

## Evaluation of EDTA-based Three Methods to Detect IMP-1 and VIM-2 Type Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of Imipenem Resistant *Acinetobacter* and *Pseudomonas* spp.

Seung Bok Hong<sup>1,†</sup>, Kyung-A Shin<sup>2</sup> and Seock Yeon Hwang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Juseong University, Cheongwon 363-7941, Korea

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine Bundang Jesaeng Hospital, Sunghnam-si, Gyeonggi-do 463-7742, Korea

<sup>3</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

We compared three EDTA-based phenotypic screening methods for detecting IMP-1 and VIM-2 type metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing isolates of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* spp., EDTA-double disk synergy test (EDTA-DDST), Etest MBL, and imipenem (IPM)-EDTA disk test. A total of 183 isolates (65 *Acinetobacter* spp. and 118 *Pseudomonas* spp. showing IPM resistance), confirmed to MBL genes by PCR, were used. The criteria for MBL production were (i) presence of a synergistic zone between IPM and EDTA disks in EDTA-DDST, (ii) reduction of IPM minimal inhibitory concentration by  $\geq 3$  twofold dilutions in the presence of EDTA in the Etest MBL, and (iii)  $\geq 7$  mm increase in the inhibition zone around the IPM plus EDTA disks compared with a sole IPM disk in the IPM-EDTA disk test. In this study using 87 MBL-producing and 96 MBL-nonproducing isolates, the sensitivities/specificities of EDTA-DDST, Etest MBL and IPM-EDTA disk tests were 94.3/78.1%, 89.7/91.7%, and 97.7/95.8%, respectively. When the threshold for the increase of the inhibition zone around the IPM plus EDTA disk over a sole IPM disk was altered to  $\geq 5$  mm and  $\geq 8$  mm for *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp., respectively, the sensitivity and specificity of the test were 98.9% and 96.9%, respectively. Of the three EDTA-based phenotypic tests, the IMP-EDTA disk test was superior for detection of MBL-producing isolates.

**Key Words:** Metallo- $\beta$ -lactamase, Imipenem, EDTA, Etest, Comparison

### 서 론

카바페넴 (carbapenem)은 대부분의  $\beta$ -락타마제에 안정하므로 다제내성 그람음성 간균의 감염증 치료를 위하여 마지막으로 투여할 수 있다. 그러나 카바페넴의 사용이 증가하면서 1991년 imipenem (IPM)을 가수분해할 수 있는 획득성  $\beta$ -락타마제가 처음 분리되었다 (Watanabe et al., 1991). 이  $\beta$ -락타마제는 Ambler의 분류에 의해 Class B에 속하며 활성을 위해 Zn 이온이 필요하므로 metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)라 명명되었다 (Bush et al., 1995). MBL은 IMP형과 VIM형이 아시아 (Lee et al., 2003b), 유럽

(Lauretti et al., 1999; Riccio et al., 2000) 및 북아메리카 (Hanson et al., 2006; Pitout et al., 2007)를 포함한 전세계에서 분리되었으며, 이어서 SPM형, GIM형 그리고 SIM형이 각각 라틴아메리카 (Toleman et al., 2002), 독일 (Castanheira et al., 2004) 그리고 서울 (Lee et al., 2005a)에서 분리되었다.

국내에는 주로 *Pseudomonas* spp. 및 *Acinetobacter* spp.와 같은 포도당 비발효 균에서 IMP-1형 및 VIM-2형 분리되었으며 (Lee et al., 2003b), 서울 등 일부 지역에서 SIM형 *Acinetobacter* spp.가 분리되었다 (Lee et al., 2005a).

MBL의 검출 방법에 MBL 활성을 억제하는 다양한 킬레이트 (chelating agent)가 이용되고 있다. Arakawa (2000), Lee (2001) 및 Kimura 등 (2005)이 각각 2-mercaptopropionic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 및 dipicolinic acid (DPA) 등을 이용하여 MBL 검출 방법을 소개하였으나, 아직까지 Clinical Laboratory and Standard Institutes (CLSI)에서 추천하는 방법은 없는 실

\*접수일: 2011년 2월 28일 / 수정일: 2011년 5월 31일  
채택일: 2011년 6월 2일

†교신저자: 홍승복, (우) 363-794 충북 청원군 내수읍 덕암리 산 4, 주성대학 임상병리과  
Tel: 043-210-8308, Fax: 043-210-8289  
e-mail: sbhong8646@hanmail.net

정이다. MBL 키레이트 중 EDTA는 검사실에서 다양한 용도로 사용하며 접근이 용이하여 가장 많이 이용되고 있다. EDTA를 이용한 MBL의 선별검사에 여러 가지 방법들이 소개되고 있는데, 처음에 Lee 등 (2001)이 IPM과 EDTA 디스크 사이에 새로 생긴 억제대를 관찰하는 EDTA-이중 디스크 확산법 (EDTA-double disk synergy test, EDTA-DDST)을 소개하였다. 그리고 양쪽의 IPM Etest strip에 한쪽에는 EDTA를 첨가하고 다른 한쪽에는 EDTA를 첨가하지 않은 Etest MBL이 상품화 되었다. 이 검사는 EDTA가 첨가된 IPM의 최소억제농도가 원래의 IPM 최소억제농도 보다 일정 기준 이하로 (8배 이하) 감소할 때 MBL로 판단하게 된다 (Lee et al., 2005b). 한편 Yong 등 (2002)은 EDTA가 포함된 IPM disk와 IPM 단독 디스크의 억제대 차이를 비교하는 IPM-EDTA disk test 등을 소개하였다. 저자들은 국내에서 MBL 생성주의 대부분을 차지하고 있는 *Acinetobacter* spp.와 *Pseudomonas* spp.에서 MBL을 생성하는 균을 검출하는데 EDTA에 기초한 상기 세 가지 방법을 비교하여 보았다.

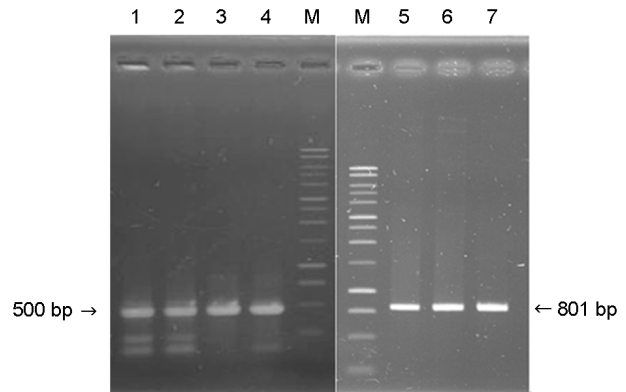
## 재료 및 방법

### 대상 균주 및 감수성 검사

2001년에서 2004년 까지 다양한 임상 검체에서 분리된 IPM 내성인 *Acinetobacter* spp. 65균주와 *Pseudomonas* spp. 118균주를 포함하여 총 183균주를 실험에 이용하였다. IPM 감수성 검사는 CLSI 지침 (2006)에 따라 디스크 확산법으로 시행하였다.

### MBL 유전형 검사

모든 균주에 대하여 국내에서 분리된 예가 있는 *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> 및 *bla*<sub>SIM-1</sub> 유전자에 대한 PCR를 시행하였다 (Fig. 1). 시발체는 기존 문헌 (Poirel et al., 2000; Kim et al., 2004)을 참조하여 바이오니아 (Bioneer, Cheongwon, Korea)에 주문 제작하였으며, PCR은 DNA 2 µl, 1쌍의 시발체 각각 20 pmol 그리고 1 U의 *Taq* polymerase가 포함되어 있는 premix를 혼합하여 총 부피가 20 µl 되게 하였다. 증폭은 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 95°C에서 15분간 전변성 (predenaturation) 후, 94°C에서 45초, 51°C에서 30초 (*bla*<sub>SIM-1</sub>의 경우에 56°C에서 30초), 72°C에서 1분을 1주기로 25회, 마지막으로 72°C에서 10분간 연장반응을 시행하였다.



**Fig. 1.** Detection of the amplified *bla*<sub>IMP-1</sub> (left) and *bla*<sub>VIM-2</sub> (right) genes. M, 1.0 kb molecular size marker; lanes 1~4, isolates harboring *bla*<sub>IMP-1</sub> (500 bp); lanes 5~7, isolates harboring *bla*<sub>VIM-2</sub> (801 bp).

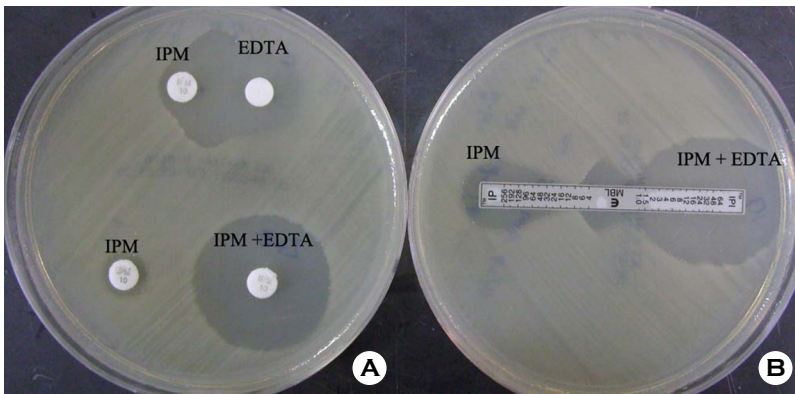
### MBL 표현형 검사

**EDTA 이중 디스크 확산 방법 (EDTA-DDST test).** EDTA-DDST는 Lee 등 (2001)의 방법을 참고로 하였는데, 우선 0.5 McFarland 균 농도를 Mueller Hinton (MH) 한천배지에 접종 후 IPM 10 µg (BBL, Cockeysville, MD, USA) 디스크와 빈 디스크를 끝과 끝이 10 mm 되게 한다. 이어서 0.5 M EDTA 10 µl를 빈 디스크에 첨가한 후 35°C에서 16~18시간 배양하였다. 두 디스크 사이에 새로운 억제대가 생성되면 MBL 생성 균주로 판단하였다 (Fig. 2).

**Etest MBL.** Etest MBL (AB BIODISK, Solna, Sweden)은 제조사의 지침대로 시행하였으며, EDTA 존재 하에 IPM의 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)가 8배 (3 two fold dilution) 이상 감소하거나 E-test MBL 스트립의 가운데 부분에 환상 (phantom) 억제대가 생기면 MBL 생성 균주로 판단하였다 (Fig. 2).

**EDTA-IPM disk test.** Yong 등 (2002)의 방법대로 시행하였다. 0.5 McFarland 균 농도를 MH 한천배지에 접종하고 2개의 IPM 디스크를 MH 한천에 올려놓는다. 하나의 IPM 디스크에 0.2 M EDTA 10 µl를 첨가하여 16~18시간 배양한 후 EDTA를 첨가한 IPM 디스크의 억제대가 IPM 단독 디스크의 억제대 보다 7 mm 이상 증가하였을 때 양성으로 판단하였다 (Fig. 2).

EDTA에 기초한 세 가지 표현학적 검사에 VIM-2 *Achromobacter xyloxidans* (accession number AY 686225) (Shin et al., 2005)을 양성대조로, *P. aeruginosa* ATCC 27853



**Fig. 2.** Inhibition patterns of EDTA-based phenotypic tests in VIM-2 type MBL-producing *P. aeruginosa*. A 0.5-mol/L (1,861 µg/disk) and 0.2 mol/L EDTA (744 µg/disk) were used as inhibitor for MBL inhibitor in EDTA DDST (A, upper) and IPM-EDTA disk test (A, lower), respectively.

**Table 1.** Results of the EDTA-based methods for the detection of IMP-1 & VIM-2 type MBL in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas* species

Species and allele of MBL genes (No of isolates)	EDTA-DDST		Etest MBL		IPM-EDTA disk test	
	P*	N	P	N	P*	N
<i>Acinetobacter</i> spp. (65)						
IMP-1 like MBL (18)	16	2	18	0	17	1
VIM-2 like MBL (14)	12	2	13	1	13	1 <sup>†</sup>
MBL non-producer (33)	5	28	5	28	1	32
<i>Pseudomonas</i> spp. (118)						
IMP-1 like MBL (8)	8	0	0	8	8	0
VIM-2 like MBL (47)	46	1	47	0	47	0
MBL non-producer (63)	16	47	3	60	3	60
Total isolates (183)						
MBL producer (87)	82	5	78	8	85	2
MBL non-producer (96)	21	75	8	88	4	92
Sensitivity (%)	94.25		89.65		97.70	
Specificity (%)	78.12		91.66		95.83	

\*The criterion of MBL producer was defined as a increase of an inhibition zone around IPM plus EDTA disk over IPM alone disk by ≥ 7 mm in IPM-EDTA disk test.

<sup>†</sup>Isolates co-producing MBL and OXA-51 type carbapenemase.

**Abbreviations:** MBL, metallo-β-lactamase; DDST, double disk synergy test; IPM, imipenem; P, positive; N, negative.

을 음성대조 균주로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

Imipenem 항균제에 내성인 183균주를 대상으로 *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> 및 *bla*<sub>SIM-1</sub>에 대한 PCR을 시행한 결과, IMP-1와 VIM-2형 MBL이 *Acinetobacter* spp.에서 49.2% (32/65) 그리고 *Pseudomonas* spp.에서 46.6% (55/118)였다 (Table 1). 이들 MBL 유전형 검사를 기준으로 하였을 때 EDTA-DDST는 *Acinetobacter* spp.에서 32 MBL 생성주 중 4균주를 검출하지 못하였으며 33 MBL 비 생성주에서 5균주가 양성을 보였다. *Pseudomonas* spp.에서는 55 MBL 생성

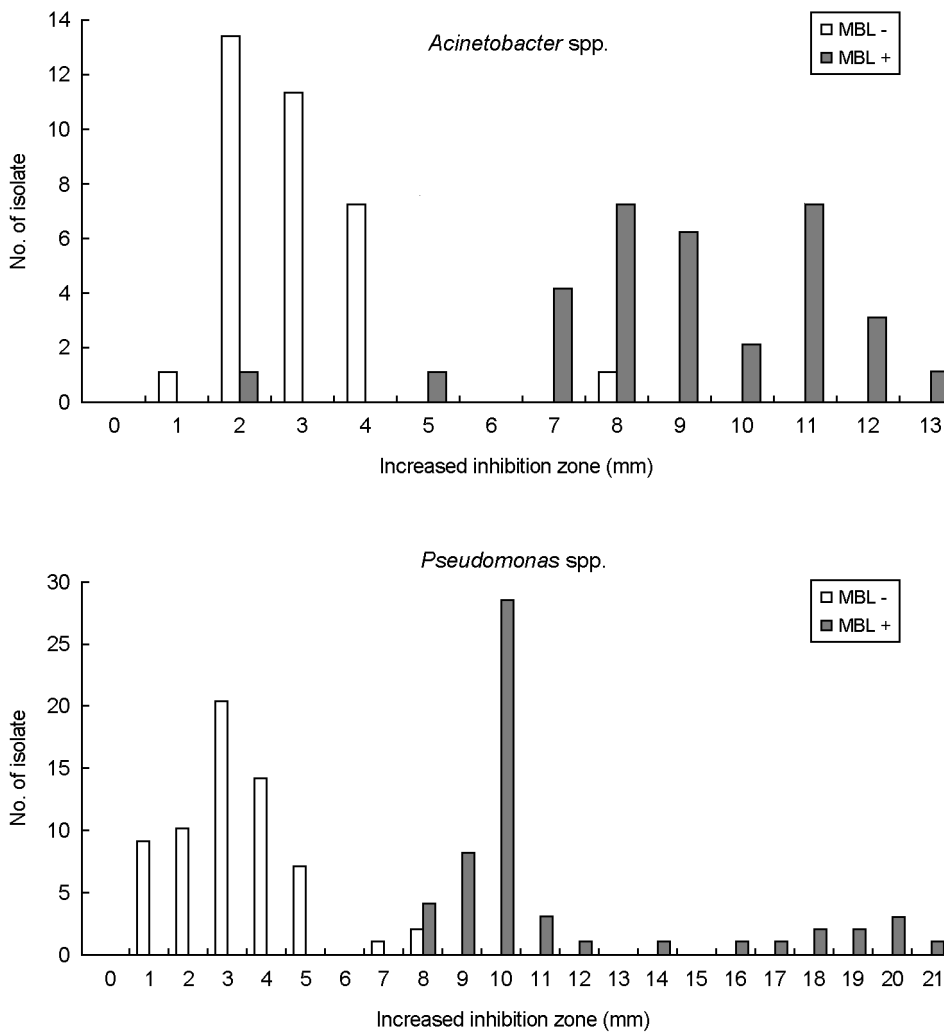
주에서 1주를 검출하지 못하였으며, 63 MBL 비 생성주에서 16균주가 양성을 보였다. 전체적으로 87 MBL 생성균주 중 82균주 (예민도: 94.3%)와 96 MBL 비 생성균주 중 21균주 (특이도 78.1%)가 양성을 보였다 (Table 1). EDTA-DDST 검사는 EDTA와 IPM 디스크간 거리에 따라 다른 결과를 보일 수 있다. 두 디스크간 거리를 10 mm와 15 mm로 한 논문에서 각각 92.7% (Lee et al., 2003a)와 67% (Marchiaro et al., 2005)의 검출률 (예민도)을 보였다. 본 연구에서는 두 디스크간 거리를 10 mm로 사용하였는데 예민도는 94.3%였으며 Lee 등 (2003a)의 결과와 유사하였다. 한편 EDTA-DDST는 검사과정은 편리하나 검사자간의 주관적인 판단에 의해 결과의 차이

를 보일 수 있다. 본 연구에서 EDTA-DDST의 특이도는 78.1%로 세 검사 방법 중 가장 낮았는데, Lee 등 (2003a)의 연구에서는 93.5%, Marchiaro 등 (2005)는 70%로 보고하였다. 이는 검사대상의 균 종 및 균 수의 차이뿐 아니라 검사자간 주관적인 판단에 의해서도 검사 결과가 차이를 보일 수 있기 때문으로 사료된다.

Etest MBL는 *Acinetobacter* spp.에서 32 MBL 생성주 중 1균주를 검출하지 못하였으며 33 MBL 비 생성주에서 5균주가 양성을 보였다. *Pseudomonas* spp.에서는 55 MBL 생성주에서 8주를 검출하지 못하였는데 이들은 모두 IMP-1형 *P. aeruginosa*였다. 그리고 63 MBL 비 생성주에서 3균주가 양성을 보였다. 전체적으로 87 MBL 생성주에서 78균주 (예민도, 89.7%)와 96 MBL 비 생성주 중 8균주 (특이도 91.7%)가 양성을 보여 (Table 1) Lee 등

(2005b)의 보고 (예민도 99%, 특이도 97.3%)와 차이를 보였다. Etest MBL에서 8균주의 위양성 균주가 있었는데, 흥미롭게도 이들은 모두 EDTA-DDST에서는 음성의 결과를 보였으며 이들 균주는 EDTA 감수성인 균주로 사료되었다 (Chu et al., 2005). 이상과 같이 Etest MBL은 우수한 검사 결과를 보이며 검사하기 쉽고 편리하나 IPM MIC가 낮은 (< 4 µg/mL) 균종에서는 위음성이 발생할 수 있으며 가격도 비싸다는 단점이 있다.

IPM-EDTA disk 방법은 EDTA-DDST에서 EDTA와 IPM 디스크간 거리의 조절 및 주관적 판단에 의한 결과의 차이 그리고 Etest MBL의 경제 부담 등을 보완하거나 줄일 수 있다 (Yong et al., 2002). 0.2 M EDTA를 첨가한 IPM 디스크와 EDTA를 첨가하지 않은 IPM 디스크의 억제대 차이의 (이하 EDTA 첨가 디스크에서 억제대 증가) 평균



**Fig. 3.** Increase of inhibition zone size around the imipenem disk with EDTA as compared with inhibition zones produced by imipenem disk without EDTA for 87 MBL positive and 96 MBL negative clinical isolates.

은 MBL 생성 *Acinetobacter* spp.에서 9.0 mm (2~13 mm) 이었으며, *Pseudomonas*에서는 11.5 mm (8~21 mm) 이었다. MBL 비 생성주에서는 각각 2.9 mm (1~8 mm)와 3.2 mm (0~8 mm) 이었다. EDTA 첨가 디스크에서 억제대 증가가 7 mm 이상을 MBL 생성 균주로 판단할 때, 87 MBL 생성 균주 중 *Acinetobacter* spp. 2균주를 제외하고 모두 양성 결과를 보였다 (예민도, 97.7%). 그리고 96균주의 MBL 비 생성 균주 중 4균주를 제외하고 모두 음성 결과를 보여 (특이도, 95.8%) (Table 1) Yong 등 (2002)의 결과와 유사하였다.

*Acinetobacter* spp.와 *Pseudomonas* spp.에서 EDTA가 첨가된 IPM 디스크의 억제대 증가의 평균이 달라 양성기준을 기존 7 mm 이상에서 각각 5 mm와 8 mm로 적용하였을 때 위양성 및 위음성 균주가 6균주에서 3균주 (위 음성 1, 위양성 2)로 줄었다. 이 기준을 적용하였을 때 *Acinetobacter* spp.에서 MBL 생성주 및 비 생성주 각각 1균주씩을 제외하고 정확히 감별되었다. 뿐만 아니라 검출되지 않은 하나의 MBL 생성주는 OXA-51 카바페넴 분해효소와 MBL을 동시에 생성하는 균주로 OXA-51 카바페넴 분해효소는 EDTA에 억제되지 않고 카바페넴을 가수분해할 수 있기 때문에 위음성을 나타낸 것으로 사료된다 (Lee et al., 2008). *Pseudomonas* spp.에서도 위양성 균주가 3주에서 2주로 감소되었으며 나머지 모든 균주는 정확히 감별되어 전체적으로 예민도와 특이도는 각각 98.9%와 96.9%를 보였다 (Fig. 3).

결론적으로 IPM-EDTA disk 방법은 3가지 EDTA에 기초한 MBL 생성균의 검출 방법 중 적어도 IMP-1형 및 VIM-2형 MBL을 검출하는데 가장 우수한 성적을 보였다. 또한 IPM-EDTA disk 방법은 결과의 해석에 주관적인 판단을 배제할 수 있으며 경제적이므로 임상 검사실에 적용하기 가장 유리할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000. 38: 40-43.
- Bush K, Jacoby JA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995. 39: 1211-1233.
- Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. 48: 4654-4661.
- Chu YW, Cheung TKM, Ngan JYW, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. *Intern J Antimicrob Agents*. 2005. 26: 338-341.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S9, Wayne, Pa. 2006.
- Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-β-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006. 50: 2272-2273.
- Kim IS, Oh WI, Song JH, Lee NY. Screening and identification of metallo-β-lactamase gene in clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean J Lab Med*. 2004. 24: 177-182.
- Kimura S, Ishii Y, Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM-type metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005. 53: 241-244.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzriol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM6</sub>, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999. 43: 1584-1590.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001. 7: 88-91.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiation metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2003a. 41: 4623-4629.
- Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM-and IMP-type metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. *Emerg Infect Dis*. 2003b. 9: 868-871.
- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, *bla*<sub>SIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005a. 49: 4485-4491.

- Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmström A, Qwörnström A, Karlsson Å, Chong Y. Evaluation of Etest MBL for detection of *bla*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>VIM-2</sub> Allele-positive clinical isolates *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.. J Clin Microbiol. 2005b. 43: 942-944.
- Lee K, Kim MN, Choi TY, Cho SE, Lee S, Whang DH, Yong D, Chong Y, Woodford N, Livermore DM, the KONSAR Group. Wide dissemination of OXA-type carbapenemase in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents. 2009. 33: 520-524.
- Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Pasteran F, Viale AM, Vila AJ, Limansky AS. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo-β-lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria. J Clin Microbiol. 2005. 43: 5648-5652.
- Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region; emergence of VIM-2 producing isolates. J Clin Microbiol. 2007. 45: 294-298.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collect L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase, and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in France. Antimicrob Agents Chemother. 2000. 44: 891-897.
- Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo-β-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob Agents Chemother. 2000. 44: 1229-1235.
- Shin KS, Han K, Lee J, Hong SB, Son BR, Youn SJ, Kim J, Shin HS. Imipenem-resistant *Achromobacter xylosoxidans* carrying *bla*<sub>VIM-2</sub>-containing class 1 integron. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005. 53: 215-220.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial programme. J Antimicrob Chemother. 2002. 50: 673-679.
- Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-β-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2002. 40: 3798-3801.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1991. 35: 147-1451.