



## BIOFILM PRODUCTION AND TWITCHING AND SWARMING MOTILITY OF CLINICAL ISOLATES *ACINETOBACTER* *BAUMANNII*

### PRODUKCIJA BIOFILMA I POKRETLJIVOST PO TIPU TRZANJA I ROJENJA KLINIČKIH IZOLATA *ACINETOBACTER* *BAUMANNII*

Jovana Ranin<sup>1</sup>, Aleksandra Šmitran<sup>2</sup>, Ina Gajić<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banja Luci, Republika Srpska, Federacija Bosne i Hercegovine

<sup>3</sup> Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**Correspondence:** ina.gajic@med.bg.ac.rs

#### Abstract

**Introduction:** *Acinetobacter baumannii* is a ubiquitous gram-negative bacillus that has emerged as one of the most important cause of healthcare-associated infections primarily due to multidrug resistance and its ability to survive within biofilm on nonliving objects. *Acinetobacter* possesses pili that mediates its adherence to abiotic surfaces and certain types of motility such as twitching and swarming.

**Aim:** The aim of this study was to determine the capacity of the biofilm production of *A. baumannii* and the twitching and swarming motility.

**Material and methods:** A total of 128 strains of *A. baumannii* isolated from blood (34), wound swabs (35), respiratory tract (39) and other clinical materials (20) were included in the study. Biofilm-producing ability was tested in the microtiter plates at 26°C and 37°C for 24 hours incubation period and at 37°C for 48h incubation as well. The presence of the pili was determined by the testing of the twitching and swarming motility in a semi-solid nutrient medium.

**Results:** More than 90% of isolates showed moderate or strong biofilm production capacity regardless of the experimental conditions. Decreasing in biofilm production was noticed in the group of strong biofilm producers ( $p < 0.001$ ) during prolonged incubation time (48h). During the 24-hour incubation period, wound and respiratory isolates were significantly more frequent in the group of strong biofilm producers compared to blood and other isolates. No correlation between specific types of motility and biofilm production was noticed.

**Conclusion:** The biofilm production remained stable under the tested experimental condition. There was no decisive influence of pili on this virulence factor.

#### Keywords:

*Acinetobacter baumannii*,  
biofilm,  
motility,  
pili



## Sažetak

**Uvod:** *Acinetobacter baumannii* je ubikvitaran gram negativan bacil, koji zahvaljujući multirezistenciji i preživljavanju na neživim objektima u vidu biofilma, postaje sve češći uzročnik nozokomijalnih infekcija. Bakterije roda *Acinetobacter* poseduju pile koji imaju značajnu ulogu u adherenciji, ali i u pokretljivosti bakterija po tipu trzanja i rojenja.

**Cilj:** Cilj ovog rada je bio da se utvrdi sposobnost produkcije biofilma i pokretljivosti po tipu trzanja i rojenja kroz hranljivu podlogu kod sojeva *A. baumannii* izolovanih iz različitih kliničkih uzoraka.

**Materijal i metode:** Ukupno je testirano 128 izolata *A. baumannii* poreklom iz krvi (34), briseva rana (35), respiratornog trakta (39) i ostalih kliničkih materijala (20). Izolatima je ispitana sposobnost produkcije biofilma u mikrotitarskoj ploči na 26°C i 37°C tokom 24 sati i na 37°C tokom 48 sati. Prisustvo pila je ispitano testiranjem pokretljivosti po tipu trzanja i rojenja kroz polučvrstu hranljivu podlogu.

**Rezultati:** Preko 90% ispitivanih izolata je pokazalo umerenu ili izraženu sposobnost produkcije biofilma, nezavisno od uslova testiranja, pri čemu je sa produženjem vremena inkubacije uočeno smanjenje učestalosti jakih produkora biofilma ( $p < 0,001$ ). Tokom 24-časovne inkubacije otkriveno je da su izolati iz rana i respiratornog trakta bili značajno češći u grupi jakih produkora biofilma u odnosu na izolate iz krvi i ostalih uzoraka. Nije uočena povezanost između specifičnih tipova pokretljivosti i produkcije biofilma.

**Zaključak:** Produkcija biofilma izolata *A. baumannii* je u ispitivanim uslovima bila relativno stabilna fenotipska osobina. Nije uočena povezanost kretanja po tipu trzanja i rojenja ispitivanih uzoraka sa produkcijom biofilma.

### Ključne reči:

*Acinetobacter baumannii*,  
biofilm,  
pokretljivost,  
pili

## Uvod

*Acinetobacter baumannii* je ubikvitaran gram negativan bacil koji je poslednjih godina postao značajan uzročnik bolničkih infekcija, posebno u jedinicama intenzivne nege (1). Beleži se i porast učestalosti multirezistentnih (engl. *multidrug-resistant*, MDR) izolata *A. baumannii*, a značajan problem predstavlja povećanje rezistencije ovih bakterija na karbapeneme (2,3). Pored stečenih mehanizama rezistencije, acinetobakter karakteriše i urođena rezistencija na brojne antibakterijske agense, što dodatno komplikuje terapijski pristup. *A. baumannii* izaziva širok spektar infekcija poput sepse, infekcija urinarnog trakta, pneumonija povezanih sa asistiranom ventilacijom, infekcija mekih tkiva itd. Zbog učestale multirezistencije, neretko i panrezistencije, infekcije izazvane acinetobakterom su povezane sa visokim stopama smrtnosti (4).

Kolonizacija žive i nežive materije je preduslov razvoja bolničkih infekcija, a ujedno predstavlja i jednu od značajnih faza u formiranju biofilma (5,6). Procenjuje se da je i do 65% svih infekcija posredovano biofilmom (7). U pitanju je kompleksna multićelijska trodimenzionalna struktura, u kojoj su blisko postavljene ćelije uronjene u ekstraćelijsku polimernu supstanciju, koju same proizvode. Ekstraćelijski matriks može biti sastavljen od ugljenih hidrata, nukleinskih kiselina, proteina i drugih makromolekula (5). Unutar biofilma, bakterije postaju nedostupne ćelijama imunskog sistema, a dejstvo antibiotika je smanjeno, zahvaljujući fizičkoj barijeri u vidu matriksa.

*Acinetobacter* je otporan na brojne dezinficijense i isušivanje, što doprinosi uspešnoj kolonizaciji i preživljavanju na neživim materijama kao što su medicinski aparati, implantati, različite površine i oprema koju bolesnici u jedinicama intenzivne nege često zahtevaju (kateteri,

tubusi, proteze, i slično) (8). Sposobnost *A. baumannii* da formira biofilm na različitim veštačkim podlogama poput plastike i stakla (9,10) ima veliki značaj u u nastanku infekcija koje izaziva ova bakterija (11). *A. baumannii* poseduje brojne faktore virulencije koji učestvuju u procesu formiranja biofilma. U fazi adherencije značajnu ulogu imaju pili tipova I i IV, koji takođe doprinose i pokretljivosti acinetobaktera po tipu trzanja i rojenja, premda se ova bakterija zbog nedostatka flagela, tradicionalno ubraja u nepokretne bakterije.

Pored uslova sredine, kod najvećeg broja bakterija kritičnu ulogu u nastanku biofilma imaju delovi bakterijske ćelije koji su značajni za adherenciju, pili i površinski proteini (12). S obzirom na to da je uloga pila kod *A. baumannii* još uvek nerasvetljena u potpunosti (9,13), cilj ove studije je bio da se ispita sposobnost produkcije biofilma kao i da li je kod testiranih sojeva *A. baumannii* prisustvo pila povezano sa sposobnošću bakterija da produkuju biofilm.

## Materijal i metode

### Bakterijski izolati

Istraživanje je obuhvatilo 128 izolata *A. baumannii* koji su izolovani tokom 2017. godine i deo su kolekcije Instituta za mikrobiologiju i imunologiju. Sojevi su izolovani iz briseva rana (35 izolata), krvi (34 izolata), respiratornih uzoraka (bronhoalveolarni lavat, sputum i trahealni aspirat - 39 izolata) i iz drugih kliničkih materijala (urin, drena - 20 izolata).

Izolovani sojevi su identifikovani automatizovanim sistemom *Vitek 2* (*Biomerieux*, Francuska) pomoću GN ID kartice, a nakon toga su zamrzavani u bujonu od obranog

mleka (*HiMedia*, Indija) na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Kulture su po potrebi odmrzavane, presejavane na hranjivi agar (*HiMedia*, Indija) i inkubirane 24 sata na  $37^{\circ}\text{C}$ . Od sveže bakterijske kulture su pravljeni suspenzije u puferovanom fiziološkom rastvoru ili triptikaza soja bujonu (TSB) (*Sigma-Aldrich*, Nemačka), koje su korišćene tokom daljih eksperimenata.

### Ispitivanje produkcije biofilma

Ispitivanje produkcije biofilma je rađeno po metodi Stepanovića i saradnika (14), sa modifikacijom u koncentraciji ispitivanog inokuluma. U 2 ml sterilnog TSB inokulirano je 20  $\mu\text{l}$  bakterijske suspenzije gustine  $1 \times 10^8$  cfu/ml, da bi se dobila suspenzija gustine 106 cfu/ml. Svaki soj je testiran u triplikatu, tako što je po 100  $\mu\text{l}$  pripremljene suspenzije sipano u po tri bunarčića u ploči za mikrotitraciju (Kartel, Italija). Ploče su zatim inkubirane pod različitim uslovima: na  $26^{\circ}\text{C}$  i  $37^{\circ}\text{C}$  tokom 24 sati i na  $37^{\circ}\text{C}$  tokom 48 sati. Izolatima koji su inkubirani 48 časova je nakon 24-časovne inkubacije dodato 50  $\mu\text{l}$  TSB. Sadržaj ploče je zatim odstranjen pipetiranjem, a svaki bazenčić je tri puta ispiran fosfatnim puferom da bi se odstranile neadherisane bakterije. Adherisane bakterije su fiksirane sušenjem na vazduhu, a zatim je u svaki bazenčić pipetirano po 100  $\mu\text{l}$  boje kristal violet iz seta za bojenje po Gramu (*Merck*, Nemačka). Nakon 15 minuta, koliko je trajalo bojenje, ploče su ispirane tri puta fosfatnim puferom i sušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja, u svaku rupicu je dodato po 100  $\mu\text{l}$  30% sirćetne kiseline (Zorka Šabac, Srbija). Ekstinkcije (engl. *optical density*, OD) su očitavane na automatizovanom *ICN Flow Titrek Multiscan Plus* čitaču na  $\lambda$  od 570 nm.

Za svaku mikrotitracionu ploču su rađene po 3 negativne probe, koje su sadržale samo sterilan TSB. Granična vrednost ekstinkcije (engl. *cutt-off OD - ODc*) je za svaku ploču dobijana kao zbir srednje vrednosti ekstinkcija negativnih proba i trostruke vrednosti standardne devijacije. Prema sposobnosti produkcije biofilma, izolati su podeljeni u četiri kategorije: neproduktore, slabe, umerene i jake produktore biofilma. Za kategorisanje je korišćena formula:

$OD < ODc$  neproduktori

$ODc < OD < 2 \times ODc$  - slabi produktori

$2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$  - umereni produktori

$4 \times ODc < OD$  - jaki produktori.

Kao pozitivna kontrola korišćen je *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

### Ispitivanje pokretljivosti po tipu trzanja i rojenja

Ispitivanje pokretljivosti po tipu trzanja i rojenja je izvedeno po metodi Klemmera (*Clemmer*) i saradnika (15). Oba tipa pokretljivosti su ispitivana u polučvrstim podlogama koje su razliveno u plastične Petrijeve ploče (podloga za ispitivanje trzanja: TSB+0,8% hranjivog agara; podloga za ispitivanje rojenja: TSB+0,4% hranjivog agara). Ispitivani bakterijski izolati su zasejavani ubodnom ezom kroz celu dubinu obe hranjive podloge i inkubirani 24 sata na temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$ . Podloge za ispitivanje pokretljivosti po tipu trzanja su nakon inkubacije pažljivo odstranjivane nakon čega je dno Petrijeve ploče bojeno 0,2% rastvorom gencijane violet (*Merck*, Nemačka) u trajanju od 5 minuta. Boja je

zatim pažljivo ispirana, a meren je prečnik pokretljivosti bakterija, tj. zona Petrijeve ploče na kojoj se zadržala boja usled prisustva bakterija. Izolati su klasifikovani kao nepokretni (prečnik manji od 5 mm), umereno pokretni (prečnik od 5 do 20 mm) i izuzetno pokretni (prečnik veći od 20 mm). Pokretljivost po tipu rojenja je ispitivana merenjem prečnika dobijenih kolonija nakon inkubacije zasejane podloge. Sojevi su označeni kao nepokretni (prečnik kolonije  $\leq 10$  mm) ili kao pokretni (prečnik kolonije  $> 10$  mm). Oba eksperimenta su za svaki ispitivani soj ponavljana tri puta, a prikazani rezultati odgovaraju aritmetičkoj sredini sva tri merenja.

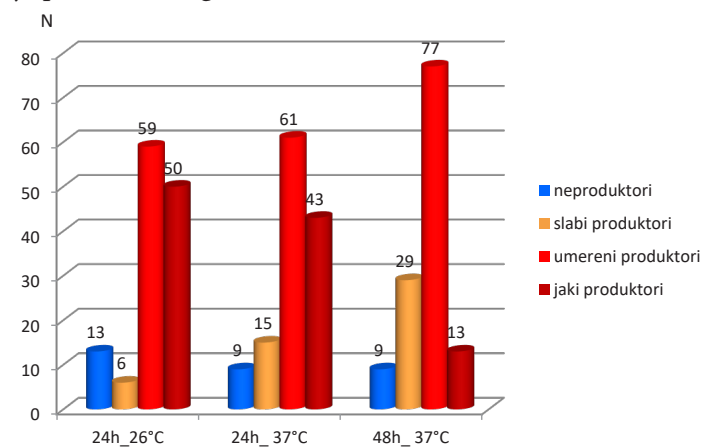
### Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je vršena *SPSS 15* sistemom za analizu podataka. Za procenu značajnosti razlike učestalosti korišćeni su  $\chi^2$  i Fišerov test. Razlika je bila statistički značajna ukoliko je  $p < 0,05$ , a visoko značajna ako je  $p \leq 0,001$ .

## Rezultati

### Sposobnost produkcije biofilma

Produkcija biofilma pri različitim temperaturnim i vremenskim uslovima ( $26^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ ,  $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$  i  $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ ) je prikazana na **grafikonu 1**.



**Grafikon 1.** Sposobnost produkcije biofilma 128 izolata *Acinetobacter baumannii* u različitim uslovima

Sposobnost produkcije biofilma je ispitivana: a) nakon 24-časovne inkubacije na  $26^{\circ}\text{C}$ , b) nakon 24-časovne inkubacije na  $37^{\circ}\text{C}$  i c) nakon 48-časovne inkubacije na  $37^{\circ}\text{C}$ . Prema sposobnosti produkcije biofilma ispitivani sojevi *A. baumannii* su podeljeni u četiri kategorije: neproduktori, slabi produktori, umereni produktori i jaki produktori. N - broj izolata.

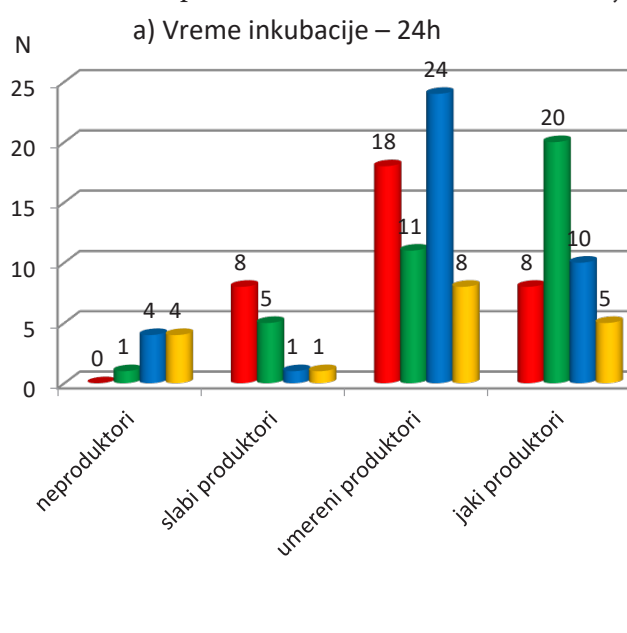
Pri inkubaciji zasejanih bujona u mikrotitracionim pločama u uslovima  $26^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ , 90% ispitivanih sojeva je produkovalo biofilm, pri čemu je 5,5% sojeva bilo svrstano u grupu slabih produktora, 46% u grupu umerenih produktora, a 39% u grupu jakih produktora. Nakon inkubacije sojeva na temperaturi  $37^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 24h, čak 92,2% izolata je produkovalo biofilm, a nakon produžene inkubacije na istoj temperaturi ( $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ ) biofilm je produkovalo 93,8% ispitivanih

sojeva. Nije uočena statistički značajna razlika učestalosti sojeva koji produkuju biofilm u navedenim eksperimentalnim uslovima ( $p > 0,05$ ). Međutim, vreme inkubacije jeste uticalo na promenu broja izolata koji pripadaju određenoj kategoriji sojeva koji produkuju biofilm. Pri inkubaciji sojeva na temperaturi od 37°C, nakon 48-časovne inkubacije značajno manji broj sojeva bio svrstan u kategoriju jakih produktora ( $n = 13$ ; 10,2%) u odnosu na 24-časovnu inkubaciju ( $n = 43$ ; 33,6%)  $p \leq 0,001$ . Suprotno tome, učestalost slabih i umerenih produktora biofilma je povećana nakon produžene inkubacije (slabi produktori: 24h - 10,9% vs. 48h - 23,4  $p \leq 0,001$ ; umereni produktori: 24h - 46,9% vs. 48h - 60,2%,  $p \leq 0,001$ ).

### Sposobnost produkcije biofilma kod izolata različitog porekla

Statistički značajne razlike u produkciji biofilma u odnosu na poreklo izolata ( $p < 0,05$ ) su uočene nakon inkubacije od 24 sata na obe testirane temperature (**grafikon 2** i **grafikon 3**), dok su nakon 48 sati svi uzorci (bez obzira na poreklo) pokazali istu sposobnost formiranja biofilma (**grafikon 3**).

Povezanost vrste uzoraka i sposobnosti formiranja biofilma na temperaturi 37°C nakon 24h inkubacije je

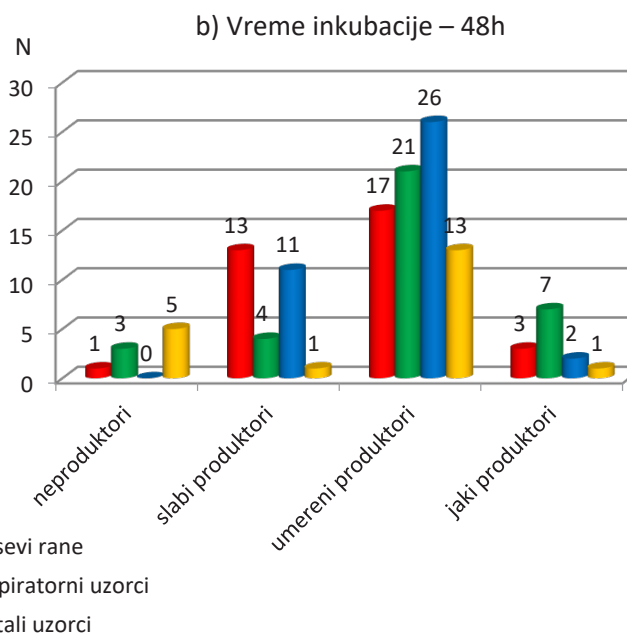


prikazana na **grafikonu 2**. Pod navedenim uslovima inkubacije, uočeno je da su sojevi izolovani iz briseva rana bili najzastupljeniji u grupi jakih produktora biofilma (46,5% nakon 24h) ( $p \leq 0,001$ ), dok su u grupi umerenih produktora dominantni bili sojeva poreklom iz respiratornog trakta (39,3% nakon 24h) ( $p < 0,05$ ).

Pri inkubaciji sojeva na sobnoj temperaturi (26°C) nakon 24-časovnog perioda, 54,2% sojeva izolovanih iz rana i 43,6% respiratornih izolata su kategorisani kao jaki produktori, dok je 73,5% sojeva izolovanih iz krvi bilo svrstano u grupu umerenih produktora (**grafikon 3**).

### Pokretljivost po tipu trzanja i rojenja

Pokretljivost po tipu rojenja je potvrđena kod 43,8% ispitivanih izolata, dok je 56,3% izolata označeno kao nepokretno (**grafikon 4**). Izuzetna pokretljivost po tipu trzanja je uočena kod 12 izolata (9,4%), umerena pokretljivost kod 64 izolata (50%), dok su 52 izolata (40,6%) bila nepokretna. Dobijeni rezultati ne ukazuju na statistički značajnu povezanost pokretljivosti izolata po tipu trzanja ili rojenja i produkcije biofilma ni u jednom od tri sprovedena eksperimenta ( $p > 0,05$ ).



**Grafikon 2.** Razlika u formiranju biofilma sojeva *Acinetobacter baumannii* izolovanih iz različitih kliničkih uzoraka na temperaturi 37°C nakon inkubacije od 24h i 48h

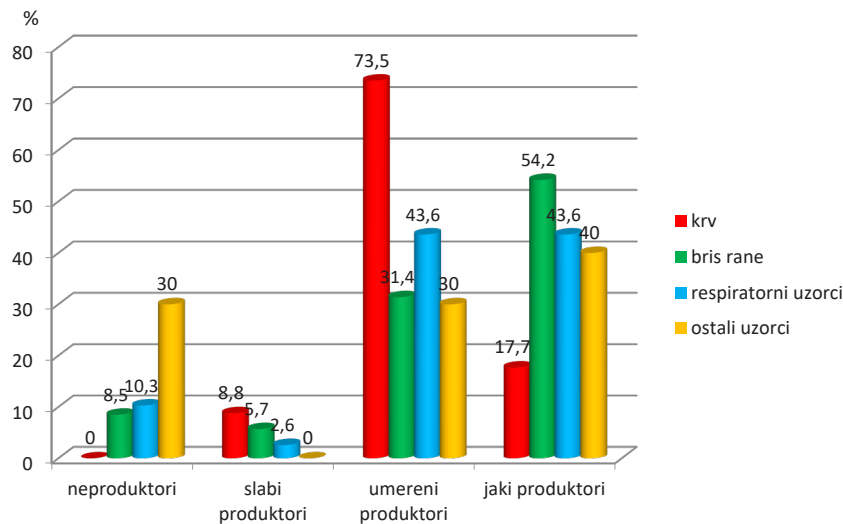
a) Produkcija biofilma nakon 24-časovne inkubacije na temperaturi od 37°C: većina izolata *A. baumannii* je svrstana u kategoriju umerenih i jakih produktora; sojevi izolovani iz briseva rana su bili dominantni u grupi jakih produktora biofilma.

b) Produkcija biofilma nakon 48-časovne inkubacije na temperaturi od 37°C: nakon produžene inkubacije broj sojeva koji su svrstani u kategoriju jakih produktora je značajno smanjen ( $p \leq 0,001$ ), a broj izolata koji su kategorisani kao slabi produktori je značajno povećan ( $p \leq 0,001$ ). N - broj izolata.

## Diskusija

Produkcija biofilma je važan faktor virulencije velikog broja bakterija. Ova osobina se prevashodno povezuje sa infekcijama vezanim za veštačke materijale kao i sa hroničnim infekcijama (16). Mnogobrojnim istraživanjima je dokazano da produkcija biofilma zavisi od bakterijske vrste i faktora sredine (17,18), ali je takođe poznato da ova osobina može biti različita kod pojedinih sojeva iste bakterijske vrste (19).

Tokom 24-časovne inkubacije nije uočena statistički značajna razlika u formiranju biofilma na temperaturi od 26°C i 37°C. Dobijeni rezultati ukazuju na stabilnu produkciju biofilma ispitivanih izolata u odnosu na ambijentalnu temperaturu, bilo da je u pitanju humani organizam (37°C) ili spoljašnja sredina (26°C). Dobijeni rezultat ističe značaj opstanka *A. baumannii* u spoljašnjoj sredini, budući da sobna temperatura ne utiče na smanjenje produkcije biofilma, što direktno doprinosi preživljavanju u bolničkoj sredini. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima



**Grafikon 3.** Razlika u formiranju biofilma 128 sojeva *Acinetobacter baumannii* nakon 24-časovne inkubacije na temperaturi 26°C u odnosu na vrstu uzorka

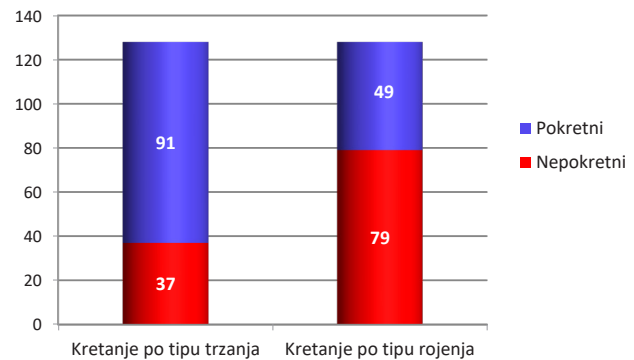
Sojevi *A. baumannii* izolovani iz krvi, briseva rana, respiratornih i drugih uzoraka su prema sposobnosti produkcije biofilma nakon 24-časovne inkubacije na temperaturi od 26°C kategorisani u: neproductore, slabe, umerene i jake productore biofilma; sojevi izolovani iz briseva rana su bili najbolji produktori u navedenim uslovima - 54,2% svrstano u kategoriju jakih produktora.

drugih autora koji su, takođe, dokazali da ambijentalna temperatura ne utiče ni na produkciju biofilma (kolektivni način razmnožavanja) (20), ni na rast i razmnožavanje slobodnoživućih planktonskih sojeva *A. baumannii* (21).

S obzirom na to da biofilm nije stabilna formacija, zanimljivo je bilo ispitivati njegovu produkciju u funkciji vremena. Na osnovu promene produkcije biofilma tokom vremena moglo bi se anticipirati njegovo rasipanje tj. disperzija. Među testiranim izolatima je sa produženjem inkubacionog perioda sa 24h na 48h na temperaturi od 37°C bilo statistički značajno manje sojeva u kategoriji jakih produktora. Zbog velike gustine bakterija unutar biofilma, dolazi do smanjenja hranjivih materija i povećanja trošnosti matriksa, odnosno do rasipanja biofilma. Suprotno tome, nakon prolongirane inkubacije uočeno je povećanje procenta sojeva koji produkuju biofilm u grupi slabih i umerenih produktora. Kako je produkcija biofilma izuzetno kompleksan proces, neophodna su dodatna istraživanja koja bi ispitala regulatorne mehanizme acinetobaktera u produkciji biofilma (22). Najzad, bilo bi interesantno ispitati produkciju biofilma tokom višednevnog vremenskog perioda, tj. tokom 72h i 96h, ne bi li se dobila kompletna slika stabilnosti biofilma u vremenu.

Dobijeni rezultati ukazuju da su sojevi izolovani iz krvi bili najčešći u kategoriji slabih produktora biofilma u sva tri eksperimenta. Takođe, sojevi izolovani iz rana i respiratornih uzoraka su bili značajno bolji produktori od invazivnih sojeva. Dobijeni rezultat je očekivan, budući da je poznato da invazivni sojevi, razmnožavajući se u telesnim tečnostima, u uslovima koji ne dozvoljavaju sesilan način života, nishodno regulišu produkciju biofilma. I zaista, veliki broj autora ukazuju da produkcija biofilma *A. baumannii* zavisi od vrste uzorka iz koje su izolovani, tj. zavisi od vrste infekcije koju bakterija izaziva (23).

*A. baumannii* se tradicionalno tretira kao nepokretna bakterija zbog nedostatka flagela. Međutim, prisustvo pila tipa I i tipa IV joj omogućava kretanja po tipu trzanja



**Grafikon 4.** Pokretljivost 128 sojeva *Acinetobacter baumannii* po tipu trzanja i rojenja

i rojenja. Poznato je da prisustvo pila kod različitih bakterija pospešuje produkciju biofilma, posebno u početnim fazama ovog procesa (24). Ipak, kada je u pitanju *A. baumannii*, rezultati različitih istraživača su oprečni (25,26). U ovom radu nije dokazano da prisustvo pila i sledstvena pokretljivost direktno utiču na produkciju biofilma. Dobijeni rezultati se mogu delom objasniti time što ove netipične vrste pokretljivosti zavise kako od testiranog soja, tako i od hranjive podloge koja se koristi u ispitivanju (10,15). U daljim istraživanjima bi bilo zanimljivo ispitati pomenute tipove pokretljivosti na različitim podlogama i precizno ukazati na uticaj sastava podloga na ove osobine *A. baumannii*.

## Zaključak

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da je produkcija biofilma izolata *A. baumannii* relativno stabilna fenotipska osobina u ispitivanim uslovima, što ukazuje da je sposobnost formiranja biofilma jedan od kritičnih faktora za preživljavanje ove bakterije u intrahospitalnim uslovima.

## Literatura

1. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:939-951.
2. Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:1442-1448.
3. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51:3471-3484.
4. Karakoc C, Tekin R, Yeşilbağ Z, Cagatay A. Risk factors for mortality in patients with nosocomial Gram-negative rod bacteremia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17:951-957.
5. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93.
6. Djeribi R, Boucherit Z, Bouchloukh W et al. A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of *Acinetobacter baumannii*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013; 102:540-545.
7. Costerton JW, Stewart PS. Battling biofilms. *Sci Am* 2001; 285:74-81.
8. Villegas MV, Hartstein A. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:284-295.
9. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003; 149:3473-3484.
10. Eijkelkamp BA, Stroher UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2011; 323:44-51.
11. Subramaniyan A. Profile of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infections among hospitalized patients. *J Med Sci Clin Res* 2017; 5:23111-23115.
12. Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr; 15:155-66.
13. McQueary CN, Actis LA. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol*. 2011; 49:243-50.
14. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40:175-9.
15. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* 2011; 157:2534-2544.
16. Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 2015; 7:1-7.
17. Rosini R, Margarit Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 5:6.
18. Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015; 80:7-12.
19. Fiedler T, Köller T, Kreikemeyer B. *Streptococcus pyogenes* biofilms-formation, biology, and clinical relevance. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5:15.
20. De Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, et al. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS One*. 2010; 5:e10732.
21. Obeidat N, Jawdat F, Al-Bakri AG, Shehabi AA. Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources. *Am J Infect Control* 2014; 42:401-4.
22. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 2014; 37:119-27.
23. Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:47.
24. Vijayakumar S, Rajenderan S, Laishram S, Anandan S, Balaji V, Biswas I. Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Front Public Health* 2016; 4:105.
25. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3:a010306.
26. Chow S, Gu K, Jiang L, Nassour A. Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. *J Exp Microbiol Immunol* 2011; 15:22-29.