

ویژگی‌های سیستم ترشحاتی نوع ۳ در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس

رباب آذرگون^۱، فرحناوش دوستدار^۱، قمر تاج خانبابایی^۲، مونا قاضی^۱، فرامرز مهرنژاد^۳، حسین گودرزی^۱

^۱ مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

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

^۲ متخصص ریه اطفال، بیمارستان مفید کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۳ گروه علوم مهندسی زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

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

روش بررسی: در این تحقیق توصیفی، بر روی سودوموناس آئروژینوزا ۵۱ بیمار 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 آئروژینوزا، ۶۶/۷٪ مقاوم به تری متوپریم، ۳۷/۲٪ مقاوم به جنتامایسین، ۲۱/۵٪ مقاوم به امیکاسین و سفپیم، ۱۹/۶٪ مقاوم به توپرامایسین، ۱۵/۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۳/۷٪ مقاوم به ایمپنم و ۹/۸٪ مقاوم به سفنازیدیم بودند. نتایج PCR نشان داد که ۹۰/۲ درصد حاوی ژن *exoT*، ۷۸/۴ درصد حاوی ژن *exoS* و ۲۵/۵ درصد حاوی ژن *exoU* بودند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، مقاومت هم‌زمان بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های گروه آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلونئوروکوئینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف (سفپیم یا سفنازیدیم) در ۱۳/۷٪ نشانه شروع ظهور 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 مجاری تنفسی بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس مناسب‌تر هستند.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، سیستمیک فیبروزیس، فاکتورهای ویروالانس، سیستم ترشحاتی نوع ۳.

مقدمه

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

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

آدرس نویسنده مسئول: 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

سیستیک فیبروزیس (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) ایجاد می شود (۴). سودوموناس اتروژینوزا به طور مزمن در ریه افراد مبتلا سیستیک فیبروزیس کلونیزه می شود و در نهایت منجر به نقص تنفسی و مرگ می گردد (۵). سودوموناس اتروژینوزا برای ایجاد عفونت از فاکتورهای ویروالاس داخلی و خارجی زیادی استفاده می کند که شامل پیوسیانین، لیپاز، پروتئازها، 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 فاکتورهای ویروالاس را به درون سلول میزبان وارد می کند (۷). سه سم موثر در بیماری زایی در سودوموناس اتروژینوزا که مورد شناسایی قرار گرفته است شامل توکسین های ExoT, ExoS و ExoU می باشد که توسط سیستم ترشحی نوع ۳ به درون سلول میزبان ترشح می گردد (۸). توکسین های ExoS و ExoT توکسین های دو عملکردی هستند که هم فعالیت فعال کنندگی GTPase (GAP) و هم فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفراز (ADPRT) دارد (۹). فعالیت های GAP و ADPRT باعث تخریب اکترین اسکلت سلولی و مرگ سلولی می گردند (۹، ۱۰). ExoU فعالیت فسفولیپازی دارد که موجب لیز سلول های یوکاریوتی می شود (۱۱).

برخلاف مطالعات زیادی که بر روی فاکتورهای ویروالاس باکتری در شرایط و بیماری های حاد صورت گرفته، مطالعات کمتری در مورد فاکتورهای ویروالاس باکتری در شرایط و بیماری های مزمنی مثل سیستیک فیبروزیس انجام گرفته است.

بنابراین با توجه به اهمیت باکتری سودوموناس اتروژینوزا در عفونت های ریوی و سیستیک فیبروزیس شناسایی هرچه بیشتر فاکتورهای ویروالاس مرتبط با این بیماری ها در هر جامعه کلینیکی خاص می تواند به توسعه راه های مناسب تر برای کنترل عفونت های ناشی از آن کمک نماید. برای کنترل بهتر عفونت های ریوی ناشی از سودوموناس اتروژینوزا، در این تحقیق هدف این است که خصوصیات ژن های سیستم ترشحی نوع ۳ سودوموناس اتروژینوزای 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 اتروژینوزای جدا شده از خلط بیماران مبتلا سیستیک فیبروزیس در رابطه

با تعیین ژن های مرتبط با سیستم ترشحی نوع ۳ (exoT)، (exoU، exoS) مورد بررسی قرار گرفتند. سویه استاندارد ATCC27853 سودوموناس اتروژینوزا 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 تأیید قرار گرفتند. سوش ها در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد در محیط TSB حاوی ۳۰٪ گلیسرول 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: توپرامایسین ۱۰ μg، جنتامایسین ۱۰ μg، آمیکاسین ۳۰ μg، سفتازیدیم ۳۰ μg، سفپیم ۳۰ μg، مروپنم ۱۰ μg، ایمپنم ۱۰ μg، سیپروفلوکساسین ۵ μg، تریمتوپریم ۵ μg و پیپراسیلین-تازوباکتام ۱۰ μg بودند.

به منظور استخراج DNA جهت انجام PCR از روش فنل کلرفورم 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 ۱۰x، ۱/۵ mgcl2 میلی-مول، آنزیم DNA Polymerase Taq ۱ واحد، ۲۰۰ dNTP میلی مول. در نهایت محصولات هر ژن توسط ژل آگارز ۱/۵ 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 (۶۶/۷٪) مقاوم به تری متوپریم، ۱۹ نمونه (۳۷/۲٪) مقاوم به جنتامایسین، ۱۱ نمونه (۲۱/۵٪) مقاوم به امیکاسین و سفپیم، ۱۰ نمونه (۱۹/۶٪) مقاوم به توپرامایسین، ۸ نمونه (۱۵/۶٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۷ نمونه (۱۳/۷٪) مقاوم به ایمپنم، ۵ نمونه (۹/۸٪) مقاوم به سفتازیدیم، ۳ نمونه (۵/۸٪) مقاوم به مروپنم و ۰ نمونه (۰٪) مقاوم به پیپراسیلین-تازوباکتام بودند.

مقاومت هم زمان بر علیه آنتی بیوتیک ها از گروه آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلوروکوئینولون ها

جدول ۱. توالی پرایمر ها و دماهای مورد استفاده برای واکنش PCR

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

سیستیک فیبروزیس نشان می‌دهد. بسیاری از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس علیه توکسین‌های مترشحه از سیستم ترشچی 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 ترشچی نوع ۳ بودند. بدین ترتیب که فراوانی ژن‌های ExoT، ExoS و ExoU در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۹۰/۲، ۷۸/۴ و ۲۵/۵ درصد بود.

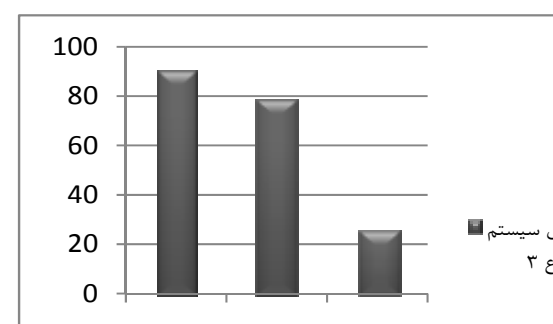
در مطالعات مختلف، فلتمن و همکارانش در سال ۲۰۰۱، میگن و همکارانش در سال ۲۰۰۲، تینگچ و همکارانش در سال ۲۰۰۷، دیوید و همکارانش در سال ۲۰۰۷ و هارمر و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس میزان ژن‌های ExoS و ExoT بیشتر و میزان ژن 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 ویروالانس 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 ترشچی نوع ۳ که از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس جدا شده اند نسبت به

(سیپروفلوکساسین) و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (سفپیم یا سفتازیدیم) در ۱۳/۷٪ از نمونه‌ها مشاهده شد (جدول ۲). نتایج PCR مربوط به ویژگی‌های سیستم ترشچی 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٪ نمونه یا 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	۳/۹٪
۲ مقاوم به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین	۳/۹٪
۳ فقط مقاوم به سیپروفلوکساسین	۱/۹٪
۴ مقاوم به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم	۳/۹٪
۵ مقاوم به جنتامایسین و سفتازیدیم	۵/۸٪



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

بحث

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

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 سیستمیک 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 سیستمیک 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 سیستمیک 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 مجاری تنفسی بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس مناسب‌تر هستند.

بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس به محض آلودگی اولیه با سودوموناس آئروژینوزا باید سریعاً درمان شوند، وگرنه 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 پپراسیلین-تازوباکتام (۱۰۰٪)، مروینم (۹۴/۱٪) و سفتازیدیم (۹۰/۲٪) بود و درصد حساسیت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بدین ترتیب بود: سیپروفلوکساسین ۸۴/۳٪.

ایمپنم 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 سیستمیک فیبروزیس انجام دادند میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها به قرار زیر بود: ایمپنم ۱۰۰٪، سیپروفلوکساسین ۹۰/۵٪، سفتازیدیم و توبرامایسین ۸۵/۷٪، آمیکاسین و پپراسیلین-تازوباکتام 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 می‌دهد. در مطالعه‌ای که اگاروال و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در هند روی بیماران سیستمیک فیبروزیس انجام دادند، ۴۱٪ ایزوله‌ها مقاومت هم‌زمان به چند آنتی‌بیوتیک مهم در درمان این بیماران از جمله جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، پپراسیلین و سفتازیدیم را نشان دادند (۱۳). در مطالعه حاضر نیز مقاومت هم‌زمان بر علیه آنتی‌بیوتیک‌ها از گروه آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلوروکوئینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (سفپیم یا سفتازیدیم) در ۱۳/۷٪ از نمونه‌ها مشاهده شد. در مطالعاتی که در سال‌های اخیر در مورد آنتی‌بیوتیک‌های استنشاقی صورت گرفته است، محلول استنشاقی توبرامایسین و سیپروفلوکساسین در کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت مزمن سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به سیستمیک 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 سیپروفلوکساسین ۱۵/۶٪ مشاهده شد که نشان دهنده شروع ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

REFERENCES

1. 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.
2. Langton Hower SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating Pseudomonas aeruginosa in people with cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev 2009; 7:CD004197.
3. 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.
4. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989 8;245:1073-80.

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 report. 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.