



ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER

BCSA

BURKHOLDERIA CEPACIA SELECTIVE AGAR

Färdiga plattor



BCSA: *B.cepacia*-stammar: till vänster laktos/sukros-positiva till höger laktos/sukros-negativa.

1 – AVSEDD ANVÄNDNING

Produkt för *In vitro*-diagnostik. Selektivt och differentiellt medium för bestämning av frånvaro av *Burkholderia cepacia* komplex (Bcc) i icke-sterila farmaceutiska produkter enligt USP-metoden och för isolering av Bcc i kliniska prover, huvudsakligen från luftvägarna.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING *

Kaseinpepton	10 g
Jästextrakt	1,5 g
Laktos	10 g
Sackaros	10 g
Natriumklorid	5 g
Fenolrött	0,08 g
Kristallviolett	0,002 g
Agar	11,5 g
Vankomycin	0,0025 g
Gentamicin	0,010 g
Polymyxin B	600,000 UI
Renat vatten	1 000 ml

*Formuleringen kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de prestandakriterier som krävs.

3 – PRINCIP FÖR METODEN OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Burkholderia cepacia-komplexet (Bcc) är en grupp aeroba, gramnegativa, oxidas- och katalaspositiva stavar som omfattar 20 arter som fenotypiskt är nästan omöjliga att skilja åt och som kan indelas i nio genomvarer¹.

Bcc har hög metabolisk mångsidighet, stor spridning i miljön och varierande virulens. Dessutom har medlemmar av *B.cepacia*-komplexet förmågan att bilda biofilmer i farmaceutiska vattensystem samt förmågan att övervinna antimikrobiella konserveringssystem och vara resistenta mot desinfektionsmedel.²

Arterna i Bcc-gruppen är opportunistiska patogener hos mekaniskt ventilerade patienter, immunosupprimerade, spädbarn, äldre och personer med allvarliga underliggande sjukdomar.² Bcc orsakar allvarliga infektioner hos patienter med cystisk fibros och kronisk granulomatös sjukdom. Två Bcc-medlemmar, *B.cenocepacia* och *B.multivorans*, står för mer än 85% av infektionerna vid cystisk fibros.³

I en undersökning från 2012 analyserades de rapporterade återkallelserna från den amerikanska marknaden av icke-sterila farmaceutiska produkter, kosmetika, medicintekniska produkter och kosttillskott för mikrobiologiskt relaterade problem under en 7-årsperiod: majoriteten av dessa återkallelser (72 %) var förknippade med oacceptabla mikroorganismer och förekomsten av *B.cepacia* var den mest frekventa händelsen (34 %).⁴

Flera återkallelser av icke-sterila farmaceutiska produkter har också rapporterats under senare år.^{5,6}

FDA var tillräckligt oroad 2017 för att utfärda ett rådgivande meddelande om farorna med Bcc-kontaminering av vattenhaltiga, icke-sterila läkemedelsprodukter.⁷

Som svar på intressenternas önskemål publicerades en testmetod för bestämning av frånvaro av *Burkholderia cepacia*-komplex 2019 i kapitel <60> i USP, för att definiera testförfaranden och medieformuleringar⁸. Bland de olika odlingsmedier som beskrivs för isolering av *B.cepacia*, nämligen MAST, BCA, OFPBL, BCSA, föll valet på det senare på grund av dess förmåga att stödja en snabbare tillväxt av Bcc-isolat och att undertrycka andra respiratoriska organismer.^{2,9,10,11}

BCSA Burkholderia Cepacia Selective Agar är beredd enligt den formel som beskrevs av Heny 1997⁹ och uppfyller kraven i USP <60>⁸.

BCSA innehåller peptoner som ger näringsämnen för tillväxt av *Burkholderia cepacia* och andra mikroorganismer. Laktos och sackaros oxideras av de flesta Bcc-isolat och de sura slutprodukterna resulterar i att mediet skiftar från orange till gult på grund av närvaron av pH-indikatorn fenolrött. Kristallviolett tillsätts för att hämma tillväxten av grampositiva organismer; antimikrobiella ämnen som vankomycin, gentamicin och polymyxin B tillsätts för att hämma andra organismer än Bcc.

BCSA är avsett för bestämning av frånvaro av *Burkholderia cepacia*-komplex (Bcc) i icke-sterila farmaceutiska produkter enligt USP-metoden⁸ och för isolering av Bcc i kliniska prover, huvudsakligen från luftvägarna, hos patienter med cystisk fibros och andra luftvägssjukdomar.^{12,13}

4 – FYSISKA EGENSKAPER

Medelstort utseende	röd-orange, klar
Slutligt pH vid 25 °C	6,8 ± 0,3

5 – MATERIAL SOM TILLHANDAHÅLLS

Produkt	Typ	REF	Förpackning
BCSA Burkholderia Cepacia Selective Agar	Färdiga plattor	541153	2 x 10 plattor ø 90 mm Primär förpackning: 2 cellofanpåsar Sekundär förpackning: kartong





6 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Sterila slingar och pinnar, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

7 – PROVER

Farmaceutiska prover: icke-sterila produkter för inandning eller vattenhaltiga beredningar för oral, oromukosal, kutan eller nasal användning; följ det förfarande som beskrivs av USP för provberedning.⁸

Kliniska prover: BCSA-agar används för att påvisa *Burkholderia cepacia*-komplex från expektorerad sputum, djupa svalgpinna och aspirat, bronkoalveolärt lavage. Proverna skall skickas direkt till laboratoriet utan dröjsmål. Om behandlingen måste fördröjas skall proverna förvaras i kylskåp i högst 2 timmar.^{9,10,12} Samla om möjligt in prover före antimikrobiell behandling. God laboratoriepraxis ska tillämpas vid insamling, förvaring och transport till laboratoriet.

8 – TESTFÖRFARANDE

Farmaceutiska prover

Innan testet för bestämning av frånvaro av *Burkholderia cepacia*-komplex (Bcc) utförs måste metodens förmåga att detektera Bcc i närvaro av den produkt som ska testas fastställas (testmetodens lämplighet). Detaljerna i förfarandet beskrivs i USP <60>.⁸

Bered en spädning 1:10 av den produkt som skall undersökas med minst 1 g av produkten. Använd 10 ml eller den mängd som motsvarar 1 g eller 1 ml för att ympa en lämplig mängd (bestämd enligt beskrivningen i Testmetodens lämplighet) Tryptic Soy Broth eller en lämplig utspädning av Tryptic Soy Broth som bestäms under metodlämpligheten (till exempel kan en utspädning på 1:10 krävas vid frivillig testning av farmaceutiska vatten). Blanda och inkubera vid 30–35 °C i 48–72 timmar.

Subkultur genom strykning på en platta med BCSA och inkubering vid 30–35 °C i 48–72 timmar.

Kliniska prover

Inokulera 100 µL av det flytande salivet eller bronkoalveolära sköljningen på en BCSA-platta och sprid ut inokulum över hela agarplattans yta. Alternativt, om materialet odlas direkt från en bomullspinne, rulla bomullspinnen över ett litet område på ytan vid kanten; stryk sedan från detta inokulerade område.

Inkubera vid 35–37 °C i 48–72 timmar.

AMCLI-SIFC¹² rekommendation: inkubering vid 37 °C i 3 dagar följt av inkubering vid rumstemperatur i en vecka och kvantitativ upptäckt av CFU. UK SMI B 57¹³ rekommendation: inkubering vid 35–37 °C i 5 dagar med daglig avläsning av kulturer.

9 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Möjlig förekomst av Bcc indikeras genom tillväxt av grönbruna kolonier med gula halos, eller vita kolonier omgivna av en rosaröd zon på BCSA. All tillväxt på BCSA, typisk eller atypisk, bör bekräftas genom identifieringstest med biokemiska, immunologiska, molekylära och masspektrometriska tekniker efter rening av kolonierna på ett lämpligt medium.

10 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll.⁸

KONTROLLSTAMMAR	INKUBATIONSTEMPERATUR/ t / ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
<i>B.cepacia</i> ATCC 25416	35 °C / 48 timmar / A	god tillväxt
<i>B.cenocepacia</i> ATCC BAA-485 eller <i>B.multivorans</i> ATCC BAA-487	35 °C / 48 timmar / A	God tillväxt
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	35 °C / 72 timmar / A	Tillväxthämning
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	35 °C / 72 timmar / A	Tillväxthämning

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke som står för American Type Culture Collection

11 – PRESTANDAEGENSKAPER

Prestanda utvärderades med en intern studie genom att förbereda BCSA-plattor (REF 541153) med dehydrerad BCSA (REF 4011532) kompletterad med BCSA Selective Supplement (REF 4240073)

Prestanda utvärderades med kvalitativ ekometrisk teknik med inkubering vid 35 °C i 24–72 timmar, med 40 bakteriestammar, 18 kliniska isolat och 22 ATCC-derivat: *B.cepacia* 11, *B.cenocepacia* 2, *B.multivorans* 1, *P.aeruginosa* 15, *P.fluorescens* 2, *A.baumannii* 2, andra gramnegativa bakterier 4, grampositiva bakterier 2, jästsvamp 1.

Produktivitet: de 14 stammarna av *Burkholderia* spp. växte efter 24 timmar och morfologin och färgförändringarna var fullständiga efter 72 timmar.

Selektivitet: de övriga 25 bakteriestammarna och jästen hämmades fullständigt inom 72 timmar, med undantag för *Providencia stuartii* som inte hämmas av BCSA.

Produktiviteten utvärderades också med kvantitativ spread plate-teknik med Columbia Blood Agar (CBA)-plattor med 2 stammar av *B.cepacia*, 1 stam av *B.cenocepacia*, 1 stam av *B.multivorans* som referensmedium. Efter inkubation vid 35 °C i 48 timmar beräknades produktivetsförhållandet (CFU^{BCSA} / CFU^{CBA} x 100) och visade sig vara högre än 0,5.

Före försäljning testas ett representativt urval av alla partier av BCSA-plattor som är färdiga för användning och av de råmaterial som används för beredning av plattorna (dehydrerad BCSA-bas, REF 401153 och BCSA Selective Supplement, REF 4240073) för produktivitet och selektivitet genom att resultaten jämförs med en tidigare godkänd referensparti.

Produktiviteten testas med modifierad Miles-Misra ytdroppsmetod genom inokulering av plattorna med decimala spädningar i saltlösning från 10⁻¹ till 10⁻⁴ av en 0,5 McFarland-suspension av icke-målstammarna *P.aeruginosa* ATCC 9027, *P.fluorescens* ATCC 13525, *S.aureus* ATCC 6538, *E.faecalis* ATCC 29212, *B.subtilis* ATCC 6633, *C.albicans* ATCC 10231. Efter inkubering vid 35 °C i 72 timmar hämmas tillväxten av icke-målstammar vid spädningen 10⁻¹.





12 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Den gula färgförändringen i mediet indikerar nedbrytning av sackaros och/eller laktos som ger upphov till försurning; denna nedbrytning förekommer kanske inte i alla Bcc-stammar. Därför rekommenderas att alla typer av kolonier som odlas på BCSA utsätts för identifieringstester.
- Det finns rapporter om att stammar av *Burkholderia gladioli* och *Pseudomonas* spp. kan isoleras på BCSA.¹³
- Även om BCSA-mediets överlägsenhet för isolering av Bcc är erkänd, rapporterar Plonga¹⁴ att 7 stammar av 43 inokulerade (sensitivitet 86 %) inte växte på ett marknadsfört BCSA. Det är därför möjligt att det finns Bcc-stammar som kan vara känsliga för antibiotika som finns i mediet.
- Snabbväxande mykobakterier (RGM) kunde utvinna från rutinodlingar av prover från patienter med cystisk fibros genom att förlänga inkuberingen av BCSA till 7 dagar.¹⁵ Denna strategi för isolering av RGM ger dock fortfarande sämre resultat än användning av mer specifika medier.¹⁴
- Identifieringen av Bcc-medlemmar kan vara problematisk eftersom *B.cepacia* har en varierande genetisk sammansättning som gör det svårt att göra en korrekt identifiering med hjälp av fenotypiska tester. Många biokemiska testsystem har svårt att skilja mellan släktena *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas* och *Delftia*; detta förvärras när man försöker skilja inom *Burkholderia*-släktet (artmedlemmarna är fylogenetiskt mycket nära släkt med få skillnader i fråga om fenotypiska egenskaper). Till exempel är *B.cepacia* nära besläktad med bakteriearten *B. gladioli*.¹
- Testtiden för ett läkemedelsprov måste beaktas. Den mikrobiella tillväxtkinetiken hos många Bcc-organismer kan, på grund av deras återhämtning från förhållanden med låg näringshalt, ofta resultera i en förlängd fördröjningsfas. Dessutom kan vissa produkt ingredienser ha en inverkan på den mikrobiella tillväxtkinetiken: vid för tidig analys kan det finnas otillräckligt med bakterieceller för att en Bcc-förening ska kunna detekteras.¹
- USP-testets förmåga att detektera Bcc i närvaro av den produkt som skall testas måste fastställas. Inkubationstiden för metodens lämplighet får inte överskrida den kortaste angivna inkubationstiden.⁸
- Tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten av de mikroskopiska och/eller andra diagnostiska testerna.

13 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Denna produkt är inte klassificerad som farlig enligt gällande europeisk lagstiftning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren *före* och *efter slakt* samt kontroller under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att dessa produkter inte innehåller några överförbara patogener. Därför rekommenderas att de färdiga plattorna behandlas som potentiellt smittsamma och hanteras med iakttagande av de vanliga specifika försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE-uttalandet från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana S.r.l. har vidtagit för att minska risken för smittsamma djursjukdomar.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Varje platta med detta odlingsmedium är endast avsedd för engångsbruk.
- Färdiga plattor ska inte betraktas som en "steril produkt" eftersom de inte genomgår slutsterilisering, utan som en produkt med kontrollerad biologisk kontaminering, inom gränserna för de specifikationer som anges i kvalitetskontrollcertifikatet.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera oanvänt medium och plattor som har inokulerats med prover eller mikroorganismer i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Analyscertifikat och säkerhetsdatablad finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Detta gäller även i förhållande till eventuella rättigheter från tredje part. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

14 - FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvara plattorna i originalförpackningen vid 2–8 °C och skyddade från direkt ljus. Om de förvaras korrekt kan plattorna användas fram till utgångsdatumet. Använd inte plattorna efter detta datum. Plattor från öppnade plastpåsar kan användas i 7 dagar om de förvaras i en ren miljö vid 2–8 °C. Använd inte plattorna om plastpåsen är skadad eller om skålen är trasig. Använd inte plattor som visar tecken på försämring (t.ex. mikrobiell kontaminering, uttorkning, krympning eller sprickbildning i mediet, atypisk färg, överdriven fuktighet, osv.).

15 – REFERENSER











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-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.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

 REF eller REF Katalognummer	 LOT Batch-kod	 IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik	 Tillverkare	 Använd senast
 Temperaturbegränsning	 Innehållet räcker till <n> tester	 Se bruksanvisningen	 Endast för engångsbruk	 Ömtåligt, hantera med försiktighet

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Användningsinstruktioner (IFU) – Revidering 1	Uppdaterad layout och innehåll i enlighet med IVDR 2017/746	2020/05
Revidering 2	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/03

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

