

ISTRUZIONI PER L'USO

BCSA SELECTIVE SUPPLEMENT

Supplemento selettivo liofilizzato

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Miscela di sostanze antimicrobiche da aggiungere al terreno BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar Base 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 - FORMULA TIPICA

CONTENUTO DEL FLACONE PER 500 ML DI TERRENO

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

BCSA Selective Supplement è una miscela liofilizzata di antimicrobici da utilizzare come supplemento del terreno BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar Base per verificare l'assenza di *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) nei prodotti farmaceutici non sterili in accordo al metodo USP¹ e per l'isolamento di Bcc nei campioni clinici, principalmente di origine respiratoria per la diagnostica delle infezioni nei pazienti con fibrosi cistica o con altre patologie respiratorie^{2,3}.

Il terreno completo BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar è preparato in accordo alla formula descritta da Henry nel 1997⁴ ed a quanto indicato da USP <60>¹.

Gli antibiotici vancomicina, polimixina B, gentamicina sono inibitori dei batteri Gram positivi e dei batteri Gram negativi diversi da Bcc.

4 - METODO DI RICOSTITUZIONE E DI PREPARAZIONE DEL TERRENO

Ricostituire il contenuto di una fiala di BCSA Selective Supplement con 5 mL di acqua purificata sterile, usando le precauzioni dell'asepsi. Aggiungere a 500 mL di BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar Base (REF 401153) sterilizzato in autoclave e raffreddato a 47-50°C in condizioni asettiche. Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto del liofilizzato	pastiglia bassa compatta, leggermente friabile, incolore
Aspetto della soluzione	limpida, incolore

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
BCSA Selective Supplement	Supplemento liofilizzato	4240073	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

BCSA Burkolderia Cepacia Selective Agar Base (REF 401153), autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse e tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori 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>¹ 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.^{2,4,5}

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.¹

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 brodcultura 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-SIFC² 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 57³ 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 aloni 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.

11-CONTROLLO QUALITA' 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. È comunque facoltà 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.¹

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 Selective Supplement sono testati per la produttività e la selettività con il terreno di base BCSA Burkholderia Cepacia Selective Agar Base, avendo come riferimento lotti precedentemente approvati e considerati come Lotti di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *B.cepacia* ATCC 25416, *B.cepacia* ATCC 25608, *B.cepacia* e *B.multivorans* di isolamento clinico, *B.cenocepacia* ATCC BAA-245, *B.multivorans* ATCC BAA-247. 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 alle specifiche.

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 totalmente inibita.

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.³
- Pur essendo riconosciuta la superiorità del terreno BCSA per l'isolamento di Bcc, Plonga⁶ segnala la mancata crescita su un terreno BCSA del commercio di 7 ceppi su 43 seminati (sensibilità 86%). È 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).⁷ Questo espediente per l'isolamento di RGM fornisce comunque risultati inferiori rispetto all'uso di terreni più specifici.⁶
- 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*.⁸
- 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.⁸
- 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.¹
- 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

- Il supplemento 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 è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente; consultare la Scheda di Sicurezza prima dell'uso.
- BCSA Selective Supplement ed il terreno di base devono essere usati in associazione secondo le indicazioni sopra descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.





- BCSA Selective Supplement è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica per evitare lesioni.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il supplemento, i terreni di coltura e con gli agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione; smaltire il supplemento non utilizzato ed i terreni di coltura seminati con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare BCSA Selective Supplement come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano e animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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. 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

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; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto liofilo ed il prodotto ricostituito al momento dell'uso e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del ciclo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16-BIBLIOGRAFIA

1. USP <60> Microbiological Examination of Non-sterile Products: Tests for Burkholderia cepacia complex. December 1, 2019.
2. AMCLI-SIFC Raccomandazioni per l'esecuzione delle indagini microbiologiche di campioni delle vie respiratorie di pazienti con fibrosi cistica. 2010.
3. 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>.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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/

BCSA SELECTIVE SUPPLEMENT 4240073

SDS

Regolamento (UE) 2020/878

Contiene: gentamicina solfato, vancomicina HCL

Classificazione

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

Etichettatura

Pittogramma



Avvertenza Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P280 Indossare guanti protettivi.

P261 Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P333+P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364 Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.



**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 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
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2022
Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

