

## ویژگی‌های سیستم ترشحی نوع ۳ در نمونه‌های سودوموناس آنروزینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس

رباب آذرگون<sup>۱</sup>، فرحنوش دوستدار<sup>۱</sup>، قمرتاج خانبابایی<sup>۲</sup>، مونا قاضی<sup>۱</sup>، فرامرز مهرنژاد<sup>۳</sup>، حسین گودرزی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرم‌سیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۲</sup> متخصص ریه اطفال، بیمارستان مفید کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۳</sup> گروه علوم مهندسی زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

### چکیده

سابقه و هدف: مطالعات کمی در مورد فاکتورهای ویرولانس باکتری در شرایط و بیماری‌های مزممی مثل سیستیک فیبروزیس انجام شده است. بنابراین خلط بیماران مبتلا سیستیک فیبروزیس که از مهر ماه ۱۳۹۰ تا مهرماه ۱۳۹۱ به بیمارستان مفید مراجعه کرده بودند در رابطه با تعیین ژن‌های مرتبط با سیستم ترشحی نوع ۳ (*exoU exoS exoT*) مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی: در این تحقیق توصیفی، بر روی سودوموناس آنروزینوزا ۵۱ نمونه تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. همچنین برای تعیین توزیع ژن‌های کد کننده توکسین *ExoU ExoS* و *ExoT* در نمونه‌ها از تکنیک PCR استفاده شد.

یافته‌ها: از ۵۱ نمونه سودوموناس آنروزینوزا، ۶۶/۷٪ مقاوم به تری متوفیریم، ۳۷/۲٪ مقاوم به جنتامایسین، ۲۱/۵٪ مقاوم به امیکاسین و سفپیم، ۱۹/۶٪ مقاوم به توبرامایسین، ۱۵/۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۳/۷٪ مقاوم به ایمپینم و ۹/۸٪ مقاوم به سفتازیدیم بودند. نتایج PCR نشان داد که ۹۰/۲ درصد حاوی ژن *exoT* و ۲۵/۵ درصد حاوی ژن *exoS* بودند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، مقاومت همزمان بر علیه آنتی بیوتیک‌های گروه آمینوگلیکوژیدها (جنتامایسین)، فلوروکوئینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) و سفالوسپرین‌های وسیع الطیف (سفپیم یا سفتازیدیم) در ۱۳/۷٪ نشانه شروع ظهرور مقاومت به چند دارو در این نمونه‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، احتمالاً نمونه‌های حاوی ژن *exoS* در مقایسه با نمونه‌های حاوی ژن *exoU* برای بقا در محاری تنفسی بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مناسب‌تر هستند.

**واژگان کلیدی:** سودوموناس آنروزینوزا، سیستیک فیبروزیس، فاکتورهای ویرولانس، سیستم ترشحی نوع ۳.

### مقدمه

در افراد با نقص ایمنی است (۱). در صورت درمان سریع احتمال بهبودی عفونت‌های سودوموناس آنروزینوزا وجود دارد، ولی هیچ آنتی بیوتیکی قادر به ریشه کنی عفونت‌های مزمم سودوموناس آنروزینوزا نمی‌باشد (۲). سیستیک فیبروزیس ریه و همچنین پانکراس، کبد و روده را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳). سیستیک فیبروزیس با موتاسیون در ژن تنظیمی انتقال دهنده غشایی

سودوموناس آنروزینوزا پاتوژن فرصت طلب انسانی است که عامل عفونت‌های خطناک خونی، ریوی، زخم و سوختگی به خصوص

آدرس نویسنده مسنون: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، حسین گودرزی (e-mail: h\_god100@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۱  
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۷/۳۰

## ویژگی های سیستم ترشحی نوع ۳ در سودوموناس اثروژینوزا

با تعیین ژن های مرتبط با سیستم ترشحی نوع ۳ (exoT, exoU, exoS) مورد بررسی قرار گرفتند. سویه استاندارد ATCC27853 سودوموناس اثروژینوزا به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

نمونه های جمع آوری شده در محیط های کشت آگار خون دار و مک کانگی آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلنی های مشکوک با استفاده از تست های تشخیصی و بیوشیمیایی مورد تائید قرار گرفتند. سوش ها در دمای ۷۰-۷۰ درجه سانتی گراد در محیط حاوی ۳٪ گلیسروول ذخیره گردیدند.

تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن (Kirby – Baur) بر اساس استانداردهای CLSI انجام شد. دیسک های آنتی-بیوتیکی (MAST) که مورد استفاده قرار گرفتند شامل: توبرامایسین  $\mu\text{g}$  ۱۰، جنتا مایسین  $\mu\text{g}$  ۱۰، آمیکاسین  $\mu\text{g}$  ۳۰، سفتازیدیم  $\mu\text{g}$  ۳۰، سفپیم  $\mu\text{g}$  ۳۰، مروپن  $\mu\text{g}$  ۱۰، ایمیپن  $\mu\text{g}$  ۱۰، سپروفلوکسازین  $\mu\text{g}$  ۵، تریمت-پریم  $\mu\text{g}$  ۵ و پیپراسیلین-تازو باکتام  $\mu\text{g}$  ۱۰ بودند.

به منظور استخراج DNA جهت انجام PCR از روش فنل کلروفوم استفاده شد. آزمون PCR جهت بررسی ژن های exoS, exoU, exoT با استفاده از پرایمر ها و دماهای ذکر شده در جدول ۱ انجام شد (۱۲).

ترکیبات و مواد استفاده شده در این واکنش به شرح زیر بود: پرایمر با غلظت ۳۰ پیکومول، بافر  $\times 10$ ,  $1/5 \text{ mgcl}_2$  میلی-مول، آنزیم Taq DNA Polymerase ۱ واحد،  $200 \text{ dNTP}$  میلی مول. در نهایت محصولات هر ژن توسط ژل اکارز  $1/5$  درصد مشاهده شد.

## یافته ها

تحقیق بر روی ۵۱ بیمار انجام شد. سن بیماران از ۴ ماهگی تا ۱۷ سالگی متغیر بود و همچنین ۵۳٪ بیماران مذکر و ۴۷٪ مونث بودند. ۳۴ نمونه (۶۶٪) مقاوم به تری متیوپریم، ۱۹ نمونه (۳۷٪) مقاوم به جنتامایسین، ۱۱ نمونه (۲۱٪) مقاوم به امیکاسین و سفپیم، ۱۰ نمونه (۱۹٪) مقاوم به توبرامایسین، ۸ نمونه (۱۵٪) مقاوم به سپروفلوکسازین، ۷ نمونه (۱۳٪) مقاوم به ایمیپن، ۵ نمونه (۹٪) مقاوم به سفتازیدیم، ۳ نمونه (۵٪) مقاوم به مروپن و ۰ نمونه (۰٪) مقاوم به پیپراسیلین-تازو باکتام بودند.

مقاومت هم زمان بر علیه آنتی بیوتیک ها از گروه آمینو گلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلئورو کوئینولون ها

سیستیک فیبروزیس (CFTR) (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) می شود و در نهایت منجر به نقص تنفسی و مرگ می گردد (۵). سودوموناس اثروژینوزا برای ایجاد عفونت از فاکتور های ویرولانس داخلی و خارجی زیادی استفاده می کند که شامل پیوسیانین، لیپاز، پروتازها، فسفولیپاز و رامنولیپید می باشد. در بیماران دارای نقص ایمنی و مبتلا به سیستیک فیبروزیس سیستم ترشحی نوع ۳ در شروع عفونت دیده می شود (۶). سیستم ترشحی نوع ۳ یکی از مهم ترین سیستم های ترشحی در باکتری ها می باشد که فاکتور های ویرولانس را به درون سلول می بارند (۷).

سه سم موثر در بیماری زایی در سودوموناس اثروژینوزا که مورد شناسایی قرار گرفته است شامل توکسین های ExoT, ExoS و ExoU می باشد که توسط سیستم ترشحی نوع ۳ به درون سلول می بارند (۸). توکسین های ExoT و ExoS توکسین های دو عملکردی هستند که هم فعالیت فعل کنندگی GAP (GTPase) و هم فعالیت ADP Ribozيل ترانس فراز (ADPR) دارد (۹). فعالیت های GAP و ADPRT باعث تحریب اکتین اسکلت سلولی و مرگ سلولی می گردد (۱۰, ۹). فعالیت فسفولیپازی دارد که موجب لیز سلول های یوکاریوتی می شود (۱۱).

برخلاف مطالعات زیادی که بر روی فاکتور های ویرولانس باکتری در شرایط و بیماری های حاد صورت گرفته، مطالعات کمتری در مورد فاکتور های ویرولانس باکتری در شرایط و بیماری های مزممی مثل سیستیک فیبروزیس انجام گرفته است. بنابراین با توجه به اهمیت باکتری سودوموناس اثروژینوزا در عفونت های ریوی و سیستیک فیبروزیس شناسایی هرچه بیشتر فاکتور های ویرولانس مرتبط با این بیماری ها در هر جامعه کلینیکی خاص می تواند به توسعه راه های مناسب برای کنترل عفونت های ناشی از آن کمک نماید. برای کنترل بهتر عفونت های ریوی ناشی از سودوموناس اثروژینوزا، در این تحقیق هدف این است که خصوصیات ژن های سیستم ترشحی نوع ۳ سودوموناس اثروژینوزای مرتبط با عفونت های ریوی بیماران سیستیک فیبروزیس در نمونه های ایرانی مراجعه کننده به بیمارستان مفید طی سال های ۹۱-۱۳۹۰ مورد مطالعه قرار گیرند.

## مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی، ۵۱ نمونه سودوموناس اثروژینوزای جدا شده از خلط بیماران مبتلا سیستیک فیبروزیس در رابطه

جدول ۱. توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده برای واکنش PCR

پرایمر	توالی پرایمر	واسرثت شدن	اتصال	طویل شدن	سیکل	ژن
exoS	GCG AGG TCA GCA GAG TAT CG TTC GGC GTC ACT GTG GAT GC				bp ۱۱۸	
exoS	AAT CGC CGT CCA ACT GCA TGC G TGT TCG CCG AGG TAC TGC TC				bp ۱۵۲	
exoT	CCG TTG TGG TGC CGT TGA AG CCA GAT GTT CAC CGA CTC GC	C°۷۲	۵۵C°	C°۹۴	bp ۱۳۴ ۳۶	۱ دقیقه ۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه

سیستیک فیبروزیس نشان می‌دهد. بسیاری از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس علیه توکسین‌های مترشحه از سیستم ترشحی نوع ۳ آنتی بادی تولید می‌کنند که نشان دهنده وجود این توکسین‌ها در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزای موجود در این بیماران می‌باشد (۱۴).

این تحقیق نشان داد که اکثر نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، حاوی ژن‌های کد کننده توکسین‌های مترشحه از سیستم ترشحی نوع ۳ بودند. بدین ترتیب که فراوانی ژن‌های ExoT و ExoU در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۷۸/۴، ۹۰/۲ و ۲۵/۵ درصد بود.

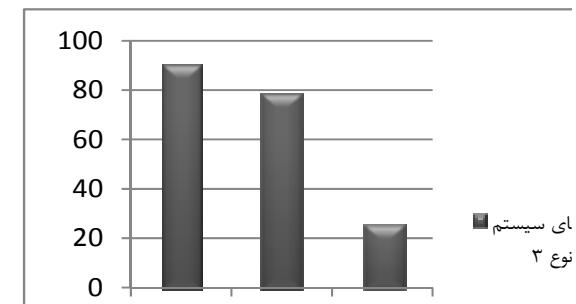
در مطالعات مختلف، فلتمن و همکارانش در سال ۲۰۰۱، میگان و همکارانش در سال ۲۰۰۲، تینگکچ و همکارانش در سال ۲۰۰۷، دیوید و همکارانش در سال ۲۰۰۷ و هارمر و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس میزان ژن‌های exoS و exoT بیشتر و میزان ژن exoU کمتر می‌باشد که با مطالعه ما سازگار است (۱۵-۱۹).

ترشح توکسین‌های ExoS و ExoU منجر به مرگ سلول میزبان، تخریب بافت و در نتیجه افزایش پاسخ التهابی می‌شود. چنین اثری منجر به تشدید بیماری در بیماران با عفونت‌های حاد مثل ذات‌الریه اکتسابی بیمارستانی می‌شود، اما در نهایت می‌تواند منجر به پاکسازی ارگانیسم شود و در نتیجه مانع پایداری طولانی مدت باکتری در مسیرهای هوایی بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس می‌گردد. بنابراین کاهش بیان این فاکتورهای ویروننس یک روش کلی است که نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا برای پایداری طولانی مدت در محیط ریوی استفاده می‌کنند. جالب توجه اینکه نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای سیستم ترشحی نوع ۳ که از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس جدا شده اند نسبت به

(سیپروفلوکساسین) و سفالوسپورین‌های وسیع الطيف (سفپیم) یا سفتازیدیم در ۱۳/۷٪ از نمونه‌ها مشاهده شد (جدول ۲). نتایج PCR مربوط به ویژگیهای سیستم ترشحی نوع ۳ در نمودار ۱ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که از ۵۱ نمونه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس ۴۶، ۹۰/۲ درصد حاوی ژن exoT، ۴۰ نمونه یا ۷۸/۴ درصد حاوی ژن exoS و ۱۳ نمونه یا ۲۵/۵ درصد حاوی ژن exoU بودند.

جدول ۲. فراوانی نمونه‌های مقاوم به چند آنتی بیوتیک

مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها
۱ فقط مقاوم به جنتامایسین
۲ مقاوم به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین
۳ فقط مقاوم به سیپروفلوکساسین
۴ مقاوم به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم
۵ مقاوم به جنتامایسین و سفتازیدیم



نمودار ۱. توزیع ۵۱ بیمار مبتلا به سیستیک فیبروزیس بر حسب توکسین‌های سیستم ترشحی نوع ۳

## بحث

با وجود آنکه سیستم ترشحی نوع ۳ سودوموناس آئروژینوزا نقش اصلی را در عفونت‌های حاد بازی می‌کند. شواهدی وجود دارد که نقش این سیستم را در عفونت‌های مزمن مثل

ایمپینم٪۸۶/۲، سفپیم و آمیکاسین٪۷۸/۴٪، جنتامایسین٪۶۲/۷، توبرامایسین٪۸۰/۳ و تریمتوپریم٪۳۳/۳٪. در مطالعه‌ای که دکتر افتخار و همکارانش در ایران در سال ۲۰۰۳ روی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس انجام دادند میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها به قرار زیر بود: ایمپینم٪۱۰۰٪، سیپروفلوکسازین٪۹۰/۵٪، سفتازیدیم و توبرامایسین٪۸۵/۷٪، آمیکاسین و پیپراسیلین-تازوباتکام٪۸۱٪ و جنتامایسین٪۶۲٪. همان طور که مشاهده می‌شود در مورد اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر نزدیک به هم می‌باشد.

از طرف دیگر مصرف طولانی و مکرر آنتی‌بیوتیک در درمان این بیماران احتمال ایجاد مقاومت هم‌زمان نسبت به چند آنتی‌بیوتیک را در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا افزایش ۲۰۰۵ می‌دهد. در مطالعه‌ای که اگاروال و همکارانش در سال در هند روی بیماران سیستیک فیبروزیس انجام دادند،٪۴۱٪ ایزوکله‌ها مقاومت هم‌زمان به چند آنتی‌بیوتیک مهم در درمان این بیماران از جمله جنتامایسین، سیپروفلوکسازین، پیپراسیلین و سفتازیدیم را نشان دادند (۱۳). در مطالعه حاضر نیز مقاومت هم‌زمان برعلیه آنتی‌بیوتیک‌ها از گروه آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلؤوروکوئینولون‌ها (سیپروفلوکسازین) و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (سفپیم یا سفتازیدیم) در٪۱۳/٪ از نمونه‌ها مشاهده شد. در مطالعاتی که در سال‌های اخیر در مورد آنتی‌بیوتیک‌های استنشاقی صورت گرفته است، محلول استنشاقی توبرامایسین و سیپروفلوکسازین در کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت مزمن سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس موثر بوده است. ولی با وجود مفید بودن این آنتی‌بیوتیک‌ها با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نگرانی‌های وجود دارد (۱۷-۱۹). در مطالعه حاضر مقاومت به توبرامایسین به میزان٪۱۹/۶٪ و به سیپروفلوکسازین٪۱۵/۶٪ مشاهده شد که نشان دهنده شروع ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

## REFERENCES

- Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:528-37.
- Langton Hewer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 7:CD004197.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-73.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073-80.

نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران با عفونت‌های حاد سمهای متفاوتی تولید می‌کنند. اگرچه درصد بالایی از نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای سیستم ترشحی نوع ۳ که از بیماران با عفونت حاد مثل ذات‌الریه اکتسابی بیمارستانی جدا شده‌اند توکسین ExoU ترشح می‌کنند، درصد بسیار کمتری از این نمونه‌ها که از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس جدا شده‌اند این توکسین را ترشح می‌کنند. در بین نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای دارای سیستم ترشحی نوع ۳ ترشح توکسین ExoU معمولاً با ترشح توکسین ExoS رابطه معکوس دارد. این نتایج با گزارش‌های قبلی که بیان می‌داشت که نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای حاوی ژن exoU در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس در مقایسه با نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای حاوی این ژن در بیماران با پنومونی حاد بسیار کمتر است، سازگار است. همچنین نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای حاوی ژن exoS در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس بسیار بیشتر است. در مطالعه ما نیز فراوانی ژن exoS به میزان٪۷۵ در مقایسه با فراوانی ژن exoU به میزان٪۲۵ در تعداد بیشتری از بیماران مورد شناسایی قرار گرفت (۱۵، ۲۰). تفسیری که می‌شود برای این مشاهدات ارائه داد این است که نمونه‌های حاوی ژن exoS در مقایسه با نمونه‌های حاوی ژن exoU برای بقا در محاری تنفسی بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مناسب‌تر هستند.

بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس به محض آلوگی اولیه با سودوموناس آئروژینوزا باید سریعاً درمان شوند، و گرنه عفونت مزمن می‌شود که در این صورت ریشه کنی سودوموناس آئروژینوزا مشکل می‌باشد. یکی از یافته‌های مهم این تحقیق تعیین میزان حساسیت باکتری‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک‌ها بود که نشان داد بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین-تازوباتکام٪۱۰۰٪، مروپین٪۹۴/۱٪ و سفتازیدیم٪۹۰/۲٪ بود و درصد حساسیت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بدین ترتیب بود: سیپروفلوکسازین٪۸۴/۳٪.

5. Wilson R, Dowling RB. Lung infections. 3. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* 1998; 53:213-9.
6. Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:8101-6.
7. Yahr TL, Goranson J, Frank DW. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* 1996; 22:991-1003.
8. Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *J Immunol* 2012; 188:1884-95.
9. Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004;152:79-92.
10. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:654-65.
11. Cystic Fibrosis Foundation: Patient Registry 1998 annual data repot. Bethesda MD: Cystic fibrosis Foundation; 1999.
12. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *J Clin Microbiol* 2003;41:3526-31.
13. Agarwal G, Kapil A, Kabra SK, Das BK, Dwivedi SN. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India. *BMC Microbiol* 2005;5:43.
14. Moss J, Ehrmantraut ME, Banwart BD, Frank DW, Barbieri JT. Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. *Infect Immun* 2001;69:1185-8.
15. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2001;147:2659-69.
16. Stevens MJ, Ferguson M. Biology Do, University CC. Analysis of the exoS, exoT, and exoU genes in *P. aeruginosa* cystic fibrosis isolates. 2002.
17. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Al Nassafi K, et al. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:1697-704.
18. Wareham DW, Curtis MA. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. *Int J Med Microbiol* 2007; 297:227-34.
19. Hu H, Harmer C, Anuj S, Wainwright CE, Manos J, Cheney J, et al. Type 3 secretion system effector genotype and secretion phenotype of longitudinally collected *Pseudomonas aeruginosa* isolates from young children diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 266-272.
20. Jain M, Ramirez D, Seshadri R, Cullina JF, Powers CA, Schulert GS, et al. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5229-37.