

새로운 옥사졸리디논계 항균제 LCB01-0371에 대한 *Enterococcus faecalis*의 내성 기전

이현희 · 이수노 · 곽진환[#]

한동대학교 생명과학부

(Received November 7, 2013; Revised November 25, 2013; Accepted December 2, 2013)

Resistance Mechanism of *Enterococcus faecalis* to LCB01-0371, a New Oxazolidinone

Hyun-Hee Lee, Su-Ro Lee and Jin-Hwan Kwak[#]

School of Life Science, Handong Global University, Pohang 791-708, Korea

Abstract — To study the resistance mechanism of *E. faecalis* to LCB01-0371, several resistant mutants to LCB01-0371 or linezolid were isolated by step-wise selection. The frequency of spontaneous mutations resistant to LCB01-0371 was lower than that of linezolid in *E. faecalis*. The genetic variations in resistant mutants were analyzed by DNA sequencing of domain V of 23S rRNA in each mutant. The first-step mutant to LCB01-0371 had a G2576T point mutation in V domain of 23S rRNA. However, no resistant mutant to LCB01-0371 was isolated in second-step mutant selection.

Keywords □ LCB01-0371, resistance mechanism, Oxazolidinone, *E. faecalis*

최근에 전세계적으로 MRSA, VRE와 같은 multi-drug resistant (MDR) 병원균인 슈퍼박테리아의 출현으로 인해 기존 항생제로 쓰는 치료가 힘든 감염질환이 많이 발생하고 있다. 이러한 내성균은 병원뿐만 아니라 지역사회에서도 점차 퍼져가면서 인류의 건강에 큰 위협이 되고 있다.^{1,2)} 이러한 실정에도 불구하고 슈퍼박테리아의 치료제의 개발이 지금까지 제대로 이루어지지 않았고, 최근 FDA로부터 신약 승인을 받은 linezolid와 daptomycin 이외에는 새로운 항생제가 거의 없는 형편이다. 따라서 슈퍼박테리아를 치료할 수 있는 새로운 항생제 중 특히 최근 독성 문제와 내성 문제가 대두되기 시작한 linezolid를 대신할 수 있는 새로운 옥사졸리디논계 항생제의 개발이 시급한 실정이다.³⁻⁶⁾

옥사졸리디논계 화합물은 새로운 작용기전을 가진 합성 항생제로서, MRSA 및 VRE 등 거의 모든 그람양성 내성세균에 우수한 항균활성을 갖는 슈퍼항생제로 잘 알려져 있다.^{7,8)} 옥사졸리디논계 항생제는 세균의 23S rRNA의 V 부위에 결합하여, 30S rRNA와 50S rRNA의 초기 복합체 형성을 방해하고, 따라서 세

균의 단백질 생합성을 억제하면서 항균효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁹⁾

최초의 옥사졸리디논계 항균제인 linezolid(Zybox[®])는 MRSA 및 VRE와 같은 슈퍼박테리아에 의한 감염의 치료제로 2000년에 FDA로부터 승인을 받은 약물이다. 그리고 linezolid는 현재 MRSA, vancomycin-resistant *S. aureus*(VRSA), vancomycin-resistant enterococci(VRE)와 같은 내성균으로 인한 중증의 폐렴과 중증 피부감염 치료에 매우 효과적으로 사용되고 있는 우수한 항생제이다. 그러나 최근 들어 linezolid의 임상에서의 사용빈도가 증가하면서, linezolid에 내성을 가진 *S. aureus*와 *Enterococci*의 출현이 점차 보고 되고 있다.^{10,11)} 뿐만 아니라, 모노아민산화효소의 억제 반응과 혈소판감소증, 빈혈, 호중구감소증 등을 포함한 골수 독성의 문제로 인해 linezolid의 장기간 사용이 크게 제한되고 있다.^{12,13)} 따라서 linezolid에 대한 세균의 내

[#]Corresponding Author

Jin-Hwan Kwak

School of Life Science, Handong Global University, Pohang 791-708, Korea

Tel.: 054-260-1353 Fax.: 054-260-1925

E-mail: jhkwak@handong.edu

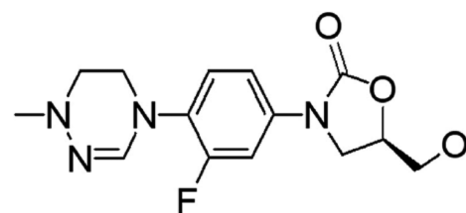


Fig. 1 – Chemical structure of LCB01-0371.

성 문제를 극복하고 linezolid가 갖고 있는 골수 독성 문제를 개선하기 위한 새로운 2세대 옥사졸리디논계 화합물의 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다.^{14,15)}

국내의 레고캠바이오사이언스에서 합성한 새로운 옥사졸리디논계 화합물인 LCB01-0371 화합물은(Fig. 1) 대부분의 그람양성 세균과 특히 다제약제 내성 그람양성균에 있어서 linezolid보다 우수한 항균 활성을 갖고 있으며, 현재 국내에서 임상시험 중인 신약 후보물질이다.¹⁴⁾

본 연구에서는 LCB01-0371 화합물에 대해 세균의 내성기전을 처음으로 연구하고, 세균의 내성발현 빈도를 대조약물인 linezolid와 비교 분석함으로써 LCB01-0371 화합물의 우수성을 검증하고자 하였다.

실험방법

시약

본 실험에 사용된 LCB01-0371과 linezolid는 국내의 레고캠바이오사이언스에서 합성한 것을 이용하였다.

시험 균주

본 연구의 내성 빈도 실험 및 내성기전 연구에 사용된 실험균주는 표준균주인 *E. faecalis* ATCC29212 균주를 사용하였다.

Step-wise 선발에 의한 돌연변이 내성균주의 분리

E. faecalis ATCC29212 균주를 항생제가 포함되지 않은 Brain-Heart Infusion(Difco, USA) 배지에 접종하여 35°C에서 20시간 배양하였다. 배양한 균액의 0.1 ml을 0.5배의 MIC(Minimal Inhibition Concentration) 농도를 갖는 LCB01-0371 또는 linezolid가 포함된 새로운 BHI 배지에 옮긴 뒤, 다시 18시간 배양하였다. 그리고 배양한 균액의 0.1 ml을 다시 1배의 MIC 농도를 갖는 항생제가 포함된 BHI로 옮겨서 18시간 더 배양하였다. 이러한 과정을 MIC 농도의 2배가 되는 약물 농도가 될 때까지 계속하며, 마지막에는 배양한 균액을 2배의 MIC 농도를 갖는 BHI 고체배지에 배양하여 각각의 항생제에 대한 돌연변이 내성균주를 선발하였다. 이들 내성균주들에 대한 LCB01-0371 및 linezolid의 MIC를 새로 측정 후, 각각 새로운 MIC 값의 2배가 되는 농도에서 앞서와 같은 방법으로 2차 단계 내성균을 선발하였다. 이처럼 단계별로 선발된 돌연변이 내성균주들은 10%의 glycerol 용액에 현탁하여 -70°C에서 보관한 뒤, 필요 시 사용하였다.

자연돌연변이 내성 발현 빈도

E. faecalis ATCC29212 균주를 Mueller-Hinton broth(Difco, USA)에 접종하여 35°C에서 20시간 배양하였다. 배양 균주의 1 ml

을 BHI broth 200 ml에 접종하여, 600 nm에서 흡광도가 0.7~0.8이 될 때까지 35°C에서 2~3시간 정도 더 배양하였다. 배양된 *E. faecalis* ATCC29212 균주를 4°C에서 5,000 g로 30분 동안 원심분리하여 수확한 뒤, 침전물을 1 ml의 BHI broth로 재현탁 하였다. 각각의 현탁액을 LCB01-0371 또는 linezolid를 각각 MIC의 1배, 2배, 4배 농도를 포함하고 있는 BHI agar에 0.1 ml씩 도말하여 접종한 뒤, 35°C에서 4일 간 배양하였다. 자연돌연변이 내성균의 발현 빈도는 자연돌연변이를 통해 내성을 습득하여 항생제를 함유한 고체배지에서 성장한 단일 집락의 개수를 실제 도말한 *E. faecalis* ATCC29212 균주의 CFU(Colony Forming Unit)를 개수로 나눈 값으로 결정하였다.

PCR에 의한 DNA 증폭과 ribosomal genes의 염기서열 분석

Linezolid에 대한 세균의 내성 기전은 세균의 50S ribosomal subunit의 23S rRNA를 암호화 하는 유전자의 염기서열에서의 점 돌연변이로 인한 것으로 보고 되었다.¹⁶⁾ 새로운 옥사졸리디논계 화합물인 LCB01-0371에 대한 *E. faecalis*의 내성 기전을 연구하기 위해, 자연돌연변이에 의해 생성된 내성균의 23S rRNA peptidyl transferase 부위의 염기서열을 야생 표준균주인 *E. faecalis* ATCC29212 균주와 비교하였다. BHI agar에 배양한 *E. faecalis* ATCC29212 균주와 본 연구에서 선발된 돌연변이 내성균주를 template으로 이용하여 다음과 같은 방법으로 colony PCR을 실시하였다. *E. faecalis* 균주의 23S rRNA peptidyl transferase 부위에 해당하는 2,049 위치에서 2,767 위치까지의 DNA 염기쌍을(719 bp: *E. coli* numbering), 5'-GACGGAAAGACC-CCATCC-3'(forward)와 5'-ACACTTAGATGCTTT-3'(reverse)의 두 종류의 PCR용 프라이머로 사용하여 DNA를 증폭하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 반응 후, 95°C에서 1분, 45.2°C에서 1분, 72°C에서 1분간씩 총 30회를 반복한 후, 마지막에 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 결과물은 1% agarose gel을 이용한 DNA 전기영동법을 통하여 확인하였다. 증폭된 각각의 PCR 산물을 이용하여, 23S rRNA의 V domain에 점 돌연변이가 발생했는지 DNA star 프로그램을 이용하여 염기서열분석을 하였다.

실험결과

Step-wise 선발에 의한 돌연변이 내성균주의 분리

LCB01-0371에 대한 *E. faecalis* 균주의 내성기전을 linezolid와 비교 연구하기 위해, Step-wise 선발 방법으로 돌연변이 내성균주를 분리하였다. Fig. 2는 LCB01-0371과 Linezolid에 대한 *E. faecalis* 내성균의 step-wise 선발 과정과 그 결과를 보여주고 있으며, 야생 표준균주인 *E. faecalis* ATCC29212에 대한 LCB01-0371과 Linezolid의 MIC는 똑같이 2 µg/ml이었다. LCB01-0371에 대한 실험에서는, *E. faecalis* ATCC29212 균주에서 1차 단계

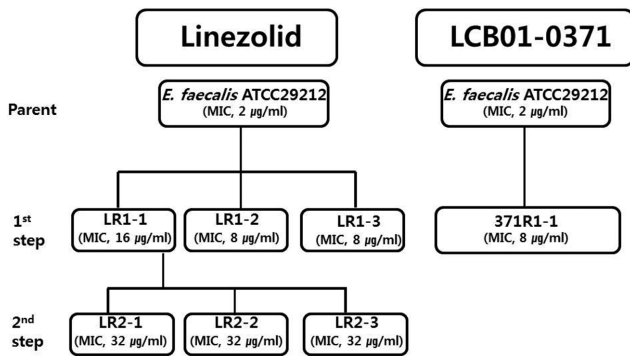


Fig. 2 – Step-wise selection of *E. faecalis* mutants resistant to LCB01-0371 and linezolid.

에서만 MIC가 4배 증가된 단 하나의 돌연변이 내성균주가 분리되었고, 이 내성균주를 371R1-1로 명명하였다. 2차 단계에서는 LCB01-0371에 대한 내성균주가 발생되지 않았다. 반면에 linezolid에 대한 실험에서는 1차단계에서는 MIC가 4~8배 정도 증가된 3개의 돌연변이 내성균주가 발생하였고, 이들을 각각 LR1-1, LR1-2, LR1-3로 명명하였다. 그리고 linezolid에 대해서는 2차 단계에서도 더 높은 내성 강도를 가진(MIC가 16배 정도 증가) 균주가 3종류 분리되어, 각각 LR2-1, LR2-2, LR2-3로 명명하였다. 이러한 결과는 LCB01-0371 화합물에 대해 *E. faecalis* 균주의 내성 발생률이 linezolid보다 낮게 발생한다는 것을 보여주며, 특히 LCB01-0371에 대해서는 2차 단계에서의 돌연변이 내성균이 발생하지 않았다는 것은, linezolid의 경우와 달리 LCB01-0371에 대해서는 MIC가 8배 이상 증가된 고도 내성균이 발생하지 않았다는 것을 보여주고 있다.

자연돌연변이 내성 발현 빈도

시험 항생제에 대한 세균의 내성균 발생 빈도를 측정하기 위해, *E. faecalis* ATCC29212 균주를 4배의 MIC 농도에서 LCB01-0371와 linezolid에 각각 노출시켰을 때, 자연돌연변이 내성균의 발생 빈도는 각각 9×10^{-10} , 4×10^{-10} 임을 확인할 수 있었다(Table I). 즉, *E. faecalis* 균주의 LCB01-0371에 대한 자연 돌연변이 내성균의 발생 빈도는 Linezolid의 경우보다 2배 이

Table I – Frequency of *E. faecalis* spontaneous mutations resulting in decreased susceptibility to LCB01-0371 and linezolid

Strain	Compounds	MIC (µg/ml)	Concentration used for selection (µg/ml)	Mutant frequency
ATCC29212	LCB01-0371	2	8	9×10^{-10}
ATCC29212	Linezolid	2	8	4×10^{-10}
371R1-1	LCB01-0371	8	16	^a
LR1-1	Linezolid	16	32	2.1×10^{-10}

^aNo mutant was isolated.

상 낮다는 것을 보여 주었다. 한편 대부분의 항생제에 대한 세균의 내성균주의 발생 빈도는 대략 10^{-9} 정도인 것을 감안하며, 옥사졸리디논계 화합물에 대해서는 세균의 내성균이 발생 빈도가 매우 낮다는 것을 알 수 있고, 실제로 임상에서도 linezolid에 대한 세균의 내성 발생 문제는 다른 항생제에 비해 현저히 낮다는 것을 알 수 있다.

내성균주의 ribosomal genes의 염기서열 분석

LCB01-0371에 대한 *E. faecalis*의 내성 기전을 연구하기 위해, LCB01-0371와 linezolid에 대해 내성을 획득한 모든 균주들에 대해 23S rRNA peptidyl transferase 부위의 염기서열을 결정하여, 야생 표준균주인 *E. faecalis* ATCC29212의 염기서열과 분석 비교하였다(Table II). LCB01-0371에 대한 *E. faecalis* ATCC29212의 내성 기전은 linezolid의 경우에서와 마찬가지로 50S ribosomal subunit의 23S rRNA를 암호화 하는 유전자의 2,576번 염기가 G에서 T로 바뀌는 G2576T의 점 돌연변이로 인한 것으로 밝혀졌다. 즉, step-wise 선발 1차 단계에서 분리된 371R1-1 및 LR1-1, LR1-2, LR1-3 등의 4개의 내성균주에서 공통적으로 23S rRNA의 V 부분에서 G2576G/T로 부분적으로 바뀌는 점 돌연변이가 일어났다. 부분적 점 돌연변이가 발생하게 되는 이유는, *E. faecalis*는 23S rRNA 유전자에 대해 4개의 유전자 copy 수를 갖고 있는데,^{17,18)} 1차 단계에서는 이들 4개의 유전자 copy 중에서 일부에서만 점 돌연변이가 일어났기 때문이다. 그러나 2차 단계에서 분리된 고도 내성인 LR2-1, LR2-2, LR2-3 균주에서는 23S rRNA 유전자의 2,576번 염기가 G에서 T로 모두 바뀌는 G2576T

Table II – MICs and genetic characteristics of *E. faecalis* mutant

Strain	No. of serial passage	MIC (µg/ml)		Mutation in the 23S rRNA sequence
		LCB01-0371	Linezolid	
ATCC29212	Wild type	2	2	-
371R1-1	1	8	16	G2576G/T
LR1-1	1	16	8	G2576G/T
LR1-2	1	16	16	G2576G/T
LR1-3	1	16	16	G2576G/T
LR2-1	2	32	32	G2576T
LR2-2	2	16	32	G2576T
LR2-3	2	32	32	G2576T

의 점 돌연변이가 일어났다. 다시 말해서 MIC가 16배 정도 증가된 고도 내성균에서는 4개의 유전자 copy에서 모두 G2576T의 점 돌연변이가 일어났음을 확인할 수 있었다. 반면, LCB01-0371에 대해서는 step-wise 선발 2차 단계에서는 MIC가 더 높아진 *E. faecalis* 고도 내성균주가 전혀 발생하지 않았다. 이러한 결과는 내성균의 발현 측면에서 LCB01-0371은 linezolid보다 더 우수한 특성을 갖고 있음을 보여주었다.

고찰 및 결론

1980년대 이후부터 광범위항생제인 제3세대 세파계 항생제의 무분별한 사용으로 인해 MRSA, VRE, VRSA와 같은 슈퍼박테리아들이 발생하게 되었다. 세팔로스포린계, 플루오르퀴놀론계, 반코마이신과 같은 주요 항균제에 대해서 이미 내성을 갖고 있는 그람양성 다제약제 내성균들은 병원내감염(nosocomial infection)을 일으키는 주 원인이며, 치료가 매우 어렵고 또한 높은 치사율을 가지고 있기 때문에 사회적으로 더욱 심각한 문제라고 여겨진다. 이러한 상황에서 근 30년만에 새로운 작용기전을 갖는 혁신 신약인 옥사졸리디논계 항생제가 개발 됨으로써 이들 슈퍼박테리아에 대한 치료가 어느 정도 가능하게 되었다. 그리고 옥사졸리디논계 항생제인 linezolid는 자연에서 분리된 물질이 아니라 합성에 의해 개발된 항균물질이기 때문에, linezolid에 대해서 기존에 존재하는 내성기전이 자연계에서는 흔치 않다. 이러한 이유로 linezolid에 대한 세균의 내성은 다른 항생제들에 비해서 천천히 일어나게 된다. 그러나 최근에 linezolid에 대해서도 *S. aureus* 및 *E. faecalis* 균주에서 내성균들이 조금씩 보고되기 시작하면서, linezolid를 대체할 수 있는 2세대의 새로운 옥사졸리디논계 항생제의 개발 필요성이 대두되기 시작하였다.^{10,11)} LCB01-0371은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 내성균주에 대해 우수한 항균력을 갖고 있기 때문에,¹⁴⁾ 현재 국내에서 임상시험 중에 있는 신약 후보물질이다. 본 연구에서는 새로운 옥사졸리디논계 화합물인 LCB01-0371에 대해 *E. faecalis*의 내성 발현 기전 연구를 linezolid와 비교 진행하였다.

LCB01-0371 화합물은 *E. faecalis* 균주에 대한 내성발현 빈도에서 9×10^{-10} 의 매우 낮은 확률을 갖고 있다. 특히 LCB01-0371 화합물은 linezolid와 달리 step-wise 선발 1단계에서만 낮은 정도의 내성을 갖는 한 균주만 분리되었는데, 반면 linezolid의 경우에는 2차 단계에서도 고도의 내성을 가진 여러 돌연변이균주가 분리되었다. 이는 LCB01-0371에 대한 *E. faecalis* 돌연변이 내성균주의 발현이 매우 어려울 것이며, 또한 내성 획득도 linezolid에 비해 더욱 천천히 일어날 것으로 예견할 수 있는데, 이러한 결과는 LCB01-0371은 내성 발현의 측면에서 linezolid보다 우수한 특성을 갖고 있음을 보여주고 있다.

한편 LCB01-0371에 대해 *E. faecalis* 균주가 내성을 획득하게

되는 방법은, linezolid의 경우와 마찬가지로 옥사졸리디논계 항생제의 표적 부위인 23S rRNA의 V domain 부분에서의 돌연변이에 의해 내성이 발생하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 LCB01-0371에 대한 자연돌연변이 내성균인 371R1-1 균주에서는 *E. faecalis*의 4개의 23S rRNA 유전자 중에서 일부분만이 G2576G/T의 점 돌연변이가 일어났으므로, linezolid의 고도 내성균주인 LR2-1, LR2-2, LR2-3 균주에서 완전한 점 돌연변이가 일어난 G2576T와는 다른 양상을 보여주었다. 즉, 371R1-1 균주는 LCB01-0371에 대해 완전한 내성을 획득하지 못한 돌연변이 균주임을 알 수 있었다. 그리고 linezolid에 대한 *E. faecalis* 균주의 내성 기전은 지금까지 G2576T의 점 돌연변이 이외에도 G2512T, G2513T, C2610G의 변이도 보고된 바가 있는데,¹⁵⁻¹⁸⁾ LCB01-0371에 대한 *E. faecalis*의 내성균주에서는 G2576T 변이 이외의 다른 돌연변이는 관찰되지 않았다. 그리고 *E. faecalis* 균주가 새로운 옥사졸리디논계 항생제인 LCB01-0371과 기존의 linezolid에 대해 교차내성을 갖는 여부를 각각의 내성균에 대한 MIC를 측정함으로써 확인하였다. LCB01-0371은 linezolid에 대한 내성균주인 LR1-1, LR1-2, LR1-3, LR2-1, LR2-2, LR2-3 모두에 대해서 항균활성이 없었고, linezolid도 LCB01-0371에 대한 내성균인 371R1-1에 대해서 항균 활성을 갖지 못함으로써, *E. faecalis* 균주는 LCB01-0371과 linezolid에 대해 교차내성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

결론적으로 새로운 옥사졸리디논계 항생제인 LCB01-0371은 linezolid에 비해 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 항균 활성이 더 우수하고, 또한 내성균 발현의 측면에서 linezolid보다 우수한 특성을 갖고 있기 때문에 신약으로서의 성공 가능성이 매우 높다고 할 수 있겠다.

감사의 말씀

본 연구는 2012년도 한동대학교의 연구년 지원에 의하여 수행되었습니다(HGU-2012).

참고문헌

- 1) Michael, A. F. and Christopher, T. W. : Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **325**, 1089 (2009).
- 2) Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilber, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B. and Bartlett, J. : Bad bugs, no drugs : no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1 (2009).
- 3) Rybak, J. M., Barber, K. E. and Rybak, M. J. : Current and prospective treatments for multidrug-resistant gram-positive infections. *Expert Opin Pharmacother.* **14**, 1919 (2013).

- 4) O'Connell, K. M., Hodgkinson, J. T., Sore, H. F., Welch, M., Salmond, G. P. and Spring, D. R. : Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 10706 (2013).
- 5) Pucci, M. J. and Bush, K. : Investigational antimicrobial agents of 2013. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 792 (2013).
- 6) Perry, C. M. and Jarvis, B. : Linezolid: a review of its use in the management of serious Gram-positive infections. *Drugs* **61**, 525 (2001).
- 7) Flamm, R. K., Mendes, R. E., Ross, J. E., Sader, H. S. and Jones, R. N. : Linezolid surveillance results for the united states: LEADER surveillance program 2011. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1077 (2013).
- 8) Gill, C. J., Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Misura, A. S., Bartizal, K. and Hickey, E. J. : *In vivo* efficacy of a novel oxazolidinone compound in two mouse models of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3434 (2007).
- 9) Leach, K. L., Swaney, S. M., Colca, J. R., McDonald, W. G., Blinn, J. R., Thomasco, L. M., Gadwood, R. C., Shinabarger, D., Siong, L. and Mankin, A. S. : The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol. Cell.* **26**, 393 (2007).
- 10) Bing, G., Theodoros, K., Sotirios, T., Janet, H. and Romney, M. H. : The emerging problem of linezolid-resistant Staphylococcus. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 4 (2013).
- 11) Meka, V. G. and Gold, H. S. : Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 1010 (2004).
- 12) Cattaneo, D., Orlando, G., Cozzi, V., Cordier, L., Baldelli, S., Merli, S., Fucile, S., Gulisano, C., Rizzardini, G. and Clementi, E. : Linezolid plasma concentrations and occurrence of drug-related haematological toxicity in patients with gram-positive infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **41**, 586 (2013).
- 13) Nukui, Y., Hatakeyama, S., Okamoto, K., Yamamoto, T., Hisaka, A., Suzuki, H., Yata, N., Yotsuyanagi, H. and Moriya, K. : High plasma linezolid concentration and impaired renal function affect development of linezolid-induced thrombocytopenia. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2128 (2013).
- 14) Jeong, J. W., Jung, S. J., Lee, H. H., Kim, Y. Z., Park, T. K., Cho, Y. L., Chae, S. E., Baek, S. Y., Woo, S. H., Lee, H. S. and Kwak, J. H. : *In vitro* and *in vivo* activities of LCB01-0371, a new oxazolidinone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5359 (2010).
- 15) Jones, R. N., Moet, G. J., Sader, H. S., Mendes, R. E. and Castanheira, M. : TR-700 *in vitro* activity against and resistance mutation frequencies among Gram-positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 716 (2009).
- 16) Prystowsky, J., Siddiqui, F., Chosay, J., Shinabarger, D. L., Millichap, J., Peterson, L. R. and Noskin, G. A. : Resistance to linezolid : characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2154 (2001).
- 17) Samir, N. P., Nader, M., Dea, S., Baldwin, T., Frances, B. J. and David, J. F. : Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* isolated in Ontario, Canada. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **77**, 350 (2013).
- 18) Lobritz, M., Hutton-Thomas, R., Marshall, S. and Rice, L. B. : Recombination proficiency influences frequency and locus of mutational resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3318 (2003).