



Tipificación de aislamientos de *Ralstonia mannitolilytica* en un hospital pediátrico de la Ciudad de México

Typing of *Ralstonia mannitolilytica* isolates in *Ralstonia mannitolilytica* a pediatric hospital in Mexico City

Alejandra Aquino-Andrade,¹ Jocelin Merida-Vieyra,¹ Antonino Lara-Hernández,² Hilda Hernández Orozco,³ Agustín De Colsa Ranero^{1,4}

Resumen

INTRODUCCIÓN: *Ralstonia mannitolilytica* es un agente causal de infecciones asociadas al cuidado de la salud. Las especies del género *Ralstonia* son difíciles de identificar y diferenciar. Nuestro objetivo fue identificar y tipificar aislamientos de *R. mannitolilytica* obtenidos de hemocultivos de pacientes pediátricos.

MATERIALES Y MÉTODOS: Colectamos 10 aislamientos de *R. mannitolilytica* identificados con un sistema automatizado, un sistema de espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS, *Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) y análisis del gen 16S rRNA. Se determinó el perfil de resistencia y se tipificaron las carbapenemasas a través de PCR y secuenciación. Se estableció la relación clonal de los aislamientos mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).

RESULTADOS: El sistema MALDI-TOF-MS y análisis del gen 16S rRNA identificaron a los aislamientos como *R. mannitolilytica*; todos pertenecieron a la misma clona y fueron resistentes a meropenem, se detectaron a las carbapenemasas OXA-443 y OXA-444 en todos ellos.

CONCLUSIONES: Este es el primer reporte de aislamientos de *R. mannitolilytica* con origen clonal y que poseen las carbapenemasas OXA-443 y OXA-444 en pacientes pediátricos mexicanos.

PALABRAS CLAVE: *Ralstonia*, bacteriemia, Pediatría, México, Espectrometría de Masa por Láser de Matriz Asistida de Ionización Desorción, Farmacorresistencia Microbiana.

Abstract

INTRODUCTION: *Ralstonia mannitolilytica* is a causative agent of hospital-acquired infections. The species of the *Ralstonia* genus are difficult to identify and differentiate. Our objective was to identify and typify *R. mannitolilytica* isolates obtained from blood cultures of pediatric patients.

METHODS: We collected 10 isolates that were identified with an automated system, a Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) system and 16S rRNA gene analysis. The resistance profile was determined and the carbapenemases were typed through PCR and sequencing. The clonal relationship of the isolates was established by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

RESULTS: The MALDI-TOF-MS system and 16S rRNA gene analysis identified the isolates as *R. mannitolilytica*; all belonged to a single clone and were resistant to meropenem. The carbapenemases OXA-443 and OXA-444 were detected in all strains.

CONCLUSIONS: This is the first report of *R. mannitolilytica* isolates with clonal origin and harboring the carbapenemases OXA-443 and OXA-444 in Mexican pediatric patients.

KEYWORDS: *Ralstonia mannitolilytica*, MALDI-MS, Pediatrics, Mexico, OXA carbapenemase.

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular.

² Laboratorio de Bacteriología Clínica.

³ Comité de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud.

⁴ Departamento de Infectología Pediátrica.

Instituto Nacional de Pediatría.

Recibido: 29 de septiembre de 2021

Aceptado: 10 de febrero de 2022

Correspondencia:

Agustín De Colsa-Ranero
adcdoc@yahoo.com

Este artículo debe citarse como:

Aquino-Andrade A, Mérida-Vieyra J, Lara-Hernández A, Hernández-Orozco H, De Colsa-Ranero A. Tipificación de aislamientos de *Ralstonia mannitolilytica* en un hospital pediátrico de la Ciudad de México. Acta Pediatr Mex 2022; 43 (2): 73-8.



Senovital®

Control a largo plazo

Senovital es un antagonista selectivo de los receptores de leucotrienos en el tracto respiratorio.

Diversos estudios han demostrado que Montelukast previene la agudización de los cuadros asmáticos a largo plazo.



Indicaciones:

- 1** Asma crónica
• Alérgica
- 2** Rinitis alérgica
• Estacional
• Perenne
- 3** Prevención de la broncoconstricción inducida por el ejercicio



Cetus®

Senosiain®

INTRODUCCIÓN

El género *Ralstonia* se estableció en 1995, incluye 13 especies que se caracterizan por ser bacilos Gram negativos aerobios no fermentadores cuyo hábitat es el agua y suelo.¹ Las especies de mayor importancia clínica son: *Ralstonia picketti*, *Ralstonia insidiosa* y *Ralstonia mannitolilytica*. *R. mannitolilytica* previamente conocida como *Pseudomonas thomasi* y *R. pickettii* biovar 3/*thomasi*.² Estas infecciones se han asociado principalmente a soluciones parenterales o equipos contaminados.^{2,3}

Este microorganismo es agente causal de bacteriemia,⁴ sepsis neonatal⁵, meningitis⁶, infección hemoperitoneal⁷, exacerbación de enfermedad pulmonar obstructiva crónica por infección asociada⁸, infecciones en pacientes con trasplante renal⁹, entre otras. También se ha aislado de pacientes con fibrosis quística;¹⁰ y frecuentemente se asocia con brotes intrahospitalarios.^{2,11}

Las especies del género *Ralstonia* son difíciles de identificar y diferenciar; ya que usando pruebas comerciales pueden confundirse con otras especies como *Pseudomonas fluorescens* y las del complejo de *Burkholderia cepacia*. *R. mannitolilytica* puede diferenciarse de otras especies de *Ralstonia* porque no reduce nitratos y por la asimilación de D-arabitol y manitol.⁴ Por otro lado, la tipificación del género *Ralstonia* se ha realizado usando diferentes técnicas como son: amplificación aleatoria de DNA polimórfico (*amplification of polymorphic DNA*, RAPD) y ribotipificación; sin embargo, la PFGE se considera aún el estándar de oro.^{1,11,12} El objetivo de este trabajo fue identificar y tipificar aislamientos de *R. mannitolilytica* obtenidos de hemocultivos durante un brote asociado a la atención de la salud en pacientes pediátricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En un hospital pediátrico de tercer nivel de atención, durante el periodo del 26 de abril al

10 de mayo de 2013, se documentaron 10 casos de bacteriemia con aislamiento de bacilos Gram negativos no fermentadores identificados inicialmente como *Burkholderia* spp./*Ralstonia* spp. Este trabajo formó parte del protocolo Detección etiológica temprana de bacteriemia y sepsis en pacientes pediátricos a través de espectrometría de masa MALDI-TOF, con registro INP 052/2013. Como parte del estudio de brote, se realizaron cultivos de manos del personal involucrado, así como cultivos ambientales y de las bolsas de nutrición parenteral.

Identificación bacteriológica por un método automatizado. La identificación de los aislamientos y perfil de susceptibilidad se realizaron utilizando el Sistema Automatizado para Microbiología BD Phoenix[®] (Becton Dickinson, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron pruebas bioquímicas para corroborar la especie de los aislamientos (D-arabitol, manitol y nitratos).⁵ La concentración mínima inhibitoria fue interpretada aplicando los puntos de corte del *Clinical and Laboratory Standards Institute*.¹³

Detección de carbapenemasas: Fenotípicamente en el antibiograma se documentó que todos los aislamientos presentaban resistencia a meropenem. La detección de beta-lactamasas se realizó a través de la amplificación por PCR de los genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} y *bla*_{OXA-48}. En todas las reacciones utilizamos AmpliTaq Gold[®] 360 MasterMix (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) y el equipo GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los iniciadores y las condiciones de amplificación fueron descritos previamente.¹⁴⁻¹⁶ Con el programa Primer-BLAST¹⁷ diseñamos iniciadores para detectar los genes que codifican para las enzimas OXA-443 y OXA-444 utilizando la secuencia de *R. mannitolilytica* SN83A39 (número de acceso: NZ_BBUP00000000.1).¹⁸ Se amplificó un fragmento de 514 pb del gen *bla*_{OXA-443} utilizando los iniciadores OX443 directo 5'-CTTCCTGAAAGACCCGCACA-3' y OX443 reverso 5'-GTAGGTCCGGCCTCCTTTCT-3' y un fragmento de 550 pb del gen *bla*_{OXA-443}

con los iniciadores OX444 directo 5'-GCGT-GACGATCATGAAGTGC-3' y OX444 reverso 5'-GTCTCAGAGTACCGGCCACA-3'. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L y estaba constituida de 200 nM de cada iniciador y 2 ng de DNA. La amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos 95°C por 15s, 60°C 30s, 72°C 30s y un ciclo final 72°C 7 min. Los fragmentos fueron secuenciados con un método automatizado y se analizaron utilizando el programa BLAST del NCBI.^{19,20}

Identificación por MALDI-TOF-MS. Los aislamientos se cultivaron en agar soya y tripticaseína durante 48 h a 37°C. Se tomó una colonia y se colocó en el portamuestra. Se cubrió con 1 μ L de solución matriz HCCA. Se analizó en un equipo de espectrometría de masas MALDI Biotyper de Beckton Dickinson® (Becton Dickinson, USA). Los iones positivos se extrajeron con un voltaje de aceleración de 20 kV en modo lineal. El espectro se analizó en un rango de *m/z* de 3,640 a 20,000 y comparado con la base de datos. La identificación se consideró válida siempre que el resultado tuviera un valor de puntuación ≥ 1.7 .

Identificación por 16S rRNA. Los aislamientos se cultivaron durante 48 h en agar sangre de carnero 5% a 37°C. Se extrajo el DNA bacteriano usando el kit QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó un fragmento de 920 pb del gen 16S RNA utilizando los iniciadores 16S directo (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 16S reverso (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').²¹ El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L y estaba constituida de 200 nM de cada iniciador y 2 ng de DNA. La amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos 94°C por 40s, 60°C 40s, 72°C 60s y un ciclo final 72°C 7 min. Los fragmentos fueron secuenciados con un método automatizado y se analizaron utilizando el programa BLAST del NCBI.

PFGE. Para la tipificación se siguió la técnica de Khattak y col. con algunas modificaciones.²² Cada aislamiento se sembró en una placa de TSA por estría cruzada y se incubó a 37°C durante 48h. Posteriormente, se preparó una suspensión bacteriana en amortiguador PIV (Tris 1M, NaCl 1M, pH 7.6). Los bloques de agarosa se prepararon en moldes con 150 μ L de la suspensión bacteriana y 150 μ L de agarosa de baja EEO al 1%. La extracción del DNA se realizó con proteinasa K (0.5 mg/mL) y ribonucleasa A (50 μ g/mL). Los bloques de agarosa fueron lavados con amortiguador TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) con 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, *phenylmethylsulphonyl fluoride*). La restricción se realizó con 30 U de la enzima SpeI (New England Biolabs). Los fragmentos se separaron por PFGE en el equipo CHEF Mapper XA System® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5X (45mM Tris borato, 1M EDTA, pH 8.0). Las condiciones de la electroforesis fueron: 14°C a 6 V/cm por 18-19 h con rango de pulso de 1 a 40s. Los patrones fueron interpretados utilizando los criterios de Tenover.²³

RESULTADOS

Los pacientes tenían una mediana de edad de 10 meses (4 días a 6 años), el 70% era menor de 1 año, el 80% fueron de sexo femenino. El único síntoma común fue la fiebre (>38°C). El 44% de los pacientes presentaron trombocitopenia y 33% hipotensión arterial y taquicardia. Los 10 casos se presentaron en seis diferentes servicios del hospital, sin tener una relación epidemiológica directa entre ellos. Cuatro de los casos se presentaron en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCI-N), dos en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UTIP), y un caso en cada uno de los siguientes servicios: cirugía, gastro-nutrición, oncología y cardiología. Ante esto, al hacer el análisis epidemiológico del brote, no se detectó una relación espacial entre los casos; sin embargo, se identificó como factor de riesgo en

común, la aplicación de nutrición parenteral (NP) proveniente de un centro de mezclas extrahospitalario, que después de una suspensión temporal de la aplicación de la NP de dicho centro, no se registraron más casos. A pesar de que más de la mitad de los pacientes presentaron cuadros graves, todos los pacientes evolucionaron a la mejoría después de la administración de trimetoprim/sulfametoxazol y ciprofloxacino. Los cultivos de las manos de personal y ambientales resultaron negativos; de la solución de NP se obtuvo un aislamiento que correspondió a un bacilo Gram negativo no fermentador.

Debido a que los aislamientos, incluyendo al obtenido de la solución NP fueron identificados inicialmente por el sistema automatizado como *Burkholderia* spp. /*Ralstonia* spp. con un valor de confianza de 99%, fue necesario identificarlos a través de pruebas de bacteriología tradicional. No se detectó la reducción de nitratos en ninguno de ellos, y fueron positivas las pruebas de D-arabitol, manitol, glucosa, lactosa, maltosa, xilosa y citratos. Los aislamientos fueron sensibles a ciprofloxacina, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, imipenem y trimetoprim/sulfametoxazol y resistentes a amikacina, gentamicina, meropenem y colistina. En ninguno se detectaron los genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* o *bla_{OXA-48}*. Se amplificaron dos fragmentos que, de acuerdo con el análisis bioinformático, correspondieron a las carbapenemasas OXA-443 y OXA-444. La identificación por el sistema MALDI Biotyper fue *R. mannitolilytica* con índices desde 1.966 hasta 2.361. Los alineamientos realizados con el programa BLAST de los fragmentos del gen 16S rRNA identificaron a todos los aislamientos como *R. mannitolilytica*. Todos los aislamientos fueron agrupados en una sola clona (**figura 1**).

DISCUSIÓN

La identificación correcta de las especies del género *Ralstonia* es importante para un adecuado control y manejo de infecciones, así

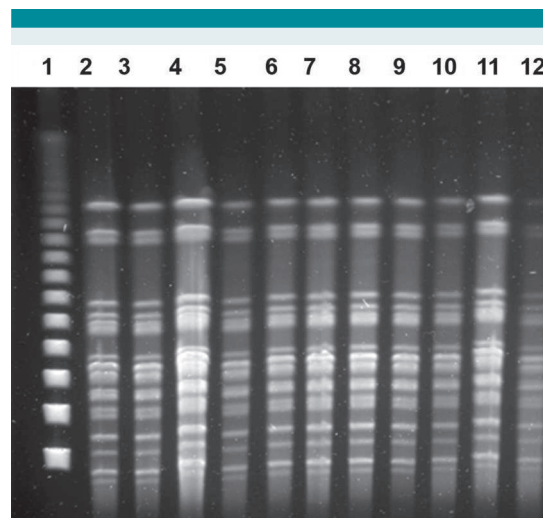


Figura 1. PFGE de los aislamientos de *R. mannitolilytica*. Carril 1. Marcador lambda. Carril 2-11: aislamientos de *R. mannitolilytica* obtenidos de pacientes con infección en torrente sanguíneo, Carril 12: aislamiento de *R. mannitolilytica* obtenido de bolsa de solución parenteral.

como para el establecimiento de un tratamiento oportuno. Por sus características fenotípicas y perfil bioquímico, *R. mannitolilytica*, puede ser confundida con otras especies bacterianas como: *R. picketti*, *P. fluorescens* y *B. cepacia*¹. Los métodos fenotípicos de identificación tienen ciertas limitaciones y su poder de discriminación es inferior al de los métodos genotípicos.¹¹ La identificación por el sistema automatizado de microbiología como *Burkholderia* spp. /*Ralstonia* spp. condujo a la necesidad de usar otras tecnologías para identificación de esta especie, como la MALDI-TOF-MS que ha demostrado ser una herramienta eficaz para la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores; como las especies del género *Ralstonia*.²⁴⁻²⁶ Asimismo, deben incluirse bioquímicas manuales básicas como: D-arabitol, manitol y reducción de nitratos que pueden distinguir entre las especies.

Se ha reportado que algunos aislamientos de *R. mannitolilytica* pueden mostrar resistencia a carbapenémicos.¹ La resistencia puede

presentarse solo a meropenem y mantener la sensibilidad a imipenem^{27,28} tal como los que describimos en este reporte. El conocimiento sobre los mecanismos de resistencia en esta especie es limitado; recientemente, se reportó la secuencia completa de una cepa de *R. mannitolilytica* resistente a carbapenémicos, el fenotipo de resistencia se asoció a la presencia de dos oxacilinasas: OXA-443 y OXA-444, localizadas en el cromosoma, pero no en elementos transponibles lo que señala que estos genes son especie-específicos.¹⁸ Nosotros encontramos los genes de ambas carbapenemasas lo que explica el perfil de resistencia a este grupo de antibióticos. Adicionalmente, la resistencia a amikacina y gentamicina es reportada frecuentemente en esta especie.² Esto señala que, sumado a vigilar la correcta identificación de esta especie, se debe considerar la caracterización de mecanismos de resistencia.

El análisis de PFGE demostró que los aislamientos obtenidos de los 10 pacientes correspondían a una misma clona. La PFGE se ha considerado el estándar de oro para la tipificación de *R. mannitolilytica*;^{1,3,11,12,27,29} y en este trabajo se pudo establecer que todos los aislamientos tenían el mismo origen clonal.

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte de un brote de bacteriemias por *R. mannitolilytica* en pacientes pediátricos en México. El sistema MALDI-TOF-MS identificó a todos los aislamientos como *R. mannitolilytica*. Este método mostró los mismos resultados que los obtenidos a través de la secuenciación del gen 16S rRNA. La resistencia a carbapenémicos se asoció a los genes de OXA-443 y OXA-444. También demostramos que todos los aislamientos tuvieron el mismo origen clonal.

REFERENCIAS

1. Daxboeck F, Stadler M, Assadian O, Marko E, Hirschl AM, Koller W. Characterization of clinically isolated *Ralstonia mannitolilytica* strains using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing and antimicrobial sensitivity, and comparison of the classification efficacy of phenotypic and genotypic assays. *J Med Microbiol*. 2005;54:55–61.
2. Ryan MP, Adley CC. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2014;33:291–304.
3. Block C, Ergaz-Shaltiel Z, Valinsky L, Temper V, Hidalgo-Grass C, Minster N, et al. Déjà vu: *Ralstonia mannitolilytica* infection associated with a humidifying respiratory therapy device, Israel, June to July 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2013;18:20471.
4. Liu C-X, Yan C, Zhang P, Li F-Q, Yang J-H, Li X-Y. *Ralstonia mannitolilytica*-induced septicemia and homology analysis in infected patients: 3 Case Reports. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9:e34373.
5. Sharma D, Sharma P, Soni P, Gupta B. *Ralstonia pickettii* neonatal sepsis: a case report. *BMC Res Notes*. 2017;10:28.
6. De Baere T, Steyaert S, Wauters G, Des Vos P, Goris J, Coenye T, et al. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/'thomasii' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolilytica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:547–558.
7. Vanechoutte M, De Baere T, Wauters G, Steyaert S, Claeys G, Vogelaers D, et al. One case each of recurrent meningitis and hemoperitoneum infection with *Ralstonia mannitolilytica*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:4588–4590.
8. Zong ZY, Peng CH. *Ralstonia mannitolilytica* and COPD: a case report. *Eur Respir J*. 2011;38:1482–1483.
9. Mukhopadhyay C, Bhargava A, Ayyagari A. *Ralstonia mannitolilytica* infection in renal transplant recipient: first report. *Indian J Med Microbiol*. 2003;21:284–286.
10. Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:692–696.
11. Maroye P, Doermann HP, Rogues AM, Gachie JP, Mégraud F. Investigation of an outbreak of *Ralstonia pickettii* in a paediatric hospital by RAPD. *J Hosp Infect*. 2000;44:267–272.
12. Pellegrino FLPC, Schirmer M, Velasco E, de Faria LM, Santos KRN, Moreira BM. *Ralstonia pickettii* bloodstream infections at a Brazilian cancer institution. *Curr Microbiol*. 2008;56:219–223.
13. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th informational supplement M100-S25. Vol. 35. Wayne, Pennsylvania, PA: CLSI; 2015.

14. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:490–495.
15. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol.* 2011;49:718–721.
16. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, et al. Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J Clin Microbiol.* 2013;51:369–372.
17. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
18. Suzuki M, Nishio H, Asagoe K, Kida K, Suzuki S, Matsui M, et al. Genome sequence of a carbapenem-resistant strain of *Ralstonia mannitolilytica*. *Genome Announc.* 2015;3:e00405-15.
19. Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA. Database indexing for production Mega-BLAST searches. *Bioinforma Oxf Engl.* 2008;24:1757–1764.
20. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000;7: 203-14.
21. Relman DA. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TT (ed), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications.* Washington, D.C: American Society of Microbiology, 1993, pp 489-95.
22. Khattak MN, Matthews RC, Burnie JP. Is *Bordetella pertussis* clonal? *BMJ.* 1992;304:813–815.
23. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233–2239.
24. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini M-I, Lamas A, Máiz L, Cantón R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* 2012;11:59–62.
25. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2034–2039.
26. Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B, Allen C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics.* 2016;17:90-100.
27. Gröbner S, Heeg P, Autenrieth IB, Schulte B. Monoclonal outbreak of catheter-related bacteraemia by *Ralstonia mannitolilytica* on two haemato-oncology wards. *J Infect.* 2007;55:539–544.
28. Dotis J, Printza N, Orfanou A, Papathanasiou E, Papanichou F. Peritonitis due to *Ralstonia mannitolilytica* in a pediatric peritoneal dialysis patient. *New Microbiol.* 2012;35:503–506.
29. Labarca JA, Trick WE, Peterson CL, Carson LA, Holt SC, Arduino MJ, et al. A multistate nosocomial outbreak of *Ralstonia pickettii* colonization associated with an intrinsically contaminated respiratory care solution. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1999;29:1281–1286.