پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحات ۱۸۹ تا ۱۹۳

مقاله اصلی
(Original Article)

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

رباب آذرگون[۱]، فرحنوش دوستدار[۱]، قمرتاج خانبابایی[۲]، مونا قاضی[۱]، فرامرز مهرنژاد[۳]، حسین گودرزی[۱]

[۱] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] متخصص ریه اطفال، بیمارستان مفید کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم اذربایجان

چکیده

سابقه و هدف: *مطالعات کمی در مورد فاکتورهای ویرولانس باکتری در شرایط و بیماری های مزمنی 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 ژن های مرتبط با سیستم ترشحی نوع ۳(exoT، exoS، exoU) 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 ExoS،ExoU و ExoT در نمونه ها 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 توبرامایسین، ۱۵/۷٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۳/۷٪ مقاوم به ایمیپنم و ۹/۸٪ مقاوم به سفتازیدیم بودند. نتایج PCR نشان داد که ۹۰/۲ درصد حاوی ژن exoT، ۷۸/۴ درصد حاوی ژن exoS و۲۵/۵ درصد حاوی ژن exoU بودند.*

نتیجه‌گیری: *در این مطالعه، مقاومت هم‌زمان بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های گروه آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلوئوروکوئینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (سفپیم یا سفتازیدیم) در ۱۳/۷٪ نشانه شروع ظهور مقاومت به چند دارو در این نمونه‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، احتمالا نمونه‌های حاوی ژن exoS در مقایسه با نمونه‌های حاوی ژن exoU برای بقا در مجاری تنفسی بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مناسب‌تر هستند.*

واژگان کلیدی: *سودوموناس ائروژینوزا، سیستیک فیبروزیس، فاکتورهای ویرولانس، سیستم ترشحی 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 ائروژینوزا وجود دارد، ولی هیچ آنتی بیوتیکی قادر به ریشه کنی عفونت‌های مزمن سودوموناس ائروژینوزا نمی‌باشد (۲). سیستیک فیبروزیس ریه و همچنین پانکراس، کبد و روده را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳). سیستیک فیبروزیس با موتاسیون درژن تنظیمی انتقال دهنده غشایی سیستیک فیبروزیس Cystic Fibrosis Transmembrane) (CFTR) Regulator) ایجاد می‌شود (۴). سودوموناس ائروژینوزا به طور مزمن در ریه افراد مبتلا سیستیک فیبروزیس کلونیزه می‌شود و در نهایت منجر به نقص تنفسی و مرگ می‌گردد (۵). سودوموناس ائروژینوزا برای ایجاد عفونت از فاکتور های ویرولانس

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

داخلی و خارجی زیادی استفاده می‌کند 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 می‌شود (۶). سیستم ترشحی نوع ۳ یکی از مهم‌ترین سیستم‌های ترشحی در باکتری‌ها می‌باشد که فاکتورهای ویرولانس را به درون سلول میزبان وارد می‌کند (۷).

سه سم موثر در بیماری‌زایی در سودوموناس ائروژینوزا که مورد شناسایی قرار گرفته است شامل توکسین‌های ExoS،ExoT و ExoU می باشد که توسط سیستم ترشحی نوع ۳ به درون سلول میزبان ترشح می گردد (۸). توکسین‌های ExoS و ExoT توکسین های دو عملکردی هستند که هم فعالیت فعال کنندگی GTPase (GAP) و هم فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفراز (ADPRT) دارد (۹). فعالیت‌های GAP و ADPRT باعث تخریب اکتین اسکلت سلولی و مرگ سلولی می‌گردند (۱۰،۹). ExoU فعالیت فسفولیپازی دارد که موجب لیز سلول‌های یوکاریوتی می‌شود (۱۱).

برخلاف مطالعات زیادی که بر روی فاکتورهای ویرولانس باکتری در شرایط و بیماری‌های حاد صورت گرفته، مطالعات کمتری در مورد فاکتورهای ویرولانس باکتری در شرایط و بیماری‌های مزمنی مثل سیستسک فیبروزیس انجام گرفته است.

بنابراین با توجه به اهمیت باکتری سودو موناس آئروژینوزا در عفونت‌های ریوی و سیستیک فیبروزیس شناسایی هرچه بیشتر فاکتورهای ویرولانس مرتبط با این بیماری‌ها در هر جامعه کلینیکی خاص می‌تواند به توسعه راه‌های مناسبتر برای کنترل عفونت‌های ناشی از آن کمک نماید. برای کنترل بهتر عفونت‌های ریوی ناشی از سودوموناس ائروژینوزا، در این تحقیق هدف این است که خصوصیات ژن‌های سیستم ترشحی نوع ۳ سودوموناس ائروژینوزای مرتبط با عفونت‌های ریوی بیماران سیستیک فیبروزیس در نمونه‌های ایرانی مراجعه کننده به بیمارستان مفید طی سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ مورد مطالعه قرار گیرند.

مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی، ۵۱ نمونه سودوموناس ائروژینوزای جدا شده از خلط بیماران مبتلا سیستیک فیبروزیس در رابطه با تعیین ژن‌های مرتبط با سیستم ترشحی نوع ۳ (exoT، exoS، exoU) مورد بررسی قرار گرفتند. سویه استاندارد ATCC27853 سودوموناس ائروژینوزا به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

نمونه‌های جمع‌آوری شده درمحیط‌های کشت آگارخون‌دار و مک کانگی آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سا نتی‌گراد نگهداری شدند.کلنی های مشکوک با استفاده از تست‌های تشخیصی و بیوشیمیایی مورد تائید قرار گرفتند. سوش‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در محیط TSB حاوی ۳۰٪ گلیسرول ذخیره گردیدند.

تست آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن (Kirby – Baur) بر اساس استانداردهای CLSI انجام شد. دیسک‌های آنتی-بیوتیکی (MAST) که مورد استفاده قرار گرفتند شامل: توبرامایسین ۱۰µg، جنتا مایسین ۱۰µg، آمیکاسین ۳۰ µg، سفتازیدیم ۳۰ µg، سفپیم ۳۰ µg، مروپنم ۱۰ µg، ایمی‌پنم ۱۰µg، سیپروفلوکساسین ۵µg، تریمتوپریم ۵µg و پیپراسیلین-تازوباکتام ۱۰ µg بودند.

به منظور استخراج DNA جهت انجام PCR از روش فنل کلرفروم استفاده شد. آزمون PCR جهت بررسی ژن‌های 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، mgcl2 ۱/۵ میلی-مول، آنزیمTaq DNA Polymerase ۱ واحد، dNTP۲۰۰ میلی مول. در نهایت محصولات هر ژن توسط ژل اگارز ۱/۵ درصد مشاهده شد.

یافته‌ها

تحقیق بر روی ۵۱ بیمار انجام شد. سن بیماران از ۴ماهگی 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 توبرامایسین، ۸ نمونه (۱۵/۶٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۷ نمونه (۱۳/۷٪) مقاوم به ایمیپنم، ۵ نمونه (۹/۸٪) مقاوم به سفتازیدیم، ۳ نمونه (۵/۸٪) مقاوم به مروپنم و ۰ نمونه (۰٪) مقاوم به پیپراسیلین-تازوباکتام بودند.

مقاومت همزمان برعلیه آنتی‌بیوتیک‌ها از گروه آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلوئوروکوئینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف (سفپیم یا سفتازیدیم) در ۱۳/۷٪ از نمونه ها مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج PCR مربوط به ویژگیهای سیستم ترشحی نوع ۳ در نمودار ۱ ارائه گردیده است و نشان می دهد که از ۵۱ نمونه سودوموناس

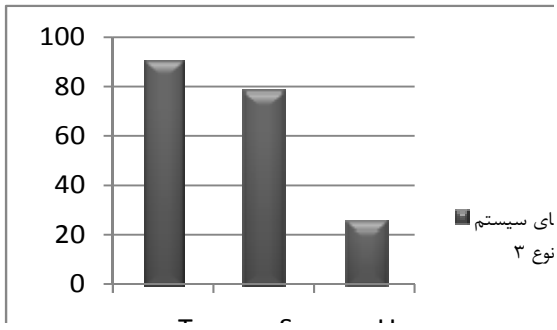
جدول ۱. توالی پرایمر ها و دماهای مورد استفاده برای واکنش **PCR**

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

ائروژینوزای 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 و۱۳ نمونه یا ۲۵/۵ درصد حاوی ژن exoU بودند.

جدول۲. فراوانی نمونه های مقاوم به چند آنتی بیوتیک

	مقاومت به انتی بیوتیک ها	
۱	فقط مقاوم به جنتامایسین	۲(۳/۹٪)
۲	مقاوم به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین	۲(۳/۹٪)
۳	فقط مقاوم به سیپروفلوکساسین	۱(۱/۹٪)
۴	مقاوم به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم	۲(۳/۹٪)
۵	مقاوم به جنتامایسین و سفتازیدیم	۳(۵/۸٪)



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 ائروژینوزا نقش اصلی را در عفونت‌های حاد بازی می‌کند. شواهدی وجود دارد که نقش این سیستم را در عفونت‌های مزمن مثل 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 نمونه های سودوموناس ائروژینوزای 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، ExoS و ExoU در نمونه های سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۹۰/۲، ۷۸/۴ و ۲۵/۵ درصد بود.

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

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 ویرولانس یک روش کلی است که نمونه‌های سودوموناس ائروژینوزا 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 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 معمولا با ترشح توکسین ExoS رابطه معکوس دارد. این نتایج با گزارش‌های قبلی که بیان می‌داشت که نمونه‌های سودوموناس ائروژینوزای حاوی ژن exoU در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس در مقایسه با نمونه‌های سودوموناس ائروژینوزای حاوی این ژن در بیماران با پنومونی حاد بسیار کمتر است، سازگار است. همچنین نمونه‌های سودوموناس ائروژینوزای 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 مجاری تنفسی بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مناسب‌تر هستند.

بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس به محض آلودگی اولیه با سودوموناس ائروژینوزا باید سریعا درمان شوند، وگرنه عفونت مزمن می‌شود که در این صورت ریشه کنی سودوموناس ائروژینوزا 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-تازوباکتام (۱۰۰٪)، مروپنم (۹۴/۱٪) و سفتازیدیم (۹۰/۲٪) بود و درصد حساسیت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بدین ترتیب بود: سیپروفلوکساسین ۸۴/۳٪، ایمیپنم 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 نمونه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس انجام دادند میزان حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها به قرار زیر بود: ایمیپنم ۱۰۰٪، سیپروفلوکساسین ۹۰/۵٪، سفتازیدیم و توبرامایسین ۸۵/۷٪، آمیکاسین و پیپراسیلین-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 ائروژینوزا افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای که اگاروال و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در هند روی بیماران سیستیک فیبروزیس انجام دادند، ۴۱٪ ایزوله‌ها مقاومت هم‌زمان به چند آنتیربیوتیک مهم در درمان این بیماران از جمله جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، پیپراسیلین و سفتازیدیم را نشان دادند (۱۳). در مطالعه حاضر نیز مقاومت هم‌زمان برعلیه آنتی‌بیوتیک‌ها از گروه آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین)، فلوئوروکوئینولون‌ها (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 ائروژینوزا 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 (۱۹-۱۷). 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 Hewer 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 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.