مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره های ۳ و۴ پائیز و زمستان ۱۳۸۷، صفحات ۵۸-۵۳

بررسی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه های ادرار

احمد قاسمی[۱]، رضوان منیری[*۱]، احمد خورشیدی[۱]، سید غلامعباس موسوی[۲]

۱) گروه میکروب شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
۲) دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
نویسنده رابط: رضوان منیری ، گروه میکروب شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
تلفن: ۰۳۶۱-۵۵۵۰۰۲۱ moniri@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۴/۱۸

چکیده:

زمینه و اهداف: *انتروکوکوس فکالیس*، کومنسال و فلورنرمال روده انسان بوده ولی قادراست عفونت های بیمارستانی ایجاد کند. در این باکتری چندین فاکتور ویرولانس شناسایی شده که شامل توده تجمعی (Agg)، پروتئین سطحی انتروکوک (Esp)، سیتولیزین(Cyl) و آنزیم ژلاتیناز می باشد. این فاکتورها به طور همگرا عمل می کنند که منجر به افزایش ویرولانس می شود و سبب تخریب و تهاجم بافتی می گردد. هدف از این مطالعه تعیین شاخص های فنوتیپی فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه های ادرار بود.

روش بررسی: در این مطالعه تولید بیوفیلم، همولیزین و ژلاتیناز در ۹۵ ایزوله بالینی *انتروکوکوس فکالیس*، جمع آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری، بررسی شدند. اطلاعات جمع آوری شده با آزمون‌های دقیق فیشر و مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: از ۹۵ سویه *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۹ سویه (۲۰٪) آنزیم ژلاتیناز تولید نمودند. ۴۲ سویه (۴۴/۲٪) دارای همولیز بودند که ۳۵ سویه(۳۵/۸٪) همولیز بتا، ۷ سویه(۷/۴٪) همولیز آلفا و ۵۳ سویه(۵۶/۸٪) فاقد همولیز بودند. ۱۰ سویه(۱۰/۵٪) تولید بیوفیلم قوی(بیشتر از۰/۲)، ۶ سویه(۶/۳٪) تولید بیوفیلم متوسط (کمتر از ۰/۲ و بیشتر از۰/۱) و ۷۹ سویه(۸۳/۲٪) تولید بیوفیلم ضعیف (کمتر از ۰/۱) نمودند. بین تشکیل بیوفیلم شدید و متوسط با فاکتورهای سن، جنس، مصرف قبلی آنتی بیوتیک، استفاده از کاتتر، و تولید همولیزین و فعالیت ژلاتیناز اختلاف معنی داری یافت نشد($P< ۰/۰۵$).

نتیجه گیری: هیچ فاکتور منفرد غالب به عنوان پیشگویی کننده مهم ویرولانس معرفی نشد. به نظر می رسد اثرات آنها تجمعی باشد.

کلید واژه ها: *انتروکوکوس فکالیس*، فاکتورهای ویرولانس ،ژلاتیناز، بیوفیلم، عفونت مجاری ادراری

مقدمه:

انتروکوکوس فکالیس از اعضاء فلور نرمال روده انسان بوده و قادر است عفونت‌های بیمارستانی ایجاد کند(۵-۱).اگرچه پاتوژنیسیته *انتروکوکوس فکالیس* درعفونت‌های ادراری خیلی مورد توجه نمی‌باشد ولی فراوانی آن در بسیاری ازگزارشات بیش از ۲۰ درصد ایزوله‌های ادراری را تشکیل می‌دهد (۸-٦). چندین فاکتور ویرولانس در *انتروکوکوس فکالیس* توصیف شده که شامل ترکیبات aggregation (Agg)، پروتئین سطحی انتروکوک (Esp)، سیتولیزین (Cyl) که دارای فعالیت باکتریسیدال، همولیتیک بوده وآنزیم ژلاتیناز است (۱و۳و٤). حدس زده می‌شود که این فاکتورها به طور همگرایی به واسطه تسهیل دسترسی به quorum وفعال نمودن تنظیم quorum-sensing، ویرولانس باکتری را افزایش دهند. این امر منجر به صدمات بافتی وتهاجم عمقی تر باکتری می‌گردد(۱و۱۲-۹).مطالعات‌اخیر نشان داده که *انتروکوکوس فکالیس* بیوفیلم تشکیل می‌دهد و سیستم quorum- sensing کنترل کننده توسعه بیوفیلم، در *انتروکوکوس فکالیس* می باشد (۱۷-۱۳). پروتئین سطحی انتروکوک که توسط ژن ***esp*** کروموزومی رمزدهی‌می‌شود با افزایش بیماریزایی، کلونیزاسیون، پایداری در مجاری ادراری و تشکیل بیوفیلم همراه است (۱و۱۳و۱۹-۱۷). تولید سیتولیزین به طور قابل توجهی شدت اندوکاردیت و اندوافتالمیت را در مدل حیوانی تشدید نموده و باعث شدت بیماری انتروکوکی در انسان می‌گردد (۱و۲۰و۲۱). پروتئین سطحی انتروکوک در اتصال اولیه و تشکیل بیوفیلم *انتروکوکوس فکالیس* دخالت دارد (۱۳). نقش پروتئین سطحی در کلونیزه شدن و بقای *انتروکوکوس فکالیس* در عفونت های مجاری ادراری در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است (۱۹). پروتئین سطحی، در مقادیر بالا در ایزوله‌های مولد اندوکاردیت و باکتریمی مشاهده شده ولی به-ندرت در ایزوله‌های مدفوعی افراد سالم مشاهده می‌گردد (۲۲). آنزیم ژلاتیناز، توسط ژن ***gelE*** کروموزومی رمزدهی می‌شود. این آنزیم یک متالوپروتئاز روی خارج سلولی است که کلاژن، ژلاتین و پپتیدهای کوچک را هیدرولیز می‌کند(۱) و در تشکیل اندوکاردیت در مدل‌های حیوانی نقش دارد(۱و۲۳و۲٤). تشکیل بیوفیلم به سلول‌ها اجازه می‌دهد در شرایط نامساعد زنده بمانند(۲۵). تحقیقات اپیدمیولوژی نقش سیتولیزین را در وقوع بیماری تایید می‌کند.در مطالعه‌ای سیتولیزین در مقایسه با ایزوله‌های اندوکاردیت و نمونه مدفوع افراد سالم، بیشتر در ایزوله‌های باکتریمی دیده شده است (۲۲). Coque و همکاران هیچ اختلافی را در بروز سیتولیزین در بین ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* از اندوکاردیت، باکتریمی و یا نمونه مدفوع افراد سالم مشاهده نکردند (۲٦). در مطالعه دیگری فقط ١٦ درصد از ایزوله‌های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* سیتولیزین تولید کرده و نقش این پروتئین به عنوان فاکتور ویرولانس مهم، کم در نظر گرفته شد (۲٤). هر چند نتایج مطالعات اخیر پیشنهاد نموده که ژن‌های سیتولیزین خاموش از ایزوله‌های بالینی *انتروکوکوس فکالیس* ممکن است یک پروفیل منفی فنوتیپی را نشان دهد، یعنی فاقد فعالیت همولیتیک بر روی محیط آگار خوندار باشد، ولی فاکتورهای محیطی نظیر آن چه که در محل عفونت رخ می‌دهد ممکن است باعث فعالیت ژن‌ها گردد (۲۵). هدف از این مطالعه تعیین فاکتورهای ویرولانس *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری بود. دراین مطالعه رابطه بالقوه بین تشکیل بیوفیلم و نقش بالینی *انتروکوکوس فکالیس* در مجاری ادراری و نیز تولید بیوفیلم و آنزیم های خارج سلولی، همولیزین و ژلاتیناز تعیین گردید.

مواد وروش ها:

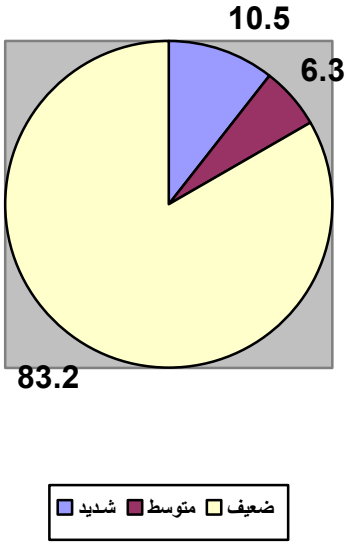
این مطالعه توصیفی بر روی ٦۰۰ نمونه ادرار از بیماران بستری در بیمارستان شهید بهشتی کاشان، که میزان گلبول‌های سفید در آزمایش ادرار مساوی یا بیشتر از ۵ در هر میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی زیاد(WBC $\geq$5/hpf) بود، انجام پذیرفت. نمونه‌های ادرار بر روی محیط های آگار خون دار وآگار ائوزین متیلن بلو کشت و به مدت ٢٤ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌های با رشد بیش از ۱۰۰۰۰واحد تشکیل دهنده کلنی در هرمیلی لیتر ادرار، با رنگ آمیزی گرم، تست حساسیت به باسیتراسین، حساسیت به تری متوپریم– سولفامتاکسازول (SXT)، رشد بر روی محیط نمک ٦/۵ درصد، تست هیدرولیز ال- پیرولیدونیل- بتا- نفتیل آمید (PYR)، رشد در دمای ٤۲^{0}C، رشد برروی محیط بایل اسکولین، تعیین هویت شدند. ۹۵ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* انتخاب و برای فاکتورهای ویرولانس تولید بیوفیلم، تولید همولیزین و تولید آنزیم ژلاتیناز بررسی شدند. فعالیت ژلاتیناز با رشد باکتری برروی محیط حاوی ۳ درصد ژلاتین مشخص گردید چند کلنی خالص بر روی محیط حاوی ژلاتین به‌صورت زیگزاگ کشت داده و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷^{0}C انکوبه گردید. بعد از این مدت با اضافه کردن یک میلی لیتر از محلول اسیدهیدروکلریک در صورت مشاهده هاله شفاف اطراف خط کشت نتیجه مثبت تلقی گردید. به منظور سنجش بیوفیلم *انتروکوکوس فکالیس* رشد یافته در محیط Trypticase soy broth (TSB) حاوی ۰/۵ درصد گلوکز به نسبت $\frac{1}{40}$ با محیط TSB حاوی ۰/۵ درصد گلوکز رقیق گردید. سپس ۲۰۰µl از سوسپانسیون حاصل به گوده های میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای اضافه و

در دمای $37\ ^0C$ به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شد. میکروپلیت سه مرحله توسط آب مقطر استریل شسته و بعد به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شود. بیوفیلم اتصال یافته با افزودن سافرانین ۰/۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه رنگ آمیزی شد. سپس سه مرحله با آب مقطر استریل شسته شد تا رنگ اضافی حذف و بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، جذب نوری بیوفیلم بر روی سطح ته گوده پلیت خشک شده در ٤٩٠ OD با ELISA Reader قرائت گردید. محیط کشت TSB بدون باکتری به عنوان شاهد استفاده شد. هر آزمایش درسه مرحله در سه روز متفاوت تکرارگردید . سپس میانگین و انحراف معیار محاسبه شد. از ۲۹۲۱۲ *Entrococcus faecalis* ATCC به عنوان شاهد استفاده گردید (۲۷و۲۸). اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی و با آزمون آماری مجذور کای و آزمون دقیق فیشر تجزیه وتحلیل شدند.

یافته ها:

از ٦۰۰ نمونه ادرار کشت شده، ۱۱٤ سویه انتروکوک (۱۹ ٪) جدا شد که ۹۵ سویه (۸۳/۳ ٪) *انتروکوکوس فکالیس* و ۱۹ سویه(۱٦/۷٪) *انتروکوکوس فسیوم* بود. سن بیماران مورد مطالعه ۳۹/۲۰±۲۸/۰٦ سال و از حداقل ۱ ماه تا حداکثر ۹۱ سال متغیر بود. ٤۸ نفر از بیماران مرد (۵۰/۵٪) و ٤۷ نفر زن (٤۹/۵٪) بودند. ۵ نفر (۵/۳٪) دارای سوند ادراری بودند. ۱٦ نفر (۱٦/۸٪) سابقه مصرف آنتی بیوتیک داشتند.

٤۲ سویه(٤٤/۲٪) دارای همولیز بودند: ۳۵ سویه (۳۵/۸٪) همولیز بتا، ۷ سویه (۷/٤٪) همولیز آلفا. ۵۳ سویه (۵٦/۸٪) فاقد همولیز بودند. میانگین و انحراف معیار تشکیل بیوفیلم در دانسیته اپتیک ۴۹۰ ، ۰/۱۱ ±۰/۰۷ و از حداقل ۰/۰۰۲ تا حداکثر ۰/۹۹٤ متغیر بود. از ۹۵ سویه *انتروکوکوس فکالیس* ۱۰ سویه(۱۰/۵٪) بیوفیلم قوی (بیشتر از۰/۲)، ٦ سویه (٦/۳٪) بیوفیلم متوسط (کمتر از ۰/۲ و بیشتر از۰/۱) و ۷۹ سویه (۸۳/۲٪) بیوفیلم ضعیف (کمتر از ۰/۱) تولید نمودند (نمودار ۱). ۱۹ سویه (۲۰٪) آنزیم ژلاتیناز تولید کردند. رابطه بین ظرفیت تولید بیوفیلم در ۹۵ سویه *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده ازنمونه‌های ادرار و فاکتورهای ویرولانس و خصوصیات دموگرافیک بیماران در جدول ۱ ارائه شده است.



نمودار ۱ : درصد فراوانی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده ازنمونه های ادرار

جدول ۱: رابطه بین ظرفیت تولید بیوفیلم در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده ازنمونه‌های ادرار، فاکتورهای ویرولانس و خصوصیات دموگرافیک بیماران

تشکیل بیوفیلم در OD_{490} / خصوصیات دموگرافیک		بیوفیلم شدید و متوسط تعداد (٪)	بیوفیلم ضعیف تعداد (٪)	جمع تعداد (٪)	P value
جنس	زن	۷ (۱٤/۹)	٤۰ (۸۵/۱)	٤۷ (۱۰۰)	۰/۶۱۶
	مرد	۹ (۱۸/۸)	۳۹ (۸۱/۲)	٤۸ (۱۰۰)	
سن (سال)	٤۰-۸	۸ (۱۵/٤)	٤٤ (۸٤/٦)	۵۲ (۱۰۰)	
	۹۱ -٤۱	۸ (۱۸/٦)	۳۵ (۸۱/٤)	٤۳ (۱۰۰)	۰/٦۷٦
مصرف آنتی بیوتیک	دارد	۳ (۱۸/۸)	۱۳ (۸۱/۲)	۱٦ (۱۰۰)	
	ندارد	۱۳ (۱٦/۵)	٦٦ (۸۳/۵)	۷۹ (۱۰۰)	۰/۷۲۹
استفاده از کاتتر ادراری	دارد	۱ (۲۰)	٤ (۸۰)	۵ (۱۰۰)	
	ندارد	۱۵ (۱٦/۷)	۷۵ (۸۳/۳)	۹۰ (۱۰۰)	≅۱
تولید همولیزین	دارد	٤ (۹/۵)	۳۸ (۹۰/۵)	٤۲ (۱۰۰)	
	ندارد	۱۲ (۲۲/٦)	٤۱ (۷۷/٤)	۵۳ (۱۰۰)	۰/۱۰۵
تولید آنزیم ژلاتیناز	دارد	۳ (۱۵/۸)	۱٦ (۸٤/۲)	۱۹ (۱۰۰)	
	ندارد	۱۳ (۱۷/۱)	٦۳ (۸۲/۹)	۷٦ (۱۰۰)	≅۱
جمع		۱٦ (۱٦/۸)	۷۹ (۸۳/۲)	۹۵ (۱۰۰)	

بحث:

انتروکوک مهم‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی است. اگرچه *انتروکوکوس فکالیس* به ندرت عفونت‌های ادراری جدی ایجاد می‌کند ولی، جدا سازی آن از عفونت‌های ادراری بیماران بستری رو به افزایش است (۸-٦). استفاده از سوندهای ادراری در بیماران بستری، باعث افزایش عفونت‌های ادراری در بیمارستان گردیده و اهمیت تشکیل بیوفیلم و ارتباط آن با پاتوژنیسیته *انتروکوکوس فکالیس* را در عفونت ادراری مشخص می‌کند. بیوفیلم زمانی به وجود می‌آید که سلول‌ها در سطح کلونیزه شده تجمع یافته و یا به صورت چند سلولی رشد نمایند و خود را در یک ماتریکس پلی ساکاریدی خارجی جای دهند(۲٦). در مطالعه ما بیوفیلم شدید و متوسط در ۱٦/۸ درصد، ژلاتیناز در ۲۰ درصد و همولیزین در ٤٤/۲ درصد از سویه‌ها مشاهده شد. بین تشکیل بیوفیلم شدید و متوسط و فاکتورهای سن، جنس، مصرف قبلی آنتی‌بیوتیک، استفاده از کاتتر و تولید همولیزین و آنزیم ژلاتیناز ارتباط معنی داری مشاهده نگردید. Coque و همکاران گزارش نمودند که همولیزین در ۱۳ درصد و ژلاتیناز در ۵۳ درصد ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* جداشده از نمونه‌های ادرار مشاهده شده است (۲٦). Vergis و همکاران گزارش نمودند که در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* ، فراوانی همولیزین ۱۷/۹ درصد (٦۳ سویه از ۳۵۲ سویه)، و ژلاتیناز ٤۷/٤ درصد (۱٦۷ سویه از۳۵۲ سویه) بوده است(۲۷). نتایج Seno و همکاران نشان داد که بین وجود پروتئین سطحی انتروکوک ، ژلاتیناز و توانایی سویه‌ها در تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی ارتباط قوی وجود دارد (۲۸). در مطالعه Kristich و همکاران نشان داده شده است که سویه‌ی فاقد پروتئین سطحی قادر است در سطوح بی جان مستقل از پروتئین سطحی انتروکوک تشکیل بیوفیلم دهد و ژلاتیناز باعث افزایش تشکیل بیوفیلم در *انتروکوکوس فکالیس* می‌گردد(۱٤). همچنین مشخص شده که پروتئین سطحی انتروکوک برای تشکیل بیوفیلم ضروری نبوده ولی وجود آن با

تشکیل مقادیر بالایی از بیوفیلم همراه بوده است (۱۵). Trendolkar و همکاران بیان نمودند که پروتئین سطحی انتروکوک، به عنوان یک فاکتور کلیدی برای توانایی *انتروکوکوس فکالیس* در تشکیل بیوفیلم، در یک وضعیت وابسته به گلوکز می‌باشد(۱۷). در مطالعه Seno و همکاران ظرفیت تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های دارای پروتئین سطحی به طور قابل توجهی بیشتر از ایزوله‌های فاقد پروتئین سطحی بود(۲۹). در صورتی که Trendolkar و همکاران چنین اثر همگرایی را بین ژلاتیناز و پروتئین سطحی انتروکوک بر روی تشکیل بیوفیلم نشان ندادند(۱۷). تشکیل بیوفیلم به‌وسیله انتروکوک نه تنها در وسایل پزشکی بلکه در پاسخ به هر فاکتور باکتریایی مداخله‌گر در چسبندگی اجزای ماتریکس خارج سلولی به میزبان، دخالت دارد(۲۹).

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که بین تشکیل بیوفیلم شدید و متوسط و فاکتورهای سن، جنس، مصرف قبلی آنتی بیوتیک، استفاده از کاتتر، تولید همولیزین و آنزیم ژلاتیناز همگرایی وجود ندارد. هیچ فاکتور منفرد غالب به عنوان پیشگویی کننده مهم ویرولانس، معرفی نشد. لذا، به نظر می رسد اثرات آنها تجمعی می‌باشد.

فهرست مراجع:

1. Gilmore MS, Coburn PS, Nallapareddy SR ,Murray BE. Enterococcal virulence. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE and Rice LB eds. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.* Washington DC; ASM.2002; PP: 301-354.
2. Hancock LE and Gilmore MS: Pathogenicity of enterococci. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI eds. *Gram positive pathogens.* Washington DC; ASM.2000; PP: 251-258.
3. Mundy LM, Sahm DF , Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence , antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 513-522.
4. Huycke MM, Sahm DF and Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem , anagenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**:239-249.
5. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 37-47.
6. Ronald A: The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 2002; **113**: 14S-19S.
7. National Nosocomial Infections Surveillance System: National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999; **27**: 520-532.
8. Gatermann SG. Virulence factors of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, and enterococci in urinary tract infections.In: Mobley HLT , Warren JW, eds. *Molecular pathogenesis and clinical management*. Washington DC; ASM.1996;pp: 313-340.
9. Haas W, Shepard BD , Gilmore MS. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 2002; **415**: 84-87.
10. Qin X, Singh KV, Weinstock GM , Murray BE. Effects of *Enterococus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 2000; **68**: 2579-2586.
11. Nakayama J, CaoY, Horii T, Sakuda S, Akkermans AD, de Vos WM ,*et al*. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 2001; **41**:145-154.
12. Qin X, Singh KV, Weinstock GM ,Murray BE. Characterization of fsr, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol* 2001; **183**: 3372-3382.
13. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, *et al*. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 4538-4545.
14. Kristich CJ, Li Y-H, Cvitkovitch DG , Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 154-163.
15. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F , Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and

various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; **72**: 3658-3663.
16. Hancock LE , Perego M. The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* 2004; **186**: 5629-5639.
17. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS , Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; **72**: 6032-6039.
18. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G , Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; **67**: 193-200.
19. Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS , Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001; **69**: 4366-4372.
20. Coburn PS , Gilmore MS. The *Entrococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* 2003; **5**:661-669.
21. Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonne F, *et al*. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol* 2002; **153**:75-80.
22. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 1995; **34**:152-156.
23. Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000*;* **19**:39-42.
24. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol. 2001; **67**(4):1628-35.
25. Hall-Stoodley L, Costerton JW , Stoodley P. Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbial* 2004; **2**:95-108
26. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM , Murray BE. incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococcus isolated from patients with endocarditis and other infection and from feces of hospitalized and community-based oersons. *J Infect Dis* 1995; **171**:1223-1229
27. Vergis EN, Shanker N, Chow JW, Hayden MK, Sndman DR, Zervos MJ *et al* . Association between the presence of enterococcal virulace factors gelatinase, hemolysin,and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clhn Infect Dis*. 2002; **35**: 570-575
28. Seno y, Kariyama R , Mitsuhata R, Monden K, Kumon H . Clinical Implications of Biofilm Formation by *Entrococcus faecalis* in the Urinary *Tract Acta Med* . Okayama 2005; **59** (No) 3: 79 - 87.
29. Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R , Muscholl-Silbernhorn A. Aggregation substance-mediated adherence to *Entrococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 2004; **72**:5877-5885