

plastlabor

10



plastlabor

10

Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc)
USP <60>

Introdução:

A contaminação microbiana de drogas farmacêuticas continua sendo uma ameaça à saúde pública nos Estados Unidos.

Os microrganismos patogênicos causam morbidade e, em alguns casos, mortalidade quando presentes em amostras ou processos farmacêuticos.

O complexo *Burkholderia cepacia* continua sendo o microrganismo número 1 causador de contaminações.

Contribui para isso a diversidade metabólica e genética exclusiva que promove a sobrevivência e o crescimento do Bcc em medicamentos e processos.

Pode ser constatado também quando não há validação dos sistemas, além de design inadequados.



Agenda

- **Estatística.**

- Apresentaremos dados recentes de contaminações e recall da FDA de 2012 à 2019 causados pela contaminação por Bcc.

- **Complexo *Burkholderia cepacia*.**

- Tipos de produtos contaminados, “Recall”, “OutBreaks”
- General Chapter <60>
- Como podemos ajudar na implementação.

Referência

- <https://www.workcast.com/ControlUsher.aspx?cpak=5193877696034990&pak=2270115023243515>
- **USP 42 - NF37 2019 <60>**



Dados 2011 – 2019 FDA

Contaminação Microbiológica

Jimenez, L. 2019. Analysis of FDA enforcement reports (2012-2019) to determine the microbial diversity in contaminated non-sterile and sterile drugs. American Pharmaceutical Review 22 September/October:48-73.

Microorganism	2012-2019	2004-2011	1995-2006
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1 S	1 NS	0
<i>Aspergillus spp.</i>	4 S	1 NS	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 NS	0	0
<i>Bacillus circulans</i>	1 S	0	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1 S	0	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	102 NS	35 NS	35 (30 NS, 5 S)
<i>Burkholderia contaminans</i>	1 NS	0	0
<i>Burkholderia gladioli</i>	1 NS	0	0
<i>Burkholderia multivorans</i>	1 NS	0	0
<i>Clostridium difficile</i>	13 NS	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2 NS	1 NS	0
<i>Herbaspirillum huttiense</i>	1 S	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 S	0	0
<i>Paecilomyces saturates</i>	1 NS	0	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	1 NS	2 NS	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 NS	7 NS	20 (19 NS, 1 S)
<i>Ralstonia pickettii</i>	45 NS	0	3 (2 NS, 1 S)
<i>Rhinocladiella similis</i>	1 NS	0	0
<i>Salmonella</i>	28 NS	2 NS	6 NS
<i>Sarcina lutea</i>	1 NS	0	0
<i>Serratia liquefaciens.</i>	6 NS	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 NS	1	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4 NS	0	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	1 S	1 NS	0
<i>Spingomonas paucimobilis</i>	2 (1 NS, 1S)	0	0
<i>Variovorax paradoxus</i>	1 S	0	0



Dados 2011 – 2019 FDA - Recall

Jimenez, L. 2019. Analysis of FDA enforcement reports (2012-2019) to determine the microbial diversity in contaminated non-sterile and sterile drugs. American Pharmaceutical Review 22 September/October: 48-73.

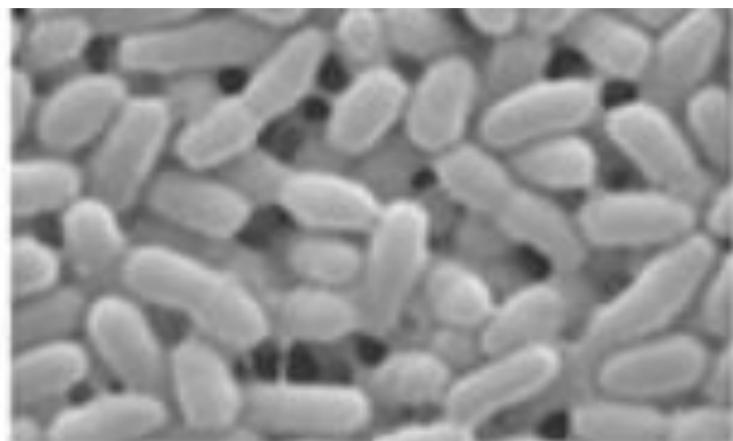
Yearly drug recalls by *B. cepacia* contamination from June 2012 - June 2019.

Year	Recalls
2012	6
2013	0
2014	0
2015	0
2016	11
2017	25
2018	4
2019	56



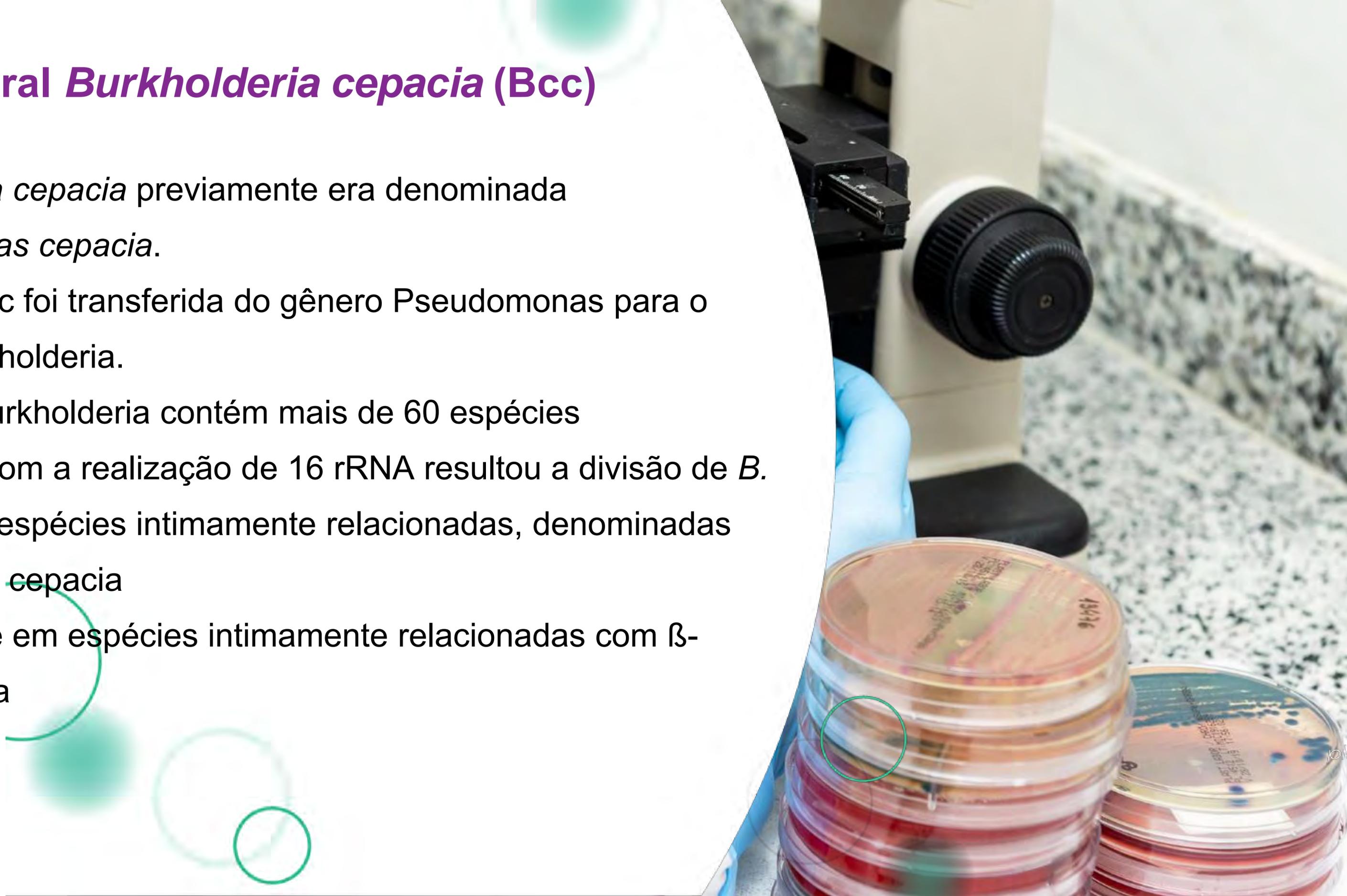
Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc)

- Desde 2007, o Complexo *Burkholderia cepacia* é o isolado número 1 em produtos de Recalls em USA, quando a contaminação é identificada.



Visão Geral *Burkholderia cepacia* (Bcc)

- *Burkholderia cepacia* previamente era denominada *Pseudomonas cepacia*.
- Em 1992 Bcc foi transferida do gênero *Pseudomonas* para o gênero *Burkholderia*.
- ✓ O gênero *Burkholderia* contém mais de 60 espécies
- Mais tarde com a realização de 16 rRNA resultou a divisão de *B. cepacia* em espécies intimamente relacionadas, denominadas complexo *B. cepacia*
- ✓ Bcc consiste em espécies intimamente relacionadas com β -proteobactéria



Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc)

- Bactéria Gram Negativa
- 20 diferentes espécies, mas fenotipicamente similares
- As espécies do complexo Bcc são isoladas frequentemente no ambiente, água, solo, plantas e nos seres humanos, podem colonizar o trato respiratório.
- Patógeno oportunista causando infecções respiratórias crônicas em pacientes imunossuprimidos como pacientes com fibrose cística e hemoglobinopatias das células falciformes
- São frequentemente resistentes aos antibióticos conhecidos
- Compartilham até 78% de seus genes
- Estrutura Genômica = bem diferente de outras bactérias, **tipicamente** possuem 3 cromossomos e um grande plasmídeo.



Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc)

Bcc currently comprises 21 species (3):

- *Burkholderia cepacia*
- *Burkholderia multivorans*
- *Burkholderia stabilis*
- *Burkholderia vietnamiensis*
- *Burkholderia ambifaria*
- *Burkholderia anthina*
- *Burkholderia pyrrocinia*
- *Burkholderia latens*
- *Burkholderia diffusa*
- *Burkholderia arboris*
- *Burkholderia seminalis*
- *Burkholderia cenocepacia*
- *Burkholderia contaminans*
- *Burkholderia dolosa*
- *Burkholderia lata*
- *Burkholderia ubonensis*
- *Burkholderia metallica*
- *Burkholderia pseudomultivorans*
- *Burkholderia puraquae*
- *Burkholderia stagnalis*
- *Burkholderia territorii*

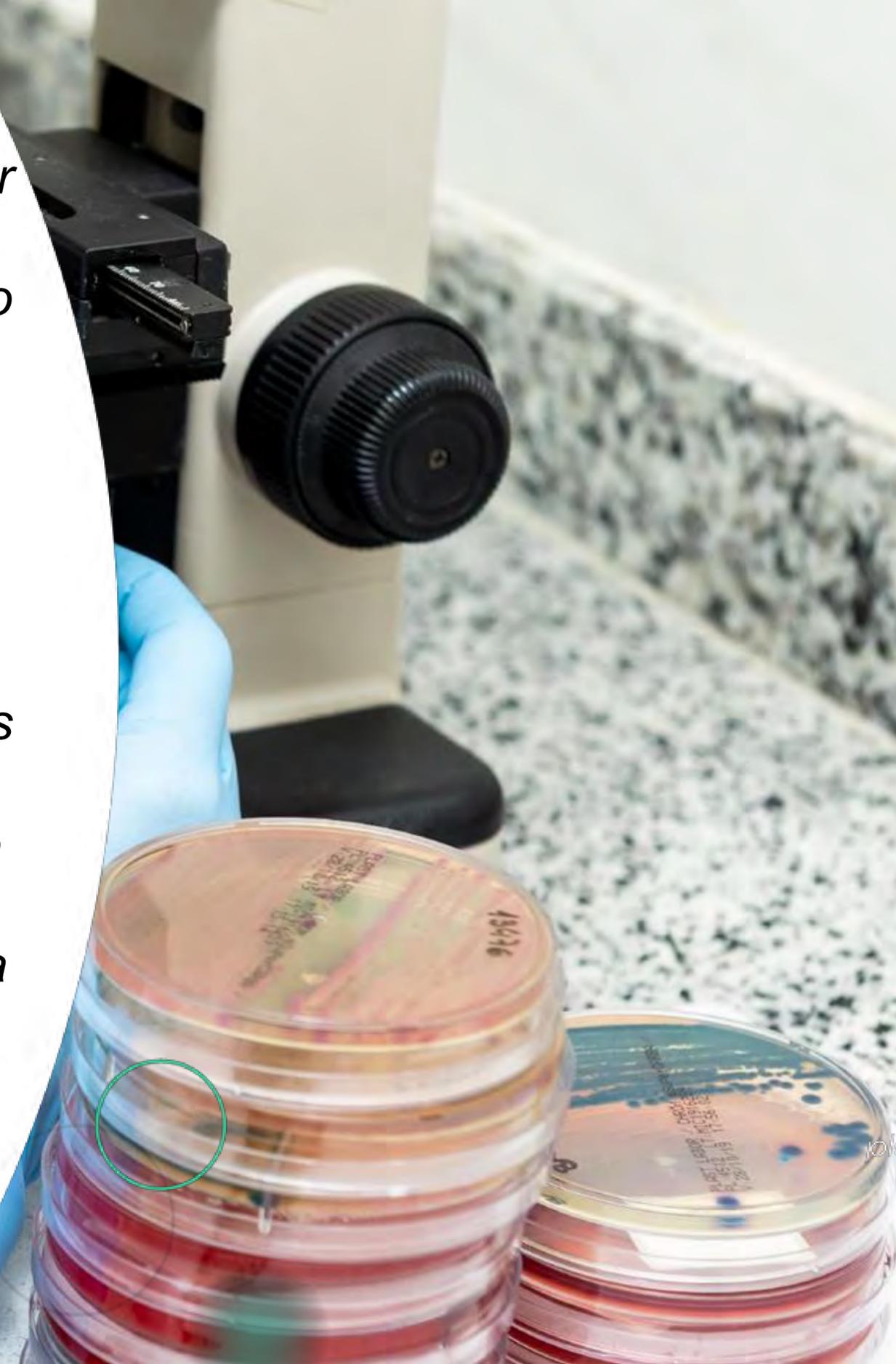


Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc)

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) é um grupo constituído por nove espécies de bactérias patogénicas oportunistas na fibrose cística (FC), associadas a prognóstico mais reservado e a infecção cruzada entre os doentes. Existe grande heterogeneidade na deterioração pulmonar dos doentes colonizados/infectados com Bcc, evoluindo, por vezes, de forma fulminante – síndrome da cepacia.

Com o objetivo de avaliar a relação entre a colonização/infecção com as diferentes espécies do Bcc e a evolução clínica, os autores analisaram, retrospectivamente, 31 doentes com FC acompanhados no Hospital de Santa Maria com isolamentos entre Janeiro de 1995 e Março de 2006. Os doentes foram divididos em grupos. (Departamento da Criança e da Família, Hospital de Santa Maria – Lisboa – Portugal)

A prevalência das espécies do Bcc foi: *B. cepacia* 57%, *B. cenocepacia* 43%, *B. multivorans* 7%, *B. stabilis* 13%. Três doentes faleceram com síndrome da cepacia.



Quais os tipos de produtos foram contaminados pelo Bcc?

- ❑ De acordo com reportes do FDA de 2012 – 2019 (1º semestre)
- 1. **Diecto Líquido (Laxante - Docusato de Sódio)**
 - ✓ **Motivo Recall:** Contaminação microbiana em produtos não estéreis, com *Burkholderia cepacia*.
- 2. **Descongestionante e Antialérgico**
 - ✓ **Motivo Recall:** Iniciado como medida preventiva devido ao potencial risco de contaminação do produto com *Burkholderia cepacia*.
- 3. **Lenços de Limpeza Anti-séptica, Anti-séptico de Primeiros Socorros, Cloreto de Bezalcônio**
 - ✓ **Motivo Recall:** Contaminação microbiana em produtos não estéreis, com *Burkholderia cepacia*.



Quais os tipos de produtos foram contaminados pelo Bcc?

4. **Suspensão Oral de Nistatina, Concentrado Oral de Cloridrato de Metadona, Solução Oral de Acetaminofeno Hidrocodona Bitartarato**
 - ✓ **Motivo Recall:** Água purificada utilizada na produção de produtos pode ter sido contaminada com *Burkholderia cepacia*.
5. **Supositórios Hemorroidais**
 - ✓ **Motivo Recall:** Produto potencialmente contaminado com *Burkholderia cepacia* e *Ralstonia pickettii*.



Outras espécies do Complexo Bcc encontradas em recall

1. Suspensão Oral de Cloridrato de Difenidramina

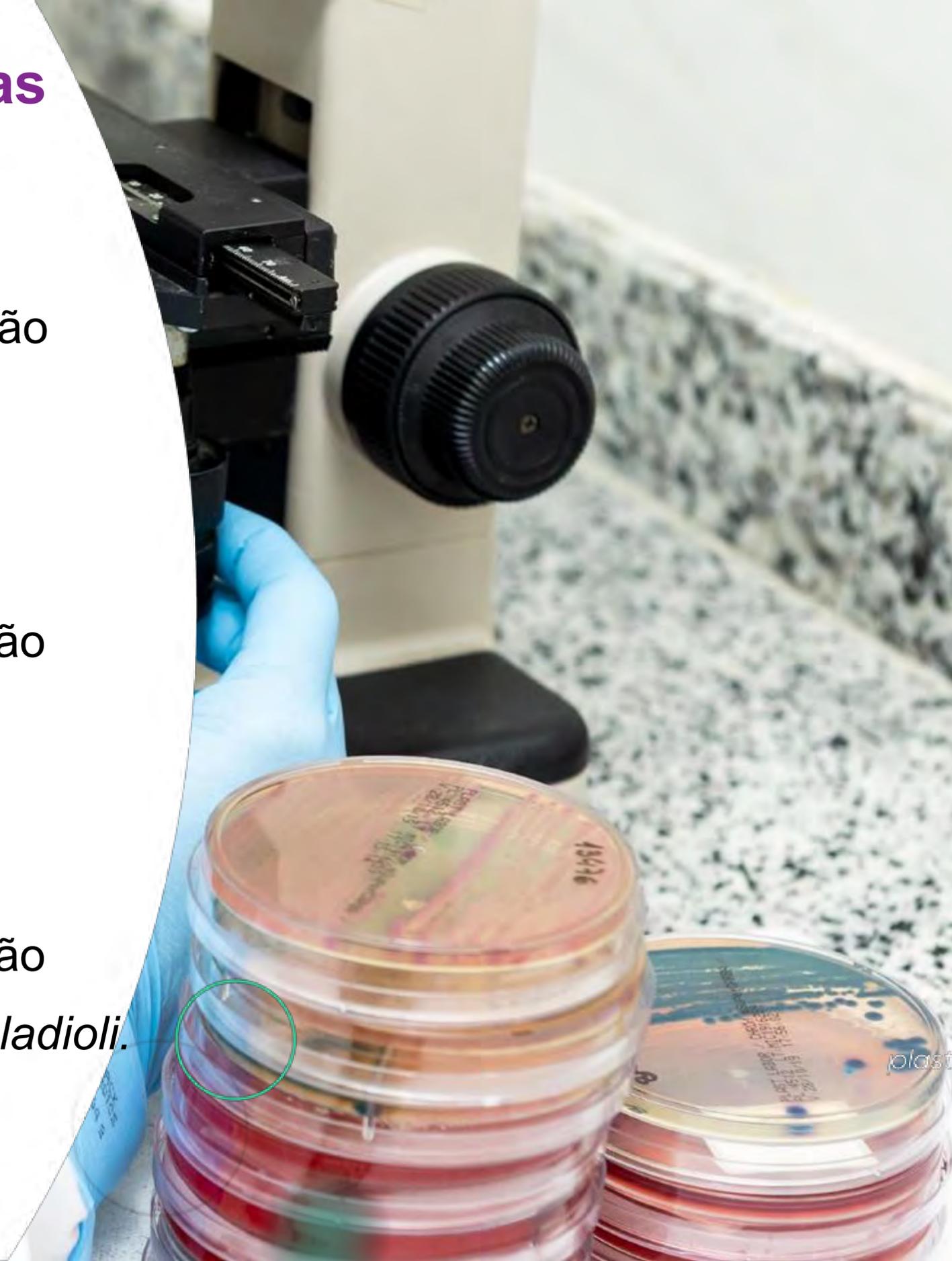
- ✓ **Motivo Recall:** Contaminação microbiana em produtos não estéreis, potencialmente contaminado com *Burkholderia multivorans*.

2. Enxaguatório Bucal Anti-séptico

- ✓ **Motivo Recall:** Contaminação microbiana em produtos não estéreis, potencialmente contaminado com *Burkholderia contaminans*.

3. Anestésico Anti-séptico

- ✓ **Motivo Recall:** Contaminação microbiana em produtos não estéreis, potencialmente contaminado com *Burkholderia gladioli*.
(Não Bcc, mas fortemente relacionada).



Outbreaks em USA

1. Contaminação em Docusato de Sódio Líquido

- ✓ Investigação conduzida de Janeiro – Outubro de 2016
- ✓ Adultos e crianças foram afetados (não FC pacientes)
- ✓ Dois métodos de identificação foram utilizados, dentre um deles, WGS - sequenciamento completo do genoma para identificar isolados do Bcc.
- ✓ 12 estados envolvidos
- ✓ 108 casos reportados
- ✓ 14 mortes
- ✓ 2 grupos distintos foram reportados: um *B. contaminantes* e outro, pertencente a um novo grupo.
- ✓ Causa raiz: más práticas de fabricação e contaminação de água purificada.



Outbreaks na Alemanha

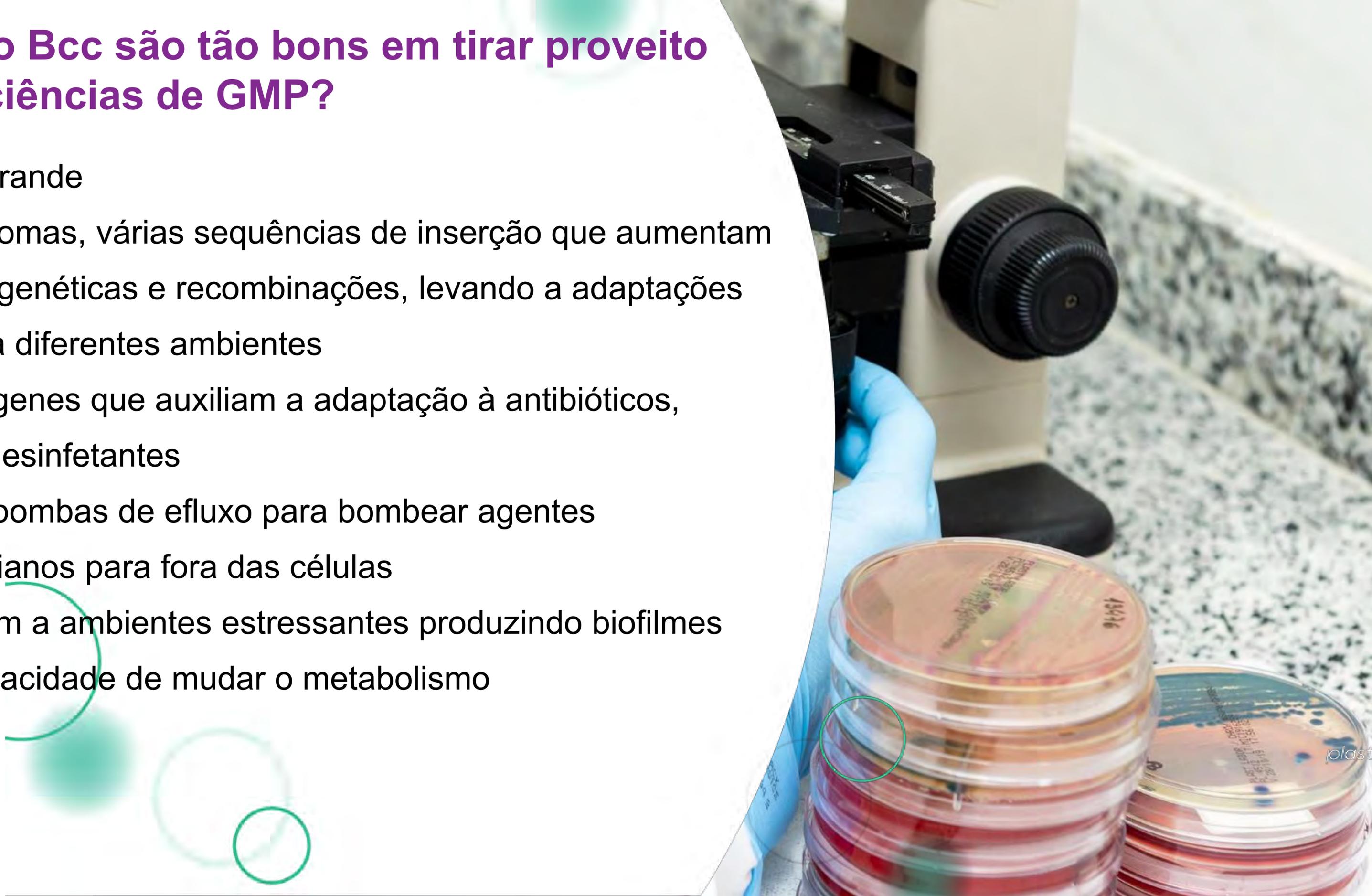
1. Solução de Enxaguatório Bucal Octenidina

- ✓ Investigação conduzida entre Agosto – Setembro de 2018
- ✓ 3 pacientes desenvolveram infecção
- ✓ 2 mortes
- ✓ Identificação genômica de Bcc, também por WGS, encontrou similaridade com a identificação das amostras dos pacientes com os produtos analisados
- ✓ Causa raiz: Sistema de Água com implicações.



Por que o Bcc são tão bons em tirar proveito das deficiências de GMP?

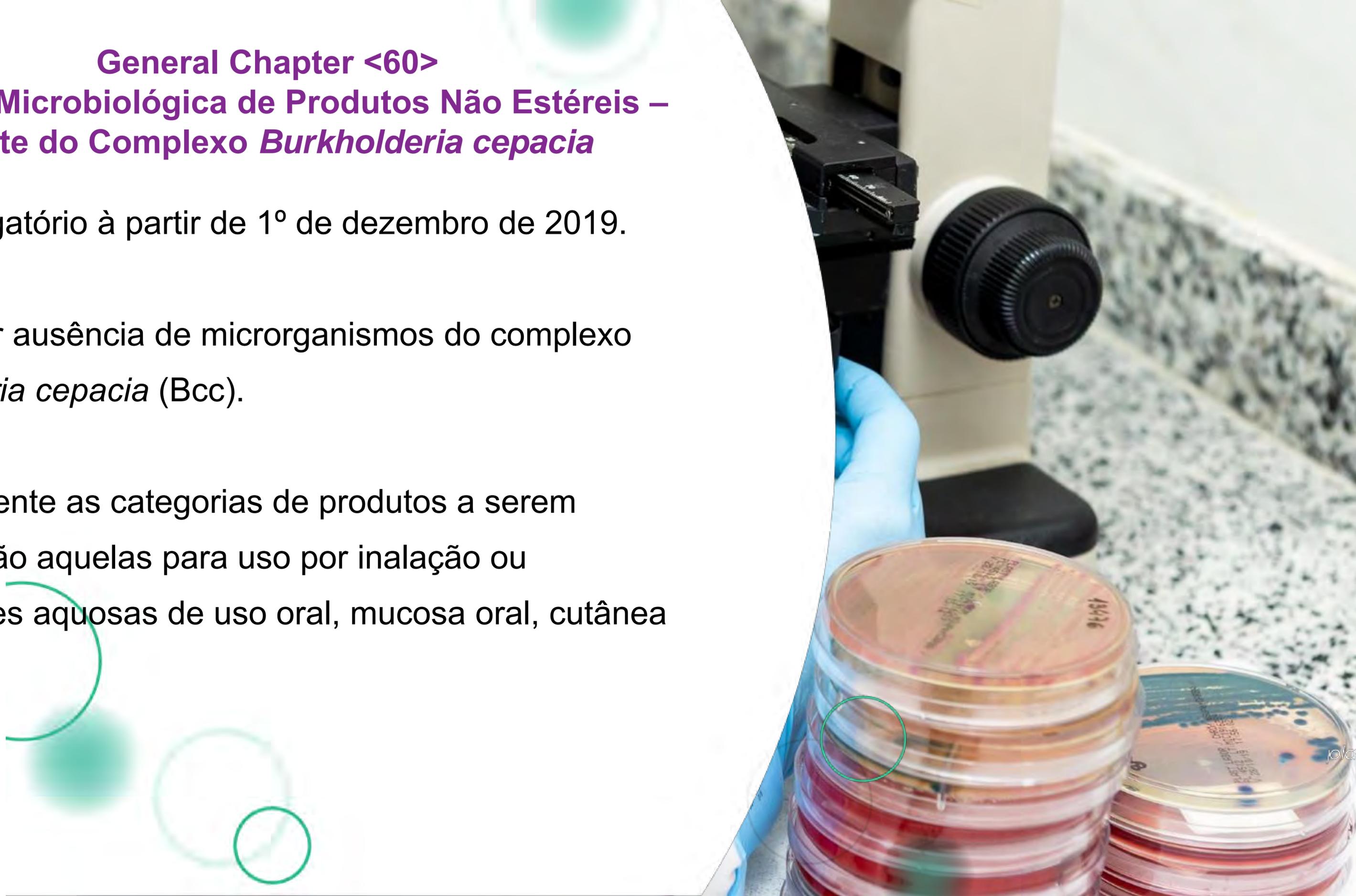
- ✓ Genoma grande
- ✓ 4 cromossomas, várias sequências de inserção que aumentam mutações genéticas e recombinações, levando a adaptações ideais para diferentes ambientes
- ✓ Possuem genes que auxiliam a adaptação à antibióticos, biocidas, desinfetantes
- ✓ Possuem bombas de efluxo para bombear agentes antimicrobianos para fora das células
- ✓ Se adaptam a ambientes estressantes produzindo biofilmes
- ✓ Tem a capacidade de mudar o metabolismo



General Chapter <60>

Análise Microbiológica de Produtos Não Estéreis – Teste do Complexo *Burkholderia cepacia*

- Teste obrigatório à partir de 1º de dezembro de 2019.
- Determinar ausência de microrganismos do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc).
- Especialmente as categorias de produtos a serem testados são aquelas para uso por inalação ou preparações aquosas de uso oral, mucosa oral, cutânea ou nasal.



General Chapter <60>

Análise Microbiológica de Produtos Não Estéreis – Teste do Complexo *Burkholderia cepacia*

• Composição do Capítulo:

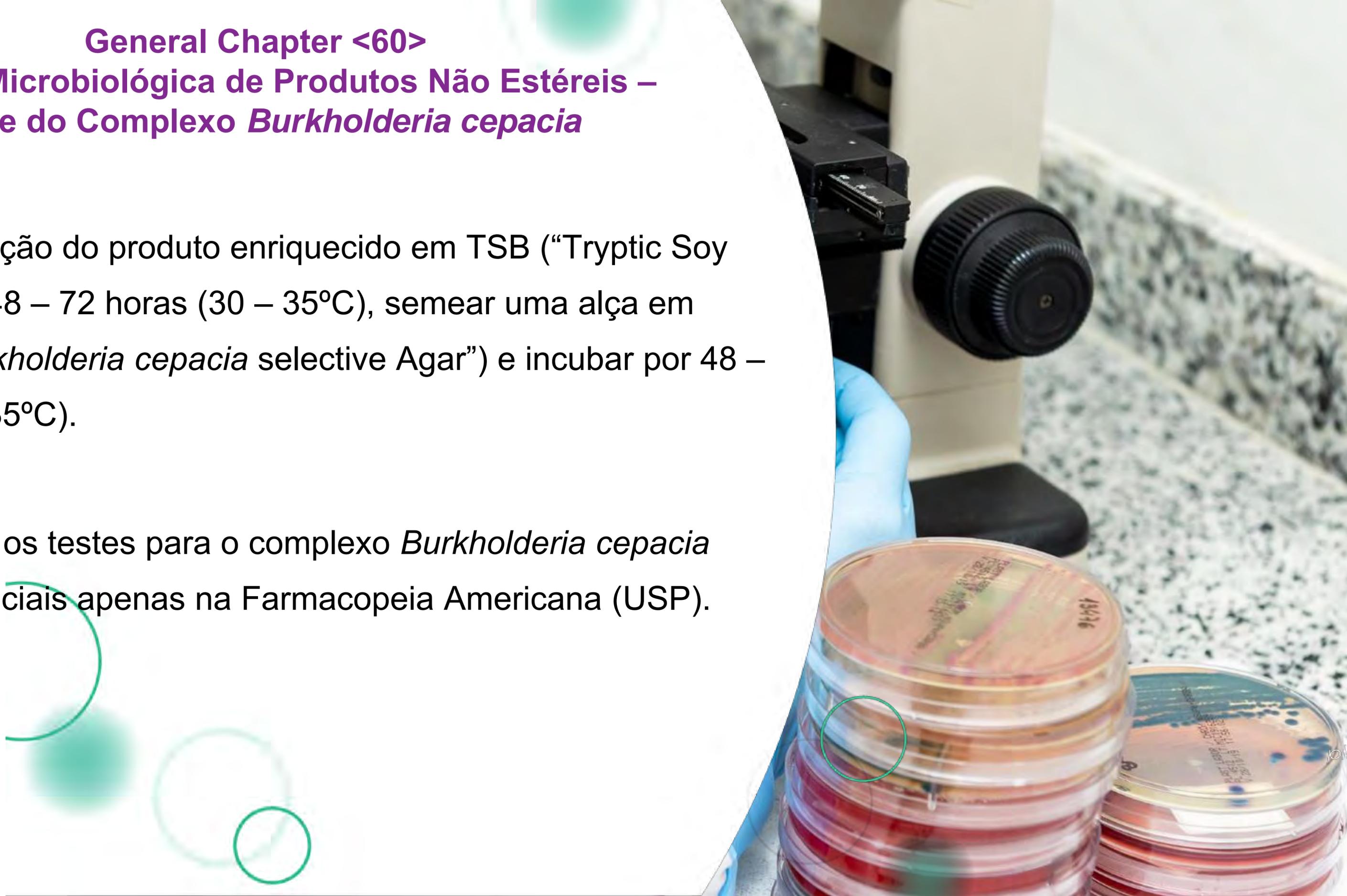
- Promoção de Crescimento e Propriedades Inibitórias do meio de cultura e Teste de Adequação para o Teste de Ausência de Bcc.
- ✓ Preparação das cepas de teste
- ✓ Controles negativos
- ✓ Propriedades de Promoção de Crescimento em meio de cultura sólido
- ✓ Propriedade Inibitória
- ✓ Propriedade Indicativa
- ✓ Teste de Adequação do Método
- ✓ Procedimento do Teste
- ✓ Recomendação do Meio de Cultura.



General Chapter <60>

Análise Microbiológica de Produtos Não Estéreis – Teste do Complexo *Burkholderia cepacia*

- Após incubação do produto enriquecido em TSB (“Tryptic Soy Broth”) por 48 – 72 horas (30 – 35°C), semear uma alça em BCSA (“*Burkholderia cepacia* selective Agar”) e incubar por 48 – 72°C (30 – 35°C).
- Atualmente, os testes para o complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) são oficiais apenas na Farmacopeia Americana (USP).



General Chapter <60>

Análise Microbiológica de Produtos Não Estéreis – Teste do Complexo *Burkholderia cepacia*

Agar BCSA – Interpretação

- ✓ Os agentes seletivos cristal violeta, a polimixina B, gentamicina e a vancomicina, inibem organismos comumente encontrados nas secreções respiratórias que não sejam o Bcc.
- ✓ Sacarose e lactose são carboidratos para enriquecimento e diferenciação com vermelho de fenol como indicador de pH.
- ✓ A presença de bactérias do Bcc é indicada pelo crescimento de colônias marrom-esverdeadas com halo amarelo ou colônias brancas cercadas por uma zona vermelho-rosa no BCSA



General Chapter <60>
Análise Microbiológica de Produtos Não Estéreis –
Teste do Complexo *Burkholderia cepacia*

Agar BCSA – Interpretação

- ✓ Qualquer crescimento no BCSA é confirmado com testes de identificação.
- ✓ Verificar “*Microbial Characterization identification and Stain Typing*” <1113> para mais informações.



Identificação do crescimento positivo no BCSA?

- Ao longo de anos tem sido um desafio a identificação rápida e precisa de *B. cepacia*
- A identificação pode ser um problema, uma vez que *B. cepacia* tem uma composição genética diversificada, dificultando a identificação precisa para os testes fenotípicos
- Identificação Bioquímica – Bcc são fenotipicamente similares. A indicação é de sempre confirmar com identificação genômica.



Identificação do crescimento positivo no BCSPA?

- Identificação 16S RNA (método considerado “gold standard”. É simples, rápido, sensível e específico
- WGS - sequenciamento completo do genoma
- MLST (digitação de sequências de foco múltiplo) – técnica de biologia molécula para a digitação de múltiplos loci. O procedimento caracteriza isolados de espécies microbianas usando as sequências de DNA de fragmentos internos de múltiplos genes de manutenção. No caso de Bcc, deve ser utilizado 7 desses genes para tentar identificar e distinguir entre os diferentes tipos de Bcc.



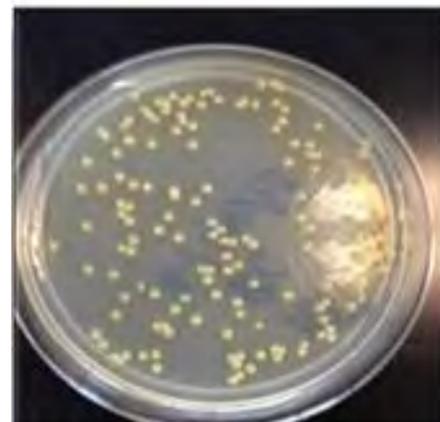
Compliance com General Chapter <60>

1. Teste de Promoção de Crescimento e Adequação do Produto utilizando inóculo com menos de 100UFC de:

***B. cepacia* ATCC 25416**

***B. cenocepacia* ATCC BAA-245**

***B. multivorans* ATCC BAA-247**



Requerimentos

- Realizar GPT em cada novo lote de meio de cultura adquirido pronto para uso ou preparado no laboratório, em paralelo com um meio de cultura previamente aprovado.
- Inocular o meio de cultura com não mais que 100 UFC de cada microrganismo para propriedades de Promoção de Crescimento e Indicativa. Inocule o meio de cultura com pelo menos 100 UFC com o microrganismo apropriado para propriedade Inibitória.
- Os microrganismos devem ser rastreáveis de uma Cultura de Coleção de Referência e devem estar em não mais do que 5 passagens da Cultura de Referência.



Requerimentos

- Compare o crescimento no novo meio de cultura com o crescimento no meio previamente aprovado
- O crescimento deve ser "comparável". Não existe na USP a definição de quantidade do que é "comparável"
- Em paralelo realizar o controle do inóculo em ágar não seletivo: deve haver ≤ 100 UFC
- E se não houver lote previamente aprovado? Considere adicionar outros Analistas do Laboratório. Use um número significativo de replicatas. A média das médias pode ser considerada como ponto de referência.



Requerimentos

Growth Promotion and Inhibitory Properties of the Media

Test each batch of ready-prepared medium and each batch of medium prepared either from dehydrated medium or from ingredients. Verify suitable properties of relevant media as described in *Table 1*.

Test for Growth-Promoting Properties, Liquid Media—Inoculate a portion of the appropriate medium with a small number (not more than 100 cfu) of the appropriate microorganism. Incubate at the specified temperature for not more than the shortest period of time specified in the test. Clearly visible growth of the microorganism comparable to that previously obtained with a previously tested and approved batch of medium occurs.

Test for Growth-Promoting Properties, Solid Media—Perform *Surface-Spread Method* (see *Plate-Count Methods* under *Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests* (61)), inoculating each plate with a small number (not more than 100 cfu) of the appropriate microorganism. Incubate at the specified temperature for not more than the shortest period of time specified in the test. Growth of the microorganism comparable to that previously obtained with a previously tested and approved batch of medium occurs.



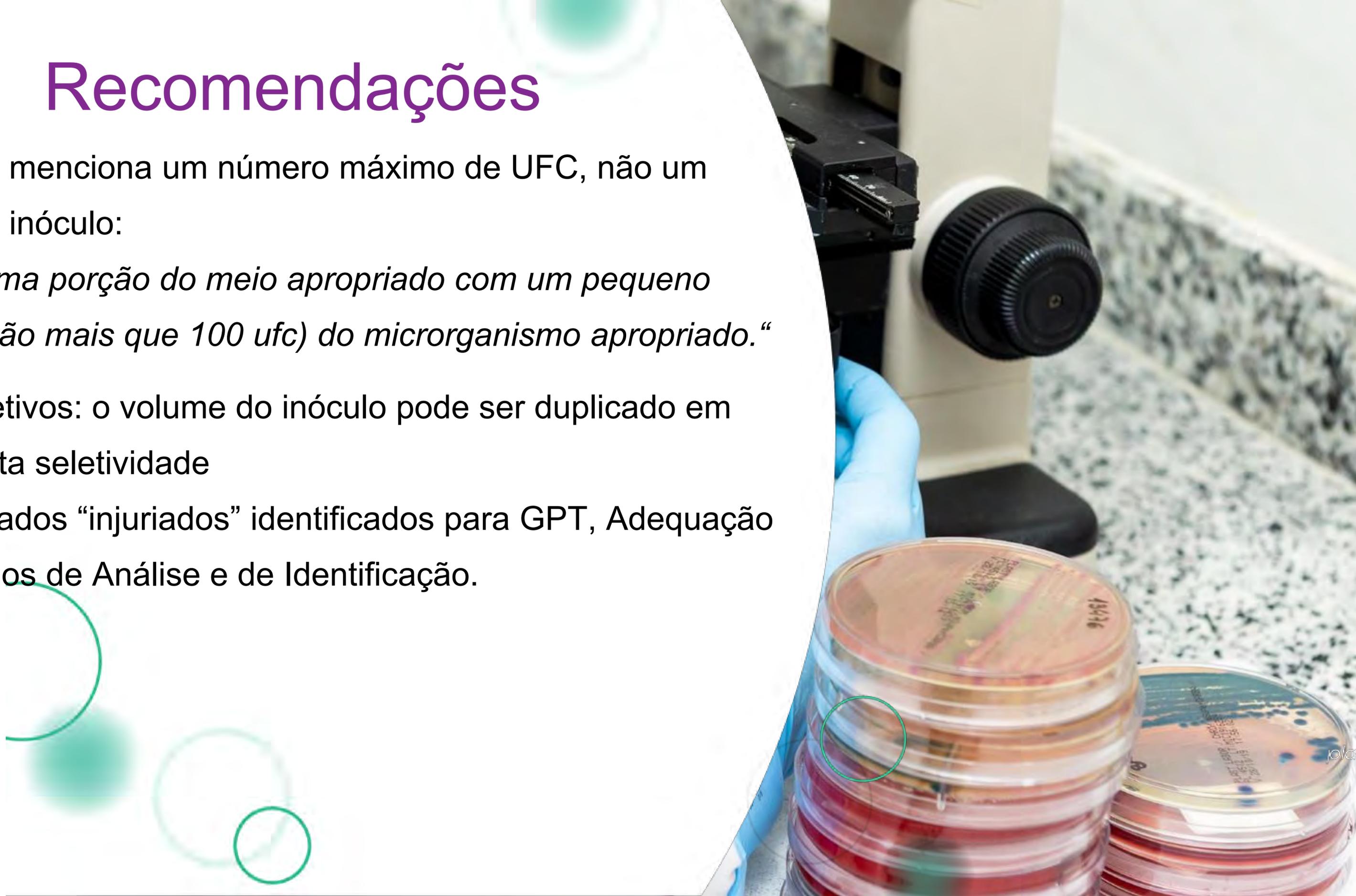
General Chapter <60>

Type of Medium	Microorganism	Properties	Temperature	Incubation Period	Colony Morphology
Burkholderia cepacia Selective Agar (BCSA)	Burkholderia cepacia	Growth Promoting and Indicative	30°C-35°C	48 hours	Greenish-brown colonies with yellow halos, or white colonies surrounded by a pink-red zone
	Burkholderia cenocepacia	Growth Promoting and Indicative	30°C-35°C	48 hours	Greenish-brown colonies with yellow halos, or white colonies surrounded by a pink-red zone
	Burkholderia multivorans	Growth Promoting and Indicative	30°C-35°C	48 hours	Greenish-brown colonies with yellow halos, or white colonies surrounded by a pink-red zone
	Pseudomonas aeruginosa	Inhibitory	30°C-35°C	72 hours	Inhibition
	Staphylococcus aureus	Inhibitory	30°C-35°C	72 hours	Inhibition



Recomendações

- USP <61> menciona um número máximo de UFC, não um volume de inóculo:
 - *"Inocule uma porção do meio apropriado com um pequeno número (não mais que 100 ufc) do microrganismo apropriado."*
- Meios seletivos: o volume do inóculo pode ser duplicado em caso de alta seletividade
- Utilize isolados "injurados" identificados para GPT, Adequação dos Métodos de Análise e de Identificação.



Como a PlastLabor pode auxiliar na Implementação do General Chapter <60>



plastlabor

Lançamento Plastlabor

Ágar *Burkholderia cepacia* (BCSA)
Atende a especificação da formulação USP <60>

Indicado para análise de produto acabado que atenda com a especificação para a ausência do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), especialmente aqueles para uso em inalação, uso oral, mucosa oral, cutânea, ou nasal para os pacientes de alto risco. Em nosso portfólio você também encontrará todas as cepas derivativas ATCC® requeridas para o Teste de Promoção de Crescimento e Teste Inibitório.



Como a PlastLabor pode auxiliar na Implementação do General Chapter <60>



Catalog Number and Strain

0488A	<i>Burkholderia cepacia</i> derived from ATCC® 25416™*
01269A	<i>Burkholderia cenocepacia</i> derived from ATCC® BAA-245™*
01270EGPT	<i>Burkholderia multivorans</i> derived from ATCC® BAA-247™
0484A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> derived from ATCC® 9027™*
0485A	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> derived from ATCC® 6538™*

Catalog Number and Strain

0488E7	<i>Burkholderia cepacia</i> derived from ATCC® 25416™*
00000	<i>Burkholderia cenocepacia</i> derived from ATCC® BAA-245™
01270E7	<i>Burkholderia multivorans</i> derived from ATCC® BAA-247™*
0484E7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> derived from ATCC® 9027™*
0485E7	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> derived from ATCC® 6538™*

Resumo

1. Complexo Bcc número 1 razão de recall em produtos em USA

2. Vantagens das deficiências dos processos de GMP tiradas por bactérias do Complexo Bcc.

3. Requerimentos General Chapter <60>

4. Como a PlastLabor pode auxiliar sua implementação.



Obrigada!
leticia.dias@plastlabor.com

Referências:

- The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. – Revista de Pneumologia - Rev Port Pneumol 2008; XIV (1): 5-26. *Palavras-chave: Complexo Burkholderia cepacia (Bcc), fibrose cística (FC), B. cepacia, B. cenocepacia, B. multivorans, B. stabilis.*
- Webinar MBL *Burkholderia cepacia* Contamination of Pharmaceutical Products and compliance with USP <60>:
<https://www.workcast.com/ControlUsher.aspx?cpak=5193877696034990&pak=2270115023243515>
- USP 42 <60> (2019)

plastlabor

10



plastlabor

10

Plast Labor Indústria e Comércio de Equipamento Hospitalar e Laboratório Ltda

(21) 2501.0888 / (11) 3862.9008

www.plastlabor.com.br

plabor@plastlabor.com.br

Rua Vaz da Costa, 103, Inhaúma

Rio de Janeiro - RJ