



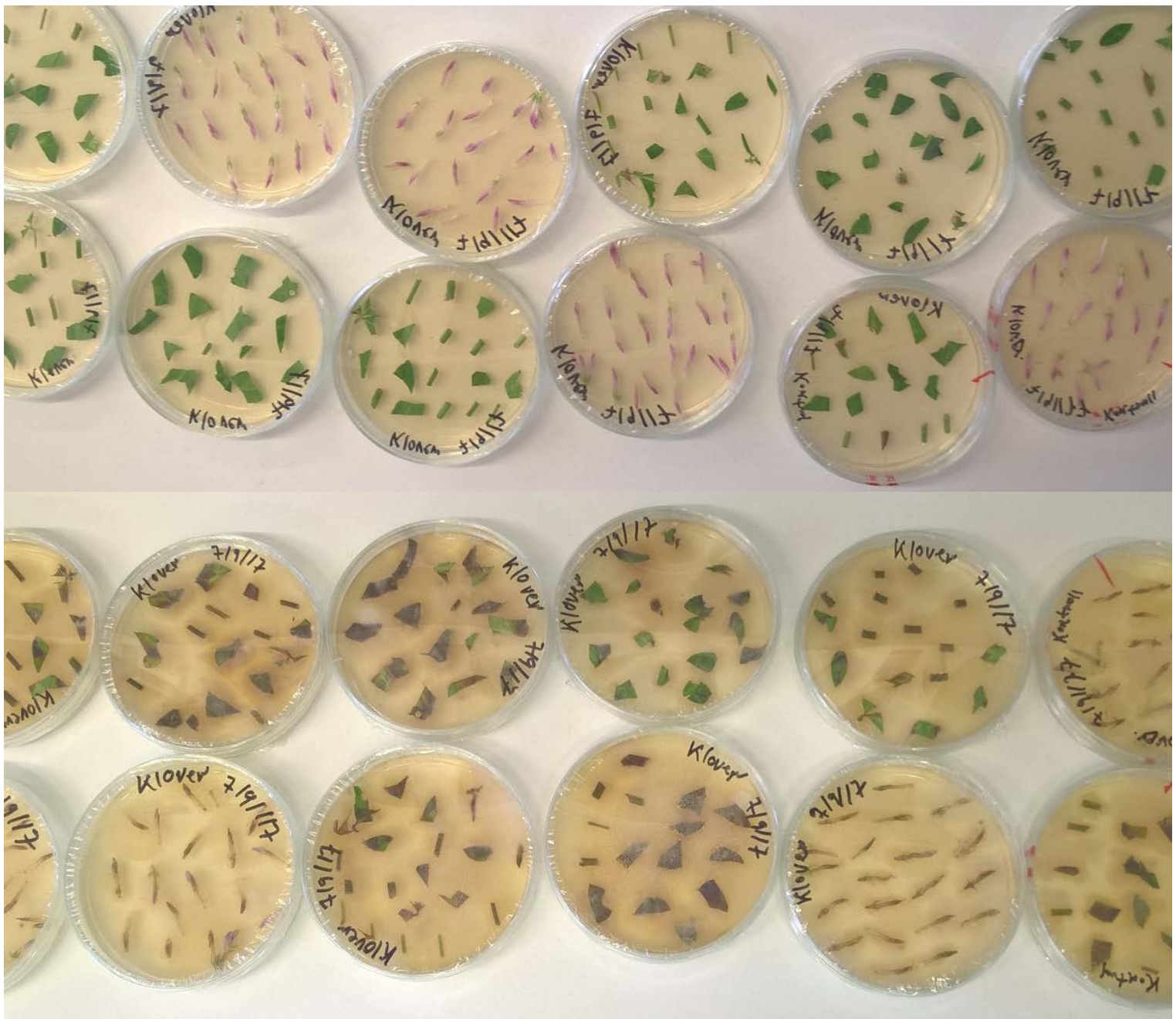
NIBIO

NORSK INSTITUTT FOR  
BIOØKONOMI

## Undersøkelse av antibiotikaresistens- markørgenet *nptII* i norsk natur

Analyserapport: Forekomst av antibiotikaresistensmarkørgenet neomycin  
fosfotransferase II (*nptII*) i prøver fra 12 ville arter fra Norge

NIBIO RAPPORT | VOL. 4 | NR. 100 | 2018



Kristin Forfang, Snorre B. Hagen, Abdelhameed Elameen, Ida Fløystad og Hans Geir Eiken  
Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO)

## TITTEL/TITLE

Undersøkelse av antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII* i norsk natur.  
Analyserapport: Forekomst av antibiotikaresistensmarkørgenet neomycin fosfotransferase II (*nptII*) i prøver fra 12 ville arter fra Norge.

## FORFATTER(E)/AUTHOR(S)

Kristin Forfang, Snorre B. Hagen, Abdelhameed Elameen, Ida Fløystad og Hans Geir Eiken

DATO/DATE:	RAPPORT NR./ REPORT NO.:	TILGJENGELIGHET/AVAILABILITY:	PROSJEKTNR./PROJECT NO.:	SAKSNR./ARCHIVE NO.:
15.08.2018	4/100/2018	Åpen	10842	7/01239
ISBN:	ISSN:		ANTALL SIDER/ NO. OF PAGES:	ANTALL VEDLEGG/ NO. OF APPENDICES:
978-82-17-02154-4	2464-1162		28	3

## OPPDRAKSGIVER/EMPLOYER:

Miljødirektoratet

## KONTAKTPERSON/CONTACT PERSON:

Kine Rautio Øverland

## STIKKORD/KEYWORDS:

Antibiotikarestistansemarkørgen, neomycin, sanntids-PCR, ville arter, Norge

Antibiotic Resistance marker gene, neomycin, Real-Time PCR, wild species, Norway

## FAGOMRÅDE/FIELD OF WORK:

Antibiotikaresistanse

Antibiotic resistance

## SAMMENDRAG/SUMMARY:

**Sammendrag**

Undersøkelse av antibiotikaresistensmarkørgenet neomycin fosfotransferase II (*nptII*) i prøver fra 12 ville arter fra Norge

I et prosjekt fra Miljødirektoratet har vi testa for tilstedeværelse av *nptII* genet i 219 prøver fra 12 ulike ville arter fra hele Norge. Utvalget av prøver inkluderte planter (løvetann, rødkløver og markjordbær), insekter (skogmaur, rognebærmøll og liten høstmåler), snegl (brunsnegl), fisk (ørret og rognkjeks) og pattedyr (rødrev, brunbjørn og isbjørn). Vi brukte to ulike sanntids-PCR (Real-Time-PCR) tester for å undersøke for tilstedeværelsen av kopier av *nptII*-genet i de 219 prøvene. Vi fant at nesten alle prøvene var negative (99%), mens kun tre enkeltprøver (løvetann, rødkløver og skogmaur) viste et svært lavt nivå av *nptII* (3-4 kopier). De positive prøvene kan være naturlige varianter eller kontaminering fra forskningslaboratorier. Vi konkluderer med at det er behov for utvida undersøkelser innenfor dette fagfeltet.



NIBIO

NORSK INSTITUTT FOR  
BIOØKONOMI

## Summary

Investigation of the Antibiotic Resistance Marker Gene neomycin phosphotransferase II (*nptII*) in samples from 12 wild species from Norway

In a project from the Norwegian Environment Agency, we have tested for the occurrence of the *nptII* gene in 219 samples from 12 different wild species from all over Norway. The selection of samples included plants (dandelion, red clover and wild strawberries), insects (ants, apple fruit moth, winter moth), slug (Spanish slug), fish (trout and lumpfish) and mammals (red fox, brown bear and polar bear). We have applied two different quantitative real-time PCR assays in order to search for the potential presence of copies of the *nptII* gene among the 219 samples. We found that almost all samples were negative (99%), while only three single samples (dandelion, red clover and ant) showed a very low level of *nptII* (3-4 copies). The positive samples may be natural variants or contamination from research laboratories. We conclude that there is a need for extended investigations in this field.

LAND/COUNTRY:	Norge
FYLKE/COUNTY:	Finnmark
KOMMUNE/MUNICIPALITY:	Sør-Varanger
STED/LOKALITET:	Svanhovd

GODKJENT /APPROVED

Hans Geir Eiken

PROSJEKTLEDER /PROJECT LEADER

Kristin Forfang

# Innhold

1 Innledning.....	5
2 Metoder.....	6
2.1 Prøvemateriale .....	6
2.2 Bakteriedyrking.....	6
2.3 DNA-isolasjon .....	6
2.4 nptII-deteksjon .....	6
2.5 16S rRNA-deteksjon.....	6
2.6 Real-time PCR .....	7
3 Resultater .....	8
3.1 Verifisering av real-time PCR tester.....	8
3.2 Prøveinnsamling .....	10
3.3 Real-time PCR-analyse.....	10
3.4 Bakteriedyrking.....	12
4 Oppsummering og konklusjon.....	14
5 Referanser .....	15
Vedlegg 1 .....	16
Vedlegg 2 .....	17
Vedlegg 3:.....	26

# 1 Innledning

Økning i forekomst av bakterier som er resistente mot antibiotika er knyttet til økt bruk av antibiotika, og utgjør en av de største helseutfordringen i verden i dag. På oppdrag fra Miljødirektoratet har NIBIO og andre norske forskningsinstitutter foretatt undersøkelser av spredning av antibiotika resistente bakterier i norsk natur. NIBIO på Svanhovd og Ås har undersøkt forekomsten av antibiotika resistensmarkør genet neomycin fosfotransferase (*nptII-genet*) i et mindre utvalg av ville arter i norsk natur (219 prøver fra 12 ulike arter) ved hjelp av sanntids-PCR. Anlyseresultatene er presentert i denne rapporten.

## 2 Metoder

### 2.1 Prøvemateriale

Fra 12 ulike ville arter ble det samlet inn 203 prøver i ulike områder i Norge (se fig. 4). Prøvematerialet omfattet ekskrement-prøver fra bjørn og rødrev, vevsprøver fra brunsnegl, isbjørn, skogsmaur, liten høstmåler, rognebærmøll, rognkjeks og ørret samt plantemateriale fra løvetann, markjordbær, og rødkløver. I tillegg ble det inkludert 16 prøver av kolonier isolert fra bakteriedyrking på neomycin-skåler fra tre ulike arter (brunsnegl, markjordbær og rødkløver) slik at det totalt ble inkludert 219 prøver i DNA-analysene (liste over de 219 prøvene i Vedlegg 2).

### 2.2 Bakteriedyrking

Det ble utført bakteriedyrking på neomycin-skåler for utvalgte prøver fra 3 ulike arter (brunsnegl, rødkløver og løvetann). Neomycin-skålene besto av LB-medium tilsatt 50 ug/mL (Sigma-Aldrich). Skålene ble først dyrket med biter fra materialet lagt direkte på agaren (plante eller animalsk vev) overnatt ved romtemperatur (Figur v3.1 i vedlegg 3). Et utvalg av antatte bakteriekolonier ble strøket ut på nye neomycin-skåler og inkubert overnatt, og et nytt utvalg av antatte bakteriekolonier ble brukt for DNA-isolasjon. Bakteriedyrking ble utført ved NIBIOs laboratorium på Ås hvor det tidligere vært jobbet med rekombinant DNA og dyrking av genmodifiserte bakterier, noe som kan utgjøre en potensiell kontamineringsrisiko.

### 2.3 DNA-isolasjon

DNA ble isolert fra prøvematerialet ved bruk av rense-kit spesifikt for typen materiale som ble brukt. Qiagen DNeasy Blood & Tissue ble brukt for vevsprøver, Qiagen DNeasy Plant mini kit for plantemateriale og Stratec PSP spin stool DNA plus kit med tilpasning for ekstraksjon av totalt bakterielt DNA ble brukt for ekskrement-prøver. All DNA-isolasjon, bortsett fra for rognebærmøll, har foregått på NIBIOs DNA-laboratorium på Svanhøvd hvor det ikke tidligere har vært jobbet med rekombinant DNA eller antibiotika.

### 2.4 nptII-deteksjon

Prøvene ble analysert for tilstedeværelsen av antibiotika-resistensmarkørgenet nptII ved bruk av TaqMan prober i real-time PCR. Det ble brukt to ulike tester for nptII-deteksjon (tabell v1.1, vedlegg 1), hvor den første testen detekterer et kort segment (56 bp, eget assay fra denne studien) fra genet mens den andre detekterer et lengre segment (194 bp, NPTII Detection Kit, Applied Biosystems). Plasmidet pRI909 (Takara Bio Inc.) som inneholder nptII-genet ble brukt som positiv kontroll for nptII og for å lage en standardkurve til å kunne kvantifisere antall kopier av genet i prøvene. Standardkurven ble preparert for å kunne detektere fra 50.000 til 5 kopier av genet, mens deteksjonsgrensen for testene var 1,05 kopier av genet. Alle prøver med mindre enn 1,05 kopier av nptII-genet ble klassifisert som negative (-).

### 2.5 16S rRNA-deteksjon

To ulike tester ble brukt som deteksjonskontroll for å verifisere innholdet av bakterie-DNA i de analyserte prøvene. Den ene testen er universell og detekterer tilstedeværelse av bakterielt DNA (Greisen et al. 1994), mens den andre skiller mellom gram-negative og gram-positive bakterier (Shigemura et al. 2005) (se tabell v1.2, vedlegg 1).

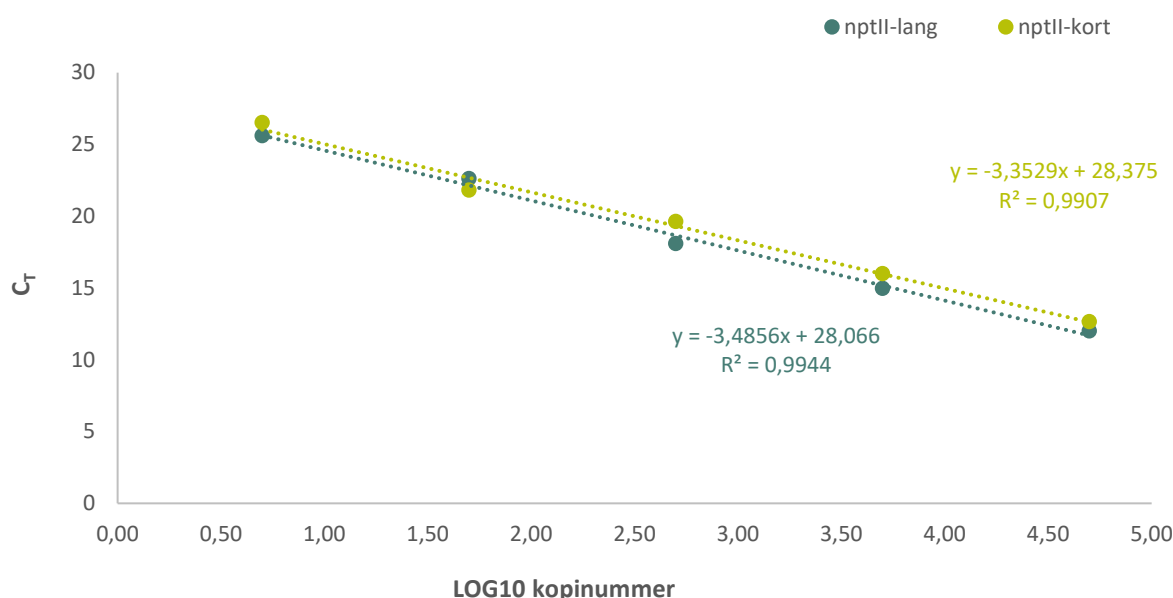
## 2.6 Real-time PCR

En detaljert metodebeskrivelse for betingelsene under real-time PCR er gitt i vedlegg 1. Alle prøvene ble analysert på 96-brønners brett sammen med 12 negative kontroller (ddH<sub>2</sub>O), en standardkurve for nptII og 2 positive kontroller for 16S rRNA, hvorav en gram-positiv og en gram-negativ bakteriestamme.

## 3 Resultater

### 3.1 Verifisering av real-time PCR tester

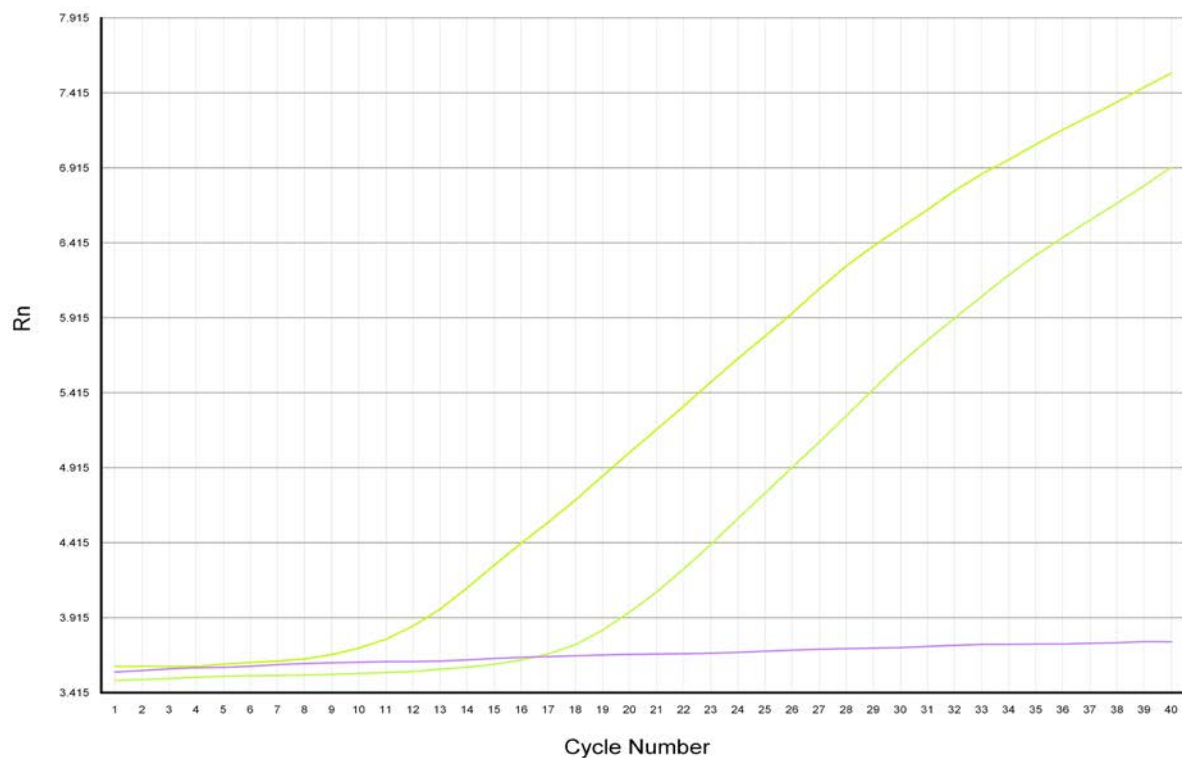
PCR-testene for *nptII*-genet (kort og langt fragment), 16S rRNA og gram-klassifisering ble verifisert mot standarder og optimalisert før prøveserien ble analysert. Figur 1 viser en standardkurve for *nptII* basert på pRI909-plasmidet ved bruk av de to ulike testene (kort og langt fragment). Stigningstallet for regresjonslinjen (-3.35 for kort fragment og -3.49 for langt fragment) tilsier at effektiviteten av de to *nptII*-testene er gode da optimal verdi for en real-time PCR-test vil ligge rundt -3.32. Samtidig viser standardkurven at lineariteten ( $R^2$ ) er høyere enn 0.99 for begge testene, noe som gjør at de kan brukes til å bestemme antall kopier av *nptII*-genet i prøvene som ble analysert.



Figur 1. Standardkurve for *nptII*-testene for både kort (56bp) og langt fragment (194bp). Standardkurven er basert på real-time PCR kjøring av en fortyningsserie av plasmidet pRI909 som inneholder fra 50.000 til 5 kopier av *nptII*-genet. Threshold cycle ( $C_T$ ) er plottet mot log av kopinummer for å danne en regresjonslinje hvor stigningstallet tilsier at effektiviteten for testene er gode og  $R^2$  at lineariteten er god.

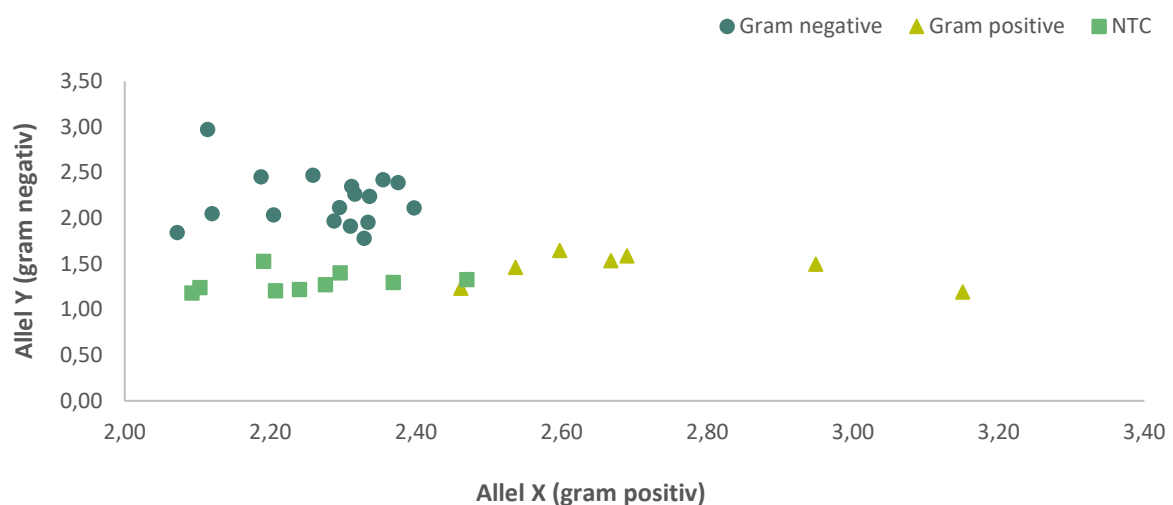
PCR-testen for 16S rRNA gir et positivt/negativt resultat basert på om bakterielt DNA kan detekteres i prøven eller ikke. Figur 2 viser amplifiseringskurvene for en gram-positiv og en gram-negativ stamme samt en negativ kontroll under real-time PCR ved bruk av 16S rRNA-testen. Dette viser at 16S rRNA-testen er i stand til å detektere innhold av bakterielt DNA i en prøve, uavhengig av hvilken gram-klassifisering bakterien tilhører. Testen vil ikke gi amplifisering for prøver som ikke inneholder bakterielt DNA, som for eksempel negative prøver (som inneholder vann) eller prøver som inneholder mikrobielt DNA fra sopp.





Figur 2. Amplifiseringskurver for 16S rRNA-testen for to bakteriestammer, hvorav en gram-positiv og en gram-negativ (gule kurver) samt en blank/negativ prøve (lilla).

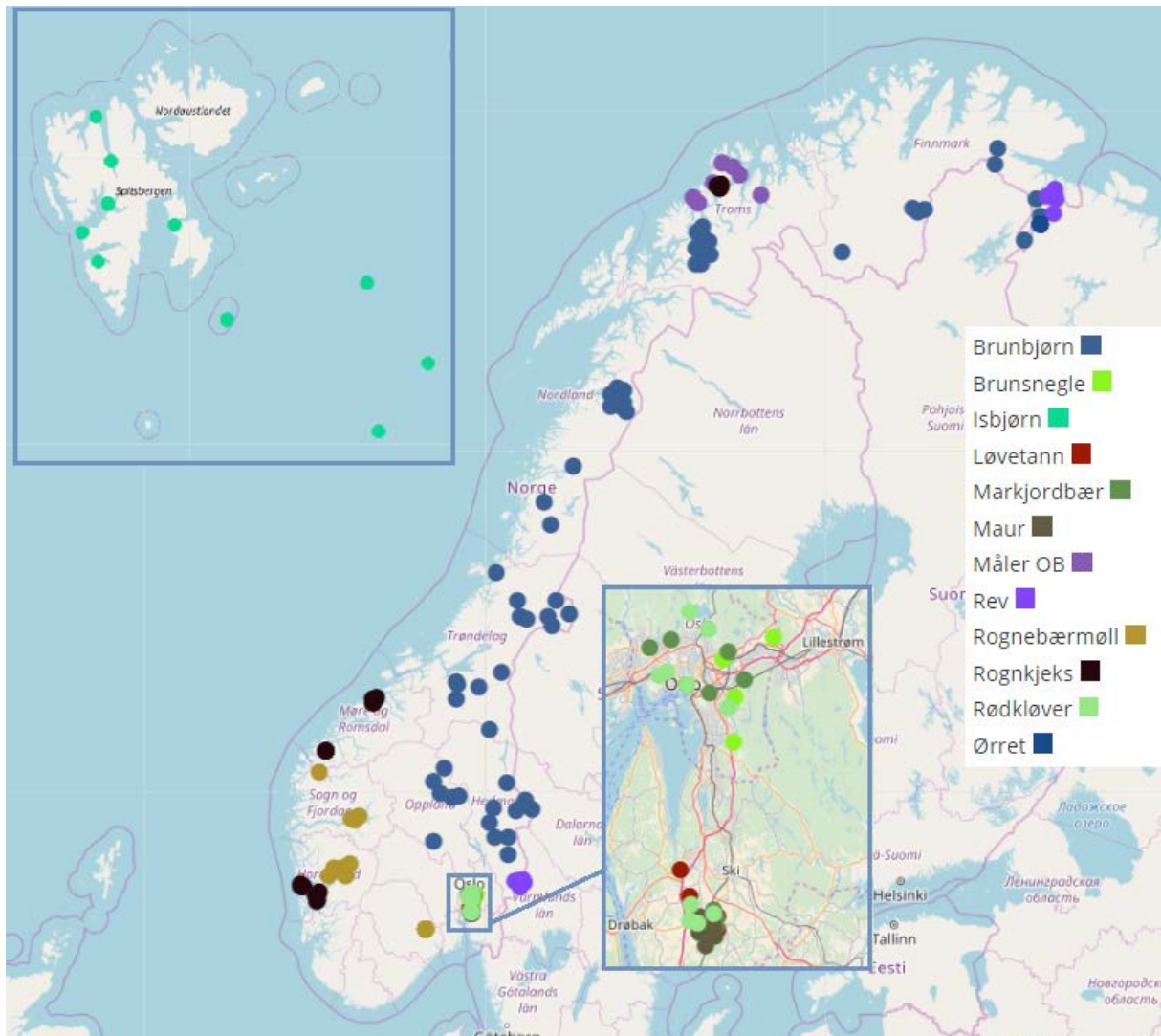
Testen for å gram-klassifisere bakterieinnholdet i prøvene ble verifisert mot kjente gram-positive og gram-negative bakteriestammer og figur 3 viser spredningsplottet for gram-klassifiseringen. Resultatene viser at man tydelig kan skille mellom gram-positive og gram-negative prøver, men at det potensielt kan være vanskelig å klassifisere prøver som inneholder både gram-positive og gram-negative bakterier fordi de blir liggende mellom de to grupperingene. Vi vil derfor velge å kalle prøver som ligger mellom de to grupperingene (gram-positiv og gram-negativ) for ubestemte prøver.



Figur 3. Spredningsplott for klassifisering av gram-positive og gram-negative prøver basert på real-time PCR. NTC (no template control) er negative prøver tilsatt vann.

### 3.2 Prøveinnsamling

Et oversiktskart over prøveinnsamlingen (totalt 219 prøver) for de ulike artene er gitt i figur 4. Det ble samlet inn minimum åtte prøver fra hver art og der det var mulig ble det hentet inn prøver fra ulike områder i Norge. I tillegg ble 16 neomycin-resistente bakteriekolonier fra dyrkning av prøver fra rødkløver, løvetann og brunsnegl valgt ut for å testes for forekomst av *nptII*. For området rundt Oslo og Akershus ble det samlet inn prøver fra brunsnegl, løvetann, markjordbær, maur og rødkløver, og dette området representerer det tettest befolkede området i studiet, som dermed har høyest menneskelig aktivitet.



Figur 4. Prøveinnsamling (n=219) for DNA-analyser som skal avdekke forekomsten av antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII*.

### 3.3 Real-time PCR-analyse

Totalt DNA isolert fra alle prøvene ble analysert for innhold av *nptII* ved bruk av PCR-testen for kort fragment (*nptII*-kort). Alle prøvene ble også testet for innhold av bakterielt DNA ved bruk av testen for 16S rRNA. Deretter ble alle prøvene som testet positivt for det korte *nptII*-fragmentet analysert på nytt på egne brett hvor de ble testet for innhold av *nptII* (langt fragment) og gram-klassifisert ved bruk av gram-testen. Tabell 1 gir en oppsummering av resultatene og viser antall positive og negative prøver for hver test. Det er gitt en oversikt over alle analyserte prøver med tilhørende resultater i vedlegg 2.

Tabell 1. Oversikt over antall analyserte, positive og negative prøver for hver enkelt test i dette studiet.

Test	Antall prøver analysert	Antall positive	Antall negative
16S rRNA	219	156	63
nptII-kort	219	11	208
nptII-lang	11	3	8
Gram	11	7	4

Det ble funnet forekomst av det korte nptII-fragmentet i totalt 11 av 219 prøver. Av disse, ble det lange *nptII*-fragmentet detektert i tre prøver (hvorav 1 var fra en neomycinresistent bakteriekoloni fra dyrkingen av rødkløver). Testen med det korte fragmentet kan være i stand til å detektere resistens i prøver hvor DNAet er degradert (f.eks. ekskrement-prøver), men ut fra gen-sekvensen kan den også predikeres til å være mindre spesifikk og kan dermed detektere sekvenser som er tilnærmet lik *nptII*-genet (eksempelvis andre varianter av *npt*-genene). Prøver som har testet positivt for det korte *nptII*-fragmentet kan derfor inneholde resistensmarkører som ligner på *nptII*-genet, men som har små sekvensforskjeller. Testen med det lange fragmentet er spesifikk for *nptII*-genet og de tre prøvene som testet positivt på denne testen ble analysert to ganger for å bekrefte innholdet av *nptII* i prøvene. Tabell 2 gir en oversikt over hvor mange prøver av hver art som er analysert i prosjektet og hvor mange positive prøver som ble funnet.

**Tabell 2. Oversikt over antall analyserte prøver for hver art, samt antall *nptII*-positive prøver detektert med begge real-time PCR-testene for *nptII*-genet.**

Arter	Antall prøver	Antall positive for <i>nptII</i>	Prosent positive
Brunbjørn	60	0	0 %
Brunsnegl	16	0	0 %
Isbjørn	10	0	0 %
Løvetann	8	1	12,5 %
Markjordbær	8	0	0 %
Skogmaur	8	1	12,5 %
Liten høstmåler	10	0	0 %
Rødrev	15	0	0 %
Rognebærmøll	20	0	0 %
Rognkjeks	30	0	0 %
Rødkløver	8	0	0 %
Ørret	10	0	0 %
SUM	203	2	0.99 %

Genet *nptII* ble detektert direkte i prøver fra løvetann og skogmaur. Disse prøvene begge samlet inn på Ås i Akershus. I tillegg ble rødkløverprøven som var utgangspunkt for dyrkingen av den positive bakteriekolonien samlet inn i Oslo. Tabell 3 viser innsamlingslokalisasjon for alle *nptII*-positive prøver i prosjektet.

**Tabell 3. Oversikt over innsamlingslokalisasjon for de tre prøvene som testet positivt for begge real-time PCR-testene for *nptII*-genet. Prøven rødkløver AR bakterie stammer fra den neomycinresistente bakterien som ble isolert fra en rødkløverprøve.**

Art	Sted	Fylke
Løvetann	Ås	Akershus
Skogmaur	Ås	Akershus
Rødkløver AR bakterie	Oslo	Oslo

### 3.4 Bakteriedyrking

Det ble foretatt bakteriedyrking av 10 prøver fra tre ulike arter (brunsnegl, markjordbær og rødkløver) på neomycin-skåler samt kontrollmedium. Alle de 30 neomycin-skålene og kontrollene viste mikrobiell vekst (bakterier og sopp) etter inkubering ved romtemperatur over natt (Figur v3.1 vedlegg 3). Antatte bakteriekolonier fra hver av de 30 neomycin-skålene ble dyrket på nye neomycin-skåler over natt, og et utvalg av 16 kolonier ble det renset DNA fra og testet for tilstedeværelse av *nptII*. Kun to prøver ga positivt resultat for *nptII*-kort testen, en fra løvetann og en fra rødkløver. Det var kun prøven fra rødkløver som viste positivt resultat for det lange fragmentet av *nptII*. De resterende prøvene fra brunsnegl, rødkløver og løvetann ga negativt resultat (se tabell 4).

Tabell 4. Resultater fra real-time PCR-kjøring for 16 isolerte kolonier fra dyrkning av prøver fra tre ulike ville arter på neomycin-skåler. Positive prøver angis med «+» -tegn og negative med «-» -tegn.

Koloni isolert fra	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gramklassifisering
Brunsnegl	-	-		+	-
Brunsnegl	-	-		-	ubestemt
Brunsnegl	-	-		+	-
Brunsnegl	-	-		+	+
Brunsnegl	-	-		+	-
Brunsnegl	-	-		+	-
Brunsnegl	-	-		-	ubestemt
Brunsnegl	-	-		+	ubestemt
Brunsnegl	-	-		+	ubestemt
Brunsnegl	-	-		+	-
Løvetann	+	-	0,63	+	-
Løvetann	-	-		+	ubestemt
Løvetann	-	-		-	+
Rødkløver	+	+	3,07	+	ubestemt
Rødkløver	-	-		+	ubestemt
Rødkløver	-	-		+	ubestemt

## 4 Oppsummering og konklusjon

Forekomst av antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII* ble detektert på et svært lavt nivå (under 5 kopier av genen) i tre prøver fra villlevende norske arter av totalt 219 analyserte. De positive prøvene stammer fra løvetann, skogmaur og en bakteriestamme isolert fra en prøve av rødkløver. Dette er arter som har tilknytning til landbruk og kultivert landskap. Forekomsten er hovedsakelig lokalisert til Østlandet, med to funn fra Ås (Akershus) og ett fra Oslo (Oslo). Østlandet har høy befolkningstetthet, og spesielt Ås er interessant fordi det er et tettsted med stort landbruksareal, men også fordi en rekke forskningsinstitusjoner holder til her. Det er kjent at både utstrakt og gjentatt bruk av antibiotika (hos mennesker og dyr) vil kunne føre til seleksjon for antibiotikagener i naturen (Levin-Reisman et al 2017). I tillegg kan arbeid med plasmider som bærer antibiotikaresistensmarkørgenet *nptII* føre til spredning av antibiotikaresistens i miljøet. I denne studien er det selvsagt ikke mulig å si noe om opphavet til den observerte forekomsten av *nptII* i de tre ulike ville artene i Norge. Videre undersøkelser på et større materiale samt å karakterisere det molekylære grunnlaget for antibiotikaresistens i ville arter er derfor både nødvendig og viktig. Vi vil foreslå å utvide prøveinnsamlingen til å inkludere flere tett befolkede områder, samt å sammenligne disse områdene med kontrollinnsamlinger i mer rurale områder for å kunne si noe om deteksjon av antibiotikaresistens kan knyttes til tett befolkede områder. I tillegg vil vi anbefale ytterligere studier som inkluderer flere antibiotikaresistensmarkørgener (som knyttes til antibiotika brukt innenfor medisin, landbruk og forskning) for å kunne gi svar på om eventuell bruk av antibiotika har ført til resistensutvikling i norsk natur.

Arbeid med å detektere genetisk forekomst av antibiotikaresistens er alltid forbundet med en viss risiko for kontaminering fra plasmider eller rekombinant DNA i laboratoriet. I dette studiet har alt arbeid med både prøveopparbeiding og genetiske analyser foregått på et laboratorium hvor det aldri har vært jobbet med antibiotika eller antibiotikaresistensmarkørgener tidligere (NIBIO Svanhøvd sitt DNA laboratorium i Finnmark). I tillegg har arbeidet med standarder (plasmider) vært fysisk adskilt fra arbeidet med de innsamlede prøvene for å kunne unngå kontaminering.

## 5 Referanser

Applied Biosystems 2007. TaqMan Plant Transgenic screening NPTII detection kit protocol. Applied Biosystems 06/2010 Partnumber 904150D.

Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 335-351.

Levin-Resiman I., Ronin I., Grefen O., Braniss I., Shoresh N., Balaban NQ. 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* 355: 826-830.

Shigemura K., Shirakawa T., Okada H., Tanaka K., Kamidono S., Arakawa S., Gotoh A. 2005. Rapid detection and differentiation of gram-negative and gram-positive pathogenic bacteria in urine using TaqMan probe. *Clin Exp Med* 4:196-201.

# Vedlegg 1

Oversikt over betingelser for real-time PCR ved kartlegging av tilstedeværelse av nptII-genet og 16S rRNA i DNA-prøver.

**Tabell v1.1. Sekvenser for primere og prober brukt i real-time P**

Test	Forward primer	nM	Reverse primer	nM	Probe	nM
nptII-lang	5' -CACGACGGGCGTTCCTTGC- 3'	500	5' -GGTGGTCGAATGGGCAGGTAGC- 3'	500	5' -(6FAM)-ACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCT-(TAMRA)- 3'	250
nptII-kort	5' -GAGTACGTGCTCGCTCGAT- 3'	900	5' -GGCTACCTGCCATTCTGA- 3'	900	5' -(FAM)-CCACCAAGCGAAACAT-(NFQ)- 3'	250
16S rRNA	5' -AACTGGAGGAAGGTGGGGAT- 3'	500	5' -AGGAGGTGATCCAACCGCA- 3'	500	5' -(6FAM)-TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG-(TAMRA)- 3'	200
Gram positiv	5' -ACCTACGGGAGGCAGCAGT- 3'	300	5' -AGGTATTACCGCGGCTGCT- 3'	300	5' -(VIC)-CCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG -(TAMRA)- 3'	200
Gram negativ					5' -(6FAM)-CGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCC-TAMRA- 3'	100

**Tabell v1.2. Forhold for real-time PCR kjøring**

Fase	Hot start	Denaturering	Annealing/Extension
Temperatur (°C)	95	92	60
Tid (mm:ss)	10:00	0:15	1:00
Sykluser	1		40

Analyseresultatene er oppdragsgivers eiendom og gjelder utelukkende de analyserte prøvene

Rapporten skal ikke gjengis i utdrag uten skriftlig godkjenning fra Laboratoriet på NIBIO Svanhovd



## Vedlegg 2

Oversikt over 219 analyserte prøver. Analyseresultatene viser status for tilstedeværelse av *nptII*-genet og 16S rRNA i prøvene.

Tabell v2.1. Oversikt over alle analyserte prøver i prosjektet og tilhørende resultat for de ulike testene. «ND» indikerer ikke detektert for *nptII* i testen for langt fragment (*nptII*-lang), mens «-» indikerer deteksjon, men med færre kopier enn 1,05 som var deteksjonsgrensen for *nptII*-testen.

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	<i>nptII</i> -kort	<i>nptII</i> -lang	Antall kopier av <i>nptII</i>	16S rRNA	Gram-klassifisering
14NF0021	Brunbjørn	Rana	Nordland	2014					
14NF0231	Brunbjørn	Vefsn	Nordland	2014					
14NF0810	Brunbjørn	Sør-Aurdal	Oppland	2014					
15AC001	Rognebærmøll	Åsen	Hordaland	2015				+	
15AC002	Rognebærmøll	Torpe	Hordaland	2015				+	
15AC003	Rognebærmøll	Slinde	Sogn og Fjordane	2015				+	
15AC004	Rognebærmøll	Djønmo	Hordaland	2015				+	
15AC005	Rognebærmøll	Alsåker	Hordaland	2015				+	
15AC006	Rognebærmøll	Sekse	Hordaland	2015				+	
15AC007	Rognebærmøll	Stor Linga	Hordaland	2015				+	
15AC008	Rognebærmøll	Leikanger	Sogn og Fjordane	2015					
15AC009	Rognebærmøll	Stårheim	Sogn og Fjordane	2015	+	ND		+	+
15AC010	Rognebærmøll	Sogndal	Sogn og Fjordane	2015	+	-	0,12	+	ubestemt
15AC014	Rognebærmøll	Haukvik	Telemark	2015				+	
15AC020	Rognebærmøll	Haukvik	Telemark	2015				+	
15AC021	Rognebærmøll	Haukvik	Telemark	2015					
15AC022	Rognebærmøll	Haukvik	Telemark	2015				+	
15AC023	Rognebærmøll	Haukvik	Telemark	2015				+	
15AC024	Rognebærmøll	Haukvik	Telemark	2015				+	

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
15AC025	Rognebærmøll	Hauvik	Telemark	2015				+	
15AC026	Rognebærmøll	Hauvik	Telemark	2015				+	
15AC027	Rognebærmøll	Hauvik	Telemark	2015				+	
15AC028	Rognebærmøll	Hauvik	Telemark	2015				+	
15NF0089	Brunbjørn	Ringebu	Oppland	2015					
15NF0090	Brunbjørn	Fauske	Nordland	2015					
15NF0092	Brunbjørn	Saltdal	Nordland	2015					
15NF0093	Brunbjørn	Sørfold	Nordland	2015					
15NF0288	Brunbjørn	Ringebu	Oppland	2015				+	
16NCLU001	Rognkjeks	Averøy	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU003	Rognkjeks	Averøy	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU005	Rognkjeks	Averøy	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU007	Rognkjeks	Averøy	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU009	Rognkjeks	Averøy	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU119	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU120	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU121	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU122	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU123	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016					
16NCLU124	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU125	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU126	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU127	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU128	Rognkjeks	Kraknes	Troms	2016				+	
16NCLU263	Rognkjeks	Hardangerfjord	Hordaland	2016				+	
16NCLU264	Rognkjeks	Hardangerfjord	Hordaland	2016				+	

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
16NCLU266	Rognkjeks	Hardangerfjord	Hordaland	2016				+	
16NCLU268	Rognkjeks	Hardangerfjord	Hordaland	2016				+	
16NCLU272	Rognkjeks	Hardangerfjord	Hordaland	2016				+	
16NCLU309	Rognkjeks	Austervoll	Hordaland	2016				+	
16NCLU310	Rognkjeks	Austervoll	Hordaland	2016				+	
16NCLU311	Rognkjeks	Austervoll	Hordaland	2016				+	
16NCLU313	Rognkjeks	Austervoll	Hordaland	2016				+	
16NCLU315	Rognkjeks	Austervoll	Hordaland	2016				+	
16NCLU325	Rognkjeks	Raudøya	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU327	Rognkjeks	Raudøya	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU329	Rognkjeks	Raudøya	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU331	Rognkjeks	Raudøya	Møre og Romsdal	2016				+	
16NCLU333	Rognkjeks	Raudøya	Møre og Romsdal	2016				+	
16NF0001	Brunbjørn	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
16NF0003	Brunbjørn	Engerdal	Hedmark	2016					
16NF0014	Brunbjørn	Åmot	Hedmark	2016					
16NF0017	Brunbjørn	Elverum	Hedmark	2016					
16NF0038	Brunbjørn	Nord Fron	Oppland	2016					
16NF0039	Brunbjørn	Sel	Oppland	2016					
16NF0062	Brunbjørn	Karasjok	Finnmark	2016				+	
16NF0064	Brunbjørn	Tana	Finnmark	2016				+	
16NF0081	Brunbjørn	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
16NF0082	Brunbjørn	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
16NF0099	Brunbjørn	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
16NF0146	Brunbjørn	Tana	Finnmark	2016				+	
16NF0181	Brunbjørn	Saltdal	Nordland	2016				+	

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
16NF0182	Brunbjørn	Saltdal	Nordland	2016				+	
16NF0183	Brunbjørn	Saltdal	Nordland	2016				+	
16NF0184	Brunbjørn	Fauske	Nordland	2016				+	
16NF0203	Brunbjørn	Trysil	Hedmark	2016				+	
16NF0205	Brunbjørn	Trysil	Hedmark	2016				+	
16NF0217	Brunbjørn	Trysil	Hedmark	2016				+	
16NF0263	Brunbjørn	Trysil	Hedmark	2016				+	
16NF0274	Brunbjørn	Karasjok	Finnmark	2016				+	
16NF0289	Brunbjørn	Karasjok	Finnmark	2016				+	
16NF0302	Brunbjørn	Snåsa	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0312	Brunbjørn	Bardu	Troms	2016				+	
16NF0319	Brunbjørn	Bardu	Troms	2016				+	
16NF0325	Brunbjørn	Bardu	Troms	2016				+	
16NF0328	Brunbjørn	Bardu	Troms	2016				+	
16NF0330	Brunbjørn	Målselv	Troms	2016				+	
16NF0333	Brunbjørn	Målselv	Troms	2016				+	
16NF0338	Brunbjørn	Målselv	Troms	2016				+	
16NF0339	Brunbjørn	Målselv	Troms	2016				+	
16NF0346	Brunbjørn	Bardu	Troms	2016				+	
16NF0349	Brunbjørn	Målselv	Troms	2016				+	
16NF0365	Brunbjørn	Melhus	Sør-Trøndelag	2016				+	
16NF0387	Brunbjørn	Melhus	Sør-Trøndelag	2016				+	
16NF0406	Brunbjørn	Elverum	Hedmark	2016					
16NF0431	Brunbjørn	Midtre Gauldal	Hedmark	2016					
16NF0434	Brunbjørn	Åmot	Hedmark	2016				+	
16NF0471	Brunbjørn	Selbu	Sør-Trøndelag	2016				+	

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
16NF0486	Brunbjørn	Åsnes	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0502	Brunbjørn	Grong	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0536	Brunbjørn	Lierne	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0537	Brunbjørn	Snåsa	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0543	Brunbjørn	Lierne	Nord-Trøndelag	2016					
16NF0554	Brunbjørn	Meråker	Nord-Trøndelag	2016					
16NF0583	Brunbjørn	Lierne	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0603	Brunbjørn	Røros	Sør-Trøndelag	2016					
16NF0609	Brunbjørn	Kautokeino	Finmark	2016				+	
16NF0618	Brunbjørn	Lierne	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0621	Brunbjørn	Nærøy	Nord-Trøndelag	2016				+	
16NF0670	Brunbjørn	Grane	Nordland	2016				+	
16NF0688	Brunbjørn	Sel	Oppland	2016				+	
16O001	Liten høstmåler	Årøy	Troms	2016					
16O042	Liten høstmåler	Storelva	Troms	2016					
16O083	Liten høstmåler	Tussøy	Troms	2016					
16O139	Liten høstmåler	Dåfjord	Troms	2016					
16O143	Liten høstmåler	Skulsfjord	Troms	2016					
16O197	Liten høstmåler	Skogsfjord	Troms	2016				+	
16O258	Liten høstmåler	Storelva	Troms	2016				+	
16O276	Liten høstmåler	Reinøya	Troms	2016					
16O392	Liten høstmåler	Tussøy	Troms	2016					
16O423	Liten høstmåler	Skogsfjord	Troms	2016				+	
16UMT110	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015				+	
16UMT111	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015					
16UMT112	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015					

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
16UMT113	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015				+	
16UMT114	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015					
16UMT136	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015					
16UMT137	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015					
16UMT138	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015				+	
16UMT139	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015					
16UMT140	Isbjørn	Svalbard	Svalbard	2015					
16VVF005	Rev	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
16VVF006	Rev	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
16VVF007	Rev	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
16VVF008	Rev	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
16VVF009	Rev	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
16VVF144	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016				+	
16VVF146	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016					
16VVF158	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016				+	
16VVF159	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016				+	
16VVF162	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016				+	
16VVF163	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016				+	
16VVF165	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016				+	
16VVF168	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016				+	
16VVF170	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016					
16VVF171	Rev	Varaldskogen	Hedmark	2016					
17STT054	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
17STT055	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
17STT056	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
17STT057	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
17STT058	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
17STT067	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
17STT068	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
17STT069	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
17STT070	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016					
17STT071	Ørret	Sør-Varanger	Finnmark	2016				+	
AR-K-10	Rødkløver AR bakterie			2017				+	
AR-K-4	Rødkløver AR bakterie			2017				+	
AR-K-9	Rødkløver AR bakterie			2017	+	+	3,42	+	ubestemt
AR-L-11	Løvetann AR bakterie			2017	+	ND		+	-
AR-L-3	Løvetann AR bakterie			2017				+	
AR-L-6	Løvetann AR bakterie			2017					
AR-S-10	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AR-S-11.1	Brunsnegl AR bakterie			2017					
AR-S-11.2	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AR-S-3	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AR-S-4	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AR-S-5	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AR-S-6.1	Brunsnegl AR bakterie			2017					
AR-S-6.2	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AR-S-9.1	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AR-S-9.2	Brunsnegl AR bakterie			2017				+	
AV11	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV12	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV13	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017					
AV14	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	

Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
AV15	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017	+	ND		+	-
AV16	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV17	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV18	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV19	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV20	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV21	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV22	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV23	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV24	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV25	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
AV26	Brunsnegl	Oslo	Oslo	2017				+	
FG11	Markjordbær	Oslo	Oslo	2017	+	-	0,61	+	-
FG12	Markjordbær	Oslo	Oslo	2017					
FG13	Markjordbær	Oslo	Oslo	2017					
FG14	Markjordbær	Oslo	Oslo	2017				+	
FG15	Markjordbær	Ås	Akershus	2017				+	
FG16	Markjordbær	Ås	Akershus	2017				+	
FG17	Markjordbær	Ås	Akershus	2017					
FG18	Markjordbær	Ås	Akershus	2017					
FS11	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017				+	
FS12	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017					
FS13	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017	+	ND		+	-
FS14	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017				+	
FS15	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017					
FS16	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017				+	

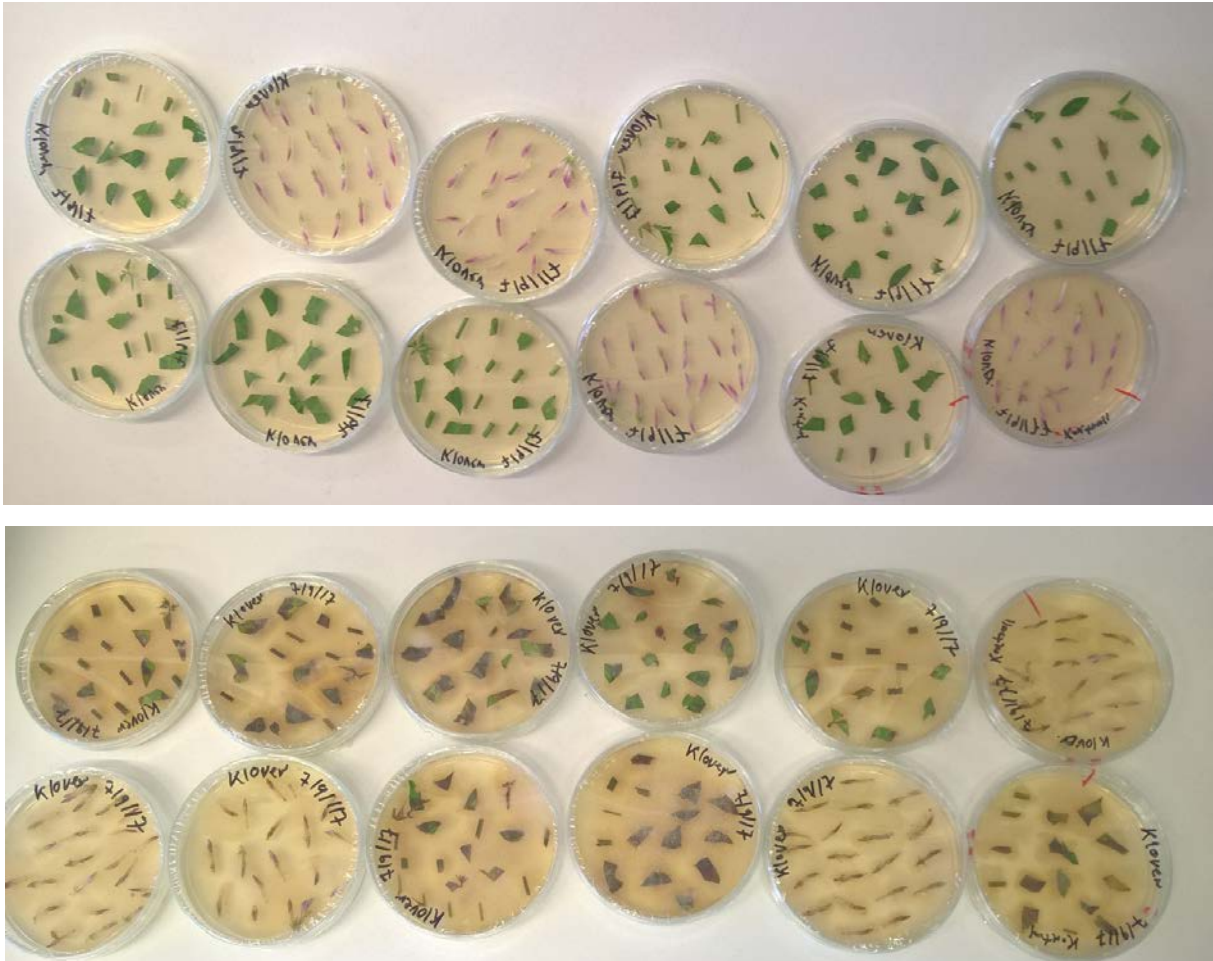


Prøvenavn	Art	Sted	Fylke	Innsamlings-år	nptII-kort	nptII-lang	Antall kopier av nptII	16S rRNA	Gram-klassifisering
FS17	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017	+	+	3,39	+	-
FS18	Skogsmaur	Ås	Akershus	2017				+	
TO11	Løvetann	Oslo	Oslo	2017				+	
TO12	Løvetann	Oslo	Oslo	2017					
TO13	Løvetann	Oslo	Oslo	2017				+	
TO14	Løvetann	Oslo	Oslo	2017	+	ND		+	ubestemt
TO15	Løvetann	Ås	Akershus	2017					
TO16	Løvetann	Ås	Akershus	2017					
TO17	Løvetann	Ås	Akershus	2017					
TO18	Løvetann	Ås	Akershus	2017	+	+	3,42	+	ubestemt
TP11	Rødkløver	Oslo	Oslo	2017					
TP12	Rødkløver	Oslo	Oslo	2017	+	ND		+	-
TP13	Rødkløver	Oslo	Oslo	2017					
TP14	Rødkløver	Oslo	Oslo	2017					
TP15	Rødkløver	Ås	Akershus	2017				+	
TP16	Rødkløver	Ås	Akershus	2017				+	
TP17	Rødkløver	Ås	Akershus	2017					
TP18	Rødkløver	Ås	Akershus	2017				+	

## Vedlegg 3:

Kontrolldyrking av prøvemateriale på neomycin-skåler.

Utvalgte kolonier ble brukt for DNA-isolasjon.



Figur v3.1. Plantemateriale på neomycin-skåler for å påvise antibiotikaresistens

Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO) ble opprettet 1. juli 2015 som en fusjon av Bioforsk, Norsk institutt for landbruksøkonomisk forskning (NILF) og Norsk institutt for skog og landskap.

Bioøkonomi baserer seg på utnyttelse og forvaltning av biologiske ressurser fra jord og hav, fremfor en fossil økonomi som er basert på kull, olje og gass. NIBIO skal være nasjonalt ledende for utvikling av kunnskap om bioøkonomi.

Gjennom forskning og kunnskapsproduksjon skal instituttet bidra til matsikkerhet, bærekraftig ressursforvaltning, innovasjon og verdiskaping innenfor verdikjedene for mat, skog og andre biobaserte næringer. Instituttet skal levere forskning, forvaltningsstøtte og kunnskap til anvendelse i nasjonal beredskap, forvaltning, næringsliv og samfunnet for øvrig.

NIBIO er eid av Landbruks- og matdepartementet som et forvaltningsorgan med særskilte fullmakter og eget styre. Hovedkontoret er på Ås. Instituttet har flere regionale enheter og et avdelingskontor i Oslo.