

## MLS<sub>B</sub>계 항생물질 유도 내성 세균에서 *In vitro*로 선발된 지속성 내성형 *erm(A)*와 *erm(C)*의 분자적 특성 규명

윤은정 · 진성혜\* · 최응칠# · 심미자\*#

서울대학교 약학대학 · 종합 약학 연구소, \*서울시립대학교 생명과학과

(Received February 15, 2007; Revised March 14, 2007)

### Molecular Analysis of Spontaneous Mutations in *erm(A)* and *erm(C)* Selected *In vitro* as a Constitutive MLS<sub>B</sub> Resistant Staphylococci

Eun-Jeong Yoon, Sung-Hye Jin\*, Eung-Chil Choi# and Mi-Ja Shim\*#

College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

**Abstract** – The predominant Macrolides-Lincosamide-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) antibiotics resistance genes in staphylococci are *erm(A)* and *erm(C)*. There is the phenomenon that the ratio of constitutively MLS<sub>B</sub> antibiotics resistance (cMLS) in *erm(A)* is much higher than in *erm(C)*. Thus, we confirmed that the difference of the mutation ratio between *erm(A)* and *erm(C)* makes the phenomenon. We examined 8 staphylococci carrying inducibly expressed (iMLS) *erm(A)* or *erm(C)* genes. After overnight incubation in the presence of the non-inducer MLS<sub>B</sub> antibiotics, spontaneous mutants constitutively expressed MLS<sub>B</sub> resistance were selected. Against our expectation, the mutation ratio of *erm(A)* was lower than *erm(C)*. Therefore, possibilities of other factors determining the ratio of cMLS phenotype might be concerned. All the mutants showed sequence alterations in translational attenuator and all the alterations seemed to give rise to change the second structure of mRNA to express constitutively. For *erm(A)*, 4 different types of sequence deletions ranging from 72 bp to 122 bp and 3 different types of duplications ranging 24 bp to 93 bp were detected. Also, there were 9 different types of duplications ranging 15bp to 154bp in *erm(C)*.

**Keywords** □ MLS<sub>B</sub> resistance, *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *erm(A)*, *erm(C)*

포도상구균(staphylococci)은 인간의 점막이나 피부에 정상균 총으로 존재하는 그람 양성구균이다. 그 중 *Staphylococcus aureus*는 coagulase 효소를 가지고 있어 다른 종과 구별되는 포도상구균으로, 유일하게 병원성으로 분류되어있는 종이다.<sup>1,2)</sup> *S. aureus*에 의한 감염은 농가진과 같은 피부감염이 가장 흔하며, 균혈증, 심내막염, 수막염, 폐렴, 화농성 관절염, 골수염, 식중독 등 매우 다양하다.<sup>2)</sup> Coagulase 효소를 가지고 있지 않은 포도상구균을 coagulase-negative staphylococci(CNS)로 통칭하는데, 과거에는 임상적 의의를 두지 않는 경우가 많았지만 면역력이 저하된 환자에게 심내막염이나 복막염을 일으키는 원인균으로 밝혀져 그

중요성이 점차 증대되고 있다.<sup>3)</sup>

이들 *S. aureus*나 CNS 감염증에 1차 치료제는  $\beta$ -lactam계 항생물질이나, 이 계열의 항생물질은 앨러지의 위험이 있고, 내성율도 매우 높아 제한적으로만 쓰이고 있다.<sup>4,6)</sup> 이에 2차 치료제로 추천되는 약물이 quinolone계 항생물질 및 마크로라이드-린코사마이드-스트렙토그라민 B(Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B, MLS<sub>B</sub>) 계열의 항생물질이다. 그러나 이들 약물에 대한 내성균도 증가하고 있는 추세이다.<sup>7)</sup> MLS<sub>B</sub> 계열 항생물질에 대한 내성의 유형은, 그 표현형에 따라 유출형 내성형, 유도 내성형, 지속성 내성형의 세가지로 나누어 생각할 수 있다.<sup>8)</sup> MLS<sub>B</sub> 계열 항생물질에 대한 내성의 가장 흔한 형태인 유도 내성형과 지속성 내성형의 경우, 그 원인 유전자가 erythromycin resistance methylase(*erm*) 유전자이며, *erm* 유전자의 모형은 유도제인 항생제에 의해 다른 항생제의 내성 여부를 결정하게 되는 반면, inverted repeat(IR) site의 일부에 변이가 일어나게 되면 지속성

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-872-1795  
(E-mail) ecchoi@snu.ac.kr  
(전화) 02-2210-2490 (팩스) 02-2210-2490  
(E-mail) mjshim@uos.ac.kr

내성형을 보이게 된다.<sup>3,11,12</sup> 임상 균주들의 내성 표현형에 대한 지속적인 관찰 결과에 따르면 본래 *erm* 유전자의 내성형인 유도성 내성형 보다 그 변이형인 지속성 내성형을 보이는 MLS<sub>B</sub> 계열 항생물질 내성 균주의 비율이 절대적으로 높은 것이 확인되고 있다.<sup>7,8,10,13,14</sup> MLS<sub>B</sub> 계열 항생물질에 내성율이 높아지고 있다는 것 자체도 주목해야 할 문제이지만, 지속성 내성형을 보이는 포도상 구균의 경우에 마크로라이드 계열 항생물질의 발전형인 케토라이드 계열 항생물질에조차 내성을 보이므로 유도성 내성형을 보이는 *erm* 유전자가 지속성 내성형으로 변이되지 않도록 관리하는 것 또한 중요하다.

Lim 등의 2002년 발표에 따르면, 우리나라에서 임상분리된 *S. aureus*의 경우 *erm*(A)의 비율이 *erm*(C)에 비해 매우 높으며 MLS<sub>B</sub> 계열 항생물질에 내성인 균주의 대부분이 지속성 내성형인 반면, CNS의 경우 *erm*(C)의 비율이 *erm*(A)에 비해 높고 *S. aureus*에 비해 유도성 내성형의 비율이 높은 것으로 나타났다.<sup>7</sup> 이를 통해 *erm*(A)와 *erm*(C)의 자발적 변이율 차이가 이와 같은 현상을 유발한 것이리라 예상할 수 있게 되었다. 이에 본 연구에서는 *erm*(A)와 *erm*(C)의 자발적 변이율에 어떤 차이가 있으며, 자발적 변이주의 분자적 특성이 어떠한지를 확인해보기로 하였다.

### 실험 방법

#### 균주의 선발

균주는 1999년과 2001년에 서울과 대전의 3차 의료기관에서 환자로부터 분리한 coagulase-negative staphylococci(CNS)와 2001년에 식약청에서 정상인에게서 분리한 *S. aureus*를 이용하였다. 1차로 Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI, USA)의 기준에 의거한 디스크 실험을 통해 MLS<sub>B</sub> 계열 항생물

질에 유도 내성 표현형을 가지는 균주를 선발하였다.<sup>7,15,16</sup> 선발된 균주를 대상으로 Bioneer 사(Daejeon, Korea)에서 합성한 primer(Table I)들을 이용해 multiplex Polymerase Chain Reaction(PCR)을 실시하여, 어떤 내성 유전자를 가지고 있는지 확인하였다.<sup>15</sup> 이를 통해, MLS<sub>B</sub> 계열 항생물질에 유도 내성형의 표현형을 보이면서 그 분자적 원인이 *erm*(A)이거나 *erm*(C)임이 확인된 8개의 세균 균주를 선발하였다. 이들 대상 균주를 대상으로 CLSI의 기준에 따라 항생물질의 최소 억제 농도를 측정하고 실험을 진행하였다.

#### 항생물질

14환 마크로라이드계 항생물질인 erythromycin(Sigma Chemical Co., MO, USA), 15환 마크로라이드계 항생물질인 josamycin(ICN Biomedical, CA, USA), 린코사마이드계 항생물질인 clindamycin(Sigma Chemical Co., Mo, USA), 스트렙토그라민 B계 항생물질인 quinupristine(Handok Co., Seoul, Korea), 케토라이드계 항생물질인 telithromycin(Handok Co., Seoul, Korea)을 사용하였다.

#### 자발적 변이율의 확인 및 돌연변이체 선발

대상 균주를 Mueller Hinton(MH) broth(Difco, MD, USA)에서 진탕 배양하여, 그 균액을 4배 최소 저지 농도의 항생물질이 포함된 MH agar(Difco, MD, USA)에 도말하였다. 이를 37°C에서 18시간 동안 배양하여 생겨난 돌연변이체의 집락을 관찰하였다. 항생물질을 포함하지 않은 MH agar 배지에 같은 균액을 도말하여 생균수를 확인하고, 돌연변이체 집락의 수와 비교하여 변이율을 계산하였다. 생겨난 돌연변이체가 자발적 변이에 의해 지속성 내성형을 획득하였는지를 확인하였다. 이를 위해, CLSI에

Table I - Primers used in PCR

Name	Primer sequence	Product size (base pairs)
<i>erm</i> (A) <sup>c</sup>	5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3' <sup>a</sup> 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3' <sup>b</sup>	421
<i>erm</i> (B) <sup>c</sup>	5'-GAAAAGGTACTIONCAACCAATA-3' <sup>a</sup> 5'-ATGAACGGTACTTAAATTTGTTTAC-3' <sup>b</sup>	639
<i>erm</i> (C) <sup>c</sup>	5'-GCTAATATGTTTAAATCGTCAATTCC-3' <sup>a</sup> 5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3' <sup>b</sup>	572
IR- <i>erm</i> (A) <sup>d</sup>	5'-GAAGTCGTCAAGGTGCAAAATTAC-3' <sup>a</sup> 5'-GACTAGCTCTTTGGTAAATGTCC-3' <sup>b</sup>	431
IR- <i>erm</i> (C) <sup>d</sup>	5'-CGTGATCAACAAGTTTATTTTCTG-3' <sup>a</sup> 5'-CTTTTATTCAATAATCGCATCCG-3' <sup>b</sup>	458
rRNA <sup>d</sup>	5'-GAAAGGCGTAACGATTTGGG-3' <sup>a</sup> 5'-GGAACCACCGGATCACTAAG-3' <sup>b</sup>	437

<sup>a</sup>Forward primer.

<sup>b</sup>Reverse primer.

<sup>c</sup>Primer set for multiplex PCR.

<sup>d</sup>Primer set for PCR and sequencing analysis.

의거한 agar dilution 법으로 최소 저지 농도를 결정하고, 디스크 법으로 지속성 내성형을 보이고 있는지를 보았다. 내성을 유도 하기 전 후의 생장 곡선을 비교하여 내성 유도와 관계없이 지속적으로 MLS<sub>B</sub> 계열 항생제 전반에 내성임을 확인하고, pulse-field gel electrophoresis(PFGE) 실험을 실시하여 돌연변이체가 모형 균주에서 발생한 것임을 확인하였다.

**변이위치의 결정**

Genomic DNA extraction kit인 G spin<sup>TM</sup>(InTRON, Gueonggi, Korea)을 이용하여 모형 균주 및 지속성 내성형 돌연변이체의 total DNA를 얻었다. 이 total DNA를 주형으로하여, Table I의 IR-erm(A)와 IR-erm(C) primer를 이용하여 Peltier Thermocycler(MJ Research, MA, USA)에서 PCR 하였다. 최초에 95°C에서 5분간 denaturing을 하고, 이어 97°C에서 10초, primer별

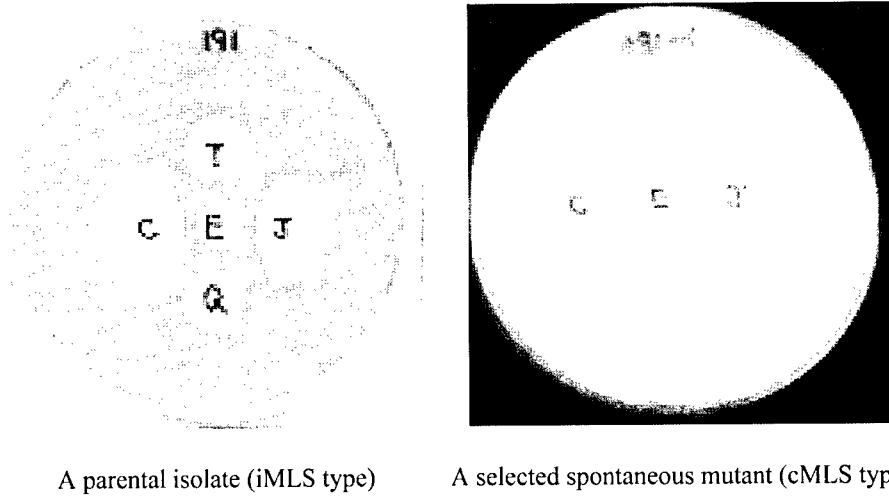
적합 annealing 온도에서 30초, 74°C에서 45초간 elongation하는 반응을 25회 반복한 후 74°C에서 10분간 마무리 elongation을 하였다. 이렇게 얻어진 DNA단편을 InTRON사의 PCR quick spin<sup>TM</sup>으로 정제하고 Bionics사(Seoul, Korea)에 sequencing 분석을 의뢰하여 변이 위치를 결정하였다.

**실험 결과 및 고찰**

최소 저지 농도 및 디스크 실험을 통해 분명한 유도 내성형 균주를 확인하여 선발된 실험 대상 모형 균주들은 14환 마크로라이드계 항생물질인 erythromycin에 의해 내성이 유도되어 16 환 마크로라이드계인 josamycin, 린코사마이드계인 clindamycin, 스트렙토그라민 B계인 quinupristine, 케토라이드계인 telithromycin에 내성을 가지게 되는 것으로 보였다(Table II와 Fig. 1).

**Table II** – The characters of parental isolates and their mutants

		MIC (µg/ml)									
		Erythromycin		Josamycin		Clindamycin		Quinupristine		Telithromycin	
		p/t	mutants	p/t	mutants	p/t	mutants	p/t	mutants	p/t	mutants
<i>erm(A)</i> <i>S. aureus</i>	NSTA191	>64	>64	8	>64	8	>64	4	>64	0.12	>64
	NSTA819	>64	>64	8	>64	8	>64	4	>64	0.12	>64
CNS	1999-122	>64	>64	4	>64	0.25	>64	0.25	>64	≤0.06	>64
	1999-147	>64	>64	4	>64	0.5	>64	0.5	>64	0.12	>64
<i>erm(C)</i> <i>S. aureus</i>	NSTA534	>64	>64	16	>64	16	>64	8	>64	0.25	>64
	NSTA777	>64	>64	16	>64	16	>64	8	>64	0.25	>64
CNS	KY46	>64	>64	8	>64	8	>64	0.5	>64	0.12	>64
	KY50	>64	>64	8	>64	8	>64	0.5	>64	0.12	>64



A parental isolate (iMLS type)                      A selected spontaneous mutant (cMLS type)

**Fig. 1** – Phenotypes of a parental isolate and its selected spontaneous mutant. Disks marked E contains erythromycin 15 µg/disc, C contains clindamycin 2 µg/disc, J contains josamycin 15 µg/disc, T contains telithromycin 0.2 µg/disc and Q contains quinupristin 2 µg/disc. We could find D-shaped zone of inhibition around the disks of C, J, T and Q at the panel of the parental isolate. However there was no zone of inhibition around the discs of all MLS<sub>B</sub> antibiotics.

이는, 내성을 유도하는 항생물질인 erythromycin을 처리한 뒤에 다른 항생물질이 포함된 배지에서 배양한 균의 성장곡선으로도 확인되었다. 이에, non-inducer인 4종의 항생제를 이용하여 자발적 지속성 내성형 돌연변이체를 선발하였다. 더불어 생균수를 측

정하여 균액에 들어있는 생균에서 생겨난 돌연변이체의 비율을 계산하여 Table III에 나타내었다. 돌연변이체 선발 실험은 3회에 걸쳐 실시하여 그 평균치를 구하였다. 얻어진 돌연변이체에 대해서는 triple-disc test 상에서 저지환이 생기지 않음을 확인

Table III – The ratio of spontaneous mutation

			Selected by			
			Josamycin	Clindamycin	Quinupristine	Telithromycin
<i>erm(A)</i>	<i>S. aureus</i>	NSTA191	$4.5 \times 10^{-10}$	$3.6 \times 10^{-10}$	$4.5 \times 10^{-10}$	$2.7 \times 10^{-12}$
		NSTA819	$1.1 \times 10^{-10}$	$3.7 \times 10^{-10}$	$< 10^{-13a}$	$9.7 \times 10^{-11}$
	CNS	1999-122	$8.1 \times 10^{-9}$	$5.1 \times 10^{-10}$	$1.2 \times 10^{-13}$	$8.1 \times 10^{-10}$
		1999-147	$< 10^{-13a}$	$1.2 \times 10^{-9}$	$< 10^{-13a}$	$3.9 \times 10^{-10}$
<i>erm(C)</i>	<i>S. aureus</i>	NSTA534	$1.1 \times 10^{-8}$	$4.9 \times 10^{-8}$	$3.4 \times 10^{-9}$	$4.6 \times 10^{-9}$
		NSTA777	$4.4 \times 10^{-8}$	$4.3 \times 10^{-8}$	$3.6 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^{-8}$
	CNS	KY46	$1.2 \times 10^{-7}$	$5.7 \times 10^{-8}$	$4.2 \times 10^{-11}$	$3.0 \times 10^{-8}$
		KY50	$1.7 \times 10^{-7}$	$7.1 \times 10^{-8}$	$2.6 \times 10^{-11}$	$1.1 \times 10^{-7}$

<sup>a</sup>No mutants were selected and the number of viable cells were near  $10^{13}$  CFU/ml.

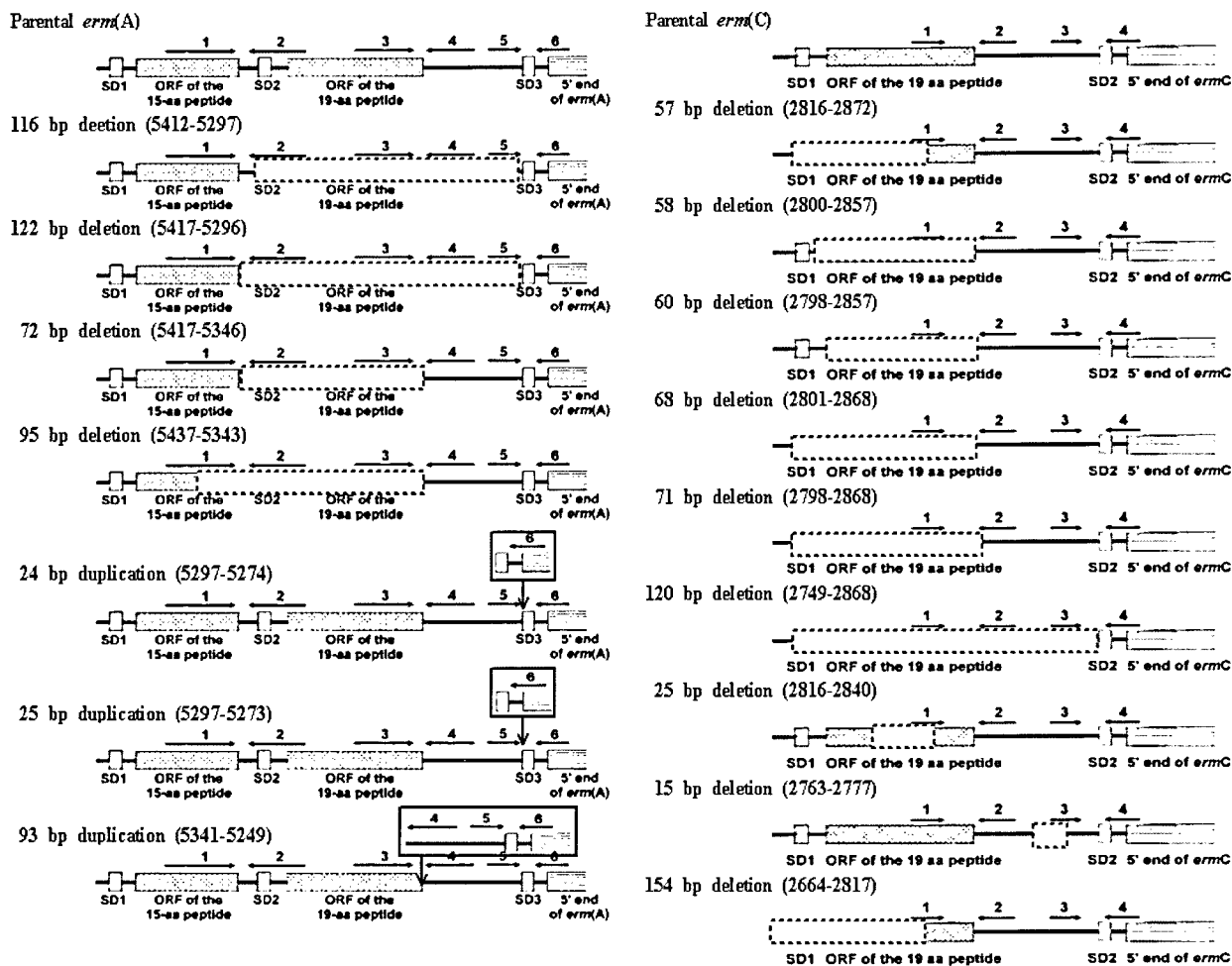


Fig. 2 – Detected mutations in the translational attenuator region of *erm* genes.

하였고, 최소저지 농도와 성장곡선으로 지속성내성화 되었음을 재확인하였다. 그 변이율은  $10^{-7}$ 에서  $10^{-13}$  정도로 매우 낮은 편이었다. 변이율은 *erm* 유전자의 종류나 선발 항생물질에 따라 조금씩 달랐으나, 균종별 차이는 크지 않았다. 선발 항생물질로 quinupristine 및 telithromycin을 쓴 경우의 변이율이 전반적으로 가장 낮아, *erm*(A)를 가지는 *S. aureus*와 CNS의 경우, 변이주를 하나도 얻지 못한 경우도 있었다. *erm*(C)보다는 *erm*(A)를 가지는 균주의 변이율이 더 낮았다. *erm*(A)는 지속성 내성형 변이주를 하나도 얻지 못하여  $10^{-13}$ 보다도 낮은 변이율을 보이는 경우부터  $8.1 \times 10^{-9}$ 의 변이율을 보이는 경우까지 있었다. 반면, *erm*(C)의 경우 가장 낮게는  $4.2 \times 10^{-11}$ 에서 높게는  $1.7 \times 10^{-7}$ 까지 전반적으로 *erm*(A)에 비해 높은 변이율을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. *erm*(A)와 *erm*(C) 유전자에서 보여진 이와 같은 차이는 임상 균주에서의 내성 표현형과 유전자형의 비율을 통해 예측한 바와는 상반되는 결과였다. 이를 통해, 임상에서 분리되는 균주가  $MLS_B$  계열 항생물질에 대해 지속성 내성화되는 원인에는 자발적 변이 이외에 다른 요인이 작용하고 있으리라 예측된다. 실제  $MLS_B$  계열 항생물질에 유도 내성형인 *S. aureus* 감염증을 치료할 때 non-inducer인 clindamycin 등도 치료 실패 경험에 있어 임상적으로는 이들을 사용하지 않을 것을 권하고 있다. 이와 같이 낮은 변이율에도 불구하고 non-inducer 사용시 치료 실패와 같은 결과가 나타나는 것은, 인체 내에 다른 인자가 유도 내성형 균주의 지속성 내성화에 관여하고 있다는 뜻이라 해석할 수 있겠다.

수 차례의 실험을 통해 안정적으로 일정한 양의 돌연변이체를 얻을 수 있었던 clindamycin으로 선발한 균주들을 이후의 실험에 이용하였다. 이들 돌연변이체들은 모형 균주와 달리 내성 유도 없이도  $MLS_B$  계열 항생물질 전반에 대해 높은 최소 저지 농

도를 나타내었다(Table II).  $MLS_B$  계열 항생물질에 대해 지속성 내성형을 가지게 된 균주들은 *erm* 유전자의 translational 혹은 transcriptional attenuation을 결정하는 IR site의 변이에 의한 경우가 일반적이다. 따라서 이 부분을 증폭하여 얻어낸 DNA 단편을 sequencing analysis로 확인하였다. 더불어  $MLS_B$  계열 항생물질의 결합부위도 증폭하여 분석하였다. 이때 사용한 primer는 Table I의 IR-*erm*(A)와 IR-*erm*(C), 그리고 rRNA set였다.  $MLS_B$  계열 항생물질의 결합부위인 ribosomal RNA에는 아무런 변이도 일어나지 않았음을 확인하였고, 반면에 IR site에서는 다양한 변이를 관찰할 수 있었다(Table IV). *erm*(A)의 IR site에서는 deletion 및 duplication의 변이가 관찰되었다. Deletion 타입의 경우는 72 bp에서 122 bp까지 4가지 종류의 유전자 조각 상실을 확인하였으며, duplication 타입의 경우는 24 bp, 25 bp 또는 93 bp의 유전자 조각이 반복되는 3가지의 변이를 확인하였다. *erm*(C)의 IR site에서는 15 bp에서 154 bp의 유전자가 상실되는 9가지 타입의 deletion 변이가 관찰되었다. 이들 변이된 IR site sequence의 mRNA 2차 구조를 예상해 본 결과,<sup>16,17</sup> Fig. 3에서 보여지듯 구조가 변형되어 *erm* 유전자의 시작 코돈 앞에 위치한 ribosome 결합 부위에 ribosome의 결합이 용이하도록 노출됨으로써, 별다른 유도 없이 유전자가 발현되는 구조를 만드는 것으로 보였다.

## 결 론

Non-inducer인  $MLS_B$  계열 항생물질에 의한 유도 내성형 staphylococci의 지속성 내성형 자발적 변이율은 낮은 편이었으며, 그들의 변이 원인은 inverted repeat site의 변이에 의한 mRNA의 2차 구조의 변화 때문인 것을 확인할 수 있었다.

Table IV – Detected mutations in the translational attenuator region of *erm* genes

Mutation type	Structural alteration (base pairs)	Positions of alterations	No. of mutants	
<i>erm</i> (A)		in Tn554 (GI: 43726)	<i>S. aureus</i>	CNS
Deletion	116	5412-5297	3	6
Deletion	122	5417-5296	5	-
Deletion	72	5417-5346	3	-
Deletion	95	5437-5343	-	4
Duplication	24	5297-5274	-	1
Duplication	25	5297-5273	3	1
Duplication	93	5341-5249	2	-
<i>erm</i> (C)		in pE194 (GI: 49489772)		
Deletion	57	2816-2872	-	3
Deletion	58	2800-2857	2	1
Deletion	60	2798-2857	1	-
Deletion	68	2801-2868	1	-
Deletion	71	2798-2868	4	-
Deletion	120	2749-2868	1	-
Deletion	25	2816-2840	3	-
Deletion	15	2763-2777	2	-
Deletion	154	2664-2817	-	4

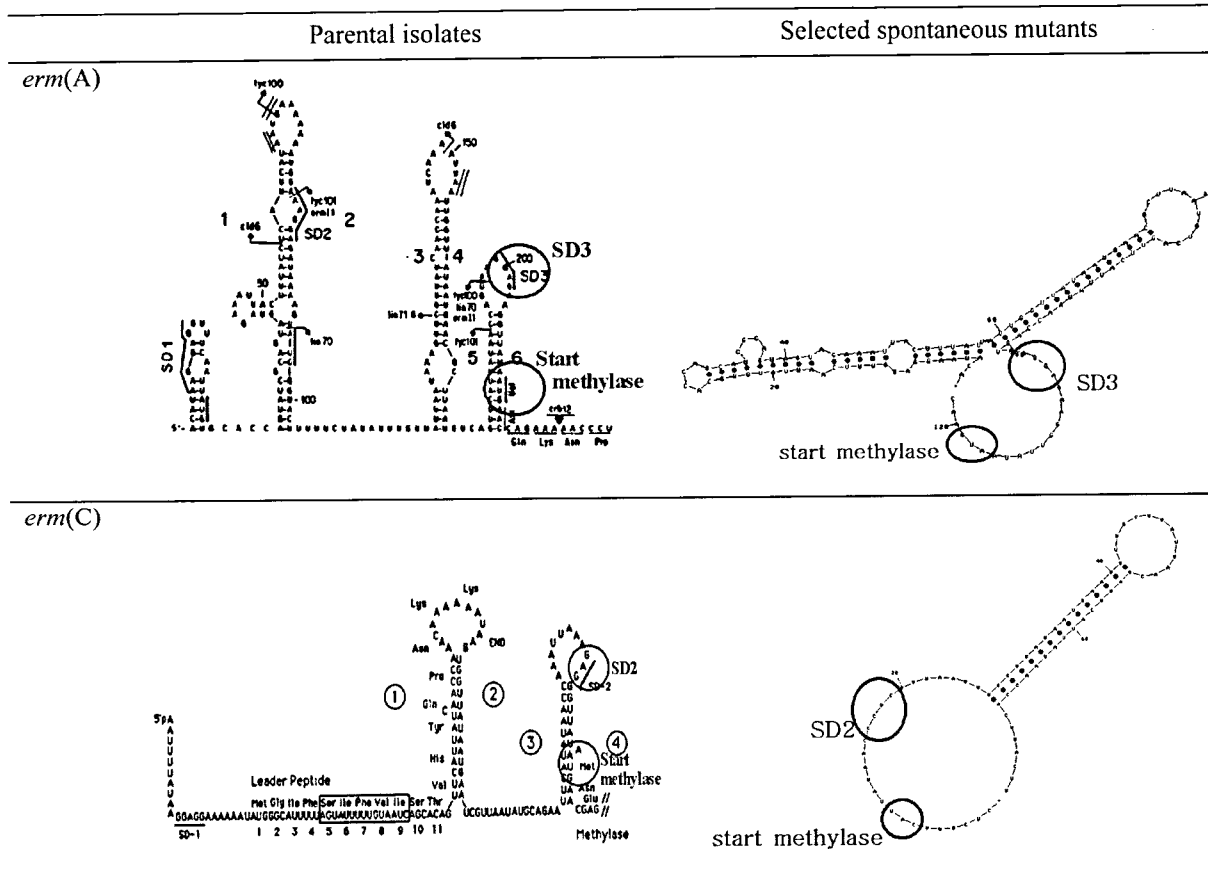


Fig. 3 – Representative estimated secondary structures of mRNA in the translational attenuator region of *erm(A)* and *erm(C)*.

감사의 말씀

이 논문은 서울시립대학교 2005년 학술연구조성비에 의하여 연구되었습니다. 이에 서울시립대학교에 감사하는 바입니다.

참고문헌

- 1) Thouverez, M., Muller, A., Hocquet, D., Talon, D. and Bertrand, X. : Relationship between molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a French teaching hospital. *Journal of Medical Microbiology* 52(Pt 9), 801 (2003).
- 2) Kim, H. B., Jang, H. C., Nam, H. J., Lee, Y. S., Kim, B. S., Park, W. B., Lee, K. D., Choi, Y. J., Park, S. W., Oh, M. D., Kim, E. C. and Choe, K. W. : *In vitro* activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: A nationwide survey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(4), 1124 (2004).
- 3) Lampson, B. C. and Parisi, J. T. : Naturally occurring *Staphylococcus epidermidis* plasmid expressing constitutive

- macrolide lincosamide streptogramin B resistance contains a deleted attenuator. *Journal of Bacteriology* 166(2), 479 (1986).
- 4) Felmingham, D., Reinert, R. R., Hirakata, Y. and Rodloff, A. : Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative *in vitro* activity of the ketolide, telithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 50 Suppl S1, 25 (2002).
- 5) Uh, Y., Jang, I. H., Hwang, G. Y., Lee, M. K., Yoon, K. J. and Kim, H. Y. : Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of beta-hemolytic streptococci in Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(7), 2716 (2004).
- 6) Shobha, K. L., Rao, P. S. and Thomas, J. : Survey of *Staphylococcus* isolates among hospital personnel, environment and their antibiogram with special emphasis on methicillin resistance. *Indian J. Med. Microbiol.* 23(3), 186 (2005).
- 7) Lim, J. A., Kwon, A. R., Kim, S. K., Chong, Y., Lee, K. and Choi, E. C. : Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 49(3), 489 (2002).

- 8) Fiebelkorn, K. R., Crawford, S. A., McElmeel, M. L. and Jorgensen, J. H. : Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(10), 4740 (2003).
- 9) Schmitz, F. J., Petridou, J., Milatovic, D., Verhoef, J., Fluit, A. C. and Schwarz, S. : *In vitro* activity of new ketolides against macrolide susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates with defined resistance gene status. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**(3), 580 (2002).
- 10) Schmitz, F. J., Petridou, J., Jagusch, H., Astfalk, N., Scheuring, S. and Schwarz, S. : Molecular characterization of ketolide-resistant *erm*(A)-carrying *Staphylococcus aureus* isolates selected *in vitro* by telithromycin, ABT-773, quinupristin and clindamycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**(4), 611 (2002).
- 11) Schmitz, F. J., Petridou, J., Astfalk, N., Scheuring, S., Kohrer, K., Verhoef, J., Fluit, A. C. and Schwarz, S. : Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *erm*(A) genes in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(5), 1603 (2001).
- 12) Werckenthin, C., Schwarz, S. and Westh, H. : Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *ermC* genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(7), 1681 (1999).
- 13) Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M. E., Leclercq, R., Vandenesch, F. and Etienne, J. : Distribution of genes encoding resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(5), 1062 (1999).
- 14) Luthje, P. and Schwarz, S. : Molecular analysis of constitutively expressed *erm*(C) genes selected *in vitro* in the presence of the non-inducers pirlimycin, spiramycin and tylosin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**(1), 97 (2007).
- 15) Khan, S. A., Nawaz, M. S., Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. : Simultaneous detection of erythromycin resistant methylase genes *ermA* and *ermC* from *Staphylococcus* spp. by multiplex-PCR. *Molecular and Cellular Probes* **13**(5), 381 (1999).
- 16) Sandler, P. and Weisblum, B. : Erythromycin induced ribosome stall in the *ermA* leader: a barricade to 5'-to-3' nucleolytic cleavage of the *ermA* transcript. *Journal of Bacteriology*, **171**(12), 6680 (1989).
- 17) Zuker, M. : Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**(13), 3406 (2003).
- 18) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15<sup>th</sup> Informational Supplement. Document M100-S15. CLSI, Wayne, PA (2005).