

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目

Dissemination of IncF group F1:A2:B20 plasmid-harboring multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 before the acquisition of *bla*_{CTX-M} in Japan.

(*bla*_{CTX-M}の獲得以前のIncFグループF1:A2:B20プラスミドを保有する多剤耐性大腸菌 ST131 の日本における広まり)

氏 名

林美智子

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

2000 年以降、腸管外感染症の起因菌や健常人腸管内の保有菌として CTX-M 型 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 産生 *Escherichia coli* が問題となっている¹。それらの株は、キノロン系およびアミノグリコシド系抗菌薬に対しても同時に耐性を示し多剤耐性傾向を示している²。このような ESBL 産生 *E. coli* の世界的流行には Sequence Type 131 クローン株の出現が関与していると言われており³、臨床分離株およびキノロン系、セファロスポリン系の抗菌薬耐性株における ST131 株の分布割合や分子生物学的特徴（血清型、耐性遺伝子の種類やプラスミドの Inc type など）が明らかとなっている⁴。しかし、そうした報告は臨床分離株や耐性株を対象としているため、抗菌薬投与歴のない人の腸管内に保菌される ST131 株や感性的 ST131 株の分子生物学的特徴を必ずしも反映している訳ではない。臨床由来でない感性的株を対象に研究を行うことは、耐性株の成り立ちを知る上で有用であるが、それが難しいのは、薬剤のセレクションなしに糞便検体から ST131 株を選択するのが容易でないからである。

ST131 株の多くは血清型 O25:H4 を示すため、腸管由来の感性的 ST131 株を収集する 1 つの代替案として、血清型 O25 を有する株を糞便から分離する方法がある。日本では 1999 年から 2013 年の間、下痢便の血清型を、日常検査業務の一環として調べており海外と比べて O 血清型が判明している株が容易に収集できる。規模の大きい民間検査センターの 1 つである Bio Medical Laboratories (BML) は、3 万から 7 万株の O 血清型について各年報告している (http://www.bml.co.jp/bct_info/c/index.html)。その報告によると O25-*E. coli* は年々増加しており、1999 年では 3% であったが 2008 年には 16%、2013 年には 22% に達している。この O25-*E. coli* の増加はヒト腸管内における ST131-*E. coli* の増加を示している可能性があり、このことが *bla*_{CTX-M} の拡散と何らかの関係があるのではないかと我々は推測している。

近年、ゲノム解読技術の進歩により ESBL 産生 ST131 株のうち *H3ORx* と *H3OR1* という株が主要なクローンであること、さらに *H3ORx* は主に CTX-M-15 を産生し欧米を中心に世界中で広がっている一方で、CTX-M-14 や CTX-M-27 を産生する *H3OR1* は主に日本や韓国を含む東アジアで流行していることが明らかになった⁵⁻⁷。ESBL 産生の *H3OR1* は海外では分離されることが少ないため non-*H3ORx* と呼称され注目されていなかった。しかし、Matsumura らが 2008 年を境に CTX-M-27 産生 *H3OR1* が急増していることを報告して以来、海外の異なる 4 つの地域で散発例が報告されており、現在では警戒が必要なクローン株として認識され始めている^{3, 8}。さらに興味深いことに、*H3ORx* と *H3OR1* の 6 割以上は、それぞれ F2:A1:B-, F1:A2:B20 という異なる FAB type の IncF プラスミドを保有していることが報告されている^{6, 7, 9}。こうした報告は ESBL 産生菌を対象としており^{5, 6, 9-12}、*bla*_{CTX-M} 獲得以前に *H3ORx* と *H3OR1* や IncF グループのプラスミドが、リザーバーとして広がっていたかは明らかになっていない。

本研究において、2008年に下痢患者の糞便から収集された O25-*E. coli* を対象に次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を実施することで、ヒト腸管内に生息する O25-*E. coli* の分子生物学的特徴を明らかにし、*bla*_{CTX-M} の広まりにおける ST131 株、特に *H3OR1* が果たす役割に関する知見を得ることを目的とした。

【結果】

1. 株の特徴

1-1. Molecular typing

今回使用した 50 株のうち 36 株 (72%) が ST131 であった。さらに ST131 のうち、27 株 (27/36, 75%) が *H3OR1* に分類された。Matsumura らは *H3OR1* の中にさらにクローナルな株があると述べており、これらの多くは CTX-M-27 を産生するため C1-M27 と名付けられている⁷。この C1-M27 と同じ疫学マーカーを持つ株が我々の株からも 2 株 (7.4%) 検出された。

Table 1. O25-*E. coli* 50 株の分類

分類	ST131			non-ST131	
	<i>H3O</i>			non- <i>H3O</i>	
	<i>H3OR1</i> ^a	<i>H3ORx</i> ^a	<i>H3OS</i>		
株数	27 (27/50, 54%)	3 (3/50, 6%)	1 (1/50, 2%)	5 (5/50, 10%)	14 (14/50, 28%)
F1:A2:B2 O 保有株	24 (24/27, 89%)	0	0	0	1 (1/14, 7%)
<i>bla</i> _{CTX-M} 保 有株	4 (4/27, 15%)	2 (2/3, 67%)			

^a表中の R と S はフルオロキノロン系抗菌薬への耐性/感性を示している

1-2. 患者情報、感受性結果の比較 (ST131 vs non-ST131)

ST131 株 (n = 36) と non-ST131 株 (n = 14) との間に疫学的背景 (年齢、性別、入院/外来) の有意差は見られなかった。6 つの抗菌薬 の ampicillin、ampicillin/sulbactam、

ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, sulfamethoxazole/trimethoprim) に対する感受性結果においては差が見られ、ST131 株において耐性率が高かった。

2. 保有プラスミドの Inc タイプ

27 株の H3OR1 のうち、24 株 (24/27, 89%) が IncFII-FIA-FIB (subtype F1:A2:B20) プラスミドを保有していた。一方で、H3OR1 以外の ST131 株や non-ST131 株では 1 株 (1/14, 7%) だけが同一タイプのプラスミドを保有していた。

3. 薬剤耐性遺伝子

3-1. 薬剤耐性遺伝子の分布と所在

ST131 (n = 36) の内、33 株 (92%) が少なくとも 1 つ以上の薬剤耐性遺伝子を保有していたが、non-ST131 (n = 14) は 5 株 (36%) だけであった。さらに、薬剤耐性遺伝子の高い保有率は、H3OR1-ST131 における F1:A2:B20 の高い保有率と相関していた。H3OR1-ST131 が保有する 30 個の non-F1:A2:B20 プラスミドのうち 12 個が少なくとも 1 つ以上の耐性遺伝子を保有する一方で、24 個の F1:A2:B20 プラスミドのうち 22 個が少なくとも 1 つの耐性遺伝子を保有していた (40% vs. 92%; $P < 0.01$)。分布に差が見られた耐性遺伝子は *bla*_{TEM-1}、*aac*(3)-*IIc*、*aadA5*、*sul1*、*sul2*、*dfrA17*、*mph*(A) であった。

*bla*_{CTX-M} は 6 株から検出され、4 株は H3OR1 で *bla*_{CTX-M-14} をプラスミド上に保有していた。そのプラスミドの Inc タイプは IncFII-FIA-FIB (subtype F1:A2:B20)、IncFII (subtype F4:A-B-)、IncZ (n = 2) であった。残りの 2 株は H3ORx で、*bla*_{CTX-M-15} を染色体上もしくはプラスミド上 (IncR) に保有していた。

3-2. 薬剤耐性遺伝子の集積領域

pMRY09-581ECO_1 は 35kb サイズの multidrug resistance region (MRR) を保有しており、全ての耐性遺伝子がこの領域に存在していた。この MRR は 3 つの領域からなり、region I は *aadA5*、*sul1*、*mph*、region II は *sul2*、*strA*、*strB*、*tet*(A)、region III は *dfrA17* と *int1* を含んでいた。pMRY09-581ECO_1 以外のプラスミドにおいて 9 個のプラスミドが region I を保有し、そのうち region II と region III を保有していたのは、それぞれ 4 個と 6 個であった。F1:A2:B20 プラスミドと non-F1:A2:B20 プラスミドとの間で分布に差が見られた耐性遺伝子もこの MRR に存在していた。一方で、*bla*_{CTX-M-14} は MRR と関係ないと考えられ、その理由は *bla*_{CTX-M-14} をもつ 4 株全てが F1:A2:B20 を持っているにもかかわらず、MRR を持つ F1:A2:B20 プラスミドは 1 つだけであり、さらにその株も IncZ に *bla*_{CTX-M-14} を持っていたからである。

4. F1:A2:B20 プラスミドの特徴

4-1. サイズと相同性

24 個の F1:A2:B20 プラスミドのサイズは 86-159kb で、中央値は 125kb であった。最も大きいプラスミドをレファレンスとして、各プラスミドの coverage (レファレンスと一致する配列が自身の配列の何%を占めるかを示す指標) を調べたところ、レファレンスのプラスミドを除く 23 個のうち 22 個 (22/23, 96%) のプラスミドが 93% 以上の coverage を示した。残りの 1 個は IncN 由来の配列が挿入されていたために、coverage が他のプラスミドよりも低かった。

本研究においてコンプライートにした F1:A2:B20 プラスミドと National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースに登録されている F1:A2:B20 (n = 3) および F2:A2:B20 (n = 1) を比較したところ、地理的に異なる場所 (アメリカ、ドイツ、タイ) で分離されたにも関わらず、非常に良く似ていた。さらに、それら全てのプラ

スミドが MRR を保有していた (1 つは region I のみ)。

4-2. 安定性

プラスミドは、自身が宿主菌体内で世代を超えて維持されるように働くプラスミド安定遺伝子 (partitioning system、TA-based addiction system) を持つことが知られている。そのプラスミド安定遺伝子の保有状況を H30R1 27 株が保有する F1:A2:B20 プラスミド (n = 24) と non-F1:A2:B20 プラスミド (n = 30) とで比較した。その結果、F1:A2:B20 プラスミドの方が partitioning system および多種多様な TA-based addiction system を保有していた。これらプラスミドの一部を用いて安定性の実験を行ったところ、菌にとって過酷な環境、つまり抗菌薬 (シプロフロキサシン) への暴露においても 20 日間継代して安定的に維持されたのは、F1:A2:B20 のみであった。

Table 2. F1:A2:B20 および non-F1:A2:B20 プラスミドにおけるプラスミド安定遺伝子および接合必須 *tra* 遺伝子の分布比較

	F1:A2:B20 (n = 24)	Non-F1:A2:B20 (n = 30)	
		IncF (n = 15)	other Inc types (n = 15)
partitioning systems ^a	24 (100%)	13 (87%)*	4 (27%)*
TA-based plasmid addiction systems ^a	24 (100%)	11 (73%)*	5 (33%)*
tra systems	22 (92%)	2 (13%)*	0
tra systems	2 (8%)	0	0
tra systems	0	0	0
tra system	0	9 (60%)*	5 (33%)*
tra system	0	4 (27%)*	10 (67%)*
essential transfer genes	10 (42%)	12 (80%)*	14 (93%)*

*F1:A2:B20 プラスミドを比較対象として行った Fisher's exact test により P < 0.05 となった

4-3. 接合能

プラスミドが保有する接合に関わる遺伝子 (*tra*) は 33kb の領域に 35 個存在する。その中でも、既報において欠損や変異により接合能を失うと言われている *tra* (以下、essential transfer genes) は 23 個である¹³⁻¹⁷。この essential transfer genes が 1 つでも欠けているものを数えたところ、F1:A2:B20 プラスミドでは 14 個、non-F1:A2:B20 プラスミドでは 4 個検出された (Table 2)。これらプラスミドの一部を用いて接合能の実験を行ったところ、予測通り essential transfer genes を欠いているプラスミドは接合能を失っていた。加えて essential transfer genes を保有するプラスミドで接合効率を測定したところ、実験に使用した F1:A2:B20 プラスミドの 43% が接合せず、それ以外は non-F1:A2:B20 プラスミドよりも 100 倍も接合効率が低かった。

【考察】

今回の結果から 2008 年に収集された O25-*E. coli* 50 株のうち 72% が ST131 株であること

が明らかになった。BML が 2008 年に収集した *E. coli* の中で約 15% が O25 であったことを考えると、当時すでに約 10% の人が腸管内に ST131-*E. coli* を保有していたと推測される。今回使用した株は抗菌薬感受性にかかわらず集められているため、腸管内に生息する O25-*E. coli* の偏りのない population structure を示していると言える。ST131 36 株のうち 18 株 (50%) が外来患者由来であることを考慮すると、抗菌薬と接触する機会が少ない市中においても水面下で non-ST131 株よりも耐性傾向にある ST131-*E. coli* が広まっていることが推察される。

ST131 株の中でも特に多くの割合を占めていたのが、東アジアにおいて ESBL 産生 ST131-*E. coli* として知られている H30R1 のクローンであった。しかし、本研究においてはこれらの株の内、*bla*_{CTX-M-14} を保有していたのは 4 株のみであった。一方で、H30Rx 3 株の内、2 株が *bla*_{CTX-M-15} を保有していた。これらの知見は、*bla*_{CTX-M} を保有しない ST131 もしくは CTX-M-14/27 を産生する ST131 において H30R1-ST131 が優勢である、片や CTX-M-15 産生 ST131-*E. coli* においては H30Rx が主要であるという既報と一致している^{5-12, 18-20}。最近の研究において世界中から集められた ST131 4071 株のゲノムを解析しており、H30R1 と H30Rx に相当する C1 と C2 が世界的に相互循環してきた可能性を指摘している²¹。一方で *bla*_{CTX-M} は強い地域特性を示している⁵⁻⁷。このことは、H30R1 は *bla*_{CTX-M-14} と、H30Rx は *bla*_{CTX-M-15} という様に、それぞれが地域固有に広まっていた *bla*_{CTX-M} を獲得しかつそれを安定に維持することで、特有の遺伝子と共に循環していると考えられる。

本研究の優れた点は、染色体とプラスミドのゲノムを別々に解析し、薬剤耐性遺伝子の所在やプラスミドのレプリコンタイプを明らかにした点である。今回、F1:A2:B20 プラスミドが H30R1-ST131 に広く分布し、その他のプラスミドよりも薬剤耐性遺伝子を多く保有していることが明らかになった。H30R1-ST131 がその他のプラスミドを持っていたにも関わらず、F1:A2:B20 プラスミド上に薬剤耐性遺伝子を集積させていたことは注目に値する。一方で、non-H30R1-ST131 は様々なプラスミドに薬剤耐性遺伝子を保有していた。

H30R1、F1:A2:B20 および薬剤耐性遺伝子との強い相関を考慮し、F1:A2:B20 についてより詳細な解析を行った。プラスミドサイズが 86-159kb と大きいにもかかわらず、24 個の F1:A2:B20 プラスミドのうち 23 個 (96%) において、一致する配列が自身の配列の 93% 以上を占め、高い類似性を示していた。また、NCBI データベースに登録されている同タイププラスミドと配列を比較すると、疫学的関連がないにも関わらず、高い類似性を示していた。F1:A2:B20 プラスミドは接合能が極端に低いことから、接合により伝播したとは考えにくい。一方で、F1:A2:B20 プラスミドは抗菌薬プレッシャーの有無にかかわらず 200 世代に渡って安定に維持されたことから、この F1:A2:B20 プラスミドの類似性には F1:A2:B20 プラスミドの安定性が関与しているのではないかと考えられる。Maherault らは株進化の過程で *bla*_{CTX-M-15} は *E. coli* によりよく順応したことを報告しており²²、H30Rx のように、薬剤耐性遺伝子を保有する安定な F1:A2:B20 プラスミドが ST131-*E. coli* に利得をもたらし、その結果、抗菌薬プレッシャーのない状況下でも多剤耐性となり、*bla*_{CTX-M} の獲得に役立ったと考えられる。

本研究で使用した株は 2008 年に収集されており、CTX-M-27 産生株が日本において流行する前であったため、*bla*_{CTX-M-27} は検出されなかった。今では *bla*_{CTX-M-27} を保有する H30R1-*E. coli* が日本において広まっていることは周知の事実である²³。NCBI データベースで *bla*_{CTX-M-27} を保有する *E. coli* 由来のコンプライートプラスミド配列を検索すると 27 個のプラスミドが登録されており、その中で F1:A2:B20 タイプは 7 個であった。一方で、*bla*_{CTX-M-14} は今回の研究において様々なプラスミド上に存在していた。*bla*_{CTX-M-14} を保有する F1:A2:B20 プ

ラスミドはNCBIデータベースに存在せず、今回が初めての報告であると思われる。これらのことから、*bla*_{CTX-M-27}はF1:A2:B20プラスミド上に安定に維持され、*bla*_{CTX-M-14}は維持されにくいと考えられる。こうした理由から、CTX-M-27産生 *E. coli*の数は2010年以降、増加し、もっとも優勢なCTX-Mタイプとなったと考察される²³⁻²⁸。

【結語】

本研究により *bla*_{CTX-M}を獲得するよりも前に、多剤耐性のF1:A2:B20プラスミドを保有したST131-*H30R1*が広まり、*bla*_{CTX-M}のリザーバーとなった可能性が示唆された。今回、染色体ゲノムだけでなく、プラスミドレプリコンや薬剤耐性遺伝子プロファイルについてもST131サブタイプ (*H30R1*、*H30Rx*)を分類することができた。*H30R1*、*H30Rx*はその土地固有の*bla*_{CTX-M}を獲得した後に広まったと考えられ、そのことはさまざまな国における分子疫学の違いを説明し得ている。そのほかのST131と*bla*_{CTX-M}との組み合わせよりも、*H30Rx*-CTX-M-15と*H30R1*-CTX-M-27が世界的に広まっている背景や機序を明らかにするためにはさらなる研究が望まれる。

【文献】

1. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. Clin Microb Rev 27(3):543-574
2. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. J Antimicrob Chemother 66:1-14.
3. Mathers a AJ, Peirano G, Pitout JDD. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev 28(3): 565-591.
4. Pitout JDD, DeVinney R. 2017. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination [version 1; referees: 2 approved] F1000Research, 6(F1000 Faculty Rev):195.
5. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, Turner P, Anson LW, Kasarskis A, Batty EM, Kos V, Wilson DJ, Phetsouvanh R, Wyllie D, Sokurenko E, Manges AR, Johnson TJ, Price LB, Peto TEA, Johnson JR, Didelot X, Walker AS, Crook DW, Modernizing Medical Microbiology Informatics Group (MMMIG). 2016. Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. mBio 7(2):e02162-15.
6. Johnson TJ, Danzeisen JL, Youmans B, Case K, Llop K, Munoz-Aguayo J, Flores-Figueroa C, Aziz M, Stoesser N, Sokurenko E, Price LB, Johnson JR. 2016. Separate F-type plasmids have shaped the evolution of the *H30* subclone of *Escherichia coli* sequence type 131. mSphere 1(4):e00121-16.
7. Matsumura Y, Johann JDD, Gomi R, Matsuda T, Noguchi T, Yamamoto M, Peirano G, DeVinney R, Bradford PA, Motyl MR, Tanaka M, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S. 2016. Global *Escherichia coli* sequence type 131 clade with *bla*_{CTX-M-27} gene. Emerging Infectious Diseases 22(11):1900-1907.

8. Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, Ichiyama S. 2015 CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *J Antimicrob Chemother* 70:1639-1649.
9. Phan MD, Forde BM, Peters KM, Sarkar S, Hancock S, Stanton-Cook M, *et al.* 2015. Molecular characterization of a multidrug resistance IncF plasmid from the globally disseminated *Escherichia coli* ST131 clone. *PLoS ONE* 10(4): e0122369.
10. Smet A, Van Nieuwerburgh F, Vandekerckhove TT, Martel A, Deforce D, Butaye P, Haesebrouck F. 2010. Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PLoS One* 5(6):e11202
11. Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 53(10):4472-82.
12. Ghosh H, Doijad S, Falgenhauer L, Fritzenwanker M, mirzalioglu C, Chakraborty T. 2017 *bla*_{CTX-M-27}-encoding *Escherichia coli* sequence type 131 lineage C1-M27 clone in clinical isolates, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 23(10):1754-1756.
13. Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* 224:1-15.
14. Ippen-Ihler KA, Minkley EG. 1986. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Ann Rev Genet* 20:593-624.
15. Christie PJ, Whitaker N, González-Rivera C. 2014. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *BBA - Mol Cell Res* 1843:1578-1591.
16. Komano T, Yoshida T, Narahara K, Furuya N. 2000. The transfer region of Inc11 plasmid R64: similarities between R64 *tra* and *Legionella icm/dot* genes. *Mol Microbiol* 35:1348-1359.
17. Lawley T, Wilkins BM, Frost LS. 2004. Bacterial conjugation in gram-negative bacteria, p. 203-226. In Funnell BE, Phillips GJ (eds.), *PLASMID BIOLOGY*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
18. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V *et al.* 2013. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio* 4(6):e00377-13.
19. Jamborova I, Johnston BD, Papousek I, Kachlikova K, Micenkova L, Clabots C *et al.* 2018. Extensive genetic commonality among wildlife, wastewater, community, and nosocomial isolates of *Escherichia coli* sequence type 131 (H30R1 and H30Rx subclones) that carry *bla*_{CTX-M-27} or *bla*_{CTX-M-15}.

- Antimicrob Agents Chemother 62(10):e00519-18.
20. Hu F, O'hara JA, Rivera JI, Doi Y. 2014. Molecular features of community-associated extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the United States. Antimicrob Agents Chemother 58:6953-6957.
 21. Decano AG, Downing T. 2019. An *Escherichia coli* ST131 pangenome atlas reveals population structure and evolution across 4,071 isolates. Sci Rep 9(1):17394.
 22. Maherault AC, Kemble H, Magnan M, Gachet B, Roche D, Le Nagard H, et al. 2019. Advantage of the F2:A1:B- IncF pandemic plasmid over IncC plasmids in in vitro acquisition and evolution of *bla*_{CTX-M} gene-bearing plasmids in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 63(10) e01130-19
 23. Matsuo N, Nonogaki R, Hayashi M, Wachino JI, Suzuki M, Arakawa Y, et al. 2020. Characterization of *bla*_{CTX-M-27}/F1:A2:B20 plasmids harbored by *Escherichia coli* sequence type 131 sublineage C1/H30R isolates spreading among elderly Japanese in nonacute-care settings. Antimicrob Agents Chemother 64(5) e00202-20.
 24. Okubo T, Sato T, Yokota S, Usui M, Tamura Y. 2014. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. J Infect Chemother 20:243-249.
 25. Teramae M, Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, Shirakawa T, Fujisawa M et al. 2019. Prevalence of quinolone resistance of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* with ST131-*fimH*-30 in a city hospital in Hyogo, Japan. Int J Mol Sci 20:5162.
 26. Horie A, Nariai A, Katou F, Abe Y, Saito Y, Koike D et al. 2019. Increased community-acquired upper urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in children and the efficacy of flomoxef and cefmetazole. Clin Exp Nephrol 23:1306-1314.
 27. Saeki M, Sato T, Furuya D, Yakuwa Y, Sato Y, Kobayashi R et al. 2020. Clonality investigation of clinical *Escherichia coli* isolates by polymerase chain reaction-based open-reading frame typing method. J Infect Chemother 26:38-42.
 28. Komatsu Y, Kasahara K, Inoue T, Lee ST, Muratani T, Yaho H et al. 2018. Molecular epidemiology and clinical features of extended-spectrum β -lactamase- or carbapenemase-producing *Escherichia coli* bacteremia in Japan. PLoS One 13(8):e0202276.