

Bacillus thuringiensis og
fødevareforgiftninger

Niels Bohse Hendriksen og Bjarne Munk Hansen
Danmarks Miljøundersøgelser
Aarhus Universitet

Katharina E. Olsen
Statens Seruminstitut

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

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

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

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING	7
SUMMARY	11
1 INDLEDNING	15
1.1 BAGGRUND	15
1.2 FORMÅL	17
2 MATERIALER OG METODER	19
2.1 NORMAL MATERIALE FRA RASKE DANSKERE	19
2.2 PATIENT PRØVER.	19
2.3 METODER:	19
3 RESULTATER	21
3.1 NORMALMATERIALE.	21
3.2 PATIENT PRØVER	23
4 DISKUSSION	27
4.1 NORMALMATERIALE.	27
4.2 PATIENT-PRØVER	28
5 PERSPEKTIVERING	31
LITTERATUR:	33

Forord

I denne rapport beskrives resultaterne af projektet ” *Bacillus thuringiensis* og fødevareforgiftninger”, som er gennemført i løbet af 2005 og 2006.

Projektleder var Seniorforsker Niels-Bohse Hendriksen, Danmarks Miljøundersøgelser afdeling for Miljøkemi og Mikrobiologi. Herudover deltog følgende i projektet: seniorforsker Bjarne Munk Hansen, Danmarks Miljøundersøgelser, samt afdelingsleder Katharina E. Olsen, Statens Serum Institut. Data brugt i projektet er indsamlet løbende siden 2002 Statens Serum Institut.

Projektet er gennemført som et samarbejde mellem Danmarks Miljøundersøgelser og Statens Serum Institut, og projektet er blevet iværksat og finansieret af Miljøstyrelsen.

Til projektet har der været knyttet en følgegruppe, som takkes for gode råd og stor interesse under projektet og i forbindelse med dets rapportering. Følgegruppen bestod af: Professor Jørgen Eilenberg, Institut for økologi, Københavns Universitet; Seniorforsker Hanne Rosenquist, Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet; Teknisk direktør Ejvind Rubæk, Cillus A/S; Embedslæge Anne Hempel-Jørgensen, Sundhedsstyrelsen, Embedslægeinstitutionen Midtjylland; Dyrlæge Linda Bagge, By- og Landskabsstyrelsen og Cand. agro. Anita Fjelsted, Miljøstyrelsen.

Sammenfatning

Bakterien *Bacillus thuringiensis* er den aktive mikroorganisme i mange plantebeskyttelsesmidler, som anvendes til bekæmpelse af insekter. Den indgår således i ca. halvdelen af de mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler der anvendes i Danmark og i omkring 90% af de der anvendes på verdensplan. Disse midler udgør såvel mængdemæssigt som økonomisk langt den største del af de mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler på verdensmarkedet.

B. thuringiensis er kendt som et insektpatogen, der er aktiv overfor forskellige typer af insekter. Under sporuleringen producerer bakterien specifikke δ -endotoksiner, som er toksiske overfor insektlarver. De specifikke toksiner anses for at være uskadelige overfor mennesker. Bortset fra de insekttoksiske egenskaber er *B. thuringiensis* ikke til at skelne fra *B. cereus*. *B. cereus* er kendt for at kunne forårsage levnedsmiddelforgiftninger hos mennesker, i form af såvel opkastninger som diarreer. Diareerne skyldes *B. cereus* evne til at producere en række forskellige enterotoksiner, hæmolysiner og enzymer under deres vegetative vækst i tarmen. Generne for disse toksiner og enzymer er kendt og det har derfor været muligt at undersøge hvorvidt stammer af *B. thuringiensis* er i besiddelse af disse gener ved hjælp af PCR og andre former for genetisk analyse. Sådanne genetiske analyser har vist, at en lang række stammer af *B. thuringiensis* har egenskaber, som potentielt kan medføre levnedsmiddelforgiftninger. Det er også blevet vist, at disse egenskaber kan udtrykkes af disse stammer under optimale vækstbetingelser i laboratoriet. Blandt de *B. thuringiensis* stammer, som har potentielt sygdomsfremkaldende egenskaber, er der stammer, som indgår i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler. Sådanne midler anvendes i Danmark og i store dele af verden. Men uanset, at anvendelsen af *B. thuringiensis* har været udbredt i snart mange år, så har den kun været sat i forbindelse med sygdom i ganske få tilfælde (dog aldrig i Danmark).

Det er imidlertid sådan, at hverken medicinsk praksis eller metoderne der anvendes til at detektere fødevarerpatogener skelner mellem *B. cereus* og *B. thuringiensis*, som den forårsagende agens, hverken i forbindelse med fødevarerkontamineringer eller i forbindelse med fødevarerforgiftninger (gastroenteritis). Derfor er det ukendt hvorvidt *B. thuringiensis* nogen sinde har været involveret i fødevarerforgiftninger, som er blevet tilskrevet *B. cereus*, og i så fald i hvilket omfang.

Det var projektets formål:

- At udvikle og indkøre metoder til at kvantificere forekomsten af *B. cereus* og *B. thuringiensis* i fæces fra mennesker, specielt med henblik på *B. thuringiensis* stammer, som anvendes i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler
- At estimere forekomsten af *B. cereus* og *B. thuringiensis* i fæces hos raske individer; herunder den eventuelle forekomst af *B. thuringiensis* stammer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler
- Med udgangspunkt i en pilot-undersøgelse at vurdere, om det ud fra et realistisk antal prøver fra patienter med gastroenteritis vil være muligt at identificere mindst 100 fæces prøver med stor forekomst af

B. cereus gruppe bakterier. (Ønsket om at finde mindst 100 prøver med forekomst af **B. cereus** gruppe bakterier skyldes, at **B. thuringiensis** kun udgør nogle få procent af de **B. cereus** gruppe bakterier der findes i miljø-prøver, og det derfor blev vurderet, at det var nødvendigt med mindst 100 prøver for at finde prøver med en stor forekomst af **B. thuringiensis**.)

Fæces prøver fra raske individer

Bakterier fra **B. cereus** gruppen blev fundet hos 4,8 % af personerne i det danske normalmateriale bestående af 420 prøver. I en femtedel af personernes fæcesprøver fra det danske normalmateriale, som er fundet positive for **B. cereus**, kunne der identificeres bakterier, som kunne henføres til **B. thuringiensis**. Dette svarer til fund af **B. thuringiensis** hos 0,95 % af personerne. Halvdelen af **B. thuringiensis** isolaterne har bipyramidale krystaller og besidder gener for Cry1 og Cry2, ligesom flere stammer, der indgår i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler. Ved RAPD analyse vises det, at der er fire forskellige typer af disse bakterier. Hos en af personerne er de fundne isolater identiske med **B. thuringiensis kurstaki** HD1 med hensyn til RAPD profil, men da de ikke i tillæg besidder et flagellin gen, som kan detekteres ved den anvendte PCR-analyse, kan de ikke henføres til denne stamme. Det er derimod sandsynligt, at de kan henføres til serotypen **B. thuringiensis aizawai**. Der markedsføres ikke plantebeskyttelsesmidler i Danmark, hvor aktiv-organismen er denne serotype, det gør der derimod i udlandet, så de kan stamme fra importerede fødevarer behandlet med sådanne midler. Men det kan ikke udelukkes at **B. thuringiensis** isolatet stammer fra fødevarer (f.eks. grøntsager) hvorpå der også naturligt findes **B. thuringiensis**.

Konklusioner:

- De anvendte metoder er blevet fundet anvendelige til at detektere **B. cereus** gruppe bakterier i fæces, til at differentiere mellem **B. cereus** og **B. thuringiensis** og til at karakterisere **B. thuringiensis** på stammes-niveau.
- **B. cereus** gruppe bakterier blev fundet hos 4,8 % af personerne i det danske normalmateriale
- **B. thuringiensis** blev fundet hos 0,95 % af personerne i materialet
- Der var ingen af **B. thuringiensis** isolaterne der kunne henføres til **B. thuringiensis kurstaki** HD1 og dermed med sikkerhed til et isolat fra et mikrobiologisk plantebekyttelsesmiddel.
- På baggrund af arbejdet med det relative lille prøvemateriale der er anvendt i nærværende undersøgelse synes hverken **B. cereus** og **B. thuringiensis** at være arter der er særligt hyppigt forekommende i fæces hos almindelige raske danskere, på trods af at vi ved at de fleste danskere eksponeres for de to arter via fødevarer.

Fæces prøver fra individer med gastroenteritis

B. cereus gruppe bakterier blev fundet i 10,2 % af 343 patient-prøver. Kun hos fire patienter oversteg antallet af **B. cereus** gruppe bakterier 1000 cfu/g. Isolater, som kunne identificeres som **B. thuringiensis**, blev fundet i 2,3 % af prøverne. Dette er ca. dobbelt så stor en forekomst som i normalmateriale, men da resultaterne ikke er direkte sammenlignelige, er det ikke muligt at afgøre, om dette er en virkelig forskel.

Alle **B. thuringiensis** isolaterne har bipyramidale krystaller og 12 af dem besidder gener for Cry1, Cry2 og flagellin. Fire af disse isolater fra fire patienter er identisk med RAPD-profilen for **B. thuringiensis** HD1, så det er

meget sandsynligt, at disse isolater stammer fra et mikrobiologisk plantebeskyttelsesmiddel baseret på *B. thuringiensis* HD1. De øvrige isolater, som producerer bipyramidale krystaller, har også mange ligheder med stammer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler, men det er ikke muligt med vores nuværende kendskab til isolaterne at afgøre, hvorvidt de stammer fra plantebeskyttelsesmidler eller ej.

B. thuringiensis er blevet identificeret i tarmmateriale fra 8 personer. Det er ikke muligt ud fra dette materiale at afgøre, hvorvidt *B. thuringiensis* har været involveret i tilfælde af gastroenteritis, men det vurderes, at det ikke er særligt sandsynligt, da bakterierne er fundet i lave koncentrationer som sporer. Det er mest sandsynligt, at disse personer enten har spist fødevarer med udsprøjtede sporer og som stadig fandtes på fødevarer ved indtagelse eller at de har spist fødevarer (fx grøntsager) hvorpå *B. thuringiensis* forekommer naturligt. Isolater identiske med *B. thuringiensis kurstaki* HD1 er tidligere blevet identificeret på tomater, agurker, peberfrugter og forskellige typer af kål indkøbt til konsum.

Konklusioner:

- *B. cereus* gruppe bakterier blev fundet hos 10,2 % af prøverne fra personer med gastroenteritis
- *B. thuringiensis* blev fundet hos 2,3 % af prøverne fra personer med gastroenteritis
- Fire isolater fra i alt fire personer kunne henføres til *B. thuringiensis kurstaki* HD1 og stammer dermed med stor sandsynlighed fra et mikrobiologisk plantebeskyttelsesmiddel.
- Det må med udgangspunkt i den gennemførte undersøgelse konkluderes, at der ikke, som beskrevet i projektets formål, vil være muligt, ud fra et realistisk antal prøver fra patienter med gastroenteritis, at identificere mindst 100 fæces prøver med et højt niveau af *B. cereus* gruppe bakterier, idet det vil kræve i størrelsesordenen 10.000 prøver.

Miljøstyrelsens vurdering

Ud fra undersøgelsen af det relativt beskedne antal fæcesprøver, der indgår i dette studie, kan det konkluderes, at det ikke synes at være sandsynligt, at *B. cereus* og *B. thuringiensis* forekommer i særligt stort antal i fæces hos raske danskere. Miljøstyrelsen vurderer endvidere, at man på baggrund af projektresultaterne må antage, at *B. thuringiensis* kun sjældent findes i fæces hos patienter med gastroenteritis, og at organismen i de få tilfælde næppe har været årsagen til sygdommen. Men idet fæcesprøverne formentlig er indleveret til patienternes læge adskillige dage efter symptomerne er påbegyndt, er det dog stadig vanskeligt helt at udelukke muligheden for at *B. thuringiensis* har været årsag til gastroenteritis hos nogle enkelte patienter.

Miljøstyrelsen vurderer, at der ud fra nærværende undersøgelse ikke er nogen grund til at antage, at brugen af mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler baseret på *B. thuringiensis* har medført gastroenteritis hos danskere.

Summary

The bacterium *Bacillus thuringiensis* is the active microorganism in a number of plant protection products, which are used for the control of insects. It is the active ingredient in about half of the microbial plant protection products which are used in Denmark and constitutes about 90% of the use of microbial plant protection products on the world market.

B. thuringiensis is known as an insectpathogenic organism with activity against a number of insect orders. During the sporulation the bacterium produces specific δ -endotoxins, which are toxic for insect larvae. The specific toxins are not expected to be toxic for humans. Except for these insect toxic properties it is hard to distinguish *B. thuringiensis* from *B. cereus*. *B. cereus* is known as a food born pathogen for humans, who can cause diarrhoea and emesis. Diarrhoea is caused due to a number of different enterotoxins, hemolysins and enzymes produced by *B. cereus* during vegetative growth in the intestine. The genes coding for these products are known, and therefore it has been possible to examine, whether strains of *B. thuringiensis* possess these genes by PCR-based techniques and other kinds of molecular techniques. These techniques have shown that a number of *B. thuringiensis* strains have characteristics which make them potential food borne pathogens. It has also been shown that these strains at optimal growth conditions can express these characteristics in the laboratory. Among these *B. thuringiensis* strains, which possess these potential pathogenetic properties, are strains, which are the active ingredient in microbial pest control agents. However, *B. thuringiensis* strains seem only to have been involved in disease in a very few cases.

However, neither the practice of physicians nor the methods used for detection of food borne pathogens distinguish between *B. cereus* and *B. thuringiensis* as the causative agent. It is therefore unknown whether and to what extent *B. thuringiensis* has been involved in food borne pathogenesis, which has been ascribed to *B. cereus*.

The objectives of this project are to:

- To develop and use methods for the quantification of *B. cereus* and *B. thuringiensis* in faeces from humans, with special attention to *B. thuringiensis* strains used in microbial pest control agents.
- To estimate the occurrence of *B. cereus* and *B. thuringiensis* in faeces from healthy individuals, including the possible occurrence of *B. thuringiensis* strains from microbial pest control agents
- Further it should be evaluated whether it is possible to identify at least 100 samples of faeces with a high number of *B. cereus* group bacteria from people with gastroenteritis among a realistic number of samples. The basis for the 100 samples is that the occurrence of *B. thuringiensis* in environmental samples is low, only a few percent of the total number of *B. cereus* group bacteria. Thus it was evaluated that 100 samples was a necessity to identify samples containing *B. thuringiensis* in high numbers.

For that purpose a standard collection of faeces from 420 healthy people was investigated. Bacteria from the *B. cereus* group were found in 4.8% of the samples. Among one fifth of the persons being positive for *B. cereus* group

bacteria, one or more of the isolates could be identified as *B. thuringiensis* (0.95% of the persons). One half of these *B. thuringiensis* isolates has bipyramidal crystals and possesses the genes for *cry1* and *cry2*, as strains used as microbial plant protection products. By RAPD-PCR analysis it was shown that four types of these bacteria was isolated. In one person the isolates were identical with *B. thuringiensis kurstaki* HD1, a common strain in plant protection products, based on the RAPD profile, but as the strain do not possess a flagellin gene, which can be detected by the used PCR-method, these strains are not identical with *B. thuringiensis kurstaki* HD1. However, it is likely that these isolates are identical with a strain from the serotype *B. thuringiensis aizawai*. In Denmark there are no products on the market based on this serotype, but products are in use in other countries.

Conclusions:

- The methods used were found useful for the detection of *B. cereus* group bacteria in faeces, to differentiate between *B. cereus* and *B. thuringiensis* and for the characterization of *B. thuringiensis* at the level of strains.
- *B. cereus* group bacteria were found in 4.8% of the faeces samples from the persons in the Danish standard collection.
- *B. thuringiensis* was identified in 0.95% of the samples.
- No isolates could be connected unambiguously to *B. thuringiensis kurstaki* HD1, thus no isolates could be referred to a microbial plant protection product with certainty.
- On the basis of the relatively low numbers of samples used in this investigation, seems neither *B. cereus* nor *B. thuringiensis* to occur in faeces from healthy Danes with a high frequency, although most Danes are exposed for these two species of bacteria during the consumption of food, notable vegetables.

B. cereus group bacteria were found in 10.2% of the samples from patients with gastroenteritis. In four samples the number exceeded 1000 cfu/g, in all other samples the number was below this level.

Isolates, which could be identified as *B. thuringiensis*, were found in 2.3% of the samples. This occurrence was approximate twice the occurrence in the samples from healthy people, however the results are not direct comparable, so this might be a difference by chance.

All the *B. thuringiensis* isolates have bipyramidal crystals and 12 isolates possess genes for *cry1*, *cry2* and flagellin. Four of these isolates from four patients have a RAPD-profile, which are identical with the profile of *B. thuringiensis kurstaki* HD1, thus it is very likely, that these isolates derive from a microbial pest control agent. The other *B. thuringiensis* isolates have also several characteristics in common with strains used as microbial pest control agents, but they cannot be connected to a specific strain in use as microbial pest control agent.

B. thuringiensis was identified in faeces from eight persons with gastroenteritis, it is not possible to determine whether *B. thuringiensis* has been involved in the disease, but we found it not very likely, as the bacteria was found in low concentrations as spores.

It is most likely, that these persons have been eating food contaminated with *B. thuringiensis* as spores. These spores might have been sprayed on these food items as microbial plant protection products. Isolates identical with *B. thuringiensis kurstaki* HD1 have in earlier studies been identified on e.g. tomatoes, cucumbers and cabbage.

Conclusions:

- ***B. cereus*** group bacteria were found in 10.2% of the faeces samples from persons suffering from gastroenteritis.
- ***B. thuringiensis*** was found in 2.3% of the samples from persons suffering from gastroenteritis.
- Four isolates from four patients was identical with the strain ***B. thuringiensis kurstaki*** HD1 and it is therefore very likely that these isolates derive from a microbial pest control agent.
- It seems not to be possible with a manageable number of samples to identify 100 faeces samples containing a high number of ***B. cereus*** group bacteria. The demand will be around 10 000 samples.

Opinion from the Danish Environmental Protection Agency

Based on the relatively few samples included in this study, it can be concluded, that it is not likely that ***B. cereus*** or ***B. thuringiensis*** occurs in high number in the faeces of healthy Danish population. The Danish EPA believes that based on these results it should be anticipated that ***B. thuringiensis*** only seldom is found in faeces from patients with gastroenteritis, and that the organisms in these few cases hardly have been the cause of the disease. However, since the faeces samples probably have been provided to the doctors several days after the symptoms have started, it can still not be ruled out that ***B. thuringiensis*** has been the cause of gastroenteritis in a few patients. The Danish EPA assess, that based on the present study, there is not reason to assume that the use of microbial plant protection products based on ***B. thuringiensis*** has caused gastroenteritis in the Danish population.

1 Indledning

1.1 Baggrund

Bakterien *Bacillus thuringiensis* er den aktive mikroorganisme i mange plantebeskyttelsesmidler, som anvendes til bekæmpelse af insekter. Den indgår således i ca. halvdelen af de mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler der anvendes i Danmark og i omkring 90 % af de der anvendes på verdensplan. Disse midler udgør såvel mængdemæssigt som økonomisk langt den største del af de mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler på verdensmarkedet.

B. thuringiensis er kendt som et insektpatogen, der er aktiv overfor forskellige typer af insekter. Under sporuleringen producerer bakterien specifikke δ -endotoksiner, som er toksiske overfor insektlarver. De specifikke toksiner anses for at være uskadelige overfor mennesker (Glare og O'Callaghan, 2000). Bortset fra de insekt toksiske egenskaber er *B. thuringiensis* ikke til at skelne fra *B. cereus*. *B. cereus* er kendt for at kunne forårsage levnedsmiddelforgiftninger hos mennesker, i form af såvel opkastninger som diarreer. Diarreerne skyldes *B. cereus* evne til at producere en række forskellige enterotoksiner, hæmolysiner og enzymer under deres vegetative vækst i tarmen (Granum, 2001). Generne for disse produkter er kendt og det har derfor været muligt at undersøge hvorvidt stammer af *B. thuringiensis* er i besiddelse af disse gener ved hjælp af PCR og andre former for genetisk analyse. Sådanne genetiske analyser har vist, at en lang række stammer af *B. thuringiensis* har egenskaber, som potentielt kan medføre levnedsmiddelforgiftninger (Hansen og Hendriksen, 2001). Det er også blevet vist, at disse egenskaber kan udtrykkes af disse stammer under optimale vækstbetingelser i laboratoriet. Blandt de *B. thuringiensis* stammer, som har disse potentielt sygdomsfremkaldende egenskaber, er stammer, som indgår i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler, også midler som anvendes i Danmark (Damgaard, 1996; Wilcks et al., 2006). Men uanset, at anvendelsen af *B. thuringiensis* har været udbredt i snart mange år, så har den kun været sat i forbindelse med sygdom i nogle ganske få tilfælde og aldrig i Danmark.

Det er imidlertid sådan, at hverken medicinsk praksis eller metoderne der anvendes til at detektere fødevarerpatogener skelner mellem *B. cereus* og *B. thuringiensis*, som den forårsagende agens, hverken i forbindelse med fødevarerkontamineringer eller i forbindelse med fødevarerforgiftninger (gastroenteritis) (Granum, 1997; Shinagawa; 1990). Derfor er det ukendt hvorvidt og i hvilket omfang *B. thuringiensis* har været involveret i fødevarerforgiftninger, som er blevet tilskrevet *B. cereus*. Der eksisterer dog en beskrivelse af et udbrud af gastroenteritis, som involverede fire personer i USA, hvor *B. thuringiensis* sandsynligvis var involveret. I dette ene tilfælde blev bakterierne initielt identificeret som *B. cereus*, men senere som *B. thuringiensis* (Jackson, 1995). Nogle af de tilfælde af levnedsmiddelforgiftninger, der er tilskrevet *B. cereus*, kan således ikke udelukkes at være forårsaget af *B. thuringiensis*.

I Danmark er det ukendt, hvor mange fødevarerforgiftninger der skyldes *B. cereus*, og det er også ganske ukendt hvorvidt denne bakterie forekommer almindeligt i vores tarmkanal uden at forårsage sygdom. Når vi ikke kender antallet af fødevarerforgiftninger forårsaget af *B. cereus* skyldes det, dels at der som oftest er tale om lette forgiftninger af 1 til 2 døgn varighed, dels at der ikke foretages en systematisk overvågning af sygdomme forårsaget af denne bakterie. I flere af vores nabolande er det dog dokumenteret, at *B. cereus* (i denne forbindelse er der ikke blevet skelnet mellem *B. cereus*, *B. thuringiensis* og beslægtede arter indenfor gruppen, hvis der ses bort fra *B. anthracis*) er den bakterie som oftest er involveret i udbrud af gastroenteritis, og samtidig, at dens involvering er betydeligt underestimeret (Ehling-Schultz, 2004). I to undersøgelser har man undersøgt bakteriens forekomst hos ikke syge individer, og fundet den blandt 15-40 % af befolkningen i henholdsvis England og blandt børn i Sydafrika (Ghosh, 1978; Turnbull og Kramer, 1985). Det er ganske ukendt om denne almindelige forekomst af *B. cereus* blandt mennesker også gælder *B. thuringiensis*.

Adskillelse af isolater i *B. cereus* og *B. thuringiensis* kan ske ved hjælp af mikroskopi efter δ -endotoksin krystaller efter vækst på et sporuleringsmedie. Identifikationen af *B. thuringiensis* kan yderligere blive verificeret ved hjælp af PCR-teknikker rettet mod de plasmidbårne gener som koder for δ -endotoksiner.

Med hensyn til *B. thuringiensis* stammer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler så kan stammen *B. thuringiensis kurstaki* HD1 identificeres specifikt (Hendriksen og Hansen, 2006) ved hjælp af krystal-morfologi, PCR for specifikke δ -endotoksin- og flagel-gener og RAPD-PCR. Denne stamme indgår i flere plantebeskyttelsesmidler som finder anvendelse på grøntsager til konsum i såvel ind- som udland f.eks. Dipel, Biobit og Foray (Hansen et al., 1998). *B. thuringiensis kurstaki* HD1 kan potentielt set forårsage fødevarerforgiftninger, da den besidder de nødvendige egenskaber i form af gener for enterotoksiner og hæmolysiner (Hansen og Hendriksen, 2001). *B. thuringiensis kurstaki* HD1 er desuden blevet fundet på grøntsager til konsum i varierende mængder (Hendriksen og Hansen, 2006; Frederiksen et al., 2006)

Tarmbakteriologisk laboratorium, Afd. for Bakteriologi, Mykologi og Parasitologi på Statens Serum Institut (SSI) modtager ca. 70.000 fæces prøver årligt fra et optageområde som udgør ca. halvdelen af den danske befolkning. Der modtages prøver fra såvel praksislæger som hospitaler. Alle prøver bliver underkastet diagnostik for tarmpatogene bakterier som omfatter: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides* samt *Clostridium difficile* (kun hospitalsprøver). Ca. 75 % af prøverne underkastes diagnostik for diarrefremkaldende *E. coli* jf. klinikerens rekvisition. Fæcesprøverne diagnosticeres ikke rutinemæssigt for *B. cereus* men kun på særlig opfordring fra klinikerens, som har indsendt prøven.

Kun i ca. 10 % af samtlige indkomne prøver kan et bakterielt fund rapporteres. Denne procent sats kan imidlertid variere grundet sæsonvariation: således modtager Statens Serum Institut flere prøver i løbet af månederne juli-august-september samtidig med at forekomsten af tarmpatogene bakterier også stiger mærkbart i løbet af denne periode.

På samtlige fæcesprøver som indgår i nærværende undersøgelse vil man kunne indhente oplysninger om: køn, alder, bopæl (amt/kommune) samt

kliniske oplysninger (mistanke til mad indtaget/rejse/underliggende sygdom m.m.) i det omfang klinikeren har redegjort for dette på rekvisitionssedlen.

Siden 2002 har Tarmbakteriologisk lab., SSI i samarbejde med Dansk Zoonosecenter (DFVF) indsamlet fæcesprøver fra raske personer i DK. Disse fæcesprøver (ca. 400 stk.) diagnosticeres løbende for samtlige de ovennævnte organismer dog ikke for *B. cereus*. Et spørgeskema tilflyder alle personer som har indsendt fæcesprøve til SSI. Dette spørgeskema giver oplysninger om: køn, alder, bopæl (amt/kommune), rejseaktivitet, mave-tarmlidelser, underliggende sygdomme, indtagelse af medicin, hospitalsindlæggelse, indtag af levnedsmidler (kød, fjerkræ, fisk, æg og mælk) samt kontakt til dyr.

Mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler skal på lige fod med kemiske plantebeskyttelsesmidler godkendes af de nationale myndigheder i hvert enkelt EU land og skal i den forbindelse gennemgå en risikovurdering. Endvidere skal de aktive mikroorganismer, som indgår i midlerne, vurderes i EU regi. Danmark er ansvarlig for at udarbejde EU risikovurderingen af *B. thuringiensis kurstaki*. Denne vurdering finder sted i 2006-2007. Det var bl.a. som en forberedelse til denne vurderingsproces, at Miljøstyrelsen ønskede at iværksætte nærværende projekt. Miljøstyrelsen ønskede oplysninger om forekomsten af *B. cereus* og/eller *B. thuringiensis* i vores tarmsystem, der kunne belyse hvorvidt forekomsten var udbredt blandt raske danskere uden at dette øjensynligt forårsager diarré. Endvidere ønskede Miljøstyrelsen, at projektet kunne belyse sandsynligheden for hvorvidt de to organismer kan være årsagen til diarré hos danskere. Her var styrelsen især interesseret i hvorvidt *B. thuringiensis* stammer, der indgår i plantebeskyttelsesmidler, alternativt stammer der forekommer naturligt på overfladen af fødevarer f.eks. grøntsager, kunne være årsag til diarré.

1.2 Formål

Det er projektets formål:

- At udvikle og indkøre metoder til at kvantificere forekomsten af *B. cereus* og *B. thuringiensis* i fæces fra mennesker, specielt med henblik på *B. thuringiensis* stammer som anvendes i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler
- At estimere forekomsten af *B. cereus* og *B. thuringiensis* i fæces hos raske individer; herunder den eventuelle forekomst af *B. thuringiensis* stammer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler
- Med udgangspunkt i en pilot-undersøgelse at vurdere, om det ud fra et realistisk antal prøver fra patienter med gastroenteritis vil være muligt at identificere mindst 100 fæces prøver med stor forekomst af *B. cereus* gruppe bakterier. Ønsket om at finde mindst 100 prøver med forekomst af *B. cereus* gruppe bakterier, er betinget af, at *B. thuringiensis* kun udgør nogle få procent af de *B. cereus* gruppe bakterier der findes i miljø-prøver, og det derfor blev vurderet, at det var nødvendigt med mindst 100 prøver for at finde prøver med en stor forekomst af *B. thuringiensis*.

2 Materialer og metoder

2.1 Normal materiale fra raske danskere

Siden 2002 har Tarmbakteriologisk lab., SSI i samarbejde med Dansk Zoonosecenter (DFVF) indsamlet fæcesprøver fra raske personer i DK igennem flere år. Prøverne er opbevaret i et frysemedie (Oksebouillon med 10 % glycerol, SSI Diagnostica). Hele dette materiale er blevet undersøgt, dvs prøver fra 420 personer.

2.2 Patient prøver.

343 tilfældige prøver udtaget fra prøver modtaget mellem d. 8/8 og 5/9 2005 på tarmbakteriologisk laboratorium (se tidligere) er blevet undersøgt. Prøverne er opbevaret i køleskab (4°) og behandlet indenfor et døgn. Der er udtaget prøver indsendt af såvel læger som hospitaler, og fra såvel voksne som børn.

2.3 Metoder:

To skrape-prøver fra frysemediet eller to standard skefulde fæces overføres til henholdsvis 2 ml saltvand (SSI Diagnostica) eller til 5 ml filtreret oksebouillon (SSI Diagnostica). De to prøvestørrelser er således ikke identiske; skefuldene er større end skrabeprøverne. Det var nødvendigt, at begrænse prøverne fra normalmateriale til skrab for at undgå at ødelægge prøverne ved optøning. Oksebouillonens inkuberes natten over. Fra saltvand og bouillon udsåes med podenål på MYP-plader (Oxoid, fremstillet på SSI Diagnostica) (MYP-plader er selektive *B. cereus* plader, hvor *B. cereus* kan identificeres ved, at de er røde og at der dannes en hvid udfældning rundt om dem). Saltvand og bouillon gemmes i køleskab (4°C) og der udplades på T3-plader (Travers et al., 1987) så hurtigt som muligt, før og efter varmebehandling af prøverne (30 minutter ved 65°C) (T3-plader er sporuleringsplader, hvor det er muligt at identificere *B. cereus*-lignende kolonier ved deres morfologi). Alle *B. cereus*-lignende kolonier isoleres og renstryges på T3-plader, dog maksimalt fem fra hver plade. På T3-pladerne bliver kolonierne også talt. Der blev anvendt flere forskellige strategier for at finde de *B. cereus*-lignende bakterier, for at identificere så mange prøver som muligt med bakterierne og for at isolere et stort antal af dem.

Efter renstrykning bliver isolaterne undersøgt ved fasekontrastmikroskopi. Ved mikroskoperingen bliver der især lagt vægt på sporenes størrelse og morfologi, desuden bliver det undersøgt om bakterien producerer -endotoksin krystaller og eventuelle krystallers morfologi noteres. På basis af sporestørrelse og morfologi afgøres det, om isolatet fortsat må betragtes som værende et *B. cereus*-lignende isolat.

Fra de isolater, som herefter fortsat bliver betragtet som værende *B. cereus*-lignende, bliver der herefter oprenset DNA efter vækst på LB-plader. På det oprensede DNA bliver der udført de ni PCR-analyser som fremgår af tabel 1. PCR-analyserne blev gennemført efter afprøvede principper, som beskrevet af Hendriksen og Hansen (2006).

Tabel 1 PCR-analyser gennemført på isolaterne

Analyse	Beskrivelse
ITS	Et sæt generelle primere rettet mod spacer regionen mellem 16S og 23S rDNA generne. Det betyder, at alle bakterier giver PCR-produkter. Produkternes størrelse er til en hvis grad arts-specifik. Analysen bruges her primært til at vurdere kvaliteten af DNAet fra bakterierne, og dets velegnethed til PCR.
Bc-gruppe	Består af to sæt primere rettet mod 16S rDNA generne. Det ene sæt er generelt og giver produkt med alle bakterier. Det andet sæt er specifikt for bakterier indenfor <i>B. cereus</i> gruppen. Analysen bruges til at afgøre hvorvidt et givent isolat tilhører en art inden for <i>B. cereus</i> gruppen.
Cry1	Et sæt primere som generelt er rettet mod gener, som koder for den gruppe af δ -endotoksiner som kaldes cry1. Denne gruppe omfatter δ -endotoksiner, som er aktive overfor sommerfuglelarver. <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD1 har et af disse gener.
Cry2	Et sæt primere som generelt er rettet mod gener som koder for den gruppe af δ -endotoksiner, som kaldes cry2. Denne gruppe omfatter δ -endotoksiner som primært er aktive overfor sommerfuglelarver og i et vidst omfang myggelarver. <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD1 har et af disse gener.
Cry3	Et sæt primere som generelt er rettet mod gener, som koder for den gruppe af δ -endotoksiner, som kaldes cry3. Denne gruppe omfatter δ -endotoksiner som er aktive overfor billelarver.
Cry4	Et sæt primere som generelt er rettet mod gener, som koder for den gruppe af δ -endotoksiner, som kaldes cry4. Denne gruppe omfatter δ -endotoksiner som er aktive overfor myggelarver.
Cry7-8	Et sæt primere som generelt er rettet mod gener, som koder for de to grupper af δ -endotoksiner, som kaldes cry7 og 8. Disse to grupper omfatter δ -endotoksiner som primært er aktive overfor billelarver.
Flab1,2	Et sæt primere som er rettet mod gener, som koder for flagellin gener. Dette primersæt binder sig kun til flagellin gener i de to <i>B. thuringiensis</i> serotyper <i>kurstaki</i> og <i>alesti</i> .
RAPD OPA9	Et uspecifikt bindende primersæt, som anvendes til at give et fingerprint af genotypen. Fingerprintet med OPA9 er specifikt for <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD1 og nogle stammer af serotypen <i>aizawai</i> .

3 Resultater

3.1 Normalmateriale.

Det fremgår af tabel 2, at prøver fra i alt 420 personer blev undersøgt. Fra 81 af disse personer blev der isoleret *B. cereus* lignende kolonier, men kun hos tyve af disse personer kunne identifikationen verificeres ved hjælp af mikroskopi. Denne identifikation kunne også verificeres ved hjælp af PCR. Hos fire af de tyve personer kunne der findes isolater der producerede δ -endotoksin krystaller, og som derfor må kaldes *B. thuringiensis*. Fra tre personer producerede isolaterne bipyramidale krystaller, hos den fjerde runde. Isolater med bipyramidale krystaller er ofte aktive overfor sommerfuglelarver, og denne krystalform dannes da også af stammer af serotypen *B. thuringiensis kurstaki*. Runde krystaller har derimod ofte en ukendt aktivitet. De tyve personer fordelte sig som 7 børn på mellem 1 og 5 år, tre piger og fire drenge, og 13 voksne mellem 30 og 83 år (gennemsnit 55 år), 7 kvinder og 6 mænd. Prøverne er indsamlet i ni af årets måneder, der er ingen prøver fra januar, september og december: Der er flest prøver fra februar og marts, nemlig 4.

Tabel 2 Oversigt over antal let af personer hos hvem der blev fundet *B. cereus* lignende bakterier ved koloni-morfologi, mikroskopi og PCR. Desuden er antal let af personer hos hvem der er fundet *B. thuringiensis* angivet.

	Personer totalt	Personer med Bc-lignende kolonier	Heraf Bc-lignende ved mikroskopi	Bc ved PCR	<i>B. thuringiensis</i> (krystaller)
Antal personer	420	81	20	20	4

I tabel 3 kan det ses hvorledes og på hvilket medie *B. cereus* er blevet isoleret. Hos 14 af personerne er bakterierne isoleret efter berigelse i oksebouillon, i 12 tilfælde på såvel MYP som T3, i to tilfælde kun på T3. Fra saltvand er de alle seks isoleret på T3-plader efter varmebehandling, altså som sporer, en enkelt blev også isoleret på MYP. Der blev i ingen tilfælde isoleret bakterier fra såvel saltvand som oksebouillon. Der blev ikke fundet bakterier på T3 plader uden en forudgående varmebehandling.

Tabel 3 Oversigt over hvorledes bakterierne er isoleret fra personernes fæces. (opgjort pr. person)

	Saltvand (A)		Oksebouillon (B)		Isoleret fra såvel A som B
	MYP	T3	MYP	T3	
Antal personer	1	6	12	14	0

Af tabel 4 kan det ses, hvor mange isolater der blev isoleret af de forskellige kategorier. Fra de 81 personer med Bc-lignende kolonier blev der isoleret 322

isolater; 84 af disse isolater lignede også *B. cereus* ved mikroskopi, hvilket for 83 vedkommende kunne verificeres ved PCR-analyse. 26 isolater kan henføres til *B. thuringiensis* ved tilstedeværelsen af krystaller.

Tabel 4 Antal isolater inddelt i fire forskellige kategorier.

	Bc-lignende kolonier	Bc-lignende ved mikroskopi	Bc ved PCR	<i>B. thuringiensis</i> (krystaller)
Antal isolater	322	84	83	26

Af tabel 5 fremgår det, at blandt de 26 *B. thuringiensis* isolater, er der 13 som besidder såvel *Cry1* som *Cry2* gener. Ingen af isolaterne besidder nogle af de øvrige cry-gener, der er undersøgt for. Det betyder, at 13 isolater der producerer krystaller ikke kan beskrives nærmere ved hjælp af de anvendte PCR-analyser. Disse 13 isolater er alle fra den samme person. Ingen af disse *cry* gener blevet fundet hos *B. cereus* isolaterne. Da ingen af isolaterne besidder et flagellin gen som detekteres med de anvendte primere, er det ikke sandsynligt, at isolaterne er identiske med *B. thuringiensis kurstaki* HD1.

Tabel 5 Karakterisering af *B. thuringiensis* isolaterne ved PCR-analyse.

	<i>Cry1</i>	<i>Cry2</i>	<i>Cry3</i>	<i>Cry4</i>	<i>Cry7-8</i>	Flagellin
Antal isolater	13	13	0	0	0	0

Af tabel 6 fremgår det, at der blev fundet tre personer med *B. thuringiensis* isolater med bipyramidal krystal. Isolaterne er identiske med hensyn til RAPD-profiler hos de to personer, mens der er fundet to forskellige isolater hos den tredje person. Hos de tre personer er der i alt blevet fundet *B. thuringiensis* isolater med bipyramidal krystal med tre forskellige RAPD profiler. Profilen hos de 8 isolater fra M36705 er identisk med profilen for *B. thuringiensis* HD1, men da disse isolater ikke besidder et flagellin gen (Tabel 5), er det ikke sandsynligt at disse isolater er identiske med HD1. Derimod er det sandsynligt, at de kan henføres til serotypen *B. thuringiensis aizawai* (Hendriksen og Hansen, 2006). De to prøver er indsamlet i februar og den tredje i november, de stammer fra en dreng, en voksen kvinde og en voksen mand.

Tabel 6 Karakterisering af *B. thuringiensis* isolater med bipyramidal krystal ved RAPD-analyse.

Person	Antal isolater	Profiltyper (Identiske profiltyper er angivet med samme bogstav, og antallet af isolater ses i parentes)	Antal isolater med RAPD profiler som er identiske med <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD1's profil
M36705	8	A(8)	8
T72110	3	B(2), C(1)	0
F152	2	B (2)	0

3.2 Patient prøver

Det fremgår af tabel 7, at prøver fra i alt 343 patient-prøver blev undersøgt. Fra 120 af disse prøver blev der isoleret ***B. cereus*** lignende kolonier, men kun hos 64 af disse prøver kunne identifikationen verificeres ved hjælp af mikroskopi. Denne identifikation kunne verificeres ved hjælp af PCR i 35 af prøverne. Disse prøver stammer fra 34 patienter, idet to af prøverne er fra den samme patient, men fra to forskellige dage. I otte af de 35 prøver kunne der findes isolater, der producerede -endotoksin krystaller, og som derfor må kaldes ***B. thuringiensis***. I alle de otte prøver producerede isolaterne bipyramidale krystaller. Disse prøver stammer fra otte forskellige patienter

Tabel 7 Antal prøver hvori der blev fundet *B. cereus* lignende bakterier ved koloni-morfologi, mikroskopi og PCR. Desuden er antallet af i prøver i hvilke der er fundet *B. thuringiensis* angivet.

	Patienter	Bc-lignende kolonier	Bc-lignende ved mikroskopi	Bc ved PCR	<i>B. thuringiensis</i> (krystaller)
Antal prøver	343	120	64	35	8

I tabel 8 kan det ses, hvorledes og på hvilket medie de ***B. cereus*** lignende kolonier er blevet isoleret. I 14 af prøverne er bakterierne isoleret efter berigelse i oksebouillon, de 12 på såvel MYP som på T3 og to kun på T3. Fra saltvand er der blevet isoleret 24 primært på T3-plader efter varmebehandling, altså som sporer, to blev også isoleret på MYP. I fem prøver blev der isoleret fra såvel saltvand som oksebouillon. Antallet af CFU blev opgjort på T3-plader efter varmebehandling. Koncentrationen var mellem 50 og 1000 cfu/g hos 20 patienter, mellem 1000 og 10.000 cfu/g hos 2 patienter, mellem 10.000 og 100.000 hos en patient og mellem 100.000 og 1.000.000 hos en anden patient.

Tabel 8 Oversigt over hvorledes bakterierne er isoleret fra prøverne

	Saltvand (A)		Okseboullion (B)		Isoleret fra såvel A som B
	<i>MYP</i>	<i>T3</i>	<i>MYP</i>	<i>T3</i>	
Antal	2	24	12	14	5

Af tabel 9 kan det ses, hvor mange isolater der blev isoleret med basis i deres kolonimorfologi, hvor mange af disse som også var Bc-lignende ved mikroskopi, hvor mange af disse der kunne verificeres vha PCR og endelig hvor mange der havde krystaller. Fra de 120 prøver med Bc-lignende kolonier blev der isoleret 501 bakterier; 238 af disse isolater lignede også *B. cereus* ved mikroskopi, hvilket for 154 isolater kunne verificeres ved PCR-analyse. 16 isolater kan henføres til *B. thuringiensis* ved tilstedeværelse af krystaller. Disse 16 isolater stammer fra 8 patienter, hos ingen af disse patienter oversteg koncentrationen 1000 cfu/g.

Tabel 9 Antal bakterier isoleret som Bc-lignende med basis i kolonimorfologi, antal af disse som var Bc-lignende ved mikroskopi, antal hvor identifikationen kunne verificeres vha PCR og antal isolater der producerer krystaller.

	Bc-lignende kolonier	Bc-lignende ved mikroskopi	Bc ved PCR	<i>B. thuringiensis</i> (forekomst af krystaller)
Antal isolater	501	238	154	16

Tabel 10 giver en oversigt over de patienter som er blevet fundet positive for *B. cereus/B. thuringiensis*. Desuden kan man se hvorfor prøven er blevet indsendt (symptomer), og hvorvidt der er blevet identificeret andre bakterier fra patienten. Det kan ses at aldersspredningen blandt patienterne er stor (fra 0 til 83 år); seks er under 10 år og fire er over 65. Der 20 kvinder og 14 mænd. Da alle prøverne stammer fra patienter må det skyldes, at de har en eller anden form for symptomer fra tarmsystemet. Det er oplyst, at 8 har diarre, 1 intermitterende diare, og tre er syge. For de øvrige foreligger der ikke symptomer. Hos to patienter er der udover *B. cereus* fundet *E. coli* VTEC, hos en *Clostridium difficile* og hos en *Salmonella enterica*. *B. thuringiensis* er fundet hos 4 mænd og 4 kvinder mellem 16 og 84 år. Patienten med det høje antal *B. cereus* er H45900, en et-årig pige, hvor bakterierne blev identificeret i prøver fra to forskellige dage. Prøverne blev indsendt til SSI for at få undersøgt for forekomst af *E. coli* VTEC (som dog ikke blev identificeret i prøverne).

Tabel 10 Oversigt over patienter med *B. cereus*/*B. thuringiensis*.

Patient nr.	Art	Krystal	Alder	Symptomer	Køn	Andre bakterier
M1283-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	16	Diarre	M	
M80586-05	<i>B. cereus</i>	-	63	Diarre	K	
W70768-05	<i>B. cereus</i>	-	60	Diarre	M	
W70776-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	84	Diarre	M	
W71828-05	<i>B. cereus</i>	-	58	Diarre 14dg	K	
W70535-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	54	Diarre i institution	K	
M80579-05	<i>B. cereus</i>	-	28	Diare, 2mrd	M	
W75187-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	51	Diarre, 8dg, arbejder i køkken	K	
H45896-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	40	IKO	M	
H46422-05	<i>B. cereus</i>	-	51	IKO	M	
H46934-05	<i>B. cereus</i>	-	83	IKO	K	
M2710-05	<i>B. cereus</i>	-	26	IKO	K	
M3198-05	<i>B. cereus</i>	-	0	IKO	K	+ <i>Clostridium difficile</i>
M78778-05	<i>B. cereus</i>	-	48	IKO	K	
M79034-05	<i>B. cereus</i>	-	13	IKO	M	
M79927-05	<i>B. cereus</i>	-	7	IKO	K	
T56659-05	<i>B. cereus</i>	-	44	IKO	K	+ <i>Salmonella enterica</i>
T59762-05	<i>B. cereus</i>	-	45	IKO	K	
T59909-05	<i>B. cereus</i>	-	23	IKO	K	
T60009-05	<i>B. cereus</i>	-	77	IKO	K	
T60016-05	<i>B. cereus</i>	-	67	IKO	M	
T62636-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	48	IKO	M	
T62982-05	<i>B. cereus</i>	-	65	IKO	M	+ <i>E. coli</i> /VTEC
W70083-05	<i>B. cereus</i>	-	3	IKO	M	+ <i>E. coli</i> /VTEC
W70404-05	<i>B. cereus</i>	-	46	IKO	K	
W71068-05	<i>B. cereus</i>	-	38	IKO	K	
W71778-05	<i>B. cereus</i>	-	16M	IKO	K	
W71775-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	31	Intermitterende diarre	K	
M3240-05	<i>B. cereus</i>	-	21	Diarre, Irak, 6mrd	M	
H45900-05	<i>B. cereus</i>	-	1	Kontrol af VTEC	K	
T62794-05	<i>B. cereus</i>	-	10M	Syg 4 dg	M	
M80165-05	<i>B. thuringiensis</i>	+	51	Syg, 6dg	K	
M79933-05	<i>B. cereus</i>	-	3	Syg, 7dg	M	
H45907-05	<i>B. cereus</i>	-	13	Diarre, Tunesien	K	

IKO = ikke oplyst

Det fremgår af tabel 11, at der var 17 isolater som var positive for cry1. Det betyder, at der er et isolat som ikke dannede krystaller, selvom det besidder genet, idet (tabel 9) der kun var 16 isolater der dannede krystaller. Af tabel 10 fremgår det endvidere, at blandt de nu 17 isolater der besidder cry-gener (*B. thuringiensis* isolater), så er der 17 som besidder såvel **cry1** som **cry2** gener, og 12 som også besidder flagellin genet. Ingen af isolaterne besidder nogle af de øvrige cry gener, der er undersøgt for.

Tabel 11 Karakterisering af *B. thuringiensis* isolaterne ved PCR-analyse.

	<i>Cry1</i>	<i>Cry2</i>	<i>Cry3</i>	<i>Cry4</i>	<i>Cry7-8</i>	Flagellin
Antal isolater	17	13	0	0	0	12

Af tabel 12 fremgår det, at blandt de otte personer med *B. thuringiensis* isolater med bipyramidal krystal, så er isolaterne identiske med hensyn til RAPD-profiler hos de 5 personer, mens der er fundet to forskellige profiler hos to personer og tre forskellige hos en. Hos de otte personer er der i alt blevet fundet 17 *B. thuringiensis* isolater med bipyramidal krystal med i alt ti forskellige profiler. Profilen hos de 4 af isolaterne fra 4 patienter er identisk med profilen for *B. thuringiensis* HD1. Disse 4 isolater er også positive med hensyn til *cry1* og *cry2* samt flagellin genet, så det er meget sandsynligt at disse isolater er identiske med *B. thuringiensis kurstaki* HD1.

Tabel 12 Karakterisering af *B. thuringiensis* isolater med bipyramidal krystal ved RAPD-analyse.

Patient	Antal isolater	Profiltyper (Identiske profiltyper er angivet med samme bogstav, og antal isolater er efterfølgende angivet i parentes)	Antal isolater med RAPD profiler som er identiske med <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD1's profil
M80165	1	A(1)	1
W70535	2	A(1), B(1)	1
W70776	2	A(1), C(1)	1
W71775	5	D(2), E(1), F(1),G(1)	0
H45896	2	A(1), B(1)	1
M12831	1	H(1)	0
T63636	1	I(1)	0
W75187	3	J(3)	0

4 Diskussion

4.1 Normalmateriale.

Bakterier fra *B. cereus* gruppen blev fundet hos 4,8 % af personerne i det danske normalmateriale. I en engelsk undersøgelse fandt man til gengæld, at 15 % af de raske personer blev fundet positive for *B. cereus*. I denne undersøgelse indgik der fæces fra 711 voksne personer (Ghosh, 1978). Nærværende undersøgelse afviger endog mere fra undersøgelser over børn i Sydafrika, hvor helt op til 40 % af børnene var bærere af *B. cereus* (Turnbull og Kramer, 1985). I begge disse undersøgelser er der fra nogle personer indsamlet flere fæcesprøver i løbet af nogle uger, disse viste en meget varierende forekomst af *B. cereus* både med hensyn til antal og med hensyn til serotype. Den mest sandsynlige forklaring på dette er ifølge begge undersøgelser, at forekomsten af *B. cereus* i fæces afspejler forekomsten af *B. cereus* i den konsumerede mad. Det betyder, at forskellene mellem denne undersøgelse og de to nævnte undersøgelser, dels kan skyldes forskelle mellem forekomsten af *B. cereus* sporer i fødevarerne og forskelle mellem hvad der spises i de tre lande, og dels kan skyldes forskelle mellem de anvendte metoder. I disse to undersøgelser blev der ikke differentieret mellem *B. cereus* og *B. thuringiensis*.

I en femtedel af personerne som var positive for *B. cereus* i det danske normalmateriale kunne der identificeres bakterier, som kunne henføres til *B. thuringiensis*, hvilket svarer til fund af *B. thuringiensis* hos 0,95 % af de undersøgte personer. Vi kender ikke til studier som tidligere har omhandlet forekomsten af *B. thuringiensis* i et normalmateriale. Jensen et al. (2002) fandt *B. thuringiensis* i fæces hos 8 af 20 væksthusearbejdere eksponeret for et sprøjtemiddel som indeholder *B. thuringiensis israelensis*, og de sandsynliggjorde at bakterierne stammede fra sprøjtemidlet. Halvdelen af *B. thuringiensis* isolaterne som blev isoleret i dette projekt har bipyramidale krystaller og besidder gener for Cry1 og Cry2, ligesom flere stammer der indgår i produkter. Ved RAPD analyse vises det, at der er fire forskellige typer af disse bakterier. Hos en af personerne er de fundne isolater identiske med *B. thuringiensis kurstaki* HD1 med hensyn til RAPD profil, men da de ikke også besidder et flagellin gen, som kan detekteres ved den anvendte PCR-analyse, kan de ikke henføres til denne stamme. Det er derimod sandsynligt, at de kan henføres til serotypen *B. thuringiensis aizawai*. (Hendriksen og Hansen, 2006). Der markedsføres ikke produkter i Danmark, hvor aktiv-organismen er denne serotype, det gør der derimod i udlandet, så de kan stamme fra importerede varer, eller måske fra naturligt forekommende *B. thuringiensis aizawai*.

Konklusioner:

- De anvendte metoder er blevet fundet anvendelige til at detektere *B. cereus* gruppe bakterier i fæces, til at differentiere mellem *B. cereus* og *B. thuringiensis* og til at karakterisere *B. thuringiensis* på stammes-niveau.
- *B. cereus* gruppe bakterier blev fundet hos 4,8 % af personerne i det danske normalmateriale

- *B. thuringiensis* blev fundet hos 0,95 % af personerne i materialet
- Der var ingen af *B. thuringiensis* isolaterne der kunne henføres til *B. thuringiensis kurstaki* HD1 og dermed med sikkerhed til et isolat fra et mikrobiologisk plantebekyttelsesmiddel.

4.2 Patient-prøver

B. cereus gruppe bakterier blev fundet i 10,2 % af patient-prøverne. Kun hos fire patienter oversteg antallet af *B. cereus* gruppe bakterier 1000 cfu/g. Vi har ikke kendskab til undersøgelser, hvor den generelle forekomst af disse bakterier er blevet bestemt hos personer med gastroenteritis, og derfor kender vi ikke til noget sammenligningsgrundlag. Det kan dog konstateres, at antallet af patienter med *B. cereus* gruppe bakterier er ca. dobbelt så stort som det, der blev fundet i normalmaterialet, og udgør ca. to tredjedele af antallet fundet i England og Sydafrika.

Det skal dog her bemærkes, at det er ikke muligt direkte at sammenligne antallet af prøver, hvori der er fundet *B. cereus/B. thuringiensis* i normalmaterialet med patientmaterialet, idet de benyttede prøvestørrelser i de to materialer ikke er identiske.

Det skal endvidere bemærkes, at patienter med gastroenteritis normalt ikke søger læge og indleverer fæcesprøver før diarreen har stået på i nogle dage. En diarre forårsaget af *B. cereus* varer oftest 1-2 dage efter fødevarer med sporer er indtaget og symptomerne vil som regel være aftaget efter 3-4 dage (Granum, 2001).

Isolater, som kunne identificeres som *B. thuringiensis*, blev fundet i 2,3 % af prøverne. Dette er ca. dobbelt så stor en forekomst som i normalmaterialet, men da resultaterne ikke er direkte sammenlignelige, er det ikke muligt at afgøre, om dette er en virkelig forskel.

Alle *B. thuringiensis* isolaterne har bipyramidale krystaller og 12 af dem besidder gener for Cry1, Cry2 og flagellin. Fire af disse isolater fra fire patienter er identisk med RAPD-profilen for *B. thuringiensis* HD1, så det er meget sandsynligt at disse isolater stammer fra et mikrobiologisk bekæmpelsesmiddel baseret på *B. thuringiensis* HD1 (Hendriksen og Hansen, 2006). De øvrige isolater, som producerer bipyramidale krystaller, har også mange ligheder med stammer fra mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler, men det er ikke muligt med vores nuværende kendskab til isolaterne at afgøre om dette virkelig er tilfældet.

B. thuringiensis er altså blevet identificeret i tarmmateriale fra 8 personer. Det er ikke muligt at afgøre ud fra dette materiale hvorvidt *B. thuringiensis* har været involveret i tilfælde af gastroenteritis, men det vurderes, at det ikke er særligt sandsynligt, da bakterierne er fundet i lave koncentrationer som sporer. Det er mest sandsynligt, at disse personer enten har spist fødevarer hvorpå disse bakterier i form af sporer er blevet udsprøjtet og som stadig fandtes på fødevarer ved dens indtagelse eller at det berørte personer har spist fødevarer med naturlig forekomst af *B. thuringiensis kurstaki*, der stammer fra miljøet. Isolater identiske med *B. thuringiensis kurstaki* HD1 er blevet identificeret på tomater, agurker, peberfrugter og forskellige typer af kål indkøbt til konsum (Hendriksen og Hansen, 2006; Frederiksen et al, 2006). Men en lang række andre stammer af *B. thuringiensis kurstaki* findes naturligt på grøntsager, f.eks. på kål (Hansen et al., 1998).

Konklusioner:

- *B. cereus* gruppe bakterier blev fundet hos 10,2 % af prøverne fra personer med gastroenteritis

- ***B. thuringiensis*** blev fundet hos 2,3 % af prøverne fra personer med gastroenteritis
- Fire isolater fra i alt fire personer kunne henføres til ***B. thuringiensis kurstaki*** HD1 og stammer dermed med stor sandsynlighed fra et mikrobiologisk plantebeskyttelsesmiddel.
- Det må med udgangspunkt i den gennemførte undersøgelse konkluderes, at det ikke vil være muligt at identificeres mindst 100 fæces prøver med et højt antal ***B. cereus*** fra patienter med gastroenteritis blandt et realistisk antal prøver, idet det vil kræve i størrelsesordenen 10.000 prøver.

Der skal gøres opmærksom på, at disse konklusioner er baseret på et begrænset prøvemateriale.

5 Perspektivering

I forbindelse med risikovurdering af mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler baseret på *B. thuringiensis*, ville det være en stor fordel, hvis der i fremtiden ville blive skelnet mellem *B. cereus* og *B. thuringiensis* i de kliniske mikrobiologiske laboratorier, idet det ville kunne tilvejebringe vigtige oplysninger om hvorvidt *B. thuringiensis* udgør en risiko i relation til gastroenteritis.

I projektet er der anvist simple metoder til at opgøre forekomsten af *B. cereus* gruppe bakterier i fæces, og metoder der på enkel måde kan differentiere mellem *B. cereus* og *B. thuringiensis*. Disse metoder ville nemt kunne overføres til de kliniske laboratorier.

I projektet er de isolerede *B. thuringiensis* stammer blevet sammenlignet med en stamme som anvendes i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler. Dette er gjort ved hjælp af et allerede tidligere udviklet og afprøvet metoder. Det vil også være muligt at udvikle sådanne metoder for andre *B. thuringiensis* stammer som indgår i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler, og med udgangspunkt i sådanne metoder at afgøre om forekomsten af *B. thuringiensis* stammer, der indgår i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler, er mere udbredt i human fæces end dokumenteret i dette projekt. Nye perspektivrige metoder til en sådan karakterisering er AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) og MLST (Multi-locus-sequence-typing).

En karakterisering af *B. thuringiensis* stammer på et niveau så de kan sammenlignes med stammer i mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler vil være en opgave for laboratorier, som er specialiserede indenfor *B. cereus* gruppen. Men den kan kun foretages, hvis de kliniske laboratorier isolerer og opbevarer bakterierne fra personer med gastroenteritis.

Miljøstyrelsens vurdering

Ud fra undersøgelsen af det relativt beskedne antal fæcesprøver, der indgår i dette studie, kan det konkluderes, at det ikke synes at være sandsynligt, at *B. cereus* og *B. thuringiensis* er organismer der forekommer i særligt stort antal i fæces hos raske danskere. Miljøstyrelsen vurderer endvidere, at man på baggrund af projektresultaterne må antage, at *B. thuringiensis* kun sjældent findes i fæces hos patienter med gastroenteritis, og at organismen i de få tilfælde næppe har været årsagen til sygdommen. Men idet fæcesprøverne formentlig er indleveret til patienternes læge adskillige dage efter symptomerne er påbegyndt, er det dog stadig vanskeligt helt at udelukke muligheden for at *B. thuringiensis* har været årsag til gastroenteritis hos nogle enkelte patienter.

Miljøstyrelsen vurderer, at der ud fra nærværende undersøgelse ikke er nogen grund til at antage, at brugen af mikrobiologiske plantebeskyttelsesmidler baseret på *B. thuringiensis* har medført gastroenteritis hos danskere.

Litteratur:

Damgaard, P.H. (1995) Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 12, 245-249.

Ehling-Schulz, M, Fricker, M og Scherer, S. (2004) Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Mol. Nutr. Food. Res. 48, 479-487.

Glare, T.R og O'Callaghan (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. Wiley.

Ghosh, A.C. (1978) Prevalence of *Bacillus cereus* in the faeces of healthy adults. J. Hyg. Comb. 80, 233-236.

Granum, P.E. (1997) *Bacillus cereus* determination in food. NMKL method no. 67, 4th ed. National Veterinary Institute, Oslo, Norge.

Granum, P.E. (2001) *Bacillus cereus*. I "Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers", 2. ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R og Montville, T.J. (eds.) . ASM Press.

Hansen, B.M. og Hendriksen, N.B. (2001) Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl. Environ. Microbiol. 67, 185-189.

Hansen, B.M. Damgaard, P., Eilenberg, J. og Pedersen, J.C. (1998) Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects J. Invertebrate Pathology, 71, 106-114

Hendriksen, N.B. og Hansen, N.B. (2006) Detection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 on cabbage for human consumption. FEMS Microbiol. Lett. 257, 106-111

Jackson, S.G., Goodbrandt, R.B., Ahmed, R og Kasatiya, S. (1995) Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. Lett. Appl. Microbiol. 21, 103-105.

Jensen, G.B., Larsen, P., Jakobsen, B.L., Madsen, B., Schmidt, L. og Andrup, L. (2002) Bacillus thuringiensis in fecal samples from greenhouse workers after exposure to B. thuringiensis-based pesticides. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4900-4905

Kristine Frederiksen, Hanne Rosenquist, Kirsten Jørgensen, og Andrea Wilcks (2006) Occurrence of Natural *Bacillus thuringiensis* Contaminants and Residues of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides on Fresh Fruits and Vegetables. Appl. Envir. Microbiol. 2006 72: 3435-3440.

Travers, R.S., Martin, P.A.W. og Reichelderfer (1987) Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environmental Microbiol. 53, 1263-1266.

Turnbull, P.C. og Kramer, J.M. (1985) Intestinal carriage of *Bacillus cereus*: faecal isolation studies in three population groups. J. Hyg 95, 629-638.

Shinagawa. K. (1990) Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Int. J. Food Microbiol.

Wilcks, A., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., and Licht, T.R. (2006) Fate and effects of ingested *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in the intestinal tract of human flora associated rats. FEMS. Immun. Med. Microbiol. 46, 70-77.