

2.12.99 – Microbiologia.

IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *cfr/optrA* EM *Enterococcus faecalis* DE ORIGEM ANIMAL: PRIMEIRO RELATO NO BRASIL

Maria K. S. SILVA¹, Rafael de SOUZA², Cantidio F. de L. FILHO³, Ticiano G. do Nascimento⁴, Maria C. D. SILVA⁵, Lara M. de ALMEIDA⁶.

1. Estudante de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL);
2. Estudante de Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas (UFAL);
3. Responsável Técnico do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos (FANUT/UFAL);
4. Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) / Co-orientador;
5. Professora da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) / Co-orientadora;
6. Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) / Orientadora.

Resumo

Poucos antimicrobianos estão disponíveis para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas multi-resistentes como, por exemplo, *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina. As oxazolidinonas são uma dessas últimas opções terapêuticas. O gene *cfr* (*chloranphenicol-florfenicol resistance*), que promove a metilação do gene RNAr 23S na posição A2503, e o gene *optrA* (*oxazolidinone phenicol transferable resistance*), codificador de uma proteína (ABC)-F recentemente reconhecida por atuar por meio de proteção ribossômica têm emergido em certas espécies de bactérias e direcionado o curso da disseminação da resistência às oxazolidinonas tanto no âmbito da medicina humana como na veterinária. Por meio dessa pesquisa investigamos e caracterizamos os ambientes genéticos contendo os genes *cfr* e *optrA* em uma cepa de *Enterococcus faecalis* isolada de suíno no Brasil, e determinamos o seu *Sequence Type* (ST) por MLST. O sequenciamento do genoma foi realizado com a utilização da plataforma Illumina MiSeq e o depósito da sequência completa, efetuado no banco de dados GenBank/NCBI (CP018004).

Palavras-chave: antimicrobianos; multi-resistência; suínos.

Apoio financeiro: Essa pesquisa teve o apoio financeiro da Fundepes e FAPESP.

Introdução

As oxazolidinonas constituem uma nova classe de antimicrobianos potencialmente ativos contra cepas de bactérias Gram-positivas multi-resistentes. Linezolida, primeira oxazolidinona a ser desenvolvida¹, foi aprovada em 2000 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos resistentes à meticilina, *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina².

Em menos de duas décadas – tanto no âmbito da medicina humana como da veterinária – uma ampla variedade de mecanismos de resistência à linezolida foi detectada em diferentes espécies de bactérias Gram-positivas: a) mutações na região central do domínio V do gene RNAr 23S³⁻¹²; b) mutações nos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*, codificadores, respectivamente, das proteínas ribossômicas L3, L4 e L22¹³⁻¹⁵; c) metilação do gene RNAr 23S na posição A2503 promovida pela metiltransferase Cfr, codificada pelo gene *cfr* (*chloranphenicol-florfenicol resistance*)¹⁶⁻²² e, mais recentemente; d) a expressão do gene *optrA* (*oxazolidinone phenicol transferable resistance*), codificador de uma proteína (ABC)-F recentemente reconhecida por atuar por meio de proteção ribossômica, e não efluxo²³⁻²⁹.

A disseminação dos genes *cfr* e *optrA* inter-espécies ou gêneros de bactérias tem sido mediada por elementos genéticos móveis (EGM) como transposons (Tn), plasmídeos e formas circularizadas autônomas não plasmidiais, segmentos genéticos móveis que possuem a capacidade de se integrar a plasmídeos ou ao cromossomo bacteriano. Tais segmentos genéticos têm sido identificados em diferentes bactérias patogênicas e descritos por carregarem genes de resistência a múltiplos antimicrobianos³⁰. Essa forma circularizada geralmente flanqueada por elementos de inserção parece conferir instabilidade e autonomia de mobilização a esses segmentos, o que aumenta consideravelmente a possibilidade de sua integração em genomas de diferentes patógenos bacterianos.

Em 2016, identificamos a presença do gene *optrA* em 14 cepas de *E. faecalis* isoladas de suínos provenientes de granjas localizadas em diferentes estados do Brasil³¹, sendo uma delas (*E. faecalis* L9) portadora do gene *cfr*, além do *optrA*. Considerando o contexto apresentado acima, nossos objetivos com essa pesquisa foram:

- a) caracterizar os ambientes genéticos dos genes *cfr* e *optrA*;
- b) identificar os segmentos genéticos envolvidos com a inserção e excisão dos genes no genoma;
- c) determinar o perfil epidemiológico (*Sequence Type*/ ST) da cepa *E. faecalis* L9 por meio de MLST (*multilocus sequence type* - <http://ukmirror4.pubmlst.org/efaecalis/>).

Metodologia

Extração do DNA genômico

O DNA total da cepa *E. faecalis* L9 foi obtido com a utilização do kit *DNeasy blood and tissue* (Qiagen, USA), com algumas adaptações referentes à etapa de degradação da parede celular. As enzimas lisozima (50 mg/ml) e mutanolisina (2500 U/ml) foram empregadas antes da utilização da enzima proteínaase K, fornecida com o kit.

Sequenciamento do genoma

O sequenciamento do genoma da cepa *E. faecalis* L9 foi realizado com a utilização da plataforma Illumina MiSeq. Para a preparação das bibliotecas foi utilizado o kit *Illumina Nextera XT DNA sample preparation* (Illumina Inc., USA), com as modificações recomendadas para 2 x 250-pb *paired-end*. Seguimos o protocolo da própria Illumina, disponível em <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-xt-dna.html>. Os indexes (barcodes) foram fornecidos com o kit *Nextera XT Index Kit V2 set A*, e o kit de sequenciamento utilizado foi o *Miseq Reagent Kit v2 (500cycle)*. O processamento dos dados gerados pelo sequenciamento e as montagens (*de novo*) dos contigs foram feitas com o auxílio do programa CLC Genomics Workbench 8.0.3. As anotações dos contigs para as análises *in silico* foram geradas pela plataforma *Rapid Annotation Server* (RAST). E para o depósito no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a sequência do genoma completo foi anotada pela própria plataforma do banco de dados (Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline - NCBI_PGAP).

Análise dos dados

A análise *in silico* dos dados gerados pelo sequenciamento foi feita com o auxílio dos programas CLC Genomics Workbench 8.0.3 e Geneious 8.1.5.

Depósito da sequência de DNA (genoma completo) no NCBI

A sequência completa do genoma de *E. faecalis* L9 foi submetida ao banco de dados GenBank (NCBI) e obteve o número de acesso CP018004.

Resultados e Discussão

O ambiente genético do gene *cfr* na cepa *E. faecalis* L9 isolada de suíno no Brasil apresentou um contexto genético completamente distinto de todos os descritos até o momento em *Enterococcus* spp.³². Curiosamente, o segmento de DNA no qual *cfr* estava inserido foi idêntico aos segmentos previamente descritos no cromossomo de *Proteus vulgaris* (JF969273) na China³³ e nos plasmídeos pSA8589 e p1128105 de *S. aureus* (KC561137 e KJ866414, respectivamente) nos Estados Unidos^{34,35}. A sequência de inserção IS1216, identificada em uma das extremidades do ambiente genético de *cfr*, assim como observado nos isolados de *P. vulgaris* PV-01 e *S. aureus* 1128105 e 1900, provavelmente estava envolvida no processo de aquisição desse segmento em *E. faecalis* L9. Além de evidenciar a transferência horizontal do gene, tal achado recoloca como possibilidade o fato de enterococos comensais da microbiota animal serem potenciais reservatórios de tais segmentos genéticos contendo o gene de multi-resistência *cfr*. Outro ponto importante foi a detecção *in silico* de uma forma circularizada desse segmento de DNA no qual *cfr* estava inserido. A circularização foi confirmada por PCR e sequenciamento por Sanger.

Quanto ao ambiente genético no qual o gene *optrA* estava inserido em *E. faecalis* L9, análises do sequenciamento indicaram a ocorrência de um plasmídeo de cerca de 60 Kb (pL9). O segmento de DNA contendo *optrA* estava intacto em um único contig, com uma sequência de inserção IS1216 flanqueando uma das extremidades. Assim como o ambiente genético contendo o gene *cfr*, esse contendo o gene *optrA* também estava circularizado (*in silico* e confirmado por PCR/ Sanger). O gene que codifica a Rep US1, uma cópia do transposon Tn558, e um gene regulador de transcrição do Tn916 (apesar da ausência de Tn916 em L9) também foram encontrados em pL9. Os contigs que constituíram pL9 mostraram identidade com segmentos de 15.000 pb de plasmídeos encontrados em *E. faecalis* W9-2 e *E. thailandicus* W3, isolados de esgotos em ambientes de criação de suínos na China. Contudo, os plasmídeos conjugativos pW9-2 e pW3 continham o gene *cfr*, mas não o gene *optrA*. O segmento de 7.797 pb contendo *cfr* em L9 foi, como dito, completamente diferente daqueles inseridos em pW9-2 e pW3 e de todos os ambientes genéticos contendo *cfr* em *Enterococcus* spp de origem humana e animal descritos até o momento.

Enterococcus faecalis L9 apresentou o ST29, que está atualmente incluído no complexo clonal CC403, o qual ainda apresenta poucos registros no banco de dados MLST (<http://ukmirror4.pubmlst.org/efaecalis/>). O provável fundador do CC403, a linhagem ST403, foi identificada pela primeira vez em 2013 em *E. faecalis* resistente à gentamicina (HLGR) isolado de carne de frango na Coreia e, agora, possui quatro *Single Locus Variants*, SLVs (ST29, ST244, ST292 e ST416) que foram isolados de frango, humanos e carrapatos. As linhagens do CC403, incluindo aquelas *optrA*-positivas (ST29, ST403 e ST416), parecem estar adaptadas a hospedeiros humanos e animais.

Os enterococos são bactérias que habitam o trato intestinal de seres humanos e de várias espécies animais. Prováveis membros da microbiota intestinal do último antepassado comum de mamíferos, répteis, pássaros e insetos no período Devoniano³⁶, encontram-se hoje bem adaptados a diferentes hospedeiros e amplamente distribuídos no ambiente. Os enterococos podem também sobreviver em sedimentos, solos, na superfície de vegetações aquática e terrestre, e em água doce e marinha^{37,38}. São bactérias particularmente bem posicionadas em ecossistemas microbianos complexos, em contato íntimo com uma grande diversidade de fontes de material genético³⁹, o que favorece sua reconhecida promiscuidade genética. Nossos dados reforçam a necessidade de monitoramento do curso das resistências mediadas pelos genes *cfr* e *optrA* em isolados do

gênero *Enterococcus* de origem animal.

Conclusões

Enterococcus faecalis é uma espécie comensal da microbiota intestinal humana e de várias espécies animais, mas também é uma das principais causas de infecções hospitalares. A disseminação de *optrA* em ambientes clínicos seria extremamente preocupante porque poucos antimicrobianos estão disponíveis para o tratamento de infecções causadas por patógenos resistentes, tais como MRSA e VRE. Além disso, a expressão do gene *optrA* confere redução de sensibilidade à tedizolid, nova oxazolidinona que se mostrou potente em ensaios clínicos contra isolados de estafilococos e enterococos de pacientes com infecções agudas de pele. Tedizolid também demonstrou uma vantagem em relação à linezolida contra cepas *cfr*-positivas e portadoras de mutação no gene RNAr 23S e/ou na proteína ribossômica L3⁴⁰. A disseminação do gene de multiresistência *cfr* em várias espécies bacterianas também tem sido motivo de grande preocupação tanto para a área médica humana como para a veterinária devido ao fato de a modificação mediada por Cfr no nucleotídeo A2503 no centro de peptidil transferase (PTC) do gene RNAr 23S conferir resistência a várias classes de antimicrobianos (fenicóis, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas, estreptogramina A e macrolídeos de 16 membros). No Brasil, o gene *cfr* havia sido identificado até o momento apenas em uma cepa MSSA (ST398) de origem humana⁴¹, a qual apresentou o gene de multiresistência *cfr* inserido em outro ambiente genético. Esse é o primeiro relato de resistência às oxazolidinonas no Brasil devido à presença simultânea dos genes *cfr* e *optrA* em um único isolado bacteriano.

Referências bibliográficas

1. Moellering RC. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med.* 2003; 138(2):135-42.
2. Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *The Lancet.* 2001; 358:1975-82.
3. Gales AC, Sader HS, Andrade SS, Lutz L, Machado A, Barth AL. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *International journal of antimicrobial agents.* 2006; 27(4):300-2.
4. Kelly S, Collins J, Maguire M, Gowing C, Flanagan M, Donnelly M, Murphy PG. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2008; 61(4):901-7.
5. Liakopoulos A, Neocleous C, Klapsa D, Kanellopoulou M, Spiliopoulou I, Mathiopoulou KD, Papafrangas E, Petinaki E. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2009; 64(1):206-7.
6. Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A, Kanellopoulou M, Schoina S, Papafrangas E, Marangos M, Fligou F, Zakyntinos E, Makris D, Protonotariou E, Tsiapara F, Filos K, Diza E, Anastassiou ED, Petinaki E. Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2010; 65(5):1070-1.
7. Kosowska-Shick K, Julian KG, McGhee PL, Appelbaum PC, Whitener CJ. Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2010; 68(1):34-9.
8. Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Sakai F, Tomono K, Takesue Y, Honda J, Nonomiya Y, Suwabe A, Nagura O, Yanagihara K, Mikamo H, Fukuchi K, Kaku M, Kohno S, Yanagisawa C, Nakae T, Yoshida K, Niki Y. Linezolid resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy.* 2011; 17(1):45-51.
9. Endimiani A, Blackford M, Dasenbrook EC, Reed MD, Bajaksouszian S, Hujer AM, Rudin SD, Hujer KM, Perreten V, Rice LB, Jacobs MR, Konstan MW, Bonomo RA. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2011; 55(4):1684-92.
10. Almeida LM, Lincopan N, de Araújo MR, Mamizuka EM. Clonal dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary care hospital in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5):2792-3.
11. Almeida LM, Lincopan N, de Araújo MR, Mamizuka EM. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(3):768-9.
12. Almeida LM, de Araújo MR, Iwasaki MF, Sacramento AG, Rocha D, da Silva LP, Pavez M, de Brito AC, Ito LC, Gales AC, Lincopan N, Sampaio JL, Mamizuka EM. Linezolid resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014; 58(5): 2993-4.
13. Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009; 53(12):5275-8.
14. Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2010; 65(11):2329-35.
15. Almeida LM, de Araujo MRE, Sacramento AG, Pavez M, de Souza AG, Rodrigues F, Gales AC, Lincopan N, Sampaio JLM, Mamizuka EM. Linezolid resistance in Brazilian *Staphylococcus hominis* strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013; 57:4082-4083.
16. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular microbiology.* 2005; 57(4):1064-73. _13

17. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(7):2500-5.
18. Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51(2):483-7.
19. Arias C, Vallejo M, Reyes J, Panesso D, Moreno J, Castañeda E, Villegas MV, Murray BE, Quinn JP. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(3):892-6.
20. Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN. First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52(6):2244-6.
21. Mendes RE, Deshpande L, Rodriguez-Noriega E, Ross JE, Jones RN, Morfin-Otero R. First report of Staphylococcal clinical isolates in Mexico with linezolid resistance caused by *cfr*: evidence of in vivo *cfr* mobilization. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48(8):3041-3.
22. Shen J, Wang Y, Schwarz S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68:1697-1706.
23. Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, Zhang R, Li J, Zhao Q, He T, Wang D, Wang Z, Shen Y, Li Y, Feßler AT, Wu C, Yu H, Deng X, Xia X, Shen J. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70:2182-90.
24. Cai J, Wang Y, Schwarz S, Lv H, Li Y, Liao K, Yu S, Zhao K, Gu D, Wang X, Zhang R, Shen J. Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010-2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21:1095.e1-4.
25. He T, Shen Y, Schwarz S, Cai J, Lv Y, Li J, Feßler AT, Zhang R, Wu C, Shen J, Wang Y. Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71:1466-73.
26. Almeida LM, Lebreton F, Bispo P, Saavedra JT, Wurster J, Pires C, Fernandes MR, Cerdeira LT, Lincopan N, Moreno AM, Mamizuka EM, Gilmore MS. Transferable Resistance Gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolated from swine in Brazil. *ASM Microbe* 2016; Boston, MA.
27. Li D, Wang Y, Schwarz S, Cai J, Fan R, Li J, Feßler AT, Zhang R, Wu C, Shen J. Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71:1474-8.
28. Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, Manso E, Mingoia M, Giovanetti E, Varaldo PE. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71:1118-9.
29. Cavaco LM, Bernal JF, Zankari E, León M, Hendriksen RS, Perez-Gutierrez E, Aarestrup FM, Donado-Godoy P. Detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia). *J Antimicrob Chemother*. 2016; doi: 10.1093/jac/dkw490. [Epub ahead of print].
30. Palmieri C, Mingoia M, Varaldo PE. 2013. Unconventional circularizable bacterial genetic structures carrying antibiotic resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*. 57:2440-1.
- Almeida LM, Lebreton F, Bispo P, Saavedra JT, Wurster J, Pires C, Fernandes MR, Cerdeira LT, Lincopan N, Moreno AM, Mamizuka EM, Gilmore MS. 2016. Transferable Resistance Gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolated from swine in Brazil. *ASM Microbe* 2016, Boston, MA. 32.
- Almeida LM, Pires C, Cerdeira LT, Oliveira TGM, Sacramento AG, Mamizuka EM, Moreno AM, Feßler AT, Schwarz S, Lincopan N. 2015. A Novel Genetic Environment Of The *cfr* Gene In A Porcine *Enterococcus Faecalis* Isolate From Brazil. *ICAAC* 2015, San Diego, CA. 33.
- Wang Y, Wang Y, Wu CM, Schwarz S, Shen Z, Zhang W, Zhang Q, Shen JZ. 2011. Detection of the staphylococcal multiresistance gene *cfr* in *Proteus vulgaris* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 66: 2521-6.
34. Mendes RE, Deshpande LM, Bonilla HF, Schwarz S, Huband MD, Jones RN and Quinn JP. 2013. Dissemination of a pSCFS3-Like *cfr*-carrying plasmid in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates recovered from hospitals in Ohio. *Antimicrob. Agents Chemother*. 57: 2923-28.
35. Locke JB, Zuill DE, Scharn CR, Deane J, Sahn DF, Denys GA, Goering RV, Shaw KJ. 2014. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strain 1128105, the first known clinical isolate possessing the *cfr* multidrug resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 58: 6592-8. 36.
- Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr. Opin. Microbiol*. 16: 10-16.
37. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. 2012. Enterococci in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 76: 685-706. 38.
- Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ. 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl. Environ. Microbiol*. 68: 1122-31.
39. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312:1355-59.
40. Locke JB, Zurenko GE, Shaw KJ, Bartizal K. Tedizolid for the Management of Human Infections: In Vitro Characteristics. *Clinical Infectious Diseases*. 2014; 58(S1): S35-42. 41.
- Gales AC, Deshpande LM, de Souza AG, Pignatari AC, Mendes RE. MSSA ST398/t034 carrying a plasmid-mediated Cfr and Erm(B) in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70:303-5.