

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）
令和2年度 分担研究報告書

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 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

日本と世界各国の薬剤耐性の状況を比較するために、JANIS のデータを WHO GLASS が求める方式で集計可能にすると同時に、その重複処理の方式の違いが集計値にどの程度の影響を与えるのかを明らかにする。その上で、WHO GLASS 方式で集計したデータを一般に公開する。

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。

日本国内外の研究機関との共同研究にて、ESBL 産生株、カルバペネマーゼ産生株、および *mcr* 遺伝子保有株の遺伝子検査を行う。また、共同研究を通じて、臨床上問題となる薬剤耐性菌感染症の発生状況および動向を把握し、将来的に新たな予防・治療法等の開発へ貢献も試みる。

B. 研究方法

JANISデータの統計法に基づく研究利用申請を行った上で、GLASSの求める検査材料別の重複処理を行う機能を開発し、JANIS方式の重複処理を行った場合と集計値を比較する。さらに、WHO GLASS方式で都道府県単位での集計も行い、集計データをWebから閲覧可能にする。

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。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。

共同研究機関にて臨床、食肉、野菜から分離された薬剤耐性菌を対象に、Illumina社のショートリードシーケンサーMiniSeq/MiSeq/HiSeqおよびOxford Nanopore Technologies社のロングリードシーケンサーMinION/GridIONを用いて、一塩基多型(SNP)による系統樹解析、染色体やプラスミド上の薬剤耐性遺伝子の詳細な解析を行う。

C. 研究結果

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ISEcpIが共通して認められ、ISEcpI-*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

ならず *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 1 5)。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 1 6)。このように、周辺に *IS26* が存在するタイプとして *bla_{CTX-M-8}* があつた (図 1 7)。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同一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 1 8)。*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。

共同研究にて以下の薬剤耐性菌の解析を行い、研究結果が国際学術雑誌に掲載された (表 1)。

1) 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 *K. 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)。 (図 1 9)

2) *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 *K. 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)。 (図 2 0)

3) 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 *E. hormaechei* MS37 株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)。 (図 2 1)

4) 国内のスーパーマーケットの野菜から分離された *K. pneumoniae* A015、A022 について、*bla_{NDM-1}*、*bla_{CTX-M-15}*、*bla_{TEM-1A}* を持つ IncFII (K) : IncP プラスミドの比較解析を行ったところ、以前国産食肉か

ら分離された *K. pneumoniae* のプラスミド pLM22-1-NDM-1 と同一性が高いことが分かった。このプラスミドを保有する *K. pneumoniae* は野菜由来として日本で初めて報告された。また、*A. baumannii* A022 の染色体に AbaR4-like genomic resistance island (GI) が存在することが明らかにした。 (Applied and Environmental Microbiology, in press) (図 2 2)

5) 2019 年エジプトで鳥の糞便から分離された 5 株の *E. coli* に、*tet(X7)* と *mcr-1.1* を同時に保有する IncHI2:HI2A プラスミドが検出された。鳥由来の大腸菌での報告が世界で初めてであった (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Revision)。 (図 2 3)

D. 考察

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。

共同研究で得られた結果は、日本において食品由来のカルバペネマーゼ産生菌が分離された最初の例を含み、食品におけるカルバペネム耐性菌のリスク評価をする必要があることが明らかとなった。

E. 結論

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toshiki Kajihara, Koji Yahara, Sergey Romualdovich Eremin, Barbara Tornimben e, 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
- 2) Hiroki Kitagawa, Hiroki Ohge, Liansheng Yu, Shizuo Kayama, Toshinori Hara, Seiya Kashiyama, Toshiki Kajihara, Junzo Hisatsune, Taijiro Sueda, Motoyuki Sugai. *Aeromonas dhakensis* is not a rar

- e cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan. *J Infect Chemother*, 2020 Feb;26(2):316-320. doi: 10.1016/j.jiac.2019.08.020.
- 3) 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), in press.
 - 4) Hazim O. Khalifa, Ahmed M. Soliman, Takashi Saito, Shizuo Kayama, Liansheng Yu, Junzo Hisatsune, Motoyuki Sugai, Hirofumi Nariya, Ashraf M. Ahmed, Toshi Shimamoto, Tetsuya Matsumoto, Tadashi Shimamoto. First Report of Foodborne *Klebsiella pneumoniae* Coharboring blaVIM-1, blaNDM-1, and *mcr-9*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug 2020, 64 (9) e00882-20; DOI: 10.1128/AAC.00882-20
 - 5) Ahmed M. Soliman, Hazem Ramadan, Eslam Ghazy, Liansheng Yu, Junzo Hisatsune, Shizuo Kayama, Motoyuki Sugai, Hirofumi Nariya, Toshi Shimamoto, Charlene R. Jackson, Tadashi Shimamoto. Emergence of Salmonella Genomic Island 1 Variant SGI1-C in a Multidrug-Resistant Clinical Isolate of *Klebsiella pneumoniae* ST485 from Egypt. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug 2020, 64 (9) e01055-20; DOI: 10.1128/AAC.01055-20
 - 6) Mustafa Sadek, Hirofumi Nariya, Toshi Shimamoto, Shizuo Kayama, Liansheng Yu, Junzo Hisatsune, Motoyuki Sugai, Patrice Nordmann, Laurent Poirel, and Tadashi Shimamoto. First Genomic Characterization of blaVIM-1 and *mcr-9*-Coharboring *Enterobacter hormaechei* Isolated from Food of Animal Origin. *Pathogens*, 2020 Aug 22;9(9):687. doi: 10.3390/pathogens909068
 - 7) 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 blaNDM-1, blaOXA-66, blaOXA-72, and AbaR4-like resistance island from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology* (AEM0216620R2), in press.
2. 学会発表
- Koji Yahara, Toshiki Kajihara, Sergey Romaldovich 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. *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 1

広島県で分離されたESBL産生菌 = 10,259 株

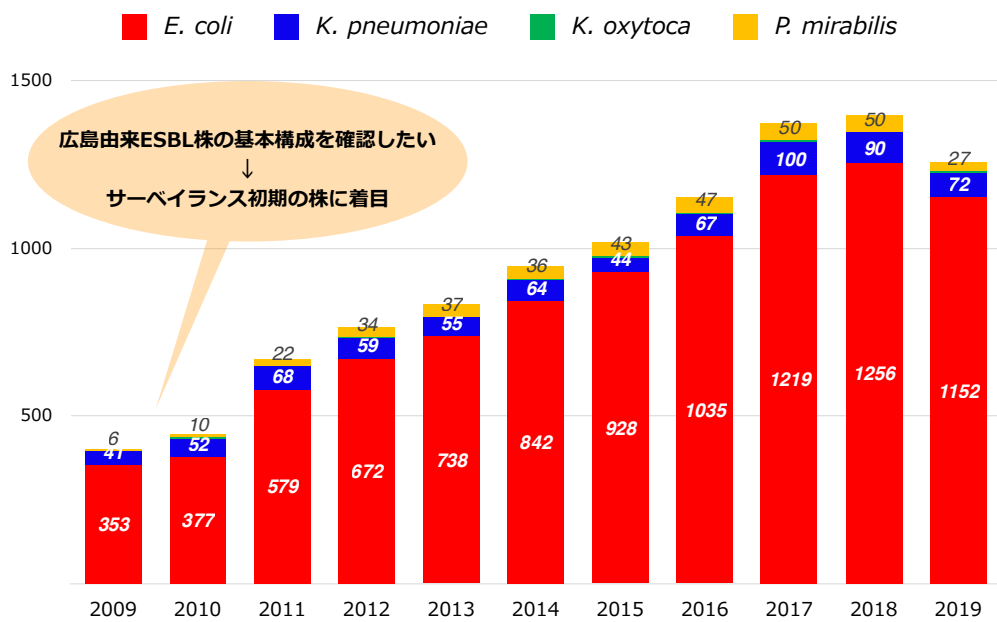


図 2

complete sequenceを得る株の選択

広島県で分離されたESBL産生菌の初期の株

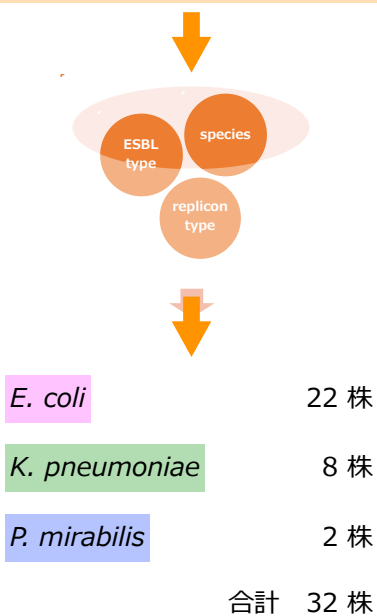


図 3

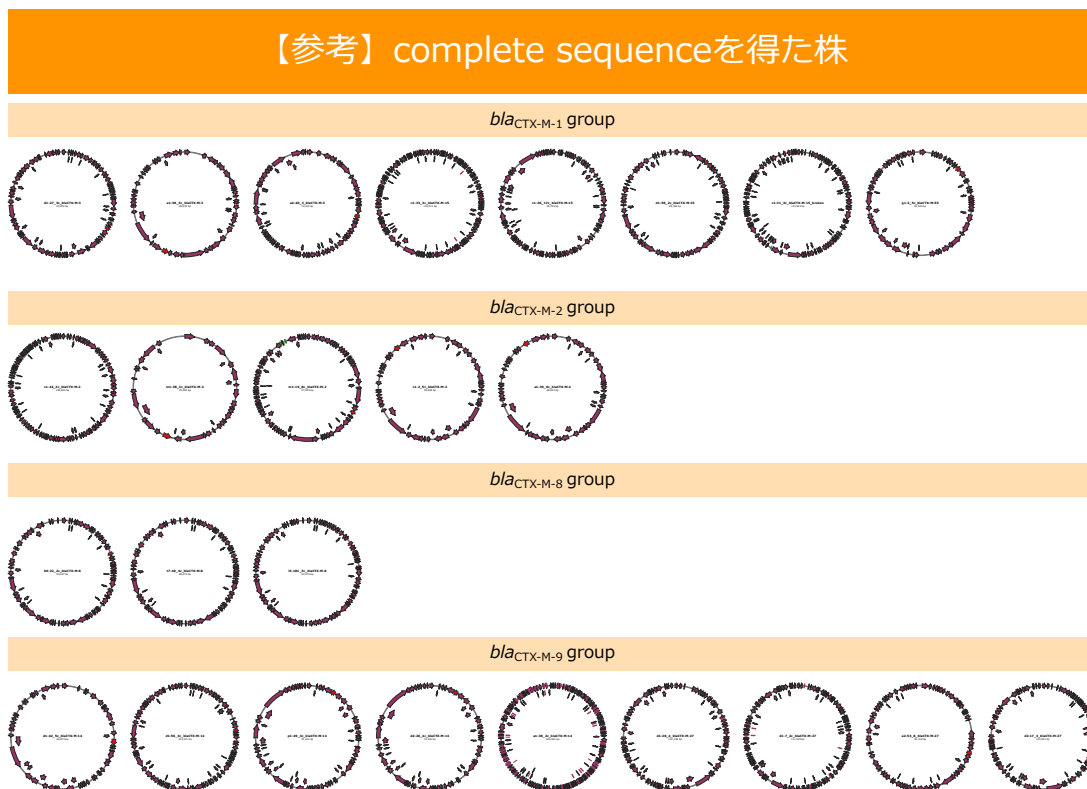


図 4

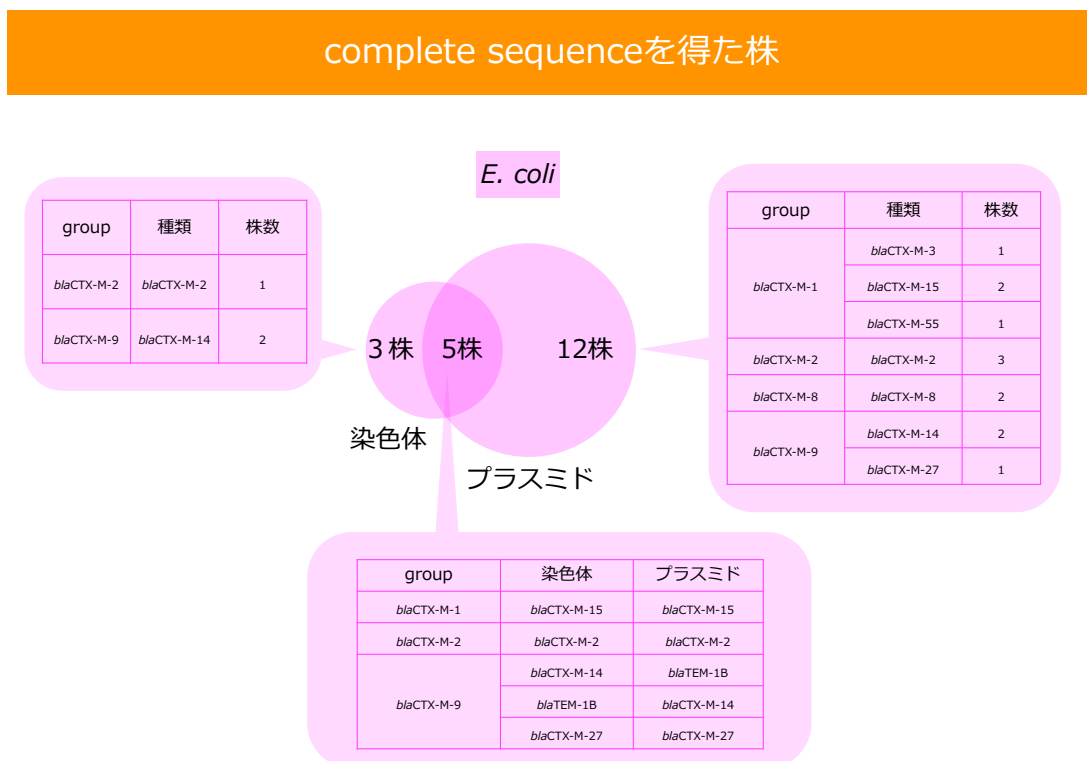


図 5

complete sequenceを得た株

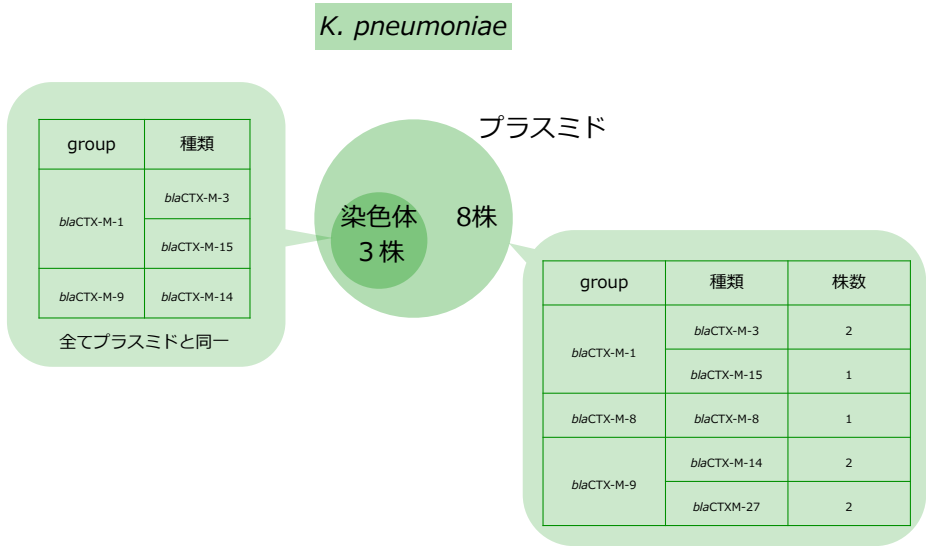


図 6

IncN plasmidの比較

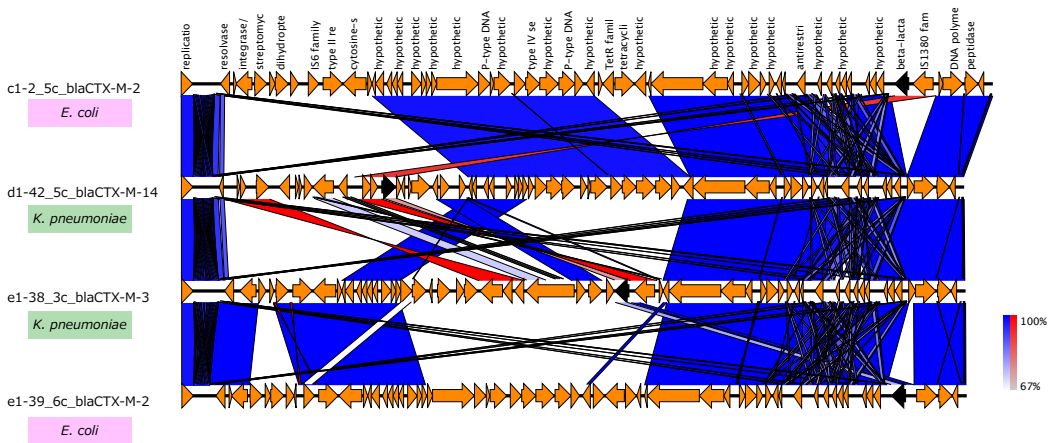
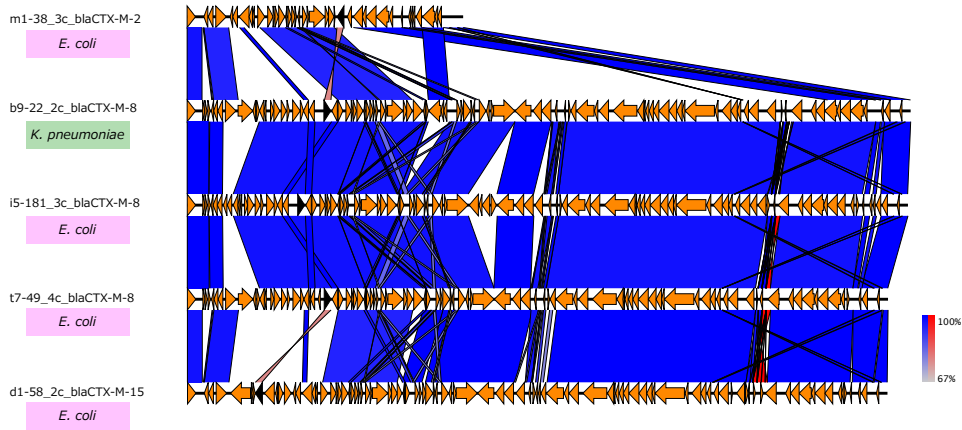


図 7

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

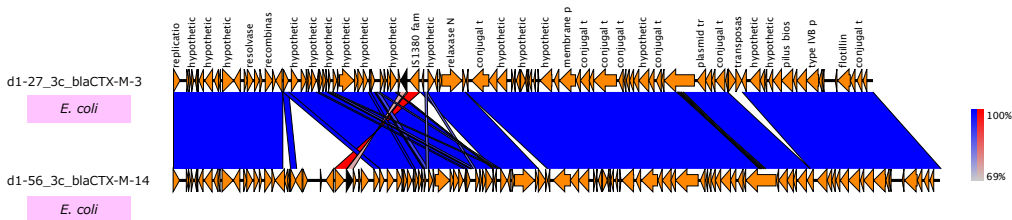


図 9

IncFII plasmidの比較

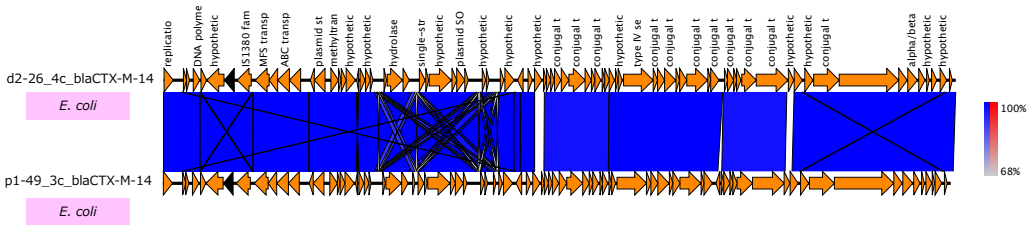
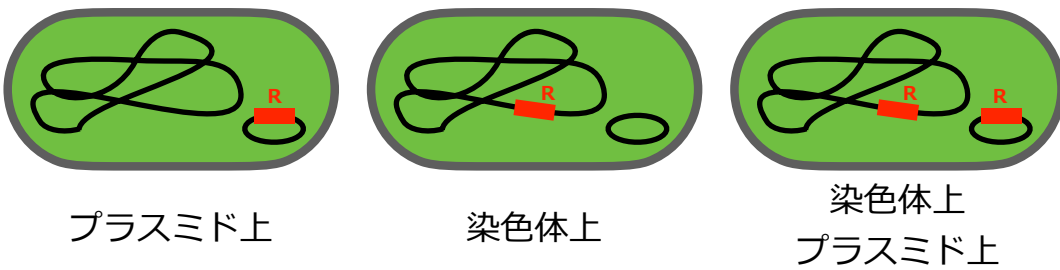


図 10

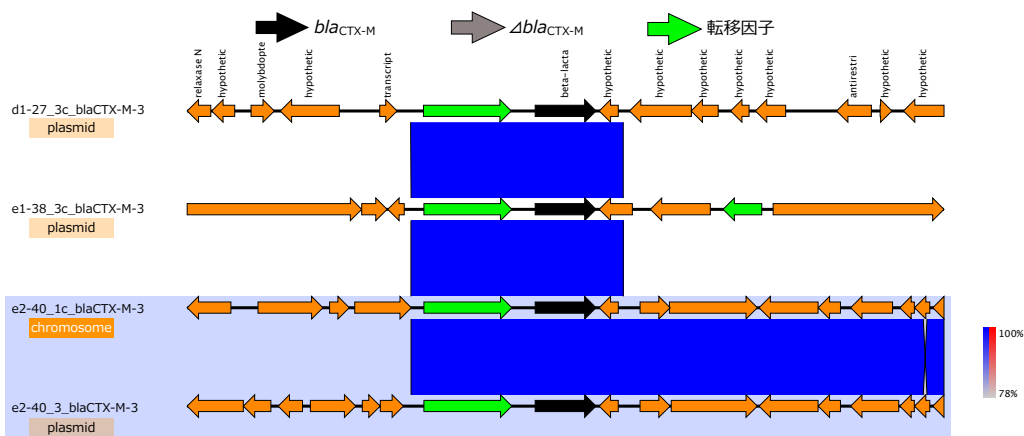
*bla*_{CTX-M}の周辺構造は？



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

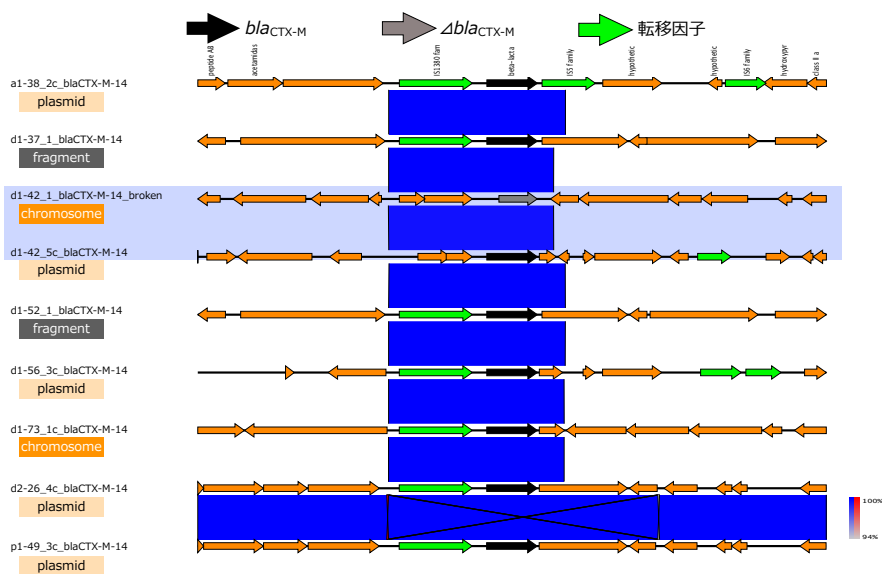
bla_{CTX-M-3}の周辺構造



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

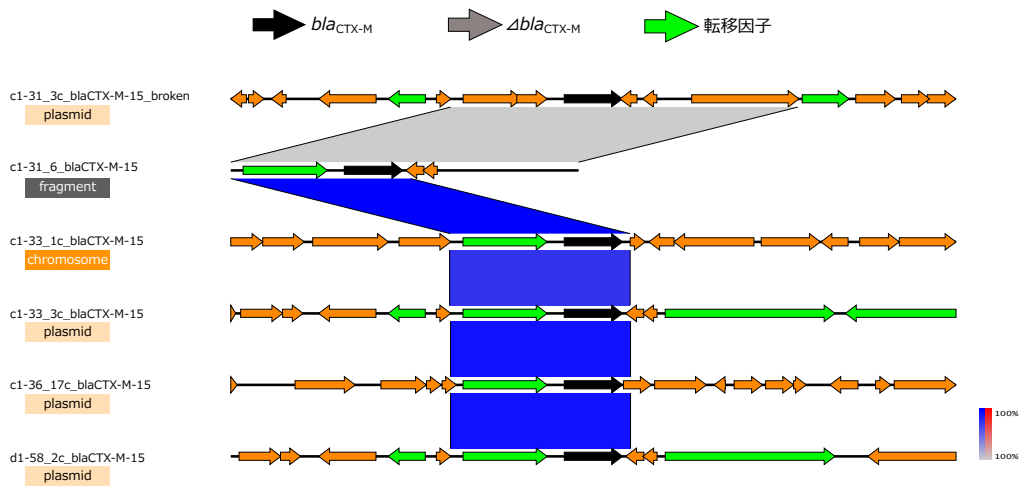
bla_{CTX-M-14}の周辺構造



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

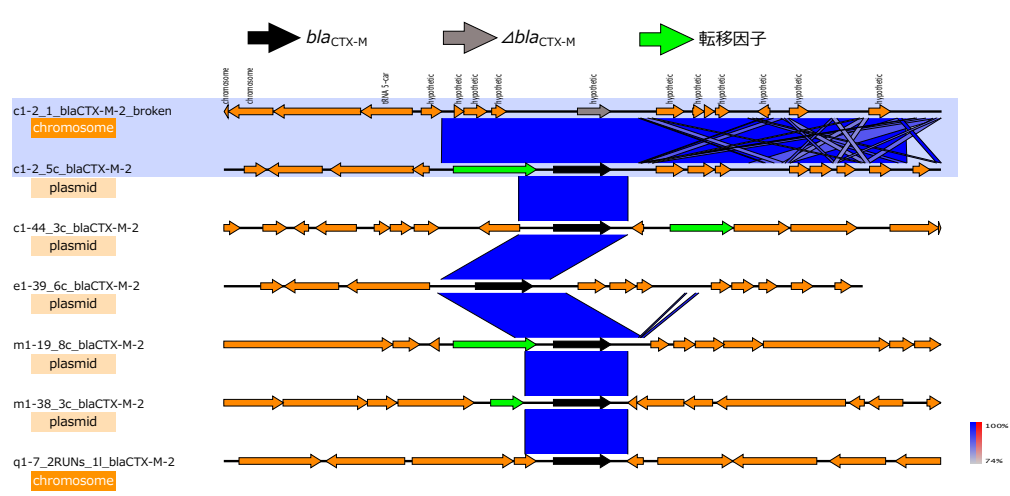
図 1 4

bla_{CTX-M-55}の周辺構造



図 1 5

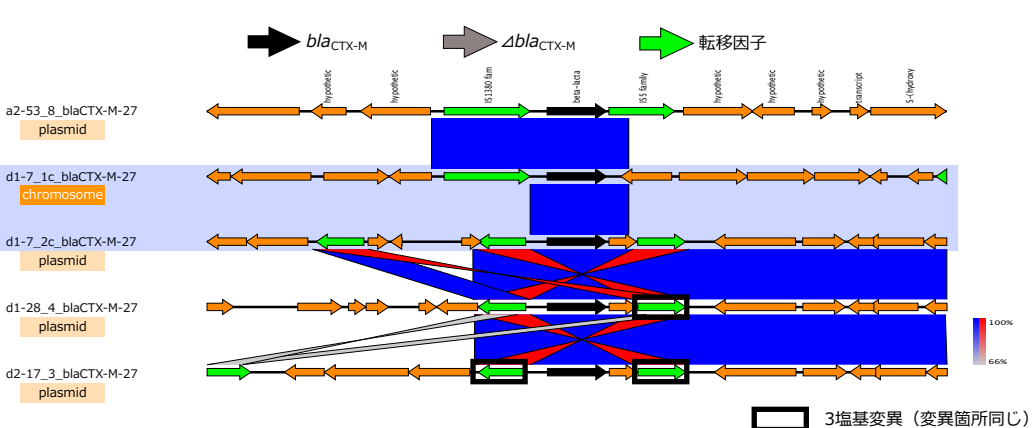
bla_{CTX-M-2}の周辺構造



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

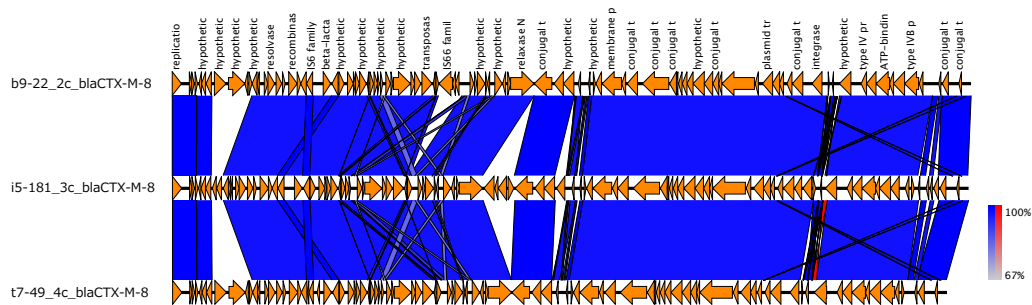
bla_{CTX-M-27}の周辺構造



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

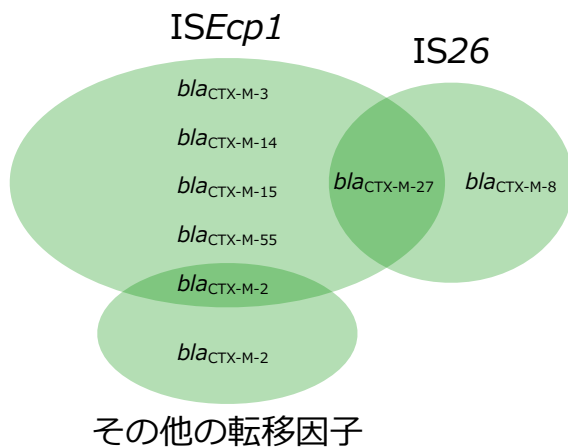


	菌種	MLST	Incl1_1_Alpha
m1-38_3_blaCTX-M-2	<i>E. c</i>	4360	100
b9-22_2c_blaCTX-M-8	<i>K. p</i>	200	100
i5-181_3c_blaCTX-M-8	<i>E. c</i>	48	100
t7-49_4c_blaCTX-M-8	<i>E. c</i>	131	100
d1-58_2c_blaCTX-M-15	<i>E. c</i>	4566	100

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

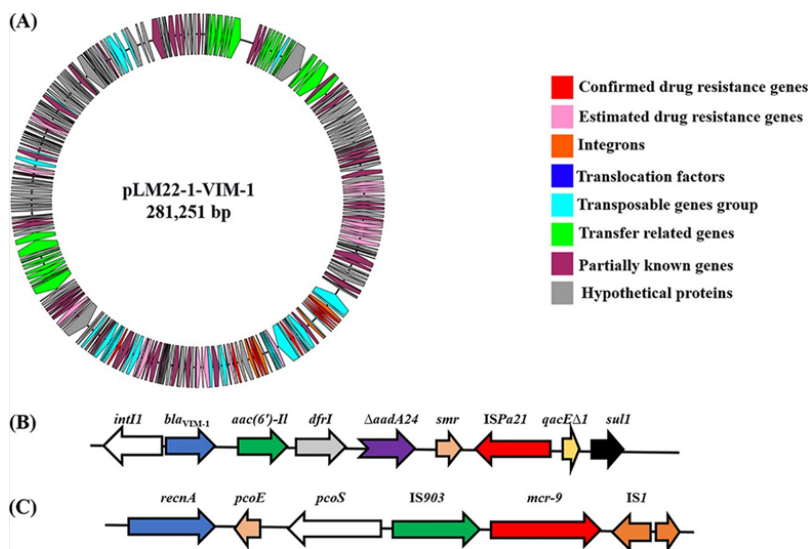


FIG 1 Analysis of the IncHI2A plasmid pLM22-1-VIM-1 carried by the foodborne carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strain LM-22-1. (A) Circular map of pLM22-1-VIM-1. (B) The genetic environment of the *bla*_{VIM-1} gene, which lies within a class 1 integron. (C) Genetic context of the *mcr-9* gene.

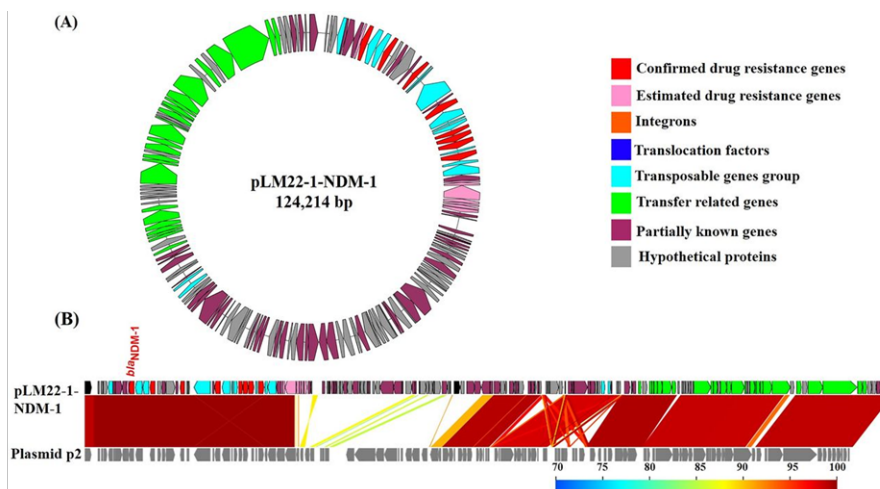


FIG 2 Analysis of the IncFII(K) plasmid pLM22-1-NDM-1 carried by the foodborne carbapenem-producing *K. pneumoniae* strain LM-22-1. (A) Circular map of pLM22-1-NDM-1. (B) Comparative sequence analysis of the *bla*_{NDM-1} encoding plasmid pLM22-1-NDM-1 to a related *bla*_{NDM-1} IncF plasmid p2 (GenBank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

chromosome

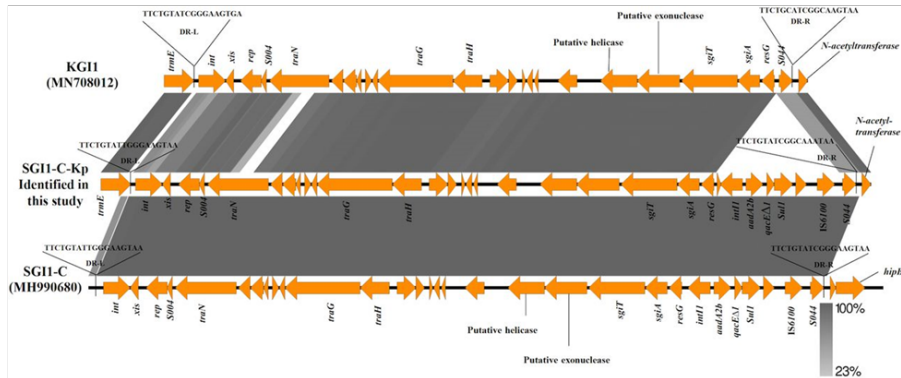


FIG 1 Schematic representation of SG11-C-Kp from *K. pneumoniae* strain Kpu48. Sequence comparison between SG11-C-Kp, SG11-C (GenBank accession no. MH990680), and Klebsiella genomic island 1 (KG11) (GenBank accession no. MN708012). SG11-C-Kp is inserted between the chromosomal genes (*trmE* and N-acetyltransferase 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

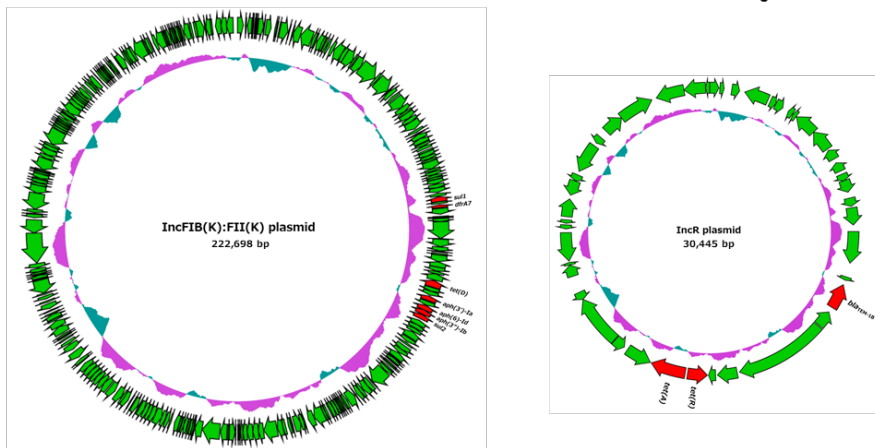


Table 1. Characteristics of chromosome and plasmids harbored by *E. hormaechei* MS37.

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.

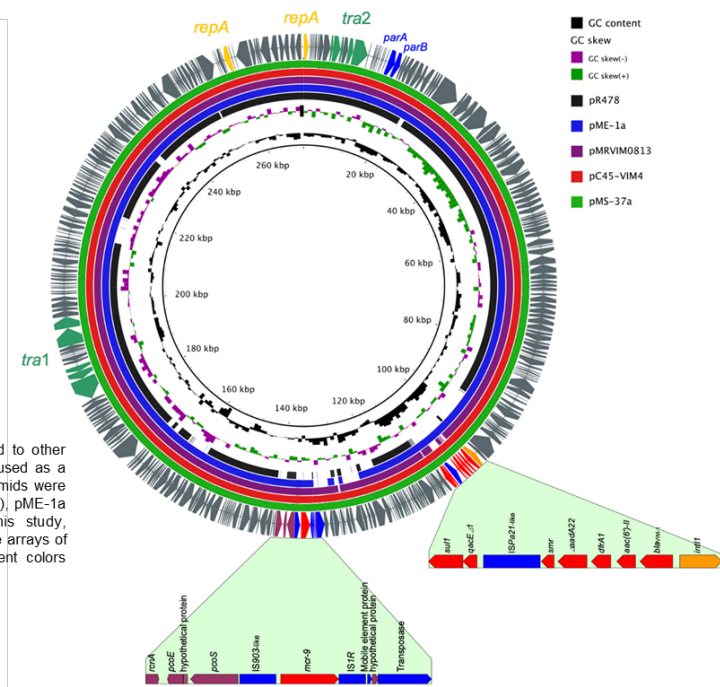


Figure 1. Circular map of blaVIM-1 and mcr-9-coharbouring IncHI2 plasmid compared to other reported similar plasmids. The complete sequence of pMS37a (the outer circle) was used as a reference plasmid. The circular maps were generated using the BRIG software and plasmids were included in the following 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.

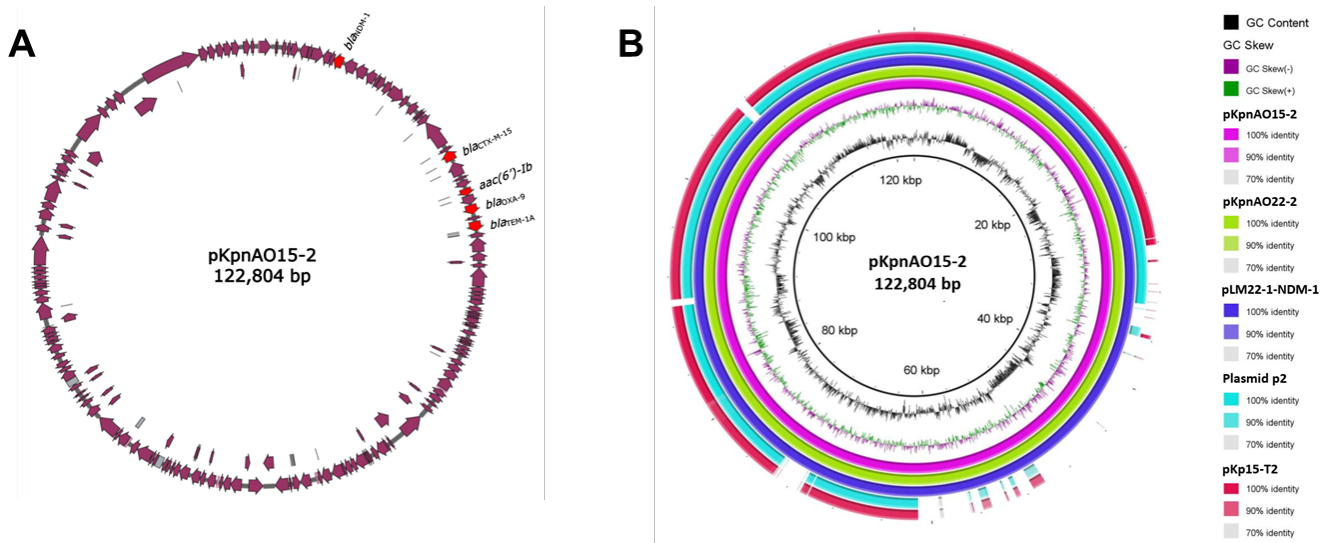


FIG 1. Plasmid structure of pKpnAO15-2, and pKpnAO22-2 identified in this study and comparison with other similar plasmids. Both the plasmids were IncFII(K):IncR-type of 122,804 bp in length and shared >99.99% nucleotide identity (A). Genes and open reading frames (ORFs) are shown as arrows with their 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).

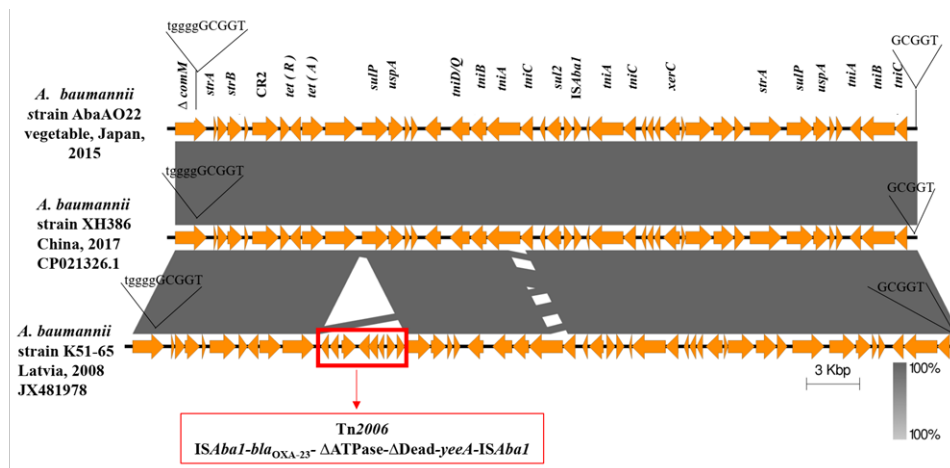
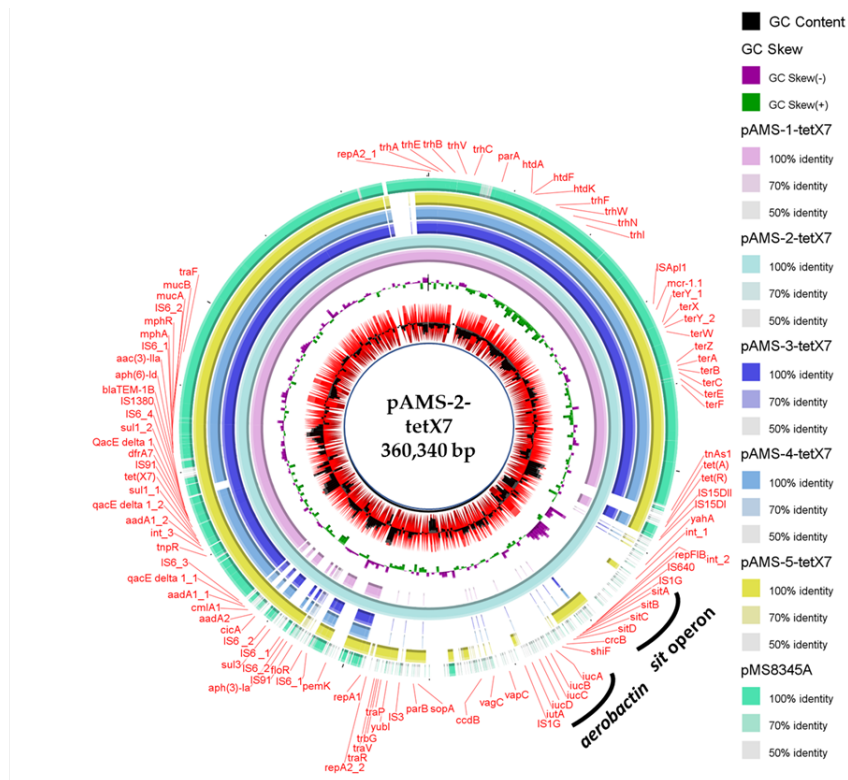


FIG 3. Genetic structures of AbaR4-AO22 and other related AbaR4-like GIs. Genes and open reading frames (ORFs) are shown as arrows with their transcriptional orientations indicated by arrowheads. The figure was drawn using the EasyFig tool (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>). AbaR4-AO22 was integrated into the chromosomal comM gene and was flanked by a 5-bp target site duplication of 5'-GCGGT-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).