed)



2.2.4 Statistisk analyse af resultater

For at fastslå om der var tale om egentlig eftervækst af enterokokker eller om der blot var tale om en stigning der kunne tilskrives variation i kimtal, blev der udført en statistisk analyse af resultater fra flaskerne hvor der fandtes en tilsyneladende forlænget overlevelse og eventuel vækst af enterokokker. Der blev udført en faktoriel variansanalyse (ANOVA) på eventuelt vækst af enterokokker fra T-4 til T-6 (SAS version 8.02) med temperatur og tank som faktorer.

3 Resultater – Projekt 1 Bakteriologi

3.1 Fysisk-kemiske målinger

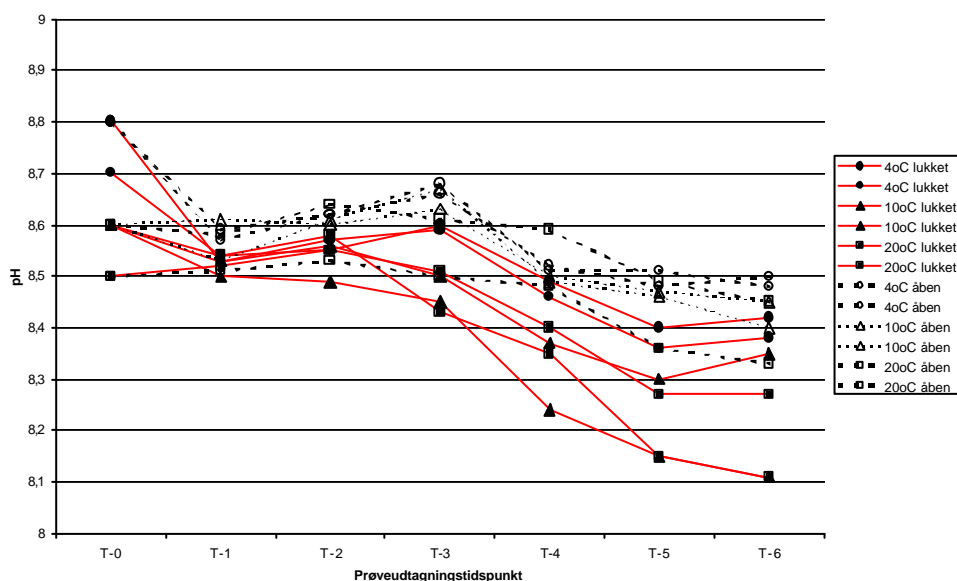
3.1.1 Temperatur

Temperaturen i de benyttede inkubatorer blev målt 2 gange ugentligt. I løbet af forsøgsperioden varierede temperaturen i inkubatorerne maksimalt med $\pm 1^\circ\text{C}$.

3.1.2 pH

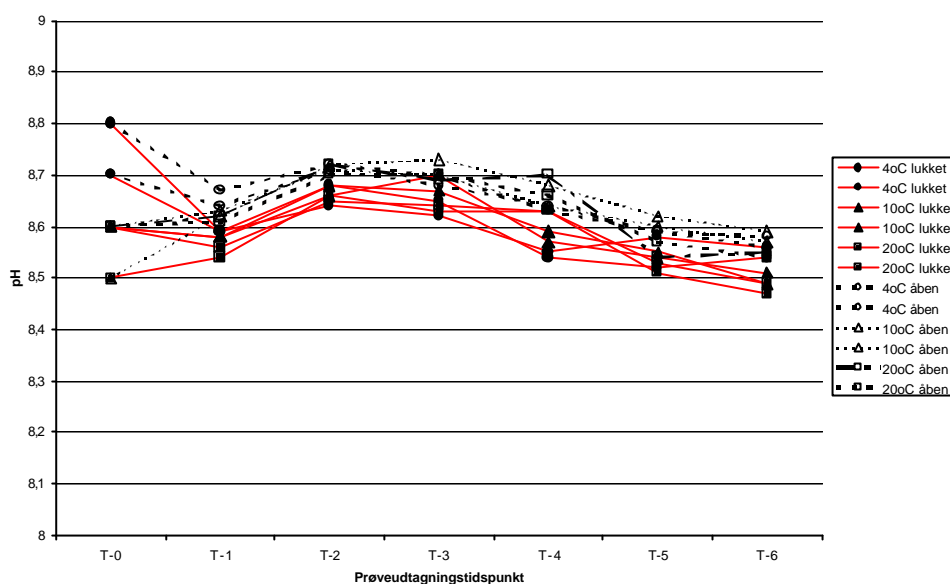
Resultaterne af pH-målinger i urinflaskerne er vist i figur 4, 5 og 6 nedenfor. pH var i alle urinprøverne mellem 8,5 og 9,1 ved starten af forsøget, dog højest i urin fra Lokaltet 3 og 4, hvor tilblanding af vand og dermed fortynding af urinen havde været mindst. De målte pH-værdier var relativt stabile i løbet af den 6 måneder lange undersøgelsesperiode, med det største pH-fald på ca. 0,5 i urin fra Lokaltet 1 (figur 4). Et fald i pH-værdierne skyldes med stor sandsynlighed et udslip af NH_3 (ammoniak) dampe ved åbning af flaskerne for hver prøveudtagning. Dette udslip har dog været meget begrænset jf. de lave reduktioner i de målte pH-værdier. Betegnelserne "lukket" og "åben" i de efterfølgende figurer henviser til om urinopsamlingstankene, hvorfra urinen blev indsamlet, var aflukket for urintilførsel ("lukket") eller om der blev tilført urin på indsamlingstidspunktet ("åben"). Det skal bemærkes, at der for hver undersøgt temperatur blev udført dobbeltbestemmelser ved analyser af urinprøver fra to forskellige beholdere.

Figur 4 Ændringer i pH i lagret urin fra Lokaltet 1, tank 2 (lukket) og tank 4 (åben).



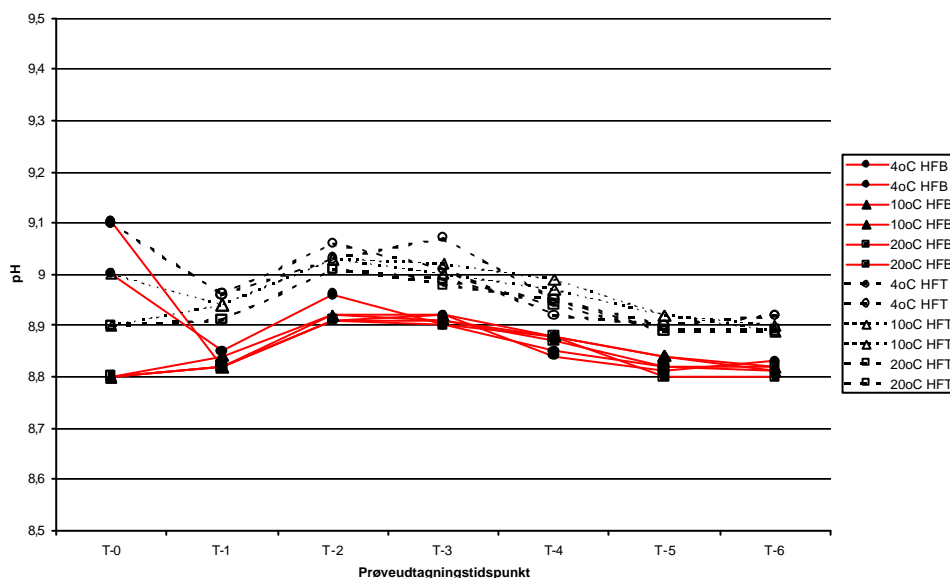
T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer.

Figur 5 Ændringer i pH i lagret urin fra Lokalitet 2 tank 3 (lukket) og tank 4 (åben).



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer.

Figur 6. Ændringer i pH i lagret urin fra Lokalitet 3 (HFB) og Lokalitet 4 (HFT).

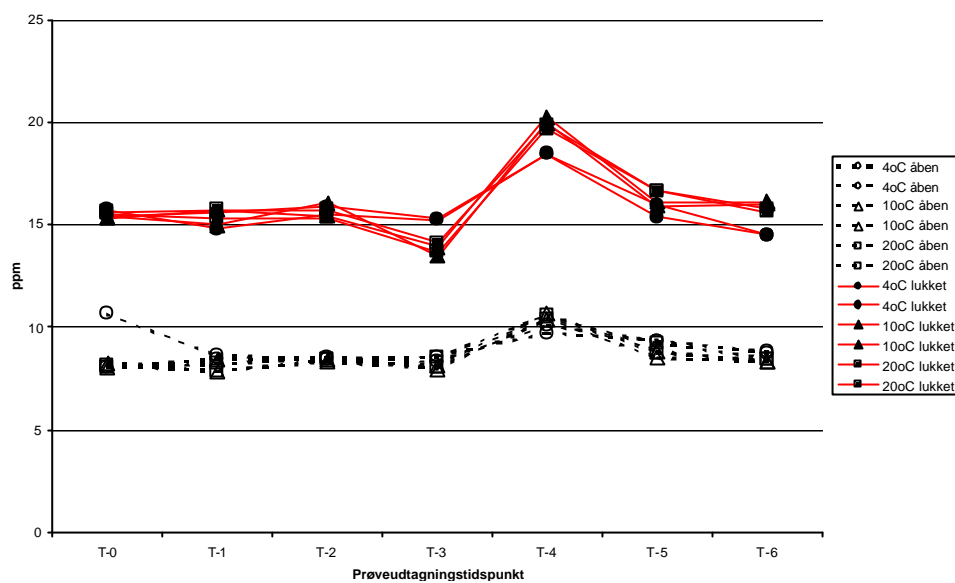


T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer.

3.1.3 Ammoniumkoncentration

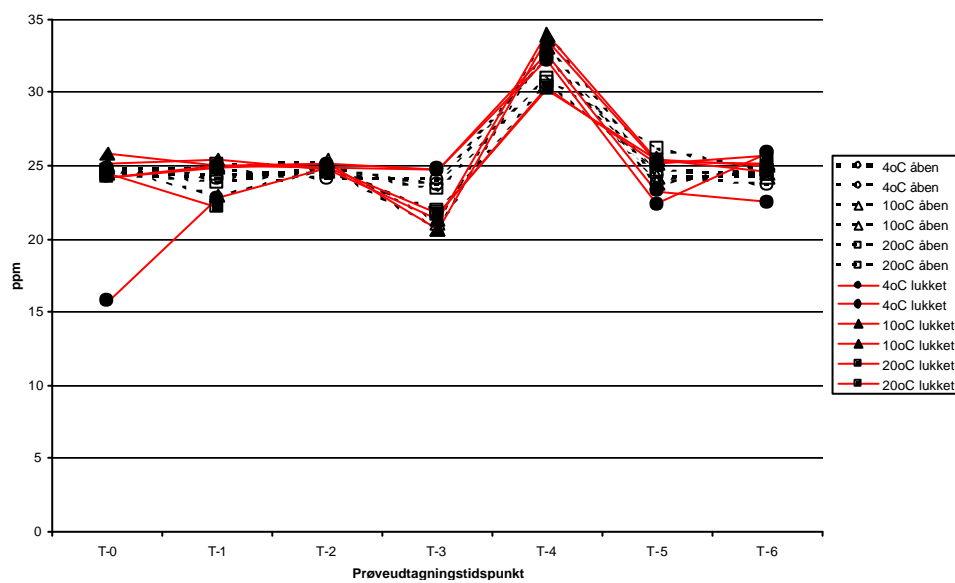
Resultaterne af ammonium-målinger er vist i figur 7, 8 og 9 nedenfor. Som forventet var ammoniumkoncentrationen højest i urin fra Lokalitet 3 og 4 hvor tilblending af vand og dermed fortynding af urinen havde været mindst. De målte ammonium-koncentrationer var relativt stabile (ca. 8 ppm for urin fra åben tank og 16-17 ppm for urin fra lukket tank) i løbet af de 6 måneder, med undtagelse af en generel stigning ved T-4 ved alle lokaliteter. Denne stigning kunne skyldes en metodisk fejl ved udtagning af prøverne, da den er af samme størrelse for alle lokaliteter ved netop T-4.

Figur 7 Ammoniumkoncentration (ppm – parts per million) ved Lokalitet 1



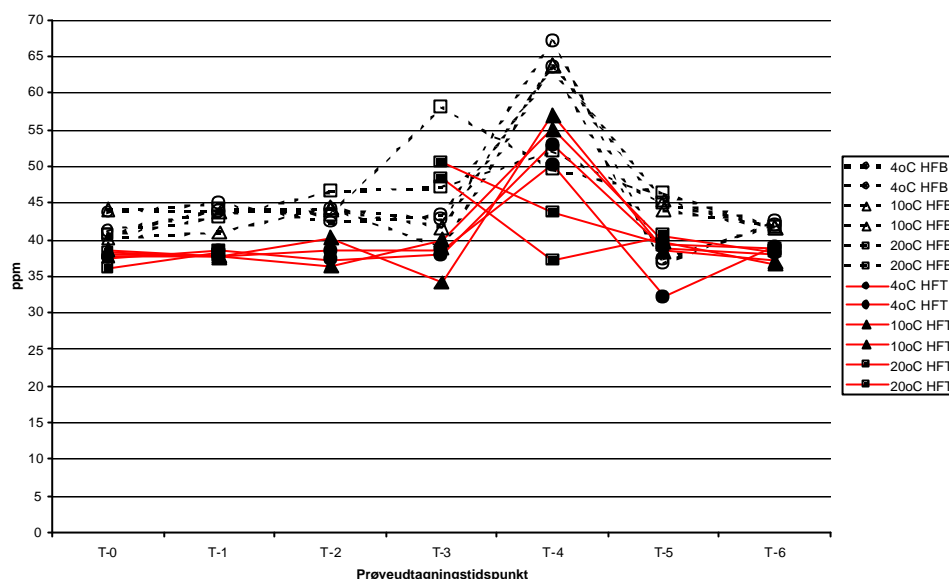
T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer

Figur 8 Ammoniumkoncentration (ppm) ved Lokalitet 2



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer

Figur 9 Ammoniumkoncentration (ppm) ved Lokalitet 3 (HFB) og 4 (HFT)



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer

3.1.4 Sammenhæng mellem pH og ammoniumkoncentration

Der var generelt god overensstemmelse mellem pH og ammonium værdierne idet de højeste pH-værdier blev målt ved Lokalitet 3 og 4, som også havde de højeste koncentrationer af ammonium. Ligeledes blev de laveste pH-værdier målt ved Lokalitet 1, hvor ammonium-koncentrationen også var lavest.

Med udgangspunkt i de begrænsede variationer i pH og ammoniumkoncentration igennem forsøgsperioden skønnes det ikke at variationer de to parametre medførte en signifikant påvirkning af overlevelsen af testparametrene.

3.2 Bakteriologiske målinger

3.2.1 Enterokokker

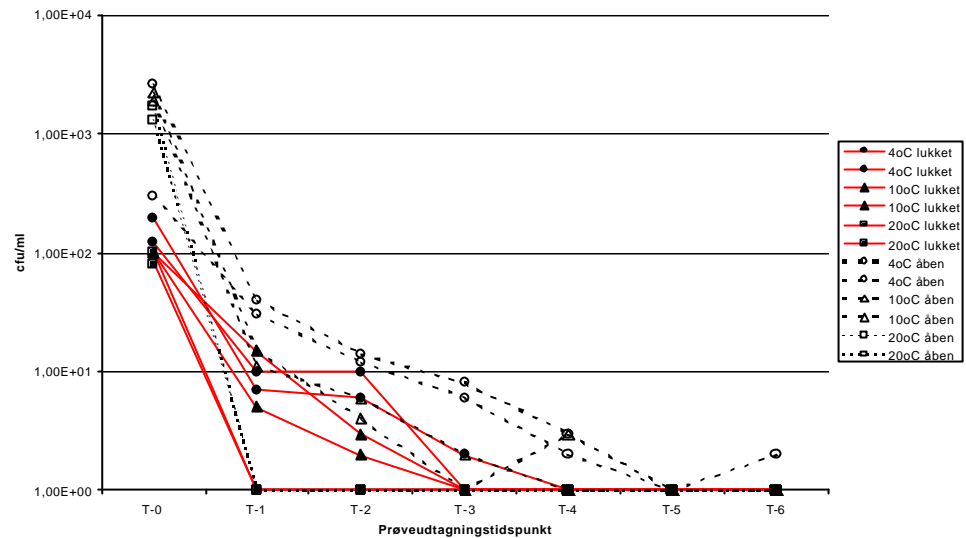
Resultaterne af undersøgelserne for enterokokker i lagret urin fra de tre lokaliteter er vist i figur 10, 11 og 12. Det skal bemærkes, at der for hver undersøgt temperatur blev udført dobbeltbestemmelser ved analyser af urinprøver fra to forskellige beholdere.

Som forventet fandtes den højeste startkoncentration af enterokokker i urin fra de åbne tanke, som blev tilledt urin ved prøveindsamlingstidspunktet. Der er således sket en fækal forurening af urinen, som mest sandsynlig skyldes en ikke 100 % separation af urin og fæces. Årsagerne hertil kan være flere, eksempelvis fækal forurening af urin fra personer med diarré eller fra børn som oftest har sværere ved at bruge urinseparerende toiletter korrekt sammenlignet med voksne.

Startkoncentration af enterokokker var 1 log-enhed lavere i urin fra Lokalitet 3 og 4. Dette kan skyldes, at denne urin havde mindre vandtilførsel ved

toiletskyl og at den koncentrerede urin havde en relativt øget reducerende effekt på enterokokantallet.

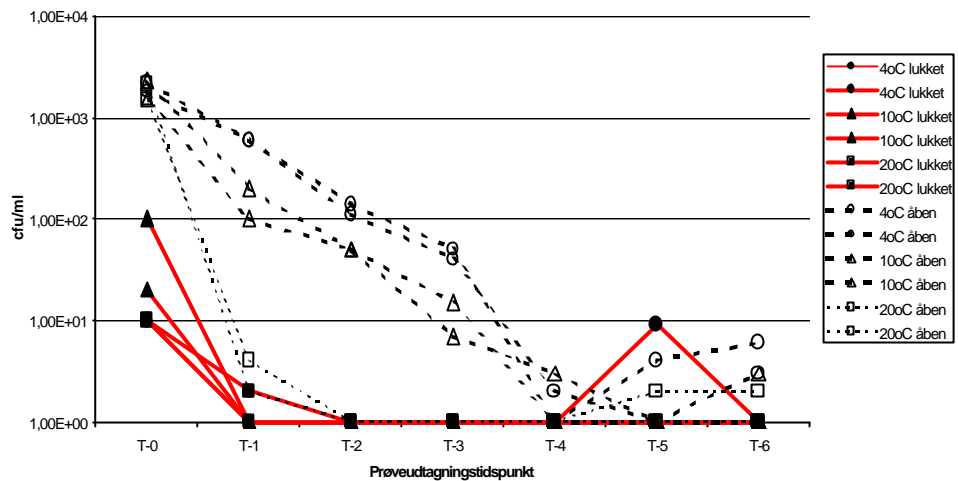
Figur 10 Reduktion i antal enterokokker i lagret urin fra Lokalitet 1 ved 3 forskellige temperaturer.



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer.

I urin fra Lokalitet 1 (figur 10) skete der en 2-3 log reduktion i antallet af enterokokker ved alle tre lagringstemperaturer. Detektionsgrænsen på 1 cfu/ml blev nået hurtigst (efter en måned) for urin fra lukket tank, lagret ved 20°C. Den langsomste reduktion af antal enterokokker skete i urin fra åben tank, lagret ved 4°C. Her blev detektionsgrænsen først nået efter fem måneders lagring, hvorefter der blev observeret en svag stigning i antal enterokokker ved prøveanalyse efter seks måneders lagring. Dette fund indikerer en mulig eftervækst ved 4°C. Der blev udtaget et antal enterokokisolater repræsenterende forskellige kolonityper til videre karakterisering, identifikation og typning. Resultaterne af disse undersøgelser er beskrevet i de efterfølgende afsnit (3.2.1.1).

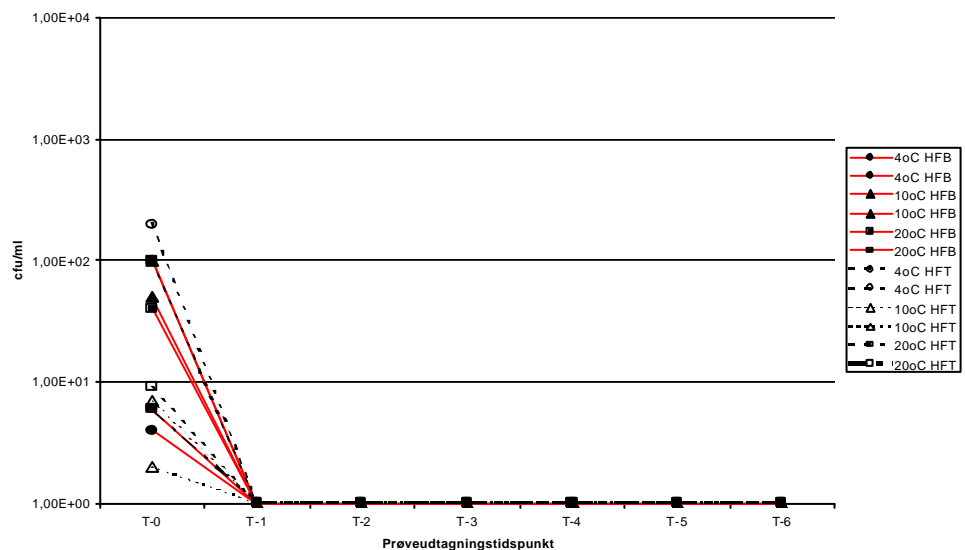
Figur 11 Reduktion i antal enterokokker i lagret urin fra Lokalitet 2 ved 3 forskellige temperaturer.



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer.

I urin fra Lokalitet 2 (figur 11) skete der en 1-3 log reduktion i antal enterokokker ved alle tre lagringstemperaturer i løbet af forsøgsperioden. Detektionsgrænsen på 1 cfu/ml blev nået hurtigst for urin fra lukket tank, lagret ved 4, 10 og 20°C, samt for urin fra åben tank, lagret ved 20°C. Dette skete efter 1-2 måneders lagring. Den langsomste reduktion i antal enterokokker skete i urin fra åben tank, lagret ved 4 og 10°C. Her blev detektionsgrænsen nået efter 4-5 måneders lagring, hvorefter der blev observeret en tilsyneladende svag stigning i antallet efter 5 og 6 måneders lagring for urin fra åben tank, lagret ved 4, 10 og 20°C, samt en midlertidig stigning i antallet i urin fra lukket tank, lagret ved 4°C. Denne stigning fandtes at være statistisk signifikant ($p < 0.05$) og tyder på en mulig eftervækst ved flere temperaturer. Der blev udtaget et antal enterokokisolater repræsenterende forskellige kolonityper til videre identifikationsbestemmelse. Resultaterne af disse undersøgelser er beskrevet i de efterfølgende afsnit.

Figur 12 Reduktion i antal enterokokker i lagret urin fra Lokalitet 1 (HFB) og 2 (HFT) ved 3 forskellige temperaturer.



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de respektive temperaturer.

I urin fra Lokalitet 3 og 4 (figur 12) skete der en 1-2 log reduktion i enterokokker ved alle tre lagringstemperaturer i løbet af lagringsperioden. Detektionsgrænsen på 1 cfu/ml blev nået allerede efter 1 måneds lagring ved alle tre temperaturer. Der fandtes ingen eftervækst af enterokokker.

3.2.1.1 Biokemisk og PCR karakterisering af enterokokisolater

Der blev udtaget kolonier fra Slanetz & Bartley agar på prøveudtagningstidspunkterne T-4, T-5, T-6 og T-8 fra Lokalitet 1 og 2. Fra Lokalitet 3 og 4 fandtes ingen vækst af kolonier på Slanetz & Bartley agar efter T1. Ofte fandtes der kun en enkelt eller få kolonier på agarpladerne.

Resultaterne af den biokemiske karakterisering og PCR bestemmelse af enterokokslægt og art af de ialt 34 udvalgte isolater fra Lokalitet 1 og 2 er vist i tabel 8. Resultaterne af multiplex PCR bestemmelserne er vist i figur 13, hvor DNA båndene for teststammerne er vist sammen med båndene for en række enterokok kontrolstammer. Teststammer og kontrolstammer med samme DNA båndstørrelse tilhører samme art.

Isolater kunne kun vokse efter udsæd af urinprøver fra den åbne tank ved Lokalitet 1. Alle 11 isolater blev bestemt til *E. faecium*. Ved T-4 blev *E. faecium* isoleret fra urinflasker opbevaret ved såvel 4 og 10°C; ved T-5 blev der kun isoleret et enkelt *E. faecium* isolat fra urinflaske opbevaret ved 20°C; og ved T-6 og T-8 blev *E. faecium* kun isoleret ved 4°C. Ved T-4 blev der isoleret et enkelt *E. mundtii* isolat (tabel 8). Alle *E. faecium* isolater havde samme kolonitype på Slanetz & Bartley agar med rødbrunt centrum og lyserød randzone og en diameterstørrelse på 1-2 mm.

Ialt 22 isolater blev udvalgt til videre karakterisering og typebestemmelse fra prøver fra åben og lukket urintanke ved Lokalitet 2 (tabel 8). Ved T-4 blev 4/5 isolater fra urinprøver opbevaret ved 4 og 10°C fra den åbne urintank bestemt som *E. faecium* og et enkelt isolat som *E. hirae*. Ved T-5 blev 7/8 isolater fra urinflasker opbevaret ved 4 og 20°C bestemt som *E. gallinarum* og kun et enkelt isolat som *E. faecium*. Ved T-6 blev der i urin fra åbne urintanke isoleret *E. gallinarum* og *E. faecium* ved såvel 4 og 10°C. Endelig blev der ved T-8 isoleret *E. gallinarum* og *E. faecium* ved 4°C (tabel 8). Der blev kun ved T-5 isoleret kolonier fra prøver fra lukket urintank. Alle *E. gallinarum* havde samme kolonitype på Slanetz & Bartley agar med rødbrun farve og en diameterstørrelse på ca. 1 mm.

Der var overensstemmelse mellem resultaterne af den biokemiske karakterisering og PCR bestemmelse af slægt og art.

Tabel 8 Resultater af biokemisk karakterisering og PCR for slægts- og artsbestemmelse af enterokokisolater fra Slanetz & Bartley agar

Isolat identifikationsnummer	Prøveudtagningsdato	Lokalitet	Urintankstype	Temperatur (°C)	Koloniudsende på Slanetz & Bartley agar ^a	Bakterieart og slægt
Urin - 1	04.02.03 = T-4	1	Lukket	4	C: smal rødbrun R: smal lyserød	<i>E. mundtii</i>
Urin - 2	04.02.03 = T-4	1	Åben	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 3	04.02.03 = T-4	1	Åben	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 4	04.02.03 = T-4	1	Åben	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 5	04.02.03 = T-4	1	Åben	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 6	04.02.03 = T-4	1	Åben	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 7	04.02.03 = T-4	2	Åben	4	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 8	04.02.03 = T-4	2	Åben	4	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 9	04.02.03 = T-4	1	Åben	10	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 10	04.02.03 = T-4	1	Åben	10	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 11	04.02.03 = T-4	1	Åben	10	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 12	04.02.03 = T-4	2	Åben	10	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 13	04.02.03 = T-4	2	Åben	10	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 14	04.02.03 = T-4	2	Åben	10	C: bred rød R: smal lyserød	<i>E. hirae</i>
Urin - 15	03.03.03 = T-5	2	Lukket	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 16	03.03.03 = T-5	2	Lukket	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 17	03.03.03 = T-5	2	Lukket	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 18	03.03.03 = T-5	2	Åben	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 19	03.03.03 = T-5	2	Åben	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 20	03.03.03 = T-5	2	Åben	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 21	03.03.03 = T-5	2	Åben	20	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 22	03.03.03 = T-5	2	Åben	20	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 23	03.03.03 = T-5	1	Åben	20	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 24	03.04.03 = T-6	2	Åben	4	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 25	03.04.03 = T-6	2	Åben	4	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 26	03.04.03 = T-6	2	Åben	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 27	03.04.03 = T-6	2	Åben	10	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 28	03.04.03 = T-6	2	Åben	10	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 29	03.04.03 = T-6	1	Åben	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 30	13.06.03 = T-8	1	Åben	4	C: smal rødbrun R: bred lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 31	13.06.03 = T-8	2	Åben	4	C: bred rødbrun R: smal lyserød	<i>E. faecium</i>
Urin - 32	13.06.03 = T-8	2	Åben	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 33	13.06.03 = T-8	2	Åben	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>
Urin - 34	13.06.03 = T-8	2	Åben	4	Rødbrune kolonier	<i>E. gallinarum</i>

^a, C: centrum af koloni; R: randzone af koloni

3.2.1.2 PFGE typning af enterokokker (DNA fingeraftryk)

Resultaterne af PFGE typningen af enterokokker er vist i tabellerne 9 og 10, ligesom eksempler på PFGE typningen er vist for *E. faecium* i figur 14 og for *E. gallinarum*, *E. mundtii*, og *E. hirae* i figur 15. Ved sammenligning af PFGE DNA båndtyper vil bakterieisolater med identisk antal og båndstørrelser ofte være af klonal oprindelse, eksempelvis som følge af opformering/eftervækst. Isolater med få båndforskelle vil ofte også være identiske eller nært beslægtede. Forskelle i båndmønstre skyldes forskelligheder i DNA sekvenser og dermed i genkendelsessteder for det anvendte skæringsenzym *Sma*I.

Tabel 9 Resultater fra PFGE typning af *E. faecium*

Lokalitet	Urintank-type	Temperatur (°C)	Prøveudtagnings-tidspunkt	Isolat-identifikationsnummer	PFGE type
1	Åben	4	T-4	Urin-2	A
1	Åben	4	T-4	Urin-3	B
1	Åben	4	T-4	Urin-4	A
1	Åben	4	T-4	Urin-5	A
1	Åben	4	T-4	Urin-6	A
1	Åben	4	T-6	Urin-29	A
1	Åben	4	T-8	Urin-30	A
1	Åben	10	T-4	Urin-9	A
1	Åben	10	T-4	Urin-10	A
1	Åben	10	T-4	Urin-11	A
1	Åben	20	T-5	Urin-23	A
2	Lukket	4	T-5	Urin-16	C
2	Åben	4	T-4	Urin-7	D
2	Åben	4	T-4	Urin-8	C
2	Åben	4	T-6	Urin-24	E
2	Åben	4	T-6	Urin-25	E
2	Åben	4	T-8	Urin-31	E
2	Åben	10	T-4	Urin-12	C
2	Åben	10	T-4	Urin-13	C
2	Åben	10	T-6	Urin-27	C

Ved PFGE typning af *E. faecium* isolater fra Lokalitet 1 fandtes to PFGE typer, A og B, hvor 10/11 isolater havde type A (tabel 9). PFGE type A isolater blev kun fundet i urin fra den åbne tank og ved alle tre undersøgte temperaturer. Type A og B har samme grundmønster, men type B indeholder yderligere 7 DNA bånd af forskellig størrelse (figur 14). Fundet af *E. faecium* med identisk PFGE type A indikerer at disse isolater er tæt beslægtet, eksempelvis kan isolaterne stamme fra samme person og/eller de er klonalt relateret som følge af multiplikation. Det ser således ud til at en identisk *E. faecium* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre temperaturer.

Tabel 10 Resultater fra PFGE typning af *E. gallinarum*

Lokalitet	Urintanktype	Temperatur (°C)	Prøveudtagnings-tidspunkt	Isolatidentifikationsnummer	PFGE type
2	Lukket	4	T-5	Urin-15	F
2	Lukket	4	T-5	Urin-17	F
2	Åben	4	T-5	Urin-18	F
2	Åben	4	T-5	Urin-19	F
2	Åben	4	T-5	Urin-20	F
2	Åben	4	T-6	Urin-26	F
2	Åben	4	T-8	Urin-32	F
2	Åben	4	T-8	Urin-33	F
2	Åben	4	T-8	Urin-34	F
2	Åben	10	T-6	Urin-28	F
2	Åben	20	T-5	Urin-21	F
2	Åben	20	T-5	Urin-22	F

I urin fra Lokalitet 2 blev der identificeret både *E. faecium* og *E. gallinarum*. Derudover blev *E. hirae* identificeret en gang ved T-4 fra en åben tank. De 9 *E. faecium* isolater havde ialt tre forskellige PFGE typer C, D og E (tabel 9). PFGE type C blev fundet i urin fra en lukket tank som blev opbevaret ved 4°C. Denne PFGE type fandtes også hos et enkelt isolat fra urin opbevaret ved 4°C og hos tre isolater opbevaret ved 10°C. Et isolat isoleret fra en åben tank ved 4°C havde type D, mens PFGE type E kun blev set hos tre isolater fundet i åbne tanke og opbevaret ved 4°C. Med fundet af tre forskellige PFGE typer, syntes der således at forekomme flere forskellige *E. faecium* stammer som udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i den åbne urintank ved Lokalitet 2.

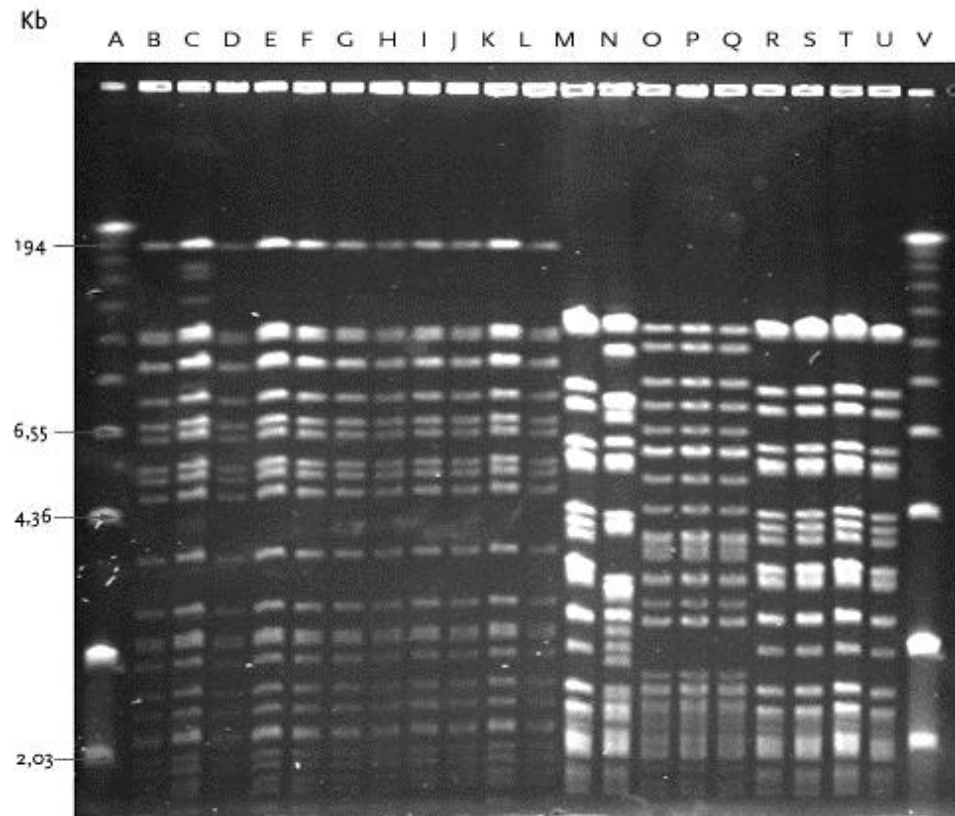
Figur 13 Multiplex PCR analyse af udvalgte enterokokisolater, samt 10 kontrolstammer.



Bane A, 100 bp DNA størrelsesmarkør; Bane B, Urin-1; Bane C, Urin-2; Bane D, Urin-3; Bane E, Urin-4; Bane F, Urin-5; Bane G, Urin-6; Bane H, Urin-7; Bane I, Urin-14; Bane J, Urin-15; Bane K, Urin-17; Bane L, Urin-18; Bane M, Urin-19; Bane N, Urin-20; Bane O, Mix kontrol; Bane P, *E. faecium* 301; Bane Q, *E. faecalis* 302; Bane R, *E. gallinarum* CECT 970; Bane S, *E. flavescens* CECT 4481; Bane T, *E. avium* CECT 968; Bane U, *E. raffinosus* NCTC 12192; Bane V, *E. mundtii* ATCC 43186; Bane W, *E. hirae* 9790RF; Bane X, *E. dispar* CECT 4310; Bane Y, *E. durans* CCUG 7972; Bane Z, 100 bp DNA størrelsesmarkør.

I urin fra Lokalitet 2 havde alle 12 *E. gallinarum* stammer, som var isoleret fra såvel åben og lukket tank ved de tre undersøgte temperaturer, identisk PFGE type F (figur 15). Det ser således ud til at en identisk *E. gallinarum* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre temperaturer.

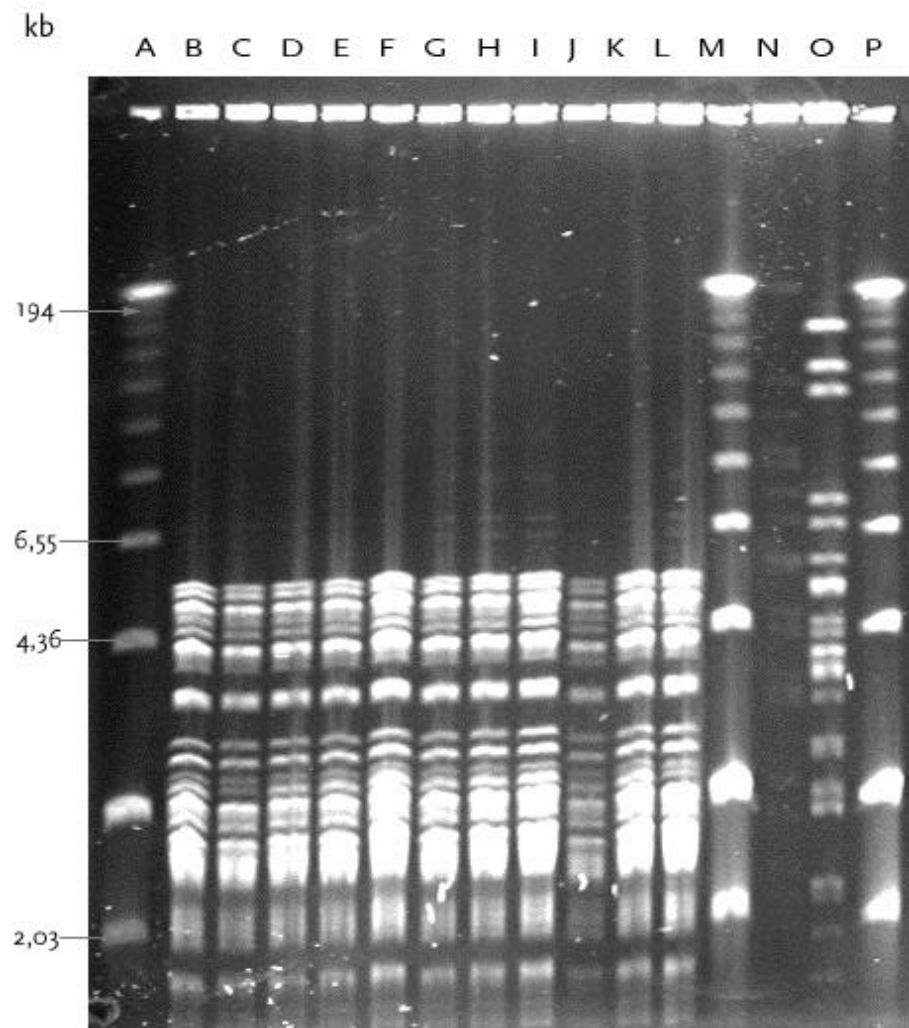
Figur 14 PFGE typer af *E. faecium* med DNA skåret med skæringsenzymet Smal.



Bane A, Low-range PFGE markør; Bane B, Urin-2; Bane C, Urin-3; Bane D, Urin-29; Bane E, Urin-4; Bane F, Urin-5; Bane G, Urin-6; Bane H, Urin-30; Bane I, Urin-9; Bane J, Urin-10; Bane K, Urin-11; Bane L, Urin-23; Bane M, Urin-16; Bane N, Urin-7; Bane O, Urin-24; Bane P, Urin-25; Bane Q, Urin-31; Bane R, Urin-8; Bane S, Urin-12; Bane T, Urin-13; Bane U, Urin-27; Bane V, Low-range PFGE markør.

Forskellen i DNA båndmønstre mellem PFGE typerne fundet hos *E. faecium* og *E. gallinarum* var stor. Generelt havde PFGE typen for *E. gallinarum* mindre fragmenter med det største fragment på ca. 5,5 kb, mens båndmønstre hos *E. faecium* havde en del større fragmenter. Det var således muligt at differentiere mellem de to arter baseret på deres PFGE type. For *E. faecium*, *E. mundtii* og *E. hirae* var størrelsen og fordelingen af DNA fragmenterne mere jævn og adskilte ikke disse arter tydeligt.

Figur 15 PFGE typer af *E. gallinarum* samt *E. mundtii* og *E. hirae* med DNA skåret med skæringsenzymet *Sma*I.



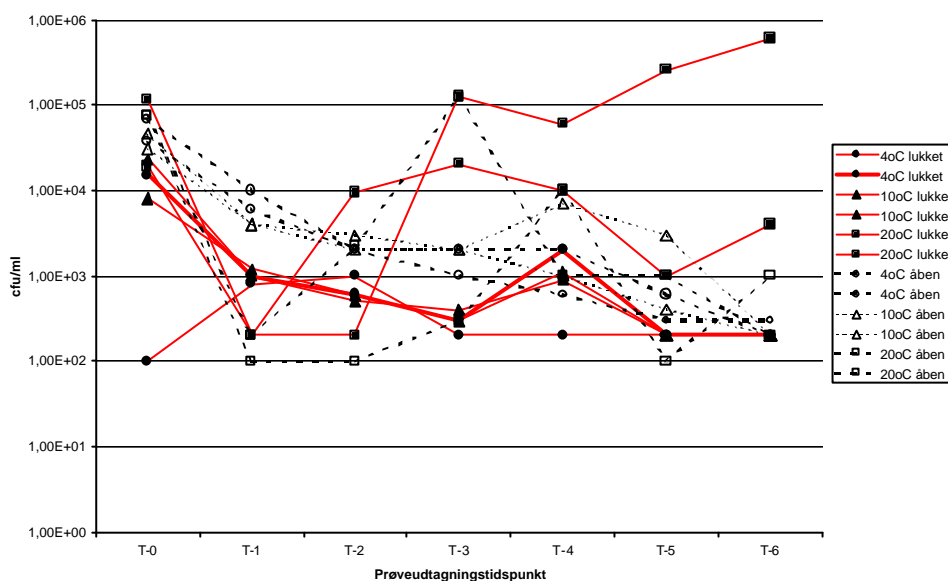
Bane A, Low-range PFGE markør; Bane B, Urin-15; Bane C, Urin-17; Bane D, Urin-18; Bane E, Urin-32; Bane F, Urin-33; Bane G, Urin-34; Bane H, Urin-19; Bane I, Urin-20; Bane J, Urin-26; Bane K, Urin-21; Bane L, Urin-22; Bane M, Low-range PFGE markør; Bane N, Urin-1; Bane O, Urin-14; Bane P, Low-range PFGE markør.

3.2.1.3 Kimtal ved 37°C

Resultaterne af undersøgelserne for kimaltal ved 37°C i urinprøver fra de fire lokaliteter er vist i figur 16, 17 og 18. Der skal bemærkes, at der for hver undersøgt temperatur blev udført dobbeltbestemmelser ved analyser af urinprøver fra to forskellige beholdere.

Urin fra åbne tanke havde samme antal eller svagt højere antal kim ved T-0 sammenlignet med urin indsamlet fra lukkede tanke. Startkoncentration af kim ved 37°C var som for enterokokker ca. 1 log-enhed lavere i urin indsamlet fra Lokalitet 3 og 4 sammenlignet med urin fra Lokalitet 1 og 2.

Figur 16. Reduktion i antal kim ved 37°C i lagret urin fra lokalitet 1 ved 3 forskellige temperaturer.

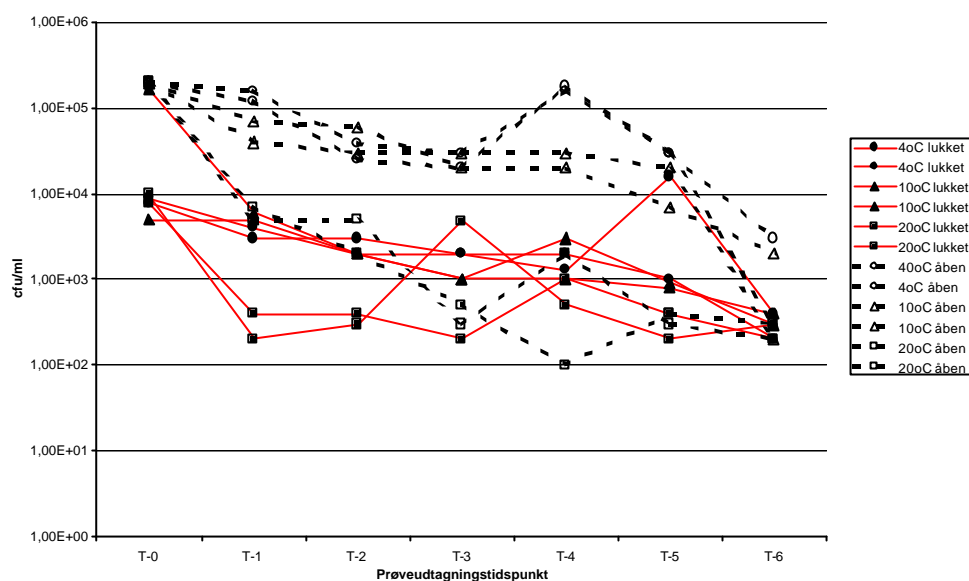


T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de angivne temperaturer.

I urin fra Lokalitet 1 skete der generelt en begrænset nettoreduktion i kimaltal ved 37°C i løbet af lagringsperioden (figur 16). I urin fra lukket tank, lagret ved 4 og 10°C, skete der en 1-2 log-enheder reduktion i kimaltallet i løbet af 6 måneders lagring. I urin fra lukket tank, lagret ved 20°C, skete der ingen kimaltsreduktion, men derimod tilsyneladende en svag stigning i kimaltallet i løbet af de 6 måneder. Resultaterne tyder på, at bakteriekim selv efter 6 måneders lagring af urin kan udvise vækst, især ved opbevaring af urinen ved 20°C.

I urin fra åben tank, lagret ved 4 og 10°C, skete der en gradvis reduktion i kimaltal på i alt 2-3 log-enheder i løbet af de 6 måneders lagring. Det skal bemærkes, at selvom der i urin fra åben tank, lagret ved 20°C, skete en reduktion på 2-3 log-enheder i kimaltallet i den ene urinflaske (replikat 1), fandtes der i den anden flaske (replikat 2) en kimaltsstigning på 1 log-enhed fra T-5 til T-6.

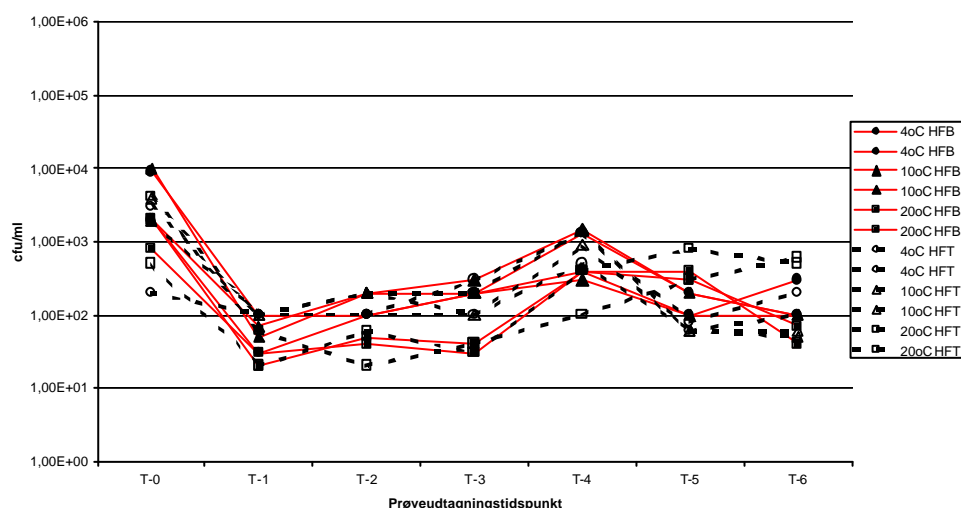
Figur 17 Reduktion i kimaltal ved 37°C i lagret urin indsamlet fra Lokalitet 2, ved 3 forskellige temperaturer.



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de angivne temperaturer.

I urin fra Lokalitet 2 skete der ligeledes generelt en begrænset reduktion i kimaltal ved 37°C i løbet af lagringsperioden (figur 17). I urin fra lukket tank, lagret ved 4, 10 og 20°C, skete der en ringe eller ingen kimaltsreduktion i løbet af de 6 måneders lagring. I urin fra åben tank, lagret ved 20°C, skete der en reduktion i kimaltallet på 3 log-enheder i løbet af de 6 måneder, hvorimod der fandtes en 1-2 log-enheds kimaltsreduktion ved de to lavere temperaturer. Der var ingen tegn på en stigning i kimaltallet i urin indsamlet fra Lokalitet 2.

Figur 18 Reduktion i antal kimaltal ved 37°C i lagret urin fra Lokalitet 3 og 4 ved 3 forskellige temperaturer



T-0 til T-6 angiver antal måneders lagring ved de angivne temperaturer.

I urin fra Lokalitet 3 og 4 var der som udgangspunkt en lidt lavere koncentration af kim efter dyrkning ved 37°C (figur 18) sammenlignet med kimtallene i urin fra de to førnævnte lokaliteter.

I løbet af de 6 måneders lagring skete der ingen eller kun ringe kimtalsreduktion ved alle tre undersøgte lagringstemperaturer. Der fandtes således ingen stigning i kimtallet i urin fra Lokalitet 3 og 4.

3.2.2 Suspekter termotolerante coliforme

Resultaterne for undersøgelserne for suspekter termotolerante coliforme bakterier er vist i Bilag C.

Generelt fandtes der lave startkoncentrationer af suspekter termotolerante coliforme bakterier i urin fra alle lokaliteterne, ligesom der kun kunne påvises suspekter termotolerante coliforme i åbne tanke fra Lokalitet 1 og 2. De lave koncentrationer af denne parameter tyder på en lavgradig frisk fækal forurening og/eller en ringe overlevelse af suspekter termotolerante coliforme bakterier i lagret urin. Der fandtes således ikke suspekter termotolerante coliforme i de tanke der havde været aflukkede i cirka 1 måned.

Resultaterne viser, at sammenlignet med enterokokker overlever termotolerante coliforme bakterier kun kort tid i lagret urin.

3.3 Delkonklusioner – Projekt 1 Bakteriologi

- Anvendelsen af 2-liters flasker til lagringsforsøg med urin medførte ringe pH variation (8,5-9,1) med de højeste værdier i urin fra urinopsamlingstanke med mindst vandtilførsel
- Enterokokker kunne isoleres i urin indsamlet fra alle opsamlingstanke (T-0)
- Reduktionen i antallet af enterokokker udviste store variationer, dog med størst reduktion i urin fra lukkede tanke som blev opbevaret ved høje temperaturer
- I urinprøver fra Lokalitet 1 og 2 blev der efter 5-6 måneders lagring observeret en svag stigning i antal enterokokker efter lagring ved 4, 10 og 20°C. Dette tyder på en øget overlevelse og/eller evne til multiplikation af enterokokker ved langvarig lagring af urin ved flere temperaturer
- Der blev udvalgt 34 bakterieisolater fra Slanetz & Bartley agarplader, som ved biokemisk karakterisering og PCR blev identificeret som tilhørende slægten *Enterococcus*
- Langt hovedparten af testede isolater fra Lokalitet 1 var *E. faecium*, som havde identisk PFGE type A. Dette indikerer, at disse isolater er tæt beslægtet, eksempelvis kan de stamme fra samme person og/eller de er klonalt relateret som følge af opformering i urinen. Det ser således ud til at en identisk *E. faecium* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre temperaturer. *E. faecium* betragtes normalt som en strikt fækal enterokokart
- Typning af *E. faecium* isolater fra Lokalitet 2 viste tre forskellige PFGE typer. Der forekom således flere forskellige *E. faecium* stammer som kunne overleve længere tids lagring i urin og/eller havde evnen til at kunne multiplicere.

- I urin fra Lokalitet 2 havde alle 12 *E. gallinarum* stammer, som var isoleret fra såvel åben og lukket tank ved de tre undersøgte temperaturer, identisk PFGE type F. Det ser således ud til at en identisk *E. gallinarum* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre temperaturer.
- Fundene af øget overlevelse og/eller eventuel opformering af *E. faecium* og *E. gallinarum* i lagret urin stiller spørgsmålstegn ved at anvende enterokokker som indikator på fækal forurening
- Der skete generelt en begrænset nettoreduktion i kimal ved 37°C i urin i løbet af lagringsperioden. Resultaterne tyder på at bakteriekim, som kan vokse ved 37°C, selv efter 6 måneders lagring af urin kan udvise vækst, især når urinen opbevares ved 20°C, hvorimod der tilsyneladende ikke var nogen vækst ved 4°C.

4 Resultater – Projekt 2 Parasitologi

4.1 Fysisk-kemiske målinger

4.1.1 Temperatur

Temperaturen i de benyttede inkubatorer blev målt 2 gange ugentligt. I løbet af forsøgsperioden varierede temperaturen i inkubatorerne maksimalt med $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 pH

Tabel 11 viser resultaterne af pH-målinger foretaget i løbet af forsøgsperioden. De målte værdier viste lille variation og var sammenlignelige med pH værdierne fra de bakteriologiske undersøgelser (projekt 1).

Tabel 11 pH-målinger i urin anvendt til parasitologiske undersøgelser (PBS = fosfatbuffer)

Lokalitet	Lagrings-temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	T-0	T-14 dage	T-1	T-2
1	4	8,65	-	8,68	8,53
1	10	8,66	-	8,63	8,56
1	20	8,65	8,61	8,64	8,53
2	4	8,67	-	8,78	8,6
2	10	8,68	-	8,69	8,56
2	20	8,68	8,62	8,65	8,53
Kontrol kapsel, PBS	4	7,4	-	7,52	7,48
Kontrol kapsel, PBS	10	7,4	-	7,52	7,46
Kontrol kapsel, PBS	20	7,4	7,45	7,52	7,48

4.1.3 Ammoniumkoncentration

Tabel 12 Ammoniumkoncentrationer i urin og kontrolopløsninger (ppm) efter forskellige prøveudtagningsintervaller. (Crypto Kt. = kontrol flaske med fosfatbuffer)

Lokalitet	Lagrings-temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	T-0	T-14 dage	T-1	T-2
1	4	18	-	18	20
2	4	25	-	25	26
Crypto Kt.	4	-	-	0,08	0,05
1	10	18	-	18	19
2	10	25	-	25	26
Crypto Kt.	10	-	-	0,05	0,08
1	20	18	19	18	19
2	20	25	26	25	26
Crypto Kt.	20	-	0,03	0,08	0,05

4.2 Parasitologiske målinger

4.2.1 Viabilitetsundersøgelser

Viabilitet (levedygtighed) i stamopløsningen af æg blev bestemt ved DAPI/PI farvning og var 65,4% og faldt hurtigt ved æggenes lagring i urin (tabel 13). Ved inkubation ved 20°C var æggenes viabilitet 0% allerede efter 14 dages lagring. Ved inkubation ved 10°C var viabiliteten 0% efter én måneders lagring. Ved inkubation ved 4°C var viabiliteten <2% efter én måneders lagring og 0% efter eksponering til urin for den ene lokalitet efter to måneders lagring.

Tabel 13 Procent (%) levende (viable) æg efter lagring i urin ved 3 forskellige temperaturer.

Lokalitet	Lagrings-temperatur (°C)	T-0	T-14 dage		T-1		T-2	
			Kapsel 1	Kapsel 2	Kapsel 1	Kapsel 2	Kapsel 1	Kapsel 2
1	4	-	-	-	1,2	0	0	1,7
1	10	-	-	-	0	0	0	0
1	20	-	0	0	0	0	0	0
2	4	-	-	-	0,6	0	0	0
2	10	-	-	-	0	2,1	0	0
2	20	-	0	0	0	0	0	0
Kontrol kapsel, PBS ^a	4	-	-	-	50,9	-	25,0	-
Kontrol kapsel, PBS	10	-	-	-	29,6	-	20,0	-
Kontrol kapsel, PBS	20	-	61,2	-	23,4	-	23,2	-
Kontrol stamopløsning	4	65,4	58,3	-	50,6	-	26,9	-

4.2.2 Podningsforsøg

Podningsforsøgene i mus bekræftede disse fund, idet ingen mus kunne smittes med æg fra urin inkuberet ved 20°C ved T-14 dage og ved T-1 (tabel 14). Resultaterne fra T-1 og T-2 for æg inkuberet i urin ved 4 og 10°C, stemmer overens med fundene fra viabilitetsundersøgelserne, idet kun én enkelt mus kunne inficeres med æg fra lagret urin fra Lokalitet 2 der havde været inkuberet ved 4°C i urin (T-1). Kun i dette ene forsøg var det muligt at inficere mus.

Tabel 14 Podningsforsøg med mus. Antal mus positive for *Cryptosporidium parvum* i hver gruppe bestående af 6 mus.

Lokalitet	Lagrings-temperatur (°C)	T-14 dage	T-1	T-2
1	4	-	0 / 6	0 / 2 ^a
1	10	-	0 / 6	0 / 6
1	20	0 / 6	0 / 6	-
2	4	-	1 / 6 ^b	0 / 6
2	10	-	0 / 6	0 / 6
2	20	0 / 6	0 / 6	-
Kontrol kapsel, PBS	20	6 / 6	-	-
Positiv kontrol ^c	4	5 / 6	6 / 6	5 / 6
Negativ kontrol ^d	-	-	0 / 6	0 / 6

a = hunmus spiste fire unger fra sit kuld og der foreligger derfor kun resultater fra to museunger i denne gruppe

b = 1 oocyst blev fundet i én mus

c = stamopløsning

d = PBS

4.3 Bakteriologiske målinger

Resultaterne for analyserne for antal enterokokker, kimaltal ved 37°C, og suspekterte termotolerante coliforme bakterier viste generelt lave kimaltsværdier, som var i overensstemmelse med de fundne kimaltal fra undersøgelserne af urin fra åben tank i projekt 1. Resultaterne af de bakteriologiske undersøgelser lavet i forbindelse med forsøgene med *Cryptosporidium* er beskrevet i Bilag D.

4.4 Delkonklusioner – Projekt 2 Parasitologi

- æg af *C. parvum* overlevede kun kort tid i urin fra mennesker. Ved 4°C og 10°C var der en overlevelsestid på under 2 måneder og ved 20°C var der en overlevelsestid på under én måned
- der var god korrelation mellem viabilitetstesten og podningsforsøgene, idet prøver med en viabilitet af æg < 2% ikke kunne inficere mus
- pH-værdier og ammoniumkoncentrationen forblev stabile i løbet af forsøgsperioden
- de bakteriologiske målinger viste lave kimaltsværdier
- æg af *C. parvum* kunne relativt nemt oprenses i forsøgets urinprøver grundet æggenes placering i semipermeable kapsler

5 Diskussion

5.1 Projekt 1 Bakteriologi

NH_4 (ammonium) koncentrationen og pH er vigtige faktorer som påvirker mikroorganismers overlevelse i urin. Ammonium og andre kvælstofforbindelser virker giftig på mikroorganismer, som også påvirkes negativt af alkaliske pH forhold (pH i urin er typisk omkring 9). Undersøgelsens resultater viste en positiv korrelation mellem NH_4 -indhold og pH med de højeste værdier målt i urin fortyndet med ingen eller begrænset mængder vand (Lokalitet 3 og 4; urin fra kolonihaver). Ved anvendelse af de relativt store 2-liters urinbeholdere til laboratorieforsøgene kunne der opretholdes et næsten konstant pH og NH_4 indhold i beholderne svarende til de forhold der findes i urinopsamlingstanke.

Startkoncentrationen af enterokokker i urin indsamlet fra åbne urinopsamlingstanke var højere (ca. $10^3 - 10^4$ cfu/ml) sammenlignet med urin fra lukkede opsamlingstanke (ca. 10^2 cfu/ml). Dette skyldes, at åbne tanke blev tilført urin på prøveudtagningstidspunktet modsat de lukkede tanke som havde været lukket i et tidsrum forud for prøveudtagningstidspunktet. Urin fra åbne tanke var således tilført frisk (fækal foruren) urin. Forskellige startkoncentrationer af enterokokker medførte en tilsvarende variation i den hastighed hvormed antallet af enterokokker blev reduceret. Dette indikerer, at der i urin med høje enterokokkoncentrationer som følge af betydelig fækal forurening vil kunne påvises enterokokker efter relativt længere lagringstid sammenlignet med urin med lave enterokokkoncentrationer.

Efter en reduktion af antal enterokokker til under detektionsgræsen på 1 cfu/ml blev der påvist en mindre stigning i antal enterokokker i urin fra Lokalitet 1 og især 2 efter 5-6 måneders opbevaring. Da enkelte andre bakterieslægter end enterokokker kan vokse på Slanetz & Bartley agarplader var det vigtigt at få fastlagt, at de fremvoksede bakteriekolonier virkelig var enterokokker. Det var endvidere også vigtig, at få bestemt enterokokarten da nogle arter kan forekomme naturligt i miljøet, eksempelvis i jord, mens andre næsten udelukkede forekommer i afføring fra mennesker og dyr. Slægt og art af udvalgte bakteriekolonier blev bestemt ved biokemisk karakterisering og PCR. Den videre karakterisering blev således udført for at kunne fastlægge om den registrerede bakterielle vækst skyldes enterokokker tilført fra mennesker og ikke fra miljøet omkring urinopsamlingstanke.

Efter 4 måneders opbevaring af urin fra Lokalitet 1 blev 11/12 isolater identificeret som *E. faecium*, som alle havde en identisk DNA fingeraftrykstype (PFGE type A). *E. faecium* betragtes normalt som en strikt fækal enterokokart der overlever relativt dårligt udenfor mavetarmkanalen af dyr og mennesker. P.g.a. af den observerede stigning i enterokokantallet stammer disse identiske *E. faecium* isolater med stor sandsynlighed fra den samme bakteriecelle som følge af opformering i urinen. Det ser således ud til at en identisk *E. faecium* stamme udviste øget overlevelse og evne til multiplikation i urinflaskerne.

Urin fra Lokalitet 2 blev opbevaret i 8 måneder i laboratoriet. Karakterisering af ialt 22 bakterieisolater efter 5-8 måneders opbevaring af urinen ved forskellige temperaturer påviste forekomst af *E. faecium* og *E. gallinarum*. Typning af en række *E. faecium* stammer viste tre forskellige PFGE typer, mens alle 12 undersøgte *E. gallinarum* stammer havde en identisk PFGE type F. Der forekom således flere forskellige *E. faecium* stammer og en identisk *E. gallinarum* stamme som kunne overleve længere tids lagring i urin og/eller havde evnen til at kunne multiplicerer.

Resultaterne af undersøgelsen stiller store spørgsmål ved anvendeligheden af enterokokker som indikator på hygiejnisk kvalitet af opbevaret urin fra mennesker. En god mikrobiel hygiejneindikator bakterie skal opfylde flere forhold, herunder at reduktionen i dens antal svarer til en antalsreduktion af de smitstoffer (eksempelvis *Campylobacter* og *Salmonella*), som den skal indikerer en eventuel tilstedeværelse af. En god indikatorbakterie må normalt heller ikke kunne udvise vækst. Det bør derfor overvejes at anvende andre bakterielle indikatorer end enterokokker til fastlæggelse af den bakteriologiske kvalitet af lagret urin. *E. coli* har i en tidligere undersøgelse vist korte overlevelsestider i lagret urin svarende til en række vigtige bakterielle smitstoffer (1-2 måneder), herunder *Shigella* spp (Dalsgaard og Tarnow, 2001). Det bør derfor overvejes nærmere at anvende *E. coli* som indikator på bakteriologisk kvalitet af opbevaret urin fra mennesker.

5.2 Projekt 2 Parasitologi

I dette projekt blev *C. parvum* benyttet som indikator på protozoers overlevelse i urin fra mennesker. Infektioner med protozoer, hvoraf flere kan smitte fra dyr til mennesker (såkaldte zoonoser), er blevet observeret stadig hyppigere i de seneste år og begrænser sig ikke kun til udviklingslande med ringe sanitære forhold, men forekommer ligeledes i den industrialiserede del af verden, med store udbrud af diarre forårsaget af protozoerne *Cryptosporidium*, *Cyclospora* og *Giardia* (Slifko *et al.*, 2000). I Danmark diagnosticeres infektioner med *Giardia* hyppigere end infektioner med *Cryptosporidium*, mens der ikke har været registreret diarrétilfælde forårsaget af *Cyclospora*. Langt de fleste af disse infektioner er erhvervet i udlandet, men eftersom cryptosporidiose er en relativ almindelig infektion i kvægbruget (Anonymous, 2002) er der en potentiel risiko for infektioner via kvæg.

C. parvum er en egnet indikator for protozoers overlevelse i miljøet, herunder eksempelvis i vand eller i urin, da *C. parvum* er mere resistent overfor miljøpåvirkninger, såsom pH, ammoniak og temperatur end *Giardia* (Olson *et al.*, 1999).

Undersøgelser udført for Miljøstyrelsen i 2001 (Dalsgaard og Tarnow, 2001) viste, at et lille antal fundne æg af *C. parvum* tilsyneladende kunne overleve adskillige måneder i urinlagringstanke. Dette fund var overraskende, idet svenske undersøgelser har vist, at æg af *C. parvum* maksimalt overlever 2 måneder i urin fra mennesker, når urinen lagres ved 4°C (Höglund og Stenström, 1999). Undersøgelserne beskrevet i denne rapport bekræfter de svenske undersøgelser, idet en overlevelse på under 2 måneder blev fundet for æg lagret ved 4°C i urin fra mennesker. I modsætning til de tidligere svenske undersøgelser blev det endvidere fastlagt at æg med en viabilitet <2% ikke

kunne inficerer mus. *C. parvum* æg lagret i urin i 2 måneder syntes således ikke at være infektiøse, herunder for mennesker.

En mulig forklaring på uoverensstemmelserne i resultater fra de tidligere danske undersøgelser (Dalsgaard og Tarnow, 2001) og resultaterne i denne rapport, kunne være, at der skete en fækal forurening efter de undersøgte urintanke blev lukket. Hvis denne forklaring er korrekt, understreger det vigtigheden af at have et holdbart og tæt urinlagringssystem. Endelig var resultaterne i de tidligere undersøgelser baseret på et meget lille antal æg. Forudsat at der ikke sker en efterfølgende fækal forurening af den lagrede urin viser denne rapport og de svenske resultater, at urin kan anses at være fri for levende og infektiøse protozoer efter ca. 2 måneders ved lagringstemperaturer >4°C.

Med hensyn til overlevelse af andre parasitter i urin fra mennesker tyder svenske undersøgelser på en relativ god overlevelse af *Ascaris suum* æg (Höglund *et al.*, 1998). *Ascaris* æg bruges ofte som model på parasitægs overlevelse i miljøet, da disse æg udviser en meget stor resistens overfor ydre miljøpåvirkninger. Det vil kræve yderligere undersøgelser at give retningslinier for lagringstid af urin med henblik på drab af *Ascaris* æg. *Ascaris* æg er markant større end protozoer, hvilket medfører at førstnævnte vil udvise en højere grad af sedimentering og derfor primært vil forekomme i urinens sediment.

I denne rapport er undersøgelserne foretaget ved tre forskellige lagringstemperaturer; 4, 10 og 20°C. Adskillige undersøgelser har vist, at *Cryptosporidium* overlevelse i forskellige medier (ferskvand, saltvand, fækalier og urin) er stærkt temperaturafhængig, idet æggene overlever længst tid ved lavere temperaturer, med 4°C som optimum temperatur for overlevelse (Robertson *et al.*, 1992; Fayer *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 1999; Höglund og Stenström, 1999; Freire-Santos *et al.*, 2000). Således fandtes der også i denne undersøgelse en sammenhæng mellem temperatur og overlevelse af æg i urin fra mennesker, med den længste overlevelse (under 2 måneder) ved 4°C.

pH værdier og ammoniumkoncentrationer i urin udtaget fra de to opsamlingskanter viste sig at være yderst stabile i løbet af forsøgsperioden, hvilket indikerer, at der har været et minimalt udslip af ammoniak ved udtagning af prøver fra glasflaskerne med urin. Det var derfor ikke muligt at lave en egentlig vurdering af pH og ammonium/ammoniaks indflydelse på æggens overlevelse. Den længere overlevelse af æg i kontrolopløsningen af fosfatbuffer tyder imidlertid på en særlig effekt af urinen på æggens overlevelse. Ammonium/ammoniak har sandsynligvis en vigtig negativ effekt på protozoers overlevelse i urin. Dette er beskrevet eller antydnet i andre lignende undersøgelser, hvor man fandt at pH alene ikke kunne forklare en øget dødelighed af æg (Jenkins *et al.*, 1998; Höglund og Stenström, 1999).

Der fandtes i vore undersøgelser en god korrelation mellem viabilitetsassayet (DAPI/PI cellefarvning) og podningsforsøgene i mus. Resultaterne viste, at når æggene af *C. parvum* var klassificeret som døde (<2% levende æg) så kunne disse ikke inficerer (smitte) mus. Undersøgelserne viser således, at fastlæggelse af viabilitet var fuldt tilstrækkeligt til fastlæggelse af æggens infektivitet. Der udvikles endvidere i øjeblikket cellebaserede assays til infektivitetsbestemmelse. Disse cellebaserede assays er ofte mere præcise end musemodellen, idet man i en musemodel altid vil have en vis variation mellem dyrene. Eksempelvis var der i denne rapport undersøgelser enkelte mus i den

positive kontrolgruppe der ikke var modtagelige overfor infektion, selvom de er blevet podet med en tilstrækkelig stor dosis af æg. Sådanne variationer er meget begrænsede i celleassays.

I vore undersøgelser blev der brugt *C. parvum* æg fra kvæg, da det ikke er muligt at opformere og skaffe tilstrækkelig antal *C. parvum* æg fra mennesker. Det kan diskuteres om overlevelse og infektivitetsundersøgelser af æg fra dyr er gode modeller for æg isoleret fra mennesker. Umiddelbart vil æg med forskellig oprindelse forventes at have en sammenlignelig resistens overfor miljøpåvirkninger, hvorimod der i podningsforsøg muligvis kan være forskelle i infektivitet (Fayer *et al.*, 2000). Disse forhold er således endnu et argument for i fremtiden at benytte cellebaserede assays til bestemmelse af infektivitet, især cellelinier fra menneskevæv. Disse forhold ændrer dog ikke den generelle konklusion, at urin kan anses at være fri for levende og infektiøse protozoer efter ca. 2 måneders ved lagringstemperaturer $>4^{\circ}\text{C}$.

Semipermeable kapsler har tidligere været brugt til undersøgelse af *C. parvum* ægs overlevelse i jord og dyregødning (Jenkins *et al.*, 1999), men så vidt det vides ikke til undersøgelser af overlevelse af *C. parvum* æg i urin fra mennesker. Kapslerne tillod en tilstrækkelig høj koncentration af æg og det var relativt nemt at oprense æg fra kapslerne. Kapslerne fungerede således på alle måder tilfredsstillende.

6 Konklusion

6.1 Projekt 1 – Bakteriologi

- Efter en generel reduktion i antal enterokokker til under detektionsgrænsen (1 cfu per ml.) efter 1-4 måneders lagring, blev der efter 5-6 måneders lagring observeret en svag men signifikant stigning i antal enterokokker efter lagring ved 4, 10 og 20°C. Denne stigning tyder på en øget overlevelse og/eller evne til multiplikation af enterokokker ved langvarig lagring af urin ved flere temperaturer
- Bakterieisolater fra agarplader anvendt til påvisning af enterokokker blev ved biokemisk karakterisering og PCR identificeret som tilhørende slægten *Enterococcus*
- Langt hovedparten af testede isolater fra Lokaltet 1 var *E. faecium*, som havde identisk PFGE type A ("DNA fingeraftryk"). Dette indikerer, at disse isolater er tæt beslægtet, eksempelvis kan de stamme fra samme person og/eller de er klonalt relateret som følge af opformering i urinen. Det ser således ud til, at en identisk *E. faecium* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre undersøgte temperaturer. *E. faecium* betragtes normalt som en strikt fækal enterokokart
- Typning af *E. faecium* isolater fra Lokaltet 2 viste tre forskellige PFGE typer. Der forekom her således flere forskellige *E. faecium* stammer som kunne overleve længere tids lagring i urin og/eller havde evnen til at kunne multiplicere
- I urin fra Lokaltet 2 havde alle 12 *E. gallinarum* stammer, som var isoleret fra såvel åben og lukket tank ved de tre undersøgte temperaturer, identisk PFGE type F. Det ser således ud til, at en identisk *E. gallinarum* stamme udviste øget overlevelse og/eller evne til multiplikation i urinflaskerne ved de tre temperaturer
- Fundene af øget overlevelse og/eller eventuel opformering af *E. faecium* og *E. gallinarum* i lagret urin stiller spørgsmålstegn ved at anvende enterokokker som indikator på fækal forurening af urin. Det bør istedet overvejes at anvende *E. coli* som indikator da denne syntes mere følsom i urin sammenlignet med enterokokker
- Der skete generelt en begrænset reduktion i kimtal ved 37°C i urin i løbet af lagringsperioden. Resultaterne viser, at bakteriekim i urin lagret i 6 måneder kan udvise vækst ved 37°C inkubering. Anvendeligheden af undersøgelse for kimtal 37°C til vurdering af den hygiejniske kvalitet af lagret urin syntes således begrænset.

6.2 Projekt 2 – Parasitologi

- Æg af *C. parvum* overlevede relativt kort tid i human urin, <14 dage ved 20°C og 1-2 måneder ved 10 og 4°C
- Ingen mus kunne inficeres (smittes) i podningsforsøg med æg fra urin der havde været lagret 14 dage ved 20°C, 1 måned ved 10°C og 2 måneder ved 4°C
- Der var god overensstemmelse mellem resultater fra viabilitetsundersøgelser og podningsforsøg. Bestemmelse af manglende levedygtighed (viabilitet) (<2% viable æg) med den anvendte metode, syntes således at kunne bruges som indikator for æggenes manglende infektivitet. Det vil i fremtiden kunne anbefales, at bruge cellebaserede assays, eventuelt som supplement til viabilitetsundersøgelser
- I modsætning til tidligere danske undersøgelser, men i overensstemmelse med svenske undersøgelser, viste resultaterne, at urin der har været lagret i minimum 2 måneder er fri for levedygtige (viable) og infektive æg af *C. parvum*. En lagring på to måneder vil også betyde elimination af *Giardia* æg, idet denne protozo er mere følsom overfor miljøpåvirkninger end *Cryptosporidium*

7 Litteraturliste

Anonymous, (2002). Annual Report on Zoonoses in Denmark. Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

Anonymous, (2003). Annual Report on Zoonoses in Denmark 2002. Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

Armon, R & Y. Kott. (1995). Distribution comparison between coliphages and phages and anaerobic bacteria (*Bacteroides fragilis*) in water sources, and their reliability as fecal pollution indicators in drinking water. *Water Science and Technology* 51 (5-6).

Carlander, A., Aronsson, P., Allestam, G., Stenström, T.A., and K. Perttu. (2000). Transport and retention of bacteriophages in two types of willow-cropped lysimeters. *Journal of Environmental Science and Health A* 35(8): 1477-1492.

Dalsgaard, A. og Tarnow, I. (2001) Miljøprojekt nr. 18 2001. Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land. Mikrobiologiske undersøgelser af lagret urin fra separationstoiletter. Miljøstyrelsen, København.

DS/EN ISO 6222/1:2001 (Totalkim ved 37°C).

DS/EN ISO 9308-1 (*E. coli*).

Dutka-Malen, S., Evers S. and Courvalin P., (1995). Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 1995, p. 24-27

Eller, G. (1995). Liquid composting of raw wastewater, mixed with biodegradable waste. Persistence of selected pathogens and indicator organisms. Dissertation submitted for diploma in Biotechnology at the Institute for Sanitary Engineering, Technical University of Brunswick, Germany.

Enemark, H. L., (2002). *Cryptosporidium* – Studies of molecular characteristics and pathogenicity. Ph.D. thesis.

Facklam, R.R., Carvalho, M.G. & Teixeira, L.M. (2002). History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. p. 1-54. In M.S. Gilmore (ed.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular biology and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington, DC.

Fayer, R., Morgan U. & Upton S.J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology* 30: 1305-1322.

- Fayer, R., Trout, J. M. & Jenkins, M. C. (1998). Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology* 84 (6): 1165-1169.
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A. M., Vergara-Castiblanco, C. A. & Ares-Mazás, E. (2000). Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Veterinary Parasitology* 89: 253-259.
- Höglund, C., Stenström, T. A., Jönsson, H. & Sundin, A. (1998). Evaluation of faecal contamination and microbial die-off in urine separating sewage systems. *Water Science and Technology* 38 (6): 17-25.
- Höglund, C. E. & Stenström, T. A. B. (1999). Survival of *Cryptosporidium parvum* in source separated human urine. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 740-746.
- Hurst, C. J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., and M.V. Walter. (1997). *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Jenkins, M. B., Bowman, D. D. & Ghiorse, W. C. (1998). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2): 784-788.
- Jenkins, M. B., Walker M.J., Bowman, D. D. Anthony L.C. & Ghiorse, W. C. (1999). Use of a sentinel system for field measurements of *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in soil and animal waste. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1998-2005.
- Johansson, P.O., Espeby, B., Nilsson, B., and G. Allestam. (1998). Artificial groundwater recharge in Stockholm – II Column test design and tracer tests. In: Peters, J.H. et al. (Eds.) *Artificial Recharge of Groundwater*, pp. 383-385. Balkema AA., Rotterdam.
- Jönsson, H., B. Vinnerås, C. Höglund, T.A. Stenström, G. Dalhammer & H. Kirchmann. (2000). Källsorterad humanurin i kretslopp. VA-FORSK RAPPORT, Stockholm.
- Jönsson, H., Stenström, T. A., Svensson, J., & Sundin, A. (1997). Source separated urine-nutrient and heavy metal content, water saving and faecal contamination. *Water Science and Technology* 35 (9): 145-152.
- Ke, D., Picard F.J., Martineau, F., Ménard C., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, p. 3497-3503
- Lewis, G. D. (1995). F-specific bacteriophage as an indicator of human viruses in natural waters and sewage effluents in Northern New Zealand. *Water Science and Technology* 31 (5-6): 231-234.
- Lilleengen, K. (1948). Typing of *Salmonella typhimurium* by means of a bacteriophage. Ph.D. thesis. The Bacteriological and Hygienical

Department of the Royal Veterinary College, Stockholm, Sweden.
Mac Kenzie, W.R., Hoxie N.J., Proctor, M.E., et al. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* 331:161-7.

Manero, A. and Blanch, A.R., (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, p. 4425-4430

Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover & R. H. Tenover. (1995). *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC

Nordling, J. (1998). Growth of enterococci at optimal and psychrotrophic temperature conditions related to growth in an urine source separating sewage system. Master thesis in biology, Department of Biology, Stockholm University, Sweden.

Norin, E., Stenström, T.A. och A. Albin. (1996). Stabilisering och hygienisering av svartvatten och organiskt avfall genom våtkompostering. *Vatten* 52(3): 165-176.

Olson, M. E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N. & McAllister, T. A. (1999). *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil and cattle feces. *Journal of Environmental Quality* 28: 1991-1996.

Olsson, A. (1995). Källsorterad humanurin – förekomst och överlevnad av fekala mikroorganismer samt kemisk sammansättning. SMI Rapport 208, Institutionen för lantbruksteknik, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Agricultural Engineering, Uppsala, 41 sider.

Robertson, L. J., Campbell, A. T. & Smith, H. V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (11): 3494-3500.

Sahlström, L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology* 87 (2): 161-166.

Schönning, C., Leeming, R., Stenström, T. A. (2002). Faecal contamination of source-separated human urine based on the content of faecal sterols. *Water Research* 36 (8): 1965-1972.

Slifko, T.R., Smith, H.V. & Rose, J.B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology* 30: 1379-1393.

Stenström, T.A. (1996). Tracing bacteria from the latrine to groundwater in dug wells. In: Drangert, J.O., Swiderski, R., and M. Woodhouse (Eds.). *Proceedings from Conference on Safe Water Environments, Kenya* 21-23.

Sundin, K. A., Leeming, R. L. & Stenström, T. A. B. (1999). Degradation of faecal sterols in urine for assessment of faecal cross-contamination in source-separated human urine and urine storage tank sediment. *Water Research* 33 (9): 1975-1980.

Thaysen, J. H., I. Lorenzen , L. K. Christensen, (1986). Medicinsk Kompendium. Nyt Nordisk Forlag Arnold Busk, København.

Tree, J. A, M. R. Adams & D. N. Lees. (1997). Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a 'viral indicator'. *Water Science and Technology* 35 (11-12): 227-232.

Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger A., Morris, J.G. and Sulakvelidze, A. (2000). Improved Pulsed-Field Gel Electroforesis for Typing Vancomycin-Resistant Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, (2000) 38, p. 4242 - 4245

Metodebeskrivelser for bakteriologiske undersøgelser

1.1 Udtagelse og opbevaring af isolater fra Slanetz & Bartley agar

På prøveudtagningstidpunkterne T-4, T-5, T-6 og T-8 blev der udtaget kolonier fra Slanetz & Bartley agar plader med vækst. Der blev udtaget kolonier med forskellig kolonimorfologi. Kolonierne blev opformeret i Brain Heart Infusion Broth (BHIB; Oxoid), og rendyrket på Blod Agar (BA; Oxoid). Isolaterne blev opbevaret i BHIB med 15% glycerol (Sigma) i fryser ved -80°C.

1.2 Identifikation og typning af enterokokker ved Polymerase Chain Reaktion (PCR), biokemiske test og Pulsed Field Gel Elektroforese (PFGE)

Identifikation af de rendyrkede isolater blev udført med PCR og biokemiske metoder. Identifikation af enterokokker på slægtsniveau ved PCR udførtes efter metode beskrevet af Ke *et al.* (1999) og artsbestemmelse efter Dutka-Malen *et al.* (1995). Bakterieartsbestemmelse af enterokokker ved PCR kunne identificere *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* og *E. flavescens*. Se også bilag D.

Der er foretaget biokemisk identifikation efter identifikationsnøgle beskrevet af Manero et Blanch (1999). Se tabel 2.

Enterokokkernes DNA fingeraftryk blev bestemt ved Pulsed Field Gel Elektroforese (PFGE) typning, der er en meget diskriminatorisk metode til differentiering af bakterier på DNA niveau. Typning af enterokokker ved PFGE blev udført som beskrevet af Turabelidze *et al.* (2000).

1.3 Identifikation af enterokokker ved Polymerase Chain Reaction (PCR)

Fremstilling af PCR lysat skete efter at isolater fra -80°C fryser var inokuleret på BA og inkuberet i 48 timer ved 37°C. Kolonimasse svarende til 5 µg blev overført til 100 µl destilleret H₂O i et eppendorfrør. Efter kogning i 15 min. ved 100°C og centrifugering i 3 min. ved 13.000 rpm blev supernatanten med DNA fra cellerne brugt til PCR.

Til PCR anvendtes Ready-To-Go PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N.J.), der indeholder Taq DNA Polymerase, magnesiumklorid (MgCl₂) og deoxyribonukleotid trifosfater (dNTP). Til en PCR-reaktion blev der tilsat 3µl PCR lysat, 1,25 µl af hver primer (koncentration af primer: 10 pmol/µl) og destilleret vand til et total volumen på 25µl.

PCR-reaktionen blev udført på en PCR-maskine fra Perkin Elmer .

Efter gennemført PCR-reaktion blev PCR produkterne adskilt ved elektroforese i en 1,5% agarose gel (SeaKem® GTG® Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, ME USA) i TAE-buffer (89 mM Tris; 89 mM eddikesyre; 2,5 mM EDTA; pH 8) ved 10°C. Gelen blev derefter farvet i ethidium bromid (2 µg/ml; Sigma, St. Louis, Mo), affarvet i destilleret vand og DNA båndene visualiseret og fotograferet under UV-lys ved Gel Doc 2000 apparat (Bio Rad, Sverige). En 100-bp DNA ladder ("stige") (Gibco-BRL) blev påsat hver agarose gel som størrelsesmarkør.

1.4 Bestemmelse af enterokokslægt

Der blev anvendt slægt-specifikke primere for enterokokker med følgende sekvens:

- Ent1 (5'-TACTGACAAACCATTCATGATG-3') og
- Ent2 (5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3')

Primerne blev syntetiseret hos firmaet TAG Copenhagen (København, Danmark). Disse primere giver et PCR-produkt med en størrelse på 112 bp.

PCR program til disse primere inkluderede denaturering i 5 min ved 94°C i første cykel, derefter 94°C i 20 sek., 55°C i 30 sek. og 72°C i 30 sek. i de næste 35 cykler, hvorefter programmet blev afsluttet med 10 min. ved 72°C. PCR rørene blev derefter afkølet til 4°C og opbevaret i fryser ved -20°C.

1.5 Bestemmelse af enterokokart

Enterokokarten blev bestemt ved såkaldt multiplex PCR-reaktion med 4 primersæt. Ved en multiplex PCR kan der anvendes flere primersæt på én gang og der kan således testes for flere arter på én gang.

Primere for detektion af *E. faecalis* havde sekvenserne:

- E1 (5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3') og
- E2 (5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3')

Primere for detektion af *E. faecium* havde sekvenserne:

- F1 (5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3') og
- F2 (5'-CATCGTGTAAGCTAACTTC-3')

Primere for detection af *E. gallinarum* havde sekvenserne:

- vanC1 F (5'-GGTATCAAGGAAACCTC-3') og
- vanC1 B (5'-CGAGCAAGACCTTTAAG-3').

Et enkelt primersæt blev anvendt til detektion af såvel *E. flavescens* og *E. casseliflavus* da disse to arter nu betragtes som én art (Teixeira *et al.*, 1997):

- vanC23 F (5'-CTCCTACGATTCTCTTG-3') og
- van C23 B (5'-CGAGCAAGACCTTTAAG-3').

PCR-reaktion med primerne E1 og E2 giver et PCR-produkt på 941 bp; primerene F1 og F2 et produkt på 550 bp; primerne vanC1 F og vanC1 B et produkt på 822 bp; endelig gav primerene vanC23 f og van C23 B

et PCR-produkt på 439 bp. Det var muligt at anvende alle de nævnte primere i samme PCR reaktion, da de forskellige størrelser af produkterne muliggør en adskillelse i den efterfølgende elektroforese.

PCR programmet for multiplex reaktionen var denaturering i 5 min ved 94°C i første cykel, derefter 94°C i 1 min., 54°C i 1 min. og 72°C i 2 min. i de næste 35 cykler, hvorefter programmet blev afsluttet med 10 min. ved 72°C. PCR rørene blev afkølet til 1/2 4°C og opbevaret i fryser ved -20°C.

Tabel 1 Identifikationsnøgle til bakterieslægt og artsbestemmelse af enterokokker ved Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Kontrol teststammer	PCR Ent1+Ent2	PCR E1+E2	PCR F1+F2	PCR vanC1B+vanC1F	PCR vanC23B+vanC23F
<i>E. faecium</i> (301)	+	-	+	-	-
<i>E. gallinarum</i> (CECT 970)	+	-	-	+	-
<i>E. avium</i> (CECT 968)	+	-	-	-	-
<i>E. raffinosus</i> (NCTC 12192)	+	-	-	-	-
<i>E. flavescens</i> (CECT 4481)	+	-	-	-	+
<i>E. mundtii</i> (ATCC 43186)	+	-	-	-	-
<i>E. durans</i> (CCUG 7972)	+	-	-	-	-
<i>E. hirae</i> (9790RF)	+	-	-	-	-
<i>E. dispar</i> (CECT 4310)	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (302)	+	+	-	-	-

1.6 Biokemisk identifikation af enterokokker

En forudsætning for at benytte identifikationsnøglen beskrevet af Manero et Blanch (1999), er at bakterieisolaternes slægt først bestemmes. Enterokokslægt blev fastlagt med PCR med de slægtsspecifikke primere Ent1 og Ent2.

Kulhydratfermentering blev udført i basal mediet Sukkerfri Bouillon, der pr liter indeholder 10 g kødekstrakt (Merck), 10 g pepton (Difco), 3 g natriumklorid (NaCl; Merck), 2 g di-natriumhydrogenphosphat-dodecahydrat (Na₂HPO₄, 12H₂O; Merck), 12 ml 0,2% bromthymolblåt (Merck). Bouillon steriliseres ved autoklavering og pH indstilles til 7,4 med 0,1 N natriumhydroxid (NaOH; Merck). L(+) arabinose, L(-) sorbose, D(-) ribose, methyl- α -D-glucopyranoside og mannitol blev tilsat i en koncentration på 1% i sukkerfri bouillon. Dette blev opnået ved at opløse 2 g af hver sukkerart i 10 ml destilleret vand, sterilfiltrere dette og tilsætte det til 190 ml sukkerfri bouillon. Der overførtes 4 ml af hver sukkerartsbouillon til sterile rør, som blev inokuleret med 4-5 kolonier af det rendyrkede bakterieisolat. Den inokulerede bouillon blev inkuberet

ved 37°C i varmeskab og aflæst efter 24 og 48 timer. Et testresultat var positivt, når boullonen var gul.

Pyrrolidonyl aminopeptidase og α -galactosidase aktivitet blev evalueret med diagnostiske kit fra Rosco Diagnostica (Tåstrup, Danmark). Testen udførtes som beskrevet af producenten og inkubation foregik ved 37°C i varmeskab med aflæsning efter 4 timer.

Arginin dihydrolase testen udførtes i arginin bouillon bestående af 5 g tryptose (Difco), 5 g gærekstrakt (Oxoid), 2 g kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 ; Merck), 0,5 g glukose (Merck) og 3 g arginin (Merck) pr. liter. Boullonen blev steriliseret ved autoklaving og pH indstilt til 7,0 med 0,1 N natriumhydroxid (NaOH; Merck). Arginin boullonen blev hældt i rør med 4 ml i hver og inokuleret med 4-5 kolonier af det rendyrkede bakterieisolat. Denne test blev udført ved 37°C med aflæsning efter 48 timer ved tildrypning af phenolrødtindikator. Reaktionen blev aflæst som positiv, når der fandtes farveomskift til rød.

Produktionen af gul pigment blev evalueret ved inokulering af isolaterne på Brain Heart Infusion Agar (BHIA; Oxoid), som blev inkuberet ved 37°C i 24-48 timer. Et isolat producerede pigment når kolonimassen havde en klar gul farve.

Testene er udført enkeltvis i henhold til identifikationsnøglen i tabel 2 beskrevet af Manero et Blanch (1999). De 10 kontrolstammer vist i tabel 2 blev medtaget i alle testene.

Tabel [ad3]2 Identifikationsnøgle til biokemisk bakterieslægtbestemmelse af enterokokker

(PYRase = pyrrolidonyl aminopeptidase)

	L(+) Arabi- nose	Gul Pig- ment	L(-) Sorbose	D(-) Ribo- se	PY Rase	Methyl- ∇ -D- glucopy- ranoside	Arginin- dihydro- lase	Mannitol	∇ - galac- tosi- dase
<i>E. faecium</i> (301)	+	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>E. gallinarum</i> (CECT 970)	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. avium</i> (CECT 968)	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>E. raffinosus</i> (NCTC 12192)	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. flavescens</i> (CECT 4481)	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i> (ATCC 43186)	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>E. durans</i> (CCUG 7972)	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>E. hirae</i> (979ORF)	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>E. dispar</i> (CECT 4310)	-	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (302)	-	-	-	+	+	-	+	+	-

1.7 Typning af enterokokker ved Pulsed Field Gel Elektroforese (PFGE)

Typning af de isolerede enterokokker ved PFGE blev udført efter metode beskrevet af Turabelidze *et al.* (2000).

Enterokokisolaterne blev opformeret i BHIB på ryst i 48 timer ved 37°C. Bakteriecellerne blev vasket og centrifugeret i TE 100:100 (100 mM Tris base (Merck), 100 mM EDTA (Merck)) og genopslemmet i 0,5 ml TE 100:100. Absorbansen målt derefter ved 595 nm på spektrofotometer (Labsystems Multiskan RC). Cellesuspensionen blev fortyndet så absorbansen lå mellem 0,9 og 1,0 svarende til en bakteriekoncentration på $2,5\text{-}3 \times 10^9$ cfu/ml.

Til lysering af bakteriecellevæggen anvendtes 0,2 ml cellesuspension, der blandtes med 0,2 ml lysisbuffer (50mM Tris, 50mM EDTA, mutanolysin (1250 U/ml; Sigma), lysozyme (2,5 mg/ml; Sigma) og proteinase K (1,5 mg/ml; Roche); pH 8) og blev inkuberet ved 37°C i 10 minutter. Derefter blev der tilsat 0,4 ml 1,2% agarose (SeaKem® Gold Agarose, Cambrex) indeholdende 1% SDS (natrium lauryl sulfat, Merck). Dette blandtes forsigtigt inden overførsel til støbeforme (Bio-Rad, Sverige), hvor der blev fremstillet 4-6 blokke af agarose med DNA fra bakterien. Blokkene blev derefter inkuberet i ESP-buffer (0,5 M EDTA, 1% sarcosyl (Sigma), proteinase K (400 µg/ml)) for nedbrydning af proteiner i 2 timer ved 55°C. Efter dette blev blokkene vasket ved 50°C, først i destilleret vand og så i TE 10:1 (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

Til elektroforese anvendtes 1/8 af en blok, der blev skåret af med en skalpel og overført til et eppendorfrør med buffer og restriktionsenzymet *Sma* I (30 Unit; New England Biolabs, MA). Denne opløsning blev inkuberet i 2 timer ved 30°C. Der blev fremstillet en 0,8% agarose gel (SeaKem® Gold Agarose) med 30 brønde, hvor der i hver brønd er plads til en afskåret blok. Elektroforese karret blev fyldt med 2,5 liter 0,5xTBE-buffer (1xTBE buffer er 89mM Tris, 90mM borsyre, 2,5 mM EDTA). De skårne blokke blev påsat agarose gelen og brøndene lukkedes efterfølgende med 1,2% agarose (SeaKem® Gold Agarose). Der blev desuden påsat en PFGE størrelsesmarkør (New England Biolabs) på hver gel. Der blev anvendt en CHEF DRIII apparat (Bio-Rad, Sverige) til elektroforese.

Elektroforese forholdene var følgende:

	Initial Switch tid (sek)	Final Switch tid (sek)	Kørsel tid (timer)	Volt/cm	Vinkel (°)
Blok 1	3,5	25	12	6	120
Blok 2	1	5	8	6	120

efter ialt 20 timers elektroforese kørsel blev gelen farvet i ethidium bromid (2 µg/ml; Sigma, St. Louis, Mo), derfter affarvet i destilleret

vand, og endelig blev DNA båndene visualiseret og fotograferet under UV-lys ved Gel Doc 2000 (Bio Rad, Sverige).

1.8 Kimtal ved 37°C

Kimtal ved 37°C blev bestemt ved tælling af kolonier på Water Plate Count Agar (WPCA) (Oxoid, Hampshire, England) efter inkubering ved 37°C i 44 ± 4 timer (DS/EN ISO 6222, 2000). Detektionsgrænsen for undersøgelsen var 10 bakterier pr. ml. Urinprøverne (1 ml) blev udtaget sterilt fra glasflaskerne og fortyndet ved 10-folds fortyndinger.

Der blev ikke foretaget nogen videre typning af isolater fra mulig eftervækst sidst i forsøgsperioden, idet kimalt ved 37°C må forventes at repræsentere en meget heterogen bakterioflora. Ud fra projektets begrænsede tidsmæssige og økonomiske ressourcer blev det derfor besluttet at karakterisere og type enterokokisolater fra Slanetz & Bartley agar, idet enterokokker er en vigtigere fækal indikator end kimalt ved 37°C.

1.9 Suspekter termotolerante coliforme bakterier

Suspekter termotolerante coliforme bakterier blev bestemt ved tælling af typiske gule kolonier på membran lauryl sulfat agar efter inkubering ved 44°C i 18-24 timer (Mod ISO/DIS 9308-1, 1998). Detektionsgrænsen for undersøgelsen var 10 bakterier per ml. Urinprøverne (1 ml) blev udtaget sterilt fra kapslerne og fortyndet ved 10-folds fortyndinger.

Orensning og detektion af oocyster i musetarmsæt

1. Hud og bugvæg åbnes forsigtigt. Mavesækken lokaliseres (hvid da den er fyldt med mælk). Duodenum frigøres forsigtigt fra mavesækken ved hjælp af en pincet, milten fjernes og tarmsættet løsnes fra krøset indtil rectum. Så meget som muligt af rectum medtages idet hele tarmsættet udtages.
2. Tarmsættet placeres i ca. 20 ml kold PBS-Tween 20 i en plast eller glasbeholder og findeles med en saks
3. Der tilsættes yderligere 30 ml og de i alt 50 ml hældes i en lille stomacherpose hvorefter der mixes godt i ca. 1 minut
4. De 50 ml filtreres igennem en lille plastsigte (apertur=) ned i et 50 ml centrifugerør.
5. Prøverne centrifugeres nu 10 minutter ved 1540 G/ rpm (hurtig acceleration, medium break) og der suges derefter ned til 5 ml. Vortex IKKE!!
6. Prøverne overføres til 15 ml centrifugerør, idet pellet overføres forsigtigt. 50 ml røret vaskes med MQ-vand indtil 15 ml røret er fuldt.
7. Prøverne centrifugeres 10 minutter ved 1540 G/ rpm (hurtig acceleration, medium break) og der suges derefter ned til 1 ml.
8. Vortex for at resuspendere pellet. Der udtages 60 µl som fordeles på 3 brønde af et objektglas.
9. Prøverne tørrer ved stuetemperatur, evt. natten over.
10. Der tilsættes 50 µl methanol per brønd for at fikserer prøverne. Disse lufttørres 15-20 minutter i stinksab.
11. Der tilsættes 40 µl FITC-antistof mod Crypto og der inkuberes i et fugtighedskammer i mørke i 1 time.
12. Brøndene vaskes forsigtigt 2 gange med 100 µl MQ-vand og der tilsættes derefter en dråbe IFA mounting fluid til hver og et dækglass lægges på.
13. Antal oocyster tælles i alle brønde ved 400x forstørrelse.

Specielle materialer:

PBS-Tween 20 : PBS indeholdende 0,02% Tween-20

FITC-antistof

IFA mounting fluid

Antal suspekke termotolerante coliforme bakterier – Projekt 1

Lokalitet	Urintanktype	Lagrings-temperatur (°C)	T-0 (cfu/ml)		T-1 (cfu/ml)	
			Flaske 1	Flaske 2	Flaske 1	Flaske 2
1	Lukket	4	<1cfu/ml ^a	1	<1cfu/ml	<1cfu/ml
1	Lukket	10	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
1	Lukket	20	<1cfu/ml	1	<1cfu/ml	<1cfu/ml
1	Åben	4	6	4	<1cfu/ml	<1cfu/ml
1	Åben	10	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
1	Åben	20	1	1	<1cfu/ml	<1cfu/ml
2	Lukket	4	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
2	Lukket	10	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
2	Lukket	20	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
2	Åben	4	6<1cfu/ml	1<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
2	Åben	10	9	1<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
2	Åben	20	1<1cfu/ml	1<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
3 ^b	Lukket	4	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
3	Lukket	10	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
3	Lukket	20	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
4 ^c	Lukket	4	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
4	Lukket	10	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml
4	Lukket	20	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml	<1cfu/ml

^a 1 cfu/ml = ingen gule kolonier på membran lauryl sulfat agar.

^b 3 = HFB

^c 4 = HFT

Bakteriologiske målinger – Projekt 2

Antal enterokokker i lagret urin ved forskellige inkubationstemperaturer (cfu/ml)

Lokalitet	Lagrings-temperatur (°C)	T-0	T-14 dage	T-1	T-2
1	4	400	-	200	80
1	10	400	-	200	20
1	20	500	40	3	1
2	4	200	-	400	100
2	10	400	-	200	100
2	20	200	90	100	1
Kontrol kapsel, PBS	4	0 ^a	-	1	4
Kontrol kapsel, PBS	10	0	-	0	1
Kontrol kapsel, PBS	20	0	0	0	0

^a 0 = ingen rød-brune kolonier; koncentration er < 1 cfu/ml

Kimtal ved 37°C i urin lagret ved forskellige temperaturer (cfu/ml)

Lokalitet	Lagrings-temperatur (°C)	T-0	T-14 dage	T-1	T-2
1	4	5000	-	3000	700
1	10	8000	-	2000	600
1	20	4000	500	100	100
2	4	30000	-	40000	9000
2	10	40000	-	40000	8000
2	20	40000	20000	3000	1000
Kontrol kapsel, PBS	4	0 ^a	-	70000	70000
Kontrol kapsel, PBS	10	0	-	120000	190000
Kontrol kapsel, PBS	20	0	13320	160000	620000

^a 0 = ingen vækst, dvs. koncentration er < 1 cfu/ml

Antal suspekter termotolerante coliforme bakterier i urin lagret ved forskellige temperaturer (cfu/ml)

Lokalitet	Lagrings-temperatur (°C)	T-0	T-14 dage	T-1
1	4	10	-	0 ^a
1	10	3	-	0
1	20	1	0	0
2	4	0	-	10
2	10	0	-	0
2	20	0	4	0
Kontrol kapsel, PBS	4	0	-	0
Kontrol kapsel, PBS	10	0	-	0
Kontrol kapsel, PBS	20	0	0	0

^a 0 = ingen gule kolonier; koncentration er < 1 cfu/ml