

**INSTRUCTIONS FOR USE**

BCSA BURKHOLDERIA CEPACIA SELECTIVE AGAR BASE BCSA SELECTIVE SUPPLEMENT

Dehydrated medium and selective supplement

BCSA: lactose/sucrose oxidizing and not oxidizing *B.cepacia* strains

1-INTENDED USE

In vitro diagnostic device. Dehydrated medium and selective supplement for the determination of the absence of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) in non-sterile pharmaceutical products according to USP method and for the isolation of Bcc in clinical specimens mainly of respiratory origin.

2-COMPOSITION**BCSA BURKHOLDERIA CEPACIA SELECTIVE AGAR BASE****TYPICAL FORMULA (AFTER RECONSTITUTION WITH 1 L OF WATER) ***

Casein peptone	10 g
Yeast extract	1.5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Sodium chloride	5 g
Phenol red	0.08 g
Crystal violet	0.002 g
Agar	11.5 g

*The formula may be adjusted and/or supplemented to meet the required performances criteria.

BCSA SELECTIVE SUPPLEMENT**VIAL CONTENTS**

Vancomycin	1.25 mg
Gentamicin	5 mg
Polymyxin B	300,000 UI

3-PRINCIPLE OF THE METHOD AND EXPLANATION OF THE PROCEDURE

Burkholderia cepacia complex (Bcc) is a group of aerobic, Gram-negative, oxidase and catalase positive rods, actually comprising 20 species which are phenotypically nearly indistinguishable and can be sub grouped into nine genomovars¹.

Bcc has high metabolic versatility, wide environmental distribution, and variable virulence; furthermore, members of the *B. cepacia* complex have the ability to form biofilms in pharmaceutical water systems as well as the capability of overcoming antimicrobial preservative systems and being resistant to disinfectants.²

The species of Bcc group are opportunistic pathogens in mechanically ventilated patients, immunosuppressed, infants, the elderly and those with serious underlying disease.² Bcc causes serious infections in patients with cystic fibrosis and chronic granulomatous disease; two Bcc members, *B. cenocepacia* and *B. multivorans*, account for greater than 85% of the cystic fibrosis infections.³

A 2012 survey analyzed the reported recalls from the U.S. market of non sterile pharmaceutical products, cosmetics, medical devices and dietary supplements for microbiologically related issues for a 7-year period: the majority of these recalls (72%) were associated with objectionable microorganisms and the presence of *B.cepacia* represented the most frequent event (34%).⁴ Several recalls of non-sterile pharmaceutical products have also been reported in more recent years.^{5,6}

The FDA was sufficiently concerned in 2017 to issue an advisory notice of the dangers of Bcc contamination of aqueous, non-sterile drug products⁷.

In response to stakeholder requests, a test method for the determination of absence of *Burkholderia cepacia* complex was published in 2019 in the chapter <60> of USP, for defining test procedures and media formulations⁸. Among the various culture media described for the isolation of *B.cepacia*, namely MAST, BCA, OFPBL, BCSA, the choice fell on the latter because of its ability to support the faster growth of Bcc isolates and to suppress other respiratory organisms.^{2,9,10,11}

BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar is prepared according to the formula described by Heny in 1997⁹ and meets the USP <60> requirements⁸.

BCSA contains peptones that supply nutrients for the growth of *Burkholderia cepacia* and other microorganisms; lactose and sucrose are oxidized by the majority of Bcc isolates and the acid end-products result in the medium changing from orange to yellow due to the presence of the pH indicator, phenol red. Crystal violet is added to inhibit growth of Gram-positive organisms; antimicrobials vancomycin, gentamicin and polymyxin B are incorporated to inhibit organisms other than Bcc.

BCSA is intended for the determination of the absence of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), in non-sterile pharmaceutical products according to USP method⁸ and for the isolation of Bcc in clinical specimens mainly of respiratory origin in patients with cystic fibrosis and other respiratory diseases.^{12,13}





4-DIRECTIONS FOR MEDIUM PREPARATION

Suspend 24 g in 500 mL of cold purified water. Heat to boiling with frequent agitation and sterilize by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Cool to 47-50 °C and, under aseptic conditions, add the contents of one vial of BCSA Selective Supplement (4240073), reconstituted with 5 mL of sterile purified water. Mix well and pour into sterile Petri dishes.

5-PHYSICAL CHARACTERISTICS

Dehydrated medium

Dehydrated medium appearance pinkish, fine, homogeneous, free-flowing powder
Solution and prepared plates appearance limpid, red orange
Final pH at 25 °C 6.8 ± 0.3

Selective supplement

Lyophilized pellet appearance short, dense, white pastille
Solution appearance limpid, colourless

6-MATERIALS PROVIDED - PACKAGING

Product	Type	REF	Pack
BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar Base CND : W0104010101; EDMA: 14.01.01.01; RDM: 1941318/R	Dehydrated medium	4011532	500 g (10.4 L)
BCSA Selective Supplement CND :W0104010104; EDMA: 14.01.01.04; RDM: 1941323/R	Lyophilized supplement	4240073	10 vials, each for 500 mL of medium

7-MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Sterile loops and swabs, autoclave, water-bath, incubator and laboratory equipments as required, ancillary culture media and reagents for the identification of the colonies.

8-SPECIMENS

Pharmaceutical samples: non-sterile products for inhalation use or aqueous preparations for oral, oromucosal, cutaneous, or nasal use; follow the procedure described by USP for the sample preparation.⁸

Clinical specimens: BCSA agar is used to detect *Burkholderia cepacia* complex from expectorated sputum, deep pharyngeal swab and aspirates, bronchoalveolar lavages. Specimens should be submitted directly to the laboratory without delay. If there is to be a delay in processing, store the specimens for no more than 2 hours in the refrigerator.^{9,10,12}

Good laboratory practices for collection, storage and transport to the laboratory should be applied.

9-TEST PROCEDURE

Pharmaceutical samples

Before performing the test for the determination of the absence of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), the ability of the method to detect Bcc in the presence of the product to be tested must be established (Suitability of the Test Method). The details of the procedure are described in USP <60>.⁸

Prepare a 1:10 dilution of the product to be examined using no less than 1 g of product. Use 10 mL or the quantity corresponding to 1 g or 1 mL to inoculate a suitable amount (determined as described in Suitability of the Test Method) of Tryptic Soy Broth or an appropriate dilution of Tryptic Soy Broth as determined during method suitability (for example, a 1:10 dilution may be required when conducting optional testing of pharmaceutical waters). Mix and incubate at 30–35 °C for 48–72 h.

Subculture by streaking on a plate of BCSA, and incubate at 30–35°C for 48–72 h.

Clinical Specimens

Inoculate 100µL of the liquefied sputum or bronchoalveolar lavages onto a BCSA plate and spread inoculum over the entire surface of the agar plate. Alternatively, if the material is being cultured directly from a swab, roll the swab over a small area of the surface at the edge; then streak from this inoculated area.

Incubate at 35-37°C for 48-72 hours.

AMCLI-SIFC¹² recommendation: incubation at 37°C for 3 days followed by an incubation at room temperature for one week and quantitative detection of CFUs. UK SMI B 57¹³ recommendation: incubation at 35-37°C for 5 days with daily cultures reading.

10-READING AND INTERPRETATION

The possible presence of Bcc is indicated by the growth of greenish–brown colonies with yellow halos, or white colonies surrounded by a pink–red zone on BCSA. Any growth on BCSA, typical or atypical should be confirmed by identification tests with biochemical, immunological, molecular, mass spectrometry techniques after colonies purification on a suitable medium.

11-USER QUALITY CONTROL

All manufactured lots of the product are released for sale after the Quality Control has been performed to check the compliance with the specifications. However, it is responsibility of the end-user to perform Quality Control testing in accordance with the local applicable regulations, in compliance with accreditation requirements and the experience of the Laboratory. Here below are listed some test strains useful for the quality control.⁸

CONTROL STRAINS		INCUBATION T°/t / ATM	EXPECTED RESULTS
<i>B.cepacia</i>	ATCC 25416	35°C / 48 h / A	good growth
<i>B. cenocepacia</i>	ATCC BAA-485 or <i>B.multivorans</i> ATCC BAA-487	35°C / 48 h / A	good growth
<i>P.aeruginosa</i>	ATCC 9027	35°C / 72 h / A	growth inhibited
<i>S.aureus</i>	ATCC 6538	35°C / 72 h / A	growth inhibited

A: aerobic incubation; ATCC is a trademark of American Type Culture Collection





12-PERFORMANCES CHARACTERISTICS

Performance was evaluated with an in-house study, by preparing BCSA plates (REF 541153) with dehydrated BCSA Base (REF 4011532) supplemented with BCSA Selective Supplement (REF 4240073)

Performance was evaluated by qualitative ecometric technique incubating at 35°C for 24-72 hours, using 40 bacterial strains, 18 clinical isolates and 22 ATCC derivatives: *B. cepacia* 11, *B.cenocepacia* 2, *B.multivorans* 1, *P.aeruginosa* 15, *P.fluorescens* 2, *A.baumannii* 2, other Gram negative bacteria 4, Gram positive bacteria 2, yeast 1.

Productivity: the 14 strains of *Burkholderia* spp., grew at 24 hours and the morphology and colour changes were complete after 72 hours. Selectivity: the other 25 bacterial strains and the yeast were totally inhibited within 72 hours with the exception of *Providencia stuartii* that is not inhibited on BCSA.

Productivity performance was evaluated also by quantitative spread plate technique using as reference medium Columbia Blood Agar (CBA) plates with 2 strains of *B.cepacia*, 1 strain of *B.cenocepacia*, 1 strain of *B.multivorans*. After incubation at 35°C for 48 hours, productivity ratio has been calculated (CFU^{BCSA}/CFU^{CBA} x 100) and found to be higher than 0,5.

Prior to release for sale a representative sample of all lots of dehydrated BCSA Base and BCSA Selective Supplement are tested for productivity and selectivity by comparing the results with a previously approved Reference Batch.

Productivity is tested by semi-quantitative ecometric technique with the following target-strains: *B.cepacia* ATCC 25416, *B.cepacia* clinical isolate, *B.cenocepacia* ATCC BAA-245, *B.multivorans* ATCC BAA-247, *B.multivorans*, clinical isolate. After incubation at 35°C for 18-24 hours the colour of the medium and the colonies and the amount of growth are observed and recorded. The chromatic characteristics and the test strains growth shall be in compliance with specifications and comparable in both batches.

The selectivity is evaluated with modified Miles-Misra surface drop method by inoculating the plates with decimal dilutions in saline from 10⁻¹ to 10⁻⁴ of a 0.5 McFarland suspension of the non-target strains *P.aeruginosa* ATCC 9027, *P.fluorescens* ATCC 13525, *S.aureus* ATCC 6538, *E.faecalis* ATCC 29212, *B.subtilis* ATCC 6633, *C.albicans* ATCC 10231. After incubation at 35°C for 72 hours, the growth of non-target strains is inhibited at the dilution 10⁻¹.

13-LIMITATIONS OF THE METHOD

- The yellow color change of the medium indicates the degradation of sucrose and/or lactose occurred producing acidification; this degradation may not be present in all Bcc strains. Therefore it is recommended that any type of colony grown on BCSA be subjected to identification tests.
- There are reports that strains of *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas* spp. can be isolated on BCSA.¹³
- Although the superiority of the BCSA medium for the isolation of Bcc is recognized, Plonga¹⁴ reports the failure to grow on a marketed BCSA of 7 strains out of 43 inoculated (sensitivity 86%). It is therefore possible that there are Bcc strains that may be sensitive to antibiotics present in the medium.
- Rapidly growing mycobacteria (RGM) could be recovered from routine cultures of samples from patients with cystic fibrosis by extending incubation of BCSA to 7 days.¹⁵ However this strategy for the isolation of RGM still provides lower results than the use of more specific media.¹⁴
- The identification of Bcc members can be problematic since *B. cepacia* has a diverse genetic composition making accurate identification using phenotypic tests difficult. Many biochemical identification test systems have difficulty differentiating between the genera *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas* and *Delftia*; this is compounded when attempting to differentiate within the *Burkholderia* genera (the species members are phylogenetically very closely related with little differences in the way of phenotypic characteristics). For example, *B. cepacia* is closely related to the bacterial species *B. gladioli*.¹
- The testing time of a pharmaceutical sample needs to be considered. The microbial growth kinetics of many Bcc organisms, due to their recovery from low-nutrient conditions, can often result in an extended lag phase; moreover, certain product ingredients can have an impact on microbial growth kinetics: by testing too early there may be insufficient bacterial cells for a Bcc contaminant to be detected.¹
- The ability of the USP test to detect Bcc in the presence of the product to be tested must be established. The incubation time for the method suitability should not exceed the shortest incubation period specified.⁸
- This culture medium is intended as an aid in the diagnosis of infectious disease; the interpretation of the results must be made considering the patient's clinical history, the origin of the sample and the results of the microscopic and/or other diagnostic tests.

14-PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The medium base and the supplement are qualitative *in vitro* diagnostics, for professional use only; they are to be used by adequately trained and qualified laboratory personnel, observing approved biohazard precautions and aseptic techniques.
- The medium base and the supplement must be used in association according to the described directions.
- Dehydrated media and antibiotics containing supplements must be handled with suitable protection. Before the use, consult the Material Safety Data Sheets.
- This culture medium contains raw materials of animal origin. The *ante* and *post mortem* controls of the animals and those during the production and distribution cycle of the raw materials, cannot completely guarantee that these products do not contain any transmissible pathogen. Therefore, it is recommended that the ready-to use plates be treated as potentially infectious, and handled observing the usual specific precautions: do not ingest, inhale, or allow to come into contact with skin, eyes, mucous membranes. Download the TSE Statement from the website www.biolifeitaliana.it, describing the measures implemented by Biolife Italiana S.r.l. for the risk reduction linked to infectious animal diseases.
- All laboratory specimens should be considered infectious.
- The laboratory area must be controlled to avoid contaminants such as powder medium and supplement or microbial agents.
- Sterilize all biohazard waste before disposal. Dispose the unused medium and supplement and the inoculated plates with samples or microbial strains in accordance with current local legislation.
- Do not use the culture medium and the supplements as active ingredients for pharmaceutical preparations or as production materials intended for human and animal consumption
- The Certificates of Analysis and the Safety Data Sheet are available in the website www.biolifeitaliana.it.





- The information provided in this document has been defined to the best of our knowledge and ability and represents a guideline for the proper use of the product but without obligation or liability. In all cases existing local laws, regulations and standard procedures must be observed for the examination of samples collected from human and animal organic districts, for environmental samples and for products intended for human or animal consumption. This also applies in relation to any third party rights. Our information does not relieve our customers from their responsibility for checking the suitability of our product for the intended purpose.

15-STORAGE CONDITIONS AND SHELF LIFE

Dehydrated medium: upon receipt, store at 10-30°C away from direct light in a dry place. If properly stored, it may be used up to the expiration date. Do not use beyond this date. Avoid opening the bottle in humid places. After the use the container must be tightly closed. Discard the product if the container and/or the cap were damaged or in case of evident deterioration of the powder (colour changes, hardening).

Selective supplement: upon receipt store at 2-8°C until the expiry date. Do not use beyond this date. Once opened and reconstituted, the vial contents must be used immediately.

16-REFERENCES

- Sandle T. Burkholderia cepacia complex: Review of origins, risks and methodologies. 2018. www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/80557/burkholderia-cepaciacomplex-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.
- 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.
- 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.
- 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>
- USP <60> Microbiological Examination of Non-sterile Products: Tests for Burkholderia cepacia complex. December 1, 2019.
- 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.
- 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.
- 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.
- AMCLI-SIFC Raccomandazioni per l'esecuzione delle indagini microbiologiche di campioni delle vie respiratorie di pazienti con fibrosi cistica. 2010.
- 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>.
- 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.
- 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.

TABLE OF APPLICABLE SYMBOLS

or Catalogue number	Batch code	<i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device	Manufacturer	Use by
Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Consult Instructions for Use	Store in a dry place away from the direct light	Fragile, handle with care



ISTRUZIONI PER L'USO **I****BCSA BURKHOLDERIA CEPACIA SELECTIVE AGAR BASE
BCSA SELECTIVE SUPPLEMENT**

Terreno in polvere e supplemento selettivo



BCSA – dall'alto: ceppi di *B.cepacia* degradanti e non degradanti il lattosio e/o il saccarosio

1-DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno di base e supplemento selettivo 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.

2-COMPOSIZIONE**BCSA BURKHOLDERIA CEPACIA SELECTIVE AGAR BASE****FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA ***

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

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

BCSA SELECTIVE SUPPLEMENT**CONTENUTO DEL FLACONE**

Vancomicina	1,25 mg
Polimixina B	300.000 UI
Gentamicina	5 mg

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-PREPARAZIONE

Sospendere 24 g in 500 mL di acqua purificata sterile, Portare ad ebollizione sotto agitazione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere, con le precauzioni dell'asepsi, il contenuto di un flacone di BCSA Selective Supplement /R(4240073), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.





5-CARATTERISTICHE FISICHE

Terreno in polvere

Aspetto della polvere
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra
pH (20-25°C)

fine granulometria omogenea, rosa
terreno limpido di colore rosso-arancio
6,8 ± 0,3

Supplemento selettivo

Aspetto del liofilizzato
Aspetto della soluzione

pastiglia bassa compatta, leggermente friabile, incolore
limpida, incolore

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar Base CND : W0104010101; EDMA: 14.01.01.01; RDM: 1941318/R	Terreno in polvere	4011532	500 g (10,4 L)
BCSA Selective Supplement CND :W0104010104; EDMA: 14.01.01.04; RDM: 1941323/R	Supplemento liofilizzato	4240073	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7-MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

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

8-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}

Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9-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.

10-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 crescita 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.

11-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





12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le prestazioni sono state valutate con uno studio interno, preparando piastre di BCSA (REF 541153) con terreno BCSA 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 BCSA Base and BCSA Selective Supplement 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, diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ 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 alla diluizione 10⁻¹.

13-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 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.

14-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato.
- I terreni in polvere ed i supplementi contenuti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime 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 di sicurezza 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 i campioni come potenzialmente infettivi.
- Sterilizzare tutti i rifiuti biologici. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o 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.

15-CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno in polvere: conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento).

Supplemento selettivo: conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2-8 °C. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente.

16-BIBLIOGRAFIA

1. Sandle T. Burkholderia cepacia complex: Review of origins, risks and methodologies. 2018. www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/80557/burkholderia-cepaciacomplex-review-of-origins-risks-and-test-methodologies/
2. 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/>
3. 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.
4. 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-and-consistency-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	LOT Numero di lotto	IVD In vitro Diagnostic Medical Device	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Proteggere dalla luce e dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura

