

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO MICROBIOLÓGICO USP-NF:
DETECCIÓN DEL COMPLEJO *Burkholderia cepacia* UFC/g o mL, EN
PRODUCTOS NO ESTÉRILES**

ASTRID CAROLINA GIL ROJANO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
MEDELLÍN
2021**

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO MICROBIOLÓGICO USP-NF:
DETECCIÓN DEL COMPLEJO *Burkholderia cepacia* UFC/g o mL, EN
PRODUCTOS NO ESTÉRILES**

ASTRID CAROLINA GIL ROJANO

Informe de Pasantías para optar al Título Profesional de Microbióloga

RAMÓN OVIDIO GARCÍA RICO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
MEDELLÍN
2021**

ÍNDICE

	pág.
INTRODUCCIÓN	9
1. OBJETIVOS	11
1.1 OBJETIVO GENERAL	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. MARCO REFERENCIAL	13
3.1 PRODUCTOS NO ESTÉRILES	13
3.2 COMPLEJO <i>Burkholderia cepacia</i> (CBc)	14
3.2.1 Generalidades	14
3.2.2 Características microbiológicas	15
3.2.3 Hábitat, difusión y transmisión interhumana	16
3.2.4 Patogenicidad del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> (Cbc)	18
3.2.4.1 Adherencia a las células epiteliales pulmonares	18
3.2.4.2 Sideróforos	19
3.2.4.3 Sistemas de transporte	20
3.2.4.4 Biofilms	21
3.2.4.5 Exopolisacparidos (EPS)	22
3.2.4.6 Resistencia al estrés oxidativo y evasión del sistema inmune	23

3.3 DATOS EPIDEMIOLÓGICOS NACIONALES E INTERNACIONALES	24
3.4 NORMATIVIDAD PARA EL COMPLEJO <i>Burkholderia cepacia</i> (CBc) EN PRODUCTOS NO ESTÉRILES	26
3.5 COMPLEJO <i>Burkholderia cepacia</i> (CBc) EN COSMÉTICOS Y MEDICAMENTOS NO ESTÉRILES	29
3.6 VALIDACIÓN	33
3.7 VERIFICACIÓN	34
3.8 PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	35
3.9 MÉTODO NORMALIZADO	35
3.9.1 Sensibilidad	35
3.9.2 Selectividad/especificidad	36
3.9.3 Límite de detección	37
4. METODOLOGÍA	39
4.1 PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN	39
4.1.1 Reactivación de las cepas de <i>Burkholderia cepacia</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
4.1.2 Estandarización de los inóculos	39
4.1.3 Preparación de muestras y pre-incubación	40
4.1.4 Selección y subcultivo	40
4.1.5 Interpretación	40
4.1.6 Tipificación de <i>Burkholderia cepacia</i>	41
4.2 MATRICES UTILIZADAS	41
4.3 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE MÉTODO EVALUADAS	43
4.4 REACTIVOS, MATERIALES, EQUIPOS Y CEPAS	45

(Continuación)	pág.
4.4.1 Reactivos	45
4.4.2 Materiales	45
4.4.3 Equipos	46
4.4.4 Cepas de referencia	46
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	47
6. RESULTADOS	49
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
8. CONCLUSIONES	61
9. RECOMENDACIONES	62
10. GLOSARIO	63
11. BIBLIOGRAFÍA	65
12. ANEXOS	76

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Características de desempeño analítico utilizadas para validación de métodos compendiales según la USP 42 – NF 37 Capítulo 1225.	33
Tabla 2. Concentración inicial y concentración final de <i>Burkholderia cepacia</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	40
Tabla 3. Muestras seleccionadas.	42
Tabla 4. Parámetros de desempeño utilizados para la verificación del método.	44
Tabla 5. Cronograma de actividades.	47
Tabla 6. Resultados obtenidos de las siembras en agar <i>Burkholderia cepacia</i> (BCSA).	49
Tabla 7. Resultados obtenidos de las características de desempeño.	51

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. Sistemas de secreción de bacterias gramnegativas.	21
Imagen 2. Modelo de desarrollo del biofilm.	22
Imagen 3. Interacciones entre una bacteria del CBc y las células inmunes.	24
Imagen 4. Aislamiento de <i>Burkholderia cepacia</i> en Agar BCSCA a partir de la Muestra 6.	50
Imagen 5. Mecanismo de acción de la polimixina B. A: unión de la polimixina B al lipopolisacárido, B: alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular.	55
Imagen 6. Mecanismo de acción de la gentamicina.	56
Imagen 7. Mecanismo de acción de la vancomicina.	57

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Aislamiento de <i>Burkholderia cepacia</i> en Agar BCSA a partir de la Muestra 4.	76
Anexo 2. Resultados de tipificación de la Muestra 1 con el Equipo Vitek 2 Compact 15.	77
Anexo 3. Procedimiento de verificación del Densitómetro McFarland - DensiChek™ plus, de acuerdo a las instrucciones del fabricante bioMérieux ^{MR} .	78
Anexo 4. Descripción del método analítico USP 2021 capítulo 60: Detección del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> UFC/g o mL.	80
Anexo 5. Medios de cultivo y diluyentes utilizados.	81
Anexo 6. Cronograma de actividades laborales en Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S.	84
Anexo 7. Carta de constancia de actividades laborales desempeñadas en Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S.	85

INTRODUCCIÓN

El Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) está constituido por bacterias con una gran distribución en el medio ambiente, con resistencia a los antibióticos y antisépticos, capaces de sobrevivir en ambientes con pocos nutrientes y metabolizar algunos compuestos antimicrobianos como fuente de carbono. Por ello estos microorganismos son vistos como contaminantes peligrosos en algunos productos de consumo humano. Los productos contaminados han causado un gran número de brotes nosocomiales en instalaciones sanitarias, siendo una amenaza para la salud.¹

Debido al riesgo sanitario que representan las contaminaciones con estos microorganismos patógenos, garantizar la inocuidad es una consideración importante en la fabricación de cosméticos y medicamentos no estériles, debido a que son productos susceptibles a contaminarse con microorganismos como mohos, levaduras y bacterias, los cuales pueden causar enfermedades o infecciones que afecten al paciente o consumidor. Además, el deterioro por acción microbiana puede acarrear cambios en las características físicas y químicas que conducirían a que el producto no sea apto para ser usado, afectando con ello la imagen del fabricante. En productos farmacéuticos, las contaminaciones pueden tener el potencial de reducir o inactivar la actividad terapéutica del principio activo y por ende representar un riesgo para la salud del paciente. Estas contaminaciones pueden surgir durante el proceso de manufactura: el pesado, el llenado, el almacenamiento, así como durante su uso.

Los laboratorios microbiológicos tienen una gran responsabilidad en el aseguramiento de la inocuidad de este tipo de productos debido a que sus protocolos de análisis microbiológicos de uso rutinario deben estar validados o verificados para garantizar la fiabilidad de los resultados, como en las detecciones de patógenos como el Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc).

A finales de 2019, la Farmacopea de los Estados Unidos–Formulario Nacional o (USP–NF) añadió a sus compendios un método analítico microbiológico para la detección del complejo de ***Burkholderia cepacia*** UFC/g o ml en productos no estériles, basándose en el cumplimiento o no cumplimiento del producto con base en la presencia/ausencia de estos microorganismos.

¹ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19.

Las metodologías como estas convienen ser adoptadas por los laboratorios que analizan productos no estériles ya que es un método estandarizado cuyo desempeño ha sido validado. Sin embargo, antes de incorporar una metodología normalizada a los procedimientos de rutina, los laboratorios deben corroborar su capacidad para aplicar el método en condiciones de uso reales. Esto es lo que se define como verificación, la cual implica la realización de un trabajo experimental para demostrar que el método funciona adecuadamente en el laboratorio en condiciones de uso rutinario.

La verificación implica determinar el cumplimiento de menos parámetros y realizar menos mediciones en comparación con una validación. Los resultados de la verificación pueden distar levemente de los obtenidos en la validación, pero se debe determinar si son aceptables teniendo en cuenta el objetivo al que se quiere llegar al utilizar el método.

El presente estudio se realizó con el objetivo de verificar la capacidad de detección del método analítico microbiológico de la Farmacopea Estadounidense (USP-NF): detección del complejo *Burkholderia cepacia* UFC/g o mL, en productos no estériles.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Verificar la capacidad de detección del método analítico microbiológico de la Farmacopea Estadounidense (USP-NF): detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** UFC/g o mL, en productos no estériles.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir un protocolo de verificación basado en el método analítico microbiológico de la Farmacopea Estadounidense (USP-NF) “Detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** UFC/g o mL” en productos no estériles.
- Comprobar si muestras de productos no estériles con diferentes características físicas interfieren con la capacidad de detección de ***Burkholderia cepacia*** del método de la Farmacopea Estadounidense (USP-NF).
- Evaluar las características de desempeño del método analítico microbiológico de la Farmacopea Estadounidense (USP-NF) “Detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** UFC/g o mL” en productos no estériles.

2. JUSTIFICACIÓN

El complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) son un grupo de bacterias patógenas oportunistas reportadas en numerosas investigaciones a través de los años como contaminantes en productos cosméticos y fármacos no estériles. Por tal razón, desde hace años ha sido necesario incluir estos microorganismos como patógenos a detectar en los protocolos de análisis microbiológicos de productos no estériles. Hasta la fecha no existía algún método estandarizado para la detección de estas bacterias en este tipo de productos. Sin embargo, a finales de 2019, un método estandarizado para la detección del complejo de ***Burkholderia cepacia*** UFC/g o ml en productos no estériles fue incluido a los protocolos de la Farmacopea de los Estados Unidos–Formulario Nacional o (USP–NF).

La adopción de metodologías normalizadas por parte de los laboratorios microbiológicos desempeña un importante papel en el aseguramiento de la inocuidad de los productos de consumo humano puesto que garantizan la fiabilidad de los resultados por haber sido evaluadas y aprobadas a través de un proceso de validación. No obstante, aunque un método haya sido validado por una entidad competente como la USP-NF, debe ser verificado antes de incorporarse a los procedimientos de rutina del laboratorio para corroborar que el método funciona en condiciones reales de uso, como lo señala la norma ISO/IEC 17025 en el apartado 7.2.

La verificación asegurará que el desempeño del método y los resultados obtenidos son confiables y consistentes, determinando que el microorganismo(s) a detectar está(n) o no realmente presente(s) evitando el riesgo de resultados falsos negativos que podrían conllevar a daños en la salud de los consumidores por productos contaminados, retirada de productos del mercado, daños a la imagen de los fabricantes y a la reputación del laboratorio.

Por ello, se decidió realizar el presente estudio con el objetivo de verificar la capacidad de detección del método analítico microbiológico de la Farmacopea Estadounidense (USP-NF): detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** UFC/g o mL, en productos no estériles.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 PRODUCTOS NO ESTÉRILES

En la fabricación de cosméticos y artículos de tocador, así como para muchos medicamentos, la esterilización no es apropiada ni viable, y no es comercialmente factible, por lo que se buscan medios alternativos de aseguramiento de la calidad microbiológica. Por ello, en el proceso de fabricación de productos no estériles, la contaminación microbiana se controla principalmente mediante la adopción de buenas prácticas de fabricación, mientras que el mantenimiento de la calidad durante el almacenamiento y el uso (que también es responsabilidad del fabricante) se logra primordialmente mediante la adición de conservantes, a través del diseño, la formulación, en el envasado y en el uso del producto para lograrlo.²

La presencia de microorganismos en un producto no estéril es un peligro potencial por dos razones. Primero, puede conducir al deterioro del producto debido a que la versatilidad metabólica de los microorganismos permite que casi cualquier ingrediente de la preparación se degrade en presencia de microorganismos adecuados; y/o puede suponer un riesgo de infección para los consumidores o pacientes.³

² BAIRD, R. y BLOOMFIELD, Sally. *Microbial Quality Assurance in Cosmetics, Toiletries and Non-Sterile Pharmaceuticals*, Boca Raton: CRC Press, 1996. 272 p. (ISBN-10: 0748404376. ISBN-13: 978-0748404377).

³ PELAEZ, Lizeth. *Control microbiológico de productos farmacéuticos no estériles en la industria farmacéutica*. Trabajo de grado Químico farmacéutico. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, 2016, 89 p.

3.2 COMPLEJO *Burkholderia cepacia* (CBc)

3.2.1 GENERALIDADES

Burkholderia cepacia (antes conocida como ***Pseudomonas cepacia***) se conocía antes como una especie, pero luego expandió al Complejo de ***Burkholderia cepacia*** (CBc), que incluye más de 20 especies. El CBc es un grupo de bacterias gramnegativas⁴ que existen naturalmente en nichos ecológicos extremadamente diversos y tienen una versatilidad metabólica extraordinaria. Aunque el CBc tiene potencial agrícola, también se considera como uno de los patógenos hospitalarios oportunistas capaces de causar infecciones en pacientes con inmunidad debilitada, enfermedad granulomatosa crónica, dispositivos médicos permanentes y fibrosis quística (FQ).⁵

El complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) se distribuye ampliamente en el medio ambiente. Se ha demostrado que debido a su gran genoma y la presencia de múltiples secuencias de inserción, sus miembros pueden asentarse en ambientes naturales como suelo, agua, rizosfera o semillas. Además de su presencia en suelos agrícolas, el complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) también se ha observado en suelos urbanos en tres estados diferentes de Estados Unidos (principalmente en jardines y campos de golf). En Bélgica, el complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) se encontró en muestras de agua y suelo de las casas y jardines de pacientes con fibrosis quística (FQ), lo que indica que puede haber una ruta de transmisión entre el medio ambiente y el humano.⁶

Los miembros de CBc tienen una resistencia inherente a los antibióticos y antisépticos, así como la capacidad de sobrevivir en condiciones nutricionales limitadas y de metabolizar la materia orgánica en ambientes acuáticos oligotróficos, utilizando incluso algunos compuestos antimicrobianos como fuente de carbono. Estas capacidades son la razón por la que los miembros del CBc se

⁴ JIN, Yuan, *et al.* Genome-based classification of ***Burkholderia cepacia*** complex provides new insight into its taxonomic status. En: *Biology Direct*. Marzo, 2020, vol. 15 no. 6. p. 1-14.

⁵ WONG, Min-Yi, *et al.* Comparison of Microbiological Characteristics and Genetic Diversity between ***Burkholderia cepacia*** Complex Isolates from Vascular Access and Other Clinical Infection. En: *Microorganisms*. Diciembre, 2020, vol. 9 no. 1, p. 51.

⁶ ROJAS, Fernando, *et al.* El controvertido complejo ***Burkholderia cepacia***, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. En: *Revista Argentina de Microbiología*. Febrero- marzo, 2019, vol. 51 no. 1, p. 84-92.

consideran contaminantes peligrosos de productos de cuidado personal y productos farmacéuticos acuosos y la causa más frecuente detrás del retiro de productos no estériles del mercado.⁷

Frecuentemente las contaminaciones del CBc surgen a partir de la presencia de estos microorganismos en el agua utilizada en alguna de las etapas de producción. El sistema de suministro y los sistemas de depuración de agua son los principales puntos críticos debido a que estas bacterias se asientan en tuberías, pasan por las diferentes etapas de depuración, forman biopelículas y son difíciles de eliminar. La desinfección regular de los sistemas de agua y la detección temprana de estos microorganismos son herramientas importantes para controlar la contaminación por el Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc).⁸

3.2.2 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Los microorganismos del complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) son bacilos gramnegativos, móviles debido a la presencia de uno o más flagelos, no formadores de esporas, aeróbios y no fermentadores de la glucosa. Su tamaño varía entre 1 a 5 µm de longitud y 0.5 a 1.0 µm de ancho⁹. El CBc tiene un genoma particularmente grande de 6 y 9 Mb (en comparación con otras especies bacterianas). Su genoma está formado por múltiples replicones distribuidos en una estructura (generalmente tres) que se consideran cromosomas. En algunas cepas, también pueden aparecer pequeños plásmidos. Presentan secuencias de inserción y múltiples islas de genoma extensas que constituyen aproximadamente el 10% del genoma, difieren en tamaño y contenido, pero todas contienen genes que sugieren haber sido derivados de elementos móviles como plásmidos, transposones, y fagos. Además, su capacidad para formar biopelículas varía según la especie. Esta forma de crecimiento se ha observado *in vitro* y en el medio natural o en el tracto respiratorio de pacientes infectados y les confiere a estas bacterias beneficios ante condiciones

⁷ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19.

⁸ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. p. 392-393.

⁹ MIRAMBELL, Antonio. Aspectos microbiológicos de ***Burkholderia cepacia*** complex en pacientes con fibrosis quística. Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Microbiología. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de Genética y Microbiología, 2015. 175 p.

adversas del entorno, como una resistencia significativamente mayor a los antibióticos y desinfectantes.¹⁰

La mayoría de las cepas de este complejo son Catalasa positiva y oxidasa positiva, aunque la reacción en algunos casos es débil; mientras que en las especies ***B. contaminans***, ***B. lata*** y ***B. pyrrocina*** la oxidasa es variable. Por lo general todas las especies del complejo ***Burkholderia cepacia*** oxidan la maltosa, lactosa y xilosa, y en su mayoría no son hemolíticas.¹¹

Todas las especies del complejo ***Burkholderia cepacia*** crecen en medios selectivos como agar Mc Conkey y ***B. cepacia*** selective agar (BCSA). Normalmente las colonias del CBc se pueden percibir a simple vista a las 24h de incubación, aunque en algunos casos es necesario esperar hasta el tercer día. En medios selectivos como BCSA, las colonias son lisas, ligeramente elevadas y en algunos casos pueden tener un aspecto mucoso. Todas las especies crecen bien a 30°C y 37°C, aunque algunas cepas pueden tener un crecimiento óptimo a 42°C. La mayoría de los aislados clínicos no son pigmentados, pero en presencia de un medio que contenga hierro pueden producir un pigmento amarillo brillante. Los aislados de este complejo también se caracterizan por producir un olor muy característico.¹²

3.2.3 HÁBITAT, DIFUSIÓN Y TRANSMISIÓN INTERHUMANA

Debido a esta gran adaptabilidad y versatilidad se puede encontrar el CBc en hábitats tan distintos como el agua, la tierra, la rizosfera y en las plantas. Diversos estudios demuestran que el CBc se encuentra en mayor medida en la rizosfera, y especialmente en la rizosfera de cultivos humanos. De hecho, se considera al CBc como las bacterias dominantes en este hábitat, especialmente en cultivos de arroz, maíz, guisantes y algodón. Las bacterias del CBc se pueden encontrar con cierta frecuencia en aguas dulces como charcas y lagos, y en ocasiones en aguas corrientes como canales y ríos. En cambio, las aguas marinas no se pueden considerar como hábitat natural ya que las cepas pertenecientes al complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) tienen un crecimiento muy escaso en aguas marinas o medios con una concentración similar de sal a la existente en el mar.¹³

¹⁰ AVERSA, Néstor, *et al.*, op. cit., pág. 389-390.

¹¹ MIRAMBELL, Antonio, op. cit., pág. 15.

¹² *Ibid.*, p. 15.

Las cepas pertenecientes al CBc se caracterizan por poseer capacidad para utilizar una gran variedad de fuentes de carbono. De hecho, se utiliza como agente bioremediador debido a su habilidad de degradar sustancias contaminantes presentes en pesticidas y herbicidas. Su capacidad para degradar sustratos aromáticos clorados y contaminantes aromáticos como el tricloroetileno y el tolueno respectivamente, confieren a este microorganismo especial interés en la industria agrícola. Otro aspecto destacable para la industria es que se ha relacionado la presencia de bacterias del CBc con mejora en el rendimiento de los cultivos. Otro aspecto relevante de las especies del CBc es su capacidad de producir antifúngicos y antimicrobianos de manera natural. Tienen la capacidad de proteger los cultivos de los daños causados por hongos fitopatógenos como ***Aphonomyces euteiches***, ***Rhizoctonia solani*** y las especies del género ***Pythium*** que son causantes de enfermedades tan comunes como la podredumbre de las raíces.¹⁴

Las especies del complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) son conocidas como patógenas oportunistas para el hombre y constituyen uno de los principales grupos de agentes infecciosos en los pacientes con fibrosis quística (FQ). Por ello existe una gran controversia sobre el uso de aquellas especies del CBc; que como se ha señalado, son beneficiosas para la industria agrícola, pero a su vez potencialmente peligrosas para el hombre. Han sido varios los estudios realizados para intentar esclarecer si los pacientes con FQ se infectan mayoritariamente por cepas ambientales o en su caso, son infecciones nosocomiales o por transmisión interhumana. Un estudio realizado en el Reino Unido reveló que la cepa ***B. cepacia*** ATCC 25416 causante de la podredumbre de la cebolla fue aislada en un paciente con FQ. Otro estudio realizado en el este de EE.UU. mostró que la cepa ***B. cenocepacia*** PHDC, una de las más frecuentemente aisladas en pacientes con FQ en esa zona de EE.UU, también se aislaba en suelos agrícolas de la misma región. Finalmente, un estudio comparó mediante *multi locus sequence typing* (MLST) un conjunto de 381 aislados clínicos del CBc con 233 aislados ambientales. El resultado fue que el 21.5 % de las cepas clínicas no se diferenciaban de las muestras ambientales. Teniendo en cuenta que las cepas del CBc no forman parte de la flora comensal normal humana, no es extraño pensar que los pacientes con FQ (en particular los que no contactan con otros pacientes con la enfermedad), puedan infectarse con cepas ambientales del CBc. Aun así, son necesarios más

¹³ MIRAMBELL, Antonio. Aspectos microbiológicos de ***Burkholderia cepacia*** complex en pacientes con fibrosis quística. Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Microbiología. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento d Genética y Microbiología, 2015. 175 p.

¹⁴ Ibid., p. 17-18.

estudios para esclarecer y determinar el peso de las cepas ambientales entre los pacientes con FQ.¹⁵

No obstante, es sabido que parte de las infecciones por el CBc en pacientes con FQ son debidas a la transmisión interhumana. De hecho, las cepas del complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) adquirieron relevancia debido a su gran facilidad de dispersión entre pacientes con FQ ya en la década de los noventa se observó que las especies pertenecientes al complejo se caracterizaban por su gran capacidad de transmisión entre personas. Sin embargo, la transmisión del CBc no solo se da entre pacientes con FQ sino que también se han descrito casos de diseminación entre pacientes sin esta patología.¹⁶

3.2.4 PATOGENICIDAD DEL COMPLEJO ***Burkholderia cepacia*** (CBc)

Las infecciones causadas por el complejo *Burkholderia cepacia* se relacionan principalmente con pacientes con fibrosis quística (FQ). La FQ es un cambio genético en el que el tracto respiratorio inferior está bloqueado por moco deshidratado y es pegajoso. Estas condiciones constituyen un entorno ideal en el que se puede establecer una infección crónica, impidiendo así el funcionamiento normal de los pulmones, provocando neumonía, provocando sepsis y, en ocasiones, incluso la muerte del paciente. Este deterioro progresivo y rápido del paciente se denomina "síndrome de cepacia" y se caracteriza por neumonía necrosante, bacteriemia y sepsis.¹⁷

3.2.4.1 Adherencia a las células epiteliales pulmonares

Para establecer con éxito una infección, después de ingresar al tracto respiratorio de un paciente con fibrosis quística (FQ), las bacterias del CBc deben adherirse a la superficie epitelial o mucosa del huésped. En los pulmones con FQ, la capa mucosa engrosada proporciona un entorno ideal para la colonización microbiana debido a defectos en la eliminación del moco, menor eficacia de los péptidos antimicrobianos y aumento de la inflamación. La capacidad de cruzar la barrera

¹⁵ Ibid., p. 18.

¹⁶ Ibid., p. 19.

¹⁷ ROJAS, Fernando *et al.* El controvertido complejo ***Burkholderia cepacia***, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. En: *Rev. Argentina de Microbiología*. Enero- Marzo, 2019, vol. 51 no. 1, p. 84-92.

epitelial y entrar en el torrente sanguíneo parece estar limitada a los miembros del CBc, porque otros patógenos de la FQ no suelen causar bacteriemia. El epitelio de las vías respiratorias juega un papel central en la progresión de la enfermedad pulmonar por FQ al producir una gran cantidad de citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatorias y moléculas de adhesión. Las bacterias CBc pueden invadir y sobrevivir en las células epiteliales a través de varios mecanismos, incluso como invasión de biopelícula, reordenamiento citoesquelético y penetración parasitaria.¹⁸ Las lipasas extracelulares, metaloproteasas y serina proteasas realizan funciones directamente relacionadas con las interacciones de las células epiteliales. Aunque las metaloproteasas y las serina proteasas parecen desempeñar un papel en la proteólisis de la matriz extracelular y son producidas por muchas, pero no todas las especies del CBc, la producción de lipasa juega un papel en la invasión y su producción está ampliamente distribuida entre los miembros del CBc. Las estructuras de la superficie bacteriana, como los lipopolisacáridos (LPS), los flagelos y los pili, también son importantes en la interacción con el huésped de la FQ. Los flagelos, los pili y la adhesina de 22 kDa desempeñan funciones importantes en el movimiento y la adhesión de las células huésped. El LPS del CBc induce una fuerte respuesta inmune, que puede causar daño a la célula huésped. La estructura de LPS de CBc es diferente del LPS de otras bacterias Gram negativas. Contiene menos fosfato, el azúcar inusual ácido D-glicerol- α -D-tallo-oct-2-ulopiranosilónico (KO) está presente en los oligosacáridos en el núcleo interno, y los residuos de 4-amino-4-desoxiarabinosa están unidos a los fosfatos del lípido A. Estas modificaciones reducen la carga aniónica en la superficie celular de los miembros del CBc e inhiben la unión y los efectos posteriores de los antibióticos catiónicos.¹⁹

3.2.4.2 Sideróforos

La producción de sideróforos como pioquelina, ácido salicílico, cepabactina y ornibactina también contribuye a la patogénesis del CBc. Además de su papel en la adquisición de hierro, la pioquelina también parece jugar un papel en el daño tisular²⁰. También se ha demostrado que la unión del hierro a la pioquelina es un catalizador eficaz para la formación de radicales libres hidroxilo (OH) y aumenta el

¹⁸ LEITÃO, Jorge et al. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. En: Applied microbiology and biotechnology. Abril, 2010, vol. 87 no. 1, p. 31–40.

¹⁹ Ibid., p. 33.

²⁰ LAMONT, Lain et al. Siderophore mediated signalling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. En: Proc Natl Acad Sci U S A. Mayo, 2002, vol. 99 no. 10, p. 7072–7077.

daño a las arterias pulmonares, las células endoteliales y las células epiteliales pulmonares debido a la exposición al superóxido y al peróxido.²¹

3.2.4.3 Sistemas de transporte

La secreción de muchos factores de virulencia secretados por cepas de CBc (como proteasas, hemolisina y adhesina) están relacionados con diversos sistemas de transporte. Se ha demostrado que los sistemas de secreción de tipo I y tipo II son responsables de la secreción de proteínas con actividad hemolítica en aislados de los linajes ***B. cenocepacia*** ET12 y ***B. vietnamiensis***^{22 23}. Recientemente, también se ha demostrado la importancia de los sistemas de secreción de tipo IV y tipo VI en cepas del CBc. Por ejemplo, un estudio realizado por Aubert et al. en 2008 se describió la presencia de un sistema de secreción funcional de tipo VI en ***B. cenocepacia*** K56-2 como un factor que juega un papel en la virulencia.²⁴

²¹ LEWENZA, S. y SOKOL, P.A. Regulation of ornibactin biosynthesis and N-acyl-L-homoserine lactone production by CepR in ***Burkholderia cepacia***. En: *J Bacteriol.* Abril, 2001, vol. 183 no. 7, p. 2212–2218.

²² FEHLNER-GARDINER, C.C.; HOPKINS, T.M. y VALVANO, M.A. Identification of a general secretory pathway in a human isolate of ***Burkholderia vietnamiensis*** (formerly ***B. cepacia*** complex genomovar V) that is required for the secretion of hemolysin and phospholipase C activities. En: *Microb Pathog.* Mayo, 2002, vol. 32 no. 5, p. 249–254.

²³ WHITBY, P. W. *et al.* Identification of an RTX determinant of ***Burkholderia cenocepacia*** J2315 by subtractive hybridization. En: *J Med Microbiol.* Enero, 2006, vol. 55 no. 1, p. 11–21.

²⁴ AUBERT, D. F. ; FLANNAGAN, R. S. y VALVANO, M. A. A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in ***Burkholderia cepacia***.

Imagen 1. Sistemas de secreción de bacterias gramnegativas.

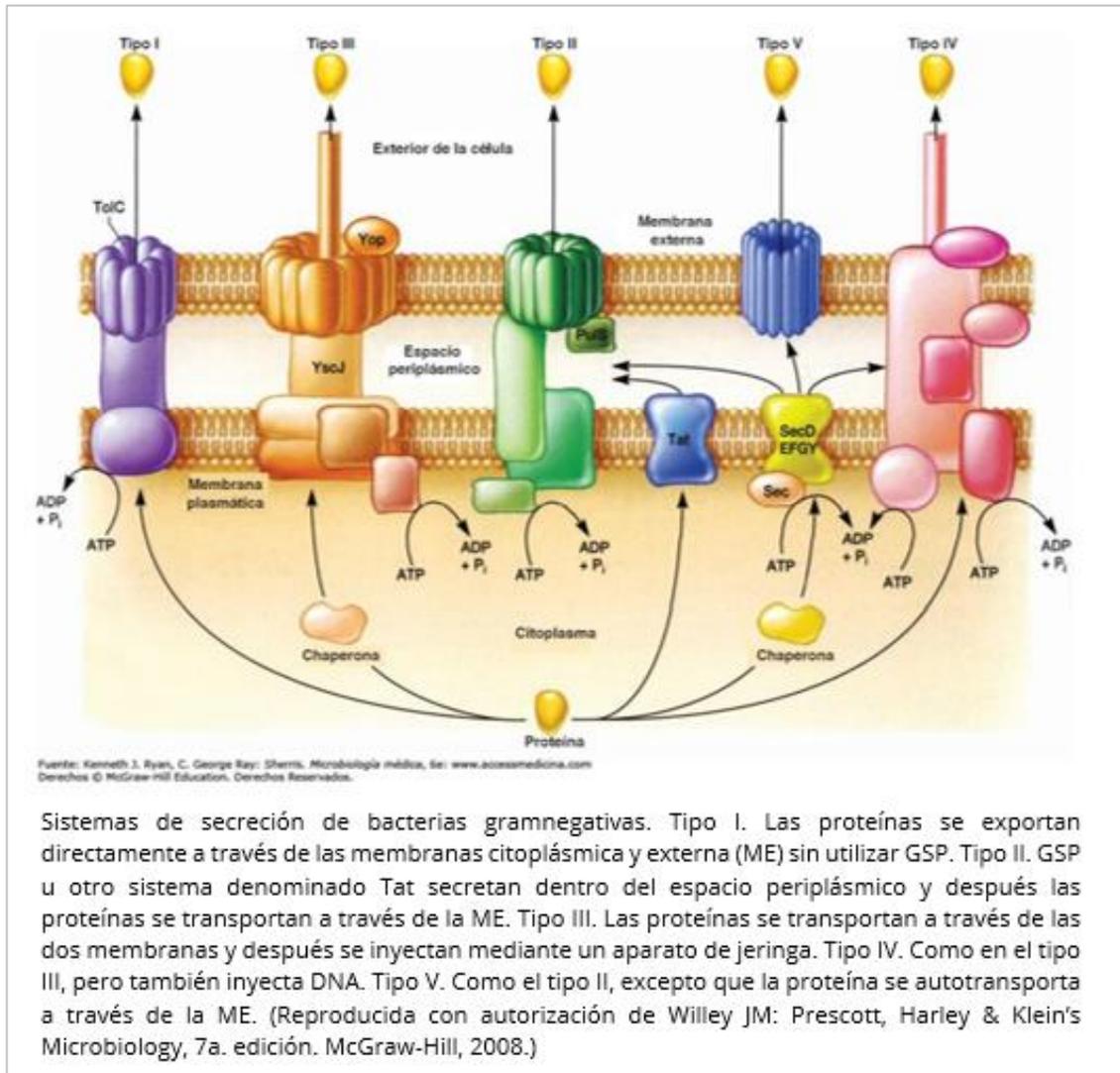


Imagen tomada de: <https://slideplayer.es/slide/14532137/>

3.2.4.4 Biofilms

Otra característica importante del CBc es que puede formar una biopelícula en la que las bacterias llevan un estilo de vida sésil, protegidas de las condiciones ambientales adversas y las defensas del sistema inmunológico del huésped. Además, se ha demostrado que las bacterias del CBc que forman biopelículas son

más resistentes a los antibióticos que las células planctónicas, lo que contribuye a su persistencia en el pulmón con FQ.²⁵

Imagen 2. Modelo de desarrollo del biofilm.

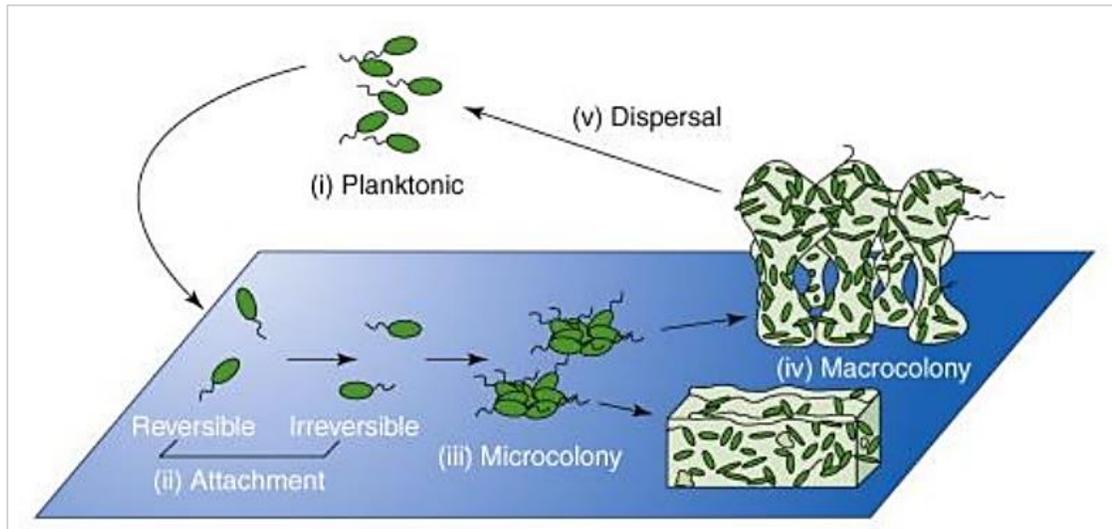


Imagen tomada de: https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_329293/amv1de1.pdf

3.2.4.5 Exopolisacáridos (EPS)

La producción de exopolisacáridos (EPS) por el CBc se consideró inicialmente un fenómeno inusual, sin embargo, en un estudio realizado por Richau et al. en el año 2000 y por Cunha et al. en 2004 se encontró que alrededor del 80% de los aislados clínicos del CBc de pacientes con FQ producían cantidades variables de un EPS, llamado cepacian^{26 27}. Aunque no es necesario para el inicio de la formación de biopelículas, también se demostró que el cepacian desempeña un papel en el establecimiento de biopelículas gruesas. La caracterización de la estructura química

²⁵ CARAHER, E. *et al.* Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. En: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Marzo, 2007, vol. 26 no. 3, p. 213–216.

²⁶ RICHAU, J. A. *et al.* Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a Portuguese cystic fibrosis center. En: *J Clin Microbiol*. Abril, 2000, vol. 38 no. 4, p. 1651–1655.

²⁷ CUNHA, M.V. *et al.* Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. En: *J Clin Microbiol*. Julio, 2004, vol. 42 no. 7, p. 3052–3058.

y composición del EPS mostró que está compuesto de glucosa, manosa, ramnosa, galactosa y ácido glucurónico.²⁸

3.2.4.6 Resistencia al estrés oxidativo y evasión del sistema inmune

La capacidad de las especies del CBc de resistir al estrés oxidativo, está altamente asociada a la capacidad de sobrevivir en los macrófagos. Las dos mayores "armas" de los macrófagos para eliminar los patógenos son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés). Por parte de la bacteria, para promover la detoxificación del superóxido producido por el macrófago, necesita la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno mediante la enzima superóxido dismutasa, seguida de la eliminación del peróxido de hidrógeno, procesos llevados a cabo por catalasas y/o peroxidasas. En el caso de ***B. cenocepacia*** se ha descrito una enzima superóxido dismutasa, SodC, y dos enzimas catalasas/peroxidasas denominadas KatA y KatB. Se ha demostrado la presencia de genes homólogos a hmpA que codifican proteínas que intervienen en la detoxificación del óxido nítrico.²⁹

Por otra parte, se ha descrito la habilidad de ***B. cenocepacia*** para infectar y sobrevivir intracelularmente en macrófagos, células epiteliales, células dendríticas, neutrófilos y amebas. Los mecanismos por los cuales la bacteria es capaz de mantenerse y sobrevivir intracelularmente no están claros, aunque se ha demostrado que una vez la bacteria entra dentro del macrófago; el fagosoma formado por la entrada de la bacteria en vez de fusionarse con el lisosoma para eliminar la bacteria, consigue dirigirse al retículo endoplasmático permitiendo que la bacteria se replique y sobreviva. Cepas mutantes de ***B. cenocepacia*** defectoras del sistema de secreción tipo IV denominado PtWT4SS, son degradadas por los lisosomas, sugiriendo que esta molécula puede intervenir en este proceso. Además de prevenir la fusión de los endosomas con los lisosomas, ***B. cenocepacia*** también retrasa la maduración de las vacuolas en los macrófagos. Se ha evidenciado como

²⁸ CESCUTTI, P. *et al.* Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. En: *Biochem Biophys Res Commun*. Julio, 2000, vol. 273 no. 3, p. 1088–1094.

²⁹ MIRAMBELL, Antonio. Aspectos microbiológicos de ***Burkholderia cepacia*** complex en pacientes con fibrosis quística. Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Microbiología. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de Genética y Microbiología, 2015. 175 p.

retrasando la acidificación de las vacuolas que contienen la bacteria impediendo que estas se unieran al lisosoma para ser degradadas.³⁰

Imagen 3. Interacciones entre una bacteria del CBc y las células inmunes.

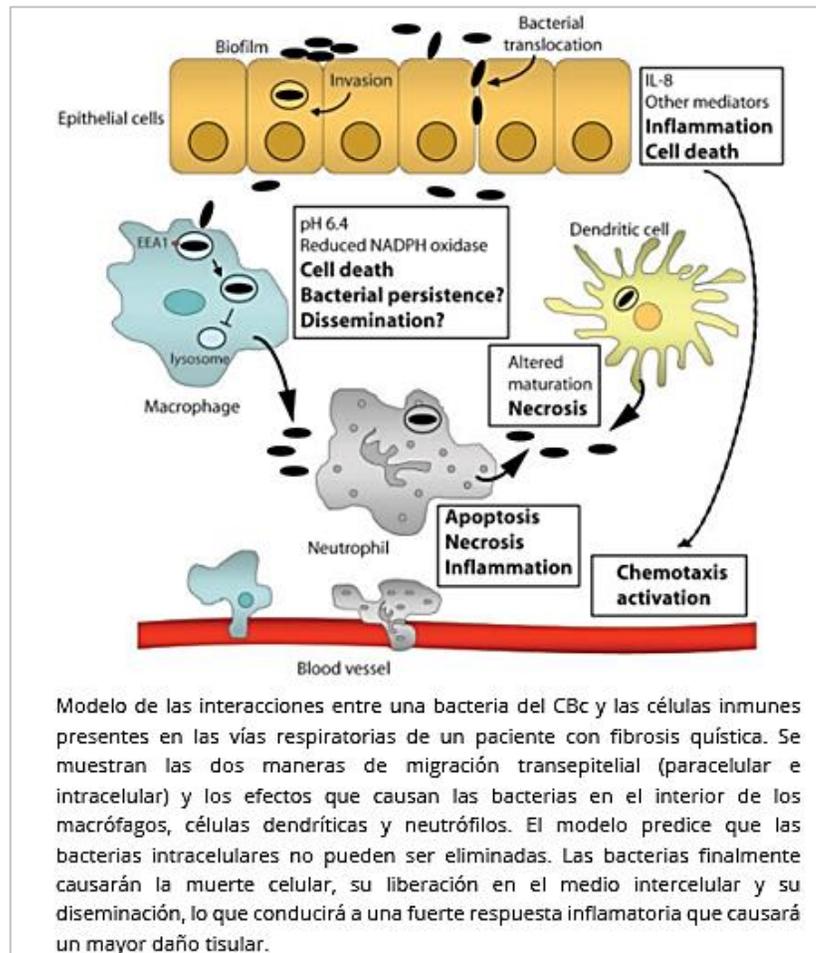


Imagen tomada de:

https://www.researchgate.net/publication/26306766_Interactions_of_Burkholderia_cepacia_and_other_Burkholderia_cepacia_complex_bacteria_with_epithelial_and_phagocytic_cells

3.3 DATOS EPIDEMIOLÓGICOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Todas las especies del Complejo *Burkholderia cepacia* (CBc) (a excepción de *Burkholderia ubonensis*) han sido aisladas de pacientes fibroquísticos, sin

³⁰ Ibid., p. 31-32.

embargo, la literatura muestra una distribución desbalanceada en ciertos países y en determinados períodos de algunas especies debido a la ocurrencia de brotes nosocomiales producidos por algunas especies en particular. Por ejemplo, se han descrito diversos brotes epidémicos en pacientes con fibrosis quística ocasionados por **B. multivorans** en el Reino Unido, en Francia y Estados Unidos. Asimismo, las especies **B. cepacia** y **B. dolosa**, también se han reportado como epidémicas en Estados Unidos. En Portugal la especie **B. cepacia** ha sido responsable de un importante brote producido por la contaminación de una solución salina de aplicación por vía nasal empleada en diferentes terapias hospitalarias. La causa de la aparición de los diferentes brotes en los casos arriba mencionados ha sido, al igual que en Portugal, producido por la contaminación de algún material o soluciones desinfectantes, de nebulizadores, apósitos anestésicos, enjuague bucal o dispositivos médicos contaminados.³¹

En el mundo, dentro del complejo **B. cepacia** (CBc), las especies **Burkholderia multivorans** y **Burkholderia cenocepacia** son las más frecuentemente halladas en pacientes con fibrosis quística, enfermedad granulomatosa crónica e inmunocomprometidos. Dentro del complejo **B. cepacia** (CBc), **B. cenocepacia** es considerado el patógeno más severo, altamente virulento y transmisible y junto a **B. multivorans** representan la mayoría (80%) de las infecciones en pacientes con fibrosis quística alrededor del mundo. La especie **Burkholderia contaminans**, formalmente descrita en 2009, tiene una baja prevalencia en pacientes con fibrosis quística alrededor del mundo, con marcadas excepciones en Argentina, España y Portugal.³²

En Colombia, durante el 2010 se presentaron 25 brotes de infecciones intrahospitalarias en Colombia. De las instituciones prestadoras de servicios de salud que notificaron el evento, el 28.0% son instituciones públicas y el 72.0% (18) corresponde a instituciones privadas. En los brotes se vieron afectados 99 pacientes y fallecieron 16 (16%). El principal microorganismo causal fue **Burkholderia cepacia**, reportado en siete instituciones. En estos brotes se vieron afectados 41 pacientes, de los cuales 12 (29%) fallecieron. Los 18 brotes restantes fueron causados por los siguientes microorganismos: **Acinetobacter baumannii**, **Klebsiella pneumoniae**, **Pseudomonas aeruginosa**, **Streptococcus pyogenes**, **Candida albicans**, **Enterobacter cloacae**, **Rotavirus**, **Serratia**

³¹ MARTINA, Pablo. Epidemiología y evolución de aislados clínicos pertenecientes al Complejo **Burkholderia cepacia** recuperados del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos. Tesis doctoral. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias Biológicas, 2013. 241 p.

³² CIPOLLA, Lucía *et al.* Prevalencia de especies del complejo **Burkholderia cepacia** en pacientes con fibrosis quística en Argentina durante el período 2011-2015. En: *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Agosto-septiembre, 2018, vol. 36 no. 7, p. 431-434.

***marcescens*, *Stenotrophomona maltophila*, *Sthapylococcus coagualsa negativo*, *Sthapylococcus epidermidis* y Virus Respiratorio Sincicial.**³³

En el mes de junio de 2013 se identificó un solo caso de aislamiento de ***B. cepacia*** en un hemocultivo en el Hospital Universitario en Bogotá. en el año 2014, se presentó en este hospital una bacteriemia por ***B. cepacia*** en la UCI de adultos y pediátrica.³⁴

En Colombia, entre los microorganismos asociados a brotes en el 2020 se encontró ***Burkholderia cepacia*** causante de 4 brotes.³⁵

3.4 NORMATIVIDAD PARA EL COMPLEJO *Burkholderia cepacia* (CBc) EN PRODUCTOS NO ESTÉRILES

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) reconoce tres tipos de microorganismos: patógenos, oportunistas y objetables. Los patógenos son microorganismos o toxinas responsables de enfermar o infectar a las personas.³⁶ Aquellos microorganismos que causan enfermedad en pacientes inmunodeprimidos se consideran oportunistas. Y aquellos microorganismos que pueden inactivar el fármaco activo y / o estropear el producto, dando lugar a una posible falta de eficacia del fármaco y seguridad cosmética, son objetables. Si un medicamento o cosmético contiene microorganismos patógenos, oportunistas, objetables o metabolitos microbianos tóxicos, o se destruye física o químicamente, se considera contaminado. Incluso si el producto no muestra signos evidentes de contaminación, los microorganismos con requisitos nutricionales simples suelen estar presentes en cantidades superiores a 10⁶ UFC/g o ml.³⁷

³³ HENRÍQUEZ, Daibeth y RODRÍGUEZ, María. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C: Boletín Epidemiológico de Infecciones Intrahospitalarias. 2010. 25 p.

³⁴ VALDERRAMA, Sandra *et al.* Pseudobrote por ***Burkholderia cepacia*** en dos unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario en Bogotá – Colombia. En: *Infectio*. Agosto, 2019, vol. 23 no. 2, 143-147.

³⁵ MINSALUD. Boletín Epidemiológico semanal, Semana epidemiológica 09 28 de feb. al 06 de marzo de 2021: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Colombia. 2021.

³⁶ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. p. 16.

³⁷ *Ibid.*, p. 16.

La FDA establece para los fabricantes de productos farmacéuticos el uso de criterios de aceptación científicamente idóneos y comprobados (por ejemplo, USP <1111> "Examen microbiológico de productos no estériles: Criterios de aceptación para preparaciones y sustancias farmacéuticas" y USP <61/62> "Examen microbiológico de productos no estériles").³⁸

La Ley de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de EE. UU. estipula que los propietarios de productos de cuidado personal y otros productos no farmacéuticos son responsables de la seguridad e inocuidad de estos cuando ingresan al comercio interestatal. Para la FDA, la "seguridad" de un producto incluye la ausencia de contaminación microbiana que pueda representar un riesgo para la salud pública. Por lo tanto, los fabricantes de productos no farmacéuticos a base de agua también deben cumplir con los requisitos actuales de la FDA para los fabricantes de medicamentos y aplicar voluntariamente aquellos elementos que puedan afectar la calidad de sus productos terminados.³⁹

Las agencias reguladoras en muchas jurisdicciones, incluido Estados Unidos, han retirado del mercado en repetidas ocasiones medicamentos y otros tipos de productos que contienen ***Burkholderia cepacia***. Por ello, el 22 de mayo de 2017, la FDA emitió un anuncio advirtiendo a los fabricantes de medicamentos sobre los riesgos para la salud que representan los productos contaminados con este microorganismo.⁴⁰

La FDA dictaminó que los fabricantes de productos farmacéuticos no estériles a base de agua debían realizar pruebas microbiológicas para la detección del complejo ***Burkholderia cepacia***. En ausencia de un procedimiento de prueba "oficial" (compendio) para ***Burkholderia cepacia***, la FDA exigió que cualquier procedimiento utilizado para ese propósito debía ser validado.⁴¹

Hasta 2019, los procedimientos para detectar microorganismos específicos en productos no estériles incluidos en el esquema del Formulario Nacional de la

³⁸ CONSUMER PRODUCT TESTING COMPANY. ***Burkholderia cepacia*** complex: FDA Expectations for Drug and Personal Care Product Manufacturers [sitio web]. Fairfield, NJ; [Consultado: 13 de junio de 2021].

³⁹ Ibid.

⁴⁰ Ibid.

⁴¹ Ibid.

Farmacopea de los Estados Unidos o el Estándar USP-NF de 2019 (USP 42-NF 37 Volumen 4, Capítulo 62) solo establecían el cumplimiento o incumplimiento de productos no estériles en función de la presencia / ausencia de ciertos microorganismos: ***Escherichia coli***, ***Salmonella spp.***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Staphylococcus aureus***, ***Clostridium*** y ***Candida albicans*** y bacterias gramnegativas tolerantes a la bilis.⁴²

El 1 de diciembre de 2019 un borrador del Capítulo General USP <60> para la detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** en productos no estériles se hizo oficial, diseñado como una extensión de los Capítulos Generales de USP <61> / <62>.⁴³

En Colombia, no existe algún método estandarizado emitido por alguna entidad competente para la detección complejo ***Burkholderia cepacia*** en productos no estériles. Sin embargo, implícitamente la presencia de estos microorganismos está regulada en medicamentos en el Decreto número 677 de 1995, que establece para estos productos, la determinación del número más probable de coliformes fecales y ensayos para detectar la presencia o no de microorganismos patógenos.⁴⁴ Para productos cosméticos la Norma Técnica Colombiana (NTC) 4833: 2012⁴⁵, la Resolución 1482 de 2012 de la Secretaría General de la Comunidad Andina⁴⁶ y la

⁴² FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 62, Examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de microorganismos específicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁴³ PHARMA WEBINARS. ***Burkholderia cepacia*** Complex Organisms & The New General Chapter USP <60> Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Tests for ***Burkholderia cepacia*** Complex [sitio web]. [Consultado: 13 de junio de 2021].

⁴⁴ COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Decreto 677 (26, abril, 1995). Por el cual se reglamenta parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a base de Recursos Naturales, Productos de Aseo, Higiene y Limpieza y otros productos de uso doméstico y se dictan otras disposiciones sobre la materia [en línea]. Santa Fe de Bogotá, D.C.: El Ministerio, 1995. 71 p. [Consultado: 13 de junio de 2021].

⁴⁵ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA. Industria de cosméticos: requisitos microbiológicos para productos cosméticos. NTC 4833: 2012. Bogotá D.C.: ICONTEC, 2012. 30 p.

⁴⁶ SECRETARIA GENERAL DE LA COMUNIDAD ANDINA. Resolución 1482 (4, julio, 2012). Modificación de la Resolución 1418: Límites de contenido microbiológico de productos cosméticos. Lima: Comunidad Andina. 2012. 2 p. [Consultado: 13 de junio de 2021].

ISO 17516: 2014⁴⁷ establecen requisitos microbiológicos en los que no se contempla el complejo ***Burkholderia cepacia***; concretamente solo para: aerobios mesófilos, mohos y levaduras, ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Escherichia coli*** y ***Candida albicans***.

3.5 COMPLEJO ***Burkholderia cepacia*** (CBc) EN COSMÉTICOS Y MEDICAMENTOS NO ESTÉRILES

Uno de los microorganismos contaminantes de productos farmacéuticos no estériles más frecuentemente reportados es ***Burkholderia cepacia***, ya sea que se identifique como ***B. cepacia*** (la especie) o solo como un miembro del complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc). La FDA, en colaboración con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), en octubre de 2016 detectó la presencia de ***B. cepacia*** en un sistema de agua utilizado para la fabricación de docusato sódico líquido oral. Esto repercutió en una alerta nacional y la empresa farmacéutica manufacturera retiró voluntariamente el producto del mercado. En 2017, la FDA detectó una posible contaminación vinculada con ***B. cepacia*** en los jarabes descongestionantes para el alivio de la tos, el resfriado y las alergias y recomendó la retirada de los productos del mercado. En 2018, la FDA detectó la presencia de varios microorganismos contaminantes en medicamentos homeopáticos, incluido ***B. multivorans***, y recomendó el retiro de todos los productos a base de agua de la empresa.⁴⁸

En 2011, se realizó un estudio por Martin *et al.* sobre la causa de un brote hospitalario de ***Burkholderia contaminans*** (perteneciente al complejo ***Burkholderia cepacia*** Group K) en un hospital universitario alemán con dos campus. La identificación de especies pertenecientes al CBc se realizó mediante secuenciación del gen *recA*, seguida de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE; Spel digest) para la identidad clonal. Se diagnosticaron 61 casos positivos en total para CBc en los dos campus. Al menos nueve pacientes contrajeron una neumonía asociada al ventilador con CBc. El CBc se encontró en paquetes de paños húmedos prefabricados que se usan para pacientes de cuidados intensivos. PFGE demostró la identidad clonal entre aislados de muestras clínicas

⁴⁷ CONDALAB. Análisis microbiológico en la industria cosmética. [Consultado: 13 de junio de 2021].

⁴⁸ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19.

y toallitas de ambos campus. Después de la eliminación de las toallitas contaminadas, no se presentaron más casos.⁴⁹

En 2012, en un trabajo de investigación realizado por Andrade y Valdiviezo se analizaron muestras de cosméticos de elaboración artesanal de dos lugares del centro de Quito, (correspondientes a “Fabricante 1” y “Fabricante 2”) con el fin de evaluar la seguridad de estos productos para los consumidores. Los análisis microbiológicos realizados incluyeron Recuento total Mesófilos Aerobios, Recuento de Mohos y Levaduras, Ausencia/Presencia de ***Staphylococcus aureus***, Ausencia/Presencia de ***Pseudomonas aeruginosa***, Ausencia/Presencia ***Burkholderia cepacia***, Ausencia/Presencia de Coliformes totales, ***Escherichia coli***, Ausencia/Presencia de ***Candida albicans***. En la metodología utilizada para la detección de ***B. cepacia*** se realizó un enriquecimiento no selectivo de la muestra utilizando caldo LPT Neutralizing e identificación posterior por aislamiento selectivo en agar BCPT. Los productos del Fabricante 1 presentaron un 100% de contaminación. La muestra de loción facial agua de rosas fue el único producto del fabricante 1 en el que se detectó la presencia de ***Burkholderia cepacia***. En los productos del Fabricante 2 no se obtuvo presencia de microorganismos patógenos.⁵⁰

En 2015, se realizó un estudio por Nannini *et al.*, concerniente a un brote hospitalario relacionado con bacteriemia causada por miembros del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc). Se identificó ***Burkholderia stabilis***, ***Burkholderia contaminans*** y ***Burkholderia ambifaria*** por caracterización molecular en aislamientos de CBc obtenidos de pacientes en unidades de cuidados intensivos adultos y neonatales. El CBc también se aisló del gel de ultrasonido inherentemente contaminado, que era la presunta fuente de infección.⁵¹

En 2015, se llevó a cabo un estudio por Ko *et al.* referente a un brote hospitalario para determinar el origen de la infección. Durante el brote, se aislaron miembros del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) de 46 hemocultivos de 40 pacientes. Se

⁴⁹ MARTIN, M., *et al.* Hospital-wide outbreak of ***Burkholderia contaminans*** caused by prefabricated moist washcloths. En: *Journal of Hospital Infection*. Marzo, 2011, vol. 77 no. 3, p. 267-270.

⁵⁰ ANDRADE, Ana y VALDIVIEZO, Ana. Control microbiológico de cosméticos elaborados artesanalmente en base de productos naturales en la ciudad de Quito. Trabajo de grado Licenciado de Microbiología Clínica y Aplicada. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Escuela de Bioanálisis, 2012. 137 p.

⁵¹ NANNINI, Esteban, *et al.* Polyclonal outbreak of bacteremia caused by ***Burkholderia cepacia*** complex and the presumptive role of ultrasound gel. En: *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. Septiembre - octubre, 2015, vol. 19 no. 5, p. 543-545.

encontró que un producto en la solución de clorhexidina al 0.5% estaba contaminado con CBc y se usó por error como antiséptico de piel durante el hemocultivo. El retiro del producto y la formación del personal lograron eliminar el brote.⁵²

En 2018, se realizó un trabajo de investigación por Akinboyo *et al.* acerca de un brote en la unidad de cuidados intensivos pediátricos de un hospital. Los aislados bacterianos del caso se analizaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado y reacción en cadena de la polimerasa palindrómica extragénica repetitiva (rep-PCR). Los aislamientos de estos casos estaban estrechamente relacionados, lo que indicó una exposición común. Se analizó el Código Nacional de Medicamentos (NDC) para el Docusato líquido oral de un fabricante asociado con un brote de 2016 (NDC 0536-0590-85) en otro hospital y se determinó que también se había administrado docusato con esta NDC a los pacientes del hospital estudiado. Con base en este descubrimiento, los frascos de Docusato abiertos y sin abrir se entregaron a los CDC y a la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. para ser cultivados. Según los informes, ***Burkholderia cepacia*** crecía en el Docusato líquido abierto, indicando a este producto como la fuente común del brote.⁵³

En el 2018, se realizó una investigación por Cáceres con el objetivo de determinar la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. En el estudio se analizaron 48 muestras de cosméticos capilares. De entre todos los análisis microbiológicos realizados, se obtuvo que un 19% de las muestras presentaron crecimiento de bacterias pertenecientes al Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc), detectándose su presunto crecimiento en agar Cetrimide como colonias blancas-crema. La ausencia de fluorescencia y mediante el proceso de confirmación bioquímica se pudo determinar ausencia de la especie ***Pseudomonas aeruginosa***. Cáceres recomendó, según este estudio, incluir al procedimiento de determinación del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc), la siembra en los agares BD OFPBL (agar oxidación/fermentación-polimixina-bacitracina-lactosa BD) y/o el Agar BD Cepacia Medium, para la detección de los microorganismos que conforman este complejo.⁵⁴

⁵² KO, Suhui, *et al.* An outbreak of ***Burkholderia cepacia*** complex pseudobacteremia associated with intrinsically contaminated commercial 0.5% chlorhexidine solution. En: *American Journal of Infection Control*. Marzo, 2015, vol. 43 no. 3, p. 266-268.

⁵³ AKINBOYO, Ibukunoluwa *et al.* Multistate Outbreak of an Emerging ***Burkholderia cepacia*** Complex Strain Associated With Contaminated Oral Liquid Docusate Sodium. En: *Infection Control & Hospital Epidemiology*. Febrero, 2018, vol. 39 no. 2, p. 237-239.

⁵⁴ CÁCERES, María. Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. Tesis Licenciada en

En 2018, se llevó a cabo un estudio por Becker *et al.* relativo a un brote hospitalario en una unidad de cuidados intensivos cardiorrespiratorios en Alemania. En el plazo de 1 mes, se diagnosticó a tres pacientes en estado crítico por infección del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) identificado en muestras respiratorias. La investigación del brote empleando tipificación por secuenciación del genoma completo (WGS) indicaron como fuente de contaminación a una solución de enjuague bucal de octenidina.⁵⁵

En 2019 se realizó una investigación por Valderrama *et al.* concerniente a un brote en dos unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario en Bogotá – Colombia. Se realizó toma de cultivos ambientales y de insumos. Los aislamientos microbiológicos se sometieron a análisis molecular. Se llevaron a cabo hemocultivos a partir de muestras tomadas de un catéter venoso central, con los cuales se identificaron 8 pacientes con bacteriemia por ***Burkholderia cepacia*** en la UCI para adultos y UCI Pediátrica. Se detectó crecimiento de ***Burkholderia cepacia*** en un lote de bolsitas (“sachet”) de jabón de clorhexidina al 4% y en lavamanos que se correlacionaron con el clon identificado en los pacientes. Se concluyó que las fuentes del brote por ***Burkholderia cepacia*** fueron un lote de jabón de clorhexidina y de los lavamanos contaminados.⁵⁶

En 2020, se realizó una investigación por Wen *et al.* con el objetivo de analizar una colección de aislados del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) en Productos de cuidado personal y evaluar la susceptibilidad de los conservantes, incluida la dimetoxi dimetil hidantoína (DMDMH), metilisotiazolinona-clorometilisotiazolinona (MIT / cMIT) y 4-hidroxibenzoato de metilo (MH). Los aislamientos de CBc recolectados durante el período de estudio de 3 años (2015-2017) se examinaron más a fondo mediante un sistema de identificación bioquímica, análisis filogenético basado en secuencias *recA* de nucleótidos y análisis de tipificación de secuencias multilocus. Las pruebas de susceptibilidad a los conservantes de las bacterias CBc se evaluaron mediante la concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida mínima. Se identificaron un total de siete tipos de secuencia distintos, que pertenecían a cuatro especies diferentes de CBc: ***Burkholderia***

Biología. Lima: Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Profesional de Biología, 2018. 70 p.

⁵⁵ BECKER, Sören *et al.* Outbreak of ***Burkholderia cepacia*** complex infections associated with contaminated octenidine mouthwash solution, Germany, August to September 2018. En: *Euro Surveill.* Octubre, 2018, vol. 23 no. 42.

⁵⁶ VALDERRAMA, Sandra *et al.* Pseudobrote por ***Burkholderia cepacia*** en dos unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario en Bogotá – Colombia. En: *Infectio.* Agosto, 2019, vol. 23 no. 2, 143-147.

cenocepacia (ST621, ST258 y novel ST), **Burkholderia lata** (ST339 y ST336), **Burkholderia contaminans** (ST482), **Burkholderia cepacia** (ST922). Para DMDMH y MH, las concentraciones máximas permitidas de acuerdo con la especificación de seguridad de los cosméticos (0,6% y 0,4%) pudieron inhibir o matar todas las cepas de CBc, pero el 40% de los aislados de CBc podrían sobrevivir a concentraciones superiores a las máximas permitidas de MIT / cMIT (de una mezcla en la proporción 3: 1 de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona). Los autores concluyeron que los fabricantes deberían estar más atentos a la contaminación de los de productos de cuidado personal por cepas de CBc, dada su diversidad en la epidemiología molecular y su baja susceptibilidad a conservantes como MIT / cMIT.⁵⁷

3.6 VALIDACIÓN

La validación de un método analítico es el proceso que confirma que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos de la aplicación analítica esperada. La Tabla 1 expone las características típicas de rendimiento analítico que deben tenerse en cuenta en la validación de métodos cualitativos y cuantitativos.⁵⁸

Tabla 1. Características de desempeño analítico utilizadas para validación de métodos compendiales según la USP 42 – NF 37 Capítulo 1225.⁵⁹

Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de detección
Límite de cuantificación
Linealidad
Intervalo
Robustez

⁵⁷ WEN, Xia *et al.* **Burkholderia Cepacia** Complex in Personal Care Products: Molecular Epidemiology and Susceptibility to Preservatives. En: *Journal of Cosmetic Science*. Mayo – Junio, 2020, vol. 71 no. 3, p. 133-148.

⁵⁸ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁵⁹ *Ibid.*, p. 8388.

3.7 VERIFICACIÓN

La verificación consiste en la evaluación de características de desempeño analítico seleccionadas (como las que se muestran en la Tabla 1) para generar datos relevantes apropiados, en lugar de repetir el procedimiento de validación. Los usuarios de los procedimientos analíticos de la farmacopea USP-NF no necesitan verificar estos procedimientos cuando los utilizan por primera vez en sus laboratorios, pero deben establecer una prueba de idoneidad documentada en las condiciones reales de uso.⁶⁰

Aunque no es necesario volver a validar por completo un método farmacopeico para verificar su suficiencia, se pueden utilizar algunas características de rendimiento analítico del proceso de validación. Solo se deben evaluar aquellas características que se consideran adecuadas para la verificación de un método en particular. Por ejemplo, la especificidad es un parámetro clave a evaluar para verificar que un protocolo de la farmacopea es adecuado para los análisis de productos y compuestos farmacéuticos. Otras características de rendimiento analítico, como la evaluación de los límites de detección o la cuantificación y precisión de los procedimientos de impurezas, pueden ayudar a demostrar la idoneidad del método de la farmacopea en condiciones reales de uso.⁶¹

La norma ISO/IEC 17025 en el apartado 5.4.2 señala que los laboratorios deben comprobar que pueden operar adecuadamente los métodos estandarizados antes de incluir los ensayos o calibraciones. También la verificación es necesaria llevarla a cabo cuando hay cambios relevantes, como en el uso de nuevos equipos similares a los anteriores, traslado de equipos, etc.⁶²

⁶⁰ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1226, Verificación procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁶¹ *Ibid.*, p. 8394.

⁶² MORILLAS, P.P *et al.* EURACHEM. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Primera Edición Española. Eurolab España, 2016. 60 p.

3.8 PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO

Son aquellas características de validación que necesitan ser valoradas y que usualmente son: precisión, linealidad, especificidad, exactitud, robustez, límite de cuantificación, intervalo de linealidad y límite de detección.⁶³

3.9 MÉTODO NORMALIZADO

Un método normalizado es aquel que se aplica exactamente como se describe en la norma. El laboratorio debe confirmar que puede aplicar un método normalizado correctamente previo a su uso en ensayos a través de la verificación del cumplimiento de los parámetros estadísticos involucrados en el método normalizado. Para ensayos cuantitativos, las características de desempeño a determinar son: precisión, límite de cuantificación y verificación de la veracidad. Los parámetros de desempeño a evaluar para ensayos cualitativos de métodos normalizados (como el Método analítico microbiológico de la farmacopea USP-NF "Detección del complejo *Burkholderia cepacia* UFC/g o ml" en cosméticos y medicamentos no estériles), son: sensibilidad, especificidad y límite de detección.⁶⁴

3.9.1 SENSIBILIDAD

Para un tipo de matriz y un nivel de inoculación especificado, se define como la porción del número total de colonias o cultivos positivos que son asignados correctamente con el método utilizado. También puede definirse como la capacidad de un método para llevar a cabo la detección del microorganismo diana, cuando este está presente.⁶⁵

⁶³ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁶⁴ ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN (OAA). Guía para la validación de métodos microbiológicos. 1era versión. 2013.

⁶⁵ Ibid., p. 7.

En conformidad con la guía para la validación de métodos microbiológicos para la validación de métodos microbiológicos de la OAA (Organismo Argentino de Acreditación), la sensibilidad puede calcularse con la siguiente fórmula:⁶⁶

$$\frac{VP}{VP + FN} * 100$$

Las abreviaciones en la fórmula significan:

- Verdadero positivos (VP): Número de casos que la prueba declara positivos y que son verdaderamente positivos.
- Falsos negativos (FN): Número de casos que la prueba declara negativos y que son realmente positivos.

3.9.2 SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

Se refiere a la capacidad de un método analítico para medir con especificidad y exactitud un analito sin interferencias en la detección debido a la presencia de impurezas que pueden estar en la muestra.⁶⁷

Según los documentos de la ICH (El Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano), la especificidad es definida como la capacidad de un método para evaluar certeramente un analito en presencia de componentes esperados (como componentes de la matriz, impurezas y productos de degradación). La falta de especificidad de un protocolo analítico puede compensarse el apoyo de otros procedimientos analíticos. [Nota: Autoridades internacionales acreditadas (IUPAC, AOAC) prefieren utilizar el término "selectivo", y no "especificidad", para los procedimientos totalmente selectivos].⁶⁸

⁶⁶ Ibid., p. 17.

⁶⁷ CASTILLO, Beatriz y GONZÁLEZ, Rolando. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. En: *Revista Cubana de Farmacia*. Enero – Abril, 1996, vol. 30 no. 1.

⁶⁸ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los

Para determinar la selectividad / especificidad en un análisis cualitativo (prueba de identificación), es necesario demostrar la capacidad del método para seleccionar entre compuestos con estructuras estrechamente relacionadas que puedan estar presentes en la muestra. Esta capacidad de selección debe corroborarse obteniendo resultados positivos en muestras que contenga el analito (quizás en comparación con un material de referencia conocido), y además, obteniendo resultados negativos en muestra que no contengan el analito, confirmando que no se obtiene una reacción positiva de los materiales similares en estructura o con estrecha relación al analito.⁶⁹

Según la Guía para la validación de métodos microbiológicos para la validación de métodos microbiológicos de la OAA (Organismo Argentino de Acreditación), la selectividad puede calcularse con la siguiente fórmula:⁷⁰

$$\frac{VN}{VN + FP} * 100$$

Las abreviaciones en la fórmula significan:

- Verdadero negativo (VN): Número de casos que la prueba declara negativos y que son realmente negativos.
- Falsos positivos (FP): Número de casos que la prueba declara positivos y que son realmente negativos.

3.9.3 LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Se define como la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, pero no cuantificarse necesariamente, en condiciones experimentales específicas. Por lo

Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁶⁹ Ibid., p. 8390.

⁷⁰ ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN (OAA). Guía para la validación de métodos microbiológicos. 1era versión. 2013.

tanto, las pruebas de límite solo confirman que la cantidad de analito está por encima o por debajo de cierto nivel. El límite de detección en términos generales se expresa como la concentración de analito (partes por mil millones, porcentaje, etc) en la muestra.⁷¹

El límite de detección, para los métodos no instrumentales, generalmente se determina a través del análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito fijando el nivel mínimo en el que el analito puede detectarse de manera certera. Para los procedimientos instrumentales, puede utilizarse el mismo método que para los no instrumentales. En el caso de los métodos de compendio oficiales, casi nunca se necesita determinar el límite de detección real sino demostrar que el límite de detección es suficientemente bajo a través del análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito por encima y por debajo del nivel de detección que es requerido. Por ejemplo, si se necesita detectar una impureza al nivel de 0.1%, se debe demostrar que el procedimiento detectará de manera confiable la impureza a ese nivel.⁷²

Para cualquier método que se utilice, el límite de detección debe validarse mediante el análisis de un número apropiado de muestras que se sepa que están cerca del límite de detección o que se han preparado en él.⁷³

⁷¹ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁷² Ibid., p. 8390.

⁷³ Ibid., p. 8391.

4. METODOLOGÍA

Métodos para cumplir el objetivo general y el objetivo específico 1

4.1 PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN

El protocolo de verificación se basó en el método estandarizado de la USP-NF 2021 capítulo 60 *Detección del complejo de Burkholderia cepacia* UFC/g o mL (ver protocolo en Anexo 4). Así, se realizó el protocolo de la USP-NF añadiéndole procedimientos pertinentes para la evaluación de las características de desempeño de método, los cuales se describen en el numeral 4.3. Además, cada ensayo del protocolo de verificación se realizó por triplicado para corroborar la consistencia de los resultados. El protocolo de verificación fue realizado por un primer analista. Luego, todo el procedimiento fue realizado por un segundo analista; esto, con el fin de comprobar si se presentarían variaciones en los resultados por posibles errores metodológicos.

4.1.1 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Burkholderia cepacia* Y *Pseudomonas aeruginosa*

Las cepas de los dos microorganismos conservados en crioperlas se sembraron en Agar Caso para su reactivación. Posteriormente se incubó la siembra de *B. cepacia* a 30 °C-35 °C durante 48h y la de *P. aeruginosa* a 35°C durante 24h.

4.1.2 ESTANDARIZACIÓN DE LOS INÓCULOS

Se establecieron tres concentraciones finales de *Burkholderia cepacia* en 100ml de muestra homogenizada, correspondientes a Nivel Bajo (1 UFC/ml), Nivel Medio (10 UFC/ml) y Nivel Alto (100 UFC/ml). Para ello, se tomaron colonias del Agar Caso donde se reactivó el microorganismo y se homogenizaron en un tubo de ensayo de poliestireno claro de 12x75 mm con 10ml de peptona tamponada al 0.1% hasta obtener una turbidez de 3 unidades de la escala de McFarland indicada en el densitómetro DensiChek™ (previamente calibrado, ver procedimiento de verificación del instrumento en Anexo 3), obteniendo una concentración de 10^9 UFC/ml. A partir de este tubo, se hicieron 8 diluciones para obtener concentraciones del microorganismo correspondientes a 10^8 hasta 10^1 . Este procedimiento también se realizó para *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismo para el cual se estableció una concentración final de Nivel Alto (100 UFC/ml). Las concentraciones

seleccionadas del patrón de diluciones fueron 10^3 , 10^4 y 10^5 teniendo en cuenta las concentraciones finales (1 UFC/ml, 10 UFC/ml, 100 UFC/ml) a las que se deseaba utilizar *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*, como se aprecia en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración inicial y concentración final de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Diluciones	UFC/ml en 10ml	Concentración final en 100ml de muestra homogenizada (UFC/ml)
10^1	10	0,01
10^2	100	0,1
10^3 (Nivel Bajo)	1000	1
10^4 (Nivel Medio)	10000	10
10^5 (Nivel Alto)	100000	100

4.1.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y PRE-INCUBACIÓN

Se analizaron 6 productos no estériles, realizando 4 homogenizaciones de cada muestra diluyendo 10 g o ml de esta en 90 ml de caldo Caso más polisorbato 80. Se añadió a tres homogenizaciones de cada muestra 0,1ml de las concentraciones 10^3 , 10^4 y 10^5 de *B. cepacia* para obtener concentraciones finales correspondientes a Nivel Bajo (1 UFC/ml), Nivel Medio (10 UFC/ml) y Nivel Alto (100 UFC/ml). A la cuarta homogenización de la muestra se añadió 0,1ml de la concentración 10^5 de *P. aeruginosa* correspondiente Nivel Alto (100 UFC/ml). Luego se mezcló e incubó a 30 °C-35 °C durante 48-72 h.

4.1.4 SELECCIÓN Y SUBCULTIVO

Las cuatro homogenizaciones de cada muestra se subcultivaron, en estrías y por triplicado, en placas de agar selectivo de *Burkholderia cepacia* (BCSA) incubando posteriormente a 30°C-35°C durante 48-72 h.

4.1.5 INTERPRETACIÓN

- La posible presencia del complejo de *Burkholderia cepacia* se indica por el crecimiento de colonias de color marrón verdoso con halos amarillos o colonias

blancas, rodeado por una zona rosa-roja en BCSA. Cualquier crecimiento en BCSA se confirma mediante pruebas de identificación.

- La ausencia de colonias a partir de las muestras inoculadas con *Pseudomonas aeruginosa* evidencia ausencia de crecimiento de este microorganismo.

4.1.6 TIPIFICACIÓN DE *Burkholderia cepacia*

Para respaldar la identidad de los aislamientos en agar BCSA a partir de las seis muestras, se realizaron pruebas bioquímicas automatizadas utilizando el equipo Vitek 2 Compact 15 - bioMérieux^{MR}. Para ello, los cultivos en agar BCSA se subcultivaron en agar Caso para obtener cultivos puros, sembrando por agotamiento e incubando a 30 °C-35 °C durante 48-72 h. Pasado ese tiempo, se realizó tinción de Gram a los cultivos puros para confirmar la presencia de Bacilos Gram-negativos correspondientes a *B. cepacia*. Posteriormente se dispensaron 3ml de solución salina al 0.45% (pH 4.5-7.0) en 6 tubos de ensayo de poliestireno claro de 12x75 mm (asignando uno para cada muestra) y se colocaron en el densitómetro DensiChekTM (previamente calibrado, ver procedimiento de verificación del instrumento en Anexo 3). Se tomaron colonias de los cultivos puros y se homogenizaron en cada tubo hasta obtener una turbidez entre 0.50 y 0.63 unidades de la escala de McFarland indicada en el densitómetro. Seguidamente, se colocaron los 6 tubos en una gradilla de tipificación que se montó en el equipo Vitek 2 Compact 15 - bioMérieux^{MR}.

Métodos para cumplir el objetivo específico 2

4.2 MATRICES UTILIZADAS

Las matrices que se utilizaron para verificar el método fueron 6 productos no estériles: shampoo en seco, agua micelar, crema de manos, Bromuro de Ipratropio, antiácido y capsulas de vitamina E-Omega 3. Estos productos se eligieron teniendo en cuenta sus características físicas: productos solubles en agua, productos no grasos insoluble en agua, productos grasos, líquidos en forma de aerosol solubles en agua y productos insolubles en agua (ver Tabla 3). Se eligieron estas características físicas para determinar si representan un inconveniente para el método USP-NF en la detección de *B. cepacia*.

Tabla 3. Muestras seleccionadas.

Matrices	Categoría	Producto	Imagen*
M1	Productos solubles en agua	Bromuro de Ipratropio	
M3	Producto no graso insoluble en agua	Antiácido	
M4	Productos grasos	Omega 3-Vitamina E	
M6	Líquidos en forma de aerosol solubles en agua	Shampoo en seco	
M7	Productos insolubles en agua	Agua micelar	
M8	Productos grasos	Crema de manos	

* Imágenes tomadas de:

<https://www.drogueriasalfa.com/inicio/63-atrovent-0025-20-ml-sol-inhalador.html>

<http://seritampo.co/linea1.html>

https://articulo.mercadolibre.com.co/MCO-493110687-omega-3-6-9-vitamina-e-x-50-capsulas-botanitas-medick-_JM

<https://almacensandra.com.co/p/badi-dry-love-sampoo-x-200ml/>

<https://www.tiendasjumbo.co/agua-micelar-garnier-skinactive-todo-en-1-x100ml/p>

<https://perfumeriaspigmento.com.ar/nivea-crema-de-manos-nutritiva-intensiva41829>

Métodos para cumplir el objetivo específico 3

4.3 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE MÉTODO EVALUADAS

Según el Organismo Argentino de Acreditación (OAA) en su *Guía para la validación de métodos microbiológicos* de 2013 (Ver referencia en Bibliografía), los parámetros de desempeño a evaluar para métodos cualitativos normalizados son selectividad, sensibilidad y límite de detección. Por ello, estos parámetros fueron los que se evaluaron para el método analítico microbiológico de la Farmacopea USP-NF *Detección del complejo **Burkholderia cepacia** UFC/g o ml.*

El analito a detectar en el protocolo de Farmacopea USP-NF es el Complejo **Burkholderia cepacia** (CBc), por tanto, **B. cepacia** fue el microorganismo que se inoculó a las matrices. Como analito similar se utilizó **Pseudomonas aeruginosa** ya que el método no debe detectar a este microorganismo sino inhibirlo. Para los inóculos de estos dos microorganismos se eligió un volumen de 0,1ml a dispensar en las muestras ya que al ser tan pequeño no alterará el volumen de muestra homogenizada.

- La selectividad se evaluó obteniendo resultados positivos en las muestras que contenía el analito (verdaderos positivos) **B. cepacia** a concentraciones finales de 1 UFC/ml, 10 UFC/ml y 100 UFC/ml, además de obtener resultados negativos en muestras que no contenían el analito sino una bacteria semejante **P. aeruginosa** (verdaderos negativos) a una concentración de 100UFC/ml.
- La inoculación del analito diana a las matrices (**B. cepacia**) a concentraciones de 1 UFC/ml, 10 UFC/ml y 100 UFC/ml también fue útil para verificar la sensibilidad del método, a través de resultados positivos en muestras que contenían el analito (verdaderos positivos).
- Respecto al límite de detección, los inóculos de **B. cepacia** a concentraciones finales de 1 UFC/ml, 10 UFC/ml y 100 UFC/ml en las muestras fueron convenientes para establecer a que concentración mínima del analito era capaz de detectar el método.

La Tabla 4 muestra el cálculo respectivo de los parámetros de desempeño evaluados y los criterios de aceptación a partir de los cuales se valoró la capacidad de detección del método USP-NF.

Tabla 4. Parámetros de desempeño utilizados para la verificación del método.

Parámetro	Cálculo	Criterios de aceptación*
Límite de detección	Concentración mínima del analito capaz de detectar el método	No aplica
Sensibilidad	$\frac{VP}{VP + FN} * 100$	>70%
Especificidad/ Selectividad	$\frac{VN}{VN + FP} * 100$	>70%

(*) Criterio de aceptación (>70%) establecido por la USP 42 – NF 37 de 2019, Volumen 5, capítulo 1227 (página 8397) para la *Validación de métodos de neutralización*, en la prueba de aptitud de método *Recuperación en Medio de agar* donde se establece, para el experimento descrito en *Validación de Métodos de Neutralización - Comparaciones de Recuperación*, que el número promedio de UFC recuperadas del producto de desafío no debe ser menos del 70% del número recuperado del control de inóculo. Se utilizó este criterio de aceptación extrapolándolo, en el protocolo de verificación, al número de placas sembradas que presentaran crecimiento cualitativo de *Burkholderia cepacia*.

En la Tabla 4, las abreviaciones en las fórmulas para el cálculo de los parámetros de desempeño de método significan:

- Verdadero positivos (VP): Número de casos que la prueba declara positivos y que son realmente positivos.
- Verdadero negativo (VN): Número de casos que la prueba declara negativos y que son realmente negativos.
- Falsos positivos (FP): Número de casos que la prueba declara positivos y que son realmente negativos.

- Falsos negativos (FN): Número de casos que la prueba declara negativos y que son realmente positivos.

4.4 REACTIVOS, MATERILES, EQUIPOS Y CEPAS

4.4.1 REACTIVOS

- Agar selectivo de *Burkholderia cepacia* (BCSA) - Scharlau
- Suplemento para agar *Burkholderia cepacia* - Scharlau
- Caldo Caso - Merck Millipore
- Polisorbato 80 - Merquimia Colombia S.A.
- Lecitina de soya - Scharlau
- Agar Caso - Scharlau
- Agua esterilizada
- Agua purificada
- Alcohol al 70%
- Hipoclorito a 200ppm
- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol-cetona
- Safranina
- Peptona tamponada al 0.1% - Merck Millipore
- Solución salina al 0.45% - Merck Supelco

4.4.2 MATERIALES

- Jarra plástica
- Varilla de agitación
- Frascos de laboratorio graduado con rosca de 500ml
- Frascos de laboratorio graduado con rosca de 1000ml
- Frascos de laboratorio graduado con rosca de 50ml
- Cinta termoindicadora
- Indicador biológico 3M™ Attest™
- Integrador químico de Vapor 3M Comply® SteriGage®
- Papel absorbente
- Probeta de 1000ml
- Cajas de Petri desechables

- Tubos de ensayo con tapa
- Tubos de ensayo de poliestireno claro de 12x75 mm
- Gradillas
- Puntas de micropipeta
- Bolsas de homogenización
- Asas desechables
- Vinipel
- Portaobjetos
- Gradilla de tipificación

4.4.3 EQUIPOS

- Balanza analítica - OHAUS
- Balanza digital - Shimadzu
- Micropipeta p1000
- Cocina
- Licuadora
- Dispensador de medios de laboratorio FlexiPump® - INTERSCIENCE
- Autoclave - Industrias Centricol S.A.S
- Diluidor automatizado - Dilumat S gravimetric diluter AES CHEMUNEX
- Homogenizador Smasher™ - AES CHEMUNEX
- Densitómetro McFarland - DensiChek™ plus bioMérieux^{MR}
- Cabina de flujo laminar - Labconco
- Vortex Ginius 3 - IKA
- Incubadora de 35°C – DiES
- Microscopio Leica DM750
- Equipo Vitek 2 Compact 15 - bioMérieux^{MR}

4.4.4 CEPAS DE REFERENCIA

- ***Burkholderia cepacia*** ATCC 25416
- ***Pseudomonas aeruginosa*** ATCC 9027

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 5. Cronograma de actividades del Trabajo de grado.

ACTIVIDAD	Año 2021 - Periodo I											
	Febrero		Marzo						Abril			
	20	27	8	10	11	13	15	12	14	17	19	20
Planteamiento del proyecto												
Formulación del anteproyecto												
Reactivación de las cepas												
Estandarización de los inóculos												
Preparación de muestras 1 y 3; pre-incubación de muestras												
Preparación de muestra 4 y pre-incubación												
Lectura de resultados de agar BCSA de muestra 1 y 3												
Subcultivo de <i>B. cepacia</i> de agar BCSA de muestra 1 y 3 a agar Caso e incubación												
Lectura de resultados de agar BCSA de muestra 4												
Subcultivo de <i>B. cepacia</i> de agar BCSA de muestra 4 a agar Caso e incubación												
Reactivación de las cepas												
Estandarización de los inóculos												

Tabla 5. (Continuación).

ACTIVIDAD	Año 2021 - Periodo I												
	Febrero		Marzo						Abril				
	20	27	8	10	11	13	15	12	14	17	19	20	
Preparación de muestras 6, 7 y 8; pre-incubación de muestras													
Lectura de resultados de agar BCSA de muestra 6, 7 y 8													
Subcultivo de <i>B. cepacia</i> de agar BCSA de muestra 6, 7, 8 a agar Caso e incubación													
Montaje de muestras 1, 3, 4, 6, 7 y 8 al equipo Vitek 2 compact													
Lectura de resultados de identificación microbiana Vitek 2 compact													

Nota: en el anexo 6 se puede apreciar el cronograma de actividades laborales de rutina desempeñadas en Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S.

6. RESULTADOS

Resultados obtenidos del objetivo general y el objetivo específico 1

Tabla 6. Resultados obtenidos de las siembras en agar *Burkholderia cepacia* (BCSA).

Muestra	Analista	Crecimiento en agar BCSA											
		<i>B. cepacia</i>									<i>P. aeruginosa</i>		
		NB*			NM*			NA*			Interferente NA*		
M1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M3	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M4	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M6	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M7	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M8	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

(*) Concentraciones finales de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* correspondientes a Nivel Bajo: NB (1 UFC/ml), Nivel Medio: NM (10 UFC/ml) y Nivel Alto: NA (100 UFC/ml). Los signos positivos (+) representan aquellos cultivos en los que hubo crecimiento, mientras que los signos negativos (-) aquellos en los que no hubo.

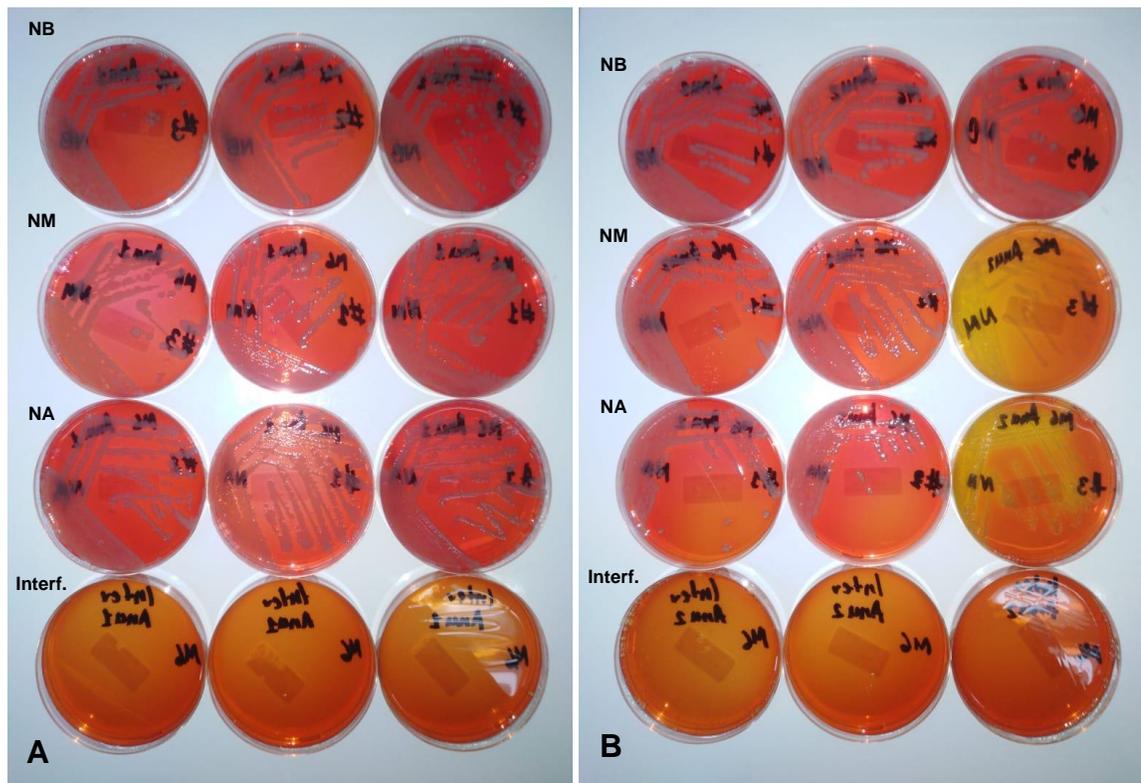
Como se muestra en la Tabla 6, en todas las concentraciones de *Burkholderia cepacia* inoculadas en las muestras hubo crecimiento en agar BCSA, creciendo como colonias típicas de color marrón verdoso con halos amarillos, otros sin halos amarillos o colonias blancas y rodeadas por una zona rosa-roja. Por su parte, *Pseudomonas aeruginosa* no presentó crecimiento en agar BCSA a partir de las seis muestras.

Los resultados de tipificación con las pruebas bioquímicas automatizadas realizadas por el equipo Vitek 2 Compact 15, evidenciaron una identificación del microorganismo inoculado (*B. cepacia*) como miembro del Complejo *Burkholderia*

cepacia (CBc) con un 97-99% de probabilidad y un nivel de confianza de identificación excelente, respaldando la identidad de los aislamientos en agar BCSA a partir de las seis muestras (ver Anexo 2).

Resultados obtenidos del objetivo específico 2

Imagen 4. Aislamiento de *Burkholderia cepacia* en Agar BCSA a partir de la Muestra 6.



Las placas sembradas por el Analista 1 y por el Analista 2 presentaron uniformidad respecto al crecimiento cualitativo de *Burkholderia cepacia*, creciendo como colonias de color marrón verdoso con y sin halos amarillos. Esto se puede apreciar en la Imagen 4, en donde se evidencia el crecimiento de *Burkholderia cepacia* a partir de la muestra 6. La imagen A muestra el aislamiento realizado por el analista 1 y la imagen B el aislamiento realizado el analista 2. Las abreviaciones corresponden a NB: nivel bajo; NM: nivel medio; NA: nivel alto; Interf.: Interferente.

Los aislamientos realizados a partir de la muestra 4 presentaron un crecimiento cualitativo reducido respecto a los aislamientos de las demás muestras (ver Anexo 1).

Resultados obtenidos del objetivo específico 3

Tabla 7. Resultados obtenidos de las características de desempeño.

Parámetro	Fórmula	Cálculo	Resultado	Criterio de aceptación >70%
Límite de detección	No aplica	No aplica	1 UFC/ml	No aplica
Sensibilidad	$\frac{VP}{VP + FN} * 100$	$\frac{108}{108 + 0} * 100$	100%	Aceptable
Especificidad/ Selectividad	$\frac{VN}{VN + FP} * 100$	$\frac{36}{36 + 0} * 100$	100%	Aceptable

Con respecto a las características de desempeño, de acuerdo a la Tabla 7, el límite de detección del método fue de una concentración de 1 UFC/ml de **Burkholderia cepacia**, ya que los aislamientos presentaron crecimiento en agar BCSA a esa concentración mínima establecida. Cabe señalar, que los aislamientos de la muestra 4 presentaron un menor crecimiento cualitativo respecto a los aislamientos de las demás muestras (ver Anexo 1).

Como se aprecia en la Tabla 7, los porcentajes obtenidos en la sensibilidad y la especificidad excedieron satisfactoriamente los criterios de aceptación mayores al 70%. La sensibilidad del método fue de 100%, evidenciándose en el crecimiento de **B. cepacia** en las 108 placas sembradas en total. La especificidad/selectividad fue del 100%, demostrándose por el nulo crecimiento del Interferente **Pseudomonas aeruginosa** en las 36 placas en total inoculadas con este microorganismo y por el crecimiento de **B. cepacia** en aquellas cajas en las que se inóculo.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El uso de metodologías estandarizadas por parte de un laboratorio es fundamental ya que, al ser procedimientos previamente validados, significa que la consistencia y confiabilidad de los resultados ha sido comprobada experimentalmente. Sin embargo, la adopción de métodos normalizados implica la verificación a través de la realización de un trabajo experimental para demostrar, a través de evidencias objetivas, que el método funciona adecuadamente.⁷⁴ Así, en este estudio se realizó la verificación del método microbiológico de la Farmacopea Estadounidense USP-NF “Detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** UFC/g o mL” en cosméticos y medicamentos no estériles.

Análisis de los resultados obtenidos del objetivo específico 2

Los resultados obtenidos de los aislamientos realizados a partir de las muestras 1, 3, 6, 7 y 8 evidenciaron un crecimiento cualitativo notable de ***Burkholderia cepacia***, tanto los sembrados por el analista 1 como los sembrados por el analista 2. No obstante, los aislamientos realizados a partir de la muestra 4 mostraron un menor crecimiento cualitativo en las tres concentraciones inoculadas respecto a los aislamientos de las demás muestras. Esto puede atribuirse a la naturaleza de la muestra 4, correspondiente a capsulas de Omega 3 y Vitamina E, las cuales inhibieron parcialmente a ***Burkholderia cepacia***.

Esto lo demuestra un estudio realizado por Naguib y Valvano en 2018, en el que se evidenció que formas de vitamina E solubles en agua y formas liposolubles actúan como inhibidores de la unión de antibióticos BcnA en ***Burkholderia cenocepacia***. Esta bacteria produce la proteína lipocalina bacteriana extracelular BcnA tras la exposición a concentraciones subletales de antibióticos bactericidas. BcnA captura una variedad de antibióticos fuera de las células bacterianas, proporcionando un mecanismo extracelular global de resistencia a los antimicrobianos. La vitamina E, al interferir con la unión de antibióticos mediada por lipocalina, podría mejorar la eficacia de los antibióticos para matar estas bacterias. Cuando se combina con antibióticos bactericidas, la vitamina E contribuye a mejorar la destrucción de bacterias tanto *in vitro* como *in vivo*.⁷⁵

⁷⁴ MORILLAS, P.P *et al.* EURACHEM. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Primera Edición Española. Eurolab España, 2016. 60 p.

⁷⁵ NAGUIB, Marwa y VALVANO, Miguel. Vitamin E Increases Antimicrobial Sensitivity by Inhibiting Bacterial Lipocalin Antibiotic Binding. En: *mSphere*. Diciembre, 2018, vol. 3 no. 6. e00564-18.

Por su parte, en un estudio llevado a cabo por Mil-Homens, Bernardes y Fialho en 2012, se evidenció que los ácidos grasos Omega 3, especialmente el DHA (ácido docosahexaenoico de la serie omega-3), tienen propiedades antibacterianas, potencial terapéutico y potencial profiláctico *in vivo* e *in vitro* contra ***Burkholderia cenocepacia*** K56-2, los cuales se demostraron en modelos de infección de oruga ***Galleria mellonella***.⁷⁶

Además, en una investigación realizada por Mil-Homens, Ferreira y Fialho en 2016, se analizaron los efectos antimicrobianos de las fórmulas a base de aceite de pescado ricas en ácidos grasos omega-3 contra patógenos de la fibrosis quística (FQ) (***Burkholderia cenocepacia*** K56-2 y ***Pseudomonas aeruginosa*** PAO1). Los aceites de pescado mostraron eficacia antibacteriana contra estos microorganismos en modelos de infección de oruga ***Galleria mellonella***, presentando mayor actividad los ácidos grasos EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) pertenecientes a la serie Omega 3.⁷⁷

La vitamina E y el Omega 3, así como han evidenciado tener actividad antimicrobiana contra ***Burkholderia cenocepacia***, pueden tener los mismos efectos sobre ***Burkholderia cepacia*** teniendo en cuenta que son especies estrechamente relacionadas al pertenecer al complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBC).⁷⁸

Se presume que la reducción de la carga microbiana en el crecimiento cualitativo de los aislamientos de la muestra 4 no se debió a errores metodológicos en vista del número de repeticiones efectuadas para cada nivel de concentración de ***Burkholderia cepacia*** (3 repeticiones cada uno) además de las 2 repeticiones del procedimiento de verificación realizadas, una llevada a cabo por el Analista 1 y otra por el Analista 2, cuyos aislamientos en agar BCSA a partir de las demás muestras presentaron un crecimiento cualitativo uniforme.

⁷⁶ MIL-HOMENS, Dalila; BERNARDES, Nuno y FIALHO, Arsénio. The antibacterial properties of docosahexaenoic omega-3 fatty acid against the cystic fibrosis multiresistant pathogen ***Burkholderia cenocepacia***. En: *FEMS Microbiology Letters*. Marzo, 2012, vol. 328 no. 1, p. 61-69.

⁷⁷ MIL-HOMENS, D.; FERREIRA, S. y FIALHO, A. Fish oils against ***Burkholderia*** and ***Pseudomonas aeruginosa***: *in vitro* efficacy and their therapeutic and prophylactic effects on infected ***Galleria mellonella*** larvae. En: *Journal of Applied Microbiology*. Marzo, 2016, vol 120 no. 6, p. 1509-1519.

⁷⁸ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. 531 p. (ISBN 978-987-26716-3-1).

Análisis de los resultados obtenidos del objetivo general, objetivo específico 1 y objetivo específico 3

Respecto a las características de desempeño analizadas, los resultados obtenidos en el límite de detección, selectividad y sensibilidad se debieron a los compuestos selectivos y nutricionales del agar BCSA. Debido a ello, en todas las placas sembradas a partir de las seis muestras (tanto las siembras realizadas por el analista 1 y por el analista 2) hubo crecimiento cualitativo de ***B. cepacia*** e inhibición de crecimiento de ***P. aeruginosa***.

El medio BCSA contiene extracto de levadura y peptona de caseína como componentes nutritivos⁷⁹. Los miembros del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) son poco exigentes nutricionalmente⁸⁰ ya que están adaptados a proliferar y a sobrevivir en ambientes con nutrientes limitados⁸¹, por lo que, mientras hayan compuestos orgánicos básicos a partir de los cuales puedan nutrirse, crecerán sin percances. Por otra parte, el medio fue capaz de inhibir ***Pseudomonas aeruginosa*** gracias a los agentes selectivos polimixina B y gentamicina. Además, la vancomicina del medio⁸² fue capaz de inhibir la posible carga microbiana Gram positiva presente en las muestras.⁸³

Las polimixinas tienen un espectro de actividad relativamente estrecho, siendo eficaces contra bacterias Gram negativas aerobias y anaerobias, incluyendo ***P. aeruginosa***. Estos antibióticos son agentes anfipáticos que actúan en la superficie celular. La molécula de polimixina tiene un anillo polipeptídico catiónico con una cadena lateral de ácidos grasos lipofílica. Esta estructura se une con las moléculas de lipopolisacaridos (LPS) aniónicos de la membrana celular por

⁷⁹ LABORATORIOS MICROKIT. BCSA Burkholderia complex selective agar Base. Revisión 2020. España. Laboratorios MICROKIT, 2020. Disponible en: <https://www.microkit.es/fichas/BCSA-BURKHOLDERIA-COMPLEX-SELECTIVE-AGAR-Base-USP-2019.pdf>

⁸⁰ CÁCERES, María. Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. Tesis Licenciada en Biología. Lima: Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Profesional de Biología, 2018. 70 p.

⁸¹ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19.

⁸² LABORATORIOS MICROKIT, BCSA Burkholderia complex selective agar Base, op. cit., pág. 1.

⁸³ GARDETE, Susana y TOMASZ, Alexander. Mechanisms of vancomycin resistance in ***Staphylococcus aureus***. En: *J Clin Invest.* Julio, 2014, vol. 124 no. 7, p. 2836-2840.

desplazamiento del calcio y el magnesio ocasionando alteraciones en la permeabilidad de la envoltura celular, fuga del contenido celular y eventualmente la muerte del microorganismo. Una propiedad adicional de las polimixinas es que al causar destrucción de la membrana celular externa incrementa la penetración intracelular de antibióticos hidrofílicos, dando paso a una actividad antimicrobiana combinada.⁸⁴

Imagen 5. Mecanismo de acción de la polimixina B. A: unión de la polimixina B al lipopolisacárido, B: alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular.

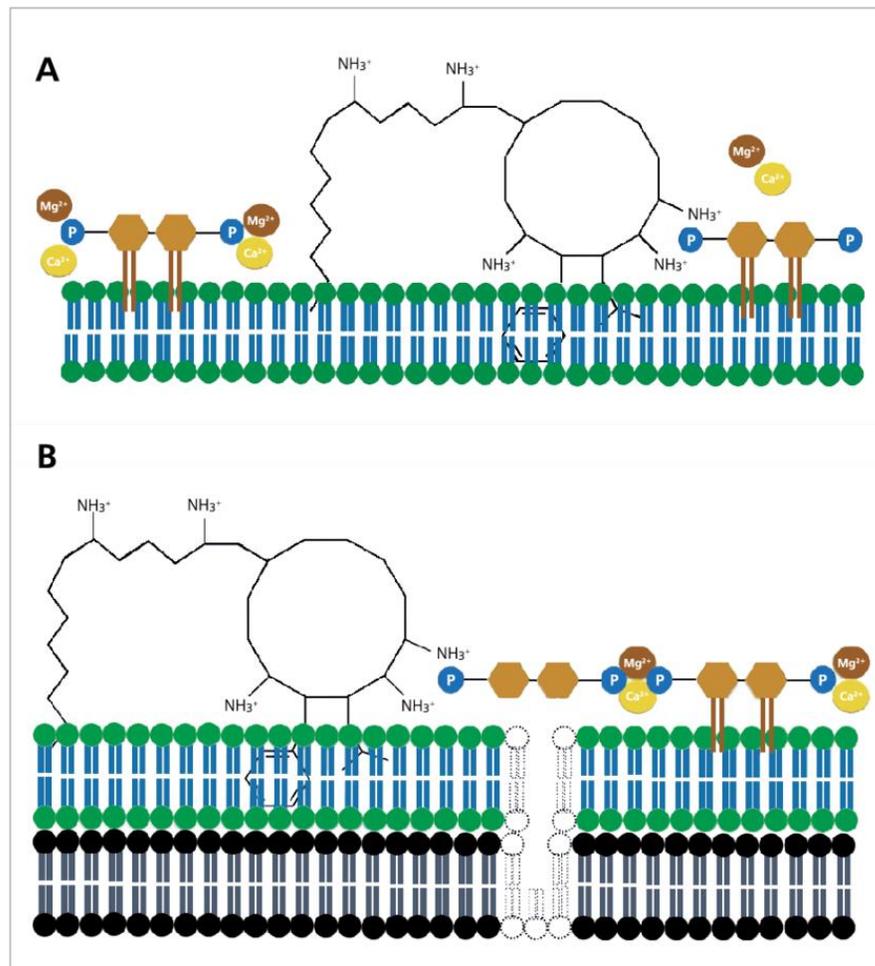


Imagen tomada de: https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Mecanismo-de-accion-de-las-polimixinas-A-Inicialmente-se-genera-una-atraccion_fig3_302943323

⁸⁴ FRAGOZO, Luis y VILLALOBOS, Carlos. *Pseudomona aeruginosa*: estado del arte. Monografía Especialidad de Medicina Interna. Barranquilla: Universidad Libre. Facultad de ciencias de la salud, 2016. 112 p.

Por su parte, la gentamicina es un antibiótico aminoglucósido con acción bactericida, altamente eficaz contra bacilos gramnegativos aerobios⁸⁵ como *Pseudomonas aeruginosa*.⁸⁶ La gentamicina inhibe la formación del complejo de iniciación del ribosoma produciendo un error de lectura del ARN mensajero; esta acción impide el inicio de la síntesis proteínica ocasionando la muerte celular.⁸⁷

Imagen 6. Mecanismo de acción de la gentamicina.

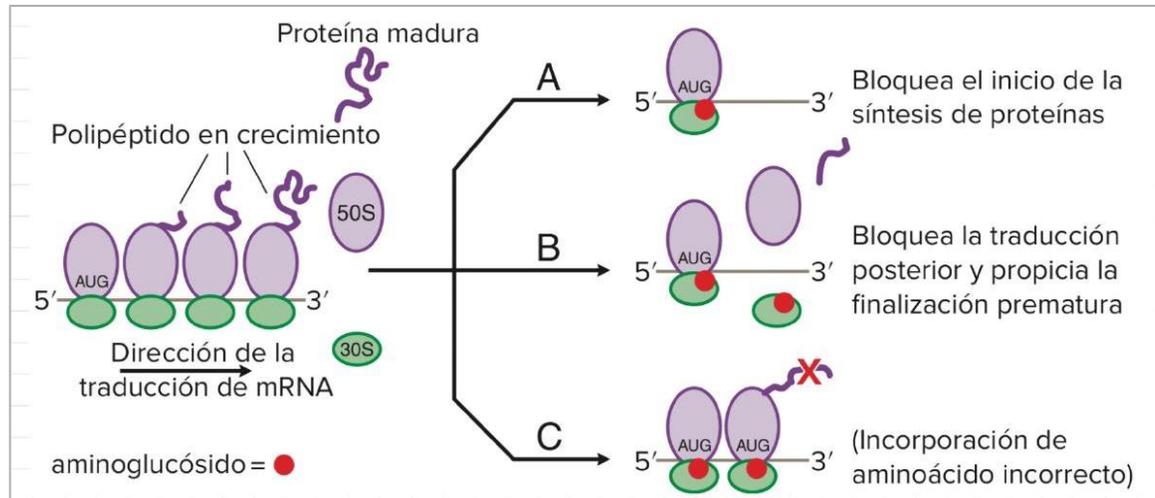


Imagen tomada de: <https://www.udocz.com/co/read/164857/antibioticos-aminoglucosidos>

Por otro lado, la vancomicina es un antibiótico glicopéptido bactericida para la mayoría de los Gram positivos.⁸⁸ El mecanismo de acción de la vancomicina consiste en una unión rápida e irreversible a la pared celular de las bacterias sensibles, inhibiendo la síntesis del péptidoglucano, que constituye el andamiaje de la pared celular. Molecularmente, la vancomicina une su extremo N-terminal al dímero D-alanil-D-alanina del extremo C-terminal del precursor peptidoglucano (el pentapéptido “UDP-N-muranil”) en la superficie externa de la membrana citoplasmática. Simultáneamente, inhibe la actividad de la enzima transglucosilasa, que cataliza la unión entre el precursor peptidoglucano (pentapéptido UDP-N-

⁸⁵ GARG, Ashok *et al.* Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. Buenos Aires: Panamericana, 2010. 616 p. (ISBN: 978-950-06-1712-3).

⁸⁶ ABDELGHANY, Sharif *et al.* Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. En: *Int J Nanomedicine*. Julio, 2012, vol. 7, p. 4053-4063.

⁸⁷ GARG, Ashok *et al.*, op. cit., pág. 148.

⁸⁸ GARDETE, Susana y TOMASZ, Alexander, op. cit., pág. 2836.

muranyl) y el peptidoglucano en crecimiento. La Vancomicina también inhibe las enzimas con actividad transpeptidasa y carboxipeptidasa, enzimas que catalizan la formación de enlaces cruzados entre la estructura del péptidoglucano y la pentaglicina, lo cual otorga rigidez al andamiaje de la pared celular. El resultado final es la formación de una pared celular no rígida. La lisis celular ocurre por la falta de oposición a la presión osmótica.⁸⁹

Imagen 7. Mecanismo de acción de la vancomicina.

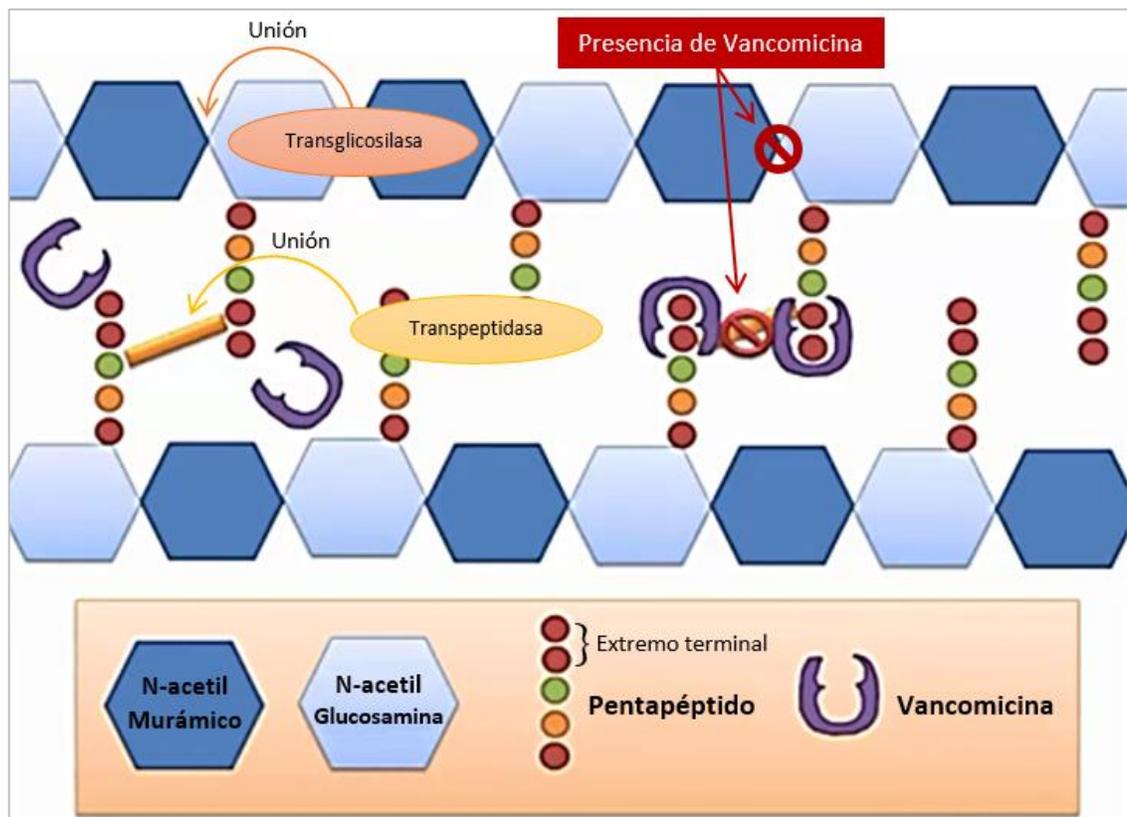


Imagen tomada de: <https://www.youtube.com/watch?v=2fraMQiOJeU>

En lo concerniente a estudios de desempeño de método para la detección de *Burkholderia cepacia* en cosméticos, en un estudio realizado en 2010 por un laboratorio español, Laboratorios Microkit, con el objetivo de revalidar el protocolo para el control microbiológico de productos cosméticos, se compararon los resultados que obtuvieron en tres características de desempeño correspondientes a sensibilidad, selectividad y límite de detección, con los obtenidos con una

⁸⁹ LÓPEZ, José. Vancomicina: informe técnico [en línea]. Zaragoza. (2 de marzo de 2011). [Consultado: 13 de junio de 2021]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/info-farmacia.com/info-farmacia/medico-farmaceuticos/informes-tecnicos/vancomicina-informe-tecnico>

metodología estandarizada (Pharmacopea y su derivado Manual para el Control Microbiológico de Productos Cosméticos, 1994, del Ministerio de Sanidad y Consumo). En este estudio se pretendía revalidar, entre otras tantas, la metodología para la detección de *Burkholderia cepacia* en cosméticos. En esta se realiza un enriquecimiento no selectivo con caldo LPT Neutralizing y el aislamiento selectivo en agar BCPT. Por su parte, en el método de referencia (un método de detección para *Pseudomonas aeruginosa* aplicado a la detección de *Burkholderia cepacia* en cosméticos) se utiliza agar Cetrimide para el aislamiento selectivo de *Burkholderia cepacia*. Las matrices empleadas en el estudio fueron cosméticos: champú, dentífrico, gel de baño, desodorante en barra, leche bronceadora, crema labial, crema antiestrías, colorete en polvo, tónico facial, crema de masaje, enjuague bucal y toallitas de bebé.⁹⁰

Los resultados del estudio demostraron que la metodología Microkit tuvo una sensibilidad del 100%, al igual que el método de la farmacopea USP-NF. Esto significa que el método Microkit y el método USP-NF fueron capaces de detectar al microorganismo en aquellas muestras en las que estaba presente, mientras que aquellas en las que no se inoculó, no se evidenció crecimiento cualitativo. Contrariamente, la sensibilidad del método de referencia fue del 0% significando que se obtuvieron falsos negativos, es decir, se presentaron casos en los que no se detectó el microorganismo cuando estaba presente en la muestra.

La selectividad en los métodos Microkit, USP-NF y el Método de referencia fue del 100%, indicando que estos procedimientos no detectaron otros microorganismos que no fuesen *Burkholderia cepacia*, inhibiendo a otros que no se deseaban detectar. Respecto al límite de detección, el método USP-NF fue el método capaz de detectar *B. cepacia* a concentraciones más bajas (1UFC/ml), seguido del método Microkit (70 UFC/ml). El método de referencia resultó ser el método con un límite de detección más alto (>250 UFC/ml).

La sensibilidad nula y el límite de detección alto del método de Referencia es debido al uso del agar Cetrimide, el cual es un medio de cultivo que no ha sido diseñado para la detección de miembros del Complejo *Burkholderia cepacia* (CBc) sino para *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies del género.⁹¹ Contrariamente, el agar BCPT, utilizado por Laboratorios Microkit, obtuvo notables resultados en las características de desempeño ya que fue diseñado por este laboratorio

⁹⁰ LABORATORIOS MICROKIT. Certificado de validación de cosméticos. Revisión 2010. España. Laboratorios MICROKIT, 2010.

⁹¹ BRITANIA. Cetrimida agar. Revisión 2018. Buenos Aires. BRITANIA, 2018.

específicamente para la detección de ***B. cepacia*** en cosméticos. Los excelentes resultados de este medio están respaldados por la identificación molecular por PCR de las colonias sospechosas obtenidas por sus usuarios en sus muestras naturales.⁹²

De igual forma, los resultados en los parámetros de desempeño del método USP-NF son debido al medio BCSA, creado para el aislamiento de ***B. cepacia***, aunque inicialmente para ser utilizado en el análisis de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística.⁹³ Sin embargo, sus aplicaciones en la detección de ***Burkholderia cepacia*** en productos cosméticos y medicamentos no estériles han mostrado buenos resultados.

Esto se evidencia en una investigación realizada por el laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, en la cual se recomienda el uso del medio BCSA para la identificación del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) en productos farmacéuticos y cosméticos. En este estudio se utilizaron tres medios selectivos utilizados para el aislamiento del Complejo ***B. cepacia*** (CBc): agar BCSA, TB-T (trypan blue- tetraciclina) y el medio PCAT (con ácido azelaico y triptamina). Se empleó el método ecométrico para la comparación de estos medios utilizando cepas del CBc de colección y otras aisladas de productos industriales. Se observó que el medio BCSA fue el más adecuado para el aislamiento del CBc de muestras de fármacos y cosméticos debido a su capacidad de recuperación de cepas y por su selectividad en presencia de otros microorganismos como ***Pseudomonas aeruginosa***.⁹⁴

Otra investigación demuestra la aptitud del agar BCSA para la detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc). Este estudio se realizó en 2019 por Degrossi *et al.* con el objetivo de comparar el agar Trypan Blue-Tetraciclina (TB-T), el agar selectivo para ***Burkholderia cepacia*** (BCSA) y el BCSA comercial modificado (BCSA_m) en el aislamiento de cepas del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) del Taxón K. Mediante el método ecométrico se analizaron los criterios de productividad, selectividad y especificidad frente a cepas de referencia

⁹² LABORATORIOS MICROKIT, op. cit., pág. 6.

⁹³ HENRY, Deborah *et al.* Comparison of Isolation Media for Recovery of ***Burkholderia cepacia*** Complex from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. En: *Journal of Clinical Microbiology*. Abril, 1999, vol. 37 no. 4, p. 1004-1007.

⁹⁴ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. 531 p. (ISBN 978-987-26716-3-1).

del CBc, aislamientos clínicos e industriales del Taxón K y cepas de otras especies. los medios BCSA y BCSAm demostraron diferencias de productividad y selectividad; ambos medios obtuvieron una adecuada productividad y selectividad parcial por permitir el crecimiento de especies taxonómicamente cercanas al CBc. El medio TB-T evidenció una menor selectividad y productividad (especialmente con ***B. contaminans***). Por otra parte, no se observaron diferencias atribuibles al origen industrial o clínico de los aislamientos. Se concluyó que los medios de cultivo BCSAm y BCSA son los medios selectivos más apropiados a utilizar para el aislamiento del Taxón K, tanto en muestras de origen industrial como clínico.⁹⁵

⁹⁵ DEGROSSI, José *et al.* Comparación de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de especies del Taxón K perteneciente al complejo ***Burkholderia cepacia***. En: *Ars Pharm.* Junio, 2019, vol. 60 no. 2, p. 93-100.

8. CONCLUSIONES

- El método de la Farmacopea estadounidense –Formulario Nacional (USP-NF) para la detección del Complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc) demostró un buen desempeño respecto los parámetros de sensibilidad, límite de detección y especificidad/selectividad en la detección de ***Burkholderia cepacia*** en cosméticos y medicamentos no estériles.
- Los productos no estériles correspondientes a Bromuro de Ipratropio, Antiácido, Shampoo en seco, Agua micelar y Crema de manos, demostraron ser matrices cuyas características físicas no interfieren con la capacidad de detección del método USP-NF en el análisis microbiológico para ***Burkholderia cepacia***.
- La matriz de Omega 3 y Vitamina E inhibe parcialmente ***Burkholderia cepacia*** interfiriendo con su crecimiento en agar BCSA.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar pruebas de aptitud de método, con ***Burkholderia cepacia*** y matrices de Omega 3 y Vitamina E, al método USP-NF para la detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** (CBc), utilizando las pruebas descritas en la USP 42- NF 37 de 2019, capítulo 62 (*Examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de microorganismos específicos*) sección *Propiedades de promoción del crecimiento e inhibitorias de los medios, aptitud de la prueba y controles negativos*.
- En caso de que el Omega 3 y Vitamina E demuestren ser matrices que interfirieran con la detección de ***Burkholderia cepacia*** en cosméticos y medicamentos no estériles, se sugieren buscar alternativas que mitiguen este inconveniente.
- Se aconseja evaluar el límite de detección del método USP-NF para la detección del complejo ***Burkholderia cepacia*** en productos no estériles para comprobar los resultados obtenidos en este estudio respecto a ese parámetro de desempeño.

10. GLOSARIO

ANALITO: componente medido por el método de análisis. En el caso de métodos microbiológicos esto es el microorganismo, sus componentes o productos asociados (enzimas o toxinas).

EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO: verificación de la capacidad del método para cumplir de forma satisfactoria con todos los requisitos establecidos para el mismo.

INÓCULO: en microbiología se denomina inóculo a la concentración de microorganismos utilizada para realizar un cultivo microbiano.

MATRIZ: componentes de un producto y sus relaciones moleculares que definen sus propiedades físicas y químicas.

MEDICAMENTO: toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra.

MÉTODO CUALITATIVO: método de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado de forma directa o indirecta en una cierta cantidad de muestra.

MÉTODO DE REFERENCIA: método internacionalmente reconocido y ampliamente aceptado. Por ejemplo, NMKL, ISO, CEN, métodos de AOAC Internacional, métodos que se indican en la Unión Europea, en las legislaciones nacionales y ciertas normas nacionales de calidad equivalente.

MUESTRA: porción del producto (al menos 1 g o 1 ml) que es usado en la prueba para preparar la suspensión inicial.

PRODUCTO COSMÉTICO: sustancia o formulación de aplicación local a ser usada en las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos, o en los dientes y en las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlos en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales

PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN: conjunto de instrucciones por escrito cuyo alcance es mayor que el de un procedimiento normalizado de operación, y que describe detalladamente todos los pasos a seguir para verificar un ensayo.

PRODUCTOS NO ESTÉRILES: son aquellos que permiten la presencia de una carga bacteriana en cantidad limitada de acuerdo a las especificaciones de las normas pertinentes.

11. BIBLIOGRAFÍA

¹ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00139-19>

² BAIRD, R. y BLOOMFIELD, Sally. Microbial Quality Assurance in Cosmetics, Toiletries and Non- Sterile Pharmaceuticals, Boca Raton: CRC Press, 1996. 272 p. (ISBN-10: 0748404376. ISBN-13: 978-0748404377). En: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=NkQPEAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA9&dq=non+sterile+cosmetics&ots=mYC0WsrZVp&sig=UKGtaArGTLTDPN6_emS4dQpghcM#v=onepage&q=non%20sterile%20cosmetics&f=false

³ PELAEZ, Lizeth. Control microbiológico de productos farmacéuticos no estériles en la industria farmacéutica. Trabajo de grado Químico farmacéutico. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, 2016, 89 p. En: <https://1library.co/document/eqoe9w7y-control-microbiologico-productos-farmacuticos-esteriles-industria-farmaceutica.html>

⁴ JIN, Yuan, *et al.* Genome-based classification of ***Burkholderia cepacia*** complex provides new insight into its taxonomic status. En: *Biology Direct.* Marzo, 2020, vol. 15 no. 6. p. 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13062-020-0258-5>

⁵ WONG, Min-Yi, *et al.* Comparison of Microbiological Characteristics and Genetic Diversity between ***Burkholderia cepacia*** Complex Isolates from Vascular Access and Other Clinical Infection. En: *Microorganisms.* Diciembre, 2020, vol. 9 no. 1, p. 51. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010051>

⁶ ROJAS, Fernando *et al.* El controvertido complejo ***Burkholderia cepacia***, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. En: *Rev. Argentina de Microbiología.* Enero- Marzo, 2019, vol. 51 no. 1, p. 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>

⁷ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00139-19>

⁸ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. 531 p. (ISBN 978-987-26716-3-1). En: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

⁹ MIRAMBELL, Antonio. Aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia* complex en pacientes con fibrosis quística. Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Microbiología. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de Genética y Microbiología, 2015. 175 p. https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_329293/amv1de1.pdf

¹⁰ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. 531 p. (ISBN 978-987-26716-3-1). En: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

¹¹ ¹² ¹³ ¹⁴ ¹⁵ ¹⁶ MIRAMBELL, Antonio. Aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia* complex en pacientes con fibrosis quística. Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Microbiología. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de Genética y Microbiología, 2015. 175 p. https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_329293/amv1de1.pdf

¹⁷ ROJAS, Fernando *et al.* El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. En: *Rev. Argentina de Microbiología*. Enero- Marzo, 2019, vol. 51 no. 1, p. 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>

¹⁸ ¹⁹ LEITÃO, Jorge *et al.* Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. En: *Applied microbiology and biotechnology*. Abril, 2010, vol. 87 no. 1, p. 31–40. DOI: 10.1007/s00253-010-2528-0

²⁰ LAMONT, Lain *et al.* Siderophore mediated signalling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mayo, 2002, vol. 99 no. 10, p. 7072–7077. DOI: 10.1073/pnas.092016999

- ²¹ LEWENZA, S. y SOKOL, P.A. Regulation of ornibactin biosynthesis and N-acyl-Lhomoserine lactone production by CepR in ***Burkholderia cepacia***. En: *J Bacteriol.* Abril, 2001, vol. 183 no. 7, p. 2212–2218. DOI: 10.1128/JB.183.7.2212-2218.2001.
- ²² FEHLNER-GARDINER, C.C.; HOPKINS, T.M. y VALVANO, M.A. Identification of a general secretory pathway in a human isolate of ***Burkholderia vietnamiensis*** (formerly ***B. cepacia*** complex genomovar V) that is required for the secretion of hemolysin and phospholipase C activities. En: *Microb Pathog.* Mayo, 2002, vol. 32 no. 5, p. 249–254. DOI: 10.1006/mpat.2002.0503.
- ²³ WHITBY, P. W. *et al.* Identification of an RTX determinant of ***Burkholderia cenocepacia*** J2315 by subtractive hybridization. En: *J Med Microbiol.* Enero, 2006, vol. 55 no. 1, p. 11–21. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46138-0>
- ²⁴ AUBERT, D. F. ; FLANNAGAN, R. S. y VALVANO, M. A. A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in ***Burkholderia cepacia***. En: *Infect Immun.* Mayo, 2008, vol. 76 no. 5, p. 1979–1991. DOI: 10.1128/IAI.01338-07
- ²⁵ CARAHER, E. *et al.* Comparison of antibiotic susceptibility of ***Burkholderia cepacia*** complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. En: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Marzo, 2007, vol. 26 no. 3, p. 213–216. DOI: 10.1007/s10096-007-0256-x
- ²⁶ RICHAU, J. A. *et al.* Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of ***Burkholderia cepacia*** isolates from a Portuguese cystic fibrosis center. En: *J Clin Microbiol.* Abril, 2000, vol. 38 no. 4, p. 1651–1655. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1651-1655.2000
- ²⁷ CUNHA, M.V. *et al.* Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. En: *J Clin Microbiol.* Julio, 2004, vol. 42 no. 7, p. 3052–3058. DOI: 10.1128/JCM.42.7.3052-3058.2004
- ²⁸ CESCUTTI, P. *et al.* Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. En: *Biochem Biophys Res Commun.* Julio, 2000, vol. 273 no. 3, p. 1088–1094. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3059

²⁹ ³⁰ MIRAMBELL, Antonio. Aspectos microbiológicos de ***Burkholderia cepacia*** complex en pacientes con fibrosis quística. Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Microbiología. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de Genética y Microbiología, 2015. 175 p. https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_329293/amv1de1.pdf

³¹ MARTINA, Pablo. Epidemiología y evolución de aislados clínicos pertenecientes al Complejo ***Burkholderia cepacia*** recuperados del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos. Tesis doctoral. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias Biológicas, 2013. 241 p. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/30885/Documento_completo__.pdf?sequence=3

³² CIPOLLA, Lucía *et al.* Prevalencia de especies del complejo ***Burkholderia cepacia*** en pacientes con fibrosis quística en Argentina durante el período 2011-2015. En: *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Agosto-septiembre, 2018, vol. 36 no. 7, p. 431-434. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.09.002

³³ HENRÍQUEZ, Daibeth y RODRÍGUEZ, María. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C: Boletín Epidemiológico de Infecciones Intrahospitalarias. 2010. 25 p. <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Bolet%C3%ADn%20IIH%202010.pdf>

³⁴ VALDERRAMA, Sandra *et al.* Pseudobrote por ***Burkholderia cepacia*** en dos unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario en Bogotá – Colombia. En: *Infectio*. Agosto, 2019, vol. 23 no. 2, 143-147. <http://dx.doi.org/10.22354/in.v23i2.770>

³⁵ MINSALUD. Boletín Epidemiológico semanal, Semana epidemiológica 09 28 de feb. al 06 de marzo de 2021: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Colombia. 2021. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2021_Boletin_epidemiologico_semana_9.pdf

³⁶ ³⁷ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. 531 p. (ISBN 978-987-26716-3-1). En:

<https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

^{38 39 40 41} CONSUMER PRODUCT TESTING COMPANY. ***Burkholderia cepacia*** complex: FDA Expectations for Drug and Personal Care Product Manufacturers [sitio web]. Fairfield, NJ; [Consultado: 13 de junio de 2021]. Disponible en: <https://cptclabs.com/burkholderia-cepacia-testing/>

⁴² FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 62, Examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de microorganismos específicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁴³ PHARMA WEBINARS. ***Burkholderia cepacia*** Complex Organisms & The New General Chapter USP <60> Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Tests for ***Burkholderia cepacia*** Complex [sitio web]. [Consultado: 13 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.pharmawebinars.com/usp-60-tests-for-burkholderia-cepacia-complex>

⁴⁴ COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Decreto 677 (26, abril, 1995). Por el cual se reglamenta parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a base de Recursos Naturales, Productos de Aseo, Higiene y Limpieza y otros productos de uso doméstico y se dictan otras disposiciones sobre la materia [en línea]. Santa Fe de Bogotá, D.C.: El Ministerio, 1995. 71 p. [Consultado: 13 de junio de 2021]. Disponible en: https://www.invima.gov.co/documents/20143/453029/decreto_677_1995.pdf

⁴⁵ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA. Industria de cosméticos: requisitos microbiológicos para productos cosméticos. NTC 4833: 2012. Bogotá D.C.: ICONTEC, 2012. 30 p.

⁴⁶ SECRETARIA GENERAL DE LA COMUNIDAD ANDINA. Resolución 1482 (4, julio, 2012). Modificación de la Resolución 1418: Límites de contenido microbiológico de productos cosméticos. Lima: Comunidad Andina. 2012. 2 p. [Consultado: 13 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/documents/20143/448427/Resolucion+1482+de+2012.pdf/3c84c2c0-c924-b368-b345-75cb257a8f64>

⁴⁷ CONDALAB. Análisis microbiológico en la industria cosmética. [Consultado: 13 de junio de 2021]. Disponible en: https://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/industria_cosmetica.pdf

⁴⁸ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00139-19>

⁴⁹ MARTIN, M., *et al.* Hospital-wide outbreak of ***Burkholderia contaminans*** caused by prefabricated moist washcloths. En: *Journal of Hospital Infection.* Marzo, 2011, vol. 77 no. 3, p. 267-270. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.10.004>

⁵⁰ ANDRADE, Ana y VALDIVIEZO, Ana. Control microbiológico de cosméticos elaborados artesanalmente en base de productos naturales en la ciudad de Quito. Trabajo de grado Licenciado de Microbiología Clínica y Aplicada. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Escuela de Bioanálisis, 2012. 137 p. En: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9579/merged%20%2848%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

⁵¹ NANNINI, Esteban, *et al.* Polyclonal outbreak of bacteremia caused by ***Burkholderia cepacia*** complex and the presumptive role of ultrasound gel. En: *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* Septiembre - octubre, 2015, vol. 19 no. 5, p. 543-545. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.06.009>

⁵² KO, Suhui, *et al.* An outbreak of ***Burkholderia cepacia*** complex pseudobacteremia associated with intrinsically contaminated commercial 0.5% chlorhexidine solution. En: *American Journal of Infection Control.* Marzo, 2015, vol. 43 no. 3, p. 266-268. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.11.010>

⁵³ AKINBOYO, Ibukunoluwa *et al.* Multistate Outbreak of an Emerging ***Burkholderia cepacia*** Complex Strain Associated With Contaminated Oral Liquid Docusate Sodium. En: *Infection Control & Hospital Epidemiology.* Febrero, 2018, vol. 39 no. 2, p. 237-239. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.265>

⁵⁴ CÁCERES, María. Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos

capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. Tesis Licenciada en Biología. Lima: Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Profesional de Biología, 2018. 70 p. En: https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1750/Caceres_mp.pdf?sequence=1&isAllowed=y

⁵⁵ BECKER, Sören *et al.* Outbreak of ***Burkholderia cepacia*** complex infections associated with contaminated octenidine mouthwash solution, Germany, August to September 2018. En: *Euro Surveill.* Octubre, 2018, vol. 23 no. 42. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.42.1800540>

⁵⁶ VALDERRAMA, Sandra *et al.* Pseudobrote por ***Burkholderia cepacia*** en dos unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario en Bogotá – Colombia. En: *Infectio.* Agosto, 2019, vol. 23 no. 2, 143-147. <https://dx.doi.org/10.22354/in.v23i2.770>

⁵⁷ WEN, Xia *et al.* ***Burkholderia Cepacia*** Complex in Personal Care Products: Molecular Epidemiology and Susceptibility to Preservatives. En: *Journal of Cosmetic Science.* Mayo – Junio, 2020, vol. 71 no. 3, p. 133-148. <https://europepmc.org/article/med/33022209>

^{58 59} FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

^{60 61} FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1226, Verificación procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁶² MORILLAS, P.P *et al.* EURACHEM. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temáticas Relacionadas. Primera Edición Española. Eurolab España, 2016. 60 p. En: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

⁶³ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁶⁴ ⁶⁵ ⁶⁶ ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN (OAA). Guía para la validación de métodos microbiológicos. 1era versión. 2013. En: https://www.academia.edu/23339061/OAA_Organismo_Argentino_de_Acreditaci%C3%B3n_GUIA_PARA_LA_VALIDACI%C3%93N_DE_M%C3%89TODOS_MICROBIOL%C3%93GICOS_GU%C3%8DA_PARA_LA_VALIDACI%C3%93N_DE_M%C3%89TODOS_MICROBIOL%C3%93GICOS?auto=download

⁶⁷ CASTILLO, Beatriz y GONZÁLEZ, Rolando. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. En: *Revista Cubana de Farmacia*. Enero – Abril, 1996, vol. 30 no. 1. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009

⁶⁸ ⁶⁹ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁷⁰ ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN (OAA). Guía para la validación de métodos microbiológicos. 1era versión. 2013. En: https://www.academia.edu/23339061/OAA_Organismo_Argentino_de_Acreditaci%C3%B3n_GUIA_PARA_LA_VALIDACI%C3%93N_DE_M%C3%89TODOS_MICROBIOL%C3%93GICOS_GU%C3%8DA_PARA_LA_VALIDACI%C3%93N_DE_M%C3%89TODOS_MICROBIOL%C3%93GICOS?auto=download

⁷¹ ⁷² ⁷³ FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 42 - FORMULARIO NACIONAL 37 (USP 42 – NF 37). Capítulo 1225, Validación de procedimientos farmacopeicos. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Cuadragésima Segunda Revisión; Formulario Nacional, Trigésima Séptima Edición. Rockville. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019.

⁷⁴ MORILLAS, P.P *et al.* EURACHEM. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Primera Edición Española. Eurolab España, 2016. 60 p. En:

https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

⁷⁵ NAGUIB, Marwa y VALVANO, Miguel. Vitamin E Increases Antimicrobial Sensitivity by Inhibiting Bacterial Lipocalin Antibiotic Binding. En: *mSphere*. Diciembre, 2018, vol. 3 no. 6. e00564-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00564-18>

⁷⁶ MIL-HOMENS, Dalila; BERNARDES, Nuno y FIALHO, Arsénio. The antibacterial properties of docosahexaenoic omega-3 fatty acid against the cystic fibrosis multiresistant pathogen ***Burkholderia cenocepacia***. En: *FEMS Microbiology Letters*. Marzo, 2012, vol. 328 no. 1, p. 61-69. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02476.x>

⁷⁷ MIL-HOMENS, D.; FERREIRA, S. y FIALHO, A. Fish oils against ***Burkholderia*** and ***Pseudomonas aeruginosa***: *in vitro* efficacy and their therapeutic and prophylactic effects on infected ***Galleria mellonella*** larvae. En: *Journal of Applied Microbiology*. Marzo, 2016, vol 120 no. 6, p. 1509-1519. <https://doi.org/10.1111/jam.13145>

⁷⁸ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. 531 p. (ISBN 978-987-26716-3-1). En: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

⁷⁹ LABORATORIOS MICROKIT. BCSA Burkholderia complex selective agar Base. Revisión 2020. España. Laboratorios MICROKIT, 2020. En: <https://www.microkit.es/fichas/BCSA-BURKHOLDERIA-COMPLEX-SELECTIVE-AGAR-Base-USP-2019.pdf>

⁸⁰ CÁCERES, María. Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. Tesis Licenciada en Biología. Lima: Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Profesional de Biología, 2018. 70 p. En: https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1750/Caceres_mp.pdf?sequence=1&isAllowed=y

⁸¹ TAVARES, Mariana, *et al.* ***Burkholderia cepacia*** Complex Bacteria: a Feared

Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. En: *Clin Microbiol Rev.* Junio, 2020, vol. 33 no. 3. e00139-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00139-19>

⁸² LABORATORIOS MICROKIT. BCSA Burkholderia complex selective agar Base. Revisión 2020. España. Laboratorios MICROKIT, 2020. En: <https://www.microkit.es/fichas/BCSA-BURKHOLDERIA-COMPLEX-SELECTIVE-AGAR-Base-USP-2019.pdf>

⁸³ GARDETE, Susana y TOMASZ, Alexander. Mechanisms of vancomycin resistance in ***Staphylococcus aureus***. En: *J Clin Invest.* Julio, 2014, vol. 124 no. 7, p. 2836-2840. <https://doi.org/10.1172/JCI68834>

⁸⁴ FRAGOZO, Luis y VILLALOBOS, Carlos. ***Pseudomona aeruginosa***: estado del arte. Monografía Especialidad de Medicina Interna. Barranquilla: Universidad Libre. Facultad de ciencias de la salud, 2016. 112 p. <https://repository.unilivre.edu.co/bitstream/handle/10901/10232/1122397816.pdf?squence=1&isAllowed=y>

⁸⁵ GARG, Ashok *et al.* Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. Buenos Aires: Panamericana, 2010. 616 p. (ISBN: 978-950-06-1712-3) En: https://books.google.com.co/books?id=iMEGY_X2taYC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false

⁸⁶ ABDELGHANY, Sharif *et al.* Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards ***Pseudomonas aeruginosa*** infection. En: *Int J Nanomedicine.* Julio, 2012, vol. 7, p. 4053-4063. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34341>

⁸⁷ GARG, Ashok *et al.* Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. Buenos Aires: Panamericana, 2010. 616 p. (ISBN: 978-950-06-1712-3) En: https://books.google.com.co/books?id=iMEGY_X2taYC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false

⁸⁸ GARDETE, Susana y TOMASZ, Alexander. Mechanisms of vancomycin resistance in ***Staphylococcus aureus***. En: *J Clin Invest.* Julio, 2014, vol. 124 no. 7, p. 2836-2840. <https://doi.org/10.1172/JCI68834>

⁸⁹ LÓPEZ, José. Vancomicina: informe técnico [en línea]. Zaragoza. (2 de marzo de 2011). [Consultado: 13 de junio de 2021]. Disponible en:

<https://sites.google.com/a/info-farmacia.com/info-farmacia/medico-farmaceuticos/informes-tecnicos/vancomicina-informe-tecnico>

⁹⁰ LABORATORIOS MICROKIT. Certificado de validación de cosméticos. Revisión 2010. España. Laboratorios MICROKIT, 2010. En: <https://www.microkit.es/publicaciones/24-CERTIF.VALIDACION%20COSMETICA.pdf>

⁹¹ BRITANIA. Ceftriaxona agar. Revisión 2018. Buenos Aires. BRITANIA, 2018. En: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5b5b1ee19e9ce.pdf

⁹² LABORATORIOS MICROKIT. Certificado de validación de cosméticos. Revisión 2010. España. Laboratorios MICROKIT, 2010. En: <https://www.microkit.es/publicaciones/24-CERTIF.VALIDACION%20COSMETICA.pdf>

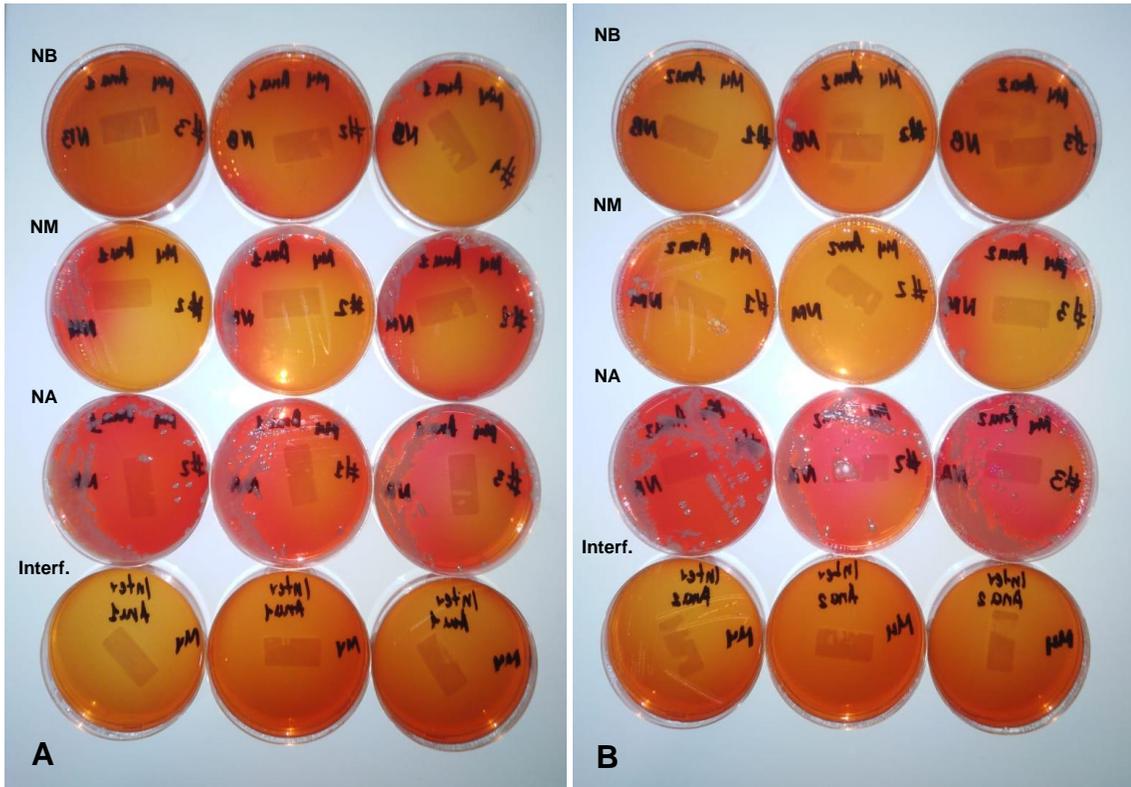
⁹³ HENRY, Deborah *et al.* Comparison of Isolation Media for Recovery of ***Burkholderia cepacia*** Complex from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. En: *Journal of Clinical Microbiology*. Abril, 1999, vol. 37 no. 4, p. 1004-1007. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.4.1004-1007.1999>

⁹⁴ AVERSA, Néstor, *et al.* Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Buenos Aires: Subcomisión de Buenas Prácticas de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), 2013. 531 p. (ISBN 978-987-26716-3-1). En: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

⁹⁵ DEGROSSI, José *et al.* Comparación de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de especies del Taxón K perteneciente al complejo ***Burkholderia cepacia***. En: *Ars Pharm.* Junio, 2019, vol. 60 no. 2, p. 93-100. <https://dx.doi.org/10.30827/ars.v60i2.8312>

12. ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento de *Burkholderia cepacia* en Agar BCSA a partir de la Muestra 4.



La imagen A muestra el aislamiento a partir de la Muestra 4 por el analista 1; La imagen B muestra el aislamiento a partir de la Muestra 4 por el analista 2. Las abreviaciones corresponden a NB, nivel bajo; NM, nivel medio; NA, nivel alto; Interf., Interferente.

Anexo 2. Resultados de tipificación de la Muestra 6 con el Equipo Vitek 2 Compact 15.

TECNIMICRO LABORATORIO DE ANÁLISIS S.A.S

Cliente de bioMérieux:
Equipo Nº: VK2C

Informe de examen

Aislamiento: Burkholderia cepacia-6 (Aprobado)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2411495203627430 Prueba de instrumento: 000014EECF54 (LAB. TECNIMICRO)

Bionúmero: 2223650013500211

Cantidad de organismo:

Organismo seleccionado: Burkholderia cepacia group

Comentarios:	<i>Características Macroscópicas: En agar cscyp, las 24 horas de incubación, se observaron colonias medianas color beige, con borde liso, con elevación media.</i>
	<i>Características Microscópicas: Baños Gram Negativas</i>

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2411495203	Fecha caduc.: 30-dic-2021 12:00 COT
	Finalizado: 20-abr-2021 18:56 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,82 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad	Burkholderia cepacia group	
	Bionúmero: 2223650013500211	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Burkholderia cepacia group			
Burkholderia cepacia	SACCHAROSE(99),YELLOW(78),ONPG(99),GELATIN(74),		
Burkholderia vietnamiensis	SACCHAROSE(99),YELLOW(0),ONPG(99),GELATIN(0),		
Burkholderia multivorans	SACCHAROSE(1),ONPG(99),GELATIN(2),		
Burkholderia stabilis	SACCHAROSE(1),ONPG(1),GELATIN(93),		
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 2

Anexo 3. Procedimiento de verificación del Densitómetro McFarland - DensiChek™ plus, de acuerdo a las instrucciones del fabricante bioMérieux^{MR}.

VERIFICACIÓN DE INSTRUMENTOS

Verifique el rendimiento de la medición DensiChek, Plus utilizando uno o más de los estándares McFarland (0.5, 2.0 o 3.0) después de poner a cero el instrumento con el estándar 0.0 McF (en blanco):

- Al recibirlo y antes del primer uso
- De acuerdo con las pautas normativas locales o al menos una vez al mes

IMPORTANTE: Antes de utilizar los estándares para verificar el rendimiento de la medición, confirme que se muestra la configuración del tubo de VIDRIO. Consulte Cambio de la configuración del tipo de tubo.

1. Seleccione el estándar 0.0 McF y limpie la superficie exterior con un paño para lentes.
2. Invierta suavemente el estándar 0.0 McF de cinco a seis veces para asegurarse de que sea homogéneo.
3. Asegúrese de que el instrumento esté encendido e inserte el estándar 0.0 McF en el instrumento y presione la tecla Zero / Scroll. Gire lentamente el estándar una vuelta completa. El instrumento mostrará una serie de guiones seguidos de 0.00.
4. Seleccione el Estándar deseado (0.5, 2.0 o 3.0) y limpie la superficie exterior con un paño para lentes.
5. Invierta suavemente el estándar de cinco a seis veces para asegurarse de que sea homogéneo.
6. Inserte el estándar en el instrumento y gírelo lentamente una vuelta completa hasta que se muestre un valor numérico.
7. Verifique que el valor de McFarland mostrado esté dentro del rango aceptable.

Rango aceptable estándar

Estándar	Rango aceptable	
0.5	0.44	0.56
2.0	1.85	2.15
3.0	2.79	3.21

8. Repita del Paso 5 al Paso 7 para los Estándares restantes según lo desee.

PRECAUCIÓN: Si alguno de los estándares está fuera del rango aceptable. repetir Instrumento! Verificación. Si su estándar aún está fuera de rango. póngase en contacto con el soporte técnico de bioMérieux.

9. Si los estándares están dentro del rango aceptable. proceda a la puesta a cero en un tubo de ensayo lleno de solución salina.

Puesta a cero en tubo de ensayo lleno de solución salina

Este procedimiento debe realizarse siempre que se utilice un nuevo tipo de tubo de ensayo (como un nuevo fabricante o número de pieza) para garantizar la precisión adecuada.

1. Seleccione un tubo de ensayo limpio y confirme visualmente que no tiene arañazos.
2. Llene el tubo de ensayo con solución salina estéril.
3. Con el instrumento apagado. Inserte el tubo de ensayo lleno de solución salina en el instrumento.
4. Presione la tecla de encendido para encender el instrumento.
5. Asegúrese de seleccionar el ajuste de tipo de tubo correcto.
6. Presione la tecla ZeroScroll y gire lentamente el tubo de ensayo. Asegúrese de que se complete una rotación completa antes de que se muestre la lectura. El instrumento mostrará una serie de guiones seguidos de 0.00.

Anexo 4. Descripción del método analítico USP 2021 capítulo 60: Detección del complejo *Burkholderia cepacia* UFC/g o mL.

1.1. Preparación de muestras y pre-incubación.

- Disolver o diluir 10 g o ml de la muestra en 90 ml de caldo Caso más polisorbato 80 (u otra dilución 1 en 10). Dependiendo de la muestra ajustar a un pH de 6 a 8. Luego mezcle e incube a 30 °C-35 °C durante 48-72 h.

1.2. Selección y Subcultivo.

- Subcultivar en estrías en una placa de agar selectivo de *Burkholderia cepacia* (BCSA) e incubar a 30 °C-35 °C durante 48-72 h.

1.3. Interpretación.

- La posible presencia del complejo de *Burkholderia cepacia* está indicada por el crecimiento de colonias de color marrón verdoso con halos amarillos o colonias blancas, rodeado por una zona rosa-roja en BCSA. Cualquier crecimiento en BCSA se confirma mediante pruebas de identificación.
- El producto cumple con la prueba si no existen colonias de los tipos descritos o si las pruebas de identificación confirmatorias son negativas.

1.4. Resultados.

El resultado será expresado como Negativo o Positivo para, *Burkholderia cepacia* UFC/g o mL.

Anexo 5. Medios de cultivo y diluyentes utilizados.

1. Medios de cultivo

1.1 *Burkholderia cepacia* Selective Agar (BCSA)

Preparación: Disolver 48 g de medio en 1 litro de agua bidestilada. Calentar hasta ebullición, agitando hasta la total homogeneización. No sobrecalentar. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y añadir 10 ml de solución BCSA Suplemento estéril selectivo.

Composición (g/l):

Triptona.....	10,0000
Cloruro sódico.....	5,0000
Sacarosa.....	10,0000
Lactosa.....	10,0000
Extracto de levadura.....	1,5000
Rojo fenol.....	0,0800
Cristal violeta.....	0,0020
Agar.....	15,0000

- pH final: ajustar a 6.8 ± 0.2 . Esterilización por autoclave.
- Los antibióticos se esterilizan por filtración y se agregan posteriormente al autoclavado.
- Interpretación: observar si aparecen colonias marrón verdosas, con halo amarillo en el medio, o bien colonias blancas con halo fucsia en el medio, o bien colonias violáceas, con o sin halo amarillento en el medio. El medio sin sembrar es rojo-salmón, su viraje completo a amarillo o a rosa-fucsia indica la presencia de gran número de colonias de Complejo *Burkholderia cepacia* (CBc). Dada la versatilidad y el polimorfismo del CBc, identificar cualquier colonia crecida en el medio selectivo, aunque no sea típica, o mejor aún, enviar la placa con colonias sospechosas a identificación molecular. No debe aparecer ni una sola colonia confirmativa en 1-10 g de medicamento o de cosmético enriquecido, ni en 100 ml de agua de uso farmacéutico o cosmético.

Suplemento Selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA)

Composición (g/vial):

Polimixina B Sulfato.....	5.000 IU
Gentamicina	0,0025
Ticarcilina.....	0,0500
Reconstituir el vial original con:	
Agua destilada estéril.....	5 ml

- Nota: cada vial es suficiente para suplementar 500ml de Agar Base para ***Burkholderia cepacia***.
- Añadir Suplemento selectivo al agar BCSA cuando el medio autoclavado baje a 45-50° C.

1.2 Agar caso o Tryptic Soy Agar

Preparación: Suspender 40 g del polvo en 1 litro de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

Composición (g/l):

Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína).....	15,0 g
Bacto Soytone (digerido papaico de harina de soja).....	5,0 g
Cloruro sódico.....	5,0 g
Agar.....	15,0 g

- pH final de 7.3 ± 0.2 at 25°C.
- El número y tipo de organismos cultivados en medios completados preparados de BD Tryptic Soy Agar (medios en frasco) es muy elevado. Por tanto, aquí no se presentan detalles específicos acerca de su aspecto. A partir de los aislados obtenidos en los medios, se deben realizar subcultivos apropiados para permitir la diferenciación e identificación adicionales.

1.3 Caldo caso o caldo Soja Trypticaseina (TSB) con Tween (polisorbato) 80

Preparación: Suspender 35,7 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar ligeramente hasta lograr la disolución completa del medio. Dispensar en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

Fórmula en g/L:

Dextrosa.....	2,5
Fosfato dipotásico.....	2,5
Digerido pancreático de caseína.....	17
Digerido papaínico de soja.....	3
Cloruro sódico.....	5
Tween 80.....	5
Lecitina de soja.....	0,7

- pH final 7.3 ± 0.2 at 25°C

1.4 Peptona tamponada al 0.1%

Preparación: Suspender 1g de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Dispensar en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Fórmula en g/L:

Digerido enzimático de caseína.....	10
Dihidrogenofosfato de potasio.....	1,5
Cloruro sódico.....	5
Hidrógeno fosfato disódico.....	3,5

- pH final (25°C) 7,0 ± 0,2

2. Diluyentes

2.1 Solución salina al 0.45%

Preparación: Suspender 4.5g de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Dispensar en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Fórmula: Cloruro sódico (NaCl).

Anexo 6. Cronograma de actividades laborales en Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S.

ACTIVIDAD	Año 2021 - Periodo I																
	Enero		Febrero				Marzo		Abril		Mayo		Junio		Julio		
	25	30	1	5	8	19	22	1	31	1	30	1	31	1	30	1	24
Inducción	■	■															
Limpieza de materiales de laboratorio			■	■													
Preparación, esterilización de medios de cultivo y materiales de laboratorio					■	■											
Limpieza de laboratorio; revisión, ensamblaje y envío de informes de clientes							■	■	■								
Procesamiento de aguas y frotis										■	■						
Procesamiento de muestras de cosméticos											■	■					
Procesamiento de muestras de alimentos, aguas, frotis, cosméticos y test rápidos de antibióticos para carnes y leches														■	■	■	■

Anexo 7. Carta de constancia de actividades laborales desempeñadas en Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S.



Medellín, 26 de agosto de 2021

LA GERENCIA DE RECURSOS HUMANOS CERTIFICA

El señor(a) GIL ROJANO ASTRID CAROLINA identificado(a) con cédula de ciudadanía número 1143393029, realizó la etapa de aprendizaje productivo en la empresa TECNIMICRO LABORATORIO DE ANALISIS S.A.S. desde el 25 de ENERO de 2021 hasta el 24 de JULIO de 2021; bajo un contrato de aprendizaje, desempeñándose como AUXILIAR DE LABORATORIO.

Funciones :

- Apoyar el acondicionamiento de muestras, conforme a los procedimientos establecidos por el tutor asignado.
- Notificar cualquier desviación de los procedimientos al líder inmediato.
- Cumplir con los procedimientos e instructivos que le correspondan.
- Apoyar las tareas de acuerdo con el plan de trabajo establecido.
- Aprender y colaborar con la preparación de los reactivos o medios de cultivo necesario para el cumplimiento del plan de análisis programado por el tutor.
- Mantener el principio de veracidad en sus actuaciones y decisiones.
- Colaborar y participar en la implantación y mantenimiento de las medidas adoptadas en torno a la prevención de riesgos para la salud.

Se expide a solicitud del interesado.

Atentamente,

TECNIMICRO
NIT: 890.932.335-7

KATERIN GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Analista Recursos Humanos

Validar referencia laboral en el correo katerin.gonzalez@mxns.com

Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S
Nit: 89 0932535-7
Carrera 42 N° 10-37 Medellín
PBX (4) 4031100 / Fax (4) 268 1996

