

## DHA-1 AmpC $\beta$ -lactamase 생성 *Klebsiella oxytoca* 임상균주의 분리

송원근<sup>1</sup>, 김재석<sup>1</sup>, 김한성<sup>1</sup>, 이태재<sup>1</sup>, 박민정<sup>1</sup>, 박인현<sup>2</sup>, 이규만<sup>1</sup>

한림대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 정형외과학교실<sup>2</sup>

### Isolation of *Klebsiella Oxytoca* Clinical Isolate Producing AmpC $\beta$ -lactamase, DHA-1

Wonkeun Song<sup>1</sup>, Jae-Seok Kim<sup>1</sup>, Han-Sung Kim<sup>1</sup>, Tae Jae Lee<sup>1</sup>,  
Min-Jeong Park<sup>1</sup>, In-Heon Park<sup>2</sup>, and Kyu Man Lee<sup>1</sup>

Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup> and Orthopedic Surgery<sup>2</sup>, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background** : *Klebsiella oxytoca* strain exhibiting an unusual inducible  $\beta$ -lactam resistance phenotype was isolated from a wound specimen of a patient at a university hospital in August 2002. The isolate was resistant to ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, and demonstrated reduced inhibition zone diameters for ceftazidime in combination with clavulanate versus those for ceftazidime when tested alone.

**Methods** : Antimicrobial susceptibilities were tested using the Etest and disk diffusion method. AmpC  $\beta$ -lactamase production was determined by modified Hodge test. The disk antagonism method was used to detect inducibility of  $\beta$ -lactamase. Conjugation experiments were performed by the filter mating method using the recipient *Escherichia coli* J53 Azi<sup>r</sup> strain. PCR and DNA sequencing of DHA-specific PCR products were tested.

**Results** : The double disk synergy test was negative and the modified Hodge test was positive for the *K. oxytoca* isolate. Antagonism was observed between cefoxitin and oxyimino-cephalosporins. Sequence analysis of the DHA-specific PCR products revealed that they were identical to the amino acid sequence of the DHA-1  $\beta$ -lactamase. Transfer of the resistance by conjugation experiments was successful.

**Conclusions** : We found a plasmid-mediated DHA-1  $\beta$ -lactamase-producing *K. oxytoca* possessing an unusual inducible  $\beta$ -lactam resistance phenotype was found in a university hospital in Korea. The resistance phenotype was conferred by DHA-1 encoded by a self-transferable plasmid.

(*Korean J Clin Microbiol* 2004;7(2):124-129)

**Key words** : *Klebsiella oxytoca*, inducible, AmpC  $\beta$ -lactamase, DHA-1

## 서 론

*Klebsiella oxytoca*는 저농도의 penicillinase를 생성하여 aminopenicillin, ticarcillin, piperacillin 등에 내성이며 expanded-spectrum cephalosporin제나 aztreonam에도 내성인 경우가 있다[1, 2]. *K. oxytoca*가 expanded-spectrum  $\beta$ -lactam제에 내성을 나타내는 기전은 유전자의 promotor 부위의 변이로 인해 염색체성 penicillinase가 과량 생성되는

접 수 일 : 04/8/5 게재승인일 : 04/8/23

교신저자 : 송원근

(150-950) 서울특별시 영등포구 대림1동

강남성심병원 진단검사의학과

TEL : (02)829-5259 FAX : (02)847-2403

E-mail : swonkeun@hallym.or.kr

경우[3]와 플라스미드성 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)가 생성되는 경우가 있다[4]. 최근 들어 주로 *K. pneumoniae*와 *Escherichia coli*에서 cephamycin제에 내성을 보이는 균주들이 증가하고 있는데, 이는 *Pseudomonas aeruginosa*나 *Enterobacter* spp. 등의 그람음성간균에 존재하는 염색체성 AmpC  $\beta$ -lactamase 유전자에서 전이된 플라스미드성 AmpC  $\beta$ -lactamase 때문이다[5, 6]. 대부분의 장내세균 과(family)의 AmpC는 유도성이며 과량 생성되는 경우 oxyimino- $\beta$ -lactam제, 7- $\alpha$ -methoxy-cephalosporin제 및 monobactam제에 내성을 나타낼 수 있다[5, 6]. 대부분의 플라스미드성 AmpC 효소는 *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*와 같이 선천적으로 염색체성 AmpC  $\beta$ -lactamase가 없는 균종에서 발견된다[7-10]. 플라스미드성 AmpC 효소는 염색체성과는 달리 대부분이 구성적(constitutive)으로 표현되며 유도성인 경우는 드물다. 사우디아라비아에서 최초로 DHA-1  $\beta$ -lactamase 생성 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis가 분리되었는데 [7], 이 *bla*<sub>DHA-1</sub> 유전자는 *Morganella morganii*의 염색체성 AmpC에서 유래된 것으로 조절(regulator) 유전자인 ampR이 있기 때문에 유도성이다[11, 12]. 최근에는 DHA-1과 유사한 DHA-2  $\beta$ -lactamase가 프랑스에서 보고된 바가 있으며, 이 효소도 유도성의 내성 표현형을 보인다[13].

최근 한림의대 강동성심병원에서 ESBL 디스크 확인 시험 결과, 생소한 내성표현형을 보이는 *K. oxytoca*가 분리되었다. 시험한 결과, 유도성 AmpC  $\beta$ -lactamase인 DHA-1 생성균주임을 확인하여 보고하는 바이다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상균주와 환자정보

2002년 8월 한림대학교 강동성심병원 정형외과에 입원한 65세 남자환자의 창상 검체에서 *K. oxytoca*가 분리되었다. MicroScan WalkAway System (Dade International Inc., West Sacramento, CA, USA)으로 시행한 항균제감수성시험에서 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin, tobramycin에 내성이고 ESBL 선별시험에는 음성이었다. ESBL 디스크 확인 시험[14]에서는 ceftazidime-clavulanate의 복합제 디스크의 억제대가 ceftazidime 디스크만의 억제대보다 감소하였다.

### 2. 감수성시험

E test strip (AB BIODISK, Solna, Sweden)을 이용하여 사용설명서에 따라 amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, cefoxitin, cefotetan, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefepime, imipenem의 최소억제농도(MIC)를 측정하였다.  $\beta$ -lactam제가 아닌 항균제에 대해서는 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 디스

크확산법[14]을 이용하였고 항균제디스크는 amikacin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)이었다. *E. coli* ATCC 25922를 정도 관리균주로 사용하였다. ESBL과 AmpC  $\beta$ -lactamase의 검출을 위해 각각 double disk synergy 시험[15]과 modified Hodge 시험[16]을 시행하였다.

### 3. 유도성시험

염색체성  $\beta$ -lactamase의 유도성을 검출하기 위해서 사용하였던 disk antagonism 시험[6]을 약간 변형하여 시행하였다. 균액을 바른 Mueller-Hinton agar plate의 표면에 유도약제와 oxyimino- $\beta$ -lactam제 디스크를 각각의 가장 자리의 간격이 20 mm가 되게 놓고 하룻밤 배양 한 후에 판독하였다. 유도약제는 amoxicillin-clavulanate와 cefoxitin을, oxyimino- $\beta$ -lactam제는 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefepime을 이용하였다.

### 4. PCR과 DNA sequencing

Alkaline lysis 방법[17]에 따라 template DNA를 분리하였고 PCR 증폭은 이전의 방법[18]을 약간 변형하여 0.5  $\mu$ M primer와 2  $\mu$ L의 template DNA를 이용하여 최종 부피가 50  $\mu$ L가 되도록 하였다. *bla*<sub>SHV</sub>[19], *bla*<sub>TEM</sub>[19] 및 *bla*<sub>DHA</sub>[20] 특이 primer를 이용한 PCR 증폭과 DNA sequencing에 사용한 primer는 Table 1과 같았다. BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하여 염기서열을 배열하고 분석하였다.

### 5. 내성전달시험

Conjugation은 filter mating법[21]에 따라 시행하였고 recipient로는 *E. coli* J53 Azi' 균주[22]를 이용하였다. Transconjugant는 sodium azide (100 mg/ml)와 cefoxitin (16 mg/ml)이 함유된 MacConkey agar를 이용하여 선별하였다.

## 결 과

### 1. 감수성시험과 내성전달시험

*K. oxytoca*는 amoxicillin-clavulanate와 cefoxitin에 고농도 내성을 보였고 다른  $\beta$ -lactam제의 MIC는 낮았다.  $\beta$ -lactam제 이외의 약제 중에서는 tobramycin에 내성이었다. Double disk synergy 시험은 음성, modified Hodge 시험은 양성이었다. 내성 전달시험에 의해서 cefoxitin 내성이 recipient인 *E. coli* J53 Azi' 균주에 전달되었고 이 transconjugant도 임상균주와 거의 유사한 감수성 양상을 나타냈다 (Table 2).

Table 1. Primers used for amplification and sequencing

Primer	Sequence <sup>*</sup>	Position <sup>†</sup>	Accession no <sup>‡</sup>
Amplification			
TEM-A	TAAAATTCTTGAAGACG	2-18	AF027199
TEM-B	TTACCAATGCTTAATCA	1059-1075	
SHV-OS5	TTATCTCCCTGTTAGCCA	254-271	AY008838
SHV-OS6	GATTTGCTGATTCGCTC	1033-1050	
Amplification and sequencing			
DHA-MF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	1244-1265	Y16410
DHA-MR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	1648-1628	
Sequencing			
DHA-LF	GGGGAGATAACGTCTGACCA	2545-2564	AJ237702
DHA-LR	TAGCCAGATCCAGCAATGTG	3063-3044	
DHA-RF	GCTGGGGTTATCTCACACCT	3275-3294	AJ237702
DHA-RR	GCACTCAAATAGCCTGTGC	3805-3786	

<sup>\*</sup> All primer sequence are written in the 5' -to-3' direction.

<sup>†</sup> Nucleotide position of the primer in the sequence.

<sup>‡</sup> GenBank accession number of a sequence containing the corresponding primer sequence.

Table 2. Antimicrobial susceptibilities of a DHA-1  $\beta$ -lactamase-producing *K. oxytoca* strain isolated from a patient and its transconjugant

Strain	MIC* (g/ml)									Inhibition zone diameter <sup>†</sup> (mm)							
	AMC	TZP	FOX	CTT	ATM	CTX	CAZ	FEP	IPM	AMK	GEN	TOB	CIP	SXT	CAZ + CLA	CTX + CLA	
Clinical isolate	48	4	256	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	15	19	10	23	24	25	21	27
Transconjugant	48	4	256	1	0.25	0.5	1	0.25	0.25	19	23	14	34	32	25	20	28

\* MIC values obtained by Etest.

<sup>†</sup> Inhibition zone diameters obtained by NCCLS disk diffusion test.

Abbreviations: AMC, amoxicillin-clavulanate; AMK, amikacin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CLA, clavulanate; CTT, cefotetan; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; FOX, cefoxitin; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; SXT, cotrimoxazole; TOB, tobramycin; TZP, piperacillin-tazobactam.

## 2. 유도성시험

ESBL 디스크 확인시험에서 *K. oxytoca* 임상균주는 ceftazidime의 억제대가 ceftazidime-clavulanate의 억제대보다 4 mm 감소하였고, transconjugant는 ceftazidime-clavulanate와 cefotaxime-clavulanate의 억제대가 ceftazidime과 cefotaxime의 억제대보다 각각 4 mm과 5 mm 씩 감소하였다(Table 2). Disk antagonism 시험에서는 cefoxitin과 amoxicillin-clavulanate 디스크에 근접한 oxyimino- $\beta$ -lactam 디스크의 억제대가 D자 모양으로 찌그러져서 유도성  $\beta$ -lactamase임을 확인하였다.

## 3. PCR과 DNA sequencing

*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> 및 *bla*<sub>DHA</sub> 특이 primer를 이용한 PCR 결과 SHV와 DHA에 양성을 보였다. 이 균주는 cefotaxime, ceftazidime, aztreonam의 MIC가 모두 1  $\mu$ g/mL 이하이었고

MicroScan, double disk synergy 시험, ESBL 디스크 확인 시험에서 모두 ESBL 음성을 보여 SHV는 SHV-1 like  $\beta$ -lactamase로 추측이 되었다. DHA 특이 PCR 산물로 염기서열을 분석 한 결과, 이것의 아미노산 염기서열이 DHA-1  $\beta$ -lactamase와 100% 일치하였다.

## 고 찰

플라스미드성 AmpC  $\beta$ -lactamase 중 유도성인 것은 DHA-1, DHA-2, ACT-1형 등이 알려져 있다[7, 13, 23]. DHA-1은 *S. enterica* serovar Enteritidis에서 처음 보고가 되었고[7], 대만의 한 대학병원에서 DHA-1 생성 *K. pneumoniae*의 유행이 보고 된 바가 있다[24]. 저자들은 65세 남자 환자의 창상검체에서 플라스미드성 유도성 AmpC  $\beta$ -lactamase인 DHA-1  $\beta$ -lactamase 생성 *K. oxytoca*를 분리하였다. 플라스미드성 AmpC  $\beta$ -lactamase 중 DHA형은 전 세계적으로 드문 것으로 알려져 있다. 미국의 25개 주와

워싱턴 D.C.에서 분리된 총 752주의 oxyimino- $\beta$ -lactam제 내성 *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* 중에서 *K. pneumoniae*의 8.5%, *K. oxytoca*의 6.9%, *E. coli*의 4%가 플라스미드성 AmpC  $\beta$ -lactamase 생성균주이었으나 이중 DHA형  $\beta$ -lactamase 생성 *K. oxytoca*는 없었다[25]. 그러나 한국은 플라스미드성 AmpC  $\beta$ -lactamase 생성 *K. pneumoniae* 중에서 DHA형이 가장 흔하였고[26] *E. coli*나 *Salmonella*에서도 DHA-1형이 보고된 바가 있다[26, 27]. 또한 한국에서 분리된 DHA-1  $\beta$ -lactamase 생성 *K. oxytoca*가 GenBank accession number AY205599로 등재되어 있다. 이번 연구에서 분리된 *K. oxytoca*는 conjugation 시험에 의해서 cefoxitin의 내성이 *E. coli* J53 Azi'에 전달되어 *bla*<sub>DHA-1</sub>이 스스로 이동이 가능한 플라스미드에 있음을 알 수 있었다.

ESBL의 검출 방법에 대해서는 많은 연구가 이뤄져 있으며 *Klebsiella*와 *E. coli*에 국한되어 있기는 하지만 NCC-LS에 그 기준이 설정되어 있다[14]. AmpC  $\beta$ -lactamase의 검출법도 3-dimensional 시험[28], modified Hodge 시험[16], AmpC disk 시험[29] 등이 개발되어 있으나 아직 NCCLS에는 검출방법이나 기준이 설정되어 있지 않은 상태이다. 유도성  $\beta$ -lactamase의 생성을 검출하기 위해서는 유도약제인 cefoxitin이나 clavulanic acid와 oxyimino- $\beta$ -lactamase 간의 antagonism 시험[6]을 이용할 수 있다. 염색체성 AmpC  $\beta$ -lactamase 유전자가 선천적으로 없는 *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *P. mirabilis* 중에서 유도성 AmpC  $\beta$ -lactamase 생성균주들은 ESBL 디스크 확인시험을 했을 때 ESBL 생성균주와는 반대로 ceftazidime-clavulanate와 cefotaxime-clavulanate 디스크의 억제대가 ceftazidime과 cefotaxime 디스크의 억제대보다 감소하므로 이를 유도성  $\beta$ -lactamase 생성 그람음성간균의 검출을 위한 선별검사에 사용할 수 있다고 하였다[24]. 저자들의 경우에서도 ESBL 디스크 확인시험의 결과가 ESBL 생성균주와 반대의 결과를 보였고 disk antagonism 시험도 양성을 보여 유도성  $\beta$ -lactamase임을 확인할 수 있었다.

선천적으로 유도성 AmpC 효소를 생성하는 세균에 의한 감염에서 종종 AmpC 과량생성 변이주가 함께 존재하는 경우가 있는데, 이때 extended-spectrum  $\beta$ -lactam제로 치료하는 경우가 있으므로 이를 예방하기 위해서 유도성 AmpC 생성 *Enterobacteriaceae* 균주에 대해서는 모든 extended-spectrum  $\beta$ -lactam제를 내성으로 보고해야 한다는 견해도 있다[6]. 그러나 유도성인 DHA-1 생성균주와 같은 플라스미드성 AmpC 생성균주의 감염에 대한 extended-spectrum cephalosporin제의 치료 효과에 대한 연구가 아직 거의 없기 때문에 모든 extended-spectrum  $\beta$ -lactam제를 내성으로 보고해야 하는지는 아직 알 수 없으며, 이러한 균주에 의한 감염의 선택약제가 무엇인지도 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 다른 연구들[13, 24]과 마찬가지로 이번 연구에서도 감수성시험 결과, DHA-1 생성 *K. oxytoca*가 대부분의 oxyimino-cephalosporin제에 감수성을 보였으나 clavulanic acid의 존재 하에서는 감수성이 저

하되었다. 하지만 cefepime과 imipenem은 clavulanic acid의 존재 하에서도 감수성의 저하가 거의 없는 것으로 알려져 있다[24]. 따라서 DHA-1 생성균주는 4세대 cephalosporin제나 carbapenem제가 가장 좋은 선택약제일 가능성이 있다. 따라서 미생물검사에서 *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *P. mirabilis* 중에서 DHA-1등의 유도성  $\beta$ -lactamase가 검출된 경우 임상 의사에게 cephamycin제와 같은 강력한 AmpC 유도약제의 사용을 피할 것을 알려주는 것이 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**배 경** : 2002년 8월 한 대학병원에서 소소한  $\beta$ -lactam제 내성 표현형의 양상을 보이는 유도성 *Klebsiella oxytoca* 균주가 한 환자의 창상검체에서 분리되었다. 이 균주는 ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefoxitin에 내성이었고 ceftazidime-clavulanate 디스크의 억제대가 ceftazidime 디스크의 억제대보다 감소하였다.

**방 법** : Etest와 디스크확산법을 이용하여 항균제감수성시험을 하였다. AmpC  $\beta$ -lactamase 생성은 modified Hodge 시험으로 판독하였다. Disk antagonism 시험으로  $\beta$ -lactamase의 유도성을 검출하였다. Conjugation은 *Escherichia coli* J53 Azi' 균주를 recipient로 한 filter mating 방법으로 시행하였다. PCR과 DHA 특이 PCR 산물을 이용한 DNA sequencing을 시행하였다.

**결 과** : *K. oxytoca* 균주에 대한 double disk synergy 시험은 음성이었고 modified Hodge 시험은 양성이었다. Cefoxitin과 oxyimino-cephalosporin제 디스크 간에 antagonism을 보였다. PCR과 DHA 특이 PCR 산물을 이용한 DNA sequencing 결과 아미노산 염기서열이 DHA-1  $\beta$ -lactamase와 일치하였다.

**결 론** : 저자들은 한국의 한 대학병원에서 소소한 유도성 내성 표현형을 갖고 있는 플라스미드성 DHA-1  $\beta$ -lactamase 생성 *K. oxytoca*를 분리하였고, 이 DHA-1 유전자는 스스로 이동이 가능한 플라스미드에 있어 내성이 전달됨을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Jeong SH, Kim WM, Chang CL, Kim JM, Lee K, Chong Y, et al. Neonatal intensive care unit outbreak caused by a strain of *Klebsiella oxytoca* resistant to aztreonam due to overproduction of chromosomal  $\beta$ -lactamase. *J Hosp Infect* 2001;48:281-8.
2. Kim BN, Ryu NJ, Kim YS, Woo JH. Retrospective analysis of clinical and microbiological aspects of *Klebsiella oxytoca* bacteremia over a 10-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:419-26.
3. Fournier B, Liu CY, Lagrange PH, Krishnamoorthy R,

- Philippon A. Point mutation in the Pribnow box, the molecular basis of  $\beta$ -lactamase overproduction in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1365-8.
4. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, et al. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1995;21:915-23.
  5. Livermore DM.  $\beta$ -Lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;34:557-84.
  6. Livermore DM and Brown DFJ. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;48(Suppl S1):59-64.
  7. Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gaillot D, Lagrange PH, Philippon A. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2352-8.
  8. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Wilhelm R, Chong Y. Comparative characterization of the cephamycinase *bla*<sub>CMY-1</sub> gene and its relationship with other  $\beta$ -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1926-30.
  9. Gonzales Leiza M, Perez-Diaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martinez-Beltran J, Bush K, et al. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC type plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2150-7.
  10. Thomson KS. Controversies about extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001;7:333-6.
  11. Barnaud G, Arlet G, Danglot C, Philippon A. Cloning and sequencing of the gene encoding the AmpC  $\beta$ -lactamase of *Morganella morganii*. *FEMS Microbiol Lett* 1997;148:15-20.
  12. Poirel L, Guibert M, Girlich D, Naas T, Nordmann P. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:769-76.
  13. Fortineau N, Poirel L, Nordman P. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:207-10.
  14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 7th ed. Approved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2000.
  15. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987;ii:302-6.
  16. Yong D, Park R, Yum JH, Lee K, Choi EC, Chong Y. Further modification of the Hodge test to screen AmpC  $\beta$ -lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Methods* 2002;51:407-10.
  17. Takahashi S and Nagano Y. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *J Clin Microbiol* 1984;20:608-13.
  18. Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:377-80.
  19. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. A 1998 survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3177-9.
  20. Perez-Perez FJ and Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2153-62.
  21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatus T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
  22. Jacoby GA and Han P. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996;34:908-11.
  23. Reisbig MD and Hanson ND. The ACT-1 plasmid-encoded AmpC  $\beta$ -lactamase is inducible: detection in a complex  $\beta$ -lactamase background. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:557-60.
  24. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1  $\beta$ -lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002;40:3121-6.
  25. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:533-7.
  26. 송원근, 김재석, 김미나, 김의중, 박연준, 용동은 등. 한국에서 분리된 plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase 생성 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*의 빈도와 유전자형의 분포. *대한진단검사의학회지* 2002;22:410-6.
  27. Kim JY, Park YJ, Lee SO, Song W, Jeong SH, Yoo YA, et al. Bacteremia due to *Salmonella enterica* serotype

- Montevideo producing plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase (DHA-1). *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:214-7.
28. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000;38:1791-6.
29. Black JA and Thomson KS. A simple disk test for detection of plasmid-mediated AmpC production in *Klebsiella*. Abstr. 42nd Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother abstr. D-534, 2002.