

Mekanisme Biomolekuler *Pseudomonas aeruginosa* dalam Pembentukan Biofilm dan Sifat Resistensi terhadap Antibiotika

Wani Devita Gunardi

Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta
Alamat Korespondensi: wd409gunardi@gmail.com

Abstrak

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah salah satu bakteri batang Gram negatif penghasil biofilm yang banyak berperan dalam infeksi akut dan kronik. Komponen biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah Alginat yang merupakan polimer asetil dari asam beta D-mannouronik dan alfa-L- asam guluronik. Biofilm ini resisten terhadap antimikroba dan sistem pertahanan imun tubuh sehingga sulit untuk dieradikasi. Ketidakberhasilan terapi antibiotika pada keadaan infeksi biofilm dikarenakan adanya struktur biofilm yang tersusun dari matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang sulit ditembus oleh antibiotika. Komponen matriks eksopolisakarida (EPS) sebagai bahan pembungkus biofilm terdiri dari Psl, Pel, Alg, dan eDNA. *P.aeruginosa* diketahui mampu menghasilkan tiga eksopolisakarida biofilm yaitu alginat, Psl dan Pel. Komponen Psl dan Pel berperan dalam proses pematangan atau maturasi biofilm dan resistensi antibiotika, sedangkan komponen Alg lebih banyak berperan dalam menghasilkan mukus untuk melindungi *Pseudomonas aeruginosa* dari antimikroba dan sistem imunitas tubuh. Antibiotika golongan makrolida (eritromisin, claritromisin, dan azitromisin) memunyai aktivitas antibiofilm yang kuat secara *in vitro* dan *in vivo* pada infeksi bakteri biofilm batang Gram negatif dengan menghambat alginat yang membentuk EPS. Semua jenis antibiotik kecuali polymyxin ditolak oleh sistem mekanisme pompa *efflux P.aeruginosa* yaitu meAX-oprM, mexXY-oprM, mexCD-oprJ dan mexEF-oprN. Virulensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berhubungan dengan produk bakteri seperti eksotoksin A, eksoenzim S, alginat, hemolisin, fosfolipase C, elastase, alkaline protease dan siderofor. Semua faktor virulensi ini telah memainkan peranan penting pada patogenesis infeksi traktus respiratorius, saluran kemih, luka dan keratitis.

Kata kunci : *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri penghasil biofilm, resistensi biofilm terhadap antibiotika

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the gram-negative bacteria producing biofilm which has an important role in acute and chronic infection. *Pseudomonas aeruginosa*'s biofilm material is known as acetyl polymer originate from D-mannouronik beta acid and alfa-L- guluronik acid. This biofilm is resistant to antibiotics and immune systems which make it hard to be eradicated. The ineffectiveness of antibiotics treatment to biofilm infections due to high level of biofilm resistance as a result from biofilm structure itself, build by exopolysaccharide matrix known as extracellular polymeric substances (EPS). This EPS functioned as a biofilm shield, contains of Psl, Pel, Alg, dan eDNA. *P.aeruginosa* is known to be capable of producing three different type of exopolysaccharide matrix, which are alginate, Psl and Pel. Psl and Pel material have role in maturation process and antibiotics resistant mechanism. Meanwhile, the Algs modulate defense mechanism of host's immune system and antibiotic resistance by producing slime. Makrolide antibiotic class (eritromisin, claritromisin and azitromisin) has a strong antibiofilm activity *in vitro* and *in vivo* towards all gram-negative bacteria producing biofilm infections by detaining the Alginate which produces EPS. All types of antibiotics class, except polymyxin, were ejected by *Pseudomonas aeruginosa* efflux pumping

mechanism like meAX-oprM, mexXY-oprM, mexCD-oprJ dan mexEF-oprN. Virulence factor of Pseudomonas aeruginosa related with bacteria products such as exotoxin A, exoenzyme S, alginate, hemolysin, phospholipase C, elastase, alkaline protease and siderofor. All of these virulence factors play an important role in pathogenesis of respiratory tract infection, urinary tract infection, wounds and keratitis.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa, biofilm producer, multidrugs resistant biofilm producer*

Pendahuluan

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri oportunistik Gram negatif yang paling sering berperan dalam pembentukan biofilm pada alat kesehatan yang tertanam dalam tubuh manusia. Diperkirakan 10%-20% kasus infeksi nosokomial disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.¹ Sebagai bakteri pembentuk biofilm ini, maka infeksi biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* umumnya sulit dieradikasi dan sering menyebabkan infeksi persisten atau kronik, seperti pada kasus infeksi kistik fibrosis paru atau infeksi biofilm akibat pemakaian alat yang tertanam dalam tubuh.^{1,2} Hal ini disebabkan karena kerja dari antibiotika dan sistem imunitas tubuh menjadi kurang efektif pada bakteri yang terdapat dalam biofilm dibandingkan dengan bakteri planktonik.²

Infeksi persisten yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ini umumnya resisten terhadap terapi beberapa antibiotika (MDR=*multi-drug resistance organism*). Keadaan ini dapat menimbulkan komplikasi lanjutan berupa infeksi sekunder jamur dan memperpanjang lama masa perawatan.³ Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* juga mempunyai kemampuan untuk hidup dan tumbuh kembang dalam berbagai kondisi dan lingkungan, sifat ini memungkinkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menjadi agen infeksi yang dapat memudahkan timbulnya wabah bakteri MDR di lingkungan rumah sakit khususnya unit perawatan intensif (ICU).³

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* juga merupakan bakteri patogen yang sering menjadi penyebab Infeksi Saluran Kemih, infeksi luka, dan infeksi saluran pernapasan bagian bawah pada pasien dengan imunokompromis. Faktor predisposisi Infeksi Saluran Kemih dengan penyebab bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah pemakaian

alat invasif kateter urin selama tindakan operasi di rumah sakit, atau pada penyakit saluran kemih lainnya yang mempermudah terjadinya kolonisasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.⁴

Faktor Virulensi dan Molekuler dari Uropatogenik *Pseudomonas aeruginosa*

Virulensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berhubungan dengan produk bakteri seperti eksotoksin A, eksoenzim S, alginat, hemolisin, fosfolipase C, elastase, alkalin protease, dan siderofor. Masing-masing dari faktor virulensi ini akan berperan sesuai dengan letak tempat dan tipe infeksi dari Infeksi Saluran Kemih.⁴ Hal ini dapat terjadi melalui fasilitas komunikasi antar sel bakteri atau *quorum sensing*.³

Pada isolat dari infeksi saluran kemih terbanyak ditemukan faktor virulensi elastase, fosfolipase C, dan eksoenzim S yang berperan juga sebagai penyebab infeksi yang bersifat persisten. Dibandingkan dengan hasil isolat dari infeksi lainnya maka isolat dari infeksi saluran kemih menghasilkan kadar alginat paling rendah dan kadar protease yang paling tinggi. Ditemukan juga bahwa dari isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari spesimen urin terdapat paling sedikit satu dari dua siderofor seperti pyochelin dan atau pyoverdin. Faktor virulensi hemolisin juga diketahui mempunyai hubungan dengan kerusakan jaringan ginjal. Secara invitro, adanya produksi hemolisin yang kuat juga dapat dipakai sebagai informasi adanya proses pyelonefritis. Dengan memahami dan mengerti tentang mekanisme pengaturan ekspresi gen virulensi dari bakteri *P.aeruginosa* diharapkan dapat mengembangkan alternatif lain penatalaksanaan infeksi bakteri biofilm.³

Faktor virulensi lainnya adalah yang berhubungan dengan kemampuan untuk membentuk biofilm yaitu alginat, lipopolisakarida (LPS), flagel, pilus dengan

faktor adhesi, dan ada juga yang berkaitan dengan produk sekresi dari sel seperti enzim protease, elastase, fosfolipase C, pyocyanin, eksotoksin A, eksoenzim S, hemolisin, dan siderofor.^{4,5} Faktor virulensi yang berperan dalam pembentukan biofilm sesuai tahap pembentukannya adalah *PilA* dan *PilB* pada pili untuk tahap pertama, yaitu tahap adhesi atau perlekatan dengan permukaan alat atau jaringan serta alginat (Alg), *Polysaccharide synthesis locus* (Psl), dan *Pellicle formation* (Pel) pada tahap pematangan biofilm.¹

Pada *P.aeruginosa* dengan tipe mukoid yang banyak ditemukan dari isolat pasien *Cystic Fibrosis* (CF), ditemukan alginat sebagai komponen *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang paling berperan, sedangkan dari isolat infeksi yang berkaitan dengan penggunaan alat seperti kateter urin, yang paling banyak ditemukan adalah Psl dan Pel sebagai komponen EPS yang dominan.^{1,2} Komponen matriks ekso polisakarida (EPS) sebagai bahan pembungkus biofilm terdiri atas Psl, Pel, Alg, dan eDNA. Komponen Psl dan Pel berperan selain dalam proses pematangan

atau maturasi biofilm, ternyata berperan juga dalam resistensi antibiotika. Sedangkan komponen Alg lebih banyak berperan dalam respons imun.⁶ Psl terletak pada bagian perifer dari matriks biofilm (EPS) dan berperan untuk menarik bakteri planktonik bebas untuk membentuk struktur biofilm. Pel berperan sebagai reseptor dari enzim diguanilat siklase untuk mengontrol pembentukan c-di-GMP sebagai *second messenger* untuk proses maturasi biofilm.^{1,7}

Semua faktor virulensi ini memainkan peranan penting pada patogenesis infeksi traktus respiratorius, saluran kemih, luka, dan keratitis. Masing-masing dari faktor virulensi diatas, didapati bahwa elastase, fosfolipase C, toksin A, dan eksoenzim S paling banyak ditemukan dari *strain* isolat *P.aeruginosa* penyebab infeksi pada luka, traktus respiratorius, dan jarang ditemukan pada kasus infeksi saluran kemih. Tingkatan produksi dari masing-masing faktor virulensi berbeda-beda tergantung dari keadaan lingkungan tempat infeksi.⁴

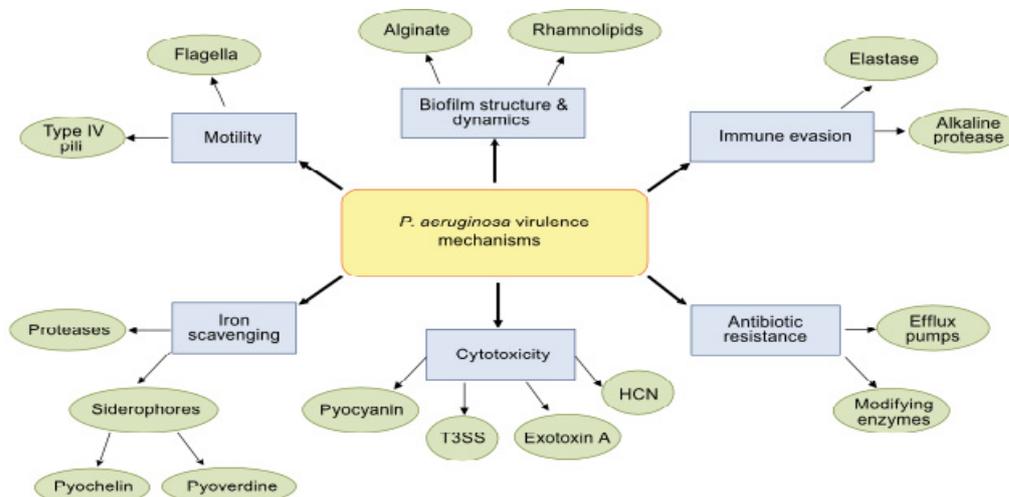


Figure 1. Virulence mechanisms employed during *P. aeruginosa* infections.

Gambar 1. Mekanisme Virulensi yang Berperan pada Infeksi *P. aeruginosa* Dikutip dari Lee J dkk³

P.aeruginosa diketahui mampu menghasilkan tiga eksopolisakarida biofilm, yaitu alginat yang bermuatan negatif, eksopolisakarida yang kaya akan mannanosa netral “Psl”, dan eksopolisakarida yang kaya akan glukosa “Pel”. Produksi alginat sangat menentukan

fenotip mukoid dari *P.aeruginosa* yang diisolasi dari infeksi sistik fibrosis. Peran QS pada biofilm untuk pertamakali ditemukan pada *P.aeruginosa*, yang sangat menentukan produksi faktor-faktor biofilm dan perkembangan biofilm secara keseluruhan.

Regulasi QS pada *P.aeruginosa* melibatkan tiga sistem (Rhl, Las, dan Qsc) yang membentuk jejaring QS. QS merupakan regulator positif dari perluasan biofilm. Rhamnolipid merupakan contoh surfaktan yang dikendalikan oleh QS yang memfasilitasi biofilm *P.aeruginosa*. Kecuali itu perlu dicatat bahwa pili (atau fimbriae) pada *P.aeruginosa* memungkinkan melakukan motilitas sehingga bisa melekat pada permukaan.^{6,8}

Mekanisme Resistensi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Adanya kecenderungan peningkatan resistensi bakteri *P.aeruginosa* terhadap antibiotika secara global, pada umumnya akibat penggunaan antibiotika yang tidak rasional atau *overuse* apalagi pada bakteri penghasil biofilm. Hal ini menimbulkan *P.aeruginosa* menjadi bersifat *multidrug-resistant*. Dari beberapa penelitian sebelumnya, didapatkan adanya penurunan sensitivitas bakteri *P.aeruginosa* terhadap antibiotika seperti imipenem, yaitu dari 83.7% pada tahun 2002 menjadi 70.8% pada tahun 2015.^{9,10}

Terdapat beberapa mekanisme resistensi yang dimiliki oleh bakteri *P.aeruginosa* yaitu melalui sifat intrinsik resisten yang telah dimilikinya, proses mutasi melalui kromosom, dan melalui transfer materi gen resisten dari bakteri lainnya via transposon, plasmid, dan bakteriofaga. Mekanisme resistensi tersebut akan mengakibatkan bakteri *P.aeruginosa* mempunyai kemampuan untuk restriksi *uptake* antibiotika, memompa keluar antibiotika (*efflux pump*), menginaktivasi antibiotika, dan mengubah target antibiotika.⁹

Beberapa di antara mekanisme resistensi terhadap B-laktam adalah adanya ekspresi AmpC, OprD dan *efflux pump*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Moya et al, resistensi dari *P.aeruginosa* terhadap B-laktam merupakan hasil dari kombinasi dari mutasi yang menyebabkan inaktivasi OprD, hiperproduksi AmpC dan overekspresi *efflux pump*. Kurangnya ekspresi PBP4 juga menyebabkan terjadinya mutasi PAO1 terhadap dacB. Modifikasi terhadap ekspresi gen PBP1a memiliki dampak terhadap resistensi terhadap B-laktam. Beberapa studi lainnya mengungkapkan adanya penurunan ekspresi koding gen PBP2 dan PBP3 pada

isolat *P.aeruginosa* yang resisten terhadap carbapenem.¹¹

Beberapa jenis sistem mekanisme pompa antibiotika (*efflux pump*) pada *P.aeruginosa* telah diketahui yaitu : meAX-oprM, mexXY-oprM, mexCD-oprJ, dan mexEF-oprN. Semua jenis antibiotika kecuali *polymyxin* ditolak oleh sistem mekanisme pompa ini. MexAB-oprM bertanggung jawab terhadap resistensi terhadap B-laktam, kuinolon dan beberapa jenis disinfektan. MexXY-oprM merusak aminoglikosida dan mexEF-oprN merusak karbapenem dan kuinolon. Gen dari sistem ini muncul hampir di semua galur namun tidak dalam jumlah yang tinggi. Tetapi, peningkatan ekspresi ini dapat dihasilkan dari mutasi terhadap gen regulator seperti mexR, yang mengontrol ekspresi gen mexAB-oprM.⁹

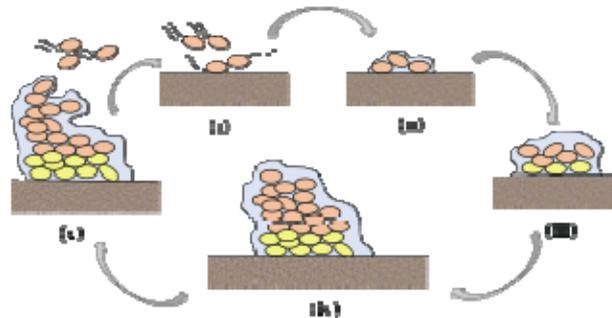
Multidrug – resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* telah diketahui sebagai salah satu bakteri penyebab utama infeksi nosokomial. Pada genom *P.aeruginosa*, MexAB-OprM dan MexXY-OprM, mempengaruhi fenotipe resisten B-laktam, dan mengurangi aktivitas florokuinolon dan aminoglikosida. Selain itu mekanisme lainnya yang berkaitan dengan resistensi B-laktam antibiotika adalah adanya *Penicillin binding Proteins* (PBPs), yaitu PBP1a, PBP1b, PBP2 dan PBP3.^{9,11}

Pembentukan Biofilm oleh Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Pembentukan biofilm umumnya terdiri atas lima tahapan yaitu tahap pertama adalah perlekatan bakteri planktonik ke permukaan lapisan kateter urin yang bisa diiniasi dari bahan material kateter, pH urin, zat-zat dalam urin (elektrolit dan protein). Pada tahap ini, peranan faktor virulensi bakteri seperti flagel dan adhesin memegang peranan penting. Tahap kedua adalah perlekatan yang sifatnya menetap atau *irreversible*, pada tahap ini *Pseudomonas aeruginosa* membutuhkan protein SadB yang akan mengubah perlekatan menjadi *irreversible*. Tahap ketiga adalah pembentukan lapisan kompleks biomolekul dan matriks *extracellular polymeric substances* (EPS) untuk membentuk mikrokoloni. Terdapat tiga komponen materi polisakarida yang berperan dalam pembentukan biofilm pada bakteri

P.aeruginosa yaitu Psl, Pel dan alginat .Tahap keempat adalah pematangan biofilm dan tahap kelima terjadi pelepasan bakteri biofilm lagi,

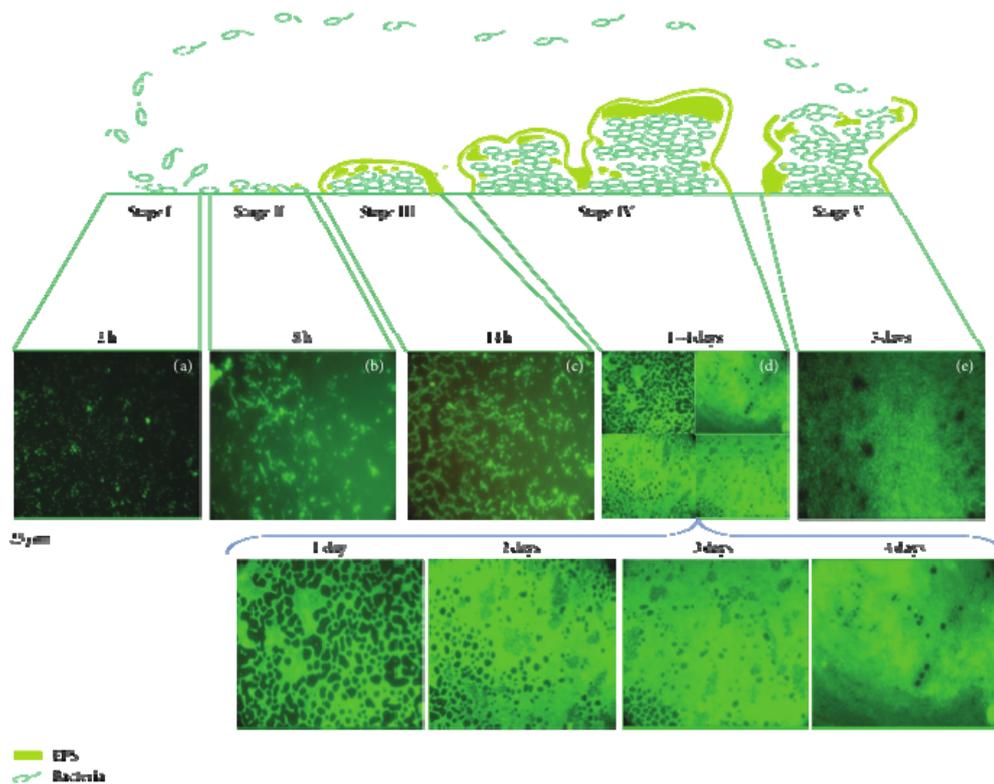
untuk dapat kembali membentuk lapisan biofilm lainnya.^{5,6,13}



Gambar 2. Tahap Pembentukan Biofilm: (i) perlekatan bakteri planktonik ke permukaan dinding lumen kateter urin, (ii) perlekatan menetap atau *irreversible*, (iii) pembentukan mikrokoloni, (iv) pematangan biofilm (v) pelepasan bakteri biofilm.¹³

Dari hasil penelitian Rasamiravaka, dkk, diperlihatkan bahwa siklus pembentukan biofilm oleh bakteri *P.aeruginosa* pada media glukosa yang minimal telah dimulai pada dua jam pertama, yaitu tahap dimana bakteri planktonik mulai melekat pada permukaan alat atau lingkungan abiotik, kemudian dalam delapan jam berikutnya membentuk perlekatan yang bersifat menetap atau *irreversible*. Perlekatan ini akan mencapai *quorum sensing* dan membentuk mikrokoloni dengan mulai membentuk EPS sebagai matriksnya dalam waktu 14 jam. Mikrokoloni ini kemudian makin berkembang

menjadi biofilm yang matang dan kokoh dengan struktur EPS-nya. Biofilm yang matang ini tercapai pembentukannya dalam waktu 1-4 hari setelah terjadi perlekatan bakteri, baik pada alat atau lingkungan abiotik maupun pada jaringan. Bakteri dalam biofilm yang matang ini dapat terdispersi kembali dari lingkungan biofilmnya menjadi bakteri planktonik dan dapat mengkolonisasi kembali permukaan alat atau jaringan lainnya. Hal ini dapat terjadi seperti sebuah siklus yang berulang dan dapat menyebabkan kolonisasi yang berlangsung secara terus-menerus, sehingga pada suatu saat dapat terjadi infeksi.²



Gambar 3. Siklus Pembentukan Biofilm dari Bakteri *P.aeruginosa* pada Media Minimal Glukosa.²

Terapi Antibiotika terhadap *P.aeruginosa*

Ketidakberhasilan terapi antibiotika pada keadaan infeksi biofilm dikarenakan tingginya tingkat resistensi antibiotika akibat adanya struktur biofilm yang tersusun dari matriks EPS. Beberapa penelitian menyarankan untuk menggunakan terapi kombinasi antibiotika dengan antibiotika golongan makrolida sebagai pilihan utama.^{10,12-14}

Antibiotika golongan makrolida (eritromisin, klaritromisin, dan azitromisin) mempunyai aktivitas antibiofilm yang kuat secara *in vitro* dan *in vivo* pada infeksi bakteri biofilm batang Gram negatif dengan menghambat alginat yang membentuk EPS.¹³ Antibiotika golongan makrolida banyak digunakan pada infeksi biofilm traktus respiratorius, karena faktor virulensi Alg yang banyak berperan pada bakteri *P.aeruginosa* tipe mukoid. Terdapat perbedaan hasil dari berbagai penelitian di beberapa tempat untuk pola resistensi terhadap bakteri *P.aeruginosa* yang diisolasi dari isolat klinik. Penelitian Anil C. di Kathmandu Nepal tahun 2013, melaporkan tingkat resistensi yang rendah

terhadap antibiotika Imipenem, Amikacin, dan Ciprofloxacin. Tetapi laporan penelitian dari negara Malaysia, Turki, dan India menyatakan peningkatan resistensi yang tinggi terhadap Amikacin dan Ciprofloxacin.^{15,16} Penelitian di Rumah Sakit militer di Serbia periode tahun 2006-2011, menunjukkan isolasi bakteri tersering penyebab *Catheter Associated Urinary Tract Infection* (CAUTI) adalah *Candida sp* (28,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (18,3%) dan *Klebsiella sp* (15,5%) dengan peningkatan resistensi terhadap antibiotika. Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mempunyai tingkat resistensi terhadap ciprofloxacin (69,2%) dan imipenem (46,1%).¹⁷ Hasil penelitian lainnya di Libya didapatkan kepekaan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotika anti-pseudomonas adalah Cefepime (54%), piperacillin-tazobactam (54%), ceftazidim (45%) sedangkan resistensi terhadap Imipenem sebesar 36%, lebih baik sedikit dibandingkan resistensi Imipenem di Serbia.^{17,18}

Daftar Pustaka

1. Lavery G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens*. 2014;3(3):596-632.
2. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*. 2015;2015:759348.
3. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*. 2015;6(1):26-41.
4. Mittal R, Khandwaha R.K., Gupta V., Mittal P.K., Harjas K. Phenotypic characters of urinary isolate of *Pseudomonas aeruginosa* & their association with mouse renal colonization. *Indian J Med Res*. 2006;123:67-72.
5. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Journal of infection and public health*. 2009;2(3):101-11.
6. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(10):20983-1005.
7. Whitney JC, Colvin KM, Marmont LS, Robinson H, Parsek MR, Howell PL. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(28):23582-93.
8. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International journal of medical microbiology: IJMM*. 2012;302(2):638.
9. de Freitas A.L.P. BAL. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: Focus on imipenem. *BJID*. 2002.
10. Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period. *PloS one*. 2015;10(10):e0139836.
11. Moya B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan-beta-lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(9):4771-8.
12. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*. 2015;7(1):1-7.
13. Soto SM. Importance of biofilms in urinary tract infections: New therapeutic approaches. *Advances in biology*. 2014;2014:1-13.
14. Herrmann G, Yang L, Wu H, Song Z, Wang H, Hoiby N, et al. Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(10):1585-92.
15. Anil C. SRM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate at a tertiary care hospital in Kathmandu Nepal. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(3).
16. K.M. S. Determination of antibiotic resistance pattern of biofilm producing pathogenic bacteria-associated with *uti*. *Int J Drug Dev & Res*. 2013;5 (4).
17. Mladenovic J, Veljovic M, Udovicic I, Lazic S, Jadranin Z, Segrt Z, et al. Catheter-associated urinary tract infection in a surgical intensive care unit. *Vojnosanitetski preglod*. 2015;72(10):883-8.
18. Zorgani A, Abofayed A, Glija A, Albarbar A, Hanish S. Prevalence of device-associated nosocomial infections caused by gram-negative bacteria in a trauma intensive care unit in Libya. *Oman Medical Journal*. 2015;30(4):270-5.