

ISTRUZIONI PER L'USO

BCSA

BURKHOLDERIA CEPACIA SELECTIVE AGAR

Piastrine pronte all'uso

1-DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per verificare l'assenza di *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) nei prodotti farmaceutici non sterili in accordo al metodo USP e per l'isolamento di Bcc nei campioni clinici principalmente di origine respiratoria.



BCSA: ceppi di *B.cepacia* degradanti e non degradanti gli zuccheri del terreno.

2-COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptone di caseina	10 g
Estratto di lievito	1,5 g
Lattosio	10 g
Saccarosio	10 g
Sodio cloruro	5 g
Rosso fenolo	0,08 g
Violetto cristallo	0,002 g
Agar	11,5 g
Vancomicina	0,0025 g
Gentamicina	0,010 g
Polimixina B	600.000 UI
Acqua purificata	1000 ml

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Burkholderia cepacia complex (Bcc) è un gruppo di batteri Gram-negativi, aerobi, ossidasi e catalasi positivi, a forma di bastoncino, composto da 20 specie, strettamente correlate fenotipicamente e raggruppabili in 9 varietà genotipiche.¹

Bcc ha un'elevata versatilità metabolica, un'ampia distribuzione ambientale, una virulenza variabile ed una capacità di formare biofilm nei sistemi idrici farmaceutici oltre che l'abilità di bypassare i sistemi antimicrobici dei conservanti e di resistere ai disinfettanti.²

I membri del gruppo sono patogeni opportunisti in pazienti ventilati meccanicamente, immunodepressi, neonati, anziani e persone con gravi patologie di base.² Essi causano gravi infezioni in soggetti con fibrosi cistica e con malattia granulomatosa cronica; due specie all'interno del gruppo Bcc, *B. cenocepacia* e *B. multivorans*, si ritrovano in oltre l'85% delle infezioni nei soggetti con fibrosi cistica.³

Dall'esame dei richiami dal mercato negli Stati Uniti di prodotti farmaceutici non sterili, dispositivi medici, preparati dietetici, cosmetici, condotta nel 2012 per un arco temporale di sette anni, si è evidenziato come la maggioranza dei casi (72%) fosse da imputare alla presenza di microrganismi indesiderabili e come tra questi, la presenza di *B.cepacia* rappresentasse l'evento più frequente (34%).⁴

Diversi richiami dal mercato di prodotti farmaceutici non sterili sono stati segnalati anche in anni più recenti.^{5,6} Nel 2017 l'FDA ritenne necessario emettere un avviso sui pericoli della contaminazione da Bcc dei prodotti farmaceutici acquosi e non sterili.⁷

A fronte di tutto questo, nel 2019 USP ha incluso tra i propri metodi microbiologici un test per determinare l'assenza di *B.cepacia* complex nei prodotti farmaceutici non sterili, definendo il terreno di coltura ed il metodo d'analisi.⁸ Tra i vari terreni di coltura descritti in letteratura per l'isolamento di *B.cepacia*, MAST, BCA, OFPBL, BCSA, la scelta è caduta sul quest'ultimo essendo ritenuto il mezzo più selettivo e con la capacità di sviluppare colonie di Bcc in tempi più rapidi.^{2,9,10,11}

BCSA Burkholderia Cepacia Selective Agar è preparato in accordo alla formula descritta da Henry nel 1997¹⁰ ed a quanto indicato da USP <60>.⁸

Il terreno completo BCSA contiene peptone di caseina ed estratto di lievito che forniscono azoto, carbonio, oligoelementi e vitamine per la crescita microbica; il lattosio ed il saccarosio sono inclusi quali carboidrati ossidabili da Bcc; il rosso fenolo è un indicatore di pH che vira al giallo in condizioni di acidità; il violetto cristallo è un composto inibitore della flora Gram positiva; gli antibiotici vancomicina, polimixina B, gentamicina sono inibitori dei batteri Gram positivi e dei batteri Gram negativi diversi da Bcc.

BCSA Burkholderia Cepacia Selective Agar è indicato per verificare l'assenza di Bcc nei prodotti farmaceutici non sterili in accordo al metodo USP⁸ e per l'isolamento di Bcc nei campioni clinici per la diagnostica delle infezioni nei pazienti con fibrosi cistica o con altre patologie respiratorie^{12,13}.

4-CARATTERISTICHE DEL TERRENO IN PIASTRA

Aspetto del terreno in piastra	terreno limpido, di colore rosso-arancio
pH (20-25°C)	6,8 ± 0,3

5-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
BCSA Burkholderia Cepacia Selective Agar CND W0104010405; EDMA: 14.01.04.01	Piastrine pronte all'uso	541153	2 x 10 piastrine ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6-MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.





7-CAMPIONI

Campioni farmaceutici: i campioni sono costituiti soprattutto da farmaci per uso inalatorio o preparati acquosi per uso orale, per la mucosa orale, per uso cutaneo o nasale; seguire le indicazioni riportate in USP <60>⁸ per la loro preparazione.

Campioni clinici: il terreno viene utilizzato per la semina degli espettorati, del tampone faringeo profondo, dei lavaggi bronco alveolari, dell'aspirato ipofaringeo. I campioni devono essere immediatamente consegnati al Laboratorio; qualora non sia possibile processarli immediatamente, si consiglia di conservarli a 2-8° C per un massimo di 2 ore.^{9,10,12} Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

8-PROCEDURA DELL'ANALISI

Campioni farmaceutici

Il test per verificare l'assenza di Bcc nei campioni farmaceutici deve essere preceduto da una prova di idoneità del metodo, inoculando il prodotto da esaminare con i ceppi batterici riportati nel capitolo Controllo Qualità. Per i dettagli di tale prova si rimanda al capitolo 60 di USP.⁸

Preparare una diluizione 1:10 del campione da esaminare usando non meno di 1 g di prodotto. Trasferire 10 mL o la quantità corrispondente a 1 g o 1 ml per inoculare una quantità adeguata di Tryptic Soy Broth o di una sua opportuna diluizione, determinata con la prova di idoneità del metodo.

Incubare a 30-35°C per 48-72 ore.

Trapiantare dalla brodocoltura su piastra di BCSA e strisciare con l'ansa su quattro settori della piastra per ottenere colonie isolate.

Incubare a 30-35°C per 48-72 ore.

Campioni clinici

Inoculare la piastra di BCSA con 100 µl di espettorato fluidificato o di liquido di lavaggio bronchiale o depositando il materiale raccolto con il tampone.

Strisciare con l'ansa su quattro settori della piastra per ottenere colonie isolate.

Incubare a 35-37°C per 48-72 ore. Le raccomandazioni AMCLI-SIFC¹² indicano una incubazione delle piastre per 3 giorni a 37°C seguiti da una incubazione a temperatura ambiente fino ad una settimana ed una determinazione quantitativa della carica. Le raccomandazioni di UK SMI B 57¹³ indicano una incubazione per 5 giorni a 35-37°C con osservazioni giornaliere delle piastre.

9-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

La possibile presenza di Bcc nel campione è indicata dallo sviluppo sul terreno BCSA di colonie verdastre-marroni con alone giallo o di colonie bianche circondate da una zona rosa-rossa.

Le piastre con crescite tipiche ed atipiche devono essere sottoposte a prove di identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

10-CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.⁸

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>B.cepacia</i>	ATCC 25416	35°C / 48H / A	buona crescita
<i>B. cenocepacia</i>	ATCC BAA-245 oppure <i>B.multivorans</i> ATCC BAA-247	35°C / 48H / A	buona crescita
<i>P.aeruginosa</i>	ATCC 9027	35°C / 72H / A	crescita inibita
<i>S.aureus</i>	ATCC 6538	35°C / 72H / A	crescita inibita

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrate di American Type Culture Collection

11-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le prestazioni sono state valutate con uno studio interno, preparando piastre di BCSA (REF 541153) con terreno BCSA Base disidratato (REF 4011532) addizionato di BCSA Selective Supplement (REF 4240073).

Le prestazioni sono state valutate mediante tecnica ecometrica qualitativa incubando a 35 °C per 24-72 ore, utilizzando 40 ceppi batterici, 18 di isolamento clinico e 22 derivati dalla collezione ATCC: *B. cepacia* 11, *B.cenocepacia* 2, *B.multivorans* 1, *P.aeruginosa* 15, *P.fluorescens* 2, *A.baumannii* 2, altri batteri Gram negativi 4, batteri Gram positivi 2, lievito 1.

Produttività: i 14 ceppi di *Burkholderia* spp sono cresciuti alle 24 ore e la morfologia ed il colore si sono resi ben evidenti alle 48 ore.

Selettività: gli altri 25 ceppi batterici ed il lievito sono stati totalmente inibiti entro 72 ore di incubazione, ad eccezione di *Providencia stuartii* che non è inibito su BCSA.

Le prestazioni di produttività sono state anche valutate mediante tecnica quantitativa con semina in superficie, usando come terreno di riferimento piastre Columbia Blood Agar (CBA), con 2 ceppi di *B.cepacia*, 1 ceppo di *B.cenocepacia*, 1 ceppo di *B.multivorans*. Dopo incubazione a 35 °C per 48ore, è stato calcolato il rapporto di produttività (UFC^{BCSA}/ UFC^{CBA} X100) e ritrovato superiore a 0,5.

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte e delle materie usate per la loro preparazione (BCSA Base, REF 401153 e BCSA Selective Supplement, REF 4240073) vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *B.cepacia* ATCC 25416, *B.cepacia* di isolamento clinico, *B.cenocepacia* ATCC BAA-245, *B.multivorans* ATCC BAA-247, *B.multivorans* di isolamento clinico. Dopo incubazione a 35°C per 18-24 ore si osservano le caratteristiche cromatiche delle colonie e del terreno e le cariche microbiche. I parametri osservati sono conformi alla specifiche e comparabili nei due lotti.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate, con metodo Miles Misra modificato, appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non-target *P.aeruginosa* ATCC 9027, *P.fluorescens* ATCC 13525, *S.aureus* ATCC 6538,





E.faecalis ATCC 29212, *B.subtilis* ATCC 6633, *C.albicans* ATCC 10231. Dopo 72 ore di incubazione a 35°C, la crescita dei ceppi non target risulta inibita.

12-LIMITI DEL METODO

- Il viraggio al giallo del terreno è indice di degradazione degli zuccheri presenti nel terreno con formazione di acidi; tale degradazione può non essere presente in tutti i ceppi di *B.cepacia* complex. Per questa ragione è consigliabile che qualsiasi tipo di colonia coltivata sul terreno sia sottoposta ai test di identificazione.
- Vi sono segnalazioni che sul terreno BCSA possono essere isolati ceppi di *Burkholderia gladioli* e *Pseudomonas* spp.¹³
- Pur essendo riconosciuta la superiorità del terreno BCSA per l'isolamento di Bcc, Plonga¹⁴ segnala la mancata crescita su un terreno BCSA del commercio di 7 ceppi su 43 seminati (sensibilità 86%). E' quindi possibile che vi siano ceppi di Bcc che possono essere sensibili agli antibiotici presenti nel terreno.
- Con incubazione estesa a 7 giorni sul terreno BCSA possono essere isolati dall'espettorato di pazienti con fibrosi cistica, micobatteri non tubercolari a rapida crescita (RGM).¹⁵ Questo espediente per l'isolamento di RGM fornisce comunque risultati inferiori rispetto all'uso di terreni più specifici.¹⁴
- L'identificazione delle colonie di Bcc può essere problematica poiché *B. cepacia* ha vari profili genetici che rendono difficile un'accurata identificazione mediante test fenotipici. Molti sistemi di identificazione biochimica hanno difficoltà a distinguere tra i generi *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas* e *Delftia*; ciò si aggrava quando si tenta di differenziare all'interno del genere *Burkholderia* (le specie sono filogeneticamente strettamente correlate con piccole differenze nel modo di esprimere le caratteristiche fenotipiche); ad esempio, *B. cepacia* è strettamente correlata *B. gladioli*.¹
- Deve essere attentamente valutato il momento dell'analisi del campione farmaceutico. La cinetica della crescita di molte specie di Bcc, a causa del loro recupero da condizioni a basso contenuto di nutrienti, può spesso portare all'estensione della fase di latenza (lag fase); inoltre gli ingredienti di cui è costituito il prodotto possono avere un impatto sulla cinetica di crescita: testando il campione troppo presto, vi potrebbero essere troppo poche cellule microbiche per poter rilevare la contaminazione da Bcc.¹
- Il metodo USP richiede una prova di idoneità del metodo per dimostrare la sua capacità di determinare Bcc in presenza del prodotto da esaminare. Per questa prova il tempo di incubazione non deve essere superiore al tempo più breve di incubazione specificato.⁸
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi dell' infezione da Bcc. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

13-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Questo vale anche in relazione a eventuali diritti di terzi. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15-BIBLIOGRAFIA

- Sandle T. Burkholderia cepacia complex: Review of origins, risks and methodologies. 2018. www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/80557/burkholderia-cepacia-complex-review-of-origins-risks-and-test-methodologies/
- Cundell T. Excluding Burkholderia cepacia complex from Aqueous, Non-Sterile Drug Products. 2019 <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/358427-Excluding-i-Burkholderia-cepacia-i-complex-from-Aqueous-Non-Sterile-Drug-Products/>
- 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; 43:2926–2928.
- Sutton S, Jimenez L. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004-2011 with Emphasis on FDA Considerations of "Objectionable Organisms" Posted January 1 2012 Amer. Pharm. Rev.





5. Abdallah M, Abdallah HA, Memish ZA. Burkholderia cepacia complex outbreaks amongst non-cystic fibrosis patients in the intensive care units: a review of adult and pediatric literature. *Infez Med.* 2018 Dec 1;26(4):299-307.
6. Marquez L, Jones KN, Whaley EM, et al. An outbreak of Burkholderia cepacia Complex infections associated with contaminated liquid Docusate. *Infect. Control & Hosp. Epidemiol.* 2017; 38(5): 567-573.
7. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services. FDA advises drug manufacturers that Burkholderia cepacia complex poses a contamination risk in non-sterile, water-based drug products, 2017. <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm559508.htm>
8. USP <60> Microbiological Examination of Non-sterile Products: Tests for Burkholderia cepacia complex. December 1, 2019.
9. Henry DA, Campbell ME, JJ, Speert DP. Identification of Burkholderia cepacia isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 1997; 35:614–619.
10. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, McGimpsey C et al. Comparison of isolation media for recovery of Burkholderia cepacia complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4):1004-1007.
11. Wright RM, Moore JE, Shaw A, et al. Improved cultural detection of Burkholderia cepacia from sputum in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 2001;54:803–805.
12. AMCLI-SIFC Raccomandazioni per l'esecuzione delle indagini microbiologiche di campioni delle vie respiratorie di pazienti con fibrosi cistica. 2010.
13. Public Health England. (2019). Investigation of bronchoalveolar lavage, sputum and associated specimens. UK Standards for Microbiology Investigations. B 57 Issue 3.5. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-andconsistency-in-clinical-laboratories>.
14. Plongla R, Preece CL, Perry JD, Gilligan P. Evaluation of RGM Medium for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Respiratory Samples from Patients with Cystic Fibrosis in the United States. *J Clin Microbiol* 2017; 55(5):1469-1477.
15. Esther CR Jr, Hoberman S, Fine J, Allen S, et al. Detection of rapidly-growing mycobacteria in routine cultures of samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1421–1425.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 1	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

