



Afsluttende rapport på projektet " Citizen Science"

*Hovedansvarlig: John
Elmedah Olsen (Professor,
KU)*

April, 2021



DK-VET rapport April, 2021

Afsluttende rapport på projektet " Citizen Science"

Udarbejdet af Rikke Heidemann Olsen

Faglig kvalitetssikring er forestået af John Elmerdahl Olsen

Udarbejdet i henhold til den veterinære myndighedsaftale mellem Miljø- og Fødevareministeriet og Københavns Universitet i samarbejde med Statens Serum Institut; Dansk veterinær Konsortium (DK-VET).

Projekt løbenummer I3RG4, referencenummer I3FP4.

Journalnummer KU-VET 061-0210/21-3680

Projektperiode 01-01-2020 – 31-12-2020

Udgivet af Dansk Veterinærkonsortium

Resumé

Antibiotikaresistent er en samfundsmæssig udfordring af betydning for sundhed hos både mennesker og kæle- og produktionsdyr (1-3).

Det udførte projektet ønskede aktivt at inddrage danske borgere i en praktisk undersøgelse, såkaldt "borger-inddragende forskning" af forekomst af resistens i tarmbakterier fra hund og kat og i bakterier i staldfluer som indikator for resistensforekomst hos produktionsdyr. Hovedformålet var af oplysende karakterer, det vil sige at skærpe den almene forståelse af antibiotikaresistens og hvilke udfordringer der er knyttet hertil, og give deltagerne mulighed for ved selvsyn at observere metoder der kan anvendes til at på resistente bakterier. Målgruppen var Gymnasieelever (1.g – 3.g) og landmænd.

Invitationer til deltagelse blev sendt via mail til landets gymnasier samt til seks dyrlæger tilknyttet landbrugets veterinære konsulenttjeneste (LVK); sidstnævnte med henblik på at mediere kontakten mellem relevante landmænd og projektansvarlig. Der var ingen positive tilkendegivelse fra landbrugssegmentet omkring deltagelse, men stor interesse for deltagelse blandt gymnasieklasser. Grundet COVID-19 situation måtte projektdeltagelsen aflyses i foråret 2020, men undersøgelsen blev gennemført i reduceret form med 11 deltagende klasser i efteråret 2020.

De deltagende klasser undersøgte i alt 100 fæcesprøver fra hund, kat og et enkelt marsvin ved udsæd på MacCockney-agar med og uden udvalgte antibiotika. Tetracyclin, colistin og cefotaxim resistente, coliforme bakterier blev påvist i 40%, 53% og 20% af prøverne. Den høje prævalens af colistin og cefotaxim-resistens vurderer at være påvirket af forekomst af naturligt resistente bakterier, særligt *Proteus* og *Pseudomonas*, kombineret med henfald af antibiotika i pladerne på grund af forkert opbevaring. De videnskabelige resultater i form af prævalenser må derfor konstateres at have for stor usikkerhed til at kunne udtale sig om resistensniveauet i danske kæledyr. Overordnet var der blandt gymnasieelever og lærere stor tilfredshed med deltagelse i projektet. Det vides ikke hvorfor ingen landmænd ønskede deltagelse i projektet. De var i materialet sikret anonymitet. Det vurderes, at såfremt man ønsker frivillig deltagelse af landmænd, skal der gøres en større end indsats for at gøre det "attraktivt" at deltage.

Projektet har været en succes for så vidt angår aktivering og oplysning af gymnasiesegmentet, men som metode til overvågning er resultaterne behæftede med for stor usikkerhed til at danne grundlag for konklusioner. En bedre fremgangsmåde vil være at kombinere den oplysende og instruktive part med i tillæg at anmode deltagerne om at indsende prøver til VET-konsortiet, hvor resistensbestemmelserne ville kunne fortages *lege artis*.

Indholdsfortegnelse

Resumé	3
Indholdsfortegnelse	4
Formål og afgrænsning	5
Baggrund, relevans og perspektiv	5
Metode	6
Resultater	6
Diskussion	10
Konklusion	11
Litteraturliste	11
BILAG 1: Baggrund for projektet (info til deltagere)	12
BILAG 2: Forsøgsprotokol	15

Formål og afgrænsning

Projektet blev udført som kapacitetsopbygningsprojekt med titlen "Citizen Science", med undertitlen Borger-involverende forskningsprojekt: Undersøgelse af niveauet af antibiotikaresistente bakterier på populations-niveau i Danmark

Samfundsmæssigt formål: Offentlig forskning skal i grundessen være samfundsberigende. Omvendt er der kun få eksempler på at den almene samfundsborger bidrager aktivt til den offentlige forskning. Med dette projekt ønskede vi at involverer borgere i det danske samfund, repræsenteret ved landmænd og gymnasieelever, aktivt i forskning, for at øge kendskab til antibiotikaresistente bakterier, øge gennemsigtigheden og tilgængeligheden af forskningen.

Videnskabelige formål: Udover det borger-inddragende og oplysende formål, havde projektet til formål at vurdere muligheden for at få indsamlet data vedrørende antibiotikaresistens hos kæledyr og produktionsdyr ved hjælp fra borgere, og at undersøge om resistens i bakterier hos fluer i stalde kan anvendes som indikator for resistensforekomst.

Baggrund, relevans og perspektiv

Hvad er "Citizen Science"?

Citizen science blev første gang brugt som begreb i 1990'erne, men er siden blev tiltagende populært. Det engelske begreb kan oversættes til dansk som "*Projekter hvor frivillige samarbejder med forskere om at besvare ægte virkeligheds-relevante spørgsmål*"⁴. Ideen er at skabe interaktion og dialog mellem borgere og forskere, og på den måde mindske afstanden mellem borger og forsker/ekspert - og skabe en debat og dialog baseret på viden og fakta.

Relevans og perspektivering

Antimikrobielle resistente bakterier er et samfundsmæssigt problem. Brugen af antibiotika er med til at selektere for resistente bakterier. Landbruget er ofte i fokus i diskussionen af unødigt brug af antibiotika, og dermed for at være medansvarlig for stigningen i niveauet af antibiotika resistente bakterier. Kæledyr har omvendt mindre fokus til trods for at flere undersøgelser har vist at overførsel af resistente bakterier især sker til mennesker med tæt kontakt til dyr. I den henseende udgør kæledyr en særlig risiko. Det er ønskeligt at finde billige måder at overvåge for forekomst af uønskede resistens i dyr, og tesen ved projektet var, at dette kan gøres ved at inddrage borgere i større omfang i prøveindsamling og analyse. Samtidig har det været ønsket at evaluere, om indsamling af fluer kan anvendes til at overvåge for forekomst af resistens i kvæg og grisestalde. I dette pilotstudie blev enterobakterier valgt som indikatorbakterier, da de kan give ophav til infektion hos både dyr og mennesker og relativt nemt kan dyrkes selektivt. Det forventes at denne form for inddragelse af befolkning i videnskabelige undersøgelser vil styrke befolkningens tillid til offentlige forskningsresultater, samt øge kendskabet til antimikrobiel resistens og betydning af såvel kæle- som produktionsdyr i et One-health perspektiv.

Metode

Metode og data:

Projektet var tiltænkt at inkludere borger-indsamling af materiale fra kæledyrene (fækalt materiale fra kæledyr) samt staldfluer (fanget via såkaldte flueklisterpapir), og on-site foretage en selektiv dyrkning af bakterier på agarplader, hver tilsat et ud af tre antibiotika, hvor der enten er vidt udbredt forekomst af resistens for at sikre positive resultater for deltagerne (tetracyclin) eller hvor der er stor interesse ud fra et One-Health perspektiv (colistin og 3. generation cefalosporin).

Formålet var at få deltagerne til at lave en kvalitativ bestemmelse af hvor prøver der indeholdt resistente bakterier af de nævnte typer. Projektet fokuserede på laktose-positive *Enterobacteriaceae*, og deltagerne blev bedt om at så fortyndinger af prøver ud på MacConkey agar med at uden de nævnte antibiotika tilsat i break-point koncentrationer i henhold til EUCAST.

Resultater

Rekruttering af deltagere

Besætningsejere: For at rekruttere egnede husdyrbesætninger, blev der i januar 2020 sent indledende invitationer ud til seks ledende dyrlæger tilknyttet landbrugets veterinære konsulent service, LVK (tre svinedyrlæger; tre svinedyrlæger). Mailen indeholdt information om projektet og understregede at arbejdsbyrden for deltagende landmænd/dyrlæger ville blive lille og alle udgifter naturligvis ville blive dækket. Specifik for landmændene blev der lovet anonymitet ved deltagelse.

Der var ingen respons fra landmænd til de seks dyrlæger. Dette faldt sammen med starten på COVID-19 epidemien og den efterfølgende nedlukning af samfundet. På denne baggrund blev det internt besluttet at opgive denne del af projektet, idet borger-inddragelse, som var projektets kerneområde, som udgangspunkt skal drives af frivillighed/lyst til deltagelse frem for pres.

Gymnasieklasser: For at rekruttere gymnasieklasser til deltagelse, blev der udsendt invitationsmail til 32 danske gymnasier i januar 2020. Der var positiv tilkendegivelse fra undervisere af 27 forskellige klasser, som ønskede at integrere forsøget i deres undervisning i foråret 2020.

Informationsmaterialer:

Der blev på KU udarbejdet baggrundsmateriale og forsøgsprotokol (bilag 1 og 2), som blev sendt til den ledende underviser af hver af de 27 klasser. Efter at have gennemgået disse, skulle hver underviser bekræfte om de stadig ønskede at deltage og oplyse, hvilken uge, de ønskede at gennemføre forsøget i.

Planlægningsarbejdet omkring hvilket uge, forsøget skulle udføres i, var vigtig, idet projektudøver skulle koordinere pladefremstilling og afsending af øvrige materialer til forsøgsudarbejdning max. en uge før hver forsøg, da antibiotika tilsat plader henfalder i aktivitet ved opbevaring.

COVID-19 aflysninger foråret 2020 og konsekvenser for projektgennemførelsen:

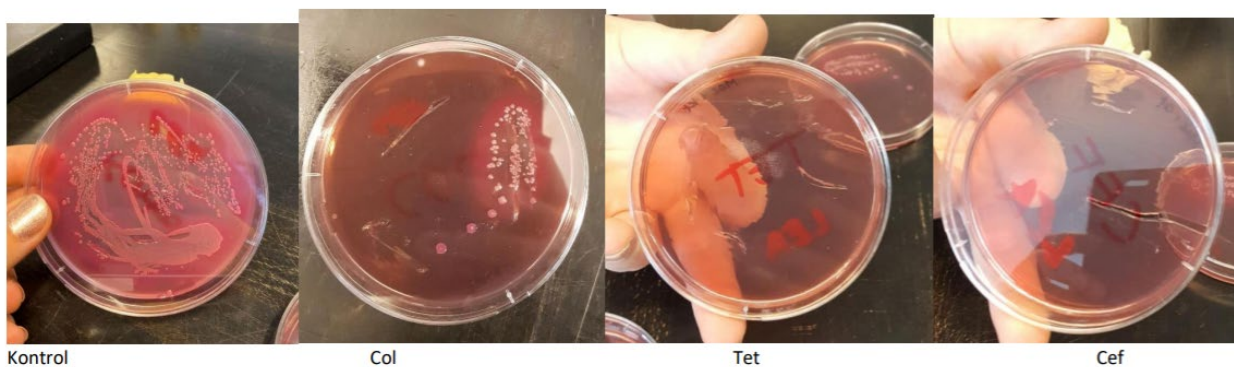
Nedlukning af samfundet i marts 2020 gjorde at undervisningsplaner i gymnasiet op til sommerens eksamener i biologi måtte oplægges, og samtlige klasser blandt projektdeltagelsen i foråret 2020 aflyste. Ved genåbning af samfundet blev der genfremsendt invitation til gymnasier. I alt var der 11 deltagende klasser, som hver fik materialer tilsendt, der tillod op til 10 fæcesprøver at blive undersøgt "on-site" som en del af undervisningen.

Resistens hos kæledyr

Hver klasse indrapporterede klassevis til den projektansvarlige via mail. Nedenfor er vist et eksempel på indrapportering af dyrkningsfund fra en af de deltagende klasser fra Aarhus gymnasium. Det var frivilligt om klasserne i tillæg ville dokumentere deres fund i billede materiale.

Eksempel på dyrkningsresultater fra katten "Simba"

Simba gruppe 2:



Figur: I dette eksempel fra "Simbas" fæcesprøve var der massiv vækst på dyrkningspladen uden tilsat antibiotika (kontrol), mens der ikke var vækst fra pladerne tilsat tetracyclin (Tet) eller cefotaxim (CEF), mens et lille antal kolonier voksede på pladen tilsat colistin (Col).

National borgerinddragende undersøgelse

Dyrkningsresultater – fæcesprøver fra hund og kat

Gymnasium: Aarhus Gymnasium, C

Dato for prøveundersøgelse: 30/9-20

Kommentar til alle resultaterne: Alle pladerne med Tet og Col har inden udpladning været placeret i et meget koldt køleskab, hvorfor overfladen af agarpladen har været frosset.

Prøve nr	Dyreart (hund/Kat)	MacConkey agar med				Evt kommentar
		uden AB ¹	Tet ²	Col ³	Cef ⁴	
1	Hund	+++	+	+	-	
2	Kat	+++	+++	+++	-	
3	Hund	+++	++	++	+	Hunden bor ved siden af en svinefarm
4	Hund	+	-	+	-	
5	Hund	++	-	+	-	
6	Hund	+++	-	+	-	Hunden har modtaget øredråber med bredspektret antibiotika
7	Hund	++	-	-	-	
8	Hund	+++	+	++	-	
9						
10						

Samlet oversigt over fundene fra deltagende klasser

Gymnasium	Antal prøver undersøgt	Andel positive (vækst) på agarplader				Kommentarer
		Uden AB	Tetracyclin	Colistin	Cefotaxim	
Nørre gymnasium	10	10/10	5/10	4/10	3/10	Fra KU side bad vi om at få indsendt prøver positive for colistin. Vi kunne ikke bekræfte colistin resistensen fænotypiske ved vores standard MIC bestemmelse.
Nr. Sundby Gymnasium	10 (2 fra samme dyr)	8/10	2/8	2/8	1/8	Ved de to blanke prøver (ingen vækst på plader uden AB) var der naturligvis heller ikke vækst på de øvrige plader tilsat AB
Nr. Sundby gymnasium (klasse 2)	7	6/7	1/6	3/6	0/6	
Viborg Gymnasium	10	10/9	3/9	5/9	1/9	En enkel fæcesprøve havde været frosset, og der var efterfølgende ingen vækst fra denne prøve

Viborg Gymnasium (klasse 2)	4	4/4	1/4	3/4	1/4	En hund i denne gruppe var kort forinden behandlet for mammaetumor. Fæces fra denne hund havde massiv vækst på alle typer plader, som muligvis kan kunne have sammenhæng med pre-og postoperativ antibiotika behandling
Viby gymnasium	9	9/9	3/9	2/9	1/9	
Aarhus gymnasium	8	8/8	4/8	8/9	1/9	Meget kondensvand på pladerne, sandsynligvis opbevaret for koldt (iskrystaller på overfladen af agarpladen)
Aarhus gymnasium (klasse 2)	7	7/7	2/7	6/7	0/7	
Aarhus gymnasium (klasse 3)	8	7/8	2/7	5/7	3/7	
Ribe Katedralskole	10	9/10	6/9	7/9	6/9	
Middelfart gymnasium	10	10/10	6/10	6/10	2/10	
Middelfar gymnasium 2	7	7/7	4/7	2/7	1/7	
Ialt	100	95/100 (95%)	38/95 (40%)	53/95 (53%)	20/95 (20%)	Kun prøver, som var dyrkbare på agar uden AB er medtaget for at beregne procentdel af AB-resistente prøver



Elever fra Ribe Katedralskole arbejder med at udplade fæces fra deres hunde/katte på antibiotika-holdige plader. En artikel om disse elevers forsøg var publiceret i <https://ugeavisen.dk/ribe/artikel/biologinorder-fra-ribe-katedralskole-forsker-i-lort>

Udpluk af deltagerkommentarer:

"De synes, at det var meget grænseoverskridende - men også interessant (Nr. Sundby Gymnasium og HF)"

"Eleverne synes det var sjovt at deltage i projektet ("Aarhus Gymnasium")

Diskussion

Det overordnede formål med projektet var at oplyse til samfundet om antibiotikaresistens, herunder om konceptet "One Health" i den betydning at resistent bakterie kan smitte fra dyr til mennesker (og visa versa). Det var endvidere formålet at undersøge om der kan ske borgerinddragelse i generering af data om resistensforekomst i dyr.

Som forventes fandtes der tarmbakterier med resistens mod de valgte antibiotika i fæcesprøver fra stort set alle undersøgte kæledyr (95%). En uventet stor andel af prøverne var positive på plader indeholdende colistin- og cefotaxim. Fotodokumentation indsendt fra flere klasser antyder at dette sandsynligvis skyldes at deltagerne ikke har sonderet tilstrækkeligt mellem laktose-positive og laktose-negative bakterier. Laktose-negative *Proteus* er naturligt resistente mod polymyxiner (colistin) og *Pseudomonas* er naturligt resistente overfor cefotaxim. Begge disse bakterieslægter vokser på MacConkey agar. Her må vi konstatere at informationsmateriale kunne have været mere informativt. Skulle man i fremtiden lave et lignende forsøg, kunne man med fordel foretage analyserne "on-site" (for at inddrage eleverne aktivt i undersøgelsen) SAMT indsende en del af prøvematerialet til et mikrobiologisk laboratorium, som kunne foretage en korrekt undersøgelse af prøverne.

Der var stor interesse for projektet blandt gymnasier, som fint kunne integrere undersøgelsen som et del af undervisningsforløbet i biologi, og det tilsendt baggrundsmateriale indgik som undervisningsmateriale. Deltagelsen var så tilfredsstillende, at flere undervisere har forhørt sig om hvorvidt projektet ville blive gentaget i 2021, for så ville de gerne deltage. Der er ikke truffet beslutning om dette endnu.

I forhold til at få rekrutteret landmænd til deltagelse i projektet var tilgangen til rekruttering forfjlet. Flere opfølgende henvendelser til dyrlægerne kunne muligvis have øget interessen for deltagelse. Det kan ikke udelukkes at sammenfald med udbrud af COVID19 har mindsket interessen for deltagelse, men det vurderes som mindre sandsynligt. Da "Citizen Science" som udgangspunkt frivillighedsbaseret, kunne projektet være fremlagt på en måde der havde gjort det mere attraktivt at deltage i projektet. Fx kunne man have haft understreget, at såfremt staldfluer skulle vise sig at kunne bruges som metode til at indsamle data om antibiotikaresistens kunne man også tænke sig metoden anvendt til at overvåge for forekomst af patogene mikroorganismer, herunder vira. Opsætning og nedtagning af fluepapir i besætninger er en meget lidt krævende arbejdsprocedure, og det er stadig planen at undersøge om metoden kan bruges til at indsamle viden om "besætningsresistens" og forekomst af patogener.

Konklusion

Projektet blev omdefinert til udelukkende at omhandle undersøgelse af resistensniveauet hos laktose-positive enterobakterier fra kæledyr, da interessen for deltagelse i projektet blandt landmænd manglede. For gymnasieelever var udbyttet et større overordnet kendskab til antibiotikaresistens, og indblik i hvordan antibiotikaresistens kan bestemmes ved dyrkning. Resultater opnået ved inddragelse af gymnasieklasserne er behæftet med stor usikkerhed, og kan ikke betragtes som troværdige. I fremtidige undersøgelser af denne type bør "on-site" undersøgelser kombineres med indsendelse af prøvemateriale til et mikrobiologisk laboratorium for at sikre værdi i overvågning.

Det vurderes stadig som en mulig metode at indsamle fluer fra produktionsbesætninger og foretage karakterisering af resistensforekomst i bakterier fra disse, som en metode til at bestemme "besætningsresistens", og det er planen at gentage denne undersøgelse i fremtiden.

Litteraturliste

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
3. Ventola, C Lee. "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats." *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* vol. 40,4 (2015): 277-83.
4. https://unipress.dk/media/17720/9788772194448_citizen-science.pdf

BILAG 1: Baggrund for projektet (info til deltagere)

Kære deltagere i "Projekt om antibiotikaresistente bakterier hos kæledyr (hund og kat)"

Tak fordi I har vist interesse for deltagelse i vores nationale undersøgelse om niveauet af antibiotikaresistente bakterier hos kæledyr (hund og kat).

Formålet med projektet er dels den videnskabelige undersøgelse af antibiotikaresistente bakterier i fæces fra vores kæledyr, dels at bidrage til et øge befolkningens kendskab til antibiotikaresistens og endeligt at drage nytte af de ressourcer der ligger i "borger-inddragende" forskning.

Baggrund

Dyr og mennesker kan smitte hinanden med bakterier Mange af os lever meget tæt med vores kæledyr, især hund og kat. Selv raske dyr kan bære mikroorganismer, som kan overføres fra dyr til mennesker. Blandt bakterier, er det især arter som *Salmonella*, *Campylobacter*, stafylokokker og *Escherichia coli*, der potentielt kan smitte gennem fx rivemærker, spyt, bid eller kontakt med afføring. Smitte kan også ske indirekte, hvilket betyder at bakterier overføres via forurenede overflader. For eksempel kan en hund afsætte bakterier fra munden på en madskål, hvorefter bakterierne overføres til mennesker senere når vi rører ved skålen. Overførsel af bakterier behøver ikke resultere i infektion og sygdom. Dog kan det i sjældne tilfælde forekomme, særligt hvis en person har et svækket immunforsvar, eller hvis bakterier kommer i kontakt med åbne sår.

Hvis smitte fra dyr til fra dyr til mennesker resulterer i en infektion, kan det være nødvendigt at behandle med antibiotika

I mange tilfælde vil kroppens immunsystem selv kunne bekæmpe en lettere bakteriel infektion. Hvis infektionen udvikler sig og bliver mere omfattende, fx hvis bakterier i et sår får adgang til blodbanen, kan det blive nødvendigt at behandle med antibiotika. Antibiotika er en samlebetegnelse for en række stoffer, der kan bruges til dyr og mennesker til bekæmpe en bakteriel infektion.

Hvad er antibiotikaresistens?

Overordnet set afhænger en bakteries følsomhed over for et antibiotikum dels af tilstedeværelsen af den eller de receptorer (bindingssteder), som stoffet virker på, dels af, om stoffet kan nå frem til receptorerne, dvs. passere bakteriers cellevæg og -membran i en tilstrækkelig koncentration. Nogle bakterier mangler den nødvendige receptor eller har en uigennemtrængelig celledækkende membran og er **naturligt resistente** over for visse antibiotika.

Med **erhvervet resistens** forstås, at bakteriens receptor for et antibiotikum er ændret gennem en mutation i genet for bindingsstedet, eller at bakterien har fået overført genetisk materiale, som koder for en ændring i bindingsstedet. Mutationer og nyt genetisk materiale kan også kode for andre resistensmekanismer, for eksempel enzymer, der ødelægger antibiotika.

Resistensudvikling som konsekvens af antibiotikaforbrug

Antibiotika er blandt de vigtigste opdagelser inden for sygdomsbekæmpelse. Desværre er antibiotika ved at drukne i sin egen succes. Et for stort og ukritisk forbrug af antibiotika, har selekteret for en kraftig stigning i de underpopulationer af bakterier, der har været i stand til at modstå et antibiotikapres.

Der er en nemlig en nøje sammenhæng mellem antibiotikaforbrug og resistensudvikling. Ved indtagelse af et antibiotikum spredes det med blodet til alle dele af kroppen, inkl. sekreter, sved, tårevæske, modermælk, tarmindhold osv. De følsomme bakterier på hud og slimhinder bliver

hæmmet i deres vækst eller fjernet, og pladsen vil blive overtaget af bakteriearter eller andre mikroorganismer, fx svampearter, der er enten naturligt resistente eller har erhvervet resistens over for det pågældende stof. Dette kaldes selektion.

Når indtagelsen af antibiotika ophører, kan bakteriefloraen returnere til den oprindelige flora, hvis der stadig forekommer - eller tilføres - følsomme bakterier.

Da livet i tarm eller på slimhinder er en kamp for ernæring og overlevelse, vil denne resistens-"omkostning" hæmme en resistent bakterie i konkurrence med dens følsomme modpart, og de følsomme bakterier vil overvokse de resistente. Dette ses fx ved normalisering af hud-, mundslimhinde- og tarmflora hos patienter et par uger efter en antibiotikabehandling.

I et miljø som det danske, hvor antibiotikaforbruget er relativt lavt, vil der være rigelig repræsentation af følsomme bakterier.

I mange Sydeuropæiske lande, som fx Spanien, Italien og Grækenland, der har et væsentligt højere antibiotikaforbrug sammenlignet med Danmark, vil den almindelige forekomst af følsomme bakterier være sparsom, og "normalfloraen" vil i højere grad bestå af resistente bakterier. Hvis der konstant opretholdes et stort selektionspres med antibiotika og en pool af resistente bakterier, der kan overføre deres resistensegenskaber, vil følsomme bakterier ikke have mange chancer for at forblive følsomme.

Formålet med dette projekt

I dette projekt ønsker vi at undersøge om bakterier, der tilhører familien af Enterobakterier, er resistente overfor klinisk vigtige antibiotika. Vi har valgt at fokusere på Enterobakterier, da disse bakterier findes i stort antal i fæces, og er "opportunistiske" patogener, dvs de kan findes hos raske personer, men kan også give sygdom, hvis muligheden (derfra navn "opportunity"/opportunistiske) byder sig (fx hvis der er et åbent sår, bakterierne kan vokse i eller bakterierne kommer i blodbanen). For at isolere Enterobakterier fra andre bakterier i fæces, kan man anvende et særligt dyrkningsmedie kaldet MacConkey agar (MCA). MCA er tilsat galdesalte og krystalviolet, der hæmmer væksten af mange forskellige bakteriearter, men ikke bakterier, der tilhører Enterobakterie- familien. Når et vækstmedie hæmmer væksten af nogle bakteriearter, kaldes mediet selektivt. Når et medie også kan bruges til at skelne mellem bakteriearter, der kan vokse på et medie, kaldes mediet indikativ. MCA er både selektivt og indikativ, da MCA også kan bruges til at skelne mellem Enterobakterier, der kan fermentere laktose, og dem som ikke kan fermentere laktose. Dette kan aflæses som farveomslag på mediet (se billede på næste side).

I får udleveret fire vækstmedieplader til hver fæcesprøve: 3

Plade 1: Ren MCA. Her kan alle bakterier, der tilhører familien af Enterobakterier vokse på. De klinisk vigtigste bakterier i Danmark (dem, der oftest giver anledning til sygdom hos dyr og mennesker), som kan vokse på MCA er *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus* og *Klebsiella*.

Plade 2: MCA tilsat antibiotikummet tetracyklin. Tetracykliner bruges bl.a. til at behandle klamydia infektioner, syfilis og svær acne. Tetracyklin bruges også til at behandle *E. coli* forårsaget tarminfektioner hos især svin.

Plade 3: MCA tilsat antibiotikummet cefotaxim. Cefotaxim bruges bl.a. til at behandle blodforgiftninger og alvorlige urinvejsinfektioner (som i øvrigt ofte er forårsaget af bakterier tilhørende Enterobakterie-familien, herunder især *E. coli*)

Plade 4: MCA tilsat antibiotikummet colistin. Colistin har tidligere været et af de mindre anvendte antibiotika, men i dag kan det i enkelte tilfælde være eneste mulighed til at behandle multiresistente bakterier. Derfor er det igen at betragte som et vigtigt lægemiddel til behandling af infektioner.

Eksempler på hvordan MCA kan se ud efter podning :



MacConkey agar (MCA) plade, upodet



Escherichia coli fermenterer den laktose, der er tilsat MCA. Ved fermentering produceres der syre. En pH indikator i mediet giver et pink omslag ved *E. coli* vækst.



Salmonella fermenterer ikke laktose, og salmonella kolonier fremstår farveløse på MCA.

BILAG 2: Forsøgsprotokol

Hvordan udføres forsøgene

Som beskrevet i invitationen er det nødvendigt at I har et varmeskab (37°C), en vægt, målebæger til 10 ml, og pipetter (10 µl) til rådighed i jeres laboratorie. Desuden skal der indsamles fæces fra 6-10 hunde/katte (vi sender materiale så I kan udføre prøver fra 10 dyr). Det behøver ikke nødvendigvis at være elevernes egne dyr, det kan også være bedsteforældre/kusiner/venner etc., blot der er kendskab til at dyrene lever "tæt" med deres ejere. Prøverne skal helst indsamles senest 24 timer før prøver skal bruges til undersøgelsen.

I får tilsendt med posten

- Rør med ske til indsamling af fæces
- MacConkey agar plader (med og uden antibiotika tilsat; MacConkey agaren hæmmer de fleste bakterier, der ikke tilhører Enterobakterie familien, mens antibiotikaen hæmmer vækst af bakterier, der ikke er resistente over for det givne antibiotika)
- Anvendte antibiotika
- Tetracycline (tet)
- Cefotaxim (cef)
- Colistin (Col)
- Blank (dvs ren MacConkey medie uden tilsat antibiotika)
- Filterposer
- Fysiologisk kogesalt opløsning (0.9% NaCl)
- Plastik podepinde

Elektronisk får I tilsendt et skema, hvori I noterer jeres observationer.

Procedure for én prøve:

- 1) Frisk afsat fæces samles op i opsamlingsglas (1 dyr/glas). Mærk glasset med dyrets navn og om det er fra en hund eller kat. Meget gerne opsamlet samme dag som prøverne skal håndteres. Kattebakken skal helst tømmes dagligt for at sørge for fæces er så frisk som muligt. Vask hænder og brug evt. håndsprit efter prøvetagning.
- 2) I laboratoriet afvejes 1,0 gram fæces
- 3) Fæces tilsættes 10 ml fysiologisk kogesalt (mærket FK, indeholder vand med 0.9% salt)
- 4) Fæces og vand "masseres" sammen til en ensartet masse i filterposen. Filteret i posen vil tillade væskefasen af blanding at trænge igennem filteret, mens større bestanddele tilbageholdes på den anden side af filteret.
- 5) Fra siden med væskefasen (uden store partikler) afpipetteres til hver agarplade 10 µl, som lægges ca 1 cm fra kanten af pladen.
- 6) Med en plastikpodepinden udstryges der på følgende måde:

Først sættes podepinden på de 10 µl, hvorefter der afkøres med podepinden grundigt på ca. 1/6 af pladen (mærket med "1" på illustrationen nedenunder), herefter føres podepinden over på en anden 1/6 og der afkøres grundigt ("2"). Dette gentages endnu engang ("3"), og endelig spredes bakterier med podepinden på resten af pladen ("4"), uden at krydse den udsæd man har lavet tidligere. Dette

bør resultere i enkeltliggende kolonier efter inkubation. På enkeltliggende kolonier kan man vurdere størrelsen og farven, og derved få en indikation på hvilke bakterieart(er), der vokser på pladen. Podepinden smides ud i egnet beholder (til kontamineret affald), låget sættes på pladen og den inkuberes ved 37 °C med bunden op til næste dag (ca. 24 timer).

7) Efter inkubering aflæses hver plade for om der er vækst af bakteriekolonier på pladen (hvis der ikke er mulighed for at aflæse pladerne den følgende dag, kan de sættes i køleskab (i plasticpose) til at der er til aflæsning

8) I må meget gerne tage billeder af plader med vækst og sende dem elektronisk sammen med resultatskemaet. Det er vigtigt, at det fremgår hvilken plade et billede viser (f.eks. "MacConkey + tetracyclin").

9) Resultaterne indføres i det elektroniske skema og sendes til cava@sund.ku.dk

Hvordan skal man forholde sig, hvis resultaterne viser at ens kat/hund bærer bakterier, der er resistente mod en eller flere typer af antibiotika

Vi ved fra andre studier, at det er normalt at dyr og mennesker bærer rundt på resistente bakterier. Der er altså ikke grund til bekymring hvis der ses vækst på pladerne tilsat antibiotika.

Såvel hos kæledyr, hvor der kan påvises antibiotikaresistente enterobakterier i deres fæces, som fra dem, hvor der ikke påvises resistente bakterier, anbefaler vi at man følger almindelige råd for god hygiejne

- Vask hænderne godt, efter du har haft kontakt med dyret.
- Lær kæledyret, at det ikke skal slikke dig i ansigtet.
- Placer ikke kattebakker i nærheden af, hvor der spises eller laves mad.
- Undgå kontakt med højrisikodyr som for eksempel reptiler, amfibier og eksotiske dyr.

- Vask og desinficer bur, fodringsområder og soveunderlag regelmæssigt.
- Brug handsker, når du renser akvariet, gør buret rent eller fjerner afføring.

Hvad skal vi og I bruge resultaterne til

Vi skal bruge resultaterne til at danne os et indledende overblik over, hvor højt niveauet af antibiotikaresistente enterobakterier er i hunde/katte i Danmark. Hvis niveauet er højere end forventet vil det sandsynligvis give anledning til en endnu mere systematisk og videnskabelig undersøgelse, hvor der fx vil blive undersøgt om der er sammenhæng mellem evt. tidligere antibiotika-behandling af dyret og fund af resistente bakterier i det samme dyr (hvilket vil tyde på at en selektion af resistente bakterier vil kunne have fundet sted).

Det er vores målsætning at dette projekt vil bidrage til et samfundsmæssigt større kendskab at dyr og menneskers sundhed er tæt forbundet - ikke kun gennem fx animalske fødevarer, men via vores fysiske kontakt med levende dyr. Projektet skal også bidrage til en øget forståelse for hvorfor det er nødvendigt at begrænse brugen af antibiotika både humant og veterinært.

Yderligere materiale, I evt kan bruge i undervisningen:

DANMAP (The Danish integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme) er et program, der overvåger forbruget af antibiotika og forekomsten af antibiotikaresistens blandt bakterier i dyr, mennesker og fødevarer i Danmark. Data offentliggøres i årlige rapporter, som kan downloades her: <https://www.danmap.org/downloads/reports>

Spørgsmål?

Har I yderligere spørgsmål?

Så send en mail til cava@sund.ku.dk eller ring på 20729044.

Eller send en mail med hvornår (hvilken uge) det passer jer at deltage. Giv os gerne besked senest 3 uger før jeres ønskede forsøgsuge, da agarpladerne med antibiotika skal fremstilles max 10 dag før brug. Husk også at skrive præcis adresse, så sender vi de nødvendige materialer med posten, og et resultatskema elektronisk. Når forsøget er færdigt, sender I resultatskemaet elektronisk til cava@sund.ku.dk.

I må også meget gerne tage et billede af klassen, samt billeder med plader med bakterievækst og sende dem elektronisk også.