PENGARUH KADAR GLUKOSA TERHADAP EKSPRESI PROTEIN AdhO36 BAKTERI *Salmonella* Typhi

Sri Winarsih*✉, Hidayat Sujuti**, Aulia Yasmin*

Abstrak

Demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella* Typhi merupakan salah satu penyakit infeksi terbanyak penyebab rawat inap penderita di Indonesia. Sehingga diperlukan penelitian tentang faktor-faktor yang mempengaruhi patogenesitas dari *S. Typhi* salah satunya adalah kadar glukosa. *S. Typhi* diketahui memiliki molekul adhesin pada bagian *outer membrane protein* (OMP) dengan berat molekul 36 kDa atau disebut juga AdhO36. Molekul adhesin ini berfungsi sebagai perlekatan bakteri pada sel hospes. Pada penelitian ini ingin diketahui pengaruh kadar glukosa terhadap ekspresi protein AdhO36 OMP *S. Typhi*. Perlakuan glukosa diberikan pada lima kelompok bakteri yaitu konsentrasi 40 mg/100mL, 80 mg/100mL, 160 mg/100mL, 240 mg/100mL dan 320 mg/100mL. Hasil elektroforesis OMP pada lima kelompok bakteri tersebut menunjukkan peningkatan ketebalan pita protein, yaitu semakin tinggi kadar glukosa akan semakin tebal protein yang terekspresi. Ketebalan pita protein OMP 36 kDa dibaca menggunakan program Corel Photo Paint 11. Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna (ANOVA, $p = 0,559$), namun secara deskriptif terlihat adanya peningkatan ketebalan protein OMP 36 kDa pada perlakuan konsentrasi glukosa yang makin besar. Kesimpulan penelitian ini adalah peningkatan kadar glukosa cenderung akan meningkatkan ekspresi protein AdhO36 *S. Typhi*.

Kata kunci : AdhO36, Kadar Glukosa, OMP, *Salmonella* Typhi

THE INFLUENCE OF GLUCOSE CONCENTRATION TO AdhO36 *Salmonella* Typhi PROTEIN EXPRESSION

Abstract

Typhoid fever caused by *Salmonella* Typhi is one of the most infectious disease which causes patient hospitalization in Indonesia. It needs some research to determine factors contributed to the pathogenicity of *S. Typhi* and glucose concentration is one of the factors. The outer membrane protein (OMP) of *S. Typhi* with molecular weight of 36 kDa named AdhO36 is known as adhesin molecule. Adhesin has function to adhere the bacteria to host cell. This study aimed is to know the influence of glucose with different concentration to the AdhO36 *S. Typhi* protein expression. There are 5 groups of bacteria that treated with different glucose concentration, 40 mg/100mL, 80 mg/100mL, 160 mg/100mL, 240 mg/100mL, and 320 mg/100mL. The electrophoregram of *S. Typhi* OMP showed that the thickness of AdhO36 protein were in line with glucose concentration, the higher the glucose concentration the thicker the AdhO36 protein band. The electrophoregram was analyzed using Corel Photo Paint 11 and statistical analysis showed that there were no significant differences between groups (ANOVA, $p = 0.559$). However, the thickness of OMP 36 kDa band was increased by increasing glucose concentration, descriptively. The conclusion was glucose concentration tend to increase AdhO36 protein expression.

Keywords: AdhO36, glucose concentration, OMP, *Salmonella* Typhi

* Laboratorium Mikrobiologi, FK UB

** Laboratorium Biokimia, FK UB

*** Program Studi Pendidikan Dokter, FK UB

✉ E-mail: Wiensri238@gmail.com

Pendahuluan

Demam tifoid merupakan suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif *Salmonella Typhi* (*S. Typhi*). Demam tifoid ditularkan melalui kontaminasi makanan dan minuman atau biasa disebut *oral-fecal transmission*.¹ Pada tahun 2000, terdapat 21,7 juta penderita demam tifoid dan 217.000 kematian karena demam tifoid.² Berdasarkan *The Global Burden of Typhoid*, Indonesia termasuk dalam kategori *high incidence* yang apabila diestimasikan terdapat 110 penderita demam tifoid dari 100.000 penduduk setiap tahunnya.³ Demam tifoid dan paratifoid berada pada urutan ke-3 dalam peringkat penyakit yang menyebabkan rawat inap di Indonesia di tahun 2010.⁴

S. Typhi merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki banyak faktor virulensi yang dapat mempengaruhi patogenesis infeksi dari bakteri ini.⁵ Telah diketahui bahwa *S. Typhi* memiliki protein adhesin yang berasal dari OMP dengan berat molekul 36 kDa yang bernama AdhO36. Protein adhesin ini berfungsi untuk melekat pada sel hospes. Setelah terjadi perlekatan dan invasi ke sel hospes, selanjutnya terjadilah infeksi dari bakteri ini. Imunisasi protein AdhO36 secara oral telah terbukti meningkatkan protektivitas dalam menghambat perlekatan *S. Typhi* pada usus mencit. Lebih lanjut dilaporkan bahwa protein AdhO36 bersifat imunogenik yaitu mampu merangsang imunitas humoral baik mukosal maupun sistemik. Protein AdhO36 juga mampu merangsang imunitas seluler.⁶

Diabetes mellitus (DM) adalah sindroma metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah. Kondisi hiperglikemia ini adalah kondisi yang tidak menular dan akan meningkat terus jumlahnya di masa yang akan datang. WHO membuat perkiraan bahwa pada tahun 2025 akan ada 300 juta orang yang menderita

diabetes melitus di seluruh dunia.⁷ Pasien dengan kadar glukosa darah yang tinggi lebih rentan terhadap berbagai macam infeksi. Kadar glukosa yang melebihi 150 mg/dL berkaitan dengan terjadinya pneumonia pada pasien kritis.⁸ Selain itu, kondisi hiperglikemia berkaitan dengan komplikasi setelah operasi kolektomi.⁹ Hiperglikemia juga berhubungan dengan durasi operasi pada pasien post operasi abdomen.¹⁰ Penyebab meningkatnya infeksi pada penderita hiperglikemia adalah melalui terbentuknya biofilm. Massa biofilm dari bakteri akan meningkat seiring dengan meningkatnya kadar glukosa.¹¹ *S. Typhi* adalah salah satu bakteri yang memproduksi biofilm, sehingga virulensi dari *Salmonella* akan meningkat seiring dengan bertambahnya kadar glukosa. Biofilm terbentuk atas berbagai macam struktur, salah satunya adalah OMP. Sebelum terbentuknya biofilm tentunya *Salmonella* harus melekat kepada hospes melalui faktor adhesin.

Oleh karena itu, pada penelitian ini ingin diketahui ekspresi protein AdhO36 sebagai faktor adhesin akibat perubahan kadar glukosa pada media kultur. Protein AdhO36 yang merupakan OMP *S. Typhi* diduga mengalami perubahan ekspresi pada lingkungan dengan kadar glukosa yang berbeda sehingga turut mempengaruhi proses adhesi dan invasi. Ekspresi protein dapat dideteksi dengan melihat ketebalan pita protein hasil elektroforesis SDS-PAGE.

Bahan dan Metode

Desain Penelitian:

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Pengaruh kadar glukosa akan diamati pada lima perlakuan yang diinkubasi dalam medium Luria Bertani Broth. Kadar glukosa masing-masing perlakuan yaitu perlakuan 1

(40 mg/100mL), perlakuan 2 (80 mg/100mL), perlakuan 3 (160 mg/100mL), perlakuan 4 (240 mg/100mL), dan perlakuan 5 (320 mg/100mL).

Sampel Penelitian:

Sampel penelitian yang digunakan adalah bakteri *S. Typhi* isolat 444-D yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur.

Definisi Operasional:

- Bakteri *S. Typhi* diambil dari stock bakteri *S. Typhi* di Laboratorium Mikrobiologi FKUB yang berasal dari darah penderita demam tifoid di RSU dr. Saiful Anwar Malang.
- Protein AdhO36 adalah *outer membrane protein* (OMP) *S. Typhi* dengan berat molekul sekitar 36 kDa pada SDS-PAGE yang diisolasi menggunakan SDS terhadap permukaan bakteri *S. Typhi*.

Hasil

Identifikasi *S. Typhi*:

Sebelum memberi perlakuan glukosa, terlebih dahulu dilakukan identifikasi bakteri *S. Typhi* yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *S. Typhi* yang digunakan berasal dari darah penderita demam tifoid di RSU dr. Saiful Anwar Malang. Identifikasi bakteri dilakukan melalui 4 tahap. Tahap pertama adalah pengecatan Gram yang menunjukkan bakteri berbentuk batang berwarna merah yaitu ciri khas Gram negatif (Gambar 1). Tahap kedua yaitu penanaman pada medium MacConkey yang menunjukkan koloni bulat, tepi tajam, dan permukaan halus, tidak berwarna, dan berdiameter 1-3 mm (Gambar 2). Tahap ketiga yaitu penanaman pada medium *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) yang menunjukkan gambaran khas *S. Typhi* yaitu koloni berwarna hitam (*black jet colony*) karena *S. Typhi* menghasilkan H_2S (Gambar 3). Tahap keempat yaitu test Microbact 12A yang memberikan hasil positif pada lysin, ornitin, glukosa, H_2S , manitol, xylose, dan citrat. Test microbact 12A memberikan hasil negatif pada ONPG, indole, urease, voges-proskauer serta TDA (Gambar 4).

Gambar 1. Morfologi bakteri Gram negatif *S. Typhi* berbentuk batang berwarna merah (1000x).

Gambar 2. Koloni *S. Typhi* pada medium MacConkey berbentuk bulat dan tidak berwarna.

Gambar 3. Koloni bakteri *S. Typhi* pada medium *bismuth sulfite* agar berwarna hitam (*Black Jet Colony*).

MICROBACT™ <small>LABORATOIRES</small> IDENTIFICATION 6173		MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E														<i>4-11-10</i>													
		GNB 24E														GNB 12B													
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P	Citrate	TDA	Gelatin	Maltotrite	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Alginate			
			+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-															
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1			
		5														6													
		0														0													
		Ours / O

Gambar 5. Profil OMP *S. Typhi* setelah diberi perlakuan glukosa. Keterangan: protein marker (PM), 40 mg/100 mL (perlakuan 1), 80 mg/100 mL (perlakuan 2), 160 mg/100 mL (perlakuan 3), 240 mg/100 mL (perlakuan 4), 320 mg/100 mL (perlakuan 5).

Pengaruh Kadar Glukosa terhadap Ekspresi Protein AdhO36:

Hasil elektroforesis yang telah diperoleh kemudian diamati secara visual dan dinilai ketebalannya menggunakan aplikasi Corel Photo-Paint 11, sehingga bisa dikonversikan dalam bentuk angka (Tabel 1).

Angka yang muncul tersebut berupa nilai *means* yaitu perbandingan kontras warna yang diukur dengan warna hitam. Semakin kecil *means* menunjukkan semakin tidak kontras warna yang diukur dengan warna hitam (mendekati hitam) atau semakin tebal pita yang diukur.

Tabel 1. Hasil pengukuran ketebalan pita protein AdhO36 menggunakan Corel Photo Paint 11

Pengulangan	Ketebalan Protein				
	40mg/100mL (P1)	80mg/100mL (P2)	160mg/100mL (P3)	240mg/100mL (P4)	320mg/100mL (P5)
1	186.43	172.95	169.07	172.12	167.84
2	201.77	199.22	200.36	196.29	187.37
3	196.80	192.15	189.99	190.46	188.98
4	184.75	182.10	175.02	174.60	170.39
Rerata $\pm$ (SD)	192.44+ (8.19)	186.60+ (11.49)	183.61+ (14.21)	183.37+ (11.84)	178.65+ (11.07)

Nilai rerata dari angka *means* pada masing-masing pengulangan yang didapat dari pengukuran ketebalan pita protein AdhO36 dengan menggunakan Corel

Photo-Paint 11 dapat ditampilkan dalam bentuk diagram batang seperti terlihat pada Gambar 6.

Gambar 6. Rerata nilai *means* ketebalan pita protein AdhO36 dengan Corel Photo-Paint 11.
Keterangan : Huruf yang sama (a) menunjukkan tidak berbeda secara bermakna

Berdasarkan Gambar 6 diketahui bahwa perlakuan glukosa 320 mg/100mL menunjukkan nilai *means* paling kecil yang berarti memiliki kepekatan warna yang paling besar. Hal ini menunjukkan bahwa pada perlakuan 320 mg/100mL didapatkan protein AdhO36 paling banyak yang diketahui dari pita proteinnya yang paling tebal. Berdasarkan nilai *means* di atas

diketahui pita protein AdhO36 paling tebal terdapat pada perlakuan kadar glukosa 320 mg/100mL, kemudian 240 mg/100mL, 160 mg/100mL, 80 mg/100mL, dan yang paling tipis pada perlakuan 40 mg/100mL.

Berdasarkan uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk pada rerata *means* masing-masing kelompok perlakuan, didapatkan nilai signifikansi ketebalan protein AdhO36 $p > 0,05$, yang berarti data hasil

penelitian terdistribusi normal. Berdasarkan analisis uji *homogeneity of variances* didapatkan taraf signifikansi menunjukkan ketebalan protein AdhO36 *S. Typhi* sebesar 0,442, sehingga disimpulkan $p > 0,05$ yang berarti data hasil penelitian homogen.

Data hasil penelitian terdistribusi normal dan homogen, sehingga dapat dilanjutkan dengan analisis *one-way ANOVA* yang mendapatkan nilai signifikansi sebesar 0,559, sehingga disimpulkan $p > 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan.

Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kadar glukosa terhadap ekspresi protein AdhO36 *S. Typhi*. Setelah dilakukan identifikasi bakteri, dilakukan kultur dengan lima perlakuan yang berbeda kadar glukosanya. Kelompok perlakuan pertama dengan kadar glukosa 40 mg/100mL, perlakuan kedua dengan kadar glukosa 80 mg/100mL, perlakuan ketiga dengan kadar glukosa 160 mg/100mL, kelompok perlakuan keempat dengan kadar glukosa 240 mg/100mL dan kelompok perlakuan kelima dengan kadar glukosa 320 mg/100mL. Masing-masing perlakuan dikultur pada media kultur Luria Bertani Broth yang diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 2x24 jam.

Dalam penelitian ini dilakukan perbandingan ketebalan pita protein AdhO36 pada masing-masing kelompok perlakuan setelah proses pemisahan protein dengan metode SDS-PAGE. Secara kasat mata, tampak bahwa ketebalan pita protein makin meningkat sebanding dengan bertambahnya kadar glukosa. Pada Tabel 1 diketahui bahwa nilai rerata *means* ketebalan protein berkurang sebanding dengan peningkatan kadar glukosa, yang artinya ketebalan protein AdhO36 meningkat sebanding

dengan peningkatan kadar glukosa. Namun demikian, secara statistik tidak berbeda secara signifikan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena banyaknya factor yang mempengaruhi ekspresi protein AdhO36 seperti pH medium, osmolaritas, dan glikasi protein.

Perbedaan kadar glukosa media kultur pada penelitian ini mengacu pada kadar glukosa darah manusia. Berdasarkan Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia yang disusun oleh Perhimpunan Endokrinologi Indonesia, kadar glukosa darah normal puasa adalah kurang dari 100mg/dL. Pada keadaan puasa, kadar GDPT (Glukosa Darah Puasa Terganggu) adalah 100-125 mg/dL. Diagnosis Diabetes Melitus ditegakkan bila kadar gula darah puasa ≥ 126 mg/dL dengan gejala klasik DM. Pada pemeriksaan glukosa darah TTGO (Tes Toleransi Glukosa Oral) dengan cara mengukur kadar glukosa darah 2 jam setelah pemberian 75 gram glukosa, kadar TGT (Toleransi Glukosa Terganggu) adalah 140–199 mg/dL. Sedangkan diagnosis Diabetes Melitus pada TTGO adalah ≥ 200 mg/dL. Kadar hipoglikemia atau glukosa darah rendah ditandai dengan menurunnya kadar glukosa darah < 60 mg/dL. Salah satu komplikasi diabetes mellitus adalah ketoasidosis diabetik yang salah satunya ditandai dengan peningkatan glukosa darah ≥ 300 mg/dL. Berdasarkan uraian di atas, dipilih kadar glukosa media kultur yaitu 40 mg/100mL, 80 mg/100mL, 160 mg/100mL, 240 mg/100mL dan 320 mg/100mL yang mewakili keadaan hipoglikemia, keadaan normal glukosa darah, keadaan TGT, keadaan diabetes melitus dan juga keadaan ketoasidosis diabetik mulai muncul. Hal ini untuk mengetahui pengaruh kadar glukosa pada manusia dan pengaruhnya terhadap ekspresi protein AdhO36.

Pada lingkungan dengan keadaan glukosa yang tinggi, perlekatan dari Enterobacteriaceae *Eschericia coli* terhadap epitel mengalami peningkatan 5 kali lipat dibanding dengan kadar glukosa normal. Kemampuan *clearance* bakteri juga mengalami penurunan pada tikus dengan diabetes melitus. Kedua hal tersebut berkontribusi pada patogenesis dan perpanjangan waktu infeksi. Bakteri *S. Typhi* termasuk dalam Enterobacteriaceae sehingga peningkatan ekspresi AdhO36 sebagai salah satu faktor adhesin bakteri dapat dihubungkan dengan peningkatan kadar glukosa lingkungan.¹²

Keadaan hiperglikemia dapat meningkatkan *endothelial permeability* dan mengubah struktur membran basalis epitel pada bakteri Gram negatif *Helicobacter pylori*. Peningkatan adhesi dari *Helicobacter pylori* terhadap epitel secara signifikan meningkat pada kadar glukosa 200 mg/dL jika dibandingkan dengan kadar glukosa 100 mg/dL dan 150 mg/dL. Pertumbuhan bakteri ini juga meningkat pada kadar glukosa yang lebih tinggi. *S. Typhi* termasuk bakteri Gram negatif sehingga hal ini bisa diasosiasikan dengan peningkatan ketebalan protein AdhO36 sebagai faktor adhesi.¹³

Dalam penelitian ini ekspresi protein AdhO36 diasumsikan juga dipengaruhi oleh glikasi protein. Protein mampu membentuk ikatan kovalen dengan glukosa tanpa bantuan enzim yang disebut dengan glikasi. Pada kadar glukosa yang makin tinggi dapat terjadi glikasi protein sehingga ketebalan di posisi 36 kDa menjadi tidak jelas atau justru pindah pada posisi sekitar 74 kDa. Pada Gambar 5 tampak ketebalan protein di sekitar molekul 74 kDa yang menunjukkan respons terhadap perubahan kadar glukosa.

Kekurangan pada penelitian ini yaitu tidak bisa menggunakan jumlah bakteri yang sangat akurat pada setiap

perlakuannya, sehingga dapat mempengaruhi ekspresi protein AdhO36. Apabila semakin banyak jumlah bakteri maka protein AdhO36 yang terekspresi juga meningkat. Pada penelitian ini hanya digunakan satu isolat *S. Typhi*, sehingga belum diketahui apakah isolat *S. Typhi* yang lain juga merespons terhadap perubahan kadar glukosa. Kekurangan lain pada penelitian ini adalah digunakannya pewarna yang kurang sensitif yaitu *coomassie blue*.

Pada Gambar 6 ditunjukkan ekspresi protein AdhO36 terhadap kadar glukosa. Meskipun secara statistik tidak bermakna namun secara visual ada kecenderungan peningkatan ketebalan protein AdhO36. Tidak hanya protein AdhO36, namun OMP secara keseluruhan tampak lebih tebal seiring dengan meningkatnya kadar glukosa seperti tampak pada elektroforegram pada Gambar 5. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan faktor virulensi dari bakteri *S. Typhi* melalui peningkatan faktor adhesi. Jadi, bakteri akan melekat lebih kuat pada usus penderita dan lebih mudah melakukan invasi. Setelah terjadinya invasi tentunya akan terjadi infeksi dari bakteri *S. Typhi*.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian mengenai pengaruh kadar glukosa terhadap ekspresi protein AdhO36 bakteri *S. Typhi*, dapat disimpulkan bahwa peningkatan kadar glukosa cenderung meningkatkan ekspresi protein AdhO36 bakteri *S. Typhi*.

Saran

Adapun saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu mengakuratkan jumlah bakteri secara lebih tepat dan menggunakan lebih dari satu isolat *S. Typhi*. Pada pewarnaan SDS-PAGE dapat menggunakan pewarna yang lebih sensitif

seperti *silver staining*. Dapat dilakukan uji adhesi protein AdhO36 yang diinkubasikan pada kadar glukosa yang berbeda pada enterosit mencit. Untuk pengembangan vaksin berbasis protein adhesin, hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai pertimbangan bahwa peningkatan kadar glukosa bersifat menaikkan ekspresi protein AdhO36, sehingga pemberian vaksin per oral sebaiknya mempertimbangkan kadar glukosa pasien.

Daftar Pustaka

1. Nelwan HR. Tata Laksana Terkini Demam Tifoid. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2012; 39(4):247 – 250.
2. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The Global Burden of Typhoid Fever. *Bulletin of the World Health Organization*. 2004; 82(5):346-353.
3. (WHO) World Health Organization. Background Document: The Diagnosis, Treatment, and Prevention of Typhoid Fever. (Online). 2003. www.who.int/vaccines-documents/. Diakses 11 Desember 2013.
4. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Profil Data Kesehatan Indonesia Tahun 2011. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2012.
5. Dzen SM, Roeskitiningsih, Santoso S, Winarsih S. Bakteriologi Medik. Surabaya: Penerbit Putra Media Nusantara. 2010. Hlm 225 – 237.
6. Winarsih S. Imunitas Seluler dan Protektivitas *in vivo* Protein AdhO36 *Salmonella Typhi*. Disertasi. Malang: Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. 2005.
7. Suyono S. Diabetes Mellitus di Indonesia. Di dalam: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S (Editor). Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Interna Publishing. 2009.
8. Kraft R, Hemdon DN, Mlcak RP, Finnerty CC, Cox RA, Williams FN, Jeschke MG. Bacterial Respiratory Tract Infections are Promoted by Systemic Hyperglycemia after Severe Burn Injuries in Pediatric Patients. *Burns*. 2014; 40(3):428-435. doi:10.1016/j.burns.2013.07.007.
9. Jackson RS, Amdur RL, White JC, Macsata RA. Hyperglycemia is Associated with Increase Risk of Morbidity and Mortality after Colectomy for Cancer. *J Am Coll Surg*. 2012;214(1):68-80. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2011.09.016 .Epub
10. Wu Y et al. Hyperglycemia and Its Association with Clinical Outcomes in the Pediatric Intensive Care Unit after Abdominal Surgery. *J Pediatr Surg*. 2013; 48(4):801-805.
11. Waldrop R, McLaren A, Calara F, McLemore R. Biofilm Growth has a Threshold Response to Glucose in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2014; 472(11):3305-10. doi: 10.1007/s11999-014-3538-5.
12. Ozer A. Increased Bacterial Adherence and Decreased Bacterial Clearance in Urinary Tract Infections with Diabetes Mellitus. Ohio: Case Western Reserve University. 2013.