

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 30～令和 2 年度 分担（総合）研究報告書

分担課題 家畜、食品由来耐性菌データと JANIS データとの連携；相互比較

研究分担者	菅井 基行	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	センター長
研究協力者	柴山 恵吾	国立感染症研究所細菌第二部	部長
	鈴木 里和	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	松井 真理	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	鈴木 仁人	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	矢原 耕史	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	平林 亜希	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	川上 小夜子	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	Liansheng Yu	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	鹿山 鎮男	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	久恒 順三	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	荒井 千夏	国立大学法人広島大学大学院医系科学研究科細菌学	
	島本 整	国立大学法人広島大学大学院統合生命科学研究科食品生命科学	
	梶原 俊樹	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	近藤 恒平	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	杳野 祥子	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	

研究要旨

平成 30 年度以降、JANIS を中心としたヒト由来検体集計データを WHO GLASS に提出し GLASS report に掲載された。GLASS の重複処理と JANIS の重複処理の違いを整理し、その違いによる集計値のズレが軽微であることを示した。WHO GLASS 方式により都道府県単位で集計したデータを国立国際医療研究センターのワンヘルスプラットフォームに提供し web 閲覧を可能にした。広島大学院内感染症プロジェクト研究センターにて 2008 年から収集した臨床分離 ESBL 産生株のうち初期の株を用い、ESBL 遺伝子保有状況、レプリコン型別により大腸菌 22 株、肺炎桿菌 8 株、*Proteus mirabilis* 2 株を選択し、合計 25 株分のプラスミド完全塩基配列を取得した。食品由来菌株として国内小売店で購入した鶏肉から *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有するプラスミド、*bla*_{NDM-1} を保有するプラスミドをもつ肺炎桿菌、国内小売店で購入した生野菜から *bla*_{NDM-1} を保有する IncFII (K) プラスミドを持つ肺炎桿菌、*bla*_{NDM-1}、*bla*_{CTX-M-15} を保有する IncFII (K) プラスミド、*bla*_{OXA-72} を 2 コピー保有する GR2 プラスミドを持つ *Acinetobacter baumannii*、エジプトの牛肉から分離された *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有する IncHI2 プラスミドを持つ *Enterobacter hormaechei* を報告した。本研究班で構築した multiplex PCR による *mcr-1*~*mcr-10* の検出方法について作業手順書を作成し、地方衛生研究所に PCR 陽性コントロールとともに手順書を配布した。

（2 段で記載）

A. 研究目的

ワンヘルスアプローチによる薬剤耐性サーベイランス体制構築を目的として、動物医薬品検査所ならびに地方衛生研究所と協力し、人由来細菌

のサーベイランス JANIS、家畜由来細菌のサーベイランス JVARM、ならびに食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを抽出、集計、統合し解析して、継続的に相互のデータ比較を行う。大腸菌、腸球

菌、サルモネラについて、JANIS、JVARM のデータ比較を行う。サルモネラについては食品由来細菌のデータについても比較する。薬剤耐性に関する国のサーベイランスデータを用いて、ワンヘルスアプローチをナショナルレベルのデータで進めるのがこの研究の特色である。結果を研究班に提供し、家畜、食品、人の中での薬剤耐性菌／遺伝子の伝播状況の総合的な理解に資する。

また、WHO は 2015 年から薬剤耐性のグローバルサーベイランス (GLASS) を開始し、各国にナショナルデータの提出を求めている。GLASS はまず人由来検体から始め、将来的に食品由来検体も加えることが検討されている。この研究では分担者四宮 (地方衛生研究所) ならびに分担者大西 (国立感染症研究所細菌第一部) の協力も得て GLASS に提出するための各菌種のデータを JANIS その他の調査から収集、集計する。GLASS は JANIS が通常実施している集計とは異なる集計手法を指定しているため、通常の JANIS の集計とは別途に集計を行い、GLASS が指定するファイル形式ファイルを作成し、GLASS に提出する。

ESBL 産生腸内細菌目細菌に関する基盤情報を整えるため、広島県で経年的に分離した ESBL 産生株からヒト由来代表株を選択し、その Inc 型別を行う。選択した代表株についてゲノム解析を実施し、経年的な分子疫学解析を行うとともに家畜由来の ESBL 産生菌のプラスミドとの比較を行う。また、食品から分離される薬剤耐性菌について、すでに市場に出回っている野菜からの薬剤耐性菌の分離を試みる。

またプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr* は現在 *mcr-1* から *mcr-9* までのバリエーションが存在するが、国内では *mcr-1*, *-3*, *-5* が検出されている。地方衛生研究所、酪農学園大学、広島大学などの本研究班の研究分担者またはその関係機関と連携して収集された家畜由来または食肉由来 *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性腸内細菌科細株において *mcr* 遺伝子保有プラスミドを含むゲノム解析を行い、プラスミドの比較解析を通して国内での *mcr* 保有株の分子疫学を明らかにする。

B. 研究方法

大腸菌、腸球菌の薬剤耐性について、JANIS で集計されている入院患者全検体由来のデータと、JVARM で集計されている牛、豚、鶏由来のデータを比較し、情報をホームページ等で公開する。大腸菌、腸球菌、サルモネラについて、JANIS、JVARM のデータ比較を行う。JVARM のデータは分担者の川西、サルモネラは分担者の四宮より提供を受ける。JANIS では、各菌種とも数万株の規模のデータを集計する。JVARM ならびにサルモネラでは数百株の規模のデータを集計する。サルモネラにつ

いては食品由来細菌のデータについても比較する。サーベイランス間で共通している薬剤や同系統の薬剤の耐性率を比較したデータを研究班に提示して、研究班内で人、家畜、食品の間で薬剤耐性菌／耐性遺伝子がどのように伝播しているのかを総合的に解析するための情報に資する。なお、一般公開する比較データについては農水省、厚労省と十分に協議し、一般国民や畜産など関係業界に情報が適切に伝わるように十分留意する。ホームページは国立国際医療研究センターが設置するワンヘルス Web ホームページを用い、掲載データは研究班で作成する。

GLASS については、これまでに作成した解析プログラムを用いて引き続きデータの集計を進める。H31 年度は 2018 年のデータを集計し、GLASS が指定するデータ形式のファイルを作成して提出する。GLASS が求めるデータのうち、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌については JANIS のデータベースから必要なデータを抽出する。サルモネラについては、分担者の四宮が全国の地方衛生研究所と協力して収集するデータを提供してもらう。淋菌、赤痢菌については分担者の大西が収集するデータを提供してもらう。それぞれの菌種で、数百から数万株のデータを集計する予定である。これらのデータをもとに、GLASS が指定するデータ形式のファイルを作成する。

ヒト由来 ESBL 産生株は広島県内の医療施設にて分離された菌株を使用した。また、野菜からの薬剤耐性菌の分離は選択培地を使用し、菌種同定を MALDI Biotyper にて実施するとともに、薬剤感受性パターンの測定を行った。細菌ゲノムの解析は短鎖型シーケンサーである MiniSeq/MiSeq/HiSeq/NovaSeq システムにて行い、MLST (multilocus sequence typing) による菌株遺伝型の型別、ResFinder による薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finder による保有プラスミドの型別を行った。必要に応じて、MinION を併用して完全長塩基配列を構築し、プラスミドの配列比較を行った。

腸内細菌科細菌における *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性株は、地方衛生研究所、酪農学園大学、広島大学などの研究班の分担または関係機関と連携して収集する。連携研究機関では、主にディスク法による薬剤感受性試験の結果を指標に耐性菌株を収集し、*mcr* 遺伝子の検出を multiplex PCR にて検討する。感染研では、菌種同定の確認を MALDI Biotyper (Bruker 社)、より詳細な薬剤感受性パターンの測定を MicroScan Walkaway (Beckman Coulter 社) を用いてそれぞれ行う。細菌ゲノムの解析は短鎖型シーケンサーである MiniSeq/MiSeq/HiSeq/NovaSeq システム

(Illumina 社)にて行い、MLST (multilocus sequence typing) による菌株遺伝型の型別、ResFinderによる薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finderによる保有プラスミドの型別を行い、菌株のメタデータと組み合わせた分子疫学解析を行う。各耐性株の代表株を選別し、長鎖型シーケンサーである MinION (Oxford Nanopore Technologies 社)を併用して完全ゲノム配列を構築し、BLAST と ACT (Artemis Comparison Tool) によるプラスミドの配列比較を行う。

(倫理面への配慮)

匿名化済のデータを統計法に基づいて研究利用する。

C. 研究結果

平成 30 年度に GLASS に提出した集計データが受理され、初めて GLASS report early implementation 2017-2018 に掲載された。翌年度以降も GLASS に継続してデータを提出し、受理された。さらに、GLASS の重複処理と JANIS の重複処理の違いを整理し、その違いによる薬剤耐性率の集計値のずれが軽微であることを示した論文を国際誌に発表し Wellcome Trust 主催の国際カンファレンス発表した (口頭発表部門の第二位に選ばれた)。また、WHO GLASS 方式により都道府県単位で集計したデータを、国立国際医療研究センターのワンヘルスプラットフォームに提供し、Web から閲覧可能にした。

広島大学 院内感染症プロジェクト研究センターにて 2008 年より収集した臨床由来 ESBL 産生株を今回の検討に使用した。収集対象菌種は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* であり、収集開始当時の基準であった CLSI M100-S18 に準拠し Double-disk synergy test (DDST) や PCR にて薬剤耐性遺伝子の確認を実施済の 10,259 株 (図 1) を用いた。これらの株から広島由来 ESBL 株の基本構成を確認する目的で、サーベイランス初期の株から完全長塩基配列を取得する株を選択した。菌種や PCR 結果より得られた ESBL 遺伝子保有状況およびレプリコンタイプの情報をもとに代表株 32 株を選択した。内訳は、大腸菌 22 株、*K. pneumoniae* 8 株、*Proteus mirabilis* 2 株であった (図 2)。

短鎖型シーケンサー (MiniSeq/ MiSeq/ HiSeq/ NovaSeq システム) および長鎖型シーケンサー (MinION/ GridION) にて完全長塩基配列決定を実施した。ResFinder による薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finder による保有プラスミドの型別を行い、菌株のメタデータと組み合わせた分子疫学解析を行った。

ESBL 別では、

*bla*_{CTX-M-1} group 8 株
*bla*_{CTX-M-2} group 5 株
*bla*_{CTX-M-8} group 3 株
*bla*_{CTX-M-9} group 9 株

の合計 25 株分のプラスミド完全長塩基配列が得られた (図 3)。

菌種別に見た場合、大腸菌ではプラスミドのみに *bla*_{CTX-M} を保有するものが 12 株、染色体のみに *bla*_{CTX-M} を保有するものが 3 株、それぞれ完全長塩基配列が得られた。5 株は、染色体とプラスミドの両方に ESBL 遺伝子の存在が認められた。染色体とプラスミドで異なる種類の *bla*_{CTX-M} を保有する株は認められなかった (図 4)。*K. pneumoniae* ではプラスミドのみに *bla*_{CTX-M} を保有するものが 8 株、染色体とプラスミドの両方に *bla*_{CTX-M} を保有するものが 3 株認められた。大腸菌と同様に、染色体とプラスミドで異なる種類の *bla*_{CTX-M} を保有する株は認められなかった (図 5)。

プラスミドの Inc type 別で比較解析を実施した (図 6~9)。IncN のように、基本骨格は保持しながら付加領域は比較的多様な構成のもの (図 6) がある一方で、IncII, IncB/O/K/Z, IncFII のようにプラスミド全体を通して比較的高い相同性が維持されている Inc type が存在した (図 7~9)。

次に、プラスミド上と染色体上にそれぞれ存在する *bla*_{CTX-M} の周辺構造の類似性を比較する目的で、*bla*_{CTX-M} の 5' -および 3' -側のそれぞれ 5kb 周辺の塩基配列解析を行った (図 10)。*bla*_{CTX-M-3}、*bla*_{CTX-M-14}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{CTX-M-55} の 5' -側には転移因子 *ISEcp1* が共通して認められ、*ISEcp1-bla*_{CTX-M} 周辺の塩基配列の構成は大きく異なっていた (図 11~14)。このことから、*bla*_{CTX-M} の種類に関わらず *ISEcp1* が転移に重要な働きをしていることが推察された。また、*bla*_{CTX-M-2} は 5' -側に *ISEcp1* が存在する株と存在しない株が認められた (図 15)。このことより、*bla*_{CTX-M-2} の伝播様式は他の *bla*_{CTX-M} とは異なるメカニズムの関与が推定された。一方で、*bla*_{CTX-M-27} の周辺は 5' -側に *ISEcp1* が存在するタイプと 5' -, 3' -側に転移因子 IS26 が存在するタイプが認められた (図 16)。このように、周辺に IS26 が存在するタイプとして *bla*_{CTX-M-8} があった (図 17)。全国的にも分離報告数が少ない *bla*_{CTX-M-8} 保有プラスミドを比較したところ、医療施設や菌種が異なってもプラスミドの基本骨格の相同性が高いことが判明した。IS26 による転移の報告は多数存在するが、なぜ周囲を IS26 で囲まれているながら *bla*_{CTX-M-8} 保有プラスミドの構造が安定に保持されているのかは不明である。

これら *bla*_{CTX-M} 周辺の転移因子に着目して解析した結果をまとめた (図 18)。*bla*_{CTX-M} は *ISEcp1* に

よる転移の頻度が最も多いと推定され、ついで IS26 によるものも確認された。

今後、プラスミドの完全長塩基配列データを引き続き経年的に取得すると共に、家畜由来の ESBL 産生菌のプラスミドとの比較を行う予定である。

食品由来の菌株における解析として、エジプトの牛肉から分離された *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を同時に保有する *Enterobacter hormaechei* について完全長塩基配列を解析したところ、これらの薬剤耐性遺伝子は共に IncHI2/pMLST1 plasmid 上に存在することが判明し、そのプラスミドを pMS37a (270.9 kb) と名付け報告した (Pathogens, 9, 687, 2020)。また、国内の食料品店の鶏肉から分離された *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, *mcr-9* 保有 *Klebsiella pneumoniae* (LM22-1 株) の解析を実施し、*bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有する IncHI2A プラスミドに pLM22-1-VIM-1 (281, 251 bp) と名付けるとともに *bla*_{NDM-1} を保有するプラスミドに pLM22-1-NDM-1 (124, 214 bp) と名付け、解析の結果を報告した (Antimicrob Agents Chemother, 64 aac. 00882-20, 2020)。また国内の小売業者から購入した生野菜より *bla*_{NDM-1} を保有する IncFII(K) プラスミドを持つ肺炎桿菌、*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} を保有する IncFII(K) プラスミド、*bla*_{OXA-72} を 2 コピー保有する GR2 プラスミドを持つ *Acinetobacter baumannii* を分離し、解析結果を報告した (Applied Environ. Microbiol. In press)。Salmonella で報告されていた Salmonella genomic island のサブタイプを、エジプトにおける患者の尿路由来多剤耐性 *Klebsiella pneumoniae* Kpu48 株が保有する例を初めて報告した (Antimicrob Agents Chemother, 64: 9 e01055-20, 2020)。

本研究班の研究分担者である四宮博人、その研究協力者である浅野由紀子 (愛媛県立衛生環境研究所) と連携し、本研究班で構築した multiplex PCR による獲得性コリスチン耐性遺伝子 *mcr* (*mcr-1*~*mcr-10*) の検出手法に関して、作業手順書を作成した。また、協力機関である他の地方衛生研究所にその手順書と PCR の陽性コントロールを配布し、食肉からコリスチン耐性株のスクリーニングを行った。また広島大学病院で保存されている血液由来検体から分離された *Aeromonas caviae* が国内で初めて *mcr-3* 遺伝子保有株であることを見出し報告した (Microbil. Res. Announcements accepted)。

D. 考察

本研究班が開発したプログラムにより、GLASS へのデータ提出が可能になっただけでなく、重複処理という薬剤耐性サーベイランスの基本問題

に関する研究成果を国際誌に発表することができ、さらに集計データを Web サイト経由でわかりやすくオープンにすることが出来た。

E. 結論

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshiki Kajihara, Koji Yahara, Sergey Romualdovich Eremin, Barbara Tornimbene, Visanu Thamlikitkul, John Stelling, Aki Hirabayashi, Eiko Anzai, Satoyo Wakai, Nobuaki Matsunaga, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Motoyuki Sugai, and Keigo Shibayama. Comparison of de-duplication methods used by WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) and Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) in the surveillance of antimicrobial resistance. PLoS One, 2020 Jun 26;15 (6):e0228234. doi: 10.1371/journal.pone.0228234

Soliman AM, Ramadan H, Ghazy E, Yu L, Hisatsune J, Kayama S, Sugai M, Nariya H, Shimamoto T, Jackson CR, Shimamoto T. Emergence of *Salmonella* genomic island 1 variant SGI1-C in a multidrug-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* ST485 from Egypt. Antimicrob Agents Chemother, 64: 9 e01055-20, 2020.

Sadek M, Nariya H, Shimamoto T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nordmann P, Poirel L, Shimamoto T. First genomic characterization of *bla*_{VIM-1} and *mcr-9* coharbouring *Enterobacter hormaechei* isolated from food of animal origin. Pathogens, 9, 687, 2020.

Khalifa H, Soliman A, Saito T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nariya H, Ahmed A, Shimamoto T, Matsumoto T, Shimamoto T. First report of foodborne *Klebsiella pneumoniae* coharboring *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, and *mcr-9*. Antimicrob Agents Chemother, 64 aac. 00882-20, 2020.

Kitagawa H, Ohge H, Yu L, Kayama S, Hara T, Kashiyama S, Kajihara T, Hisatsune J, Sueda T, Sugai M.

Aeromonas dhakensis is not a rare cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan. J Infect Chemother, 26, 316-320, 2020.

Ahmed M Soliman, Hirofumi Nariya, Daiki Tanaka, Liansheng Yu, Junzo Hisatsune, Shizuo Kayama, Kohei Kondo, Motoyuki Sugai, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto
Vegetable-derived carbapenemase-producing high-risk *Klebsiella pneumoniae* ST15 and *Acinetobacter baumannii* ST2 clones in Japan: co-existence of *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-66}*, *bla_{OXA-72}*, and *AbaR4*-like resistance island from the same sample. Applied and Environmental Microbiology (AEM0216620R2), accepted.

Liansheng Yu, Hiroki Kitagawa, Shizuo Kayama, Junzo Hisatsune, Hiroki Ohge, and Motoyuki Sugai
Complete genome sequence of *Aeromonas caviae* strain MS6064, the *mcr-3* carrying clinical isolate from Japan. Microbiology Resource Announcements

(MRA01037-20R1), accepted.

2. 学会発表

Koji Yahara, Toshiki Kajihara, Sergey Romualdovich Eremin, Barbara Tornimbene, Visanu Thamlikitkul, John Stelling, Aki Hirabayashi, Eiko Anzai, Satoyo Wakai, Nobuaki Matsunaga, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Motoyuki Sugai, and Keigo Shibayama. Comparison of deduplication methods used by WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) and Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) in the surveillance of antimicrobial resistance. Antimicrobial Resistance - Genomes, Big Data and Emerging Technologies. November 5. Hinxton, UK.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

図表を添える

図 1

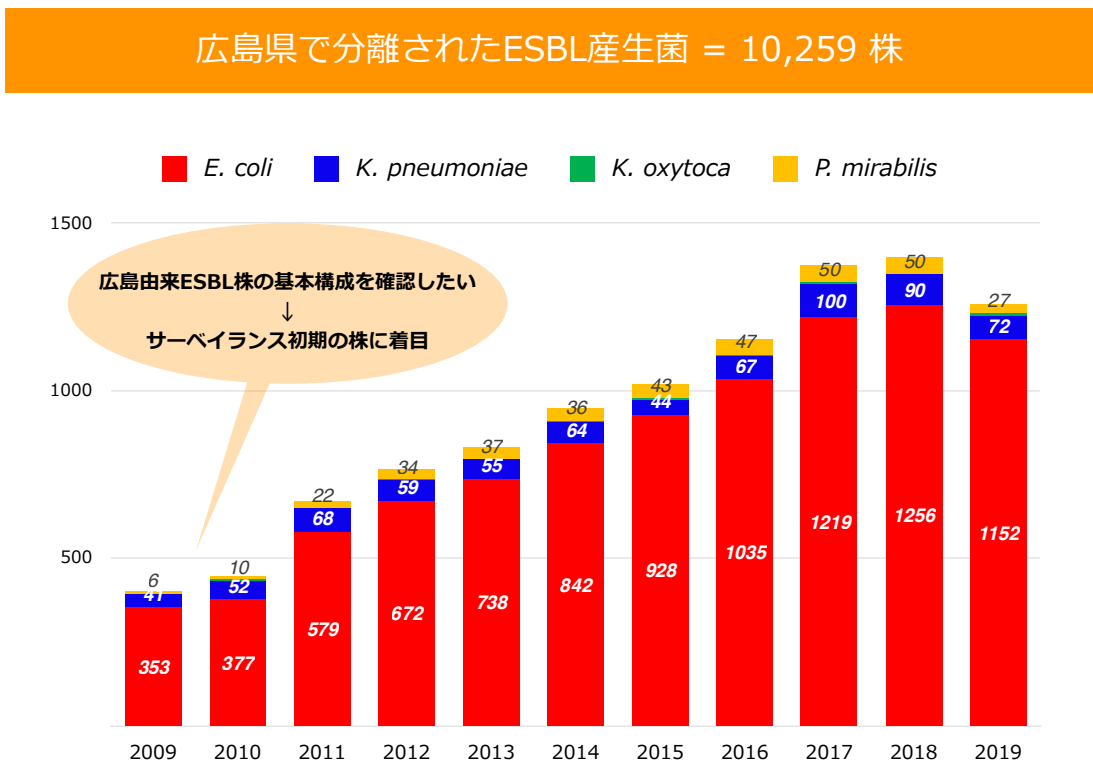


図 2

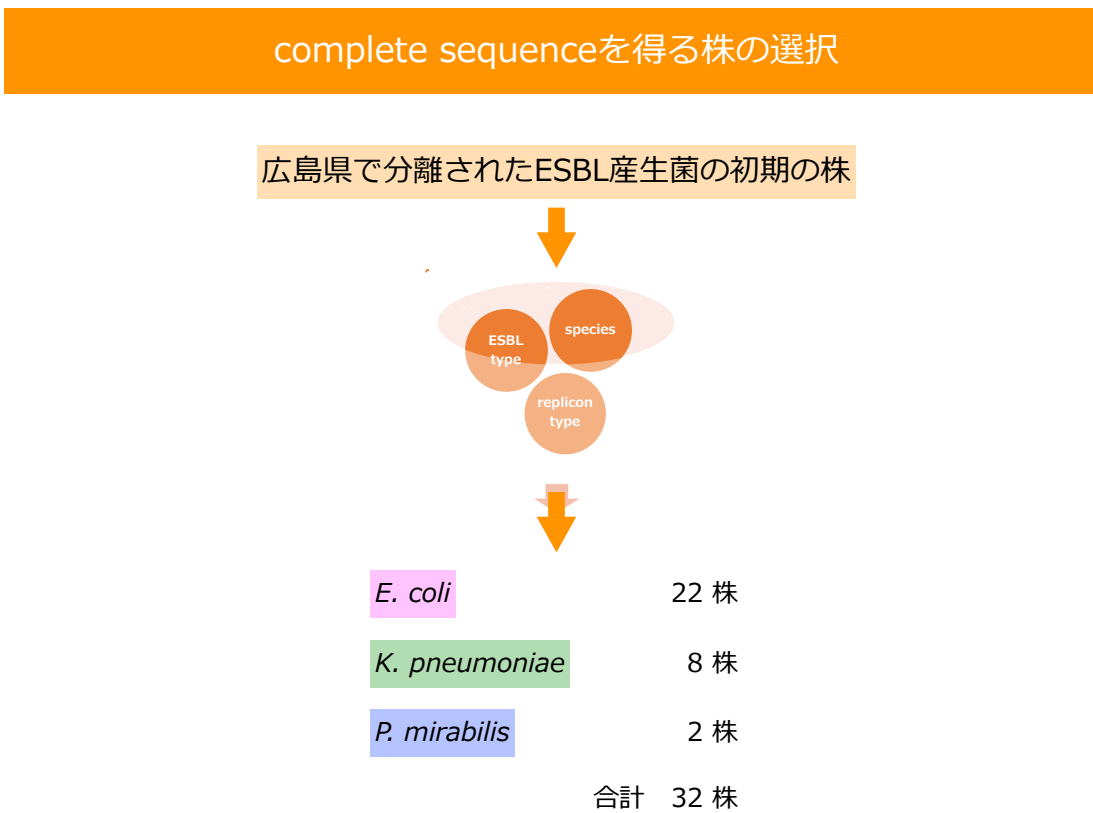


図 3

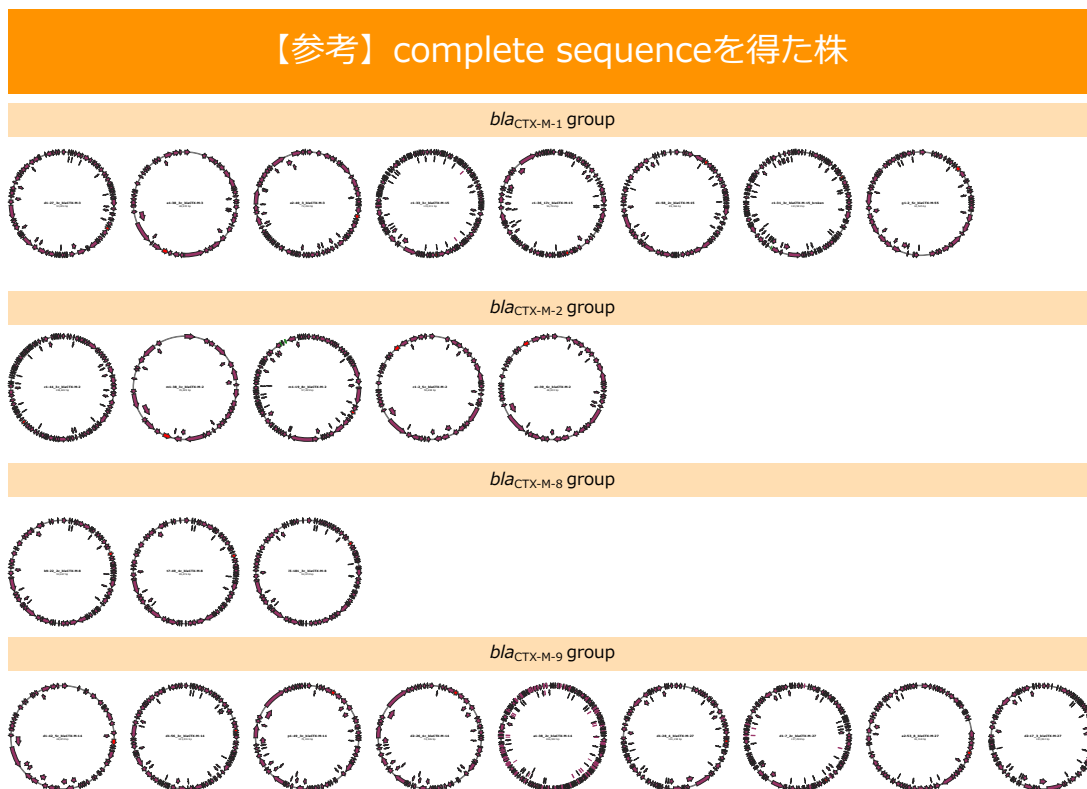


図 4

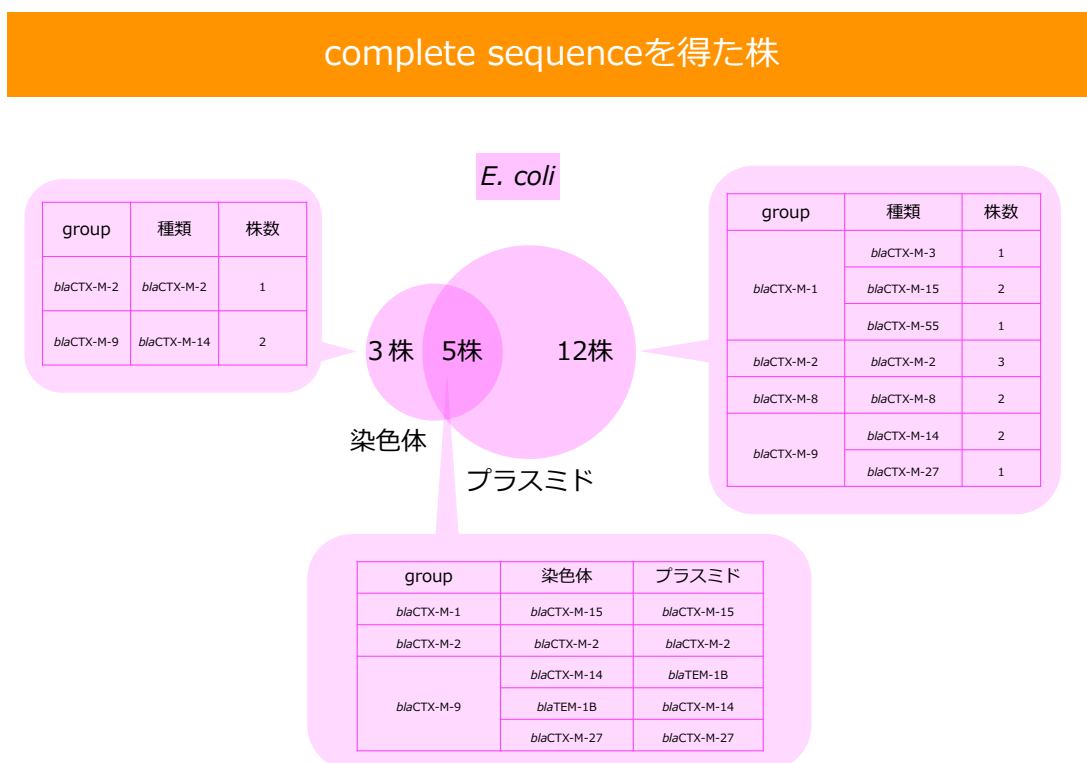


図 5

complete sequenceを得た株

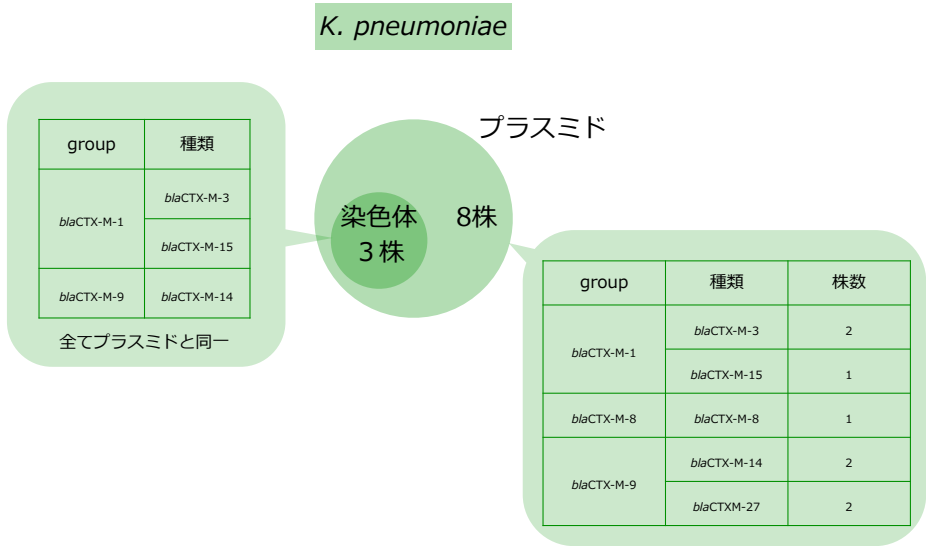


図 6

IncN plasmidの比較

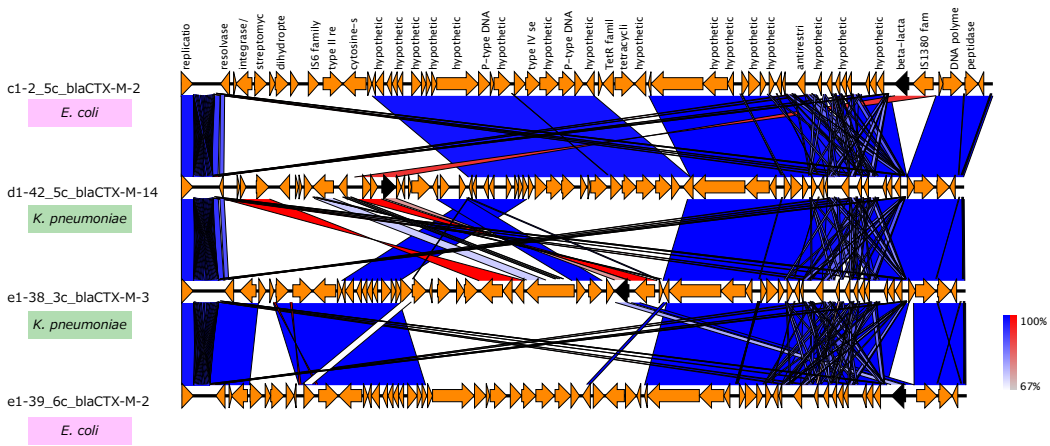
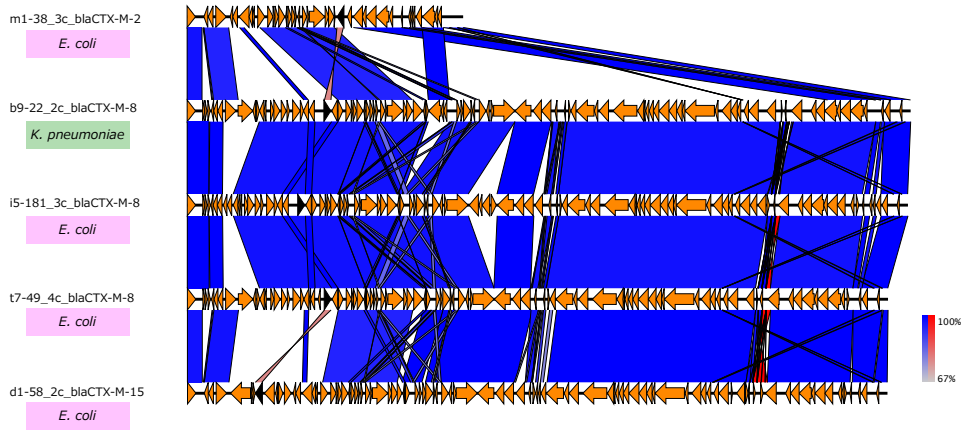


図 7

IncI1 plasmidの比較



医療施設と菌種は異なるが、b9-22とt7-49は相同性が高い

図 8

IncB/O/K/Z plasmidの比較

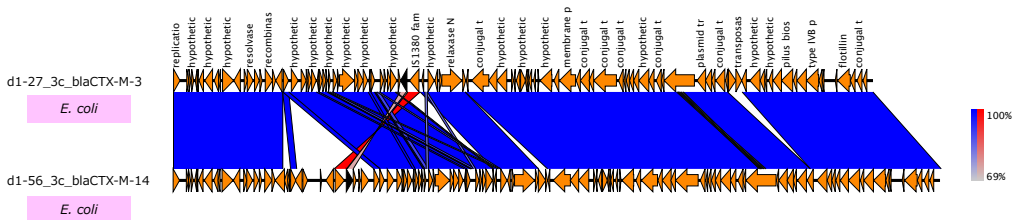


図 9

IncFII plasmidの比較

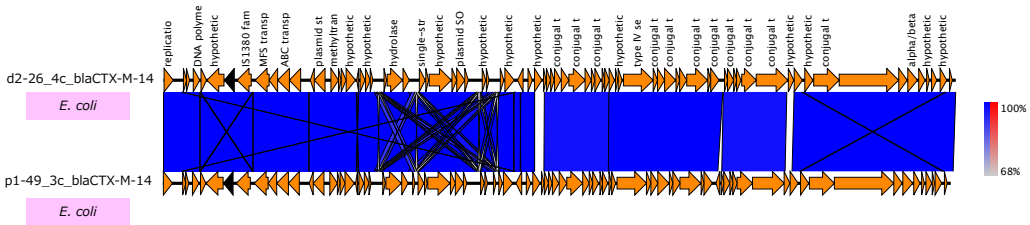
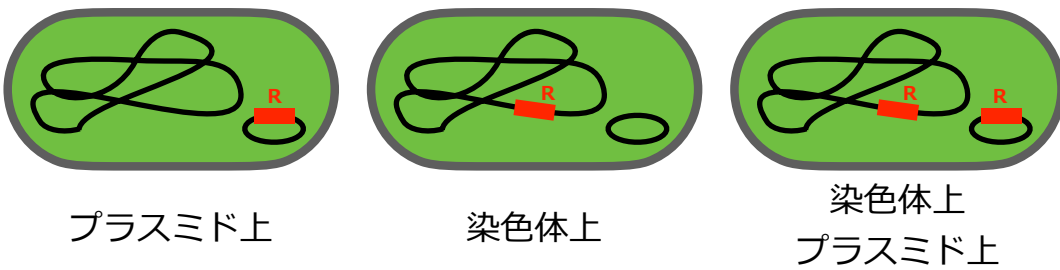


図 10

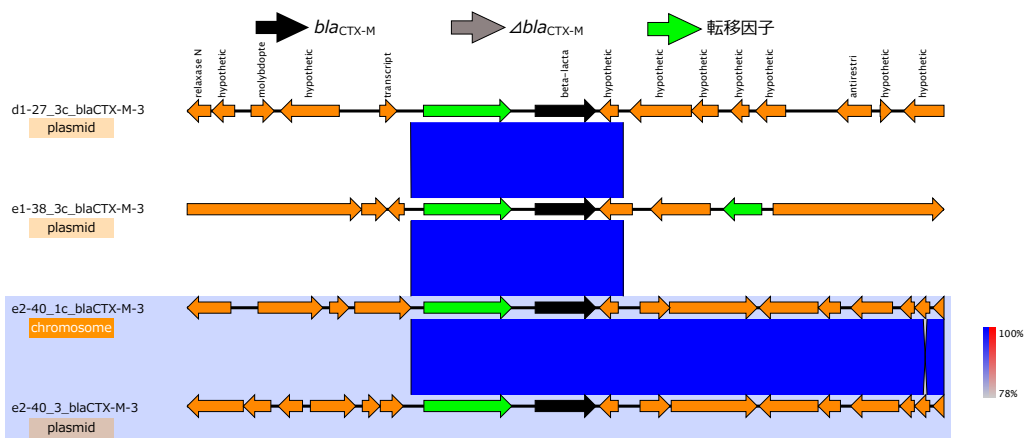
*bla*_{CTX-M}の周辺構造は？



プラスミド上と染色体上の塩基配列比較するため、
*bla*_{CTX-M}の5 kb周辺配列を比較

図 1 1

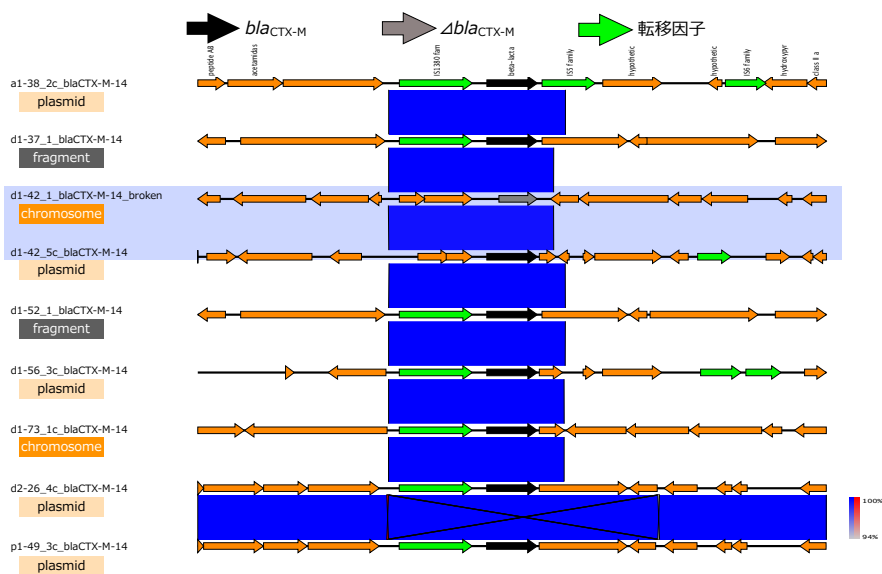
bla_{CTX-M-3}の周辺構造



bla_{CTX-M-3}の5'側にはISEcp1が認められたが
それ以外の構造は大きく異なっていた。

図 1 2

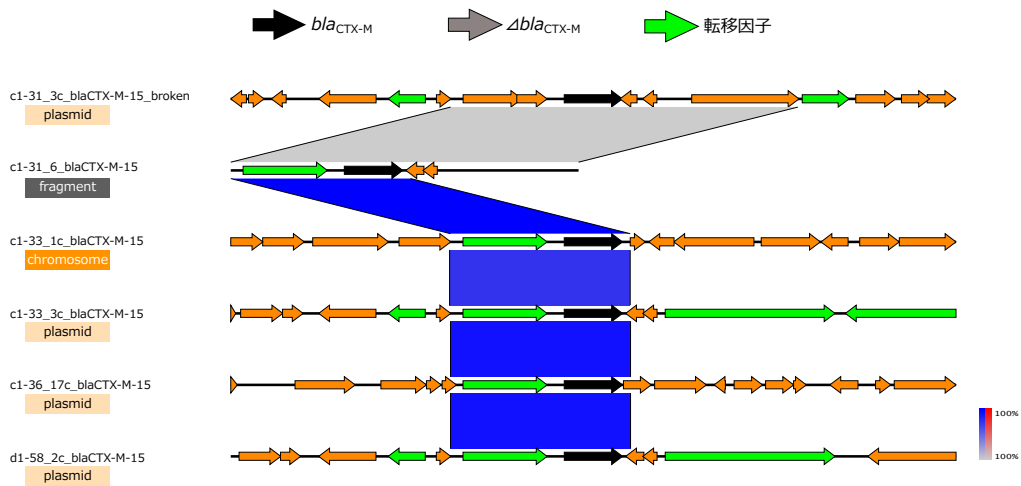
bla_{CTX-M-14}の周辺構造



bla_{CTX-M-14}の5'側にはISEcp1が存在し、その周辺は異なる

図 1 3

bla_{CTX-M-15}の周辺構造



bla_{CTX-M-15}の5'側にはISEcp1が存在し、その周辺は異なる

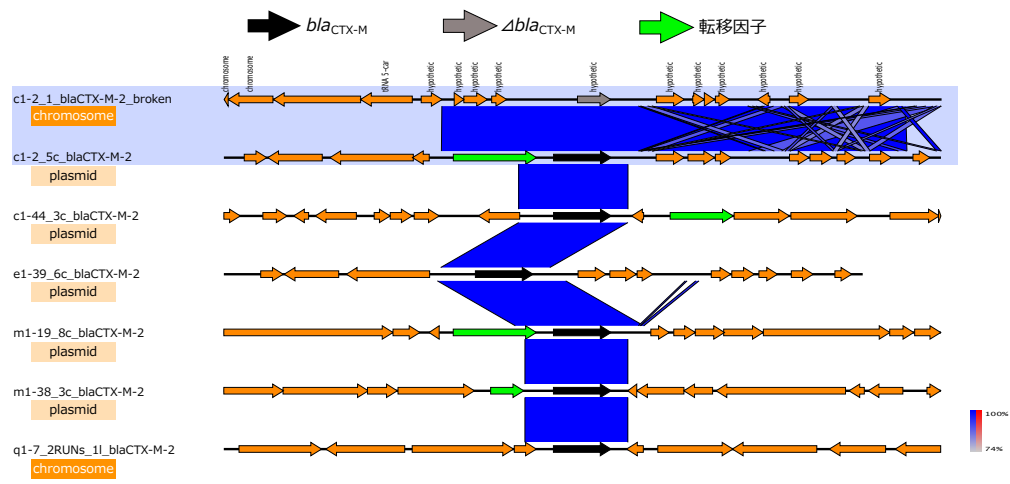
図 1 4

bla_{CTX-M-55}の周辺構造



図 1 5

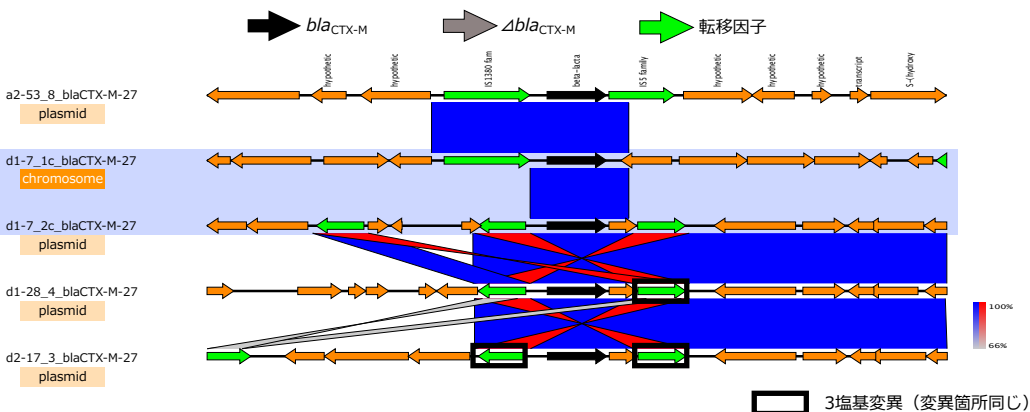
bla_{CTX-M-2}の周辺構造



bla_{CTX-M-2}の5'側にISEcp1が存在したのは2株。
 その他のクローンの周辺構造は多様だった。
 (IS26の関与は無さそう)

図 1 6

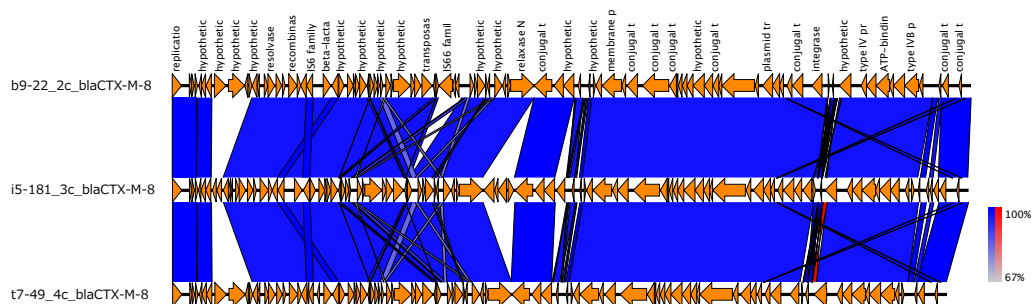
bla_{CTX-M-27}の周辺構造



bla_{CTX-M-27}の周辺は
 5'-側にISEcp1が存在するもの
 5'-, 3'-側にIS26（一部で変異あり）が存在するもの
 が認められた

図 1 7

広島由来 *bla*_{CTX-M-8}保有プラスミドの比較

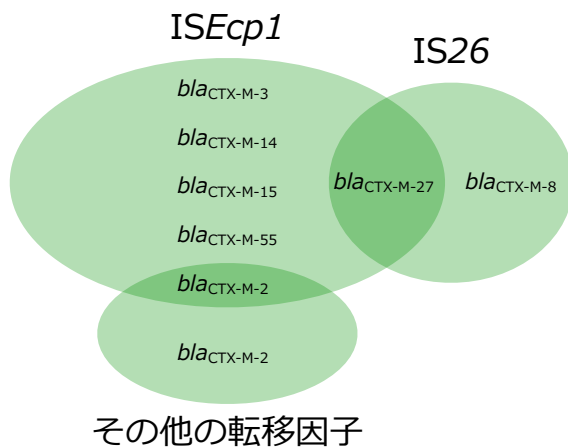


	菌種	MLST	Incl1_1_Alpha
m1-38_3_blaCTX-M-2	<i>E. c</i>	4360	100
b9-22_2c_blaCTX-M-8	<i>K. p</i>	200	100
i5-181_3c_blaCTX-M-8	<i>E. c</i>	48	100
t7-49_4c_blaCTX-M-8	<i>E. c</i>	131	100
d1-58_2c_blaCTX-M-15	<i>E. c</i>	4566	100

広島由来 *bla*_{CTX-M-8}保有 plasmid は、比較的高い相同性を維持していた。

図 1 8

*bla*_{CTX-M}と周辺の転移因子



*bla*_{CTX-M}周辺に存在する転移因子は、ISEcp1が最も多い？

表 1 共同研究機関で分離された薬剤耐性菌の NGS 解析結果および論文投稿状況

Strain name	Species	Isolation Source	解析状況
48-1 (Kpu48)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{SHV-27}</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>) : length=5154267 (incomplete) plasmid (<i>dfrA7</i> , <i>sul1</i>) : length=222698 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1B}</i>) : length=30445 (complete)
48-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{SHV-27}</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>) : length=5396391 (incomplete) plasmid (<i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>) : length=222732 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1B}</i>) : length=30433 (complete)
59	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>aadA7</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>qnrA1</i> , <i>bla_{OXA-10}</i>) : length=4223152 (complete) plasmid (<i>floR</i>) : length=6972 (complete)
96	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>aadA7</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>qnrA1</i> , <i>bla_{OXA-10}</i>) : length=4193451 (incomplete) plasmid (<i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>floR</i>) : length=112932 (complete) plasmid : length=9035 (complete)
105	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome : length=4059013 (incomplete) plasmid : length=9008 (complete) plasmid : length=3446 (complete)
218	<i>Providencia stuartii</i>	Clinical	chromosome : length=4467400 (complete)
301A	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>) : length=4202900 (complete)
126	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>aadA2</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>) : length=4128302 (complete) plasmid : length=6314 (complete)
LM22-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Food (chicken)	chromosome (<i>bla_{SHV-71}</i>) : length=5293597 (complete) plasmid (<i>bla_{VIM-1}</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>dfrA1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{CTX-M-9}</i> , <i>mcr-9</i>) : length=281251 (complete) plasmid (<i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{TEM-1A}</i> , <i>bla_{OXA-9}</i>) : length=124214 (complete)
65-VIM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical	plasmid (<i>bla_{VIM-28}</i>) : length=66324 (complete)
56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{GES-1}</i>) : length=6955839 (incomplete) plasmid (<i>bla_{VIM-28}</i>) : length=360340 (complete)
71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{GES-1}</i> , <i>bla_{OXA-488}</i>) : length=4333331 (incomplete) plasmid (<i>bla_{VIM-28}</i>) : length=361985 (complete) plasmid : length=191992 (complete) plasmid : length=6889 (complete)
37	<i>Enterobacter cloacae</i>	Food (beef)	chromosome : length=4673152 (complete) plasmid (<i>bla_{VIM-1}</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> , <i>mcr-9</i>) : length=270915 (complete) plasmid : length=129016 (complete) plasmid : length=108277 (complete) plasmid : length=6851 (complete)
42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Food (minced meat)	chromosome (<i>bla_{OXA-488}</i>) : length=4020969 (incomplete); (<i>bla_{VIM-24}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>sul1</i>) : length=1146675 (incomplete) plasmid : length=193321 (complete) plasmid : length=6901 (complete)
Kpn AO15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vegetable (organicitalian parsley)	chromosome (<i>bla_{SHV-28}</i>) : length=5273076 (complete) plasmid (<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{TEM-1A}</i>) : length=201745 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1A}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{OXA-9}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>aac(6')-Ib</i>) : length=122804 (complete) plasmid (<i>bla_{CTX-M-14b}</i>) : length=67119 (complete) plasmid : length=9294 (complete)
Kpn AO22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vegetable (organicbaby leaf mix)	chromosome (<i>bla_{SHV-28}</i>) : length=5270888 (complete) plasmid (<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{TEM-1A}</i>) : length=201745 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1A}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{OXA-9}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>aac(6')-Ib</i>) : length=122804 (complete) plasmid (<i>bla_{CTX-M-14b}</i>) : length=67119 (complete) plasmid : length=9294 (complete)
Aba AO22	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Vegetable (organicbaby leaf mix)	chromosome (<i>bla_{ADC-25}</i> , <i>bla_{OXA-66}</i>) : length=3954640 (complete) plasmid : length=110967 (complete) plasmid (<i>bla_{OXA-72}</i>) : length=10880 (complete)

■ : 論文accepted

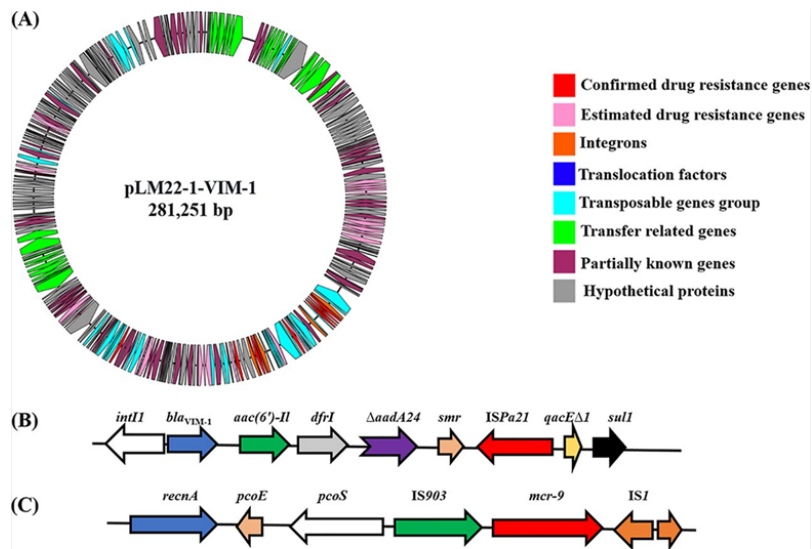


FIG 1 Analysis of the IncHI2A plasmid pLM22-1-VIM-1 carried by the foodborne carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strain LM-22-1. (A) Circular map of pLM22-1-VIM-1. (B) The genetic environment of the *bla*_{VIM-1} gene, which lies within a class 1 integron. (C) Genetic context of the *mcr-9* gene.

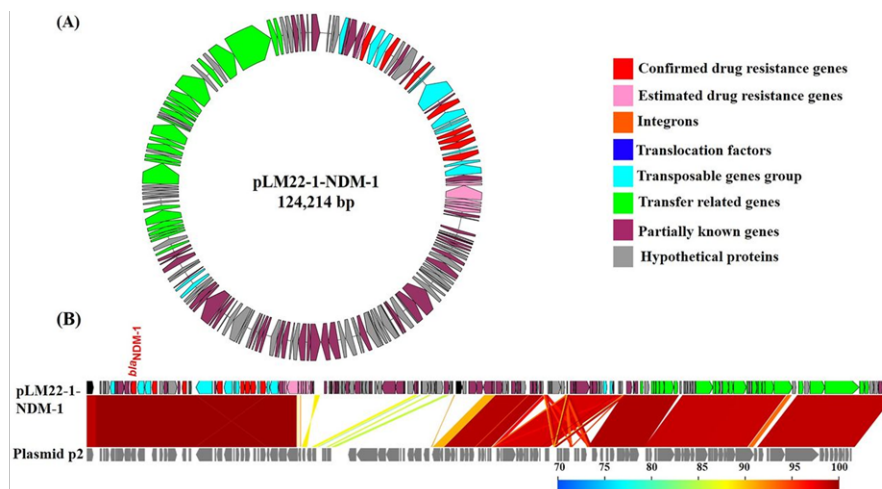


FIG 2 Analysis of the IncFII(K) plasmid pLM22-1-NDM-1 carried by the foodborne carbapenem-producing *K. pneumoniae* strain LM-22-1. (A) Circular map of pLM22-1-NDM-1. (B) Comparative sequence analysis of the *bla*_{NDM-1}-encoding plasmid pLM22-1-NDM-1 to a related *bla*_{NDM-1} IncF plasmid p2 (GenBank accession number CP009115.1) harbored by another *K. pneumoniae* strain.

chromosome

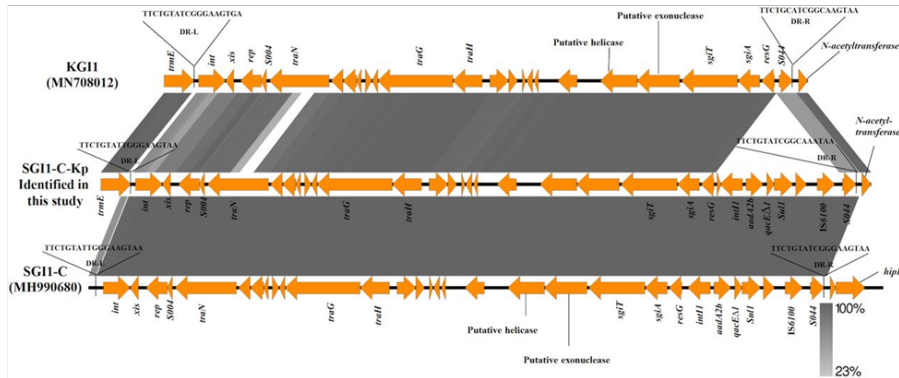


FIG 1 Schematic representation of SG11-C-Kp from *K. pneumoniae* strain Kpu48. Sequence comparison between SG11-C-Kp, SG11-C (GenBank accession no. MH990680), and Klebsiella genomic island 1 (KG11) (GenBank accession no. MN708012). SG11-C-Kp is inserted between the chromosomal genes (*trmE* and N-acetyltransferase encoding gene). KG11 is another SG11-related element lacking integrons and detected during an in silico analysis in *K. pneumoniae* isolates from the United Kingdom. Genes and ORFs are shown as arrows, with their transcriptional orientations indicated by arrowheads. Right direct repeat (DR-R) and left direct repeat (DR-L) are shown as 18 bp flanking SG11. Figure was drawn using the EasyFig tool (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>).

Ahmed M. Soliman et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2020; doi:10.1128/AAC.01055-20

plasmids

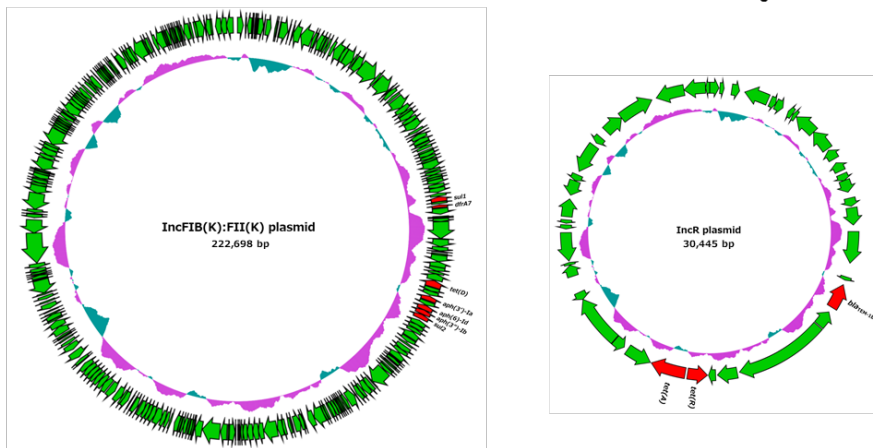


Table 1. Characteristics of chromosome and plasmids harbored by *E. hormaechei* MS37.

Genetic Element	Size (bp)	MLST	pMLST	Plasmid Incompatibility Group	Antibiotic Resistance Genet(s)
Chromosome	4,673,152	ST279	NA	NA	<i>fosA</i> , <i>bla</i> _{ACT-16}
pMS37a	270,915	NA	ST1	IncHI2/IncHI2A	<i>sul1</i> , <i>mcr-9</i> , <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>tet(A)</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-II</i> , Δ <i>aadA22</i> , <i>dfrA1</i>
pMS37b	129,016	NA	Unknown	IncC	NA
pMS37c	108,277	NA	Unknown	IncFIB	NA
pMS37d	6851	NA	Unknown	ColR/NAI	NA

NA, not applicable.

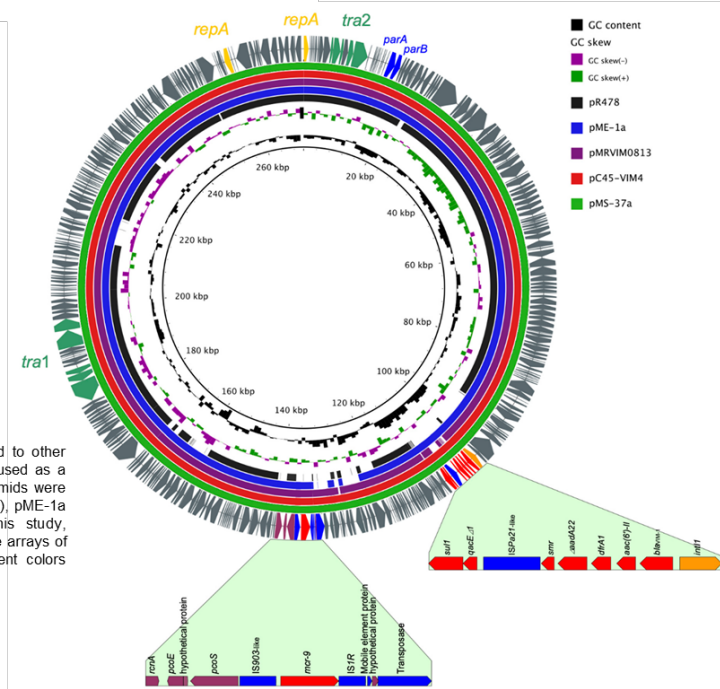


Figure 1. Circular map of blaVIM-1 and mcr-9-coharbouring IncHI2 plasmid compared to other reported similar plasmids. The complete sequence of pMS37a (the outer circle) was used as a reference plasmid. The circular maps were generated using the BRIG software and plasmids were included in the following order (inner to outer circles): pR478 (GenBank ID: BX664015.1), pME-1a (CP041734), pMRVIM0813 (KP975077), pC45-VIM4 (LT991958), and pMS37a (this study, accession no. CP053191). The resistance loci were highlighted in full (the gene cassette arrays of class 1 integron and the genetic structure surrounding the mcr-9 gene). The different colors indicate different plasmids and are listed in the color key.

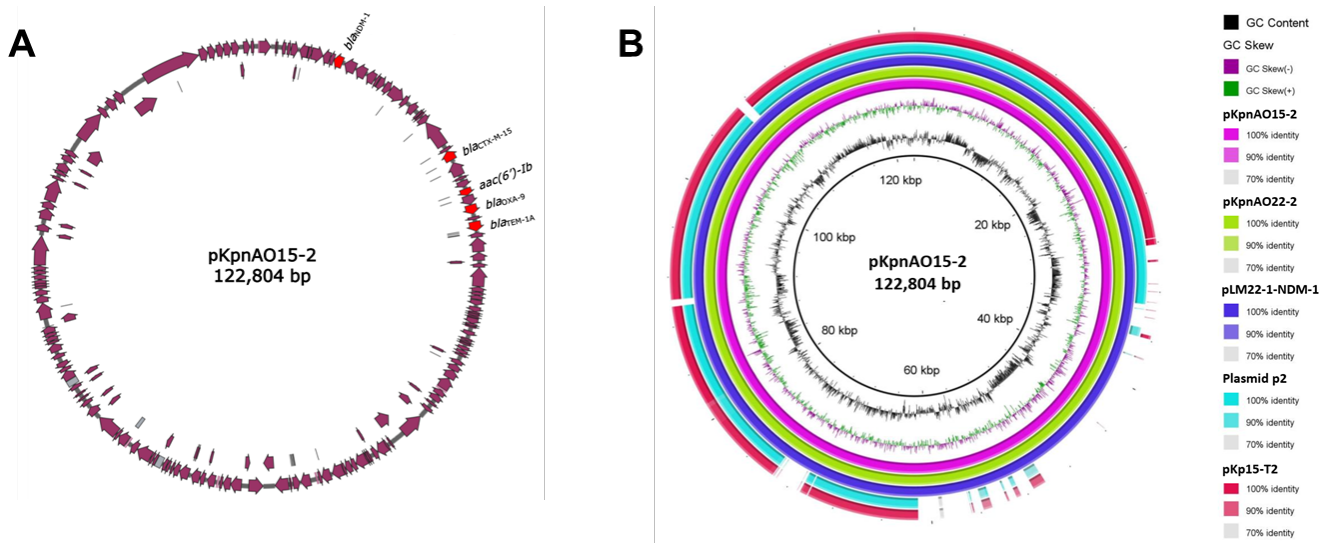


FIG 1. Plasmid structure of pKpnAO15-2, and pKpnAO22-2 identified in this study and comparison with other similar plasmids. Both the plasmids were IncFII(K):IncR-type of 122,804 bp in length and shared >99.99% nucleotide identity (A). Genes and open reading frames (ORFs) are shown as arrows with their transcriptional orientations indicated by arrowheads. This figure was generated using the BRIG tool (<http://brig.sourceforge.net/>) (B). The whole sequence of pKpnAO15-2 was used as a reference. The plasmids were included in the following order: pKpnAO15-2 (identified in this study), pKpnAO22-2 (identified in this study), pLM22-1-NDM-1, plasmid p2 (CP009115.1), and plasmid pKp15-T2 (MN657248.1) (B).

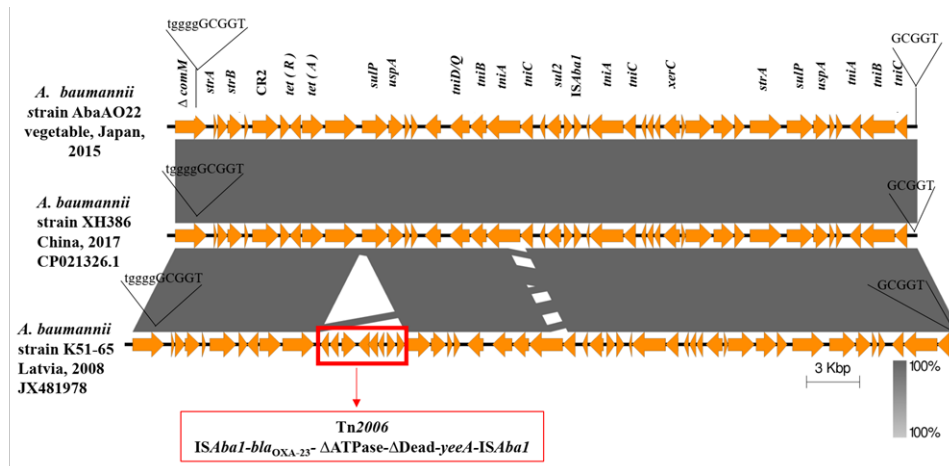
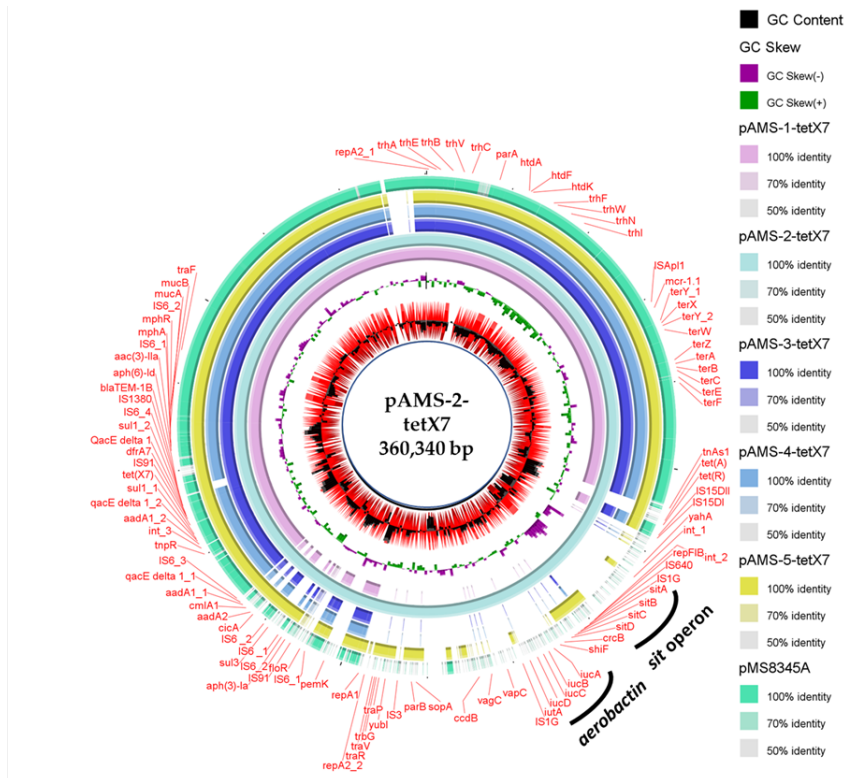


FIG 3. Genetic structures of AbaR4-AO22 and other related AbaR4-like GIs. Genes and open reading frames (ORFs) are shown as arrows with their transcriptional orientations indicated by arrowheads. The figure was drawn using the EasyFig tool (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>). AbaR4-AO22 was integrated into the chromosomal comM gene and was flanked by a 5-bp target site duplication of 5'-GGGGT-3'. AbaR4-AO22 was identical to AbaR4 from *A. baumannii* strain XH386 (CP021326.1) but lacking Tn206 (IS.Aba1-blaOXA-23-ΔATPase-ΔDead-yeaA-IS.Aba1) identified in AbaR25 (JX481978).



Schematic representation of IncHI2 plasmids carrying tet(X7) and mcr-1.1 (A), the genetic environment of tet(X7) (B), and IncFII plasmids carrying fosA4 (C) identified from the genome sequences of *E. coli* strains analyzed in this study. Only one IncHI2 plasmid, pMS8345A, carrying tet(X7) and mcr-1.1 from *E. coli* strain MS8345, Qatar (accession no. CP025402.1) have been detected from NCBI GenBank and was included in the figure. Linear comparison of the contigs carrying tet(X7) detected in this study with the chromosomal contig carrying tet(X7) from *Pseudomonas aeruginosa* strain Pa-3, Pakistan (accession no. JAATVZ010000055.1) and part of the IncHI2 plasmid, pMS8345A, carrying tet(X7) from *E. coli* strain MS8345, Qatar (accession no. CP025402.1).