

Burkholderia cepacia complex e altri Gram- negativi difficili

Priscilla Cocchi,

Laboratorio del Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica,

AOU Anna Meyer, Firenze

p.cocchi@meyer.it

Le vie aeree dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) costituiscono come è noto un habitat particolarmente favorevole alla colonizzazione da parte di svariate specie di patogeni opportunisti, e quindi allo sviluppo di colonizzazioni batteriche che portano in genere al peggioramento del quadro clinico del paziente. Le frequenti ospedalizzazioni, inoltre, rappresentano un rischio concreto di nuove colonizzazioni da parte di patogeni opportunisti che non sempre risultano facilmente identificabili.

Le vie respiratorie i pazienti affetti da Fibrosi Cistica sono soggetti alla colonizzazioni che possono divenire persistenti da parte di patogeni opportunisti e che si possono rivelare estremamente resistenti ai trattamenti antibiotici. Nel corso degli anni, probabilmente sia grazie all'aumento dell'aspettativa di vita media, ma certamente anche grazie alla necessità di ripetute terapie antibiotiche, si è assistito alla comparsa sempre più frequente dei cosiddetti patogeni emergenti. Tra le specie che vengono frequentemente isolate da campioni respiratori prelevati dalle vie aeree di pazienti FC sono annoverate *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* complex e *Burkholderia cepacia*- like, *Burkholderia gladioli*, la patogenicità di tali microrganismi rimane sconosciuta ma sono potenzialmente in grado di peggiorare il quadro clinico del paziente. In quest' ottica è comprensibile la crescente attenzione rivolta verso queste specie batteriche.

L'impiego di terreni di crescita selettivi e test biochimici agevola l'isolamento dei germi che colonizzano le vie aeree dei pazienti FC, ma non sempre permette di determinarne genere e specie. Nel caso in cui queste tecniche di identificazione che si basano su proprietà fenotipiche dei microrganismi non siano sufficienti, si rende necessario un approccio basato sulle tecniche molecolari che si basano sulla sola amplificazione di geni specifici, o su amplificazione e determinazione della sequenza nucleotidica di porzioni di geni.

Le metodiche di biologia molecolare permettono di valutare in tempi brevi le differenze di corredo genetico che caratterizzano le varie specie, riuscendo a distinguerle e permettendo ai microbiologi di dare una collocazione tassonomica corretta ai vari microrganismi isolati da campioni clinici. In particolare, il bersaglio molecolare scelto è una porzione del gene codificante per la subunità 16S del rRNA, già ampiamente utilizzato nel campo della filogenesi molecolare. Questo gene è presente in ogni specie batterica, la sua funzionalità è costante (gene house-keeping, cioè indispensabile alla vita cellulare), è altamente conservato, l'analisi comparativa delle sequenze di questo gene permette di costruire alberi filogenetici che stabiliscano eventuali relazioni tra specie che non risultano identificabili e specie già note. Per questo la filogenesi molecolare si è servita storicamente del gene per il 16S rRNA per ottenere un quadro attendibile dell'evoluzione e per questo è possibile servirsi di questo gene per agevolare l'identificazione dei microrganismi cosiddetti "difficili". Determinando la sequenza nucleotidica di questo gene e confrontando i dati con quelli già contenuti nelle banche dati, è possibile identificare la specie o quantomeno il genere dei batteri di interesse. La scarsa velocità di mutazione di questo gene ci regala infatti una fotografia piuttosto precisa del quadro evolutivo delle specie, che possiamo sfruttare per identificare i patogeni e utilizzare le informazioni ottenute per chiarirne il ruolo nelle infezioni cliniche.

La crescita su terreni selettivi e l'identificazione con test commerciali spesso non sono indicatori sufficienti per collocare correttamente all'interno di un genere o per determinare la specie di appartenenza di alcuni particolari microrganismi. Talvolta la mancata crescita sui terreni selettivi dedicati, o aspetto e caratteristiche morfologico-funzionali diversi da quelli abitualmente riscontrati rendono difficoltoso il processo di identificazione, impedendo di conoscere la diffusione e l'epidemiologia di questi batteri la cui importanza nell'aggravare il quadro clinico dei pazienti rimane pressoché sconosciuta.

L'approccio molecolare ha permesso di far luce sull'identificazione di varie specie di patogeni difficili, scoprendo che non sempre i batteri di difficile identificazione appartengono al gruppo dei cosiddetti patogeni emergenti ma talvolta mostrano proprietà fenotipiche atipiche che ne impediscono una corretta collocazione tassonomica.

Burkholderia cepacia complex

Nel panorama dei patogeni opportunisti che colonizzano le vie respiratorie dei pazienti FC, tra i più temuti a causa dell'elevato numero di antibiotici cui risultano resistenti, della facilità di contagio tra pazienti e della loro capacità di generare un rapido aggravarsi del quadro clinico del paziente, noto come *cepacia* sindrome, spiccano i membri del *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Descritti per la prima volta da Burkholder nel 1950 come causa di marcescenza del bulbo delle cipolle, questi patogeni nei tardi Anni Settanta furono scoperti essere anche coinvolti nelle patologie respiratorie strettamente correlate al decorso clinico dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica. In un primo momento, però, questi microrganismi erano stati inseriti nel genere *Pseudomonas*, specie *cepacia*, e in questa categoria tassonomica rimasero fino al 1992, anno in cui *P. cepacia* e altre otto specie appartenenti al genere *Pseudomonas* furono attribuite al nuovo genere *Burkholderia*, facente parte della suddivisione β del *phylum* Proteobatteri. La tassonomia del nuovo genere ha subito considerevoli cambiamenti, fino ad arrivare a raccogliere ventidue specie nel 2001. A partire dalla metà degli Anni Novanta si cominciò a notare l'estrema eterogeneità tra gli isolati di *B. cepacia* provenienti da nicchie diverse, cosa che rendeva estremamente difficoltosa la classificazione degli isolati stessi soprattutto alla luce delle tecniche usate fino ad allora, che non sempre erano sufficientemente sensibili o specifiche. Per questo alcuni ricercatori misero a punto un metodo di classificazione basato su un tipo di approccio detto polifasico. Furono così classificati isolati provenienti sia da pazienti che da fonti ambientali come appartenenti ad almeno cinque specie genomiche o genomovar. La classificazione mediante questo tipo di approccio ha poi permesso di delineare la struttura del complex come la conosciamo adesso: formato da dieci diverse specie genomiche o genomovar, nove delle quali hanno raggiunto lo *status* di specie. L'evoluzione delle tecnologie e uno studio più approfondito hanno permesso di determinare l'appartenenza al complex di altre specie per le quali si è in attesa di pubblicazione.

Fu evidente la necessità di un approccio tassonomico di tipo polifasico dal momento in cui la comunità scientifica si trovò ad affrontare la difficoltà di identificare chiaramente e univocamente i patogeni appartenenti al complex e non solo: appariva infatti evidente il bisogno di discriminare anche tra gli appartenenti al genere *Burkholderia* e i generi filogeneticamente più prossimi. La mancata o cattiva identificazione rimane tuttora una problematica rilevante, ed i *Burkholderia cepacia*-like, cioè le specie batteriche con caratteristiche che suggeriscono l'appartenenza al complex, devono essere sottoposti ad analisi molecolari in modo da determinarne con sicurezza la specie e prendere le misure necessarie per una corretta gestione del paziente.

La difficoltà maggiore era infatti rappresentata dall'eterogeneità fenotipica, della quale però non si riscontrava un corrispettivo dal punto di vista del genotipo, emergeva cioè una percentuale di ibridazione DNA- DNA insolitamente alta anche per organismi appartenenti alla stessa specie: valori superiori al 70%, quando invece normalmente si riscontrano valori che vanno dal 30% al 60%.

Questo tipo di approccio tassonomico rimane ancora metodo frequentemente adottato per l'identificazione degli appartenenti al complex, e si avvale appunto della combinazione di tecniche che indagano entrambi gli aspetti, fenotipico e genotipico, separatamente. La procedura prevede infatti un approccio volto a verificare le proprietà fenotipiche dei microrganismi di interesse, quindi ad esempio l'uso combinato di terreni selettivi e analisi biochimiche di routine, e successivamente test volti a verificare le analogie genotipiche per procedere infine al confronto e all'interpretazione dei risultati ottenuti. I microrganismi di interesse sono stati dunque sottoposti ad analisi del contenuto in acidi grassi della cellula, ibridazione DNA-rDNA, ibridazione DNA-DNA. Questo primo studio portò all'identificazione di cinque genomovar, tra cui *B. vietnamiensis*, che aveva già raggiunto lo status di specie. Al contempo, comunque, veniva proposto il nome *B. multivorans* per i microrganismi appartenenti al genomovar II. A seguire, hanno raggiunto lo status di specie, nell'ordine: genomovar IV, *B. stabilis*; genomovar VI, *B. dolosa*; genomovar VII, *B. ambifaria*; genomovar VIII e genomovar IX, rispettivamente *B. anthina* e *B. pyrocinia*; ed infine il genomovar III, *B.*

cenocarpia, che risulta essere formato da quattro *lineage* distinti in base al polimorfismo del gene *recA* e identificati come III-A, III-B, III-C, III-D. È stato recentemente descritto un ulteriore appartenente al complex: *Burkholderia ubonensis*, che risulta avere origine ambientale e posizione non ancora chiara in relazione agli altri genomovar pur rappresentando il genomovar X.

Ci si accorse ben presto però di come fossero difficoltose l'identificazione e la ricostruzione della storia filogenetica di microrganismi così strettamente correlati, e per di più basate su un approccio tanto impegnativo; l'interesse della comunità scientifica si volse quindi alla messa a punto di un approccio alternativo che permettesse comunque la discriminazione degli appartenenti al complex. Furono presi in considerazione due geni in particolare, storicamente utilizzati nel campo della sistematica batterica: il gene per il 16S rRNA, e il gene *recA* codificante per l'omonima proteina, il cui ruolo è essenziale nella riparazione e ricombinazione del DNA. Benché utilizzato spesso come marcatore molecolare per gli studi di sistematica batterica, nell'ambito dell'identificazione tassonomica del Bcc il gene per il 16S rRNA non permette di ottenere una separazione netta tra i genomovar, rendendo possibile solamente raggruppare in un unico profilo ARDRA gli appartenenti ad alcuni genomovar (I, III e IV) senza però distinguerli l'uno dall'altro come è invece possibile nel caso del genomovar V e del genomovar II.

Conoscendo la struttura multicromosomica propria del genoma dei membri del complex, dai primi studi effettuati su un ceppo di riferimento appartenente al genomovar I emergeva la presenza di due copie del gene *recA*, una per ogni cromosoma di maggiori dimensioni. È stato invece dimostrato come gli appartenenti ai genomovar II, III-A, III-B e V abbiano una sola copia del gene. Questi dati rivestono un ruolo di grande importanza nello sviluppo di una strategia diagnostica alternativa allo studio di geni codificanti rDNA, basata su geni house-keeping e presenti in singola copia come *recA*, strategia che risulta preziosa nel caso di una tassonomia complessa come quella del Bcc.

È stata quindi sviluppata una metodica che permettesse di discriminare in modo più accurato un genomovar dall'altro, basandosi sulla presenza di polimorfismi puntiformi nella sequenza nucleotidica del gene *recA*. Utilizzando quindi una coppia di primer complex-specifici, disegnati in base alla sequenza nucleotidica della prima open reading frame del gene in questione, è stato possibile amplificare un frammento delle dimensioni di 1 kb, di cui è stata poi determinata e analizzata la sequenza nucleotidica. I dati così ottenuti hanno permesso di individuare polimorfismi puntiformi che permettessero una migliore discriminazione dei vari genomovar. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati poi sottoposti ad analisi RFLP con quattro enzimi di restrizione, tra i quali è stato individuato in *HaeIII* il più adatto per lo scopo prefisso. I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con quelli ottenuti applicando l'approccio polifasico al medesimo panel di ceppi, ottenendo conferma della validità del metodo. L'analisi del gene *recA* ha messo in luce l'alta percentuale di similarità delle sequenze ottenute (94-95%), la presenza di "alleli" diversi per il genomovar III, la possibilità di mettere a punto test diagnostici *via*- PCR peculiari di ogni gruppo filogenetico (tranne che per quanto riguarda il genomovar I, per cui i test risultano scarsamente sensibili e specifici, e il genomovar IX per cui non è stato possibile mettere a punto un test diagnostico appropriato).

I membri del *Burkholderia cepacia* complex sono in grado di occupare svariate nicchie ecologiche, acque dolci e salmastre e la rizosfera di svariate specie vegetali. Alcuni studi dimostrano come la distribuzione delle specie del complex nel territorio italiano sia piuttosto omogenea, e come sia possibile rilevare appartenenti ad ogni genomovar in ambito ambientale. Inoltre anche i ceppi rizosferici, come quelli clinici, risultano resistenti a svariati antibiotici.

Dal punto di vista clinico, invece, in letteratura si nota la prevalenza tra gli isolati di *B. multivorans* e *B. cenocarpia*; in particolare, per quanto riguarda *B. cenocarpia* si ha la netta prevalenza dei *lineage* III-A e III-B, nessuna evidenza del III-D, mentre del III-C si conoscono solo isolati ambientali. Un recente studio italiano svolto su isolati clinici, denota la prevalenza di pazienti colonizzati da *B. cenocarpia*, in particolare dal *lineage* III-D, rispetto a *B. stabilis*, *B. pyrrocinia* e *B. cepacia* genomovar I. In rari casi è stata anche riscontrata la colonizzazione da parte di più di un *lineage* contemporaneamente. Inoltre è bassa la prevalenza di *B. multivorans*, solitamente uno dei membri del complex predominante nella colonizzazione di pazienti FC sia in Nord-Europa che in Canada. Sebbene recenti studi riportino epidemie causate da ceppi appartenenti a varie specie genomiche, i cloni epidemici di maggiore importanza

risultano appartenere al genomovar III, *B. cenocepacia*. Nei primi anni Novanta si è diffuso nel Regno Unito un clone epidemico definito ET12; è stato identificato negli Stati Uniti un ulteriore clone epidemico detto PHDC, poi diffuso in Europa. Il clone denominato ET12, che infetta un gran numero di pazienti in Canada e Regno Unito, è in grado di sintetizzare un peculiare pilus e un'adesina associata, che media l'aderenza alle cellule dell'epitelio respiratorio. Sebbene risulti importante nella patogenesi per ET12, questo peculiare fenotipo non è stato riscontrato in nessun altro clone epidemico di *B. cepacia*. Molti dei cloni appartenenti al genomovar III in grado di causare epidemie presentano anche altri marcatori genetici peculiari che invece sono assenti negli appartenenti al clone PHDC.

Quando si ha a che fare con campioni respiratori di pazienti FC è richiesto di operare innanzitutto una corretta separazione dalle altre specie, cioè dai cosiddetti germi *Burkholderia cepacia*-like, e di poter distinguere tra *B. multivorans* e *B. cenocepacia* a causa del ruolo preponderante che rivestono nell'epidemiologia del complex, sebbene anche *B. dolosa* e *B. pyrrocinia* abbiano dimostrato trasmissibilità e tutti gli appartenenti al complex debbano essere considerati trasmissibili.

Altri microrganismi "difficili"

Gli isolati clinici da campioni respiratori di pazienti affetti da Fibrosi Cistica vengono sottoposti a esame colturale, che permette di isolare i vari patogeni grazie alla crescita su terreni selettivi che ne mettono in risalto le diverse capacità metaboliche e permettono di ottenerne l'isolamento. La morfologia delle colonie e la capacità di crescere su un terreno selettivo piuttosto che su altro forniscono le prime indicazioni utili per l'identificazione dei microrganismi, che una volta isolati vengono sottoposti ad altri test che ne sfruttano le capacità metaboliche fino a consentire l'identificazione del patogeno. In commercio esistono test a gallerie che sfruttano varie proprietà metaboliche come la capacità di utilizzare o meno alcuni substrati; si ottiene un profilo biochimico che permette di identificare il batterio. Un altro tipo di test che può dare indicazioni per l'identificazione di isolati clinici è il profilo di suscettibilità agli antibiotici, spesso peculiare di un genere o specie. Nel caso in cui test basati sulle proprietà biochimiche non forniscano un risultato soddisfacente, ci troviamo di fronte ad un microrganismo difficile; studi recenti hanno riportato come sia sempre più frequente la mancata identificazione di patogeni isolati da campioni respiratori di pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Le specie che normalmente causano maggiori problemi di identificazione, per le quali oltretutto i test in commercio forniscono risultati spesso insoddisfacenti, appartengono al gruppo dei batteri Gram- negativi non fermentanti; in figura 1 si riporta lo schema utilizzato per identificare questo tipo di microrganismi.

Tra i microrganismi difficili sono annoverati i membri del *B. cepacia* complex si ricordano *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa* e gli altri appartenenti al genere, gli appartenenti al genere *Ralstonia* e *Pandoraea*, ed i cosiddetti "*Burkholderia cepacia*-like", patogeni opportunisti che possono essere confusi con i membri del Bcc (*Pandorea spp*, *Inquilinus spp* *Ralstonia spp*) e *B. gladioli*.

Batteri appartenenti al genere *Pandoraea*, ad esempio, sono relativamente poco comuni nel panorama dei germi che colonizzano i pazienti FC, nei quali possono però causare infezioni, dare luogo a epidemie, e risultano spesso multiresistenti, mentre vengono isolati dall'ambiente (suolo e acque dolci).

Anche gli appartenenti al genere *Inquilinus* risultano essere tra i patogeni FC meno comuni mentre vengono isolati dall'ambiente (suolo), e possono causare infezioni gravi, colonizzazioni croniche e spesso risultano multiresistenti agli agenti antibiotici.

Per quanto riguarda *A. xylosoxidans* e *S. maltophilia* sono responsabili di colonizzazioni persistenti e sono altamente resistenti ai trattamenti antibiotici. *Burkholderia gladioli* può portare allo sviluppo di ascessi, infezioni acute e serie complicazioni post-trapianto mentre non ne è riportata la capacità di cross-infezione.

E' inoltre importante ricordare come spesso possano sembrare "difficili" microrganismi la cui presenza nelle vie respiratorie di pazienti FC risulti insolita; il fatto che possano essere isolati appartenenti a generi che non sono abitualmente isolati dalle vie aeree di pazienti FC può aumentare i problemi di mancata identificazione o errori di identificazione. Sebbene la colonizzazione da parte di patogeni inusuali o difficili non abbia ancora un ruolo clinico chiaro, una conoscenza più approfondita della loro diffusione può aiutare a far luce su questa problematica, fornendo informazioni ai clinici e quindi migliorando l'assistenza verso i pazienti.

Recentemente sono stati sviluppati test molecolari *via*-PCR che utilizzano come target molecolare porzioni del gene codificante per il 16S rRNA la cui sequenza risulta peculiare di una data specie; esistono test *via*-PCR che permettono di confermare l'appartenenza di un isolato ad una data specie o ad un dato genere. Sono ad oggi disponibili protocolli per identificare *P. aeruginosa*, *A. xylooxidans*, *S.maltophilia*, gli appartenenti al genere *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Ralstonia*, *Inquilinus*.

Nel caso in cui non si abbiano indicazioni soddisfacenti si rende necessario amplificare una porzione più ampia del gene per il 16S rRNA e determinarne la sequenza nucleotidica per poi confrontarla con le sequenze contenute nelle banche dati e ottenere così l'identificazione del batterio.

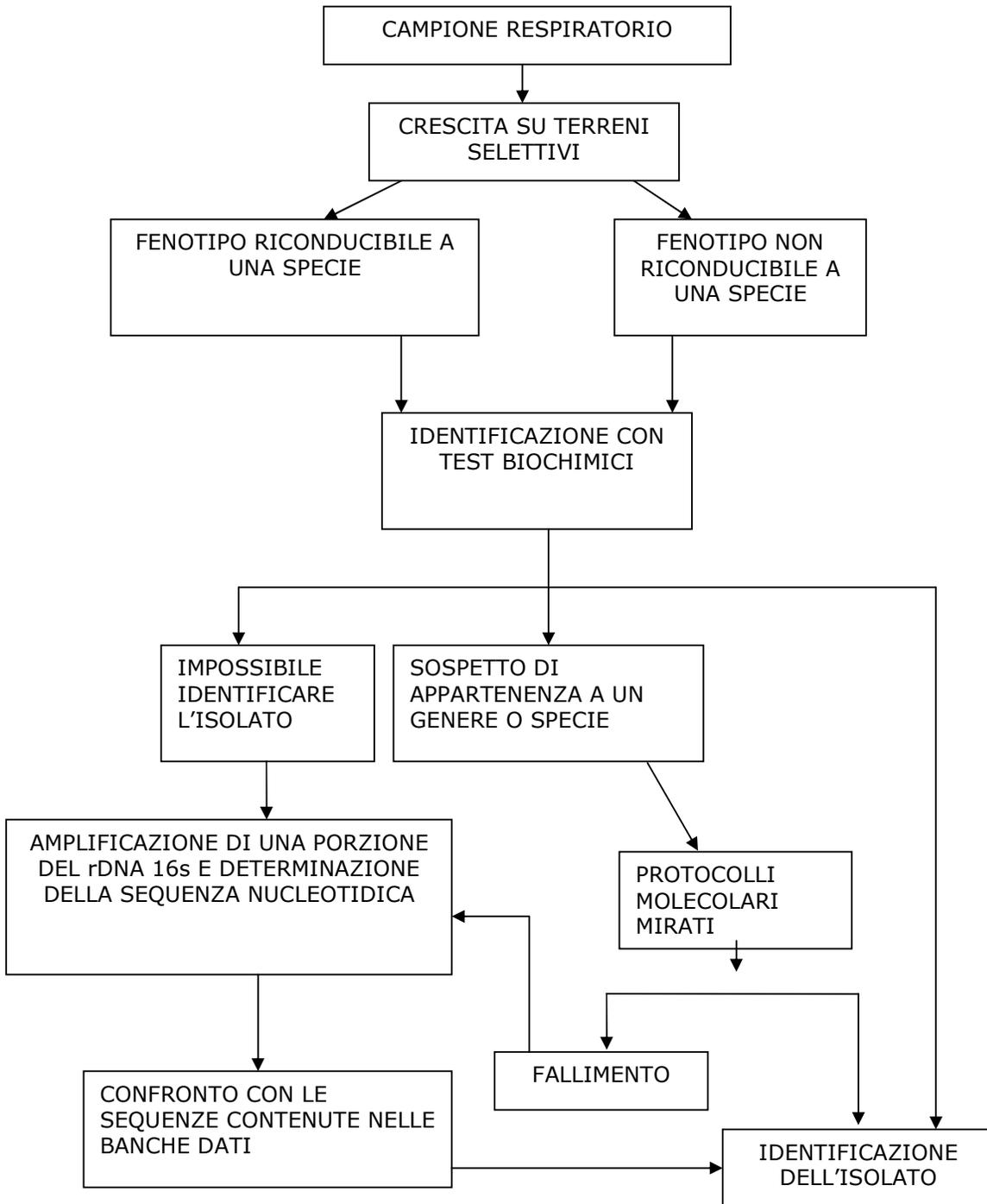


Figura 1: mappa del percorso seguito per l'identificazione di Gram- negativi non fermentanti dai campioni respiratori di pazienti FC

BIBLIOGRAFIA:

- **Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Giannino` V, Sciacca A, and Stefani S.** *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. J. Clin. Microbiol. 2001, **39**:2891-2896.
- **Atkinson RM, Lipuma JJ, Rosenbluth DB, Dunne WM Jr.** Chronic colonization with *Pandoraea apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):833-6.
- **Ballard RW, NJ Palleroni, M Doudoroff, and R Y Stanier.** Taxonomy of the aerobic *Pseudomonas*: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliicola* and *P. caryophylli* J. Gen. Microbiol. 1970, 60: 199-214
- **Bevivino A, Dalmastri C, Tabacchioni S, Chiarini L, Belli ML, Piana S, Materazzo A., Vandamme P, and Manno G.** *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. J. Clin. Microbiol. 2002, **40**:846-851.
- **Burkholder WH.** Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology 1950,40:115-117.
- **Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, Savoia D, Collura A, Fiscarelli E, De Intinis G, Busetti M, Cipolloni A, d'Aprile A, Provenzano E, Collebrusco I, Frontini P, Stassi G, Trancassini M, Tovagliari D, Lavitola A, Doherty CJ, Coenye T, Govan JR, Vandamme P.** Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5136-42.
- **Cheng H-P, and Lessie TG.** Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616 J. Bacteriol. 1994, **176**:4034-4042.
- **Chiron R, Marchandin H, Counil F, Jumas-Bilak E, Freydière AM, Bellon G, Husson MO, Turck D, Brémont F, Chabanon G, Segonds C.** Clinical and microbiological features of *Inquilinus* sp. isolates from five patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):3938-43.
- **Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ.** Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. J Clin Microbiol. 2002 Jun;40(6):2062-9.
- **Coenye T, Liu L, Vandamme P, LiPuma JJ.** Identification of *Pandoraea* species by 16S ribosomal DNA -based PCR assays. J Clin Microbiol. 2001 Dec;39(12):4452-5.
- **Coenye T, LiPuma JJ.** Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandoraea* species. FEMS Microbiol Lett. 2002 Feb 19;208(1):15-9.
- **Coenye T, LiPuma JJ, Henry D, Hoste B, Vandemeulebrouche K, Gillis M, Speert DP, Vandamme P.** *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2001, 51: 271-279
- **Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S , Gillis M, Speert DP, Vandamme P.** *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. **51**:1481-1490.

- Coenye T, Spilker T, Reik R, Vandamme P, Lipuma JJ.

Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3463-6.

- Coenye T, Spilker T, Van Schoor A, LiPuma JJ, Vandamme P.

Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax.* 2004 Nov;59(11):952-4.

- Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, Li Puma JJ.

Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *J. Clin. Microbiol,* 2001, 3427-3436.

- Eisen JA.

The RecA protein as a model molecule for systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species.

J. Mol. Evol. 1995, **41**:1105-1123.

- Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesne G, Lenoir G, Berche P, Gaillard JL.

Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center.

J Clin Microbiol. 2002 Oct;40(10):3793-7.

- Gillis M, Van Van T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP.

Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam.

Int. J. Syst. Bacteriol., 1995,45: 274-289

- Govan, J. R. W., P. H. Brown, J. Maddison, C. J. Doherty, J. W. Nelson, M. Dodd, A. P. Greening, A. K. Webb.

Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis.

Lancet 1993.342:15-19.

- Govan JRW, Deretic V.

Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*.

Microbiol Rev 1996; 60: 539-574.

- Henry DA, Mahenthalingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP.

Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001 Mar;39(3):1073-8.

- Isles A, Maclunsky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levinson H.

Pseudomonas cepacia infection in cystic fibrosis: an emerging problem.

J. Pediatr., 1984, 104: 206-210

- Johnson LN, Han JY, Moskowitz SM, Burns JL, Qin X, Englund JA.

Pandoraea bacteremia in a cystic fibrosis patient with associated systemic illness.

Pediatr Infect Dis J. 2004 Sep;23(9):881-2.

- Jørgensen IM, Johansen HK, Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Vandamme P, Høiby N, Koch C.

Epidemic spread of *Pandoraea apista*, a new pathogen causing severe lung disease in cystic fibrosis patients.

Pediatr Pulmonol. 2003 Nov;36(5):439-46.

- Karlin S, Weinstock GM, and Brendel V.

Bacterial classifications derived from RecA protein sequence comparisons.

J. Bacteriol. 1995,**177**:6881-6893

- Kersters K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Gillis M, Schleifer KH.

Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview.

Syst. Appl. Microbiol., 1996, 19: 465-477

- Lessie TG, Hendrickson W, Manning BD, and Devereux R.

Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*.

FEMS Microbiol. Lett. 1996,**144**:117-128.

- **LiPuma JJ.**

Burkholderia cepacia epidemiology and pathogenesis: implications for infection control. Curr Opin Pulm Med 1998; 4: 337-441.

- **LiPuma JJ, Dulaney BJ, McMenamin JD, Whitby PW, Stull TL, Coenye T, and Vandamme P.**

Development of rRNA-based PCR assays for the identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients.

J. Clin. Microbiol. 1999, **37**:3167-3170.Rev. **60**:407-438.

- **LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL.**

Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. Lancet 1990; 336: 1094-1096.

- **LiPuma JJ, Marks-Austin A, Holsclaw DS, Winnie B, Gilligan PH, Stull TS.**

Inapparent transmission of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* among patients with cystic fibrosis.

Pediatr Infect Dis 1994; 13: 716-719.

- **LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, Liu L, and Mahenthiralingam E.**

Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001,**164**:92-96.

- **Liu L, Coenye T, Burns JL, Whitby PW, Stull TL, LiPuma JJ.**

Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients.

J Clin Microbiol. 2002 Apr;40(4):1210-3.

- **Liu L, Spilker T, Coenye T, LiPuma JJ.**

Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread *Burkholderia cepacia* genomovar III strains.

J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2471-6.

- **Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne KS, Radomski C, Davies EJ, AV-Gay Y, Vandamme P.**

DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. J. Clin. Microbiol., 2000, 38: 3165-3173.

- **Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, Davidson AG, Wilcox PG, Nakielna B, Speert DP.**

Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*.

Clin. Infect. Dis. 2001, **33**:1469-1475.

- **Manno G, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, Romano L, Giannattasio A, Chiarini L, and Bevivino A.**

Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian cystic fibrosis center.

J. Clin. Microbiol. 2004, **42**:1491-1497.

- **Mastella G.**

Fibrosi Cistica. Nozioni elementari e linee guida per i medici che hanno in carico un paziente. Verona, 1995.

- **Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, Jarvis WR, and the Summer Camp Study Group.**

Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis.

J Pediatr 1994; 124: 694-702.

- **Reik R, Spilker T, Lipuma JJ.**

Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis.

J Clin Microbiol. 2005 Jun;43(6):2926-8.

- **Rodley PD, Römmling U, and Tümmler B.**

A physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain.
Mol. Microbiol. 1995. **17**:57–67.

- **Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ.**

PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients.

J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):2074-9.

- **Speert DP.**

Advances in *Burkholderia cepacia* complex.

Paediatr Respir Rev, 2002; 3; 230-235.

- **Stryjewski ME, LiPuma JJ, Messier RH Jr, Reller LB, Alexander BD.**

Sepsis, multiple organ failure, and death due to *Pandoraea pnomenusa* infection after lung transplantation.

J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):2255-7.

- **Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, and Stern RC.**

Pseudomonas cepacia colonization among patients with cystic fibrosis: a new opportunist.

Am. Rev. Respir. Dis. 1985, **131**:791–796.

- **Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancanneyt M, LiPuma JJ, Speert DP, Govan JRW, and Mahenthalingam E.**

Burkholderia anthina sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of molecular diagnostic tools.

FEMS Immunol. Med. microbiol. 2002, **33**:143-149.

- **Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt P, Coenye T, Hoste B, Coopman J, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kertsters K, Govan J, Ursing J, Rossello-Mora R. A., Garcia-Valdes E, Lalucat J.**

Taxonomy note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups.

Int. J. Syst. Bacteriol., 1995, 45:604

- **Vandamme P, Holmes B, T. Coenye, J. Goris, Mahenthalingam E, LiPuma JJ and Govan JRW.**

Burkholderia cenocepacia sp. nov.- a new twist to an old story.

Res. In Microbiol. 2003, 154: 91- 96

- **Vandamme P, Mahenthalingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, Henry D, and Speert DP.**

Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). J. Clin. Microbiol. 2000,**38**:1042-1047.

- **Vanlaere E, Baldwin A, Mahenthalingam E, Dowson GC, Payne GW, Vandamme P.**

Proposal for five new species within the *Burkholderia cepacia* complex.

2006. Abstract IBCWG meeting, April 20- 23, Gent, Belgium.

- **Vermis K, Coenye T, Mahenthalingam E, Nelis HJ, Vandamme P.**

Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex.

J Med Microbiol. 2002 Nov;51(11):937-40.

- **Wellinghausen N, Essig A, Sommerburg O.**

Inquilinus limosus in patients with cystic fibrosis, Germany.

Emerg Infect Dis. 2005 Mar;11(3):457-9.

- **Woese RC, Fox G.**

Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primari kingdoms.

Procl. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5088-5090.