

Sundhedsmæssige problemer ved brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i væksthuse

Preben Larsen og Jesper Bælum
Odense Universitetshospital, Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik

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
PROJEKTGRUPPEN	6
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	11
1 INDLEDNING	15
1.1 FORMÅL	15
1.2 BAGGRUND	15
1.2.1 Metode for litteraturstudie	16
1.3 LUFTVEJSSYGDOMME OG ALLERGI	16
1.3.1 Astma	16
1.3.2 Allergi	17
1.3.3 Allergisk alveolitis	17
1.4 MIKROBIOLOGISKE MIDLER OG SUNDHEDSFORHOLD	17
1.4.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
1.4.2 <i>Verticillium lecanii</i> (V.l.)	20
1.4.3 <i>Trichoderma harzianum</i> & <i>polysporum</i> (T.h.)	21
1.4.4 <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	21
2 ENQUETE VEDRØRENDE MIKROBIOLOGISKE BEKÆMPELSESMIDLER	23
2.1 MATERIALE OG METODE	23
2.2 RESULTATER	24
2.3 DISKUSSION.	26
3 MATERIALE & METODE	27
3.1 UNDERSØGELSESDSIGN.	27
3.2 MATERIALE	27
3.2.1 Gartnerier	27
3.2.2 Inklusionsprocedure	28
3.2.3 Deltagere i den primære undersøgelse (run 0)	28
3.2.4 Skemaer udsendt til deltagere efter 3, 6 og 9 måneder	29
3.2.5 Follow-up efter et år (run 1)	29
3.2.6 Bortfald	29
3.2.7 Kohorten	29
3.2.8 Anvendte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler fordelt på gartnerier og antal medarbejdere	30
3.3 UNDERSØGELSESMETODER VED DEN ÅRLIGE KLINISKE UNDERSØGELSE	31
3.3.1 Arbejdsforholdsskema	31
3.3.2 Helbredsskema	32
3.3.3 Hudprøvetest	32
3.3.4 Lungefunktionsundersøgelse med spirometri	33
3.3.5 Bronkial provokationstest	33
3.3.6 Blodprøver (total og specifik IgE)	33
3.3.7 Histaminfrigørelsetest	34
3.3.8 Selvadministrerede skemaer efter 3, 6 og 9 måneder	34

3.3.9	<i>Peakflow-monitorering</i>	35
3.3.10	<i>Eksponeringsvurderinger</i>	35
3.4	ETISKE ASPEKTER	35
3.5	DATABEHANDLING	35
4	RESULTATER	37
4.1	MATERIALET	37
4.1.1	<i>Gartnerierne</i>	37
4.1.2	<i>Personerne</i>	38
4.2	ANTISTOFFER MOD MIKROBIOLOGISKE BEKÆMPELSESMIDLER	39
4.2.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	39
4.2.2	<i>Trichoderma harzianum</i>	41
4.2.3	<i>Verticillium lecanii</i>	42
4.2.4	<i>Paecilomyces</i>	43
4.3	SYMPTOMER	43
4.3.1	<i>Symptomer i tværsnitsmaterialet</i>	43
4.3.2	<i>Symptomer i follow up</i>	45
4.3.3	<i>Symptomer og eksponering for Bacillus thuringiensis</i>	46
4.3.4	<i>Symptomer og eksponering for Trichoderma harzianum</i>	47
4.3.5	<i>Symptomer og eksponering for Verticillium lecanii</i>	48
4.3.6	<i>Symptomer og eksponering for Paecilomyces fumosoroseus</i>	49
4.4	LUNGEFUNKTIONSMÅLINGER	50
4.4.1	<i>Tværsnit lungeparametre</i>	50
4.4.2	<i>Follow-up lungeparametre</i>	50
4.4.3	<i>Bronkial provokationstest</i>	51
4.5	ENKELTTILFÆLDE AF ALLERGI ELLER INFLAMMATORISKE LUNGESYGDOMME	51
5	DISKUSSION	53
6	FORKORTELSER OG FORKLARINGER	57
7	REFERENCER	59

Bilag A
 Bilag B
 Bilag C
 Bilag D
 Bilag E
 Bilag F
 Bilag G

Forord

Ved indførelse af ny teknologi er det sjældent at man sideløbende følger de eventuelle helbredsmæssige konsekvenser i humane undersøgelser. Muligheden foreligger her. Anvendelsen af biologiske bekæmpelsesmidler var ved projektets start stadig i sin vorden (udgjorde ca. 1% af det globale pesticidmarked i 1992), men må antages at vinde hastigt frem i den kommende tid. Man har således et godt udgangspunkt for at følge udviklingen på helbredsområdet. Med dette formål blev der i 1996 planlagt en prospektiv kohorteundersøgelse i fynske gartnerier.

Næsten halvdelen af de danske væksthushavsgartnerier er placeret på Fyn, og der har der været et mangeårigt samarbejde mellem gartnerierne, de ansatte og deres respektive organisationer på den ene side og Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odense Universitetshospital på den anden side om at belyse arbejdsmiljøet og relaterede sygdomme. Det har drejet sig om kroniske sundhedsskader af pesticider, aktuelt med vægt på de reproduktionstoksiske virkninger. I forbindelse med disse projekter blev man opmærksom på de nye mikrobiologiske midler og deres eventuelle helbredsmæssige virkning, og det aktuelle projekt blev igangsat.

Undersøgelsen er gennemført i perioden 1997-2000 på basis af en bevilling fra pesticidforskningsmidlerne under miljøstyrelsen på kr. 1,5 mio., mens en igangværende fortsættelse af undersøgelsen til 3 års follow up er finansieret af Det Strategiske Miljøforskningsprogram og indgår i "Center for Miljø og Luftveje", som forløber frem til udgangen af 2001.

Til projektet har der været tilknyttet en styregruppe med følgende medlemmer:

Holger Pedersen, Miljøstyrelsen, formand
Preben Larsen, projektkoordinator, Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik
Odense Universitetshospital,
Bent Løschenkohl, Danmarks Jordbrugs-forskning,
Jesper Bælum, Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odense
Universitetshospital,
Flemming Lander, Arbejdstilsynet,
Helle Raun Andersen, Miljømedicin, ISH, Odense Universitet

Desuden har der været en følgegruppe med deltagerne
Anne Marie Hagelskjær, Gartneribrugets Arbejdsgiverforening,
Pernille Folker Hansen fra Dansk Erhvervsgartnerforening og
Arne Grewsen og Bettina Andersen fra SID-Gartnerne's Fagforening.

Vi takker de involverede gartnerier og deres ansatte for støtte til gennemførelse af undersøgelsen.

Odense, april 2002
Preben Larsen og Jesper Bælum

Projektgruppen

Projektansvarlig: Overlæge, dr.med. Jesper Bælum, Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odense Universitetshospital.

Projektkoordinator: Speciallæge i lungemedicin Preben Larsen, Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odense Universitetshospital.

Projektlæge, Overlæge, ph.d. Per Sabro Nielsen, Arbejdsmedicinsk afdeling, Centralsygehus. Esbjerg Varde.

Projektlæge, Læge Inge Fugl, Socialmedicinsk enhed Odense Kommune.

Bioanalytiker Ulla Andersen, Klinisk Kemisk Afdeling, Odense Universitetshospital.

Bioanalytiker Hanne Lilleøre, Klinisk Kemisk Afdeling, Esbjerg Centralsygehus.

Bioanalytiker Jonna Madsen, Klinisk Kemisk Afdeling, Odense Universitetshospital.

Projektvejleder, Lektor, ph.d. Torben Sigsgaard, Aarhus Universitet.

HR analyser, Professor, dr.med. Per Stahl Skov, Referencelaboratoriet, 2100 København Ø.

IgE analyser, ph.d. Gert Doekes, Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Environmental and Occupational Health, University of Utrecht.

Seniorforsker Bent Løschenkohl, Danmarks Jordbrugsforskning, Flakkebjerg.

Adjunkt ph.d. Helle Raun Andersen, fagområdet Miljømedicin, IST, Syddansk Universitet.

Sammenfatning og konklusioner

I flere gartnerier er man i løbet af de senere år begyndt at anvende forskellige mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (skimmelsvampe, vira, protozoer og bakterier). De væsentligste produkter indeholder mikroorganismerne *Bacillus thuringiensis* og *Verticillium lecanii*, som anvendes til insektbekæmpelse, mens *Trichoderma harzianum* virker som svampemiddel ved at udkonkurrere plantepatogene svampe.

Formålet med denne undersøgelse er en vurdering af risiko for udvikling af Type 1 allergi (allergi med udvikling af IgE antistoffer) og udvikling af sygdom ved erhvervsmæssig eksponering for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. De mistænkte sygdomme er astma eller andre inflammatoriske lungesygdomme. En særlig risikogruppe forventes at være personer med atopi (beredskab for Type 1 allergi).

I 1996 blev der gennemført en spørgeskemaundersøgelse vedrørende brug og erfaring med mikrobiologisk bekæmpelse i de fynske gartnerier. Der ønskedes vurderet hvor mange ansatte der arbejdede direkte med midlerne og antal udsatte i øvrigt. Ud af 205 mulige gartnerier blev der gennemført interviews med 193, beskæftigende 2.206 helårsansatte og 2.756 ansatte i højsæsonen.

59 % af gartnerierne (som repræsenterede 69% af drivhusarealet og 78% af de helårsbeskæftigede) oplyste at de brugte biologisk bekæmpelsesmidler. 27% af gartnerierne brugte både nyttedyr og mikrobiologiske midler, mens 13% udelukkende brugte mikrobiologiske midler og 19% udelukkende nyttedyr.

Der var således et betydeligt og stigende forbrug af mikrobiologisk bekæmpelsesmidler, dog i mange gartnerier som forsøg. Fordelingen af brugen af de enkelte hovedtyper er antageligt mere usikker idet perioden var præget af mange forsøg og ny introduktion. Fordelingen af brugen ændres antageligt fremover, dog fortsat med *Bacillus thuringiensis*, *Verticillium lecanii* og *Trichoderma harzianum* som hovedtyper.

Der gennemførtes i perioden 1997 til 1999 en 1 års follow-up undersøgelse af ansatte på 31 prydplantegartnerier på Fyn med i alt 773 ansatte. Personerne var eksponeret for tre typer mikrobiologisk bekæmpelsesmidler: *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma harzianum* og *Verticillium lecanii* mens en gruppe var uden eksponering. I løbet af undersøgelsesperioden blev et produkt indeholdende svampen *Paecilomyces fumosoroseus* inddraget i undersøgelsen.

I primærundersøgelsen deltog 456 personer og i 1. follow-up 439. Herved dannedes et tværsnitsmateriale af de i alt 579 personer som blev undersøgt og 316 personer, som fulgtes gennem 1 år. Undersøgelsesgruppen bliver fulgt i yderligere to år frem til 2001.

Ved de årlige undersøgelser blev der gennemført interview om arbejdsforhold og helbredsforhold samt målt lungefunktion, bronkial provokationstest og standard hudprøvetest. Blodprøver blev analyseret for IgE antistoffer (allergiantistoffer) mod de forskellige produkter.

Hyppigheden blandt de 579 personer i tværsnitsmaterialet af symptomer fra øjne og luftveje varierede mellem 9 % (altid forkølet) og 31 % (kløe i øjne). 6,6 % havde astma, mens 20 % havde høfebersymptomer.

I gartnerier hvor der anvendtes *Bacillus thuringiensis* produkter var der en overhyppighed af kløe og svie i øjnene på arbejde og øjengener mere end en gang ugentlig, mens trykken for brystet mere end en gang ugentlig var hyppigst hos dem, der selv udsprede produkterne. Der var flere nye symptomer med kløe og svie i øjnene på arbejde i gartnerier som anvendte *Bacillus thuringiensis*. Hoste uden forkølelse, anfald af vejrtrækningsbesvær, kløe og svie i næse samt anfald af kulderystelser på arbejde var hyppigere blandt personer i gartneri hvor *Trichoderma harzianum* anvendtes. Der var ingen symptomer relateret til brug af *Verticillium lecanii* og brugen af *Paecilomyces fumosoroseus* var så lidt udbredt at virkningen ikke kunne vurderes.

Der var ingen forskel i lungefunktion eller følsomhed for histamin mellem de personer som var udsat for mikrobiologisk bekæmpelsesmidler i gartnerierne og de personer som ikke arbejdede i gartnerier.

Der var målelige IgE antistoffer mod de fire typer mikrobiologisk bekæmpelsesmidler. Hyppigheden fulgte forekomsten af de enkelte produkter, men der var ikke nogen klar sammenhæng med den individuelle eksponering. Specielt var der ikke nogen øget sensibilisering hos de personer som selv havde håndteret produkterne og derfor var mest eksponerede. Antistofniveauerne hos den enkelte person var stabile, men der var ingen sammenhæng mellem forekomsten af antistoffer på den ene side og symptomer eller resultater af lungefunktionen på den anden side. Der kunne ikke detekteres en øget sensibilisering blandt de eksponerede i et års perioden.

I tværsnitsundersøgelsen havde personer med en positiv priktest (atopikere) i væsentligt flere både høfebersymptomer og symptomer på astma end de øvrige. Yderligere var der en betydelig overhyppighed af nye høfebersymptomer i løbet af det følgende år hos de atopikere som ikke havde symptomer i første runde. Der var ikke tegn til at atopikere var specielt følsomme over for de mikrobiologiske midler så årsagerne kan være mange forskellige forhold i arbejdsmiljøet.

Med en så stor forskel mellem atopikere og andre vil man forvente en ”healthy worker effect” blandt de gartneriansatte hvor særligt følsomme personer forsvinder fra af erhvervet. En analyse af de personer, som faldt fra mellem første og anden runde kunne tyde på at den er til stede. Derfor vil tværsnitsdata undervurdere den sundhedsmæssige virkning væsentligt. Vægten ved bedømmelse af den sundhedsmæssige virkning af eksponeringen bør derfor ligge på follow-up studiet som dog først efter tre års observationstid forventes at have tilstrækkelig styrke.

Sammenfattende viser studiet at der er en ret stor hyppighed af luftvejssymptomer blandt de gartneriansatte og der kan være en relation til arbejde med *Bacillus thuringiensis* og til dels *Trichoderma*. På grund af jobselektionen skal resultaterne af tværsnitsundersøgelsen tages med forbehold. Follow-up undersøgelsen viste kun få tegn på effekt af de mikrobiologiske midler, men da opfølgningstiden var kort må en konklusion dog afvente resultaterne af det treårige follow-up studie.

På trods af de begrænsede effekter af de mikrobiologiske bekæmpelsesmidler anbefales det at eksponeringen ved håndtering af produktet - specielt afvejning og udsprøjtning – begrænses. Det kan dels ske ved ændrede procedurer så materialet håndteres i opløsning og dels ved personlige beskyttelsesmidler som åndedrætsværn, handsker og forklæde. Mere definitive retningslinjer må dog afvente de endelige resultater af follow-up undersøgelsen.

Summary and conclusions

Microbiological pest control has been introduced in greenhouses as a supplement or substitution for chemical insecticides and fungicides. In Denmark the types most often used are the insecticides *Bacillus thuringiensis* and *Verticillium lecanii*. *Trichoderma harzianum* is used as a fungicide acting as a competitor to the plant pathogenic fungi. Development of this new technology enables evaluation of the health risk.

The aim of this study has been an evaluation of the risk of developing type I allergy and inflammatory lung diseases due to exposure to microbiological pesticides during work in greenhouses.

In 1996 a survey was made on the use of microbiological pesticides in greenhouses in Funen County, Denmark. 193 interviews were carried out with greenhouse owners employing 2,206 full-time workers, rising to 2,756 workers in the peak season. 59% of the greenhouses comprising 69% of the area under glass and employing 78% of the full-time workers used biological pest management. In 27% of the greenhouses both microbiological pesticides and macrobiological pest management (predator mites, nematodes etc.) were used, while 13% exclusively used microbiological pesticides in the form of bacteria and fungi. Most prevalent was the use of the species: *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma harzianum*, and *Verticillium lecanii*.

In the follow up study 31 greenhouse companies were included to cover the use of the different products. At the start they had 773 full-time workers and produced almost exclusively ornamental plants, more than 100 different species with marguerites, chrysanthemum, and roses as the most frequent. The persons were exposed to *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma harzianum*, or *Verticillium lecanii*. In addition, a group without exposure to microbiological pesticides was included. The fungus *Paecilomyces fumosoroseus* was introduced at the time of the study and therefore included.

In the first round of the study in 1997-1998, 456 persons were included. Of these, 316 were re-examined in the follow up 1 year later, at which time 123 persons were included. This gives a cross section of 579 persons (32% males and 68% females) aged between 16 and 67 years with average seniority of 9.7 years in the trade. The group of persons was followed for three years until 2001.

At the annual examinations, the persons were interviewed about working conditions, focusing on exposure to microbiological pesticides, and health conditions, focusing on symptoms related to allergy and inflammatory upper and lower respiratory tract diseases. A spirometry and bronchial challenge test was carried out using histamine chloride, as well as a skin-prick test with standard inhalatory allergens. Blood samples were taken for analysis for IgE antibodies against the total of 8 products of the four types of pesticides.

In the cross-sectional material of 579 persons, the prevalence of a total of 24 symptoms, covering irritation in eyes and airways, varied between 9% and 31% (itching in the eyes). 6.6% of the subjects reported they had asthma while about 20% reported one or more symptoms of rhinitis.

In greenhouses using *Bacillus thuringiensis* products the prevalence of itching in the eyes at work increased, and a frequency of more than once a week was observed. The persons who handled *Bacillus thuringiensis* product had more chest tightness than the rest, while in the follow up an increased incidence of itching in the eyes was seen in greenhouses using *Bacillus thuringiensis*.

Trichoderma harzianum in greenhouses was related to coughing, difficulty of breathing, itching in the nose, and more unspecific annoyance. The use of *Verticillium lecanii* was not related to any symptoms and the effects of *Paecilomyces fumosoroseus* could not be evaluated due to a low number of persons exposed.

There was no difference in the lung function and in histamine sensitivity between subjects exposed to the products and those not exposed to the products.

There were measurable IgE antibodies against the different products. The prevalence of antibodies above the detection limits was highest for the *Verticillium lecanii* and the *Bacillus thuringiensis* products, while antibodies against *Trichoderma harzianum* and *Paecilomyces fumosoroseus* were less frequent. There was no clear relationship with the measures of individual exposure. In particular, no sensitisation was observed in the highly exposed persons who had handled and sprayed the products. During the one-year follow up, the levels of antibodies for the individual were stable and there was no sign of increased sensitisation.

The incidence of new symptoms was about 10% and only in a few symptoms were related to the measurements of exposure or sensitisation. Due to the relatively few new symptoms in the short follow up, the significance of this part of the study for detecting exposure-response relationship is low.

In the cross sectional material, persons with one or more positive prick tests as an indicator of atopy showed higher prevalence of eye and nose symptoms and diagnosed asthma than the non-atopics. Furthermore, the incidence of new symptoms during follow-up in the group of atopic persons was considerably higher than among the non-atopic persons, and persons with house dust mite allergy were over represented in the group that left the study between the first and second examination. This could indicate a "healthy worker effect" due to the different exposures in the greenhouses. The evaluation of health effects should therefore primarily be based on measures of incidence and the study has therefore been extended for three years to achieve a higher significance.

In conclusion, the study showed a relatively high prevalence of symptoms among greenhouse workers, and there was a limited relationship to estimates of exposure to *Bacillus thuringiensis* and *Trichoderma harzianum*, but not to *Verticillium lecanii* or *Paecilomyces fumosoroseus* products. A few effects in the follow up were seen too, while there was no effect on physiological measurement. The significance of the one-year study, however, was low and

the "healthy worker effect" detected supports the notion that emphasis should be on measuring incidence in a longer follow up.

A limited number of significant effects of the microbiological pesticides were seen in this study. Nevertheless, altering procedures and using personal protective equipment during handling and spraying may limit exposure. The possible effects on persons exposed during re-entry activities need more investigation of both the real exposure and the dose-response relationship.

1 Indledning

Formålet med projektet er at undersøge om der er risiko for udvikling af Type I allergi og inflammatoriske lungelidelser i forbindelse med erhvervsmæssig eksponering for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (*MB*), målt ved udvikling af symptomer, ændringer i lungefunktion samt biokemiske markører for allergiudvikling.

Samtidig ønskes andre risikofaktorer i arbejdet og hos personen for sensibilisering og udvikling af sygdom karakteriseret.

1.1 Formål

Undersøgelsen vil belyse, om der er øget risiko for udvikling af allergi eller astma blandt ansatte i gartnerier, der benytter mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Der søges endvidere belyst, om der er sammenhæng mellem eksponeringens størrelse samt visse arbejdsprocesser og udvikling af allergi eller astma. Det bliver muligt på baggrund heraf at gennemføre risikovurdering og udarbejde anbefalinger vedrørende arbejdsprocedurer og beskyttelsesforanstaltninger med henblik på forebyggelse.

Det er hensigten at anvende undersøgelsens resultater som baggrund for udarbejdelse af anbefalinger vedrørende arbejdsprocedurer og beskyttelsesforanstaltninger i en målrettet forebyggelse af arbejdsbetinget luftvejssygdom som følge af udsættelse for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler.

1.2 Baggrund

Flere gartnerier er i løbet af de senere år begyndt at bruge forskellige biologiske bekæmpelsesmidler. Det er dels forskellige dyr (tæger, mider, nematoder osv.) også kaldet makrobiologiske midler og dels forskellige mikroorganismer (bakterier, vira, svampe og protozoer) som kaldes mikrobiologiske bekæmpelsesmidler.

Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler er bakterier, svampe eller virus som anvendes i stedet for kemiske stoffer (1). De første mikrobiologiske bekæmpelsesmidler kom på markedet omkring 1960, og fra midten af 1980'erne blev de første produkter anvendt i Danmark. I dag bruges de fleste til sygdoms- eller skadedyrsbekæmpelse i væksthuse. Brugen af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler udgør dog stadig kun en mindre procentdel af det samlede forbrug af bekæmpelsesmidler (2).

Lovgivningen om bekæmpelsesmidler er ganske kompliceret. Hovedreglerne om godkendelse af midlerne fremgår af kapitel 7 i kemikalieloven, men også andre af lovens regler gælder for bekæmpelsesmidlerne. I tilknytning til loven er udstedt bekendtgørelse om bekæmpelsesmidler, der indeholder en lang række konkrete anvisninger og krav til producenter, importører, forhandlere og brugere af bekæmpelsesmidler. Den nuværende lovgivning er kort skitseret i Bilag A.

1 Indledning

Formålet med projektet er at undersøge om der er risiko for udvikling af Type I allergi og inflammatoriske lungelidelser i forbindelse med erhvervsmæssig eksponering for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (*MB*), målt ved udvikling af symptomer, ændringer i lungefunktion samt biokemiske markører for allergiudvikling.

Samtidig ønskes andre risikofaktorer i arbejdet og hos personen for sensibilisering og udvikling af sygdom karakteriseret.

1.1 Formål

Undersøgelsen vil belyse, om der er øget risiko for udvikling af allergi eller astma blandt ansatte i gartnerier, der benytter mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Der søges endvidere belyst, om der er sammenhæng mellem eksponeringens størrelse samt visse arbejdsprocesser og udvikling af allergi eller astma. Det bliver muligt på baggrund heraf at gennemføre risikovurdering og udarbejde anbefalinger vedrørende arbejdsprocedurer og beskyttelsesforanstaltninger med henblik på forebyggelse.

Det er hensigten at anvende undersøgelsens resultater som baggrund for udarbejdelse af anbefalinger vedrørende arbejdsprocedurer og beskyttelsesforanstaltninger i en målrettet forebyggelse af arbejdsbetinget luftvejssygdom som følge af udsættelse for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler.

1.2 Baggrund

Flere gartnerier er i løbet af de senere år begyndt at bruge forskellige biologiske bekæmpelsesmidler. Det er dels forskellige dyr (tæger, mider, nematoder osv.) også kaldet makrobiologiske midler og dels forskellige mikroorganismer (bakterier, vira, svampe og protozoer) som kaldes mikrobiologiske bekæmpelsesmidler.

Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler er bakterier, svampe eller virus som anvendes i stedet for kemiske stoffer (1). De første mikrobiologiske bekæmpelsesmidler kom på markedet omkring 1960, og fra midten af 1980'erne blev de første produkter anvendt i Danmark. I dag bruges de fleste til sygdoms- eller skadedyrsbekæmpelse i væksthuse. Brugen af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler udgør dog stadig kun en mindre procentdel af det samlede forbrug af bekæmpelsesmidler (2).

Lovgivningen om bekæmpelsesmidler er ganske kompliceret. Hovedreglerne om godkendelse af midlerne fremgår af kapitel 7 i kemikalieloven, men også andre af lovens regler gælder for bekæmpelsesmidlerne. I tilknytning til loven er udstedt bekendtgørelse om bekæmpelsesmidler, der indeholder en lang række konkrete anvisninger og krav til producenter, importører, forhandlere og brugere af bekæmpelsesmidler. Den nuværende lovgivning er kort skitseret i Bilag A.

Flere af de mikrobiologiske midler virker ved at mikroorganismen parasiterer skadevolderne og producerer toksiner (3).(4)

Af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler har bakterien *Bacillus thuringiensis* (*israelensis* og *kurstaki*) siden 1960'erne været brugt inden for skovbrug og landbrug mod insektangreb, svampen *Trichoderma harzianum* er brugt i væksthuse mod svampeangreb, og svampene *Paecilomyces fumosoroseus* og *Verticillium lecanii* mod insektangreb.

Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler anvendes til sprøjtning på planterne, tilblandet i vækstmedie, eller til at stiklinger dyppes i en opslemning af midlet. Erhvervsmæssig udsættelse for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler kan ske dels ved blanding og udsprøjtning, dels ved håndtering af behandlede planter/jord (re-entry).

Både makro- og mikrobiologiske midler er i øjeblikket accepteret til anvendelse inden for økologisk dyrkning, hvilket måske vil øge forbruget i de næste år på grund af den stigende efterspørgsel af økologiske produkter.

1.2.1 Metode for litteraturstudie

I forbindelse med projektet blev der gennemført en litteratursøgning med udgangspunkt i de relevante områder, lungesygdomme, allergi og mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Der er søgt i databaserne Medline, Toxline, Embase og Nioshtic & HSELINE (OSH-ROM) med søgeprofiler der fremgår af Bilag B. Derudover er der opnået referencer via litteraturhenvisninger i læste artikler.

1.3 Luftvejssygdomme og allergi

1.3.1 Astma

Astma (bronchiale) er kendetegnet med symptomer som hoste og anfald af åndenød med pibende vejrtrækning, typisk sent om aftenen eller tidligt om morgenen. Typisk provokeres åndenøden uspecifikt af kold luft, fysisk anstrengelse, psykisk stress, luftvejsinfektioner og evt. specifikt af inhalationsallergener.

Karakteristisk for astma er bronkial hyperreaktivitet, som skyldes en inflammatorisk tilstand i bronkierne med øget tilbøjelighed til reversibel bronkieobstruktion på grund af kontraktion af glat muskulatur, slimhindeødem og øget bronkial sekretion. Bronkial hyperreaktivitet er karakteristisk for astma (5).

Astma angives at være den hyppigste kroniske sygdom i de industrialiserede lande og prævalensen menes at være stigende i verden (6). Øget fokusering, bedre diagnostik eller ændret klassificering kan ikke alene forklare stigningen i luftvejsallergi, ej heller ændringer i vores genetiske dispositioner. Årsagerne til stigningerne må derfor findes i vores miljø og livsstil (7).

1.3.1.1 Definition for astma

Astma er en kronisk inflammatorisk luftvejssygdom, hvor en række celler, herunder mastceller, eosinofile celler og granulocytter spiller en rolle. Inflammationen er associeret med udtalt luftvejshyperreaktivitet overfor en række stimuli. Der er en generaliseret, men variabel luftvejsobstruktion, som tidvist bedres eller svinder spontant eller efter adækvat behandling.

Døgnvariationen i peakflow skal være større end eller lig med 20 % af patientens maksimale opnåede værdi, dog minimum 100 liter pr. minut. Bedømmes lungefunktionen ved FEV₁ (forceret ekspiratorisk volumen i 1. sekund) skal ændringen være større end 20 % af patientens maksimum, hvis FEV₁ er mindre end eller lig med 1,5 liter og større end eller lig med 15 %, hvis FEV₁ er større end 1,5 liter. Dog skal ændringen være mindst 200 ml.

1.3.2 Allergi

Sygdomsgruppen allergi omfatter rhinitis og rhinoconjunctivitis, asthma bronchiale, levnedsmiddeloverfølsomhed, urticaria (nældefeber) og angioødem, systemisk anafylaksi, insektallergi og lægemiddelallergi. Den tilgrundliggende hyperreaktivitet kan være ikke-immunologisk eller immunologisk, udløst af specifik IgE.

Allergisymptomer kan udvikles med essentielt samme inflammationspatagonese i et enkelt eller i flere organsystemer samtidigt: Næseflåd, tåreflåd, obstruktiv dyspnø, feber med dyspnø og nedsat diffusionskapacitet, diarré og kolik, urticaria, angioødem, anafylaktisk almenreaktion og anafylaktisk shock, hududslæt, feber og desuden vidtgående varieret organinvolvering efter indgift af lægemidler (5).

1.3.2.1 Definition af type-1-allergi

Allergiformen er karakteriseret ved, at patienten danner IgE-antistoffer mod fremmede stoffer. Reaktionen viser sig i løbet af få minutter efter, at kroppen har mødt det pågældende allergen, når patienten er sensibiliseret.

1.3.2.2 Definition af atopi

Atopi refererer til en arvelig prædisponeret evne til at producere IgE-antistof. Om en person har atopi defineres ud fra om vedkommende har dannet IgE antistoffer overfor almindelige forekommende inhalationsallergener, bedømt ved at personen har en positiv priktest for mindst én af de almindelige inhalationsallergener.

1.3.3 Allergisk alveolitis

Sygdommen kendes under mange navne, som tærskertilunge, farmers lung, pigeon breeders lung samt andre erhvervsassocierede navne.

Allergisk alveolitis er karakteriseret ved at være en inflammatorisk lungesygdom forårsaget af inhalation af antigenholdigt støv, som regel relateret til arbejde, f.eks. flytning af hø, halm, tærskning, avl af champignon, korn, kaffe, arbejde med ost, malt, mel, fjerkræ, laboratoriedyr, luftbefugtningsanlæg, fugleekskremitter.

Symptomer i den akutte form opstår ved eksponering hos forudgående specifikt sensibiliserede personer 4-8 timer efter eksponering som feber, kulderystelser, led- og muskelsmerter, tør hoste, dyspnø, ofte svær.

Symptomerne svinder i løbet af 1-2 døgn, og optræder efter hver eksponering (5).

1.3.3.1 Definition af Allergisk alveolitis

Sygdommen er en non-IgE medieret allergisk lungesygdom, som er forårsaget af inhalation af organisk støv.

1.4 Mikrobiologiske midler og sundhedsforhold

Der findes ikke epidemiologiske undersøgelser af helbredseffekter ved brugen af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler i væksthuse. Derfor vil overvejelser om

de sundhedsmæssige effekter på den ene side bygge på analogi til beslægtede mikroorganismer og forholdene i andre brancher, og på den anden side beskrivelse af mulige virkningsmekanismer. Men man har begrænset viden om, hvorvidt erhvervsarbejde med biologiske bekæmpelsesmidler eller arbejde i lokaliteter, hvor sådanne har været benyttet, indebærer en sundhedsmæssig risiko. De mulige sundhedsmæssige effekter af eksponering for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler kan være inflammatoriske lungesygdomme. Mest vægt lægges på de to sygdomsgrupper astma og alveolitis. Begge kan forekomme som følge af en allergisk reaktion, men også ved en direkte toksisk (irritativ) påvirkning. Desuden kan forventes øvre luftvejssymptomer i form af rhinitis, øjensymptomer (conjunctivitis) eller hudsymptomer i form af udslæt eller kløe.

Selvom de mikroorganismer, der anvendes i biologiske midler, er naturligt forekommende, vil den humane eksponering ved erhvervsmæssig håndtering være langt større end ved "naturlig" eksponering. Alle mikrobiologiske bekæmpelsesmidler indeholder potentielt allergene proteiner, dels i selve mikroorganismen (f.eks. intracellulære enzymer eller strukturelle bestanddele af cellemembranen), dels i vækstmediet i form af næringsstoffer og eventuelt proteiner udskilt af mikroorganismen (8).

De vigtigste risici i forbindelse med anvendelse af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler må forventes at være induktion af allergiske eller irritative reaktioner, infektion eventuelt på grund af forurening af produktet med humanpatogene mikroorganismer samt toksiske effekter som følge af toksinproduktion.

Udsættelse for store mængder mikroorganismer i luften er kendt fra industrier, arbejde på komposteringsanlæg og fra landbrug, hvor der har været udsættelse for mikroorganismer enten som fermenter eller som forurening. Her er kendskab til en række luftvejssygdomme som følge af udsættelse for mikroorganismer og deres omsætningsprodukter (9-15). Sygdommene strækker sig fra astma, allergisk alveolitis, toksisk alveolitis og hoste til høfeber og andre slimhindegener.

1.4.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis er den mest anvendte mikroorganisme (16). Produkterne (Bactimos, Dipel og Vectobac) indeholder forskellige stammer af *Bacillus thuringiensis*, som hver især er relativt specifikke over for bestemte skadevoldende insekter (f.eks. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* over for sommerfuglelarver i skov- og landbrugskulturer, *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* overfor billelarver herunder Colorado-billen samt *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* over for diptera (myg- og fluelarver).

Bacillus thuringiensis er en gram positiv bakterie, som danner endosporer samt et såkaldt inklusionslegeme bestående af et krystallinsk protein, kaldet delta-endotoksin. Når insektlarver spiser bakterien aktiveres toksinet i parasporen i larvens tarmsystem, hvor der er basisk miljø. Toksinet hæmmer Na-K-ATPaser og forårsager paralyse og nekroser i tarmen. Herefter optages endosporerne med efterfølgende infektion (17).

Der findes nogle enkelte beskrivelser, hvor *Bacillus thuringiensis* optræder hos patienter med infektiøs sygdom, men ingen af disse studier demonstrerer en aktuel risiko for menneskers helbred på baggrund af brugen af *Bacillus*

thuringiensis (16;18). Der er lavet talrige laboratorieeksponeringsforsøg på pattedyr med *Bacillus thuringiensis* som viser høj sikkerheds profil (18;19).

Tilbage i 1959 blev der foretaget eksperimentelle humane eksponerings forsøg uden målbar helbredseffekt. 18 forsøgspersoner deltog. De indtog blandt andet 1 gram Thuricide (*Bacillus thuringiensis*) i kapsler dagligt i 5 dage. Desuden inhalerede 5 af personerne desuden 100 mg dagligt i 5 dage. Personerne blev undersøgt ved klinisk undersøgelse, og der blev foretaget en række laboratiemæssige undersøgelser fra blod-, urinprøver (samt røntgenundersøgelse for dem, der havde inhaleret *Bacillus thuringiensis*), undersøgelsesprogrammet blev gentaget ved afslutningen af de 5 dage og igen 4 eller 5 uger senere (20).

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* har været anvendt til insektbekæmpelse i afgrøder samt i beboede skovområder i mere end 30 år. Der foreligger kun få undersøgelser vedrørende sundhedsmæssige effekter på befolkningen bosat i områder hvor der har været sprøjtet med *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. I en amerikansk undersøgelse (Lane County, Oregon) fra 1985/86 af sundhedseffekter forårsaget af applikation over skovområder (med et befolknings antal på 80.000 i berørte område i 1985, og 40.000 i berørte område i 1986), fokuseres udelukkende på risikoen for infektioner forårsaget af *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Områdets 4 største kliniske laboratorier skulle i sprøjteperioden supplere almindelige undersøgelser af dyrkninger fra patienter med en *Bacillus* dyrkning. Alle dyrkninger der rutinemæssigt var udført i perioden og 1 måned senere og som var positive for *Bacillus thuringiensis* typer blev specialdyrket og sendt til undersøgelse for om det var *Bacillus thuringiensis*. Der blev fundet 55 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* positive dyrkninger ved rutinedyrkninger fra patienter i de to perioder, 52 af de positive af dyrkningerne blev bedømt til at være uden årsag til sygdom, hos 3 kunne man ikke sige om *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* var eller ikke var patogen, men alle tre patienter havde anden tilgrundliggende sygdom. Der blev overordnet fundet en minimal øget risiko for infektion med *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, men kun hos immunsupprimerede personer (21).

I Nordamerika blev løvskovsnonne et tiltagende problem i starten af 1990'erne. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* var et meget anvendt og som alene i foråret 1992 blev udspremt fra luft over 161 km² i Vancouver (British Columbia), 469 km² i Tacoma (Washington) og 30 km² i Portland (Oregon). Ved et studie (i 1992) blandt personer der blev eksponeret ved selve udsprøjtningen (120) og personer (1.400.000) der boede i området for "a major spray programme for gypsy moth control" med *Bacillus thuringiensis* blev der ikke fundet alvorlige helbredsproblemer (kun sprukne læber, tør hud, øjenirritation og næse- løbe/stoppet) (22).

I foråret 1999 blev et område på cirka 135 km² i Southern Vancouver, fra fly, oversprøjtet x 3 med *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (cirka 80.000 indbyggere i området). Der blev i perioden set nærmere på evt. helbredspåvirkning af indbyggere (blandt andet med fokus på astma hos børn). Der blev ikke fundet sammenhæng mellem udsættelsen for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* og korttids helbredspåvirkning (23).

I nogle lande i Asien er der tilsat *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* til drikkevand som myggebekæmpelse. Fra disse områder er der ikke rapporteret bivirkninger på mennesker. I Afrika har visse floder været tilsat *Bacillus*

thuringiensis var. *israeliensis*. hvor der ligeledes for mennesker, der har drukket vand fra floderne, ikke har været rapporteret bivirkninger (16).

Der foreligger nogle få kasuistikker om infektioner forårsaget af *Bacillus thuringiensis*. En landbrugsmedarbejder fik hornhindesår i det ene øje efter ved uheld at have sprøjtet *Bacillus thuringiensis* i øjet (24). En studerende der havde arbejdet med et medie med *Bacillus thuringiensis* og en kontaminant (*Acinetobacter*), udviklede en infektion efter et nålestikuheld (25). Ved et enkelt tilfælde af udbrud af gastroenteritis på et plejehjem er der fundet *Bacillus thuringiensis* (26). P.H. Damgaard, der har set på *Bacillus thuringiensis* og *Bacillus cereus*'s evner til at producere diaré fremkaldende enterotoksin, fremfører at visse tilfælde af gastroenteritis kan være *Bacillus thuringiensis* udløst, men at tilfældene kan være "skjult" bag diagnostiserede *Bacillus cereus* gastroenteritis tilfælde (27).

Andre *Bacillus* species, især *Bacillus cereus*, som kendes fra kontaminering af fødevarer, kan give alvorlige infektioner hos mennesker (28). *Bacillus cereus*. og *Bacillus thuringiensis* er nært beslægtede (29;30) og nogle undersøgelser tyder på, at *Bacillus cereus* kan omdannes til *Bacillus thuringiensis* og vice-versa ved plasmidoverførsel, når begge stammer er til stede (31).

Allergi som følge af inhalation af *Bacillus thuringiensis* i forbindelse med sprøjtning og håndtering af *Bacillus thuringiensis* er en potentiel risiko. I et enkelt studie er der fokuseret på dette. Landbrugs medarbejdere (n=48) eksponeret for *Bacillus thuringiensis* blev undersøgt før og 1 måned efter eksponering (n=32) samt 4 måneder efter eksponering (n=20). To grupper, der ikke direkte blev eksponeret, blev delt op i lavt eksponeret (n=44) og mellem eksponeret (n=34) blev ligeledes undersøgt.

Sammenfattende kunne anføres at udsættelse for *Bacillus thuringiensis* kan medføre allergisk hudsensibilisering og/eller induktion af IgG og IgE antistof. På trods af at der blandt medarbejdere var tilfælde med symptomer fra luftveje, øjne og hud, kunne ingen af symptomerne henføres til arbejdsrelaterede kliniske sygdomme (32).

1.4.2 *Verticillium lecanii* (V.I.)

Svampen (produkter Mycotal og Vertalec) benyttes til bekæmpelse af bl.a. bladlus, mellus, trips, spindemider og andre skadedyr. Den anvendes i kulturer med høj luftfugtighed. Svampen virker ved at inficere insektet via sporer som påhæfter sig insektets overflade, trænger ind og opformerer sig i insektet, der til sidst dræbes og bliver overgroet af mycelium.

Af helbredsrelaterede undersøgelser er der kun en enkelt. K. K. Eaton udførte i 1986 en undersøgelse af ansatte ved to forskningscentre. På centrene blev *Verticillium lecanii* udviklet til brug som pesticid. Formålet med studiet var at afklare om udsættelse for *Verticillium lecanii*. kunne udløse allergi eller toksiske problemer for medarbejdere (n=147), for derved at opnå information om sikkerhed til brug ved markedsføring. Der blev fundet 8 sensibiliserede personer, 3 var anført som eksponerede og 5 som ueksponerede. Fælles var at der var et lille udslag ved hudpricktest og alle udslag var mindre end den positive histamin- kontrol. Der var ingen sammenhæng med kliniske symptomer eller grad af eksponering. Der blev ikke foretaget eksponeringsmålinger i forbindelse med undersøgelsen (33).

1.4.3 *Trichoderma harzianum* & *polysporum* (T.h.)

Trichoderma arter er svampe (produkterne Supresivit og Binab T.) som kan kolonisere og gro på rodoverflader for at modvirke vækst af plantepatogene svampe. De anvendes til svampebekæmpelse i både grøntsager og prydplanter. Midlerne anvendes til frø, stiklinger eller jordbehandling, desuden udsprøjtes de over kulturerne til behandling mod plantepatogenet gråskimmel (*Botrytis cinerea*).

Også *Trichoderma harzianum* producerer og udskiller toksiske metabolitter (antibiotika og toksiner) og den antagonistiske virkning er sandsynligvis afhængig af disse metabolitter sammen med parasitisme og udkonkurrering.

Ved søgning i litteraturen fandtes ikke relevante referencer om helbredseffekter som følge af eksponering for *Trichoderma harzianum* produkter.

1.4.4 *Paecilomyces fumosoroseus*

Svampen (produkt Preferal) benyttes primært mod mellus, men har også effekt mod bladlus, thrips, spindemider og andre skadedyr. Midlet anvendes i kulturer med høj luftfugtighed, f.eks. i formeringsafdelinger hvor nyt plantemateriale ønskes rent for skadedyr. Svampen virker ved at inficere insektet som anført under *Verticillium lecanii*

Midlet er ikke generelt markedsført, men anvendt som forsøgsprodukt.

Ved søgning i litteraturen fandtes ikke relevante referencer om helbredseffekter som følge af eksponering for *Paecilomyces fumosoroseus* produktet Preferal.

2 Enquete vedrørende mikrobiologiske bekæmpelsesmidler

I starten af projektet i 1996 var der stor usikkerhed om udbredelsen af mikrobiologisk bekæmpelse. Der var oplysninger fra konsulenter og gartnerier om brugen, men ikke nogen samlet oversigt over hvor mange i gartnerierne der var udsat for produkterne. Derfor blev der gennemført en enquete vedrørende brug og erfaring med mikrobiologisk bekæmpelse.

Formålet med denne del af undersøgelsen var at belyse i hvilken udstrækning man anvendte de biologiske, specielt mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (MB) i de fynske gartnerier, herunder vurdere, hvor mange ansatte, der arbejdede direkte med midlerne og i øvrigt var udsatte.

Tabel.2.1 Mikrobiologiske midler som er indgået i undersøgelsen.

Produkt	Aktiv mikroorganisme
Vertalec	<i>Verticillium lecanii</i>
Mycotal	<i>Verticillium lecanii</i>
Bactimos	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Vectobac	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Novo Biobit	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
Foray	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
Dipel	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
Mycostop	<i>Streptomyces</i>
Rotstop	<i>Phlebiopsis gigante</i>
Novodor	<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i>
Boverol	<i>Beauveria bassiana</i>
Supresevit	<i>Trichoderma harzianum</i>
Binab	<i>Trichoderma harzianum og polysporum</i>
Agrovir	<i>Agrotis segetum granulosis virus</i>
Preferal	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>

2.1 Materiale og metode

Undersøgellesgruppen bestod af 217 fynske væksthushartnerier. Disse var udtaget fra en liste fra Gartneribrugets Arbejdsgiverforening dateret den 9. 7.1996. Der var registreret 335 gartnerier, men på grund af eksklusion af frilandsgartnerier og dobbeltregistreringer afgrænses materialet til 205 væksthushartnerier.

Dataopsamlingen foregik ved telefoninterview. Samtlige gartnerier fra listen fik ca. 2 uger forud for telefonkontakt tilsendt spørgeskema og skriftlig orientering om undersøgelsen. Samtidigt var gartnerier og ansatte orienteret via fagtidsskrifter og lokal presse.

Fremsendelsen af spørgeskemaet forud for interviewet gav mulighed for, at gartneriet kunne udvælge en person, som havde størst viden på området, typisk ejer eller formand. Desuden havde man mulighed for at se oplysninger i sprøjtejournaler m.v.

Interviewet varede fra få minutter til 1 time, i gennemsnit 20 minutter og foregik efter det fremsendte skema. Interviewskemaet indeholdt spørgsmål om brug af biologiske bekæmpelsesmidler generelt.

For hvert af stofferne opført på Miljøstyrelsens liste over aktivstoffer og midler spurgtes om i hvilke kultur midlet anvendtes, mod hvilke skadevoldere, hvilken måned, hvilken årstid, hyppighed pr. måned, det behandlede areal og metode for udbringning. Desuden spurgtes om, hvor mange som arbejdede med udbringning af stoffet og hvor mange som dagligt arbejdede i området. Tilsvarende oplysninger blev indhentet om brugen af nytte dyr.

Årstal for første brug af biologisk bekæmpelsesmidler blev opgivet. Der spurgtes om planer for fremtidig brug af biologiske bekæmpelsesmidler og vurdering af problemer. Endelig spurgtes om generelle forhold vedrørende gartnerierne, hovedkulturer, prydplanter, grøntsager fordelt på årstider. Endelig spurgtes om samlet drivhusareal og antal ansatte, dels på helårsbasis og, dels i højsæsonen.

Efter forkodning blev data indtastet og analyseret ved hjælp af SPSS, v. 10.0.

2.2 Resultater

Man søgte at kontakte gartneriet 5 gange i løbet af undersøgelsesperioden 2. september til 25. november 1996. Det var muligt at få kontakt til 205 ud af de 217 gartnerier (94 %). De ikke deltagende var karakteriserede ved at være mindre gartnerier med ingen eller få ansatte. Der foreligger fuldt gennemførte interviews på 193 gartnerier fordelt på 168 prydplantegartnerier og 26 grøntsagsgartnerier med henholdsvis 1.978 og 224 helårsansatte og 2.418 og 338 ansatte i højsæson.

Tabel 2.2. Fordeling af gartnerier som opgiver brugen af henholdsvis makro- og mikrobiologiske bekæmpelsesmidler

	Antal gartnerier	Samlet areal m ²	Antal helårsbeskæftigede	Antal beskæftigede i højsæson
Bruger mikrobiologiske bekæmpelsesmidler	78 (40%)	1.022.650 (50%)	1.241 (55%)	1.603 (57%)
Bruger nytte dyr	89 (46%)	1.209.900 (59%)	1.290 (57%)	1.736 (62%)
Bruger ikke biologiske bekæmpelsesmidler	79 (40%)	629.900 (31%)	675 (22%)	737 (26%)
TOTAL	193	2.045.950	2.229	2.790

Af de 193 besvarelser opgav 114 (59 %) at de brugte biologisk bekæmpelse. Disse gartnerier havde 69 % af drivhusarealet og 78 % af de helårsbeskæftigede

de. 27 % af gartnerierne brugte både nyttedyr og mikrobiologiske midler, mens 13 % udelukkende brugte mikrobiologiske midler og 19 % udelukkende nyttedyr (se Tabel 2.2).

Fordelingen af brugen af mikrobiologiske midler er vist i tabel 2.3. Det ses, at *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* fandtes på 26 % af gartnerierne med 38 % af medarbejderne. Forbruget udgjorde mest af produkter indeholdende *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*, mens produkter indeholdende *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* var mindre udbredt.

Tabel 2.3. Fordeling af opgivet brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler på 196 gartnerier samt det potentielt behandlede areal og antal medarbejdere med potentiel udsættelse for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler på gartnerier.

Mikroorganisme/produkt	Antal gartnerier	Samlet areal m ²	Antal helårs-Beskæftigede	Antal beskæftigede i højsæson
<i>Bacillus Thuringiensis</i>	51	703.350	858	1.186
Bactimos	27	383.000	416	517
Vectobac	18	234.000	392	567
Dipel	3	132.000	116	155
Foray				
Novo Biobit	7	61.350	69	107
Novodor				
<i>Trichoderma harzianum</i>	13	163.000	244	305
Supresivit	8	118.500	181	214
Binab	8	77.500	100	139
<i>Verticillium</i>	33	593.000	782	1.011
Vertalec	27	466.100	545	637
Mycotal	23	445.000	610	804
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>				
Preferal	3	121.000	250	385
Agrovir				
Rotstop				
Mycostop	2	21.200	28	33
Boverol				
TOTAL	196	2.045.950	2.229	2.790

Verticillium lecanii-produkterne fandtes på 17 % af gartnerierne udgørende 35% af de ansatte og fordelte sig på to hovedprodukter (Mycotal og Vertalec).

På undersøgelsestidspunktet var *Trichoderma harzianum*-arterne mindre udbredt, begrænset til seks relativt store gartnerier. Der var begrænset brug af andre midler, alt overvejende indeholdende *Paecilomyces fumosoroseus* (Preferal).

Af de 26 grøntsagsgartnerier anvendte de 20 nyttedyr, mens 9 anvendte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, en fordeling som ikke afveg fra det samlede materiale.

Biologiske bekæmpelsesmidler har ifølge opgivelserne været brugt siden 1970, men 75% af gartnerierne var startet efter 1991 og 25% af gartnerierne var startet i 1995 eller 1996.

39 % forventede uændret fremtidig forbrug af biologiske bekæmpelsesmidler, 48% øget forbrug, men kun et gartneri forventede mindre forbrug. Blandt de gartnerier, som ikke anvendte biologisk bekæmpelse angav 51 % praktiske problemer, 43% øgede omkostninger og 8% forskellige andre årsager. En række gartnerier bemærkede, at de påtænkte yderligere forsøg med biologisk bekæmpelse. I disse svar blev der ikke skelnet mellem makro- og mikrobiologiske midler.

2.3 Diskussion.

Der blev opnået svar fra en meget stor del af den ønskede gruppe. Opgivelserne kan være inkomplette da de stammer fra interview fra en enkelt person på gartneriet, men metoden med at sende spørgeskema forud for interviewet har sandsynligvis givet bedre oplysninger, idet den interviewede har haft mulighed for at tjekke oplysningerne forud for interviewet.

Resultaterne viser at der i undersøgelsesperioden var et betydeligt og stigende forbrug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, dog i mange væksthuse som forsøg. Det må således forventes at resultaterne fra helbreds- og eksponeringsundersøgelsen er dækkende for branchen på Fyn. Fordelingen af brugen af de enkelte hovedtyper er antageligt mere usikker idet perioden var præget af mange forsøg og ny introduktion. Fordelingen af brugen ændres antageligt, dog fortsat med *Bacillus thuringiensis*, *Verticillium lecanii* og *Trichoderma harzianum* som hovedtyper.

3 Materiale & Metode

3.1 Undersøgellesdesign.

Undersøgelsen er bygget op som et flerårigt follow-up af en gruppe ansatte i gartnerier, som i varierende grad har brugt de 3 hovedgrupper af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (MB) som er *Bacillus thuringiensis*, *Verticillium lecanii* og *Trichoderma harzianum*. I løbet af undersøgelsesperioden dukkede brugen af *Paecilomyces fumosoroseus* op.

Personerne blev udvalgt ud fra ansættelse på gartnerierne og de undersøgtes ved en basis undersøgelse (run 0), hvorefter de blev fulgt frem til 2001.

Effekten af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler blev vurderet ved opfølgelsesundersøgelse efter 1,2 og 3 år. Desuden blev der til alle udsendt spørgeskemaer hver 3. måned med henblik på at få oplyst nyopståede gener.

Eksponeringen blev dels estimeret ud fra gartneriernes omgivelser, fra oplysninger i spørgeskema og supplerende er der i et parallelt studie ved hjælp af målinger vurderet eksponeringen for *Verticillium lecanii* ved forskellige arbejdsfunktioner (Bent Løschenkohl, Dansk Jordbrugsforskning, Flakkebjerg (rapport under udarbejdelse)).

3.2 Materiale

3.2.1 Gartnerier

Udgangspunktet for materialet var de 193 gartnerier som indgik i forbrugsundersøgelsen (jvf. Kap.2). Herfra er oplysninger om forbruget af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler, antal ansatte og interesse for eventuel deltagelse i undersøgelse blev anvendt for at inkludere deltagere. Gartnerier der havde opgivet at de ikke ønskede at deltage og gartnerier med mindre end 7 ansatte blev valgt fra.

Gartnerierne blev udvalgt ud fra deres anførte brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Der blev forsøgt en ligelig fordeling mellem gartnerier, der brugte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (*Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma harzianum*, *Verticillium lecanii*), således at nogle kun brugte et enkelt type mens andre brugte en kombination af 2 eller alle 3 typer. Derudover udvalgte en gruppe gartnerier, der ikke brugte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler overhovedet.

Gartneriejereren blev kontaktet per telefon og efter en kort information om projektet blev vedkommende dels udspurgt om aktuelle brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler på gartneriet samt hvor mange medarbejdere der var ansatte, dels om vi kunne få lov til at komme og informere medarbejderne om det forestående projekt. Langt de fleste af de adspurgte gartneriejdere var interesserede, en mindre del (repræsenterende såvel store som mindre gartnerier) ønskede dog ikke at deltage enten ud fra hensyn til firmaet (travlhed, usikkerhed om fremtidig drift), til medarbejdere

(været med i tidligere projekter, “sygeliggørelse”) eller til gartnerifaget (tilfælde med negativ omtale i pressen).

Der blev på den måde fundet frem til 31 gartnerier med i alt 773 ansatte (793 ved enquete i 1996). Efter aftale med følgegruppen blev der tilbudt kompensation til arbejdspladsen for deltagelse med 75,- kr. pr. ansat som deltog.

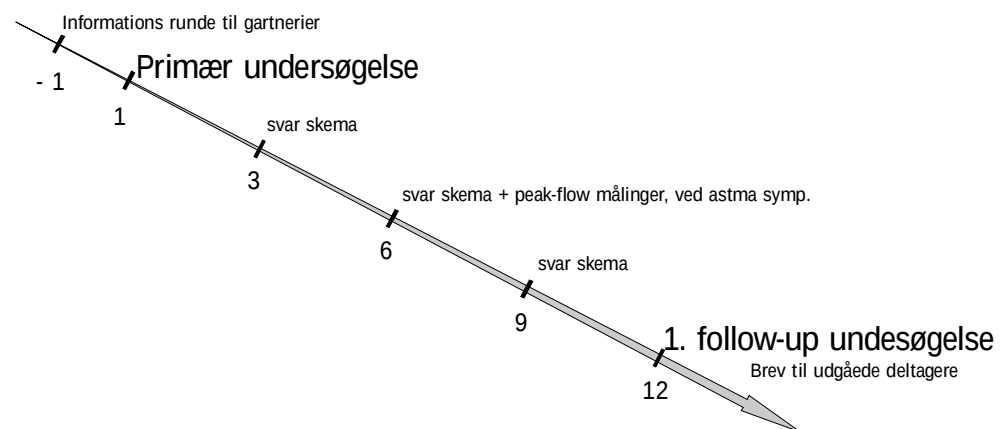
3.2.2 Inklusionsprocedure

Ved besøg på gartnerierne blev medarbejderne informeret mundtligt i en spisepause. Endvidere blev der udleveret skriftlig information som de kunne læse igennem før vi igen kontaktede gartneriet. Der blev på hver gartneri udpeget en fast kontaktperson i forbindelse med projektet.

Alle de ansatte på gartneriet blev tilbudt deltagelse i undersøgelsen således også kontorpersonele når blot deres arbejdsplads var inde i selve gartneriet og derved i samme “luftrum”.

Efter nogle dage kontaktede vi gartneriet (kontaktpersonen) for at høre om hvor mange der var interesseret i at deltage. Var antallet 5 eller derover, og der kunne findes en undersøgelsesdato inden for den berammede periode deltog det pågældende gartneri.

Et enkelt gartneri med 34 ansatte blev undersøgt som led i pilotstudie i maj 1997, mens resten blev undersøgt i perioden august 1997 - januar 1998.



Figur 3.1 Figuren angiver tidsforløbet i måneder fra første kontakt med deltager til undersøgelsen ved 1. Follow-up.

3.2.3 Deltagere i den primære undersøgelse (run 0)

Der deltog 456 gartneriansatte fordelt på 31 gartnerier svarende til 59 % af potentielle deltagere (773) fra disse gartnerier. Der er ikke foretaget systematisk udspørgning af de ansatte, der ikke ønskede at deltage (de 41 %), men et par mulige årsager fremgik af debatten ved de mundtlige informationsmøder på gartnerierne. Nogle havde f.eks. en ulyst til at få udført de beskrevne undersøgelses procedurer.

3.2.4 Skemaer udsendt til deltagere efter 3, 6 og 9 måneder

Hver 3. måned udsendtes et lille spørgeskema på 1 side til deltagerne. Ved ”3 mdr. skema” svarede 419 (92 %), ved ”6 måneders skema” svarede 417 (91 %) og ved ”9 måneders skema” svarede 390 (86%). Der blev udsendt et rykkerbrev et par uger efter udsendelsen af spørgeskemaet.

3.2.5 Follow-up efter et år (run 1)

Ved follow-up undersøgelsen (run 1) der forløb i månederne november 1998 til februar 1999, blev 316 deltagere undersøgt igen, og da undersøgelsen skulle efterfølges af en udvidet undersøgelse over 3 år blev kohorten suppleret med 123 personer enten var nyansatte, eller som af en eller anden grund ikke deltog i startundersøgelsen.

Der blev således i run 1 i alt undersøgt 439 personer svarende til 59 % af de potentielle deltagere (750) fra disse gartnerier.

3.2.6 Bortfald

De 140 der ikke deltog i follow-up undersøgelsen, fik alle tilsendt et brev hvor de blev spurgt om årsag til ”frafald” samt om de ville fortsætte i den efterfølgende undersøgelse. Af de 140 adspurgte svarede 109 (78 %). Heraf havde de 22 været på ferie, syge eller væk fra gartneriet af anden årsag på undersøgelsesdagene, men de ville gerne fortsætte i efterfølgende 2.-3. års follow-up. Af de øvrige 87 var 82 % (71 personer) ikke længere ansat på gartneriet. Enkelte svarede, at de ikke brød sig om at blive undersøgt eller svare på spørgeskemaer. Blandt dem, der ikke svarede, kan en årsag have været, at undersøgelsen som helhed blev forlænget med 2 år.

3.2.7 Kohorten

1. undersøgelses runde:
(1997/1998)

456 deltagere

1. follow-up:
(1998/1999)

316 genundersøgt

123 nye

Total: 439

Figur 3.2 Oversigt over samtlige undersøgte gennem 1. år

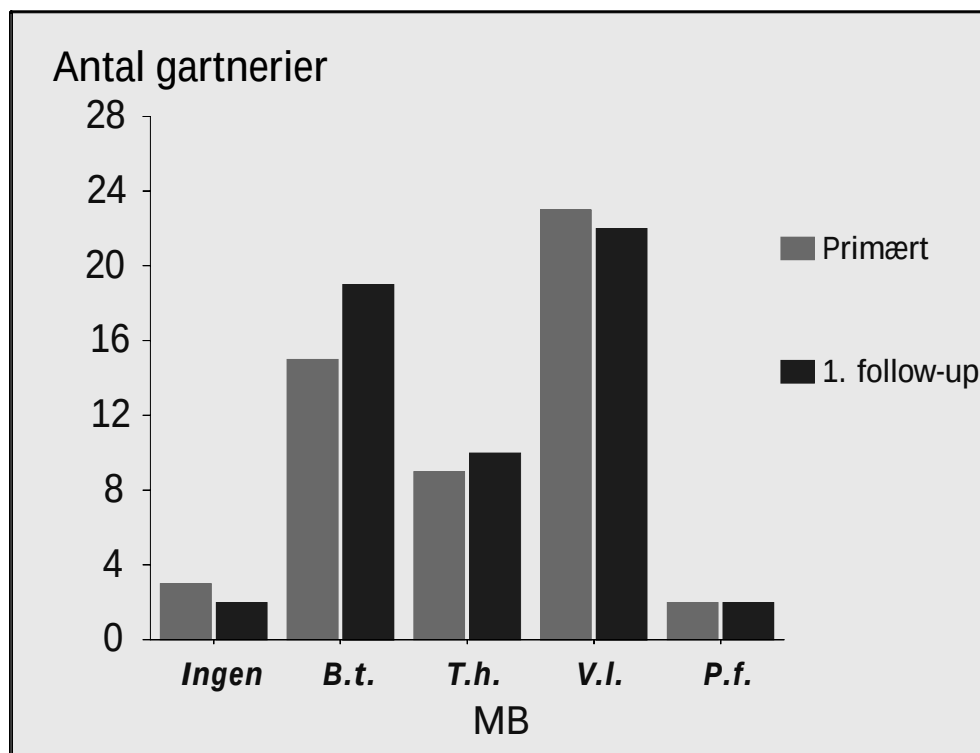
I run 0 deltog 456 personer, af disse blev 316 undersøgt igen ved 1. follow-up. Da der ved 1. follow-up også blev indrulleret nye deltagere (af hensyn til at undersøgelse blev udvidet med yderligere 2 år) blev 123 personer undersøgt med samme undersøgelsesprogram som de 456 deltagere i run 0. Herved har vi en tværsnitsgruppe på 579 personer.

3.2.8 Anvendte mikrobiologiske bekæmpelsesmidler fordelt på gartnerier og antal medarbejdere

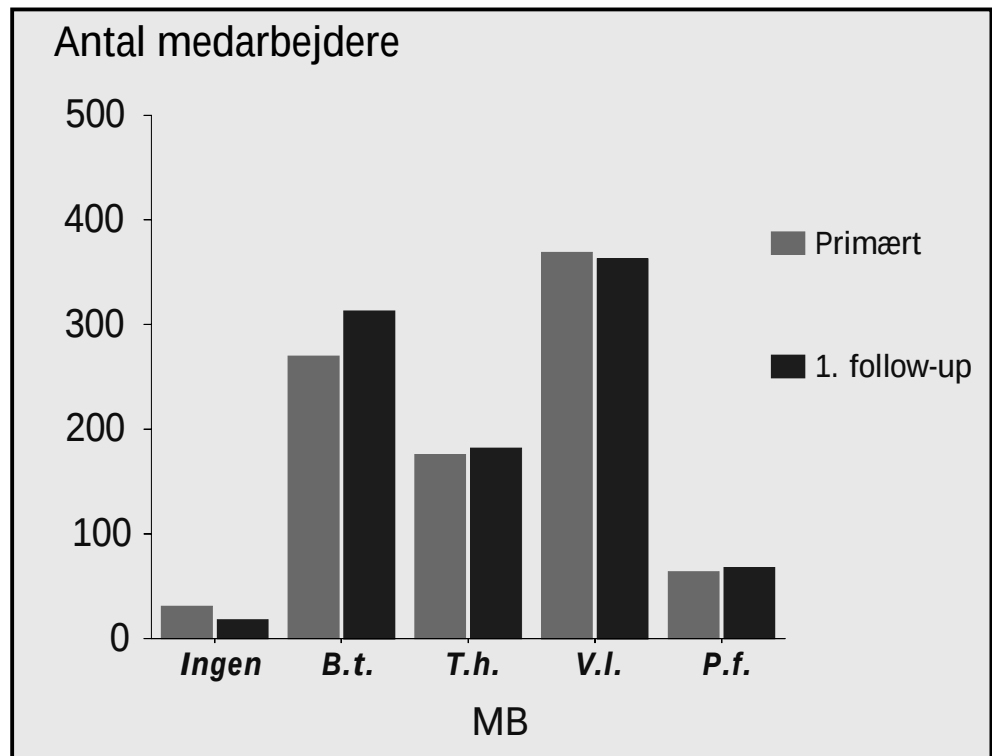
Tabel 3.1 viser antallet af gartnerier og medarbejdere, der anvendte en given type mikrobiologiske bekæmpelsesmidler eller kombination af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Oplysningerne dækker hvad der blev anvendt i året før primær undersøgelse og året før 1. follow-up. Figurerne 3.3 og 3.4 viser fordelingen af hovedtyperne.

Tabel 3.1 Kombination af anvendt mikrobiologiske bekæmpelsesmidler på gartneri- og deltagnerniveau. B.t.= *Bacillus thuringiensis*, T.h. = *Trichoderma harzianum*, V.l. = *Verticillium lecanii* P.f.= *Paecilomyces fumosoroseus*.

	Run 0	Run 0	Run 1	Run 1
Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler	Antal gartnerier	Antal personer	Antal gartnerier	Antal personer
Ingen	3	31	2	18
<i>B.t.</i>	3	41	4	32
<i>T.h.</i>	0	0	1	9
<i>V.l.</i>	12	130	8	87
<i>B.t. + T.h.</i>	2	15	2	17
<i>B.t. + V.l.</i>	3	59	6	106
<i>T.h. + V.l.</i>	1	25	1	12
<i>B.t. + T.h. + V.l.</i>	5	91	5	90
<i>B.t. + P.f. + V.l.</i>	1	19	1	14
<i>B.t. + P.f. + T.h. + V.l.</i>	1	45	1	54



Figur 3.3 Antal gartnerier der brugte en given type MB. Oplysningerne dækker hvad der blev anvendt i året før primær undersøgelse og året før 1. follow-up. (for forklaring se Tabel 3.1).



Figur 3.4. Antal deltagende medarbejdere på gartnerier der brugte en given type *MB* i året før primær undersøgelse og året før 1. follow-up. (for forklaring se Tabel 3.1)

3.3 Undersøgelsesmetoder ved den årlige kliniske undersøgelse

Undersøgelsen foregik på gartneriet i den almindelige arbejdstid. De deltagende blev interviewet og der blev lavet en undersøgelse bestående af lungefunktionsundersøgelse og bronkial provokationstest, hudprikttest samt blodprøvetagning. Den samlede undersøgelsestid for den enkelte deltager var cirka 35 minutter.

3.3.1 Arbejdsforholdsskema

Skemaet var udfyldt af deltager før undersøgelsesdagen (men blev gennemgået i forbindelse med udfyldelse af helbredsskemaet).

Spørgsmålene omfattede:

1. Deltagernes relation til gartneriet (anciennitet, ansættelsesform, arbejdstid, sprøjtecertifikat).
2. En beskrivelse af arbejdsfunktion ud fra type (potning, stikning, knibning, sætte på afstand, pakning, anden plantehåndtering, kontorarbejde og andet).
3. For hver enkelt arbejdsfunktion: Anført tidsforbrug (næsten hele tiden, tre fjerdedele, halvdelen, en fjerdedel, sjældent eller aldrig). En opgørelse af hvilke plantekulturer, der havde været arbejdet med og for de enkelte kulturer endvidere forbruget af arbejdstid.
4. Derefter mere indgående spurgt til brugen af de biologiske bekæmpelsesmidler i gartneriet fordelt såvel på nyttedyr som på *MB*. Dels hvilken slags der blev brugt og hvilken måde de blev brugt på, hvor hyppigt de blev brugt, og hvornår deltagerne sidst havde anvendt det. Der blev spurgt om brug af personlige værnemidler (maske, handske, heldragt, gummistøvler eller andet).

5. Der blev også spurgt til, hvor længe deltagerne havde arbejdet med biologiske bekæmpelsesmidler, og om deltageren selv havde afvejet eller blandet dem i forbindelse med brugen på gartneriet.

På tilsvarende vis blev der stillet spørgsmål om forhold omkring de kemiske sprøjtemidler og der indgik spørgsmål vedrørende deltagerens eventuelle tidligere gartneransættelse inden for de sidste 5 år.

3.3.2 Helbredsskema

Skemaet blev udfyldt ved et struktureret interview foretaget af bioanalytiker.

Skemaet omfattede detaljerede spørgsmål omkring symptomerne hoste, trykken for brystet, vejrtrækning (pibende/hvæsende), høfeber, gener fra øjnene, udslæt på huden. Til hvert enkelt symptom blev der spurgt til evt. døgnvariation, årstidsvariation, om det var relateret til arbejde, og hvis det var, hvilken arbejdsfunktion det har været relateret til. Hvis der var symptomer til stede udenfor arbejdstid, spurgtes om det var i relation til bolig, temperaturskift, anstrengelse, udsættelse for pollen, kontakt med dyr eller andet.

Endvidere blev der spurgt, om der i forbindelse med arbejdet havde været anfald med feber, kulderystelser eller influenzaforfølelse med uddybende spørgsmål, dels vedr. symptomer i forbindelse med anfald, og dels om arbejdsfunktion ved anfaldet.

Derudover blev der spurgt om der var konstateret astma og om eventuel medicinbehandling. Deltagerne blev også spurgt om de havde haft astmaeksem som barn, og om forældre eller søskende har haft atopi, endelig om de havde udsættelse for dyr (hund, kat, undulat, hest eller andet).

Der blev også spurgt om der har været hjerteproblemer eller andre sygdomme, og om deres medicinforbrug. Rygevaner blev detaljeret belyst.

Helbredsspørgsmål er i stor grad overensstemmende med tilsvarende spørgsmål benyttet i "Respiratory Health and Allergy Among Young Farmers and Non-Farming Rural Males in Denmark" (SUS - Study) (34).

3.3.3 Hudpriktest

Hudpriktest blev udført til vurdering af umiddelbar allergisk reaktion med et panel af 10 almindeligt forekommende allergener (dansk standardpanel). Panelet bestod af allergener fra pollen (birk, græs og gråbynke), dyr (hesteskæl, hunde- og kattehår, 2 husstøvmider (*dermatophagoides farinae* og *dermatophagoides pteronyssinus*), 2 skimmelsvampe (*cladosporium herbarum* og *alternaria*). Allergenerne (Soluprick) blev leveret af ALK-Abello, Danmark.

Endvidere blev to mikrobiologiske bekæmpelsesmiddel-ekstrakter udviklet til denne undersøgelse af ALK - Soluprick *Trichoderma harzianum* og Soluprick *Verticillium lecanii*. Man forsøgte at udvikle en priktest for *Bacillus thuringiensis*, men denne kunne ikke godkendes af Lægemiddelstyrelsen, idet den var baseret på brugen af mælkeprodukter.

På inderside af underarmen blev en dråbe af det enkelte allergen appliceret. Tilsvarende blev der sat en positiv kontrol (histamin) og en negative kontrol (opløsningsmidlet: 50 % glucol og 50 % saltvand). Herefter blev der med éngangslancet prikket i hver enkelt dråbe.

Efter 10 minutter blev positiv og negativ kontrol aflæst, og efter 15 minutter blev allergenerne aflæst. Ved aflæsning af testen blev der optegnet omrids af den eventuelle fremkomne hævelse (papel), som med den klæbende side af et stykke tape blev overført til testblanketten.

Resultatet af testen betragtes som positiv ved papel større end eller lig med 3 mm i diameter (35;36).

3.3.4 Lungefunktionsundersøgelse med spirometri

Der blev foretaget lungefunktionsmåling på alle personer, og målt værdier for henholdsvis Forceret vitalkapacitet og Forceret ekspiratorisk volumen i 1 sekund. Der blev anvendt et volumeregistrerende spirometer (Vitalograph, model R, Buckingham, UK).

Forceret vitalkapacitet (FVC) er det maksimale volumen, som kan ekspireres under en forceret eksspiration påbegyndt efter en maksimal inspiration.

Forceret ekspiratorisk volumen i 1. sekund (FEV_1), er det volumen, som ekspireres i første sekund ved en forceret eksspiration, som er påbegyndt efter en maksimal inspiration.

Spirometriundersøgelserne blev udført i henhold til American Thoracic Society's rekommandation (37).

Som forventede værdier for FEV_1 og FVC blev der for personer over 30 år anvendt standarder i henhold til Dansk Lungemedicinsk Selskabs - rekommandation (38) og for personer under 30 år standarder i henhold til "Lung Status in Young Danish Rurals" (39).

3.3.5 Bronkial provokationstest

Der blev foretaget bronkial provokation med histaminklorid til bestemmelse af PD_{20} (den samlede dosis af histamin, der forårsager et 20 % fald i FEV_1). Der blev målt efter Yan's metode (40), med kalibrerede De Vilbiss no. 40 nebulizer (Somerset, PA, USA). Den maksimale kumulerede dosis var ved første undersøgelse, 1,23 mg og ved anden undersøgelse 0,97 mg.

Hos de deltagere der havde et fald $> 20 \%$, blev PD_{20} beregnet både ved liniær og logaritmisk interpolation mellem de to sidste målte FEV_1 værdier.

3.3.6 Blodprøver (total og specifik IgE)

Der blev taget blodprøver ved venepunktur på deltagerne ude på gartnerierne. Prøverne blev efterfølgende separeret ved centrifugering og nedfrosset til -80°C til senere analyse.

Ved begge undersøgelsesrunder blev der målt Total IgE og specifik IgE overfor de enkelte produkter der blev anvendt på de deltagende gartnerier :

- 1.) produkter Bactimos, Dipel og Vectobac (indeholdende *Bacillus thuringiensis*)

- 2.) produkter Supresivit og Binab (indeholdende *Trichoderma harzianum*)
- 3.) produkter Mycotal og Vertalec (indeholdende *Verticillium lecanii*)
- 4.) produkt Preferal (indeholdende *Paecilomyces fumosoroseus*)

Metoden, der blev anvendt, er en bestemmelse af total serum immunoglobulin E (IgE) og specifik IgE reaktionen med forskellige allergener i serum. (41)

Analyseproceduren er beskrevet i bilag C, men i korthed er det en inkubation med antigenet, udvaskning, hvorefter der tilsættes monoklonalt museantistof mod human IgE, inkuberet med et biotinylert monoklonalt antistof mod muse-IgG. Endeligt blev det inkuberet med ortho-fenylendiaminphenylenediamin dihydroklorid (OPD). Efter 30 minutter blev den optiske tæthed målt (optical density) - enheder (OD)).

Da de fleste signaler var meget lave gennemførtes en reanalyse på alle hvor enten første eller anden måling var $> 0,05$ OD for at få en nøjagtig bestemmelse af mulige ændringer fra runde 0 til runde 1. Sidstnævnte analyse blev anvendt ved beskrivelsen af ændringer fra run 0 til run 1.

Analyser blev udført hos: dr. Gert Doekes, The laboratory of the Environmental and Occupational Health Group, Department of Environmental Sciences, Wageningen Agricultural University, The Netherlands (nu Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Environmental and Occupational Health, University of Utrecht).

3.3.7 Histaminfrigørelsetest

Ved follow-up undersøgelsen blev der endvidere målt histaminfrigørelse (HR-test). Der blev taget et ekstra blodprøveglass som samme dag blev sendt ekspres til analyse.

Histaminfrigørelsetest er en bestemmelse af basofile granulocytters følsomhed overfor specifikke allergener ved mistænkt Type 1 allergi (42). Der blev målt på følgende produkter: Dipel, Bactimos og Vectobac som pool, Binab, Mycotal, Preferal, Supresivit, Vertalec. Endvidere blev der målt på to kendte allergener (Birk- og græspollen som pool) undet et, samt de to special fremstillede priktest allergener (Soluprick *Trichoderma* og Soluprick *Verticillium*) der blev brugt til priktest. Med HR-test kunne vi få målt 10 prøver pr. deltager.

Analyser blev udført på Referencelaboratoriet, Rigshospitalet, København.

3.3.8 Selvadministrerede skemaer efter 3, 6 og 9 måneder

I perioden mellem de kliniske undersøgelser blev deltagerne tilsendt et spørgeskema henholdsvis 3, 6 og 9 måneder efter første undersøgelse. Formålet med dette var at få belyst forekomsten af nytilkomne symptomer samt ændrede arbejdsforhold.

Der blev spurgt om deltagerne havde arbejdet i samme gartneri som ved sidste spørgeskema. Deltageren skulle give en kort beskrivelse af arbejdsfunktioner og om hvor i gartneriet vedkommende havde arbejdet mest og med hvilken plantekultur.

Deltagerne skulle ved afkrydsning oplyse forekomst af følgende helbredssymptomer: tør hoste, hoste med opspyt, trykken for brystet,

besværet vejrtrækning, pibende / hvæsende vejrtrækning, astma, høfeber, maveproblemer eller om der har været andre symptomer. For symptomerne blev spurgt om de kun havde været til stede i forbindelse med forkølelse eller influenza.

Endvidere blev det spurgt om der i forbindelse med arbejdet havde været anfald af feber, kulderystelser eller influenza. Slutteligt blev der spurgt om rygevanerne havde ændret sig siden sidste spørgerunde.

3.3.9 Peakflow-monitorering

Med henblik på at vurdere om nyopståede symptomer kunne være arbejdsbetinget astma gennemførtes en 17 dages monitorering hos udvalgte personer. Personer blev udvalgt ud fra kriterierne: de deltagere der ved 6 mdrs. spørgeskema havde nytilkomne symptomer fra luftveje tydende på astma, samt de personer der ved primærundersøgelsen havde astmasymptomer og som ved 6 månedersspørgeskemaet fortsat anførte luftvejssymptomer, blev anmodet om at foretage peakflow-monitorering. Det blev aktuelt for 26 deltagere.

Ved peakflow-monitoreringen blev der udført målinger både under arbejde og i fritid, og der blev målt 6 gange dagligt 17 dage i træk og med i alt 3 weekender. Samtidig anførte deltageren oplysninger om arbejdsforhold, symptomer og eventuelt medicinforbrug på det samme skema. Til måling blev brugt Mini-Wright peakflow-metre.

3.3.10 Eksponeringsvurderinger

Ud fra arbejdsforholdsskema oplysningerne kan det ses at de 4 hyppigste arbejdsprocesser, hvor der kan forventes eksponering for MB, var stikning (49 %), pakning (47 %), sætte på afstand (26 %), potning (13 %) mens kun 8 % selv foretog udsprøjtning (tal fra run 0).

3.4 Etiske aspekter

Projektet fulgte Helsinki II-deklarationen og blev godkendt af Den regionale Videnskabsetiske Komité for Fyn og Vejle amter. Data opbevares ved AMK OUH og forholdene blev i øvrigt godkendt ved Datatilsynets inspektion d. 6. December 2000.

3.5 Databehandling

Alle data blev indtastet i databaseprogrammet Paradox, dobbeltindtastet, og overført til SPSS, version 10 (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, USA).

Til beskrivelse af de afhængige parametre anvendtes dels en tværsnitsundersøgelse af de 579 personer, som blev førstegangsundersøgt i henholdsvis runde 0 og runde 1.

Som eksponeringsvariable anvendtes følgende: Gartneriets oplysninger om brugen af 1 af de 4 mikrobiologiske bekæmpelsesmidler inden for det seneste år. Dette er opgjort både på produkt og på type (se tabel 4.1). Den individuel eksponering blev beskrevet ud fra om personerne opgav at de inden for det sidste år havde håndteret produkterne selv. Desuden var der angivet en frekvens af håndteringen.

I de endelige modeller anvendtes opgivelse, af at man har håndteret det givne produkt eller type mere end én gang om måneden inden for det sidste år. Som personlige variable anvendtes køn, alder, højde, rygestatus - primært tobaksrygning - inden for de sidste 2 år. Desuden anvendtes atopi som én eller flere positive priktest i standardpanelet ved første undersøgelse.

I analyserne anvendtes til beskrivelse af symptomerne primært indgangsspørgsmålet om tilstedeværelse af symptomet inden for det sidste år. Desuden analyseredes symptomer på arbejde og symptomer hyppigere end en gang om ugen. Kun hvis der var mistanke om relation til baggrundsvARIABLE i disse spørgsmål analyseredes underspørgsmål.

En logistisk regression med inklusion af alle relevante faktorer anvendtes for alle hovedsymptomer. Der blev inddraget en interaktionsfaktor mellem eksponering og positiv priktest for at analysere om atopikere var mere følsomme for eksponeringen end andre. Supplerende blev der i forbindelse hermed fremkom også bivariate analyser ved simpel χ^2 test.

Kontinuerte data som lungefunktionsmåling (FVC, FEV₁ og FEV₁/FVC (%)) analyseredes ved hjælp af en lineær regression med inddragelse af ovennævnte dikotome uafhængige variable.

I analysen af lungefunktionsmålingerne anvendtes de ikke-standardiserede data med inddragelse af højde og alder samt køn i analysen, idet der ved de indledende analyser viste sig at de alders-, højde- og køns- standardiserede værdier fortsat var signifikant relaterede til højde og alder, hvilket kunne tyde på at den anvendte standardiseringsmetode ikke passede med det givne materiale.

Ved undersøgelsen af follow-up data på de 316 personer som deltog både i run 0 og run 1 analyseredes på antallet af personer som fik nyopdukkede symptomer mellem de 2 runder over for den øvrige gruppe. Som baggrundsvARIABLE anvendtes de samme som i tværsnitsundersøgelsen og analysen var også her logistisk regression.

Ved analysen af lungefunktionsdata analyseredes differencen mellem run 1 og run 0 ved en lineær regression med ovennævnte baggrundsvARIABLE som uafhængige variable. Forud herfor undersøgtes fordelinger visuelt for normalitet og der fandtes ikke anledning til transformering af data.

Resultaterne af den lineære regressionsanalyse af de repetitive data blev kontrolleret ved hjælp af en generel lineær model for gentagne målinger (GLM for Repeated Measurements). Resultaterne af de to analyser var helt overensstemmende.

Ved analyserne anvendtes et signifikansniveau på 5 % og der udarbejdedes 95 % konfidensintervaller for de enkelte variable.

4 Resultater

4.1 Materialet

4.1.1 Gartnerierne

De 31 gartnerier producerede pryddplanter og havde 773 ansatte ved run 0 i 1997-1998. De var som anført udvalgt på basis af deres brug af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Tabel 4.1 viser fordelingen af brugen som det var opgivet i forbindelse med enketen (se kapitel 2)

Tabel 4.1 Fordeling af brugen af mikrobiologiske bekæmpelsesmidler på de 31 gartnerier, det samlede areal og de potentielt eksponerede personer

Mikroorganisme/produkt	Antal gartnerier	Samlet areal m ²	Antal helårs-beskæftigede	Antal beskæftigede i højsæson
<i>Bacillus thuringiensis</i>	14	318.900	485	687
Bactimos	8	205.900	242	302
Vectobac	6	114.000	253	393
Dipel	1	50.000	50	60
Novo Biobit	1	6.000	6	8
<i>Trichoderma harzianum</i>	6	91.500	150	174
Supresivit	5	85.500	144	166
Binab	1	6.000	6	8
<i>Verticillium</i>	20	419.000	624	821
Vertalec	17	342.400	435	499
Mycotal	15	338.500	516	701
Andre	3	121.000	250	385
Preferal (<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>)	3	121.000	250	385
TOTAL	31	559.700	797	1017

I de 31 gartnerier var der sammenlagt langt over hundrede forskellige kulturer. Den hyppigste på deltager niveau (tværsnit n=579) var julestjerner (278), derefter i rækkefølge margueritter (244), chrysanthenum (172), roser (165), ellwoodi (159), poinsettia (144), hibiscus (136), hедера (104), efeu (102) og murraya (94).

4.1.2 Personerne

Tabel 4.2 viser fordelingen af en række baggrunds variabler for de personer, som indgik i undersøgelsen fordelt på den gruppe på 316, som gennemførte begge undersøgelsesrunder, de 140 (31 %), som kun gennemførte run 0 og de 123, som blev inkluderet i run 1.

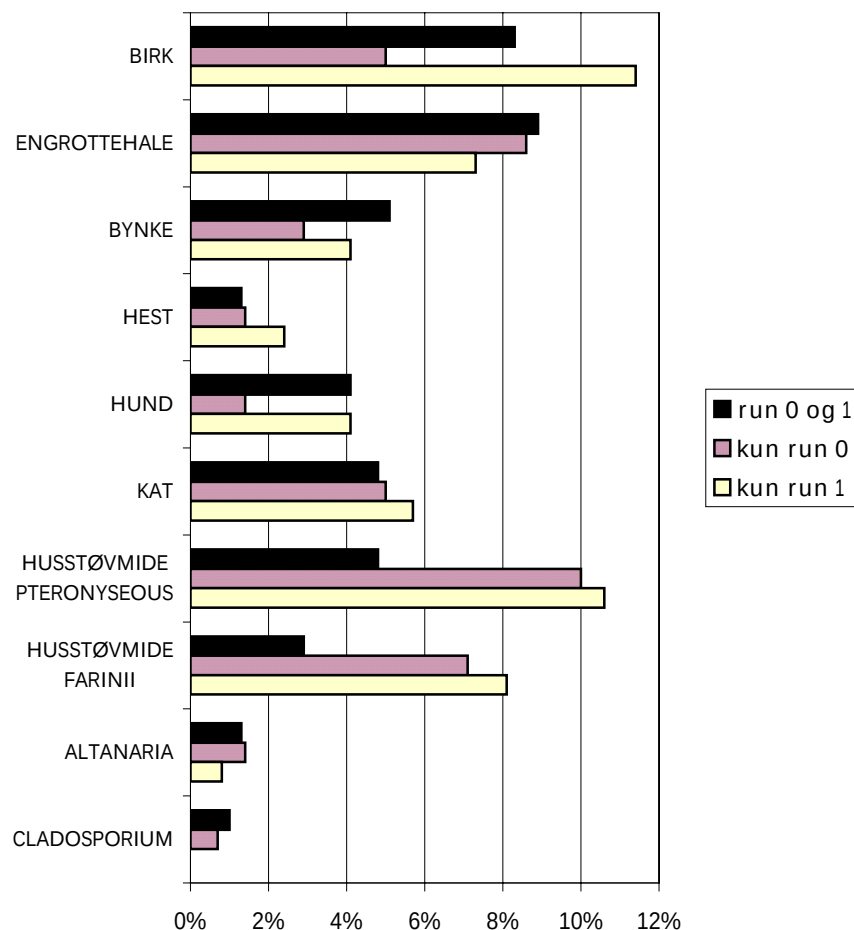
Materialet fordeler sig med ca. 32 % mænd og 68 % kvinder med gennemsnit alder på 35 år og anciennitet i gartneriet på knap 6 år og 9,7 år i faget. De fleste var fuldtidsansatte og 95 % fastansatte på gartnerierne. 36 % havde sprøjtecertifikat som tegn på faglig gartneruddannelse.

Af personlige vaner havde 63 % ikke røget inden for det sidste 2 år, mens 35 % var storrygere.

Tabel 4.2 Fordeling af baggrundsvariable for deltagere i undersøgelsen fordelt på personer, som deltog i begge runder (run 0 og run 1), kun i første runde (run 0) og i anden runde (run 1).

		Deltager i run 0 eller 1			Total
		0 og 1	kun 0	kun 1	
Antal		316	140	123	579
Mænd		35,4%	25,7%	29,3%	31,8%
Kvinder		64,6%	74,3%	70,7%	68,2%
Alder ved første undersøgelse	Gennemsnit	36,8	32,2	32	34,7
	Minimum	17	16	19	16
	Maksimum	60	59	67	67
Arbejdstimer pr. uge	Gennemsnit	37,1	36,5	36,7	36,9
	Minimum	15	15	5	5
	Maksimum	60	45	45	60
Fastansat		96,1%	90,4%	95,1%	94,5%
Sprøjtecertifikat		35,7%	34,1%	32,5%	34,6%
Rygevaner inden for de sidste 2 år	Ikke ryger	62,1%	63,0%	64,5%	62,8%
	Moderat ryger (<= 19 g/dag)	1,3%	3,0%	2,5%	1,9%
	Storryger (>19 g/dag)	36,6%	34,1%	33,1%	35,2%
Standardpriktest, antal positive	0	82,0%	81,4%	74,8%	80,3%
	1	8,5%	8,6%	11,4%	9,2%
	2	2,8%	3,6%	7,3%	4,0%
	3	2,5%	2,1%	3,3%	2,6%
	4	2,5%	2,9%		2,1%
	5 eller flere	1,6%	1,4%	3,3%	1,9%
Anciennitet i gartnerfaget (år)	Gennemsnit	12,1	7	6,7	9,7
	Minimum	0,1	0,1	0	0
	Maksimum	45	30	53	53
Anciennitet på aktuelle gartneri (år)	Gennemsnit	7,7	4,1	2,9	5,8
	Minimum	0,1	0	0	0
	Maksimum	39	34	29	39

Ved sammenligning ses, at de personer, som kun deltog enten i run 0 eller run 1 var 5 år yngre end de øvrige, der var flere mænd (34 % mod 24 %) og de havde lavere anciennitet end de øvrige. Der var ikke forskel i rygevaner, antallet af positive priktests eller disposition til høfeber eller astma mellem grupperne.



Figur 4.1 Fordeling af positive priktest over for standardallergener fordelt på deltagere i både run 0 og run 1, udelukkende i run 0 og i run 1.

Figur 4.1 viser fordelingen af positive priktests hos personerne. 19,7 % havde en eller flere positive priktests (op til 8). Hyppigst var reaktion på græs (engrottehalet) på 8,5 %, birk med 8 % og de to husstøvmider med henholdsvis 7,3 og 5,0 %. De personer som gennemførte begge runder havde lavere hyppighed af positiv priktest over for de to husstøvmider end de øvrige.

Vedrørende hovedsymptomer fandt man at der ikke var forskel på de 3 grupper bortset fra at personerne i 2. runde havde lavere frekvens af kløe og svie samt vandigt flåd fra næsen end de øvrige (se Bilag D).

4.2 Antistoffer mod mikrobiologiske bekæmpelsesmidler

Antistofferne mod mikrobiologiske bekæmpelsesmidler har fordelt sig med en række meget lave værdier og få relativt høje (se i øvrigt Bilag C).

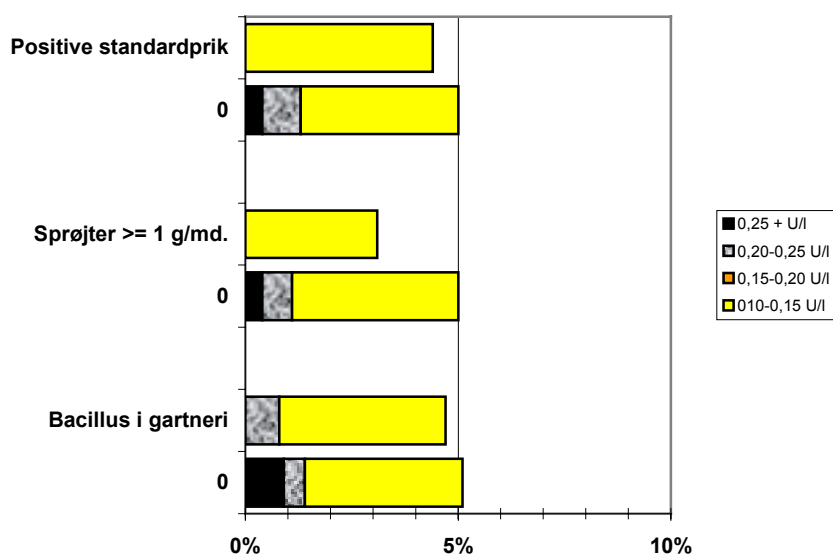
På denne baggrund gennemførtes en kategorisering, således at de er opdelt i klasser fra 0 – 0,05 OD (optical densities) og multipla heraf. For *Bacillus thuringiensis* og *Verticillium lecanii* op til 5 og *Trichoderma harzianum* op til 2. Yderligere analyseredes på dikotomerede data under eller over 0,05 OD.

4.2.1 *Bacillus thuringiensis*

Figur 4-2 viser fordelingen af antistoffer over for *Bacillus thuringiensis* (sum af antistoffer over for de tre produkter Bactimos, Dipel og Vectobac). Af hensyn

til overskueligheden er kun vist værdier over 0,10 OD. Klassen 0,05-0,10 OD væsentligt større, idet 38 % havde værdier over 0,05 OD, men uden relation til eksponeringen.

Det ses, at der ikke var relation til eksponeringsvariable eller risikofaktoren positiv priktest. Den logistiske regression viste der var flere personer med værdier over 0,05 OD i gartnerier, hvor *Bacillus thuringiensis* blev brugt (OR 2,0, CI95 1,3-2,9). Forskellen gjaldt kun for værdier mellem 0,05 og 0,10 OD. Der var ikke relation til eksponering for de andre mikrobiologiske bekæmpelsesmidler (krydsreaktion) idet personer som sprøjtede *Trichoderma harzianum* havde tendens til lavere hyppighed af positiv IgE mod *Bacillus thuringiensis*. Der var ingen interaktion mellem atopi med positiv priktest og eksponeringsvariablene.



Figur 4.2 Fordeling af antistofklasser af IgE mod *Bacillus thuringiensis* i tværsnittet (n=579). Bjælkeparrene viser for hver variabel fordelingen af antistofklasser hvor dels variabelen er til stede og ikke er tilstede (0).

Tabel 4.3 viser ændringer i antistoffer mod de enkelte produkter og summen af antistoffer mod *Bacillus thuringiensis* fra run 0 til run 1 i de forskellige grupper. Der var meget få ændringer, både stigninger og fald uden relation til nogle af baggrundsfaktorerne.

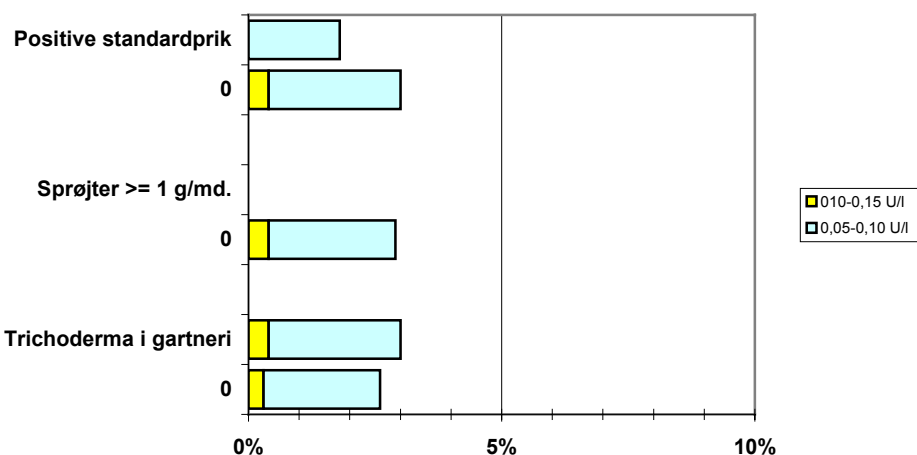
Tabel 4.3 Hyppigheden af stigning i IgE mod *Bacillus thuringiensis* fra <0,05 OD til > 0,05 OD med og uden eksponering i form af tilstedeværelse af enkeltprodukter i gartneriet og angivelse af af personen selv havde håndteret *Bacillus thuringiensis* produkter.

		IgE mod <i>Bacillus thuringiensis</i> stiger		IgE mod <i>Bacillus thuringiensis</i> falder	
Dipel i gartneri	Nej	2	,7%	3	1,0%
	Ja				
Vectobac i gartneri	Nej	1	,7%	2	1,3%
	Ja	1	,5%	1	,5%
Bactimos i gartneri	Nej	2	,9%	2	,9%
	Ja			1	,9%
<i>Bacillus thuringiensis</i> i gartneri	Nej	1	1,0%	1	1,0%
	Ja	1	,4%	2	,8%
Sprøjter selv <i>Bacillus thuringiensis</i> i run 0	Nej	2	,6%	2	,6%
	Ja			1	,3%
Sprøjter selv <i>Bacillus thuringiensis</i> i run 1	Nej	2	,7%	2	,7%
	Ja			1	5,9%

4.2.2 *Trichoderma harzianum*

IgE mod *Trichoderma harzianum* var væsentligt sjældnere end IgE mod *Bacillus thuringiensis*, cirka 3% eller 22 personer. Figur 4-3 viser fordelingen af antistoffer over for *Trichoderma harzianum* (sum af antistoffer over for de to produkter Binab og Supresivit).

Det ses, at der ikke var relation til eksponeringsvariable eller risikofaktoren positiv priktest. Den logistiske regression viste ingen relation til eksponering for *Trichoderma harzianum*, mens der var tendens til øget hyppighed af antistof i gartnerier hvor der anvendtes *Bacillus thuringiensis* og hos personer, der selv sprøjtede *Verticillium lecanii*. Der var ingen relation til baggrundsvariable.



Figur 4.3 Fordeling af antistofklasser af IgE mod *Trichoderma harzianum* i tværsnittet (n=579). Bjælkeparrene viser for hver variabel fordelingen af antistofklasser hvor dels variabelen er til stede og ikke er tilstede (0).

Tabel 4.4 viser ændringer i antistoffer mod *Trichoderma harzianum* fra run 0 til run 1 fordelt på udsættelse for de enkelte produkter. Der var stort set ingen ændringer.

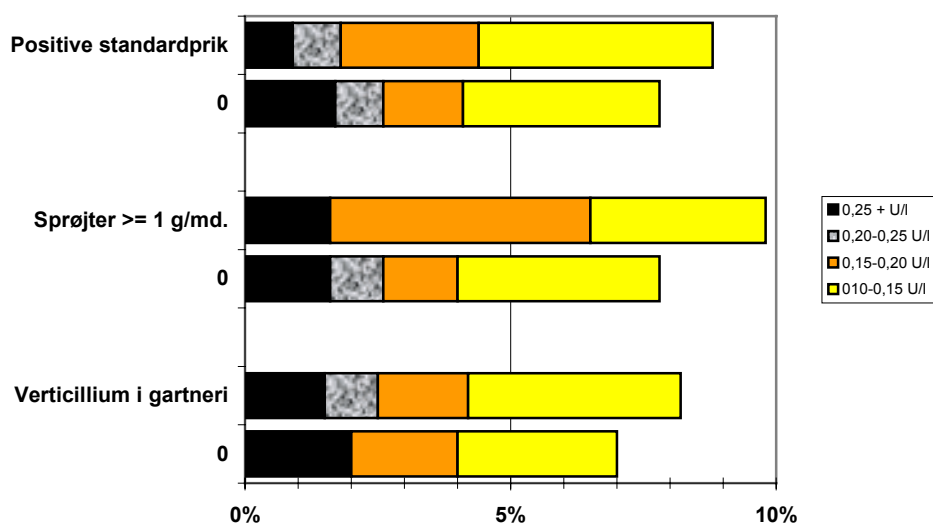
Tabel 4.4 Hyppigheden af stigning i IgE mod *Trichoderma harzianum* fra <0,05 OD til > 0,05 OD med og uden eksponering i form af tilstedeværelse af enkeltprodukter i gartneriet og angivelse af af personen selv havde håndteret *Trichoderma harzianum* produkter.

		IgE mod <i>Trichoderma harzianum</i> stiger		IgE mod <i>Trichoderma harzianum</i> falder	
Binab i gartneri	Nej				
	Ja			1	1,4%
Supresivit i gartneri	Nej			1	,4%
	Ja				
<i>Trichoderma harzianum</i> i gartneri	Nej				
	Ja			1	,7%
Sprøjter selv <i>Trichoderma harzianum</i> i run 0	Nej			1	,3%
	Ja				
Sprøjter selv <i>Trichoderma harzianum</i> i run 1	Nej			1	,3%
	Ja				

4.2.3 *Verticillium lecanii*

Figur 4.4 viser fordelingen af antistoffer over for *Verticillium lecanii* (sum af antistoffer over for de to produkter Mycotal og Vertalec). Af hensyn til overskueligheden er kun vist værdier over 0,10 OD. I alt 27 % havde værdier over 0,05 OD og 4 % havde niveau over 0,15 OD enheder.

Det ses, at der ikke var relation til eksponeringsvariable eller risikofaktoren positiv prikttest. Den logistiske regression viste ingen øget hyppighed af antistoffer i gartnerier, hvor *Verticillium lecanii* blev anvendt (OR 0,77 CI95: 0,44-1,32), eller hos personer som selv udsprede produkterne (OR 1,1 CI95: 0,6-2,2). Hyppigheden af antistoffer over 0,05 OD var højest hos kvinder, lavest hos rygere og steg med alderen.



Figur 4.4 Fordeling af antistofklasser af IgE mod *Verticillium lecanii* i tværsnittet (n=579). Bjælkeparrene viser for hver variabel fordelingen af antistofklasser hvor dels variabelen er til stede og ikke tilstede (0).

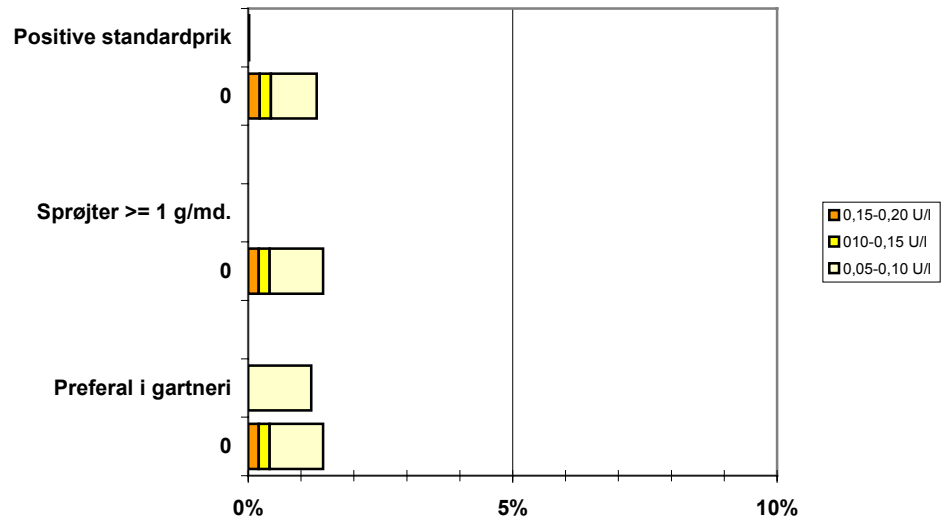
Tabel 4.5 viser ændringer i antistoffer mod *Verticillium lecanii* fra run 0 til run 1 fordelt på udsættelse for de enkelte produkter. Der var meget få ændringer, færre stigninger end fald uden relation til nogle af baggrundsfaktorerne.

Tabel 4.5 Hyppigheden af stigning i IgE mod *Verticillium lecanii* fra <0,05 OD til > 0,05 OD med og uden eksponering i form af tilstedeværelse af enkeltprodukter i gartneriet og angivelse af af personen selv havde håndteret *Verticillium lecanii* produkter.

		IgE mod <i>Verticillium lecanii</i> stiger		IgE mod <i>Verticillium lecanii</i> falder	
Vertalec i gartneri	Nej	1	1,1%	2	2,2%
	Ja	2	,8%	5	2,0%
Mycotal i gartneri	Nej			1	1,1%
	Ja	3	1,2%	6	2,5%
<i>Verticillium lecanii</i> i gartneri	Nej			1	1,5%
	Ja	3	1,1%	6	2,2%
Sprøjter selv <i>Verticillium lecanii</i> i run 0	Nej	2	,7%	5	1,7%
	Ja	1	3,1%	2	6,3%
Sprøjter selv <i>Verticillium lecanii</i> i run 1	Nej	2	,7%	5	1,8%
	Ja	1	3,2%	2	6,5%

4.2.4 *Paecilomyces*

Hyppigheden af antistoffer mod *Paecilomyces* var lav, antageligt på grund af det begrænsede antal eksponerede. Forekomsten er vist i figur 4.5 og tabel 4.6. Som det ses er der ikke nogen sammenhæng med eksponering. På grund af det lave antal positive er der ikke foretaget logistisk regression.



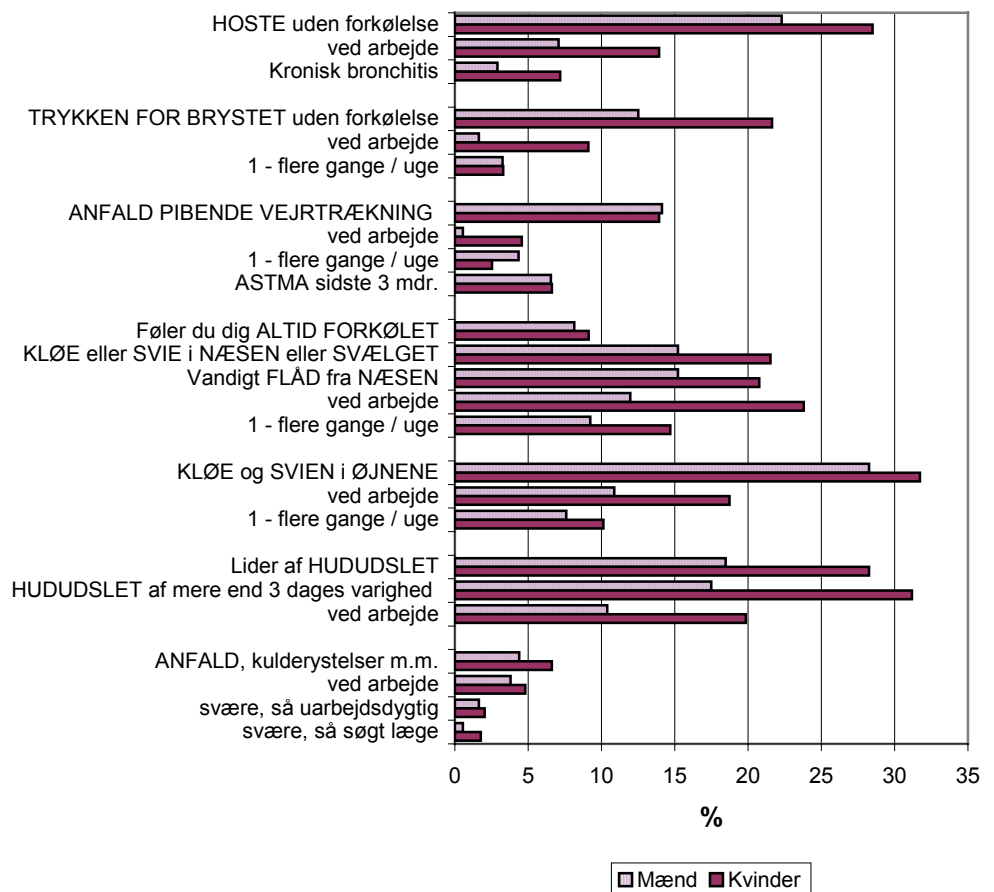
Figur 4.5 Fordeling af antistofklasser af IgE mod *Paecilomyces* i tværsnittet (n=579). Bjælkeparrene viser for hver variabel fordelingen af antistofklasser hvor dels variabelen er til stede og ikke tilstede (0).

Der var ingen ændringer i antistoffer mod *Paecilomyces* fra run 0 til run 1.

4.3 Symptomer

4.3.1 Symptomer i tværsnitsmaterialet

Figur 4.6 viser hyppigheden af symptomer hos mænd og kvinder i tværsnitsmaterialet. For de syv symptomgrupper er der spurgt om symptomerne generelt inden for de sidste 12 måneder (10 symptomer), symptomer på arbejde (7 symptomer) samt som udtryk for de sværere gener symptomer hyppigere end en gang ugentlig eller specifik kroniske eller sværere symptomer (7 symptomer). I bilag E er der vist resultaterne af den logistiske regression af tværsnitdata for de generelle symptomer.



Figur 4.6 Hyppighed af symptomer hos mænd (n=184) og kvinder (n=395) i tværsnitsmaterialet. I hver gruppe vises det generelle symptom inden for de sidste 12 mdr., symptomer på arbejde og væsentlige hyppige eller svære symptomer.

Af figur 4.6 ses, at kvinder generelt havde flere symptomer end mænd, og at næse-, øjensymptomer var de hyppigste med en prævalens på 15 til 25 % generelt og 10 til 20% på arbejde og samme frekvens med gener mere end en gang ugentlig.

Lungesymptomet anfald af pibende vejrtrækning lå på ca. 14 % men meget få på arbejde, men 3 til 5 % med hyppige gener og angivelse af astma inden for kort tid på 6 % uden kønsforskel. Hoste var et væsentligt mere uspecifikt symptom klart relateret til tobaksrygning.

Anfald af kulderystelser m.v. viste det drejede sig om en række uspecifikke symptomer. Ingen opfyldte de samlede kriterier for allergisk alveolitis (feber, kulderystelser), mens det hyppigst drejede sig hovedpine og almensymptomer, typisk 1-4 timer efter start af arbejdet. Sjældnere var anfaldene så svære at personen var uarbejdsdygtig eller måtte søge læge.

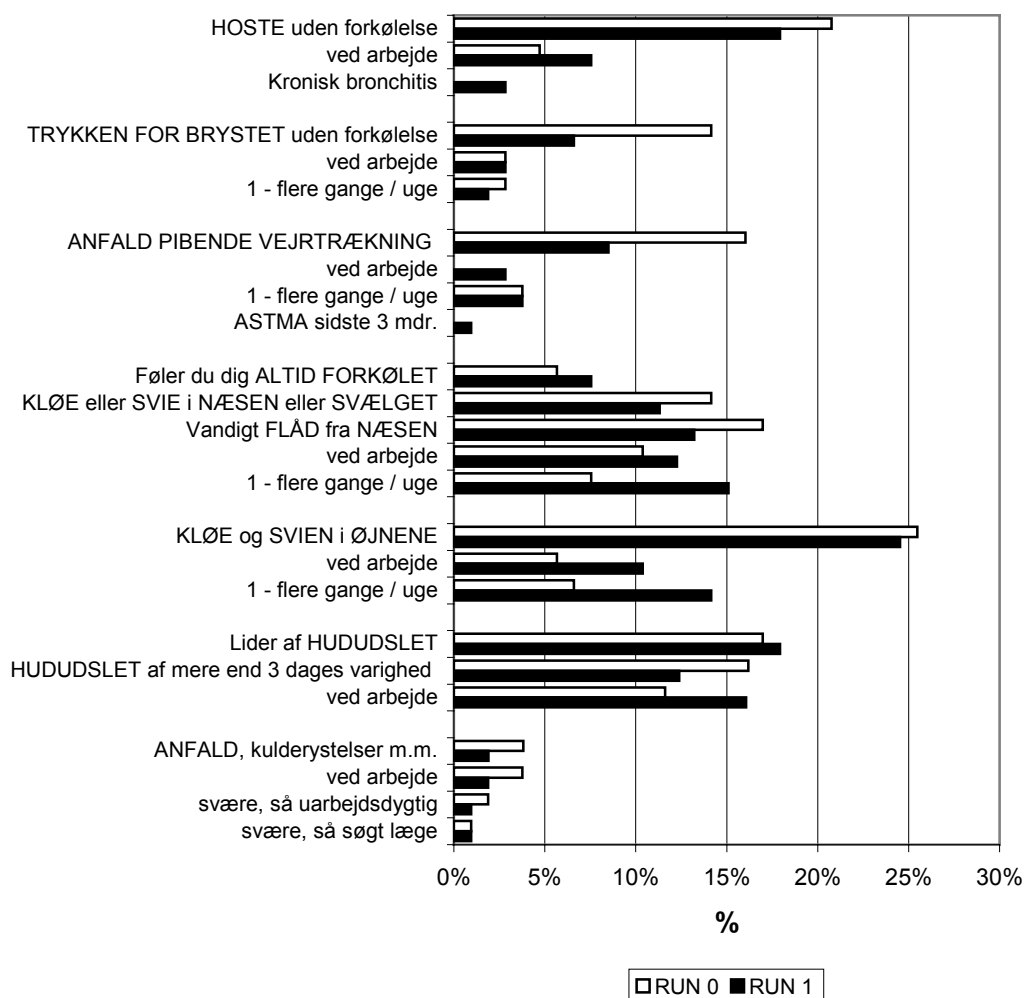
Personer med en eller flere positive priktests havde signifikant højere frekvens af pibernde vejrtrækning, astma inden for de sidste tre måneder, samtlige næse-, svælg- og øjensymptomer og hududslet.

Af personlige risikofaktorer i den logistiske regression var væsentligt én eller flere positive priktest for anfald af vejrtrækningsbesvær, astma de sidste 3 måneder samt øjen- og næsesymptomer hvor personer med positive priktests havde højere prævalens af symptomer end de øvrige. Rygere havde hyppigere

hoste og trykken for brystet end ikke-rygere. Ingen af de øvrige faktorer, alder eller anciennitet havde systematisk indflydelse på symptomprævalensen.

4.3.2 Symptomer i follow up

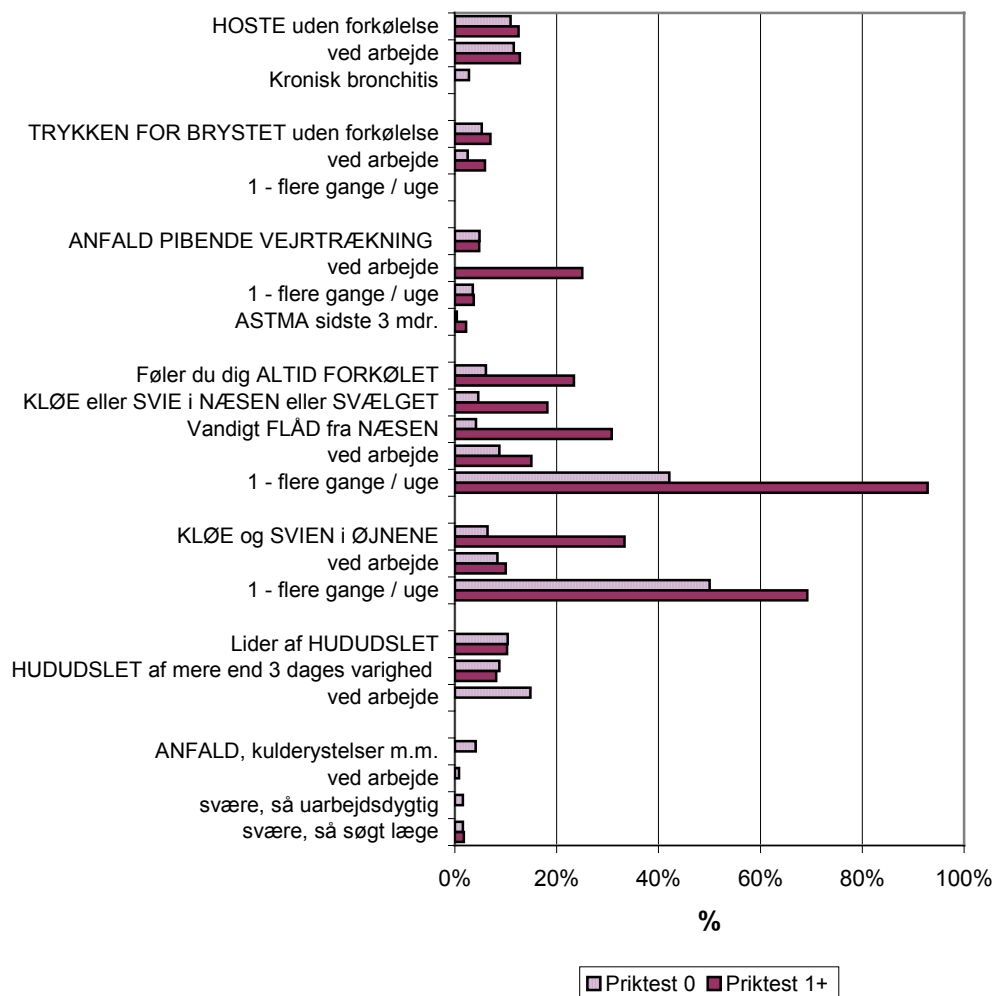
Prævalensen af gener i run 0 og run 1 for de 316 personer, som blev undersøgt i begge runder er vist i figur 4.7. Bilag F viser resultater af den logistiske regressionsanalyse af nyttilkomne symptomer mellem run 0 og run 1.



Figur 4.7 Hyppighed af symptomer i run0 og run 1 for personer (n=316), som deltog i begge runder.

Det ses at for trykken for brystet og anfald af pibende vejrtrækning faldt prævalensen markant mens der i næsesymptomerne var et mindre fald. Til gengæld steg kløe og svie i øjerne på arbejde og kløe og svie i både næse og øjne mere end en gang om ugen.

Hyppigheden af nyttilkomne symptomer i run 1 blandt de personer som ikke havde symptomer i run 0 (incidensen) er vist i figur 4.8 fordelt på personer med negativ priktest i run 0 og med en eller flere positive priktests. Det ses, at for de fleste symptomer var der væsentligt højere incidens hos prikpositive. I den logistiske regression var faktoren signifikant i de tre første næsesymptomer og i øjensymptomet kløe og svie generelt. I øvrigt havde rygere hyppigere nye anfald af pibende vejrtrækning end ikke rygere.

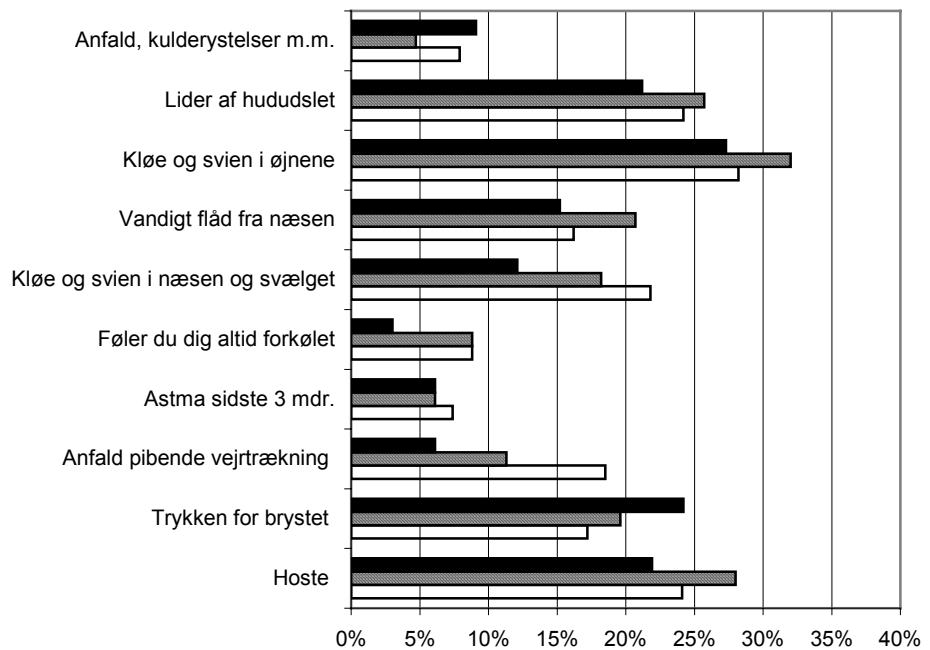


Figur 4.8 Incidens af nye symptomer i run hos personer med negativ priktest (priktest 0)(n=259) og en eller flere positive (priktest 1+) (n=57).

4.3.3 Symptomer og eksponering for *Bacillus thuringiensis*

Prævalensen af de otte hovedsymptomer i relation til *Bacillus thuringiensis* er vist i figur 4.9. På de ukorrigerede data var der en lavere hyppighed af pibende vejtrækning i gartnerier med *Bacillus thuringiensis*, men ved korrektion for baggrundvariable forsvandt denne forskel. I den logistiske regression var hududslet uden specifikation, kløe og svie i øjnene på arbejde og øjengener mere end en gang ugentlig hyppigere i gartnerier som brugte *Bacillus thuringiensis* end i de øvrige, mens trykken for brystet mere end en gang ugentlig var hyppigst blandt dem, der selv udsprede produkterne.

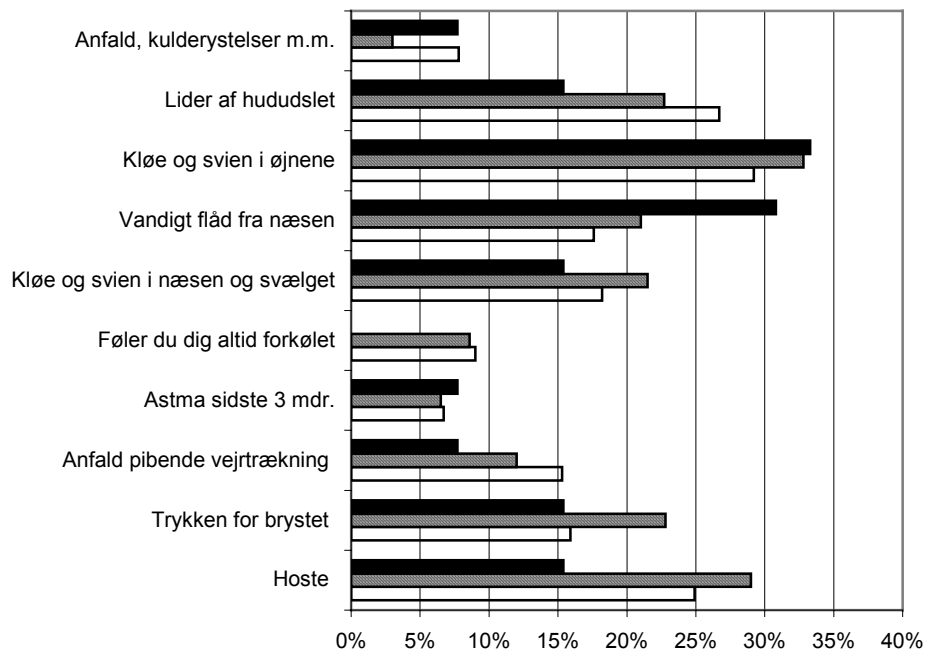
Incidensen af kløe og svie i øjnene på arbejde var højest i gartnerier som brugte *Bacillus thuringiensis* og der var tendens til øget incidens af anfald af kulderystelser etc. mens der ikke var relation mellem selv at have udsprede produkterne og symptomer.



Figur 4.9 Hyppighed af symptomer i tværsnit. Nederste hvide bjælke er personer i gartnerier uden *Bacillus thuringiensis*. Mellemste skraverede viser personer i gartnerier, som bruger *Bacillus thuringiensis*. Øverste sorte bjælke viser de personer, som selv udspreder *Bacillus thuringiensis* mere end en gang pr. måned.

4.3.4 Symptomer og eksponering for *Trichoderma harzianum*

Der var en signifikant øget hyppighed af anfald af kulderystelser blandt personer i gartnerier med *Trichoderma harzianum*, mens hyppigheden af trykken for brystet uden forkølelse var lavere. Efter korrektion bevarede forskellene her var desuden hoste uden forkølelse, anfald af vejrtrækningsbesvær, kløe og svie i næse samt anfald af kulderystelser på arbejde hyppigere. Der var ingen forskelle for de få personer, som selv håndterede produkterne. Forekomsten af positiv priktest havde ingen indflydelse på effekten af eksponeringen.



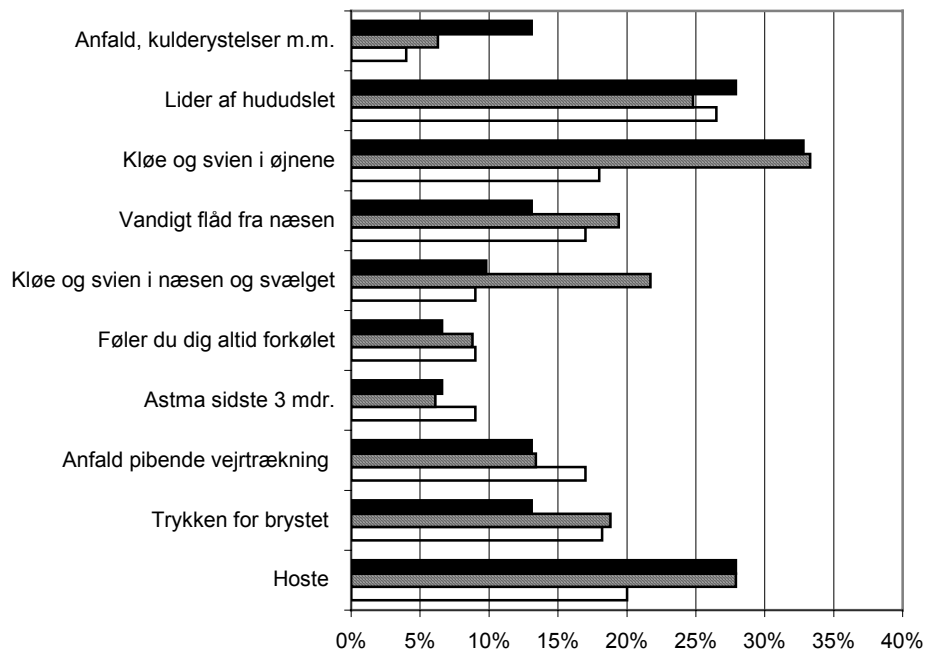
Figur 4.10 hyppighed af symptomer i tværsnit. Nederste bjælke er personer i gartnerier uden *Trichoderma harzianum*, mellemste personer i gartnerier, som bruger *Trichoderma harzianum*. Øverste bjælke viser de personer, som selv udspreder *Trichoderma harzianum*. Mere end en gang pr. Måned.

Incidensen af kronisk bronkitis var relateret til både *Trichoderma harzianum* i gartneriet og hos dem, som selv håndterede produkterne.

4.3.5 Symptomer og eksponering for *Verticillium lecanii*

De eneste effekter i tværsnitsundersøgelsen var lavere hyppigheder af kløe og svie i øjne og næse samt hudgener i gartnerier som brugte *Verticillium lecanii*, men højere frekvens af anfald af kulderystelser m.m. på arbejde hos de personer, som selv udsprede.

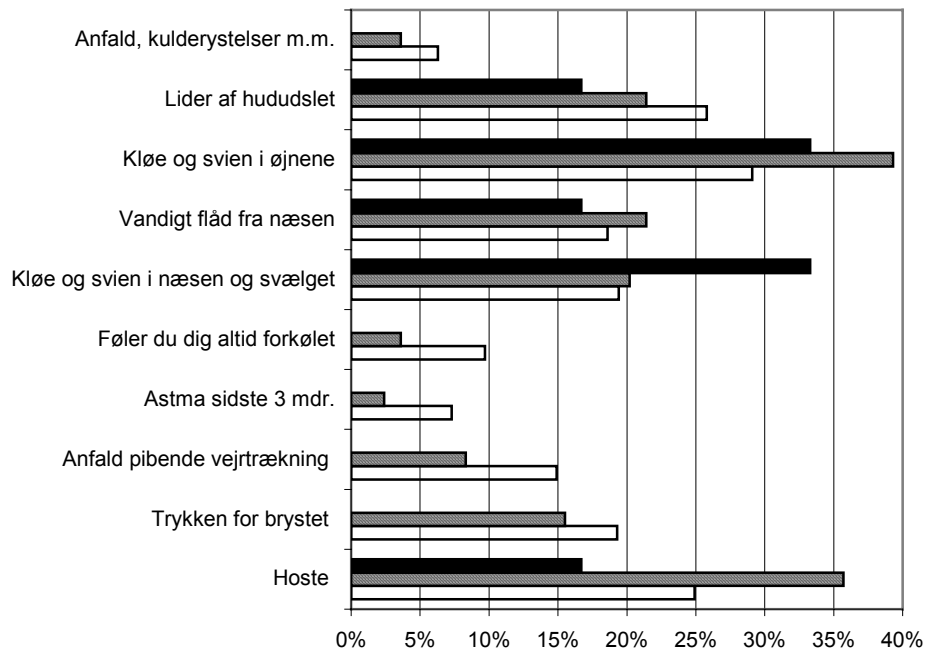
Incidensen af nye symptomer viste ikke relation til eksponeringen for *Verticillium lecanii*.



Figur 4.11 Hyppighed af symptomer i tværsnit. Nederste bjælke er personer i gartnerier uden *Verticillium lecanii*. Mellemste personer i gartnerier, som bruger *Verticillium lecanii*. Øverste bjælke viser de personer, som selv udspreder *Verticillium lecanii* mere end en gang pr. måned.

4.3.6 Symptomer og eksponering for *Paecilomyces fumosoroseus*

Der var tendens til hyppigere følelse af altid forkølelse, men mindre hoste og tendens til mindre astma i gartnerier med *Paecilomyces fumosoroseus* (Preferal), mens de få som anvendte produkterne selv ikke afveg fra resten.



Figur 4.12 Hyppighed af symptomer i tværsnit. Nederste bjælke er personer i gartnerier uden *Paecilomyces*. Mellemste personer i gartnerier, som bruger *Paecilomyces fumosoroseus*. Øverste bjælke viser de personer, som selv udspreder *Paecilomyces fumosoroseus* mere end en gang pr. måned.

Der var ikke nogen sikker sammenhæng mellem eksponering for *Paecilomyces fumosoroseus* og incidensen af nye symptomer.

4.4 Lungefunktionsmålinger

Resultaterne af lungefunktionsmålingerne er vist i bilag F. I bilaget vises både tværsnitsdata og ændringer fra run 0 til run 1.

4.4.1 Tværsnit lungeparametre

For FVC var der højere værdier for personer, som selv udsprede *Bacillus thuringiensis* og for FEV₁/FVC lavere, mens FEV₁ ikke var påvirket. De øvrige eksponeringsvariable havde ingen signifikant indflydelse.

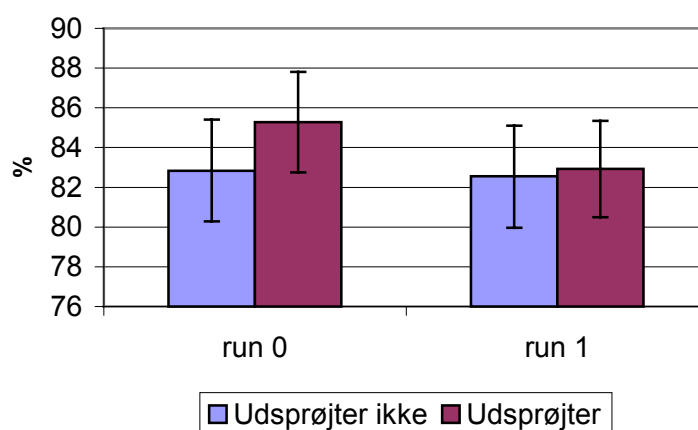
4.4.2 Follow-up lungeparametre

Resultaterne for ændringer i forceret vitalkapacitet(FVC) og ekspiratorisk volumen i første sekund (FEV₁) samt FEV₁/FVC fra run 0 til run 1 er vist i Bilag G.

For FEV₁ var der et ganske lille, ikke signifikant fald på 5 ml, for FVC 21 ml. Faldet var størst hos rygere, men der var i øvrigt ikke relation til nogle af baggrundsvARIABLENE.

Efter korrektion for baggrundsfaktorer var der stigning i FVC. Der er en tendens til at den var mindst hos rygere og der var en signifikant stigning hos de 37 personer som på et tidspunkt selv havde sprøjtet *Bacillus thuringiensis* ud (83 ml, P=0,037).

Forholdet mellem FVC og FEV₁ faldt signifikant med 0,5 % (CI 95 %, -0,96 til -0,43). Faldet var tydeligst størst hos de 37 personer som havde sprøjtet med *Bacillus thuringiensis*-præparater (-2,36 %). Dette fald var dog en tilnærmelse i forhold til de øvrige (se figur 4.13) og skyldtes forskellig stigning i FVC og ikke som forventet forskelligt fald i fald i FEV₁.



Figur 4.13 Forholdet mellem FEV₁ og FVC i run 0 og run 1 fordelt efter om personen havde opgivet, at de selv havde udsprøjtet *Bacillus thuringiensis*produkter

Desuden er der et større fald hos de personer som ikke havde været i gartnerier som anvendte *Verticillium lecanii* i forhold til dem der havde brugt det.

4.4.3 Bronkial provokationstest

I tværsnitsmaterialet var der 19 personer med positive bronkial provokationstest med PD_{20} mellem 0,0185 mg og 1,22 mg. Forekomsten af positiv bronkial test var korreleret til total IgE og antallet af positive priktest. Ved inddragelse af begge variable var dog kun antal positive priktests signifikant.

I gruppen, som gennemførte begge undersøgelser havde 11 positive priktests (mellem 0,0185 og 1,22 mg) i run 0, men kun 3 af disse havde fortsat positive priktests i run 1, hvor der i alt var 6 positive værdier (PD_{20} mellem 0,0069 og 1,01 mg) heraf var PD_{20} steget hos 2 og faldet hos 1. Der var ingen relation til eksponeringen.

4.5 Enkelttilfælde af allergi eller inflammatoriske lungesygdomme

Ud over de ovennævnte epidemiologiske analyser af prævalenser og incidenser af symptomer og funktionsmål vil en sundhedsmæssig påvirkning kunne sandsynliggøres ved veldokumenterede enkelttilfælde af udvikling af symptomer i form af astma (positiv histaminprovokation eller i behandling) eller rhinoconjunktivitis (høfebersymptomer) i forbindelse med eksponering for et af de mikrobiologiske midler eller en tydelig allergiudvikling med højt IgE. Risikopersoner vil typisk være personer med atopi, det vil sige med reaktion mod et eller flere af de hyppigste allergener i priktesten og eventuelt allergi i den nærmeste familie.

Vi fandt ikke blandt de 579 personer som deltog nogen sådan patient, hvor en allergi eller sygdom som følge af et af de mikrobiologiske midler kunne sandsynliggøres.

5 Diskussion

Formålet med hele undersøgelsen var en vurdering af om der var en biologisk effekt på mennesker som arbejder med mikrobiologiske bekæmpelsesmidler.

Sammenfattende fandtes der tegn til en sammenhæng mellem udsættelse for *Bacillus thuringiensis* og symptomer fra øjnene både i tværsnit og follow-up. For *Trichoderma harzianum* var der en relation mellem tilstedeværelse i gartneriet og flere både øvre og nedre luftvejssymptomer, men i follow-up kun relation til det mere kroniske bronkitis symptom. Da antallet af eksponerede for *Trichoderma harzianum* var begrænset og alle disse personer også var eksponeret for enten *Bacillus thuringiensis* eller *Verticillium lecanii* kan der være usikkerhed ved disse resultater. Derimod kan det siges at vi ikke fandt nogen sammenhæng mellem udsættelse for *Verticillium lecanii* og symptomer. Vi fandt desuden ikke enkeltpersoner med overbevisende tegn på allergi over for nogle af de fire typer af mikrobiologisk bekæmpelsesmidler.

Projektet er et klassisk epidemiologisk follow-up studie og resultaterne afhænger af repræsentationen af de undersøgte personer over for den udsatte befolkning.

Vi udvalgte en række repræsentative gartnerier ud fra brugen mikrobiologiske midler 1 år forud. Der kan have været sket ændringer i brugen af mikrobiologiske midler på de ikke deltagende gartnerier, men intet tyder på at de undersøgte gartnerier ikke har været repræsentative for branchen.

Deltagerprocenten var cirka 60 % hvilket svarer til tilsvarende kliniske epidemiologiske undersøgelser på arbejdspladsen. Frafaldet efter runde 0 kan have betydning såfremt det drejer sig om personer med en bestemt sygdomsprofil. Imidlertid var den hyppigst årsag til frafald jobskifte. Da arbejdsmiljøfaktorer på en given arbejdsplads har stor betydning for om personer bliver på arbejdet eller finder andet arbejde, hvor specielt personer med arbejdsrelaterede gener vil have tendens til at forlade arbejdspladsen og derfor gå ud af materialet. Dette giver anledning til en såkaldt "healthy worker selection", således at de sunde bliver tilbage.

I denne undersøgelse var tegn herpå idet personer med allergi over for husstøvmider hyppigere udgik efter første runde. Årsagen kendes ikke, men der var tydeligvis hyppigere symptomer både på og uden for arbejde hos personer med positiv priktest som udtryk for et allergisk beredskab (atopi). Det gjaldt alle de klassiske høfebersymptomer og symptomer som kan ses ved astma. Yderligere var en positiv priktest stærkt associeret til større forekomst (incidens) af nye høfebersymptomer i det følgende år. Denne tydelige effekt betyder at vægten ved bedømmelse af den sundhedsmæssige påvirkning af eksponeringen må ligge på follow-up studiet idet tværsnitsdata sandsynligvis vil underestimere den sundhedsmæssige påvirkning.

Undersøgelsens største svaghed er vurderingen af eksponeringen da de anvendte mål var temmelig grove. Dette vil tendere til at underestimere en mulig effekt af eksponeringen. Der har parallelt været en eksponeringsvurdering af *Verticillium lecanii* på udvalgte gartnerier foretaget af

Danmarks Jordbrugs-forskning, Flakkebjerg, men endelige resultater foreligger endnu ikke. De præliminære resultater af projektet viste imidlertid at der var en ganske betragtelig eksponering for *Verticillium lecanii* under afvejning og opblanding samt udsprøjtning, mens den øvrige eksponering var meget lav til umålelig. Tilsvarende målinger er nu i gang på basis af et forprojekt vedrørende *Bacillus thuringiensis* (43) Resultater ved forskellige arbejdsprocesser vil foreligge i løbet af 2002.

Forekomsten af antistoffer mod *Bacillus thuringiensis* og *Verticillium lecanii* var væsentligt hyppigere end mod *Trichoderma harzianum* og *Paecilomyces fumosoroseus*, hvilket stemmer med udbredelsen af produkterne. Derimod var der kun svag relation til de opstillede eksponeringsmål.

IgE-antistoffer er dels udtryk for en eksponering og dels for en sensibilisering. Derfor blev niveauet af antistoffer inddraget som en eksponeringsparameter i vurderingen af symptomer og lungefunktionsmålinger. I denne sammenhæng kunne det være en fordel at bruge et bedre biologisk eksponeringsmål end IgG mod de givne produkter. Dette lå desværre ikke inde for projektets ramme.

Antistofniveauerne var lave. Det er ikke direkte muligt at oversætte niveauerne til de klassisk anvendte antistofniveauer for standardallergener. Der var enkelte høje niveauer, men betydning af disse kendes ikke, idet de ikke hang sammen med et øget symptom billede eller bronkial reaktivitet.

Sammenlignet med tidligere undersøgelser fandt vi ikke en signifikant sammenhæng mellem eksponering og forekomst af *Verticillium lecanii*. Dette kan skyldes at svampen i vores undersøgelse var så udbredt, at alle reelt var eksponeret. Niveauerne i Eatons artikel var i øvrigt meget lave, hvorfor forskelle i eksponering, etc. kan forklare forskellen (33). I Eatons artikel blev der kun givet nogle beregnede gennemsnitlige eksponeringsniveauer for *Verticillium lecanii*. Vi forsøgte at udvikle en priktest mod *Verticillium lecanii*, men der var kun én positiv værdi ud af de 500. Dette kan skyldes at koncentrationen af antigen i materialet var for lavt. Det kunne ikke vurderes ved fremstillingen idet man ikke på forhånd havde kendskab til sensibiliserede personer.

Vedrørende symptomer fandtes ved tværsnitsundersøgelsen en række forskelle. Specielt var der ingen tegn på dosis-respons. Man må forvente, at personer, som har udsprøjtet, selv har været væsentligt mere eksponeret end de øvrige, og man vil forvente flere akutte symptomer. Baggrunden for, at det ikke er tilfældet, kan være en selektion, således at personer med akutte symptomer vil høre op med at sprøjte selv.

I follow-up data var der nogle sammenhænge, specielt for *Bacillus thuringiensis*, mellem nyopdukkede symptomer og eksponeringsvariable. Generelt for de 316 faldt symptomhyppigheden for de hyppigste øvre luftvejssymptomer, hvilket kan være årstidsrelateret, men ændringen var ikke relateret til eksponeringsvariable, hvorimod de forventede sammenhænge med rygning og den beskrevne atopi kunne findes.

Med et antal personer med nyopdukkede symptomer mellem 15 og 40 i løbet af et år er styrken i studiet for at finde en relevant påvirkning som forskel mellem eksponerede grupper ikke høj nok. Studiet fortsættes derfor i yderligere 2 år med årlige undersøgelser, hvorved styrken vil bedres. En mere

differentieret individuel eksponeringsvurdering kunne måske give mere sikre resultater.

Endvidere er der i den 3-års periode nyintroduktion på nogle gartnerier af f.eks. *Bacillus thuringiensis* og antallet af nyansatte i perioden vil være tilstrækkeligt til at finde en eventuel ny sensibilisering. Desuden vil en tidsmæssig relation til en eventuel sensibilisering og symptomudvikling kunne detekteres.

Ingen af lungefunktionsparametrene havde en sikker relation til eksponeringen. Der var en signifikant sammenhæng mellem udsprøjtning af *Bacillus thuringiensis* og et fald i forholdet mellem FEV₁ og FVC mellem runde 0 og runde 1. Imidlertid må dette tages med et stort forbehold, idet det er sket med en gruppe med et højt niveau i første runde som falder til niveauet i anden runde og ændringen fremkommer i lige så høj grad i form af en stigning i FVC som et fald i FEV₁ hvor sidstnævnte ville være den primære følsomme variable. Effekten skal derfor antageligvis tolkes som en tilfældig fremkomst på grund af de mange statistiske test som er udført.

Sammenfattende viser studiet at det drejer sig om en rask befolkning, dog med en ret høj symptomhyppighed. Hyppigheden af luftvejssymptomer havde en mulig relation til eksponering for specielt *Bacillus thuringiensis*. Imidlertid var alle sammenhænge relativt spredt idet der ikke var systematisk sammenhæng mellem de generelle spørgsmål og de mere detaljerede symptomer på arbejde eller symptomer af en vis hyppighed eller sværhedsgrad. Studiet viste derimod de klassiske risikofaktorer for udvikling af høfebersymptomer som atopi. I denne sammenhæng er atopi en sårbarhedsfaktor. Der var der ikke tegn til at atopikere var en særligt sårbar gruppe for at udvikle symptomer på grund af mikrobiologiske midler. Den udløsende faktor for atopikernes større incidens af symptomer kan derfor være andre forhold i gartneriernes arbejdsmiljø, enten planter, nytte dyr eller andre faktorer. Fortsættelsen af projektet hvor dataindsamlingen er afsluttet i 2001 vil kunne give mere sikre oplysninger om eventuel sensibilisering og symptomudvikling.

Ud fra resultatet af undersøgelsen kunne noget tyde på en mulig udløsning af gener, men ikke nogen betydelig varig sundhedsskadelig effekt. Imidlertid kan der ud fra kendskab til eksponeringen anbefales at eksponeringen ved håndtering af produktet, specielt afvejning og udsprøjtning, begrænses dels ved ændrede procedurer, så materialet håndteres vådt i stedet for tørt og dels ved personlige beskyttelsesmidler som åndedrætsværn. Mere definitive resultater må dog afvente det treårige follow-up studie.

6 Forkortelser og forklaringer

FVC (Forceret vitalkapacitet) er det maksimale volumen, som kan ekspireres under en forceret eksspiration påbegyndt efter en maksimal inspiration.

FEV₁ (Forceret eksparatorisk volumen i 1. sekund) er det volumen, som ekspireres i første sekund ved en forceret eksspiration, som er påbegyndt efter en maksimal inspiration

PD₂₀ Mål for følsomhed over histamin i bronkial reaktionstest (den samlede dosis af histamin, der forårsager et 20% fald i FEV₁).

B.t. *Bacillus thuringiensis*

B.t.i. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

B.t.k. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

T.h. *Trichoderma harzianum*

P.f. *Paecilomyces fumosoroseus*

V.l. *Verticillium lecanii*

MB mikrobiologiske bekæmpelsesmidler

CI: 95 95 % konfidensinterval. Den nedre og øvre grænse for det interval hvor en given statistisk parameter (middelværdi, odds-ratio eller lign.) med 95% sandsynlighed ligger.

Prævalens Hyppighed af en tilstand i en befolkning på et givet tidspunkt.

Incidens Hyppigheden af nye tilfælde pr. tidsperiode i udsnittet af en befolkning, som ikke havde sygdommen eller tilstanden ved begyndelsestidspunktet.

OR Odds ratio. Et mål for sammenhæng mellem en tilstand (syg/rask) og en anden faktor i befolkningen (eksponeret/ ikke eksponeret) beregnet som

$$OR = \frac{(\text{syg eksponeret}) * (\text{rask ikke-eksponeret})}{(\text{syg ikke-eksponeret}) / (\text{rask eksponeret})}$$

For OR i logistisk regression kan der beregnes et konfidensinterval

7 Referencer

- (1) Ray DE. Pesticides derived from plants or other organisms. In: Hayes WJ, Laws ER, editors. Handbook of Pesticide Toxicology. 1991: 585-636.
- (2) Skov- og Naturstyrelsen. Hvordan godkendes midlerne? Skov- og Naturstyrelsen . 2001.
- (3) Kvistgaard M. Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler. Anvendelsesmuligheder og udviklingstendenser. Miljøprojekt 256, 1994 1994;(256).
- (4) Miljøstyrelsen. Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler og toksiske metabolitter, Miljøprojekt nr 436. 1998.
- (5) Medicinske allergiske sygdomme og hyperreaktivitet. In: Andersen I, Bendixen G, Hansen NE, editors. Medicinsk Kompendium 14.udgave. 1994.
- (6) Barnes PJ, Godfrey S. Asthma Therapy, Martin Dunitz, London. 1998.
- (7) Linneberg A. Udvikling i forekomsten af luftvejsallergi i Danmark. Miljø og Sundhed 2000/3, dec 2000 2000.
- (8) Sjoblad RD, McClintock JT, Engler R. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. Regul Toxicol Pharmacol 1992; 15(1):3-9.
- (9) do PG. Lung (agricultural/rural). Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 114(2):212-216.
- (10) Lacey J, Crook B. Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. Ann Occup Hyg 1988; 32(4):515-533.
- (11) Sigsgaard T. Organic dust and respiratory symptoms in selected industrial environments. Environ Health Perspect 1992;(5).
- (12) Laitinen S, Kangas J, Kotimaa M, Liesivuori J, Martikainen PJ, Nevalainen A et al. Workers' Exposure to Airborne Bacteria and Endotoxins at Industrial Wastewater Treatment. AM Ind Hyg Assoc J 55 1994; 55:1055-1060.
- (13) Cosentino S, Palmas F. Assessment of Airborne Fungal Spores in Different Industrial Working Environments and Their Importance as Health Hazards to Workers. Environmental Monitoring and Assessment 1991; 16:-136.
- (14) Bunger J, Antlauf LM, Schulz TG, Westphal GA, Muller MM, Ruhnau P et al. Health complaints and immunological markers of

exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occup Environ Med* 2000; 57(7):458-464.

- (15) Engelhart S, Sennekamp J. Workplace-related complaints due to exposure to contaminated humidifier water-hypersensitivity pneumonitis with antibodies to *verticillium lecanii*. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 2000;-2.
- (16) WHO. *Bacillus thuringiensis*, Environmental Health Criteria, No. 217. 1999. WHO.
- (17) Bjarne Munk Hansen, Sylvie Salameitou. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: Jean-Francois Charles, Armelle Delécluse, Christina Nielsen-Le Roux, editors. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic Publishers, 2000: 41-64.
- (18) Siegel JP. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J Invertebr Pathol* 2001; 77(1):13-21.
- (19) McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic Sci* 1995; 45:95-105.
- (20) Fisher R, Rosner L. Toxicology of the Microbial Insecticide, Thuricide. *Agricultural and Food Chemistry* 1959; 7(10):686-688.
- (21) Green M, Heumann M, Sokolow R, Foster LR, Bryant R, Skeels M. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-86. *Am J Public Health* 1990; 80(7):848-852.
- (22) Noble MA, et al. Microbiological and Epidemiological Surveillance Programme to Monitor the Health Effects of Foray 48B BTK Spray. 30-9-1992. Vancouver, Canada.
- (23) Capital Health Region Office of the Medical Health Officer/Director of Research. Human health surveillance during the aerial spraying for control of north american gypsy moth on southern vancouver island, British columbia, 1999. 31-12-1999.
- (24) Samples JR, Buettner H. Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). *Am J Ophthalmol* 1983; 95(2):258-260.
- (25) Warren RE, Rubenstein D, Ellar DJ, Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*: protoxin activation and safety [letter]. *Lancet* 1984; 1(8378):678-679.
- (26) Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R, Kasatiya S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett Appl Microbiol* 1995; 21(2):103-105.
- (27) Damgaard PH. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12(3-4):245-250.

- (28) Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Lett 1997; 157(2):223-228.
- (29) Honda T, Shiba A, Seo S, Yamamoto J, Matsuyama J, Miwatani T. Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett 1991; 63(2-3):205-209.
- (30) Asano SI, Nukumizu Y, Bando H, Iizuka T, Yamamoto T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 1997; 63(3):1054-1057.
- (31) Lange L. Microbes and microbial products in plant protection. Progress in Botany 1992; 53:252-270.
- (32) Bernstein IL, Bernstein JA, Miller M, Tierzieva S, Bernstein DI, Lummus Z et al. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. Environ Health Perspect 1999; 107(7):575-582.
- (33) Eaton KK, Hennessy TJ, Snodin DJ, McNulty DW. *Verticillium lecanii*. Allergological and Toxicological Studies on Work Exposed Personnel. Annals of Occupational Hygiene , Vol 1986;-217.
- (34) Sigsgaard T, Hjort C, Omland Ø, Miller M, Pedersen OF. Respiratory health and allergy among young farmers and non-farming rural males. The SUS study. Respiratory symptoms and allergy among young rurals 1997;1-15.
- (35) Dreborg S. The skin prick test in the diagnosis of atopic allergy. J Am Acad Dermatol 1989; 21(4 Pt 2):820-821.
- (36) Dreborg S. Skin tests used in type I allergy testing. Allergy 1989; 44:11-59.
- (37) ATS statement--Snowbird workshop on standardization of spirometry. Am Rev Respir Dis 1979; 119(5):831-838.
- (38) Dansk Lungemedicinsk Selskab. SPIROMETRI - en rekommandation. 1-17. 1996. Nationalforeningen til bekæmpelse af Lungesygdomme.
- (39) Omland O, Sigsgaard T, Hjort C, Pedersen OF, Miller MR. Lung status in young Danish rurals: the effect of farming exposure on asthma-like symptoms and lung function. Eur Respir J 1999;(13):31-37.
- (40) Yan K, Salome C, Woolcock AJ. Rapid method for measurement of bronchial responsiveness. Thorax 1983; 38(10):760-765.
- (41) Doekes G, Douwes J, Wouters I, de Wind S, Houba R, Hollander A. Enzyme immunoassays for total and allergen specific IgE in population studies. Occup Environ Med 1996; 53(1):63-70.
- (42) Stahl SP, Norn S, Weeke B. A new method for detecting histamine release. Agents Actions 1984; 14(3-4):414-416.

- (43) Jensen GB, Andrup L, Jacobsen BL, Larsen P. Mikrobiologiske Insektbekæmpelsesmidler, AMI Rapport 53. 2001. København, Arbejdsmiljøinstituttet.

1 Lovgivning for mikrobiologiske bekæmpelsesmidler

Den 15. juli 1991 vedtog EF et direktiv om markedsføring af plantebeskyttelsesmidler (91/414/EØF). Dette direktiv blev i december 1992 implementeret i dansk lovgivning.

Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler er omfattet af lov om kemiske stoffer og produkter (Lovbekendtgørelse nr. 21 af 16. januar 1996 (1). Bekendtgørelse af lov om kemiske stoffer og produkter). De nærmere regler er fastsat i Miljøministeriets bekendtgørelse nr. 241 af 27. april 1998 om bekæmpelsesmidler (2). Bekendtgørelsen indeholder bestemmelser, der gennemfører EU-direktivet om markedsføring af bekæmpelsesmidler (Direktiv 91/414/EØF).

Godkendelse af bekæmpelsesmidler

Et bekæmpelsesmiddel må hverken importeres, sælges eller bruges i Danmark, med mindre midlet er godkendt af miljøministeren. I forbindelse med vurderinger og eventuelle godkendelser af midler til det danske marked anvendes Vejledning nr. 8, 1993 fra Miljøstyrelsen "Mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler"(3), som beskriver de regler, der gælder for *Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler*.

Godkendelsen, der også kaldes en registrering, omfatter først og fremmest en detaljeret vurdering af aktivstoffets og midlets sundhedseffekter og miljøeffekter ved det konkrete ansøgte anvendelsesområde, de ønskede afgrøder, årstid for anvendelsen, midlets dosering, udbringningsmetoden med mere.

Et *Mikrobiologisk bekæmpelsesmiddel* kan kun blive godkendt, hvis det opfylder følgende betingelser:

- ikke har uacceptable virkninger på planter eller miljøet
- ikke har skadelig virkning på dyr
- ikke påvirker menneskers sundhed
- ikke påvirker grundvandet
- er tilstrækkeligt effektivt

Med hensyn til risikoen for udvikling af allergiske sygdomme i luftvejene står der i vejledningen: " Da det er teknisk vanskeligt at udføre eksperimentelle undersøgelser til kvantificering af disse effekter, kræves ikke udført undersøgelser af dette".

Godkendelse af et nyt middel består dels af en EU-godkendelse af selve den aktive organisme, dels en dansk godkendelse af midlet, der indeholder den aktive organisme.

En EU-godkendelse indebærer, at den aktive organisme optages på en fælles EU-liste over godkendte, aktive organismer (direktivets bilag I).

Den første aktive mikroorganisme (svampen *Paecilomyces fumosoroseus*) forventes snart optaget på direktivets bilag I. Organismen indgår i produktet "Preferal", som nu søges godkendt i Danmark til bekæmpelse af væksthussmellus.

De *Mikrobiologiske bekæmpelsesmidler*, som findes på det danske markedet i dag, er omfattet af en overgangsordning. Denne overgangsordning tillader brug af midler, der var på markedet den 25. juli 1993. Ansøgninger om godkendelse af midler, der ikke var på det markedet på dette tidspunkt, skal fremsendes til EU-Kommissionen. Skov- og Naturstyrelsen er i færd med at foretage en risikovurdering af de midler, der er omfattet af overgangsordningen.

I EU-Kommissionen er man nu i færd med at udarbejde et direktiv der skal indeholde ensartede principper for vurdering og godkendelse af plantebeskyttelsesmidler baseret på mikroorganismer (bilag VI til direktiv 91/414). Når disse principper er vedtaget vil de erstatte den nugældende danske vejledning og danne grundlag for en dansk vurdering.

- (1) Miljøministeriet. Bekendtgørelse af lov om kemiske stoffer og produkter. Lov nr. 21 af 16/01/1996 1996.
- (2) Miljøministeriet. Bekendtgørelse om bekæmpelsesmidler. Miljøministeriets bekendtgørelse nr. 241 af 27/4/1998 1998.
- (3) Miljøministeriet, Miljøstyrelsen. Mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler. Vejledning fra Miljøstyrelsen nr. 8, 1993 1993;(8).

1 Profiler for Litteratursøgning

1.1 Søgning på OSH-ROM er foretaget ud fra:

```
exact{HAY?FEVER*}  
exact{RHINITIS*}  
exact{ALVEOLITIS-EXTRINSIC-ALLERGIC*}  
exact{ASTHMA*}  
exact{BRONCHITIS*}  
exact{BRONCHIOLITIS*}  
exact{LUNG-DISEASES-PARASITIC*}  
exact{PULMONARY-FIBROSIS*}  
exact{PULMONARY-EOSINOPHILIA*}  
exact{CONJUNCTIVITIS-ALLERGIC*}  
exact{FOOD-HYPERSENSITIVITY*}  
exact{ALLERGY*}  
exact{HYPERSENSITIVITY-IMMEDIATE*}  
exact{ANAPHYLAXIS*}  
exact{ENVIRONMENTAL-ILLNESS*}  
exact{PEST-CONTROL-BIOLOGICAL*}  
exact{INSECT-CONTROL*}  
exact{TICK-CONTROL*}  
exact{ENVIRONMENTAL-MICROBIOLOGY*}  
exact{AIR-MICROBIOLOGY*}  
exact{FOOD-MICROBIOLOGY*}  
exact{SOIL-MICROBIOLOGY*}  
exact{WATER-MICROBIOLOGY*}  
exact{BACILLUS-THURINGIENSIS*}  
exact{VERTICILLIUM*}  
exact{TRICHODERMA*}  
exact{PAECILOMYCES*}  
((exact{GREEN-HOUSE}) or (exact{GREEN-HOUSES}) or  
(exact{GREENHOUSES}) or (exact{GARDENERS}) or  
(exact{GREENHOUSE}) or (exact{GARDENER})) not  
("Greenhouse-Effect")
```

1.2 Søgning på Medline er foretaget ud fra:

```
explode "Hypersensitivity"/ all subheadings  
explode "Pest-Control"/ all subheadings  
explode "Lung-Diseases"/ all subheadings  
((exact{GREEN-HOUSE}) or (exact{GREEN-HOUSES}) or  
(exact{GREENHOUSES}) or (exact{GARDENERS}) or  
(exact{GREENHOUSE}) or (exact{GARDENER})) not  
("GREENHOUSE-EFFECT")  
explode "Occupational-Health"/ all subheadings
```

explode "Environmental-Microbiology"/ all subheadings
explode "Bacillus-thuringiensis"/ all subheadings
explode "Verticillium"/ all subheadings
explode "Trichoderma"/ all subheadings
explode "Paecilomyces"/ all subheadings

1 Analysebeskrivelse for total og specifik IgE

dr. Gert Doekes ;M.Sc, Ph.D., Lützen Portengen. M.Sc.

Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Environmental and Occupational Health, University of Utrecht. The Netherlands.

1.1 Material & Methods

1.1.1 Extraction of allergens

Except for Vectobac all biopesticides were suspended (1,5g/30ml; 5%) in phosphate buffered saline with 0,05% azide (PBS/Az). Vectobac was formulated as a suspension and was first centrifuged for 30min. at 2750G. After that the pellet was resuspended in PBS/Az (7,7g/30ml). All suspensions were vortexed, sonificated for 1 minute, vortexed again and left shaking for 2 hrs. After that they were centrifuged for 15min. at 2.100G. Both the pellet and supernatant of Vectobac were centrifuged for 30min. at 20.000G and filtered through a 0,45µm filter. The supernatant was dialysed for 20hrs. against 4 washings of 3 l. PBS/Az each. To get enough material for all IgE-assays, material extracted on different dates was pooled for the allergens Supresivit, Binab and Dipel. The material obtained by extracting the pellet and supernatant of the Vectobac-formulation was mixed in equal amounts. Finally, protein and carbohydrate content of all preparations was determined (table 1).

Table 1 Protein and carbohydrate contents of allergen-extracts

Allergen	Protein ¹ (µg/ml)	Carbohydrate ² (µg/ml)
Supresivit	55	46
Preferal	535	490
Binab	115	444
Bactimos	3090	357
Dipel	341	115
Vertalec	3609	364
Mycotal	810	124
Vectobac (mix)	415	283 ³

¹ both BCA (Preferal, Bactimos, Vertalec and Mycotal) and microBCA (Supresivit, Binab, Dipel and Vectobac) method.

² Dubois.

³ Carbohydrate contents were determined for pellet and supernatant separate. This value is an average, but both were comparable.

1.1.2 Testing of coating-characteristics and cross-reactivity

Coating characteristics were tested by determining IgG concentrations against the different allergen-extracts. In most cases strong reactions were found against most or all of the 8 allergen-preparations. The presence of cross-reactivity was determined by IgG-inhibition experiments with the different allergens. Cross-reactivity was noted between Supresivit and Bactimos, Binab and Supresivit, Mycotal and Preferal, and Vertalec, Vectobac and Mycotal.

1.1.3 Specific IgE testing

Plates were coated overnight at 4°C with 100µl of a 10µg/ml solution of allergen in PBS (pH=7,0). Samples were diluted 10x in PBS with Tween20 (0,05%) and gelatine (2g/l) (PBT G) and 100µl was pipetted into 2 wells. On each plate blanks for all 8 allergens (100 µl PBT G) and a positive control for Vertalec (100 µl of a 10x diluted pooled serum) were included. After incubation on a shaking platform at 37°C for 2 hrs. plates were washed with PBS with Tween20 (0,05%; PBT) and 100µl of a monoclonal mouse-antibody against human IgE (MoαHuIgE, CLB art.M1294; 1:16.000) was pipetted in each well. Plates were left shaking for another hour, washed and incubated again with a biotinylated monoclonal rabbit-antibody against murine IgG (Ram/BIO, DAKO art. E0354; 1:5.000). After 1 hr. plates were washed again and incubated with peroxidized avidine (AV/PO, DAKO art. P0364; 1:2000) for an hour. After the last washing plates were incubated with ortho-phenylenediamine dihydro-chloride (OPD) with 0,05% H₂O₂. After 30min. the reaction was stopped with 50µl HCl and the optical density (OD) was read at 492nm. Results were calculated as follows. First, a daily average blank was calculated for each allergen (n=9 for Vertalec, n=16 for all other allergens) and subtracted from the corresponding sample-OD's resulting in an adjusted OD (OD*). Second, if the OD* of both wells was > 0,05 the sample was decided to be positive (+). Alternatively, if the OD* of both wells was ≤ 0,05 the sample was negative. If only one of the OD*'s was > 0,05 the sample was retested and the new result was used. All positive samples as well as a subset of negative samples were retested to assess the reproducibility of the test.

1.1.4 Retesting of baseline and follow-up samples on the same plate

Samples of individuals for which both baseline and follow-up sample were available and for which at least one of these had been found positive previously were retested with both samples on the same plate.

1.1.5 Total IgE

Plates were coated overnight at 4°C with 100µl of a 1:4000 solution of a monoclonal mouse-antibody against human IgE (MoαHuIgE, CLB art.M1294) in PBS (pH=7,0). Samples were diluted 25x in PBT G and pipetted in 4 wells in a serial 2-fold dilution (25x, 50x, 100x, 200x). On each plate blanks and a standard were included in 10 2-fold dilutions (0,012....6,25kU/l). After incubation on a shaking platform for 2 hrs plates were washed with PBT and in each well 100µl of a monoclonal rabbit-antibody against human IgE (RaαHuIgE, DAKO art.A094; 1:10.000) was

pipetted. Plates were left shaking for another hour at 37°C, washed and incubated again with a peroxidized monoclonal horse-antibody against rabbit-IgG (H α RaIgG/PO, CLB art. M1234; 1:10.000) for an hour. After the last washing they were incubated with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) with 0,05% H₂O₂. After 30min. the reaction was stopped with 50 μ l HCl and the optical density (OD) was read at 492nm. Results were calculated as follows. Concentrations were interpolated from the standard-curve insofar as OD*'s were within a range of 0,1 to 3,4. The resulting concentration was further dichotomized into a positive (IgE > 100 kU/l) and negative result (IgE <= 100 kU/l).

1.2 Results

1.2.1 Specific and total IgE

Prevalence rates of specific sensitisation (OD* > 0.05) against biological pesticides were highest for Vertalec, Vectobac and Mycotol (table 2). Retesting did not always confirm initial results, possibly because most of the samples were only marginally positive (see appendix; tables 7A-I and graphs 2A-I). Moreover a slight but significant decrease in the OD492* for a positive pooled control on Vertalec was noticed (nov/dec 1998 OD* = 0.089; feb/april 1999 OD* = 0.079), making interpretation of differences between marginally positive baseline and follow-up samples analyzed in different periods even more difficult (appendix; table 8A-I, graphs 3A-I). This could not be resolved by adjusting for the result of the pooled serum and therefore samples of all individuals for which both baseline and follow-up samples were available and which had tested positive either at baseline or at follow-up were retested on the same plate. If necessary this was done on the complete panel of allergens (9 individuals, 18 samples) but in most cases only Vertalec, Mycotol and Vectobac had to be used (70 individuals, 140 samples). Results are given in table 3A-I and for the allergens Vertalec, Mycotol and Vectobac in graphs 1A-C. An overview of the layout off all relevant datafiles (dBase/SAS) is included in the appendix.

Table 2 Number of positive results on specific allergens and total IgE

	t=0	(%)	t=1	(%)
No.persons tested	457	100.0%	436	100.0%
Supresivit	1	0.2%	0	0.0%
Preferal	5	1.1%	6	1.4%
Binab	1	0.2%	1	0.2%
Bactimos	4	0.9%	3	0.7%
Dipel	0	0.0%	0	0.0%
Vertalec	79	17.3%	46	10.6%
Mycotal	21	4.6%	15	3.4%
Vectobac	39	8.5%	34	7.8%
Total IgE	90	19.7%	75	17.2%

The geometric mean (GM) of total IgE-levels at baseline was 25.4 (95%CI 22.1-29.1; n=457) and at follow-up 23.9 (95%CI 20.9-27.4; n=436) (see also appendix; graph 3D). The coefficient of variation (CV) for the measurements was 14.8% (n=292). Also when expressed as levels > or <=

than 100 kU/l no differences between baseline and follow-up samples were noted.

Table 3A-H Changes in sensitization to biological pesticides. In this table baseline samples (rows) are compared with follow-up samples (columns) analyzed on the same day and on the same plate. + = OD492* of both wells > 0.05, - = OD492* of both wells <= 0.05, ? = one well OD492* <= 0.05, the other > 0.05.

Supresivit	+	-	?
Baseline +	0	1	0
Baseline -	0	7	1
Baseline ?	0	0	0

Preferal	+	-	?
Baseline +	3	1	0
Baseline -	0	5	0
Baseline ?	0	0	0

Binab	+	-	?
Baseline +	0	0	1
Baseline -	0	8	0
Baseline ?	0	0	0

Bactimos	+	-	?
Baseline+	3	0	0
Baseline -	1	5	0
Baseline ?	0	0	0

Dipel	+	-	?
Baseline+	0	1	0
Baseline -	0	7	1
Baseline ?	0	0	0

Vertalec	+	-	?
Baseline +	19	5	0
Baseline -	3	45	1
Baseline ?	0	4	2

Mycotal	+	-	?
Baseline +	6	2	1
Baseline -	1	67	1
Baseline ?	0	1	0

Vectobac	+	-	?
Baseline +	18	3	3
Baseline -	2	46	5
Baseline ?	0	2	0

Table 4 Baseline samples are compared with follow-up samples analyzed on different days. + = total IgE > 100 kU/l, - = total IgE <= 100 kU/l.

IgE totaal	Follow up+	Follow upc -	
Baseline +	49	10	59
Baseline -	4	251	255
	53	261	314

1.2.2 Associations between different allergens and total IgE

Positive results on Vertalec and Mycotal were strongly correlated, while positive results on Bactimos and Vectobac correlated moderately (table 5A-C). Positive results on Vertalec and Mycotal were only moderately correlated with positive results on Vectobac at baseline. Only at follow-up slight positive associations were found between sensitisation to specific allergens and total IgE-levels (see also table 6).

Table 5a Baseline (t=0) The number in a certain row+col indicates how many samples were positive on both allergens e.g. from 79 samples positive on Vertalec 18 were also positive on Mycotal.

	Supresivi t	Prefera l	Binab s	Bactimo	Dipel	Vertalec	Mycotal	Vectoba c	Totaal IgE
Supresivi t	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Preferal		5	1	1	0	1	2	3	1
Binab			1	1	0	1	1	1	0
Bactimos				4	0	2	1	3	1
Dipel					0	0	0	0	0
Vertalec						79	18	14	18
Mycotal							21	6	8
Vectobac								39	9
Totaal IgE									90

Table 5b Follow-up (t=1)

	Supresivi t	Prefera l	Binab s	Bactimo	Dipel	Vertalec	Mycotal	Vectoba c	Totaal IgE
Supresivi t	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Preferal		6	1	1	0	3	2	2	3
Binab			1	1	0	1	1	1	1
Bactimos				3	0	1	1	3	1
Dipel					0	0	0	0	0
Vertalec						46	11	4	10
Mycotal							15	3	5
Vectobac								34	10
Totaal IgE									75

Table 5c Both baseline and follow-up

	Supresivi t	Prefera l	Binab s	Bactimo	Dipel	Vertalec	Mycotal	Vectoba c	Totaal IgE
Supresivi t	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Preferal		11	2	2	0	4	4	5	4
Binab			2	2	0	2	2	2	1
Bactimos				7	0	3	2	6	2
Dipel					0	0	0	0	0
Vertalec						125	29	18	28
Mycotal							36	9	13
Vectobac								73	19
Totaal IgE									165

Table 6 Combinations of positive results on specific allergens and total IgE

	t=0			t=1		
	No. samples	Total IgE+	%	No. samples	Total IgE+	%
0 allergens	348	63	18.1%	356	53	14.9%
1 allergen	77	18	23.4%	60	18	30.0%
2 allergens	26	8	30.8%	18	3	16.7%
3 allergens	5	1	20.0%	1	0	0.0%
4 allergens	0	0	-	0	0	-
5 allergens	0	0	-	0	0	-
6 allergens	1	0	0.0%	1	1	100.0%
7 allergens	0	0	-	0	0	-
8 allergens	0	0	-	0	0	-

APPENDIX

Table 7A-I Retesting of samples (allergens and total IgE). In this table results of the 1st test (rows) are compared with that of the 2nd (columns). + = OD492* of both wells > 0.05, - = OD492* of both wells <= 0.05, ? = one well OD492* <= 0.05, the other > 0.05.

Supresivit	+	-	?	
+	0	1	0	1
-	2	256	4	262
?	0	4	0	4
	2	261	4	267

Binab	+	-	?	
+	2	0	0	2
-	1	253	3	257
?	0	7	1	8
	3	260	4	267

Dipel	+	-	?	
+	0	0	0	0
-	2	259	3	264
?	0	2	1	3
	2	261	4	267

Mycotal	+	-	?	
+	24	7	1	32
-	1	252	3	256
?	3	2	1	6
	28	261	5	294

Totaal IgE	+	-	
+	62	6	68
-	1	287	288
	63	293	356

Preferal	+	-	?	
+	7	1	0	8
-	0	243	6	249
?	2	6	2	10
	9	250	8	267

Bactimos	+	-	?	
+	3	2	2	7
-	2	251	4	257
?	0	2	1	3
	5	255	7	267

Vertalec	+	-	?	
+	83	14	13	110
-	6	130	8	144
?	14	23	3	40
	103	167	24	294

Vectobac	+	-	?	
+	47	7	5	59
-	11	167	13	191
?	11	27	6	44
	69	201	24	294

Table 8A-H Comparison of baseline and follow-up samples analyzed on different days. In this table results of baseline samples (rows) are compared with that of follow-up samples (columns). + = OD492* of both wells > 0.05, - = OD492* of both wells <= 0.05, ? = one well OD492* <= 0.05, the other > 0.05.

Supresivit	+	-	
+	0	1	1
-	0	313	313
	0	314	314

Sensitivity	100%
Specificity	0%
Kappa	0.00

Binab	+	-	
+	0	1	1
-	0	313	313
	0	314	314

Sensitivity	100%
Specificity	0%
Kappa	0.00

Dipel	+	-	
+	0	0	0
-	0	314	314
	0	314	314

Sensitivity	100%
Specificity	-
Kappa	-

Mycotal	+	-	
+	8	5	13
-	1	300	301
	9	305	314

Sensitivity	100%
Specificity	62%
Kappa	0.72

IgE totaal	+	-	
+	49	10	59
-	4	251	255
	53	261	314

Sensitivity	98%
Specificity	83%
Kappa	0.85

Preferal	+	-	
+	2	2	4
-	1	309	310
	3	311	314

Sensitivity	100%
Specificity	50%
Kappa	0.57

Bactimos	+	-	
+	1	2	3
-	1	310	311
	2	312	314

Sensitivity	100%
Specificity	33%
Kappa	0.40

Vertalec	+	-	
+	27	20	47
-	1	264	265
	28	284	312

Sensitivity	100%
Specificity	57%
Kappa	0.68

Vectobac	+	-	
+	18	10	28
-	7	279	286
	25	289	314

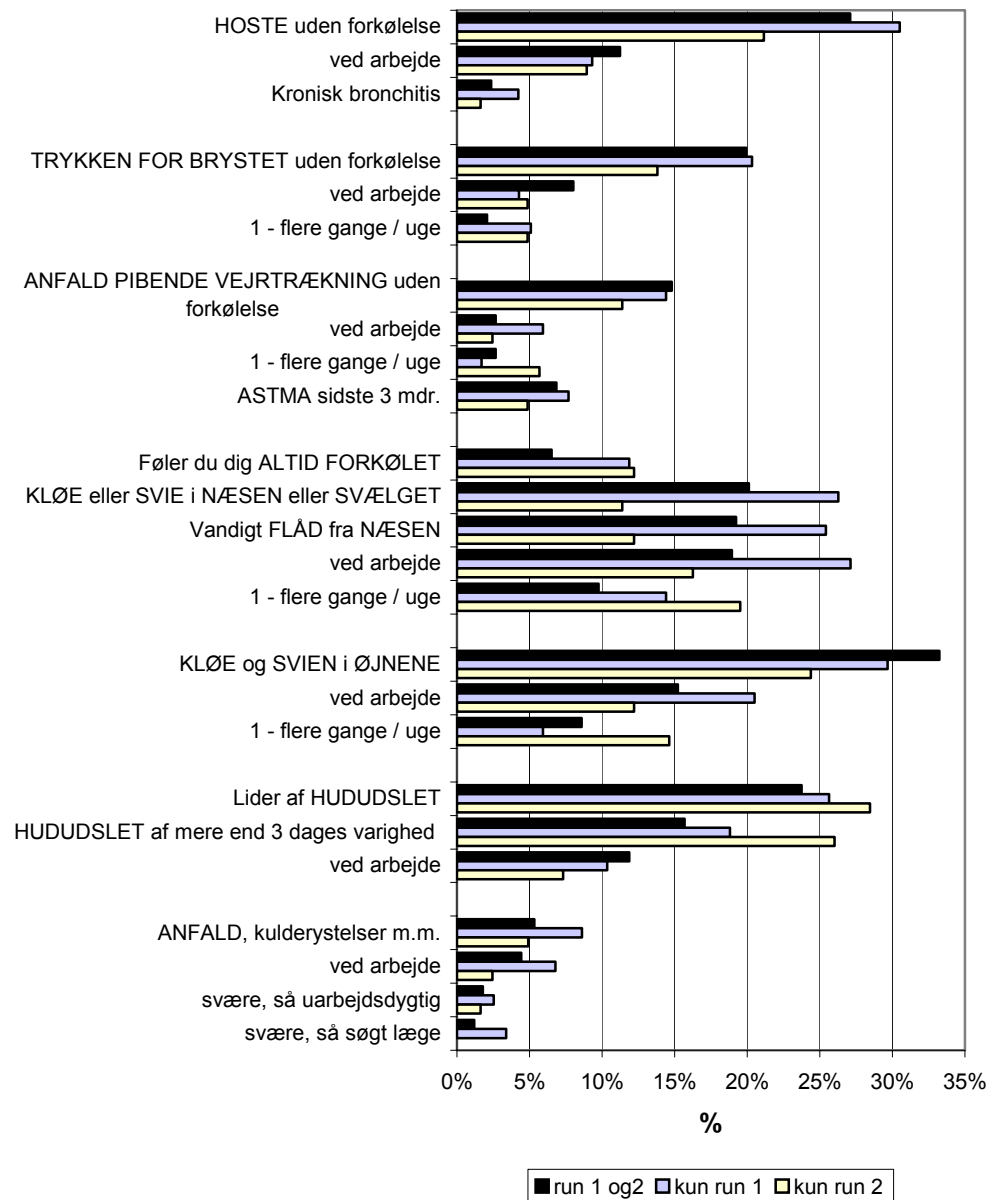
Sensitivity	98%
Specificity	64%
Kappa	0.65

1 Tabel over baggrundsvARIABLE for delt på eksponering

			I gartneri produkt med bacillus		I gartneri produkt med trichoderma		I gartneri produkt med verticillium		I gartneri produkt med paecilomyces		Total
			Ja	Nej	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja	Nej	
Mand	Antal		80	104	119	65	35	149	165	19	184
	%		37,0	28,7	34,4	27,9	35,0	31,1	33,3	22,6	31,8
Kvinde	Antal		136	259	227	168	65	330	330	65	395
	%		63,0	71,3	65,6	72,1	65,0	68,9	66,7	77,4	68,2
Alder ved us. (år)	Mean		33,2	35,6	33,9	35,9	37,0	34,2	34,3	36,8	34,7
	Minimum		18,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	19,0	16,0
	Maximum		60,0	67,0	67,0	59,0	59,0	67,0	67,0	57,0	67,0
Sprøjtecertifikat	JA	Antal	74	124	124	74	31	167	173	25	198
		%	34,6	34,6	36,0	32,5	31,3	35,3	35,4	30,1	34,6
	NEJ	Antal	140	234	220	154	68	306	316	58	374
		%	65,4	65,4	64,0	67,5	68,7	64,7	64,6	69,9	65,4
Anciennitet i gartnerfaget i år	Mean		9,5	9,9	9,6	10,0	12,2	9,2	9,8	9,6	9,7
	Minimum		,0	,1	,0	,1	,3	,0	,0	,1	,0
	Maximum		45,0	53,0	53,0	43,4	45,0	53,0	53,0	42,4	53,0
Anciennitet på aktuelle gartneri i år	Mean		6,3	5,6	5,4	6,5	8,3	5,3	5,8	5,8	5,8
	Minimum		,1	,0	,0	,0	,0	,0	,0	,0	,0
	Maximum		37,8	39,0	37,8	39,0	39,0	37,8	39,0	29,0	39,0
Rygerstatus inden for 2 år	Ikke ryger	Antal	139	216	214	141	61	294	304	51	355
		%	66,8	60,5	63,1	62,4	62,9	62,8	62,9	62,2	62,8
	<= 19 g/dag	Antal	5	6	8	3	1	10	11		11
		%	2,4	1,7	2,4	1,3	1,0	2,1	2,3		1,9
	>19 g/da	Antal	64	135	117	82	35	164	168	31	199
		%	30,8	37,8	34,5	36,3	36,1	35,0	34,8	37,8	35,2
Disposition til ASTMA	Ingen	Antal	182	301	293	190	81	402	418	65	483
		%	84,3	82,9	84,7	81,5	81,0	83,9	84,4	77,4	83,4
	Moder	Antal	13	25	22	16	7	31	32	6	38
		%	6,0	6,9	6,4	6,9	7,0	6,5	6,5	7,1	6,6
	Fader	Antal	11	15	14	12	4	22	20	6	26
		%	5,1	4,1	4,0	5,2	4,0	4,6	4,0	7,1	4,5
	Moder + fader	Antal	1	2	2	1	1	2	3		3
		%	,5	,6	,6	,4	1,0	,4	,6		,5
	Søskende	Antal	5	15	10	10	6	14	15	5	20
		%	2,3	4,1	2,9	4,3	6,0	2,9	3,0	6,0	3,5
	Moder + søskende	Antal	3	3	4	2	1	5	5	1	6
		%	1,4	,8	1,2	,9	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0
	Fader	Antal	1	2	1	2		3	2	1	3

		%	,5	,6	,3	,9		,6	,4	1,2	,5
Disposition til ALLERGISK HØFEVER	Ingen	Antal	186	293	293	186	84	395	409	70	479
		%	86,1	80,7	84,7	79,8	84,0	82,5	82,6	83,3	82,7
	Mo-der	Antal	16	39	27	28	8	47	45	10	55
		%	7,4	10,7	7,8	12,0	8,0	9,8	9,1	11,9	9,5
	Fader	Antal	7	10	11	6	3	14	16	1	17
		%	3,2	2,8	3,2	2,6	3,0	2,9	3,2	1,2	2,9
	Mo-der + fader	Antal	2	3	4	1		5	5		5
		%	,9	,8	1,2	,4		1,0	1,0		,9
	Søsk-ende	Antal	2	13	8	7	3	12	12	3	15
		%	,9	3,6	2,3	3,0	3,0	2,5	2,4	3,6	2,6
	Mo-der + søsk-ende	Antal	3	5	3	5	2	6	8		8
		%	1,4	1,4	,9	2,1	2,0	1,3	1,6		1,4
Disposition til ASTMA-EKSEM	Ingen	Antal	205	348	332	221	96	457	473	80	553
		%	94,9	95,9	96,0	94,8	96,0	95,4	95,6	95,2	95,5
	Mo-der	Antal	10	11	13	8	4	17	18	3	21
		%	4,6	3,0	3,8	3,4	4,0	3,5	3,6	3,6	3,6
	Fader	Antal	1		1			1	1		1
		%	,5		,3			,2	,2		,2
	Mo-der + fader	Antal		1		1		1	1		1
		%		,3		,4		,2	,2		,2
	Søsk-ende	Antal		3		3		3	2	1	3
		%		,8		1,3		,6	,4	1,2	,5
		Antal									
		%									
Antal positive standardprik	,00	Antal	178	287	288	177	86	379	397	68	465
		%	82,4	79,1	83,2	76,0	86,0	79,1	80,2	81,0	80,3
	1,00	Antal	15	38	26	27	6	47	47	6	53
		%	6,9	10,5	7,5	11,6	6,0	9,8	9,5	7,1	9,2
	2,00	Antal	8	15	12	11	3	20	20	3	23
		%	3,7	4,1	3,5	4,7	3,0	4,2	4,0	3,6	4,0
	3,00	Antal	6	9	12	3	3	12	14	1	15
		%	2,8	2,5	3,5	1,3	3,0	2,5	2,8	1,2	2,6
	4,00	Antal	4	8	4	8	2	10	8	4	12
		%	1,9	2,2	1,2	3,4	2,0	2,1	1,6	4,8	2,1
	5,00	Antal	3	1	2	2		4	4		4
		%	1,4	,3	,6	,9		,8	,8		,7
	6,00	Antal		2		2		2	1	1	2
		%		,6		,9		,4	,2	1,2	,3
	7,00	Antal	1	2		3		3	3		3
		%	,5	,6		1,3		,6	,6		,5
	8,00	Antal	1	1	2			2	1	1	2
		%	,5	,3	,6			,4	,2	1,2	,3
Deltger i run 0 og/eller run 1	Run 0 og 1	Antal	127	189	192	124	68	248	268	48	316
		%	58,8	52,1	55,5	53,2	68,0	51,8	54,1	57,1	54,6
	Run 0	Antal	59	81	88	52	19	121	124	16	140
		%	27,3	22,3	25,4	22,3	19,0	25,3	25,1	19,0	24,2
	Run 1	Antal	30	93	66	57	13	110	103	20	123
		%	13,9	25,6	19,1	24,5	13,0	23,0	20,8	23,8	21,2

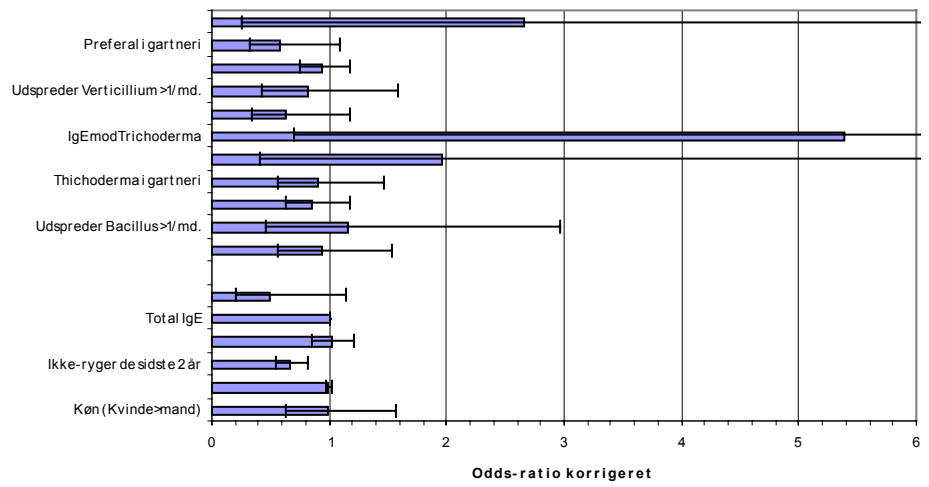
Hyppighed af symptomer i tværsnitsmaterialet fordelt på deltagelse i run 0 og run 1.



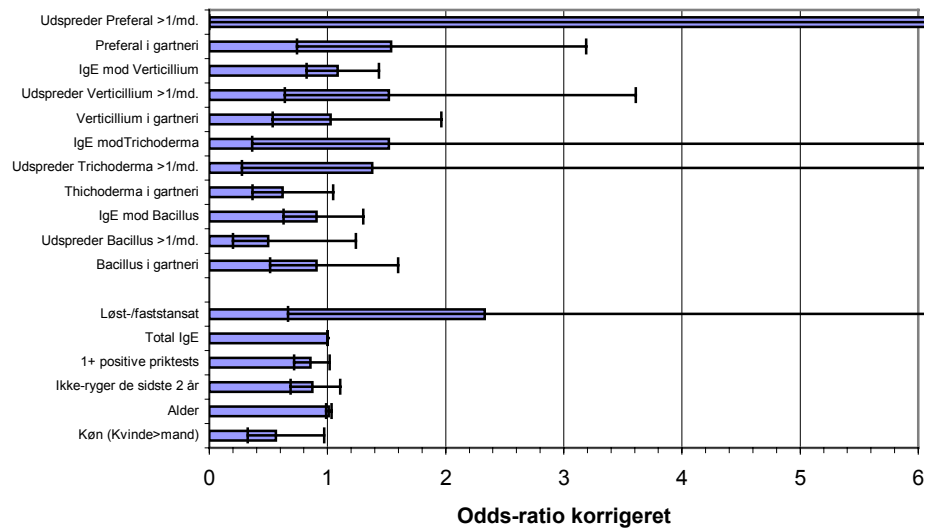
1 Frekvenser af symptomer og odds-ratioer over for baggrundsvARIABLE, tværsnit

Figurerne viser for hvert symptom odds-ratioer (OR) for hver enkelt baggrundsvARIABLE i en logistisk regression hvor alle variabler er inde i modellen (korrigerede OR). Endvidere vises med de tynde bjælker 95% konfidensintervaller for OR

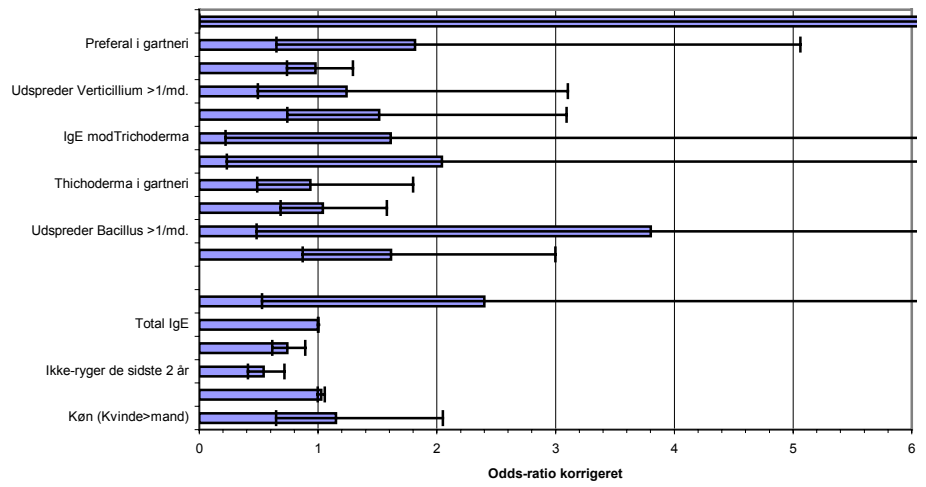
Hoste uden forkølelse



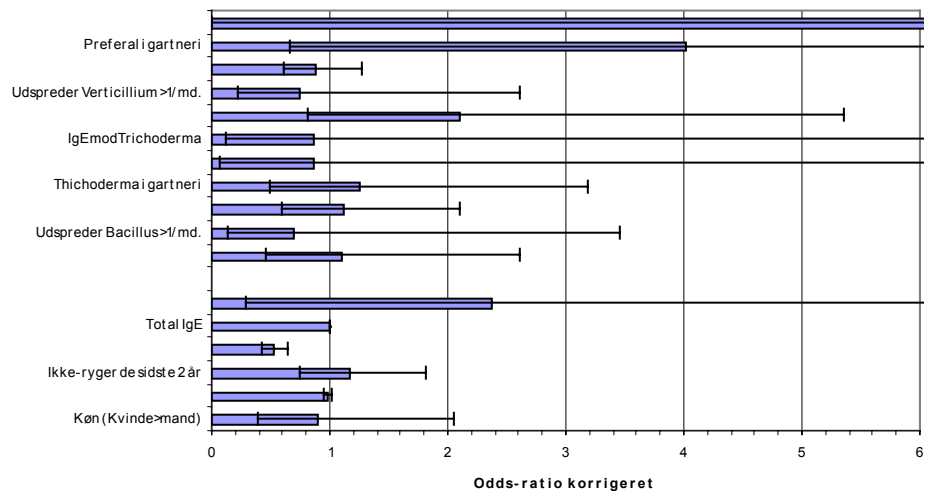
Trykken for brystet



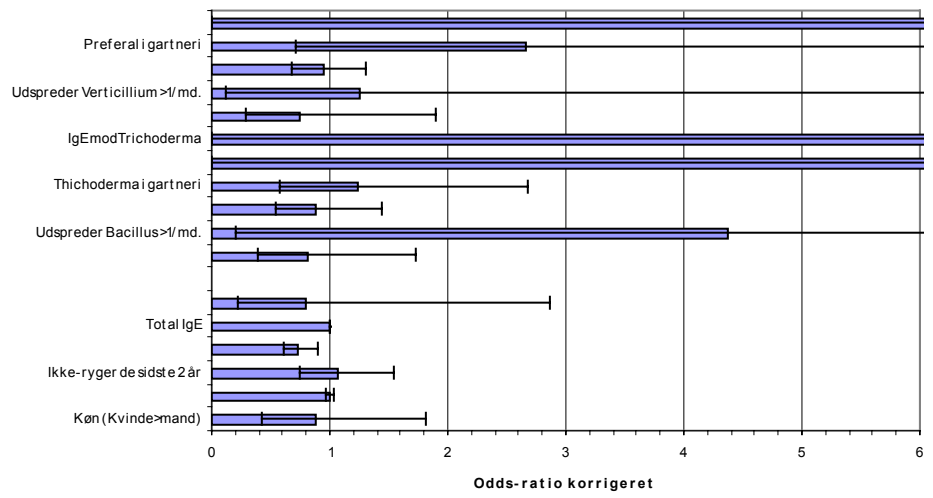
Anfald af vejtrækningsbesvær



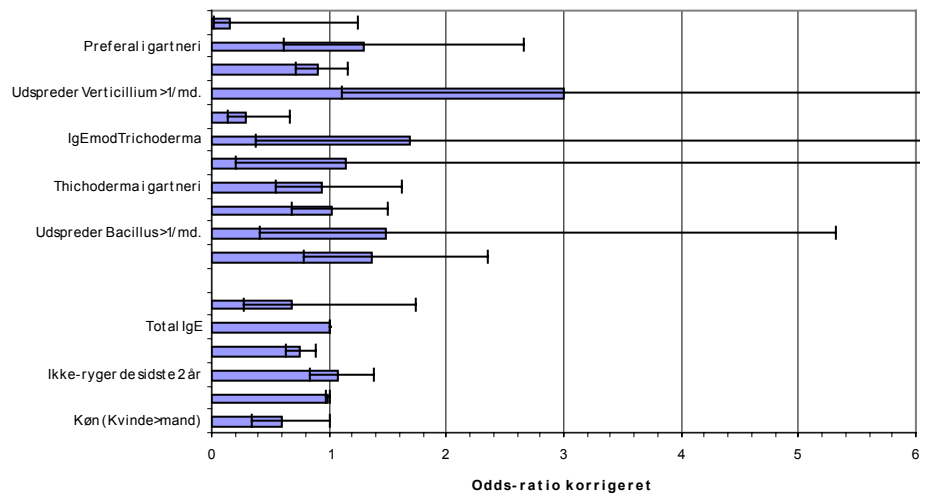
Astma de sidste 3 måneder



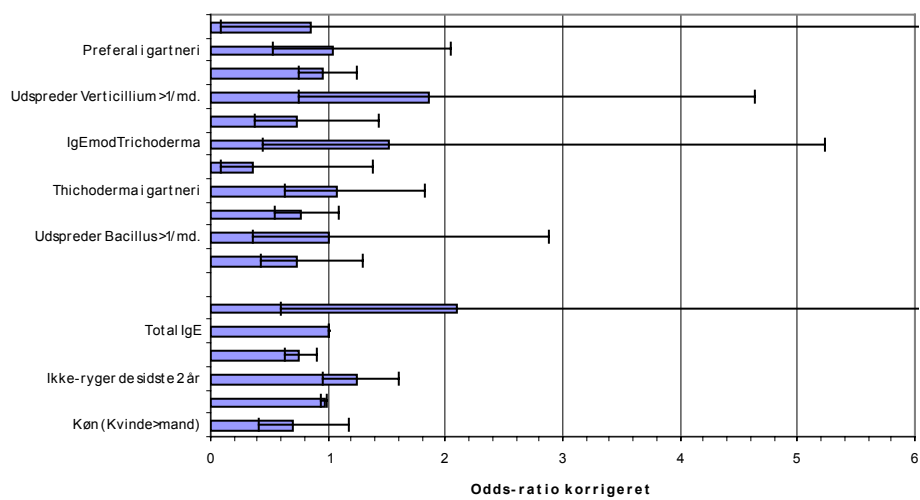
Altid forkølet



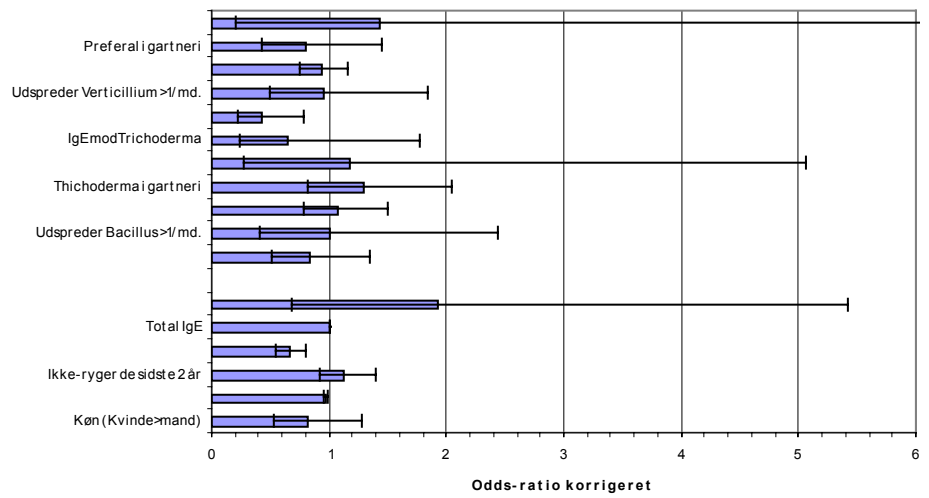
Kløe og svie i næsen



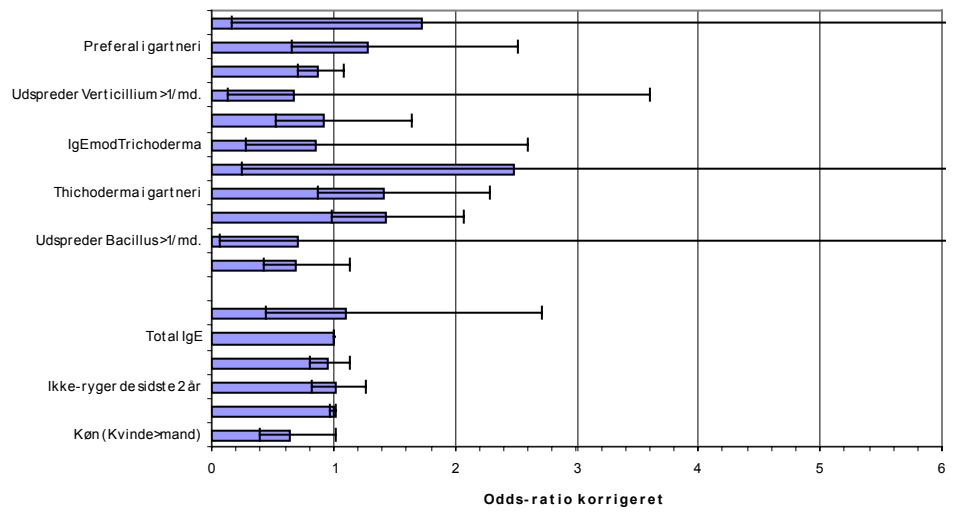
Vandigt flåd fra næsen



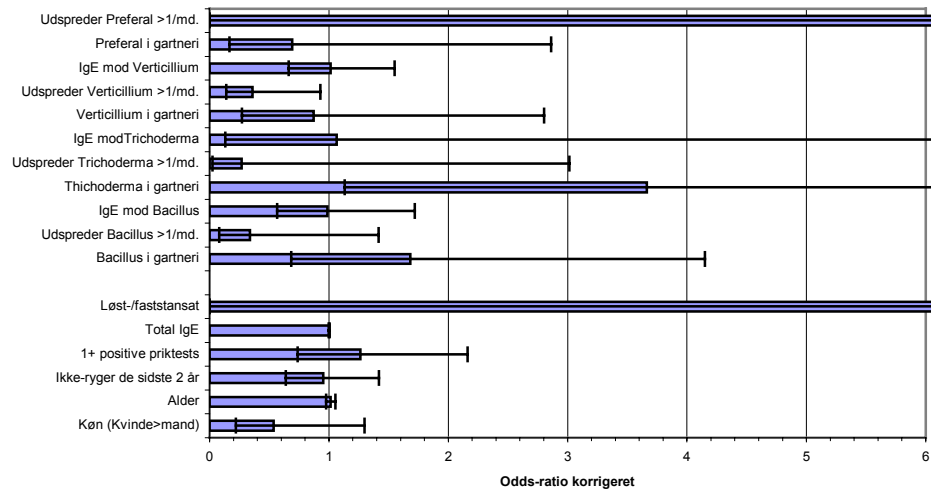
Kløe og svie i øjenene



Hududslet

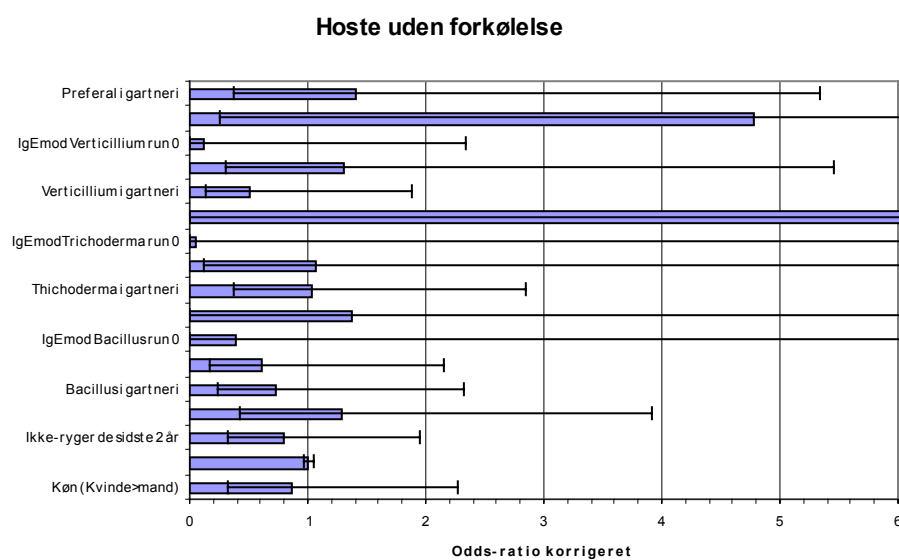


Anfald af kulderystelser m.m.

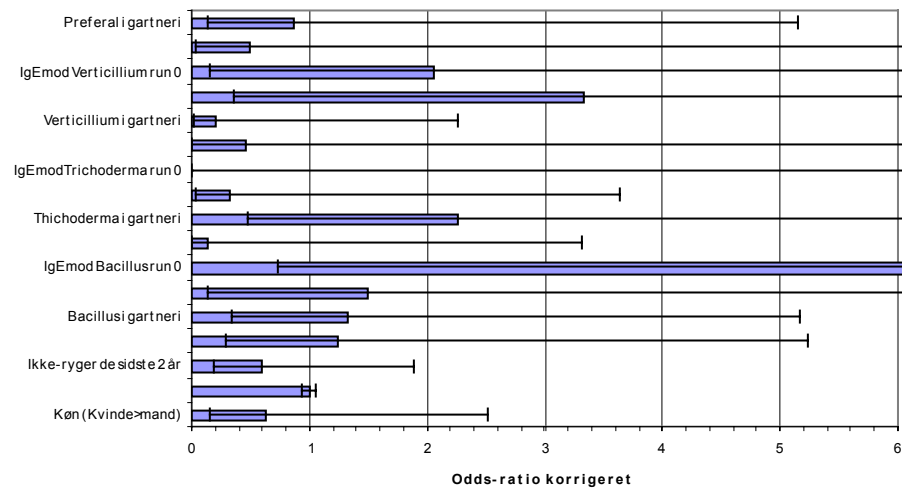


1 Odds-ratioer for symptomer over for baggrundsvariable, follow-up

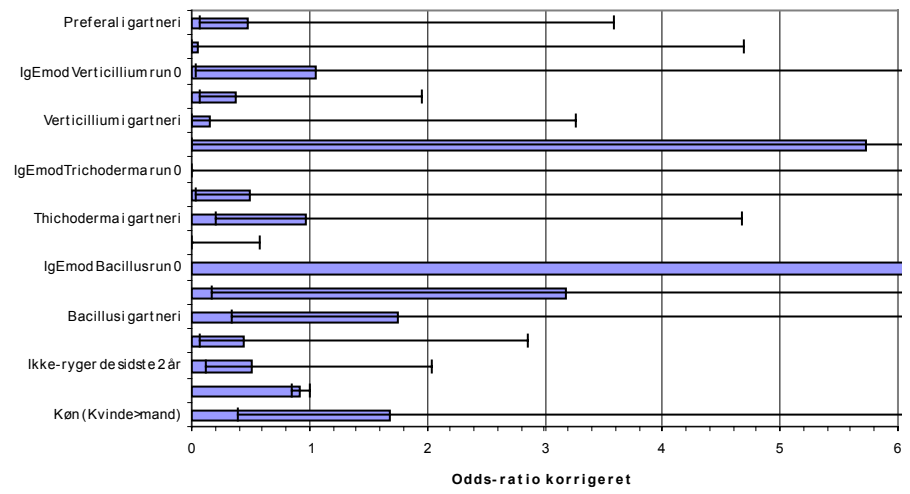
Figurerne viser for hvert symptom odds-ratio (OR) for hver baggrundsvariabel. Desuden vises 95% konfidensintervallerne med de tynde bjælker.



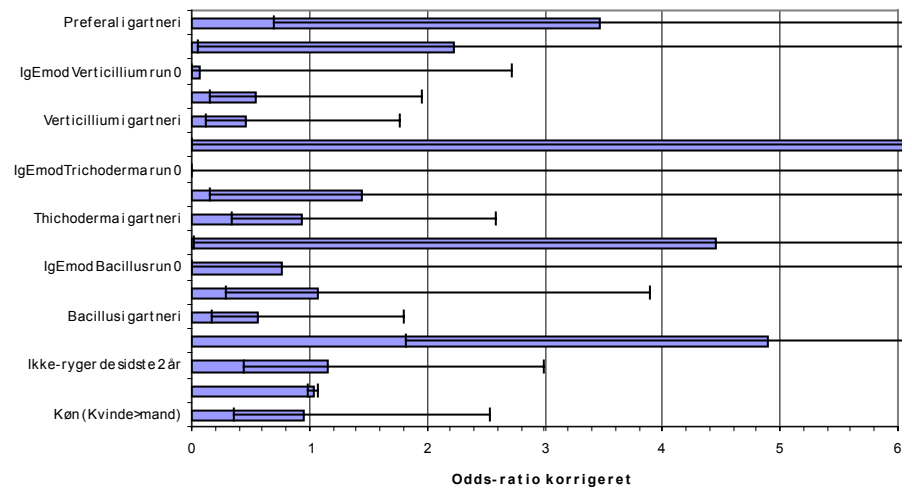
Trykken for brystet



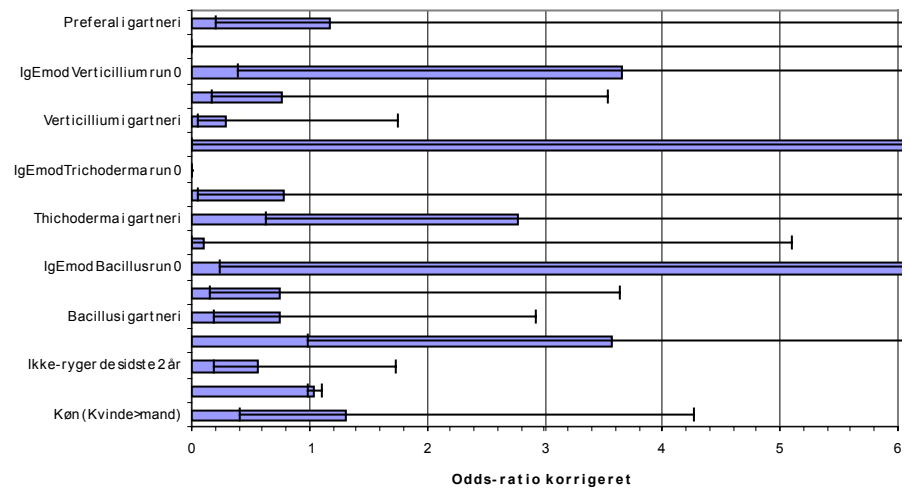
Vejrtrækningsbesvær



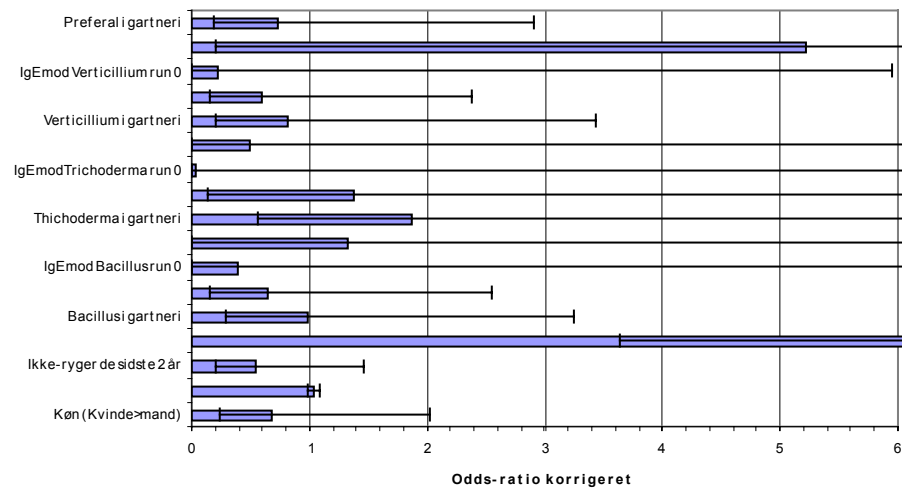
Altid forkølet



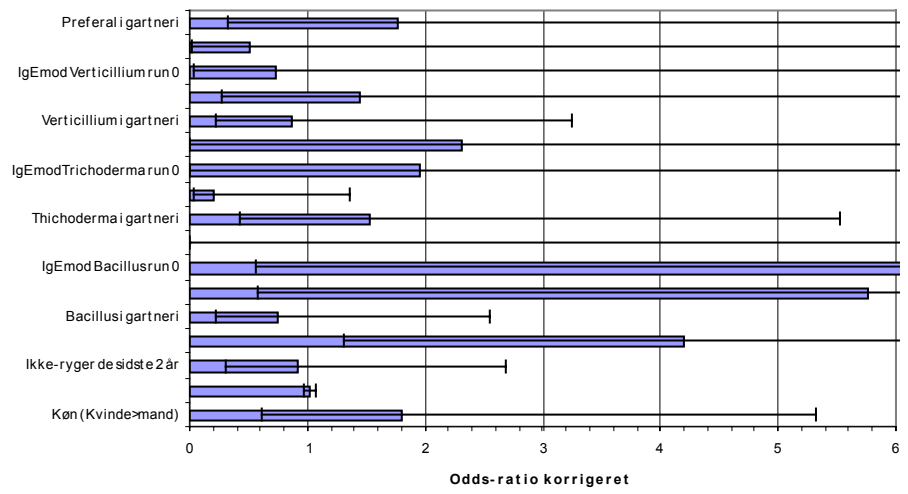
Kløe og svie i næsen



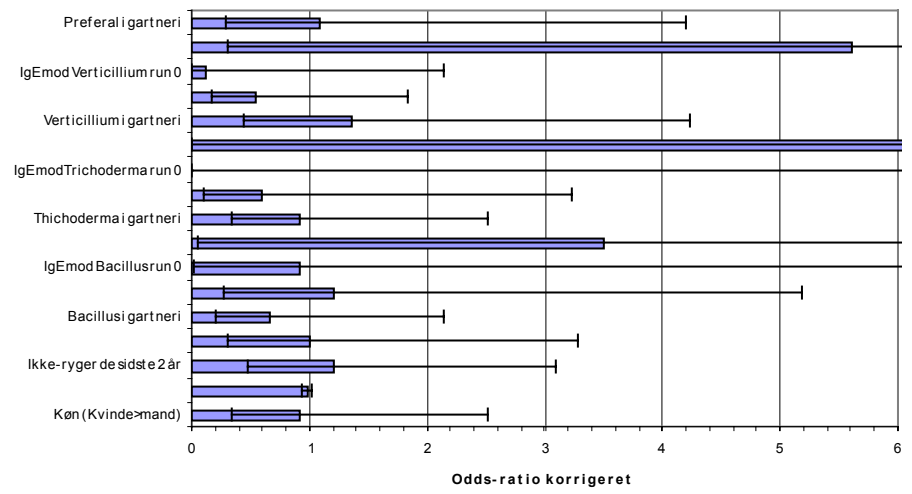
Vandig flåd fra næsen



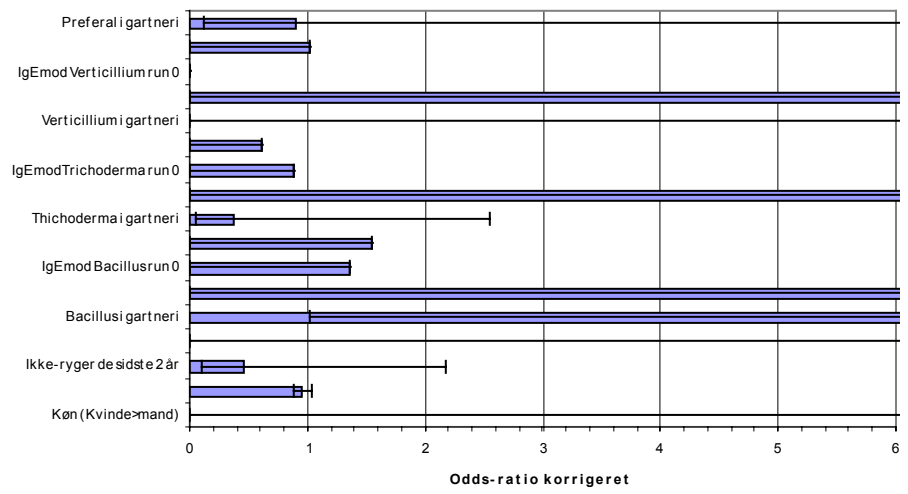
Kløe og svien i øjnene



Hududslet

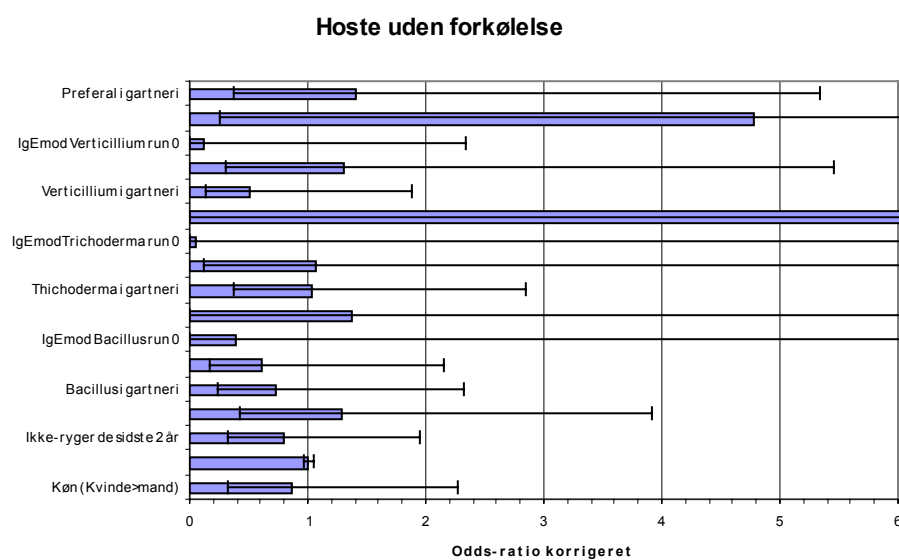


Anfald af kulderystelser m.m.

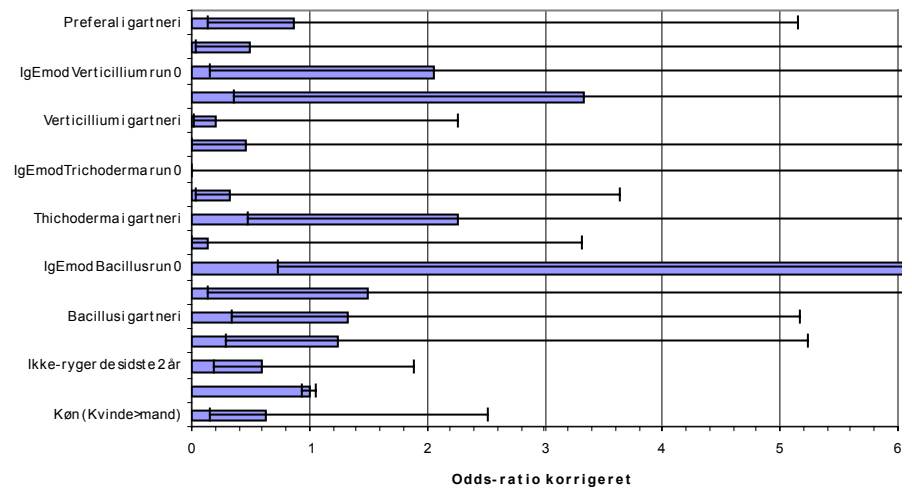


1 Odds-ratioer for symptomer over for baggrundsvARIABLE, follow-up

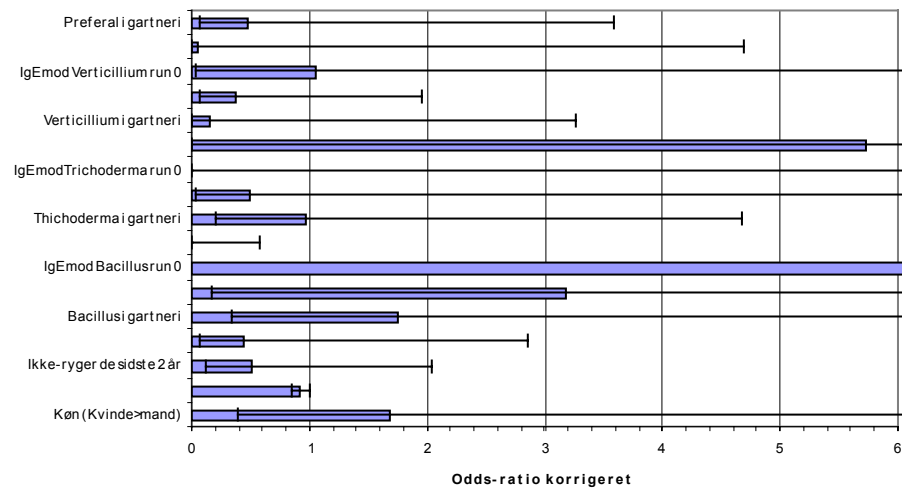
Figurerne viser for hvert symptom odds-ratio (OR) for hver baggrundsvARIABLE. Desuden vises 95% konfidensintervallerne med de tynde bjælker.



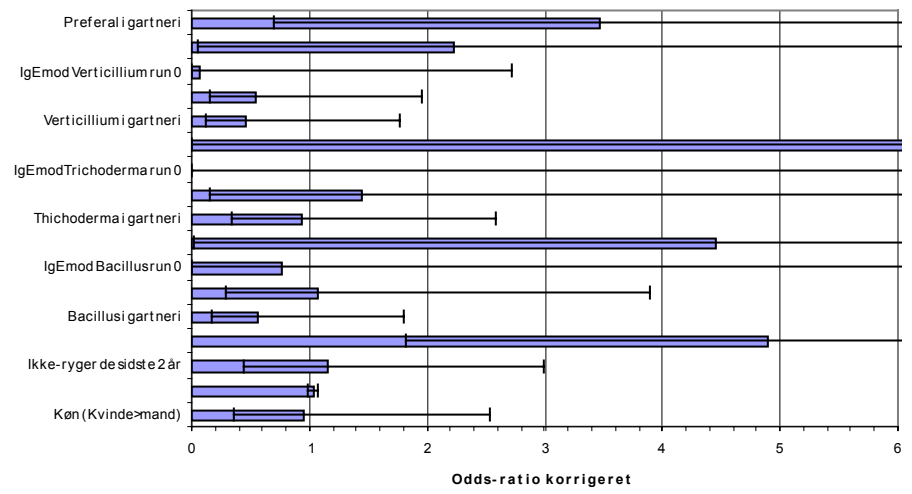
Trykken for brystet



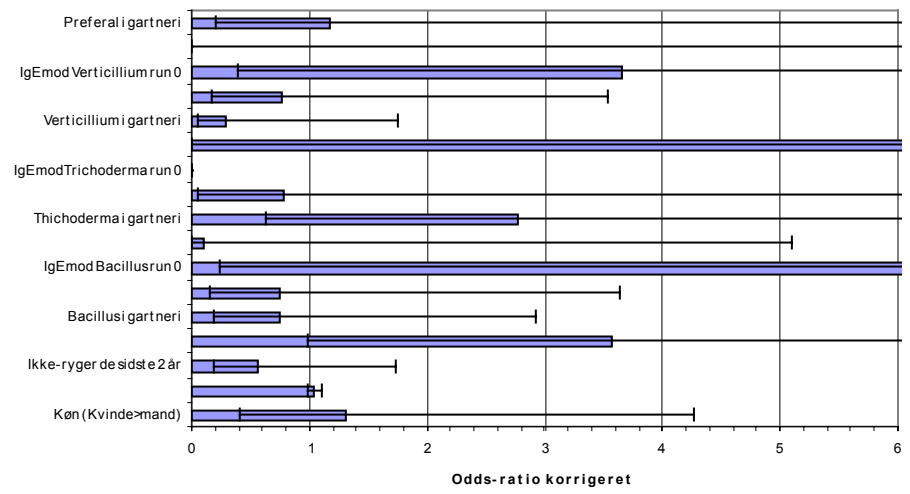
Vejrtrækningsbesvær



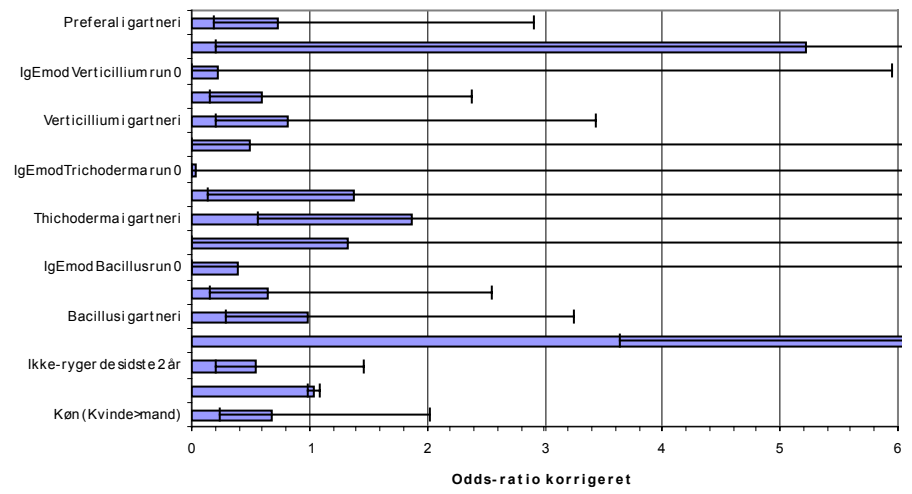
Altid forkølet



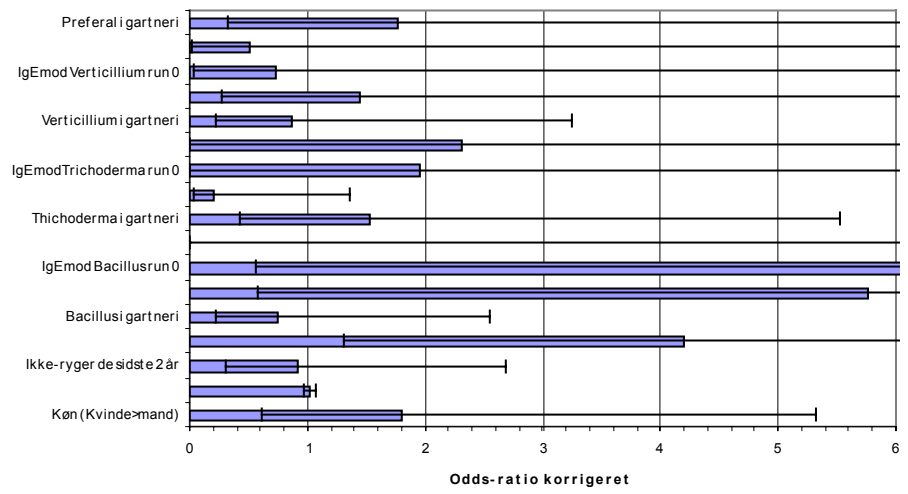
Kløe og svie i næsen



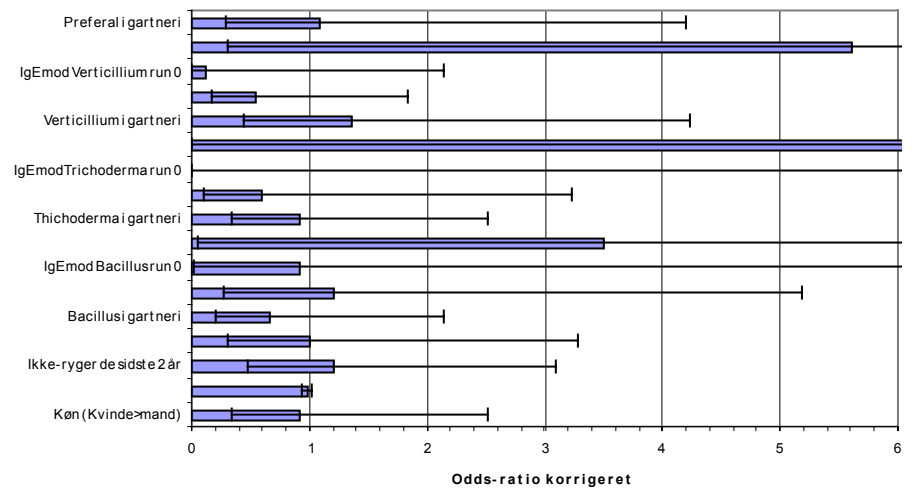
Vandig flåd fra næsen



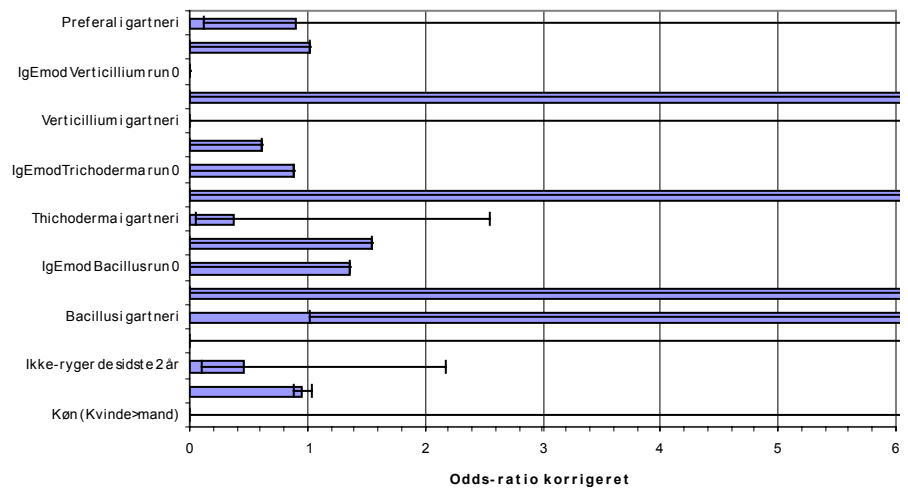
Kløe og svien i øjnene



Hududslet



Anfald af kulderystelser m.m.



Lineære regressionskoefficienter for lungefunktionsmålinger for tværsnit og follow-up

Tabellerne viser de lineære koefficienter ved linear regressionsanalyse for de tre lungefunktionsmål, dels i tværsnitsdata og dels i follow fra run 0 til run 1.

1.1 Tabeller over lungefunktionsmål tværsnit

FVC	Ikke standardiserede koefficienter		Standardiserede koefficient		Signifikans	95% konfidensinterval	
	B	Std. Error	Beta				
(Constant)	18,837	39,181	0	0,481	0,631		
Sprøjt selv b.t. >1 gang/md.	8,303	3,963	0,128	2,095	0,037	0,53552	16,0704
Sprøjt selv t.h. >1 gang/md.	-5,714	6,038	-0,057	-0,946	0,345	17,54848	6,12048
SPRØJT SELV V.I. >1 GANG/MD.	-4,891	3,619	-0,081	-1,352	0,178	11,98424	2,20224
Antal positive standardprik	0,552	1,049	0,03	0,526	0,599	-1,50404	2,60804
HEIGHT	-0,11	0,198	-0,046	-0,557	0,578	-0,49808	0,27808
Rygerstatus inden for 2 år	-4,663	2,523	-0,107	-1,848	0,066	-9,60808	0,28208
SEX	1,686	3,607	0,038	0,467	0,641	-5,38372	8,75572
ALDER	-0,02514	0,116	-0,013	-0,217	0,828	-0,2525	0,20222
I gartneri Bacillus	-5,28	3,002	-0,115	-1,759	0,08	-11,16392	0,60392
I gartneri Trichod	4,73	2,753	0,11	1,718	0,087	-0,66588	10,12588
I gartneri verticillium	-2,361	3,083	-0,046	-0,766	0,444	-8,40368	3,68168
I gartneri peacilomyces	1,149	3,698	0,02	0,311	0,756	6,09908	8,39708

FEV1	Ikke standardiserede koefficienter		Standardiserede koefficient		Signifikans	95% konfidensinterval	
	B	Std. Error	Beta				
(Constant)	30,183	39,417	0	0,766	0,444		
SPRØJT SELV B.T. >1 GANG/MD.	-2,402	3,986	-0,037	-0,603	0,547	-10,21	5,410
SPRØJT SELV T.H. >1 GANG/MD.	-2,022	6,075	-0,02	-0,333	0,739	-13,929	9,885
SPRØJT SELV V.L. >1 GANG/MD.	-2,907	3,64	-0,049	-0,799	0,425	-10,041	4,227
Antal positive standardprik	1,249	1,055	0,069	1,184	0,237	-0,818	3,316
HEIGHT	-0,155	0,199	-0,065	-0,778	0,437	-0,545	0,235
Rygerstatus inden for 2 år	-4,729	2,546	-0,109	-1,858	0,064	-9,71916	0,261
SEX	-1,038	3,631	-0,024	-0,286	0,775	-8,15476	6,078
ALDER	-0,08037	0,117	-0,042	-0,687	0,493	-0,30969	0,14895
I gartneri Bacillus	-1,526	3,028	-0,033	-0,504	0,615	-7,46088	4,4088
I gartneri Trichod	-0,334	2,767	-0,008	-0,121	0,904	-5,75732	5,089
I gartneri verticillium	3,694	3,114	0,071	1,186	0,236	-2,40944	9,797
I gartneri paecilomyces	-1,091	3,719	-0,019	-0,293	0,77	-8,38024	6,19824

FEV1/FVC	Ikke standardiserede koefficienter		Standardiserede koefficient		Signifikans	95% konfidensinterval	
	B	Std. Error	Beta				
(Constant)	6,678	7,616		0,877	0,381		
SPRØJT SELV B.T. >1 GANG/MD.	-2,584	0,771	-0,203	-3,354	0,001	-4,09516	-1,07284
SPRØJT SELV T.H. >1 GANG/MD.	0,8	1,174	0,04	0,682	0,496	-1,50104	3,10104
SPRØJT SELV V.L. >1 GANG/MD.	0,112	0,703	0,009	0,159	0,874	-1,26588	1,48988
Antal positive standardprik	0,25	0,204	0,07	1,227	0,221	-0,14984	0,64984
HEIGHT	-3,55E-02	0,039	-0,075	-0,921	0,358	-0,11189	0,04099
Rygerstatus inden for 2 år	6,13E-02	0,493	0,007	0,124	0,901	-0,90495	1,02761
SEX	-0,858	0,702	-0,099	-1,222	0,223	-2,23392	0,51792
ALDER	-2,33E-02	0,023	-0,061	-1,028	0,305	-0,06834	0,02182
I gartneri Bacillus	1,092	0,586	0,12	1,863	0,063	-0,05656	2,24056
I gartneri Trichod	-1,091	0,535	-0,129	-2,038	0,042	-2,1396	-0,0424
I gartneri verticillium	1,304	0,602	0,127	2,166	0,031	0,12408	2,48392
I gartneri paecilomyces	-0,667	0,719	-0,058	-0,929	0,354	-2,07624	0,74224

1.2 Follow-up

FVC	Ikke standardiserede koefficienter		Standardiserede koefficienter		Signifikans	95% konfidensinterval	
	B	Std. Error	Beta				
(Constant)	18,837	39,181		0,481	0,631		
SPRØJT SELV B.T. >1 GANG/MD.	8,303	3,963	0,128	2,095	0,037	0,53552	16,070
SPRØJT SELV T.H. >1 GANG/MD.	-5,714	6,038	-0,057	-0,946	0,345	-17,54848	6,12048
SPRØJT SELV V.L. >1 GANG/MD.	-4,891	3,619	-0,081	-1,352	0,178	-11,98424	2,20224
Antal positive standardprik	0,552	1,049	0,03	0,526	0,599	-1,50404	2,60804
HEIGHT	-0,11	0,198	-0,046	-0,557	0,578	-0,49808	0,27808
Rygerstatus inden for 2 år	-4,663	2,523	-0,107	-1,848	0,066	-9,60808	0,28208
SEX	1,686	3,607	0,038	0,467	0,641	-5,38372	8,75572
ALDER	-0,02514	0,116	-0,013	-0,217	0,828	-0,2525	0,20222
I gartneri Bacillus	-5,28	3,002	-0,115	-1,759	0,08	-11,16392	0,60392
I gartneri Trichod	4,73	2,753	0,11	1,718	0,087	-0,66588	10,12588
I gartneri verticillium	-2,361	3,083	-0,046	-0,766	0,444	-8,40368	3,68168
I gartneri paecilomyces	1,149	3,698	0,02	0,311	0,756	-6,09908	8,39708

FEV1	Ikke standardiserede koefficienter		Standardiserede koefficienter		Signifikans	95% konfidensinterval	
	B	Std. Error	Beta				
(Constant)	30,183	39,417		0,766	0,444		
SPRØJT SELV B.T. >1 GANG/MD.	-2,402	3,986	-0,037	-0,603	0,547	-10,21	5,41056
SPRØJT SELV T.H. >1 GANG/MD.	-2,022	6,075	-0,02	-0,333	0,739	-13,92	9,885
SPRØJT SELV V.L. >1 GANG/MD.	-2,907	3,64	-0,049	-0,799	0,425	-10,04	4,2274
Antal positive standardprik	1,249	1,055	0,069	1,184	0,237	-0,818	3,3168
HEIGHT	-0,155	0,199	-0,065	-0,778	0,437	-0,545	0,23504
Rygerstatus inden for 2 år	-4,729	2,546	-0,109	-1,858	0,064	-9,71	0,26116
SEX	-1,038	3,631	-0,024	-0,286	0,775	-8,154	6,07876
ALDER	-0,08037	0,117	-0,042	-0,687	0,493	-0,309	0,14895
I gartneri Bacillus	-1,526	3,028	-0,033	-0,504	0,615	-7,460	4,40888
I gartneri Trichod	-0,334	2,767	-0,008	-0,121	0,904	-5,757	5,08932
I gartneri verticillium	3,694	3,114	0,071	1,186	0,236	-2,409	9,79744
I gartneri run 1 paecilomyces	-1,091	3,719	-0,019	-0,293	0,77	-8,380	6,19824

FEV1/FVC	Ikke standardiserede koefficienter		Standardise-rede koefficienter	t	Signifikans	95% konfidensinterval	
	B	Std. Error	Beta				
(Constant)	6,678	7,616		0,877	0,381		
SPRØJT SELV B.T. >1 GANG/MD.	-2,584	0,771	-0,203	-3,354	0,001	-4,09516	-1,07284
SPRØJT SELV T.H. >1 GANG/MD.	0,8	1,174	0,04	0,682	0,496	-1,50104	3,10104
SPRØJT SELV V.L. >1 GANG/MD.	0,112	0,703	0,009	0,159	0,874	-1,26588	1,48988
Antal positive standardprik	0,25	0,204	0,07	1,227	0,221	-0,14984	0,64984
HEIGHT	-0,03545	0,039	-0,075	-0,921	0,358	-0,11189	0,04099
Rygerstatus inden for 2 år	0,06133	0,493	0,007	0,124	0,901	-0,90495	1,02761
SEX	-0,858	0,702	-0,099	-1,222	0,223	-2,23392	0,51792
ALDER	-0,02326	0,023	-0,061	-1,028	0,305	-0,06834	0,02182
I gartneri Bacillus	1,092	0,586	0,12	1,863	0,063	-0,05656	2,24056
I gartneri Trichod	-1,091	0,535	-0,129	-2,038	0,042	-2,1396	-0,0424
I gartneri verticillium	1,304	0,602	0,127	2,166	0,031	0,12408	2,48392
I gartneri paecilomyces	-0,667	0,719	-0,058	-0,929	0,354	-2,07624	0,7422