



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

Facultad de Ciencias

Programa Maestría en Microbiología

**Estudio de los factores asociados a la presencia de *Burkholderia cepacia* en el sistema de tratamiento de agua utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos**

**Luisa Fernanda Orjuela Vargas**

Bogotá D.C., Colombia

Octubre de 2022

**Estudio de los factores asociados a la presencia de *Burkholderia cepacia* en el sistema de tratamiento de agua utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de

**Magíster en Microbiología**  
(Modalidad de Profundización)

**Luisa Fernanda Orjuela Vargas**  
Bacterióloga y Laboratorista Clínico

Director:  
**Paola Andrea Santos Ruiz**  
Bacterióloga, Esp., M.Sc., Ph.D Bioquímica.  
Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Línea de Investigación:  
Diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica de la enfermedad  
Grupo de Investigación REMA

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias  
Programa de Maestría en Microbiología  
Bogotá D.C., Colombia  
Octubre de 2022

## **Dedicatoria**

A mis padres, Rubiela y Manuel, a mi  
hermana Camila y a mi esposo Luis por  
su apoyo incondicional durante todo este  
camino.

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a la profesora Paola Santos por aceptarme para realizar este trabajo de tesis bajo su dirección y por compartir durante todo este tiempo su valiosa experiencia y conocimientos. Por los consejos transmitido en distintos momentos decisivos de mi formación y su apoyo incondicional para culminar el trabajo. Muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento, cuando más las necesite; por estar allí cuando mis horas de trabajo se hacían tan extensas. A todas los docentes y compañeros de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por su atención y amabilidad en todo lo referente a mi vida como alumna de maestría.

Gracias a Laboratorios *Synthesis*, Laboratorios *LaFranco* y Laboratorios ABBOTT, por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios, principalmente a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología por su apoyo y empuje para continuar cada día.

A mis padres y hermana que siempre han sido el motor que impulsa mis sueños, metas y esperanzas, quienes siempre están a mi lado en los días y noches más difíciles. Gracias por ser mis guías en la vida, por haberme enseñado que, con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue. Les dedico este logro, amados padres, como una meta alcanzada juntos. Gracias por ser quienes son y por creer en mí.

A mi esposo por creer en mi capacidad y día a día apoyarme con este sueño, por acompañarme en las noches más difíciles, por su comprensión y amor.

A mis compañeros de clase, con lo que he compartido grandes momentos.

Por último y no menos importante a Dios todopoderoso y a la virgen María por haberme permitido llegar hasta este punto de mi vida, por su infinita bondad y amor, por guiarme en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por brindarme sabiduría y la fortaleza necesaria para no dejarme vencer y renunciar y así poder culminar con éxito mi carrera y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de mi estudio.

¡¡A todas las personas que han estado compartiendo conmigo en esta etapa, de corazón GRACIAS!!

## Resumen

En los últimos años, la industria farmacéutica, se ha visto amenazada por el riesgo de contaminación por *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*), bacteria Gram negativa que tiene la capacidad de crecer en condiciones de privación de nutrientes y tiende a colonizar todas las superficies del sistema de tratamiento del agua. A su vez, el agua es considerada una de las principales fuentes de contaminación en la industria farmacéutica, generando así mayor preocupación en la fabricación de productos estériles y no estériles, lo que ha llevado a los organismos internacionales y nacionales a incluir en sus políticas, la identificación y detección de este patógeno. Por lo anterior, en este trabajo se realizó una revisión sistemática en diferentes bases de datos sobre los factores asociados a la persistencia y virulencia de *B. cepacia* en esta industria y los métodos diagnósticos que permitan su identificación, utilizado para la fabricación de productos.

De acuerdo con lo reportado por la FDA, en los Estados Unidos en los años 2004 a 2011 se identificaron 64 retiros de productos por contaminación microbiológica, de los cuales el 70% correspondieron a *B. cepacia*. Para el periodo 2012 a 2022, esta cifra aumentó a 109 retiros de producto. Por su parte, en Colombia no se han reportado retiros de producto por esta causa.

La capacidad de *B. cepacia* de sobrevivir y resistir a estos ambientes está dada principalmente por factores como *quorum sensing*, la formación de biopelículas y lipopolisacáridos. Estos mecanismos le permiten detectar señales, realizar procesos de comunicación y regulación bacteriana, y contribuir a la resistencia a los antibióticos. La implementación de métodos de diagnóstico sensibles como PCR cuantitativa o espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), podría mejorar la identificación y notificación más oportuna de la contaminación para la industria farmacéutica, lo que a su vez ayudará a contener una posible infección en pacientes inmunosuprimidos por causa de estos productos contaminados.

**Palabras clave:** *Burkholderia cepacia*; Contaminación; Sistema de tratamiento de agua; Industria Farmacéutica; Productos estériles.

## Abstract

In recent years, the pharmaceutical industry has been threatened by contamination by *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*), a Gram-negative bacteria that grows in conditions of nutrient deprivation and tends to colonize all surfaces of the water treatment system. Water is considered one of the main sources of contamination, thus generating concern in the manufacture of sterile and non-sterile products, which has led international and national organizations to include in their policies the identification and detection of this pathogen. Therefore, in this work, a systematic review was carried out in different databases on the factors associated with the persistence of *B. cepacia* in the pharmaceutical industry and the diagnostic methods that allow its identification in the water treatment system used for the manufacture of products. According to reported by the FDA, in the United States from 2004 to 2011, an analysis of 64 recalls of products with microbiological contamination was carried out, 70% of which occurred in non-sterile products. In Colombia, according to the information published by INVIMA and the Instituto Nacional de Salud (INS), to date no product recalls have been reported for this cause.

The ability of *B. cepacia* to survive and resist these environments is mainly due to factors such as quorum sensing, biofilm formation and lipopolysaccharides. These mechanisms allow it to detect signals, carry out the process of bacterial communication and regulation, and contribute to antibiotic resistance. The implementation of sensitive diagnostic methods such as quantitative PCR or mass spectrometry (MALDI-TOF MS) could improve the identification and more timely reporting of contamination to the pharmaceutical industry, which in turn will help to contain possible infection in immunosuppressed patients due to these contaminated products.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia*; Contamination; Pharmaceutical industry; Water treatment system; Sterile products.

# Contenido

<b>1. Introducción</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Marco de referencia</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Características generales de la industria farmacéutica</b> .....	<b>14</b>
2.2 Sistema de agua en la industria farmacéutica .....	17
2.3 Normatividad vigente del sector farmacéutico .....	19
2.3.1 Normativa Internacional .....	20
2.3.2 Normativa Nacional.....	22
2.4 Contaminación microbiológica en la Industria farmacéutica.....	22
2.4.1. Casos de contaminación bacteriana y retiro de medicamentos .....	23
2.5 <i>Burkholderia cepacia</i> como causante de contaminación en farmacia.....	27
2.5.1. Hábitat y biodiversidad de <i>B. cepacia</i> .....	28
2.6 Taxonomía .....	29
2.7 Características bioquímicas y bacteriológicas de <i>B. cepacia</i> .....	30
<b>3.Objetivos</b> .....	<b>32</b>
3.1 Objetivo General .....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
<b>4. Diseño metodológico</b> .....	<b>33</b>
4.1 Estrategias de búsqueda bibliográfica .....	33
4.3 Extracción de datos.....	34
4.3.2 Palabras clave.....	34
4.3.1 Criterios de inclusión - elegibilidad .....	34
4.3.2 Criterios de exclusión .....	35
<b>5. Resultados</b> .....	<b>36</b>
5.1 Publicaciones seleccionados desde las diferentes bases de datos .....	36
5.2 Retiro de producto asociado a la contaminación por <i>B. cepacia</i> .....	40
5.2.1 Reporte de brotes por <i>B. cepacia</i> en Colombia .....	45
5.3 Factores de virulencia y capacidad patogénica de <i>B. cepacia</i> .....	48
5.3.1 Sistemas de quorum sensing (QS) .....	49
5.3.2 Biopelículas .....	51
5.3.3 Lipopolisacárido .....	51
5.3.4 Fosfolipasas y lipasas, factor sigma .....	51
5.4 Métodos de identificación de <i>B. cepacia</i> .....	53
5.4.1 Pruebas de identificación fenotípicas para <i>B. cepacia</i> .....	53
5.4.2 Pruebas Moleculares .....	55
5.4.2.2 Secuenciación de genes <i>hisA</i> .....	56
5.4.2.3 Secuenciación de genes <i>rpsU</i> .....	57
5.4.2.4 Secuenciación del gen <i>recA</i> .....	57
<b>6.Conclusiones</b> .....	<b>58</b>
<b>7. Referencias</b> .....	<b>59</b>

## Lista de figuras

Figura 1. Proceso de fabricación en la industria farmacéutica .....	15
Figura 2. Esquema sistema de tratamiento de agua en la industria farmacéutica.	18
Figura 3. Principales fuentes de contaminación microbiana. ....	23
Figura 4. Flujograma de búsqueda y selección de estudios.....	38
Figura 5. Reportes de retiro de producto por año a nivel mundial por <i>B.cepacia</i> ..	39
Figura 6. Reportes de retiro de productos por contaminación por país.....	40
Figura 7. Adaptación mecanismos de persistencia y otros factores que influyen en la persistencia del hospedero. ....	49
Figura 8. Identificación de <i>B. cepacia</i> .....	56



## Lista de tablas

Tabla 1. Casos de contaminación microbiana en productos farmacéuticos 2017 a 2022 .....	24
Tabla 2. Características bioquímicas de <i>B. cepacia</i> .....	31
Tabla 3. Resultados de Búsqueda en base de datos de 2010 a 2022 .....	37
Tabla 4. Principales retiros de producto por <i>B. cepacia</i> .....	44
Tabla 5. Mecanismos de Resistencia de <i>Burkholderia cepacia</i> . .....	53

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>B.cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCC*	Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>
USP*	Farmacopea de los Estados Unidos
FDA*	Agencia de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos
BPM	Buenas Prácticas de manufactura
OMS	Organización mundial de la Salud
CFR*	Corporación Federal de Regulaciones
ICH*	Conferencia Internacional sobre armonización
ISO*	Organización Internacional para la estandarización
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
API*	Ingrediente farmacéutico activos
CDC*	Centro para el control de enfermedades
UCI	Unidad de cuidados intensivos
BSCA	Medio de cultivo selectivo agar <i>Burkholderia cepacia</i>
TSA	Agar tripticasa de soja
TSB	Caldo tripticasa de soja
PDA*	Asociación Parenteral de Fármacos
INS	Instituto Nacional de Salud
MALDI-TOF*	Desorción/Ionización láser asistida por matriz y Tiempo de vuelo.
MS	Espectrometría de masas
FQ	Fibrosis quística

\* Abreviatura original de inglés.

## 1.Introducción

El sector de la salud es el mayor y mejor beneficiado de los avances tecnológicos y científicos que se dan en el mundo, como el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas. En este constante cambio, la industria farmacéutica se ha convertido en un verdadero protagonista, por su aporte en la prevención, control y tratamiento de ciertas enfermedades (1).

La industria farmacéutica tiene como función la investigación, desarrollo, fabricación y comercialización de productos destinados al diagnóstico y tratamiento de los problemas de salud de las personas, que incluyen productos estériles y no estériles. Estos productos están regidos por las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), diseñadas para minimizar la contaminación microbiana y surgen en respuesta a hechos relacionados con la falta de calidad, pureza y eficacia de alimentos y medicamentos (1,2).

En general, para los productos farmacéuticos no estériles, se permite un máximo de carga microbiana, pero debe haber ausencia de patógenos. En cambio, para los productos estériles no es permitida la carga microbiana.

Por otra parte, la normatividad internacional USP, Farmacopea de los Estados Unidos, describe en algunos capítulos, las exigencias para el control microbiano como, en el capítulo <60> se determina el examen microbiológico de productos no estériles para el complejo *Burkholderia cepacia* (BCC) basado en los métodos de diagnóstico, y los criterios de aceptación recomendados en los capítulos <61>, <62> y <1111> para proporcionar una prueba relativamente simple y confiable para la detección del BCC asociada con los procesos de fabricación farmacéutica (2).

Junto con el cumplimiento de las regulaciones internacionales, a nivel nacional la Resolución 1160 del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), establece “La regulación de las buenas prácticas de manufactura en productos farmacéuticos, constituye el conjunto de normas, procesos y procedimientos técnicos, cuya aplicación debe garantizar la fabricación uniforme y controlada de cada lote de producción, de conformidad con las normas de calidad y los requisitos exigidos para su comercialización” (3).

En los últimos años, uno de los principales microorganismos contaminantes de productos estériles y no estériles a nivel mundial, que han provocado un aumento en retiradas de producto, han sido los pertenecientes al complejo BCC. Es por esto que, para las industrias farmacéuticas la identificación de la contaminación por *B. cepacia* es un factor crítico de control.

Este patógeno es capaz de sobrevivir en condiciones limitadas de nutrientes, proliferar en entornos a base de agua, producir biopelícula y adquirir resistencia a los antibióticos y antisépticos. Cuenta con múltiples mecanismos para resistir el estrés oxidativo y secuestrar hierro, lo que hace que las infecciones sean particularmente difíciles de tratar (5), (6). También cuenta con la capacidad de metabolizar la materia orgánica presente en los ambientes oligotróficos, o con baja concentración de nutrientes.

Incluso utilizando como fuentes de carbono ciertos desinfectantes utilizados en estas industrias, como el amonio cuaternario, ampliamente utilizado para el control microbiológico de ambientes y superficies de plantas de producción, presentando una amenaza para la salud (7).

Por lo anterior, en el presente trabajo de revisión se planteó como pregunta orientadora ¿la presencia de *B. cepacia* en los sistemas de tratamiento de agua en la industria farmacéutica, podrá ser determinada con métodos diagnósticos sensibles, lo que a su vez permitirá comprender los factores de persistencia asociados a la contaminación?

La recopilación de información tiene como objetivo establecer una revisión sistemática sobre el *B. cepacia* y el BCC en la industria farmacéutica, que incluye artículos de revisión, artículos de investigación y boletines de reporte, de manera ampliada a los años 1980 al 2020. A partir de la bibliografía seleccionada, se identifican los casos de contaminación en la industria farmacéutica, los factores asociados a la persistencia de *B. cepacia* y los métodos diagnósticos que permitan su identificación en el sistema de tratamiento de agua, utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos.

De esta manera, se presenta en una primera parte la descripción de las principales características de la industria farmacéutica, sistema de tratamiento de agua en la industria farmacéutica, características de *B. cepacia*. Como resultados, se presentan los hallazgos que dan respuesta a los principales rasgos distintivos en cuanto a los factores

de virulencia del patógeno, los reportes de casos de retiro de producto a nivel internacional y nacional por esta causa, y las pruebas diagnósticas más específicas y recomendadas para su identificación.

## **2. Marco de referencia**

### **2.1 Características generales de la industria farmacéutica**

La industria farmacéutica, es el sector dedicado a la actividad económica relacionada con la fabricación, preparación y distribución de productos y sustancias químicas medicinales de uso humano y veterinario, con el objetivo fundamental de brindar atención a tratamientos o prevención de enfermedades (9). Los productos obtenidos de la industria farmacéutica pueden ser obtenidos por i) producción primaria o a granel, y ii) producción secundaria, que incluye la fabricación de fármacos dosificados como tabletas, cápsulas o pulverizados para administración oral, así como disoluciones inyectables, óvulos y supositorios, que a su vez pueden ser fabricados de forma estéril o no estéril.

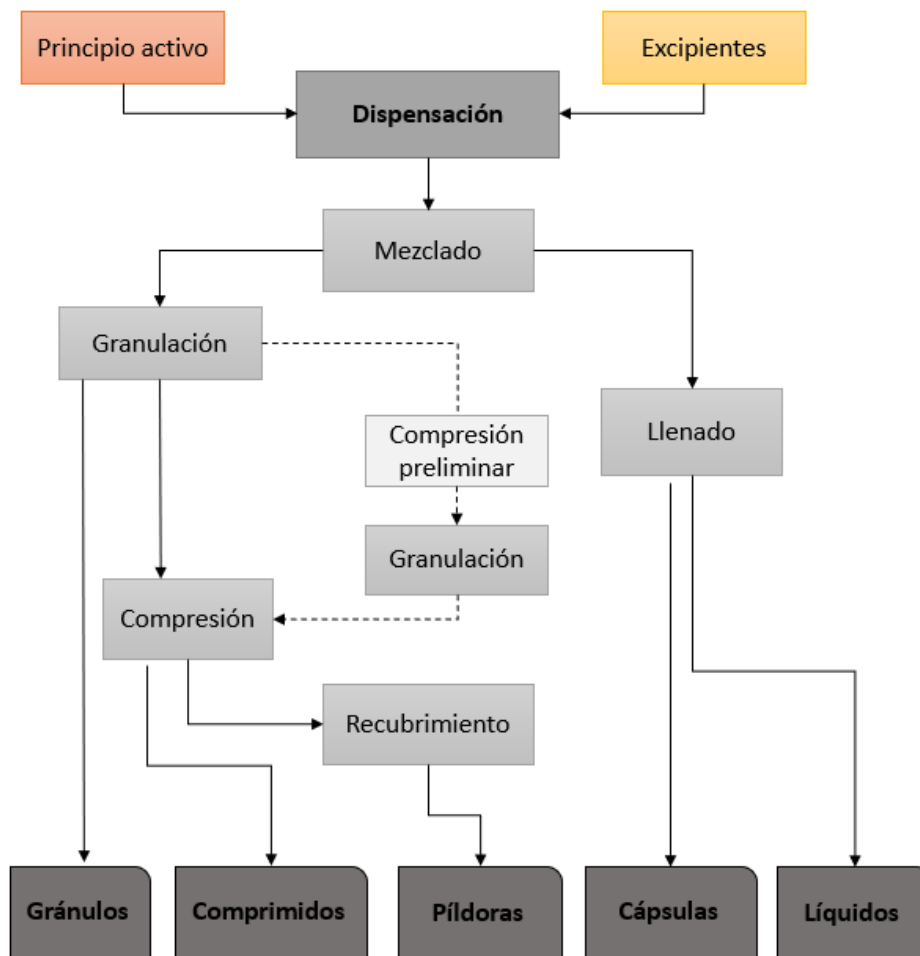
La fabricación de productos estériles, como medicamentos inyectables, ampollas, sueros oftálmicos, nasales y ungüentos estériles, es realizada bajo requisitos especiales de seguridad para minimizar los riesgos de contaminación microbiana, partículas y pirógenos, por lo que deben ser fabricados en zonas limpias, separadas y deben ser monitoreados continuamente, entre otros requisitos. La fabricación de medicamentos no estériles es producida bajo condiciones que minimizan la contaminación microbiológica, pero los procesos no son monitoreados de la misma manera que durante la producción de productos estériles. Estos productos pueden ser tabletas, capsulas, líquidos no estériles, polvos, comprimidos, óvulos, entre otros (10).

La constante investigación aplicada a la medicina, biotecnología, genómica, fisiología celular, toxicología y otras áreas de la tecnología, ha beneficiado en gran medida a la industria farmacéutica, permitiendo el descubrimiento de nuevas moléculas de uso en salud, a partir de compuestos naturales y orgánicos (11,12). Estas innovaciones en medicina suponen mayor esperanza en la prevención de enfermedades, mediante la aplicación de tratamientos personalizados que buscan mejorar la calidad de vida para los pacientes.

En general, el sector farmacéutico para desarrollar todos sus procesos requiere una estructura de producción y tecnología con cierto nivel de sofisticación. Lo anterior implica

una alta inversión en equipos verificados y calibrados, así como la contratación de personal calificado según aplique (13). En la Figura 1 se esquematiza el proceso de fabricación en la industria farmacéutica, donde se establecen las operaciones para obtener diferentes formas farmacéuticas.

**Figura 1.** Proceso de fabricación en la industria farmacéutica



Se describen los principales procesos de la Industria farmacéutica que inician por la dispensación del principio activo y los excipientes, pasando por el mezclado del cual se desprenden dos caminos para granulación y el llenado, que finalmente se obtienen líquidos o capsulas. Tomado y adaptado de (14)

La fabricación de los medicamentos en la industria farmacéutica inicia desde la mezcla del principio activo (API) y los excipientes. El API, es la sustancia de los medicamentos responsable de la acción farmacológica, es decir, del efecto positivo destinado a corregir

o restaurar una función fisiológica y que se espera que traiga un efecto favorable para la salud; es el componente principal en el proceso de producción un fármaco (15). Los excipientes, son un grupo de sustancias que completa un volumen de aglomeración de una mezcla. Incluyen potenciadores de la absorción, agentes colorantes, emulsionantes, extensores, diluyentes, rellenos, sabores, conservantes, agentes humectantes, solventes y matrices de liberación sostenida (16). La granulación en la fabricación farmacéutica para formas solidas es un paso clave, se utiliza para mejorar las cualidades de la formulación, como la fluidez y la compresibilidad. Se utilizan diferentes métodos para la granulación húmeda, incluido el lecho fluidizado, la extrusión de doble tornillo y el método de alto cizallamiento, lo que da lugar a diferentes mecanismos y propiedades de los gránulos (17).

La compresión, es un paso de fabricación esencial en la fabricación de tabletas. Es la reducción del volumen del polvo y el reordenamiento de las partículas para facilitar una compactación estable (18). El proceso de recubrimiento de las tabletas es la aplicación de un material de recubrimiento al exterior con la intención de conferir beneficios y propiedades a la forma de dosificación sobre la variedad sin recubrir. Se realiza el recubrimiento de las tabletas para mejorar las características organolépticas, brindar protección física y química, además protege al medicamento del entorno gástrico, entre otros (19 ,20).

Sin duda, todas las actividades de la industria farmacéutica se rigen por un conjunto de normas, regulaciones y leyes, que son propias de la legislación de cada país. De este modo, todo proceso de desarrollo, producción, aprobación, y comercialización de un medicamentos, está sujeto a las disposiciones legales vigentes (1). En este mismo sentido, el control de calidad en la industria está compuesto por las actividades como muestreo, análisis de productos farmacéuticos activos, excipientes, materiales de envase, ensayos de estabilidad, ensayos contra especificaciones y ensayos de investigación, entre otros (1).

Uno de los principales puntos críticos de control, recae sobre el agua de uso farmacéutico, siendo esta, uno de los más importantes compuestos activos en esta industria, usada ampliamente como materia prima, vehículo y disolvente en el



procesamiento, formulación y fabricación de productos farmacéuticos o formas farmacéuticas (2,21).

## **2.2 Sistema de agua en la industria farmacéutica**

En agua principal que ingresa a las instalaciones o procesos de la industria farmacéutica, es un agua fuente. Esta agua puede ser de fuente de ríos, depósitos, aguas de mar, o aguas de lecho profundo. Es por esto por lo que para lograr los atributos de calidad para aguas de uso farmacéutico se requieren múltiples operaciones unitarias.

En entornos industriales, la contaminación microbiana del agua y de los sistemas de distribución de agua de alta pureza, pueden resultar en biodegradación o deterioro de los equipos de fabricación. Como se ha demostrado previamente, la contaminación con microorganismos puede comprometer gravemente la calidad de materias primas y productos farmacéuticos terminado (2).

El diseño del sistema de purificación de agua requiere tener en cuenta distintos aspectos que incluyen la calidad del agua fuente, la higienización, los atributos de calidad del agua para uso farmacéutico, usos del agua, y programas de mantenimiento. A continuación, en la Figura 2 se resume el esquema de un sistema de tratamiento de agua, iniciando por el ingreso de agua potable.

El agua potable se puede usar en las primeras etapas de limpieza de los equipos de fabricación farmacéutica y de componentes en contacto con los productos (Figura 2 A). Es la mínima calidad de agua a usar en la preparación de sustancias oficiales y otros ingredientes farmacéuticos a granel. Es el agua que se indica como agua fuente o agua de alimentación (2).

**Figura 2.** Esquema sistema de tratamiento de agua en la industria farmacéutica.



La materia prima más común conocida es el agua, empleada para fabricación farmacéutica, limpieza de equipos y áreas. En la industria farmacéutica, el sistema de agua para los procesos farmacéuticos presenta un tratamiento más agresivo, con el objetivo de minimizar el número de microorganismo, endotoxinas y compuestos orgánicos e inorgánicos. Tomado y adaptado de (2)

Seguido, pasa por una filtración previa que es la denominada “filtración inicial”, su propósito es eliminar los contaminantes sólidos provenientes del suministro de agua que ingresa al sistema y proteger a los componentes subsiguientes de partículas que pueden inhibir el desempeño del equipo y acortar su vida útil (Figura 2B). Pasa por carbón activado su uso principalmente es para absorber material orgánico de bajo peso molecular, endotoxinas bacterias y aditivos oxidantes, tales como compuestos que contenga cloro y cloramina, eliminándolos del agua. Usados para lograr ciertos atributos de calidad y para proteger de reacciones adversas a las operaciones unitarias, las superficies de acero inoxidable, resinas y membranas que seguirán en las próximas etapas del diseño del sistema de agua (2).

Los aditivos químicos se emplean en los sistemas de agua para controlar microorganismos mediante el uso de desinfectantes, como los compuestos clorados y el ozono. Para mejorar la eliminación de sólidos en suspensión, se utilizan agentes floculantes, que también ayudan a evitar el depósito de sarro sobre las membranas de osmosis inversa. Para ajustar el pH y lograr la eliminación más efectiva de compuestos que contiene amoniaco y carbonatos, se utiliza osmosis inversa (2).

Los ablandadores de agua pueden estar ubicados antes o a continuación de las unidades de eliminación de desinfectantes. Usan resinas de intercambio catiónico en su forma

sódica para eliminar los iones que confieren la dureza al agua, como, por ejemplo, el calcio y el magnesio que podrían interferir con el desempeño de los equipos de procesamiento ubicados a continuación en el sistema, como por ejemplo las membranas de osmosis inversa, los dispositivos de deionización y las unidades de destilación.

El método más eficaz que permite la eliminación de cationes y aniones es la desionización, mejorando así atributos de calidad del agua. Cuenta con resinas cargadas que requieren una regeneración periódica con un ácido y una base (2) (Figura 2D). El sistema emplea membranas semipermeables conocidas como osmosis inversa. Los poros de las membranas de osmosis inversa son espacios inter segmentales entre las moléculas del polímero. El tamaño de poro es lo suficientemente grande para la permeación de las moléculas de agua, pero limitan el paso de iones hidratados, compuestos orgánicos y microorganismos. Además, puede lograr mejorar la calidad química y del contenido microbiano. Los filtros de retención microbiana (Figura 2E), poseen un tamaño de poro efectivo mayor a los ultrafiltros y están destinados a evitar el paso de microorganismos y partículas de tamaños similares, sin restringir indebidamente el flujo. Las lámparas UV de baja presión emiten una longitud de onda de 254 nm para el control microbiano y también es útil para la destrucción del ozono (Figura 2F). En la longitud de onda de 185 nm a 254 nm, ha demostrado ser de utilidad para la destrucción de desinfectantes que contienen cloro usados en el agua de alimentación, así como para las etapas intermedias del tratamiento previo del agua (2).

### **2.3 Normatividad vigente del sector farmacéutico**

Los organismos de vigilancia gubernamentales son los responsables de asegurar la calidad o inocuidad de los medicamentos, minimizando el riesgo para la salud de los pacientes. Se encuentra conformado por expertos con el poder de conceder o negar la autorización a las farmacéuticas para comercializar sus productos (14).

La legislación que norma la industria farmacéutica por lo regular es distinta en los diferentes países del mundo, pero la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel general, en el la *guía sobre los requisitos de las practicas adecuadas de fabricación* (22).

- i. Los gobiernos de cada país deberán autorizar todo proceso tanto de producción, distribución y promoción de medicamentos. Así mismo los procesos de importación y exportación de estos productos. Esto para tener un estricto control en esta área.
- ii. También es recomendable que se evalúen los términos como la seguridad, el nivel de eficacia y los aspectos de calidad correspondientes a los medicamentos. Esto previamente a ser autorizada su comercialización.
- iii. Se requiere que se inspeccione y vigile a toda empresa que fabrique, importe y comercialice fármacos. Con el fin de examinar que estos productos respondan a los requerimientos de la ley.
- iv. Legislación y control: debe existir un conjunto de leyes que normen la calidad de los productos que se producen y se comercialicen. Vigilando que la normativa sea respetada.
- v. Vigilancia e información: las instituciones encargadas deberán inspeccionar los efectos adversos que puedan producir dichos medicamentos. Similarmente, deberán proporcionar la información correspondiente a la población en general y a los profesionales de la salud.

### **2.3.1 Normativa Internacional**

- i. La agencia para la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por su sigla en inglés *The Food and Drug Administration*), de los Estados Unidos, es la entidad encargada de regular la fabricación, comercialización y distribución de medicamentos con el fin de proteger la salud pública, al garantizar la seguridad, la eficacia y la seguridad de los medicamentos humanos y veterinarios, productos biológicos y dispositivos médicos, las guías más importantes son 21 CFR Parte 210, 2005, 21 CFR Parte 211, 2005 (23).
- ii. Farmacopea de los Estados Unidos (USP), es una organización sin ánimo de lucro con marca registrada y derechos de autor que se estableció desde el año 1820. Establece los estándares y el control de calidad para medicamentos recetados y de venta libre, preparaciones magistrales, excipientes, dispositivos médicos y

elementos dietéticos. Es la farmacopea oficial que contiene normas de referencia para garantizar la calidad, pureza y confiabilidad adecuada y son controlados por la FDA. En sus capítulos generales se detallan las pruebas y procedimientos a seguir (2). Los de importancia son:

- Capítulo <61> examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de recuento microbiano.
- Capítulo <62> examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de microorganismos específicos.
- En el capítulo <60> se describe la determinación del examen microbiológico de productos no estériles para el BCC.
- Capítulo <1111> se describe el examen microbiológico de productos no estériles: criterios de aceptación de preparados farmacéuticos y sustancias para uso farmacéutico.
- Capítulo <1231> Agua para uso farmacéutico.

iii. Organización mundial de la Salud (OMS), es la organización encargada de coordinar asuntos de sanidad internacional. Establece requerimientos básicos y lineamientos específicos relacionados con la manipulación de sustancias biológicas, la manufactura; por esto la OMS cuenta con una serie de informes técnicos como el 32 y 45 sobre las buenas prácticas de manufactura- BPM, donde hace referencia a las pautas y procedimientos en la elaboración de productos farmacéuticos y en la mejora de la calidad que comprende el aseguramiento y revisión de calidad del producto (22).

iv. Requisitos Técnicos del Consejo Internacional para la Armonización de los de los Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH, por su traducción *The International Conference on Harmonization*), es único en “reunir a las autoridades reguladoras y la industria farmacéutica para discutir los aspectos científicos y técnicos de los productos farmacéuticos y desarrollar directrices. La ICH, garantiza que se desarrollen, registren y mantengan medicamentos seguros, efectivos y de alta calidad de la manera más eficiente en cuanto a recursos y cumpliendo altos estándares“ (24).

- v. Las normas ISO son el acrónimo de International Organization for Standardization. Es un conjunto de documentos de reconocimiento internacional que especifican requerimientos que pueden ser empleados en organizaciones para garantizar que los productos y/o servicios ofrecidos por dichas organizaciones cumplen con su objetivo (25).

### **2.3.2 Normativa Nacional**

- i. Resolución 1160 del INVIMA. Mediante esta resolución se establecen las buenas prácticas de manufactura, las guías de inspección de laboratorios o establecimiento de producción de medicamentos para la obtención del certificado BPM.
- ii. Resolución 2115 del 2007 de los Ministros de la Protección social y de Ambiente, vivienda y desarrollo territorial, “por el cual se establece el sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano”.

A pesar de contar con la regulación enunciada, a nivel mundial y nacional se han reportado diferentes casos de contaminaciones en los productos de consumo humano. Por lo anterior, es importante discutir estos casos particulares y describir las principales implicaciones.

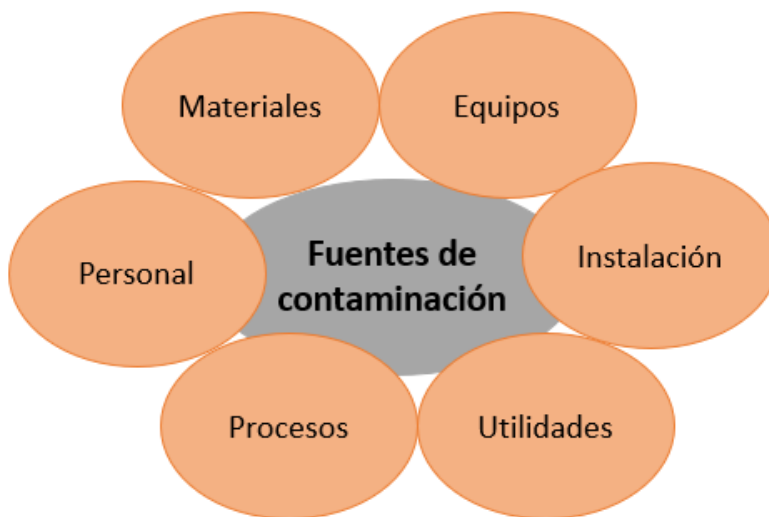
## **2.4 Contaminación microbiológica en la Industria farmacéutica**

Los microorganismos son ubicuos en la naturaleza y pueden adaptarse y sobrevivir en una gran variedad de condiciones; así mismo, pueden representar un riesgo significativo en la fabricación y comercialización de productos farmacéuticos. Es fundamental para la fabricación de productos, la comprensión de los puntos críticos de entrada microbianos y la implementación de medidas para prevenir la contaminación microbiana.

Como se muestra en la Figura 3, los microorganismos pueden ingresar a un flujo de proceso de producción desde varias fuentes: la instalación, los equipos, las operaciones del proceso, las materias primas, las membranas de filtración y el agua, entre otros. Se deben considerar todas las fuentes de contaminación microbiana al desarrollar una

estrategia de control microbiano y realizar una investigación para detectar una desviación de la contaminación microbiana (26).

**Figura 3.** Principales fuentes de contaminación microbiana.



Las principales fuentes de contaminación microbiana involucrados en el proceso de fabricación farmacéutica son la materia prima –incluidos el envase y el material de empaque-, equipos y utensilios, ambiente (agua y aire) y el personal (las uñas, las mucosas, la saliva, el cabello y la piel son las principales zonas de carga microbiana) y constituyen las fuentes de contaminación más importante y difíciles de controlar. Tomado y adaptado de (26)

#### **2.4.1. Casos de contaminación bacteriana y retiro de medicamentos**

Actualmente se han observado irregularidades importantes de BPM en varios lugares que fabrican productos farmacéuticos no estériles y estériles (27). Por lo anterior, el control de contaminación microbiana en los diferentes puntos de control de manufactura, es un importante el requisito para prevenir el retiros de productos farmacéuticos y de ocasionar efectos nocivos en la salud de los usuarios.

La forma más efectiva de proteger al usuario final de un producto defectuoso o potencialmente dañino, es mediante la notificación de retiros de producto. Las alertas de medicamentos y/o retiro es una acción voluntaria tomada por una empresa en cualquier momento para retirar un medicamento defectuoso del mercado. En la página de la FDA (<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/drug-recalls>), se permite la

búsqueda de estos hallazgos. La Tabla 1 resume los principales hallazgos reportados desde el año 2017 a 2022 a nivel mundial en productos estériles y no estériles.

**Tabla 1.** Casos de contaminación microbiana en productos farmacéuticos 2017 a 2022

Fecha	Descripción Producto	Motivo Del Retiro*	País
10/20/2017	Jarabe para la tos del bebé + mucosidad	Potencial contaminación con <i>Bacillus cereus</i> / <i>Bacillus circulans</i>	USA
12/29/2017	Jarabe Senna 5mL	Contaminación microbiana	USA
02/06/2018	Solución oral de levetiracetam	<i>Bacillus subtilis</i>	USA
02/06/2018	Líquido para el alivio de los síntomas del resfriado y la gripe	Contaminación microbiana	USA
03/20/2019	Medicamentos inyectables	Falta de garantía de esterilidad	USA
12/18/2019	productos farmacéuticos líquidos	Posible contaminación	Puerto rico
05/23/2019	Solución oral laxante salina de citrato de magnesio (sabor a limón)	Contaminación potencial con <i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	USA
09/09/2019	Desinfectante de manos antimicrobiano	Contaminación microbiana	USA
10/23/2019	Productos homeopáticos para uso humano y animal	Contaminación microbiana	USA
11/01/2019	Productos homeopáticos	Contaminación microbiana	USA
05/28/2019	Inyección de sulfato de amikacina, USP, e inyección de edisilato de proclorperazina, USP	Fallo de esterilidad	USA
12/28/2020	Rompe Pecho EX, Rompe Pecho CF, and Rompe Pecho MAX liquid	Contaminación microbiana	USA
12/01/2020	Medicamentos homeopáticos de base acuosa	Posible contaminación microbiana	USA
12/02/2020	Numerosos alimentos para humanos, animales, dispositivos médicos y productos farmacéuticos	Posible contaminación por <i>Salmonella</i> y presencia de actividad de roedores en el centro de distribución	USA
11/19/2020	Medicamentos homeopáticos	Debido a una posible contaminación microbiana	USA
04/07/2020	Pasta De Lassar Andromaco Protector De La Piel	Debido a la contaminación potencial de altos niveles de levadura, moho y bacterias	USA
08/18/2020	Suspensión oral de magnesio 2400 mg/30 ml, hidróxido de magnesio 1200 mg/hidróxido de aluminio 1200 mg/simeticona 120 mg por 30 ml y acetaminofén 650 mg/20,3 ml	Contaminación microbiana	USA
08/20/2020	Aplicador ChlorPrep de 3 ml	Contaminación por <i>Aspergillus penicillioides</i>	USA
10/28/2020	Productos nasales y geles orales para bebés	Contaminación microbiana	USA



01/10/2020	Enjuague bucal de gluconato de clorhexidina Paroex, vasos de dosis unitaria de 15 ml	Contaminacion con <i>Burkholderia lata</i>	USA
03/17/2020	Compresa Happy Ducts	El producto puede estar contaminado con <i>Cronobacter sakazakii</i> .	USA
01/31/2020	Enjuague bucal de gluconato de clorhexidina Paroex, 4 oz y 16 oz	Contaminación con <i>Burkholderia lata</i>	USA
08/01/2020	SyrSpend SF 500mL y 4L	Contaminación con <i>Burkholderia gladioli</i>	PAISES BAJOS
08/04/2020	Alcohol en gel	Producto contaminado con <i>Burkholderia contaminans</i>	USA
08/07/2020	Productos farmacéuticos inyectables estériles	Debido a una posible falta de garantía de esterilidad	USA
08/09/2020	Pasta De Lassar Andromaco Protector De La Piel	Debido a la contaminación potencial de altos niveles de levadura, moho y bacterias	USA
08/10/2020	Pasta De Lassar Andromaco Protector De La Piel	Debido a la contaminación potencial de altos niveles de levadura, moho y bacterias	USA
07/20/2020	Remedio de hisopo nasal	El producto contiene niveles elevados de <i>Bacillus cereus</i>	USA
07/22/2020	Solución de irrigación ocular estéril	Contaminación microbiana potencial que compromete la esterilidad	USA
03/30/2020	Bicarbonato de sodio en inyección de dextrosa al 5 % 150 mEq por 1000 ml	Debido a la contaminación microbiana transmitida por el agua	USA
04/07/2020	Aplicador ChloroPrep™ de 3 ml	Posible contaminación fúngica - <i>Aspergillus penicillioides</i>	USA
07/14/2020	Productos de kratom	<i>Salmonella</i>	USA
07/14/2020	Spray nasal	Por contaminación microbiana identificada como <i>Providencia rettgeri</i> .	Egipto
03/19/2020	LETS GEL KIT Paquetes de conveniencia	Contener potencialmente la contaminación microbiana en el Suturagel no estéril	PAISES BAJOS
03/19/2020	Enjuague bucal de gluconato de clorhexidina Paroex, 4 oz y 16 oz	Contaminación potencial con <i>Burkholderia lata</i>	USA
03/24/2021	Leche de Magnesia Suspensión Oral 2400 mg/30 ml	Contaminación microbiana	USA
04/16/2021	Alcohol en gel	Contaminación microbiana	MEXICO
11/17/2021	Muscle	Contaminación microbiana	USA
12/10/2021	Ninjacof and Ninjacof A	Contaminación potencial con <i>Burkholderia cepacia</i>	USA
06/22/2021	Magnesium Citrate Saline Laxative Oral Solution, Lemon Flavor	Contaminación microbiana con <i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	USA
06/22/2022	Hand sanitizer and hand sanitizing wipes	Contaminación microbiana	USA
07/15/2022	Milk of Magnesia, Magnisium Hydroxide/Aluminum Hydroxide/Simethicone Oral Suspension	Contaminación microbiana	USA

07/26/2022	Sterile Compounded Drug Products	Falta de garantía de esterilidad	USA
01/12/2022	Riomet® (Metformin Hydrochloride Oral Solution), 500 mg/5mL	Contaminación microbiana ( <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> )	USA
02/18/2022	Regenecare HA Topical Anesthetic Hydrogel	Contaminación con <i>Burkholderia cepacia</i>	USA
06/08/2022	Magnesium Citrate Saline Laxative Oral Solution, Lemon Flavor	Contaminación microbiana con <i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	USA
03/24/2022	Goldenseal Root Powder	Contaminación microbiana	USA

\*Algunos reportes de contaminación microbiana son reportados como “falta de garantía de esterilidad”, “contaminación microbiana” sin especificar el microorganismo involucrado. Fuente: elaboración propia.

Algunos de los casos más importantes de acuerdo con la Tabla 1 fueron, el producto solución oral *Levetiracetam* que anunció el retiro de dos lotes en el año 2018 en USA debido a la contaminación con *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Esta bacteria se identificó durante una evaluación de una materia prima utilizada para fabricar el producto. *B. subtilis* es ubicuo en el medio ambiente y, aunque se ha descrito que el potencial patógeno es bajo, se han reportado infecciones sistémicas graves. La probabilidad del peligro para la salud depende del grado de contaminación microbiana, la dosis, duración del tratamiento, y las condiciones subyacentes del paciente. Es posible que se produzca una infección grave si pacientes inmunocomprometidos reciben el producto contaminado.

El producto Laxante salino citrato de magnesio, solución oral con sabor a limón, fue retirado en el año 2019, debido a contaminación por *Gluconacetobacter liquefaciens*, bacteria aerobia Gram negativa, móvil. Metabólicamente usan el etanol, la glucosa y el glicerol como fuente de carbono para su crecimiento. Los pacientes inmunocomprometidos que consumen este producto pueden tener un mayor riesgo de infecciones invasivas causadas por esta bacteria que, podrían tener consecuencias adversas para la salud graves y potencialmente mortales.

Tres lotes de suspensión oral de leche de magnesia de 2400 mg / 30 mL, un lote de paracetamol de 650 mg / 20.3 ml y seis lotes de hidróxido de magnesio 1200 mg / hidróxido de aluminio 1200 mg / simeticona 120 mg, los productos fueron retirados del mercado debido a la contaminación microbiana y la falta de investigación adecuada de

las pruebas microbianas fallidas. Este producto podría provocar una enfermedad debido a molestias intestinales, como diarrea o dolor abdominal. Las personas con un sistema inmunitario comprometido tienen una mayor probabilidad de desarrollar una infección potencialmente mortal y generalizada cuando ingieren o se exponen oralmente a productos contaminados con microorganismos.

Un lote de pomada de propionato de clobetasol USP 0.05 % fue retirada del mercado debido a la presencia de la bacteria *Ralstonia pickettii* (*R. pickettii*), que fue descubierta por el fabricante mediante pruebas de rutina. *R. pickettii* está presente en el entorno natural (suelo, agua) y es poco probable que cause infecciones localizadas o sistémicas en individuos sanos con la piel intacta. Sin embargo, para las personas inmunocomprometidas o cuya piel no está intacta, es decir quemaduras solares, psoriasis, abrasiones, existe una posibilidad razonable de que se produzcan infecciones sistémicas si el producto está contaminado con esta bacteria, debido a la presencia del componente corticosteroide que mejora la absorción de la pomada. Si esta bacteria circula en el torrente sanguíneo humano, puede causar infecciones invasivas potencialmente mortales, como sepsis, neumonía, meningitis, inflamación del hueso o la médula ósea e infección en el líquido y los tejidos de las articulaciones.

Dos lotes de SyrSpend SF Cherry fueron retirados del mercado debido a que estaban potencialmente contaminados con *Burkholderia gladioli* (*B. gladioli*). Esta bacteria es un patógeno oportunista que afecta con mayor frecuencia a pacientes con enfermedades respiratorias. Los pacientes con sistemas inmunitarios comprometidos, como aquellos con fibrosis quística (FQ), tienen un mayor riesgo. *B. gladioli*, también puede causar complicaciones después de los trasplantes. La exposición al producto contaminado podría provocar eventos adversos, que podrían ser graves para las personas en riesgo.

## **2.5 *Burkholderia cepacia* como causante de contaminación en farmacia**

*Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) es una bacteria aerobia, no fermentadora, no formadora de esporas y móvil debido a la presencia de uno o más flagelos.

Morfológicamente es un bacilo Gram negativo, que varía entre 1 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho.

Se considera un patógeno oportunista responsable de numerosas infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes inmunosuprimidos y con fibrosis quística (FQ) (28). Se ha reportado que *B. cepacia* genera resistencia, e incluso multirresistencia a antibióticos y agentes antimicrobianos lo que está relacionado con contaminaciones frecuentes en la industria farmacéutica (29).

El complejo *B. cepacia* (BCC) es un grupo de bacterias patógenas oportunistas. El genoma de estas especies bacterianas es de gran tamaño y se reporta que es de hasta 9 Mpb (30).

De acuerdo a lo publicado por *Mah Thien y O'Toole George*, este complejo está formado por "22 especies conocidas como patógenos descritos como: *B. cepacia*, *Burkholderia caryophylli*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia gladiol* , *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia andropogonis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia glathei*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia graminis*, *Burkholderia phenazinium*, *Burkholderia caribensis*, *Burkholderia kururiensis*, *Burkholderia ubonensis*, *Burkholderia caledonica*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia stabilis* y *Burkholderia ambifaria*" (31).

De manera interesante, la mayoría de especies del complejo poseen gran capacidad metabólica, facilitando su adaptación a condiciones hostiles, incluidos los agentes antimicrobianos, que son sustancias con bajo porcentaje de nutrientes (6). De este modo, se considera que *B. cepacia* se puede propagar fácilmente en entornos hospitalarios, mediante dispositivos médicos (32), incluso es posible la propagación de paciente a paciente.

### **2.5.1. Hábitat y biodiversidad de *B. cepacia***

Las especies de *Burkholderia* son principalmente saprófitos ampliamente distribuidas en el ambiente natural, como el suelo, áreas húmedas, las zonas industriales, rizosfera y

una gran variedad de nichos ecológicos. Se encuentran en varias especies animales, en humanos, como promotores del crecimiento de las plantas, entre otros (33 ,34).

*B. cepacia* se caracteriza no solo por una extraordinaria adaptación nutricional sino también por una organización genómica inusual (35). Todas las especies del complejo, han demostrado una gran variabilidad fenotípica, incluso dentro de aislamientos clínicos secuenciales de la misma cepa(36). La capacidad de las especies de *Burkholderia* para prosperar en una amplia gama de entornos es un hecho de que se considere como uno de los grupos más versátiles de bacterias Gram negativas (36). Esta versatilidad le ha permitido la capacidad de crecer en productos de uso cotidiano, productos cosméticos, farmacéuticos, desinfectantes e incluso suministros de agua, siendo por lo tanto una importante agente de contaminación, pudiendo llegar a individuos susceptibles de infección.

## 2.6 Taxonomía

*Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*) nombre otorgado por Walter Burkholder en 1950, bacteriólogo estadounidense, fue el primer que describió en su investigación a *P. cepacia* como un patógeno vegetal capaz de causar la pudrición de la cebolla (37).

En 1966 Stanier et al. estableció una nueva *Pseudomonas* sp. metabólicamente variada, para la que sugirió el nombre de *Pseudomonas multivorans* (38). Unos pocos años más tarde Ballard et al introdujo una sinonimia entre *P. cepacia* y *P. multivorans* (5). En el mismo año, Jonsson propuso el nombre de *Pseudomonas kingii* para un nuevo patógeno humano oportunista (38). Los análisis taxonómicos revelaron nuevamente que este organismo era similar a *P. cepacia* (39), con reservorios naturales en suelo y agua y (40). El nombre *P. cepacia* fue incluido en la lista aprobada de nombres bacterianos hasta 1981 por Palleroni y Holmes (41). En 1992 Yabuuchi y col. transfirió *P. cepacia* y varias otras especies pertenecientes al grupo de ARNr II en el nuevo género *Burkholderia* (42). El interés por los organismos similares a *B. cepacia* condujo al descubrimiento y descripción de nuevos organismos, principalmente del medio ambiente. Hasta ahora, el análisis filogenético más completo de las especies de *Burkholderia* se basa en los genes

16S rRNA, recA y acdS. Todos señalan que hay dos linajes principales en este género: uno está compuesto en gran parte por patógenos, mientras que el otro incluye principalmente aislados ambientales que pueden formar asociaciones no patógenas con plantas (43). El género ahora pertenece a la subdivisión beta de la *Proteobacteria* y según los últimos datos contiene 44 especies, y un análisis detallado genotípico y fenotípico y de hibridación ADN-ARNr, hibridación ADN-ADN, los análisis de ácidos grasos y las pruebas bioquímicas establecen que *B. cepacia* es de hecho heterogénea y se compone de varias especies genómicas estrechamente relacionadas (44).

Este grupo de organismos fenotípicamente similares se observó como complejo de *B. cepacia* (4) y sus representantes originalmente clasificados como genomovares (45). Los genomovares son fenotípicamente indistintos con niveles bajos de hibridación ADN-ADN (30-50%) y alto nivel de homología *ADNr16S* (98-100%), pero filogenéticamente diferenciables (39 ,40). Por consiguiente, el genomovar agrupa cepas que comparten características similares, pero que genotípicamente son diferentes. Sin embargo, los genomovares son incluido en la última actualización de la lista aprobada de bacterias con sus nombres originales: “*B. cepacia* - *B. cepacia* genomovar I, *B. multivorans* - *B. cepacia* genomovar II, *B. cenocepacia* - *B. cepacia* genomovar III, *B. stabilis* - *B. cepacia* genomovar IV, *B. vietnamiensis* - *B. cepacia* genomovar V, *B. dolosa* - *B. cepacia* genomovar VI, *B. ambifaria* - *B. cepacia* genomovar VII, *B. anthina* - *B. cepacia* genomovar VIII, *B. pyrrocinia* - *B. cepacia* genomovar IX, la posición taxonómica de *Burkholderia ubonensis*” dentro del BCC no es plenamente establecido (46).

## **2.7 Características bioquímicas y bacteriológicas de *B. cepacia***

Los diferentes complejos de *B. cepacia* pueden ser identificados en Genovar de acuerdo con sus marcadores bioquímicos. En la Tabla 2 se incluyen las reacciones bioquímicas características de acuerdo con la revisión realizada por los autores Mah Thien y O’Toole George (31). Otras pruebas bioquímicas que permiten la identificación de *B. cepacia* son catalasa y oxidasa positiva, indol, H<sub>2</sub>S y ureasa negativa (47).

**Tabla 2.** Características bioquímicas de *B. cepacia*. Tomado y Adaptado de (31)

Prueba bioquímica	<i>B. cepacia</i> (Genomovar)						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidación de sucrosa	v	-	v	-	+	-	+
Fermentación azucares	v	+	v	v	-	+	+
Lactosa	v	+	v	+	+	+	+
Lisina decarboxilasa	+	v	+	+	+	-	+
Ornitina descarboxilasa	v	-	v	+	-	-	-
Reducción de Nitrato	v	-	v	+	-	-	+
Hidrolisis esculina	v	-	v	-	-	-	v
Actividad $\beta$ -Galactosidasa	+	+	+	-	+	+	+
Crecimiento a 42°C	v	+	v	-	+	+	v
$\beta$ -Hemolisis	-	-	-	-	v	-	v

(+) positivo;(-) negativo; (v) variable

Con respecto a la identificación microbiológicamente, todas las especies del BCC crecen en agar nutritivo y medios selectivos como agar MacConkey y Agar selectivo Burkholderia cepacia (ASBC). Las características macroscópicas de *B. cepacia* se pueden observar de 24 horas hasta el tercer día de incubación de 30° a 37°C, sin embargo, algunas cepas pueden tener un crecimiento optimo a 42°C. En medios de agar nutritivo o medio ASBC, las colonias son lisas, ligeramente elevadas y en algunos casos pueden tener un aspecto mucoide y olor característico. Los aislamientos de *B. cepacia* en presencia de un medio que contenga hierro producen un pigmento amarillo brillante debido a la fermentación de la glucosa (48).

## **3.Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Revisar los factores asociados a la persistencia de *Burkholderia cepacia* y los métodos diagnósticos que permitan su identificación en el sistema de tratamiento de agua, utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar la presencia de *Burkholderia cepacia* asociada a la contaminación de productos farmacéuticos, reportada a nivel nacional e internacional.
- Identificar los factores de virulencia-persistencia de *Burkholderia cepacia* que favorecen la contaminación en el sistema de tratamiento de agua utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos y en los productos terminados.
- Describir las diferentes pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares descritas para la detección de *Burkholderia cepacia* en los sistemas de tratamientos de agua.



## 4. Diseño metodológico

El presente estudio se fundamentó en un diseño metodológico no experimental cualitativo, estructurado por dos etapas búsqueda. Durante la primera etapa se realizó la búsqueda y obtención de información para el BCC y el reporte de casos de contaminación en la industria farmacéutica, de manera ampliada a los años 1980 al 2020. En una segunda etapa, se filtró la información obtenida y se analizó exhaustivamente, seleccionando la bibliografía de mayor inferencia estadística, dando mayor relevancia a las publicaciones del periodo 2010 al 2022, para dar respuesta a los objetivos propuestos y a la estructuración de esta revisión sistemática.

La siguiente lista sintetiza lo realizado en el presente trabajo para el desarrollo de los objetivos propuestos:

- Búsqueda de información bibliográfica
- Clasificación de la información
- Casos reportados de retiro de producto asociados a la contaminación por *B. cepacia*.
- Caracterización de los factores de persistencia y virulencia de *B. cepacia*.
- Principales pruebas de detección, convencionales, bioquímicas y moleculares.
- Casos reportados asociados a enfermedades causadas por producto contaminado.
- Normatividad internacional y nacional.

### 4.1 Estrategias de búsqueda bibliográfica

Se desarrolló una búsqueda en diferentes bases de datos electrónicas como Science Direct, PubMed, ProQuest. Así como páginas web de organizaciones de control de enfermedades como: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), Organización Mundial de la Salud (OMS), FDA y tomando como punto de partida la contaminación de *B. cepacia* en la industria farmacéutica.

Se emplearon los conectores booleanos “AND”, “OR” y “NOT” en la etapa preliminar de búsqueda, así como también, en la etapa de búsqueda avanzada conectando las palabras clave propuestas con términos de similitud en su significado, aplicadas en

conjunto para los dos periodos de tiempo, de acuerdo con los criterios de inclusión y criterios de exclusión establecidos.

En la definición del idioma, la búsqueda se limitó al español e inglés.

A partir de estos resultados, se revisaron inicialmente las referencias de los artículos seleccionados, con el propósito de identificar publicaciones sobresalientes y específicas en cuanto a industria farmacéutica, contaminación en la industria farmacéutica por el patógeno *B. cepacia*, patogénesis, métodos de identificación, normatividad y casos reportados.

## **4.3 Extracción de datos**

### **4.3.2 Palabras clave**

Se usaron las siguientes palabras clave y en combinación con los conectores boléanos, así:

- *B. cepacia* AND water
- *B. cepacia* AND water system, *B. cepacia* AND water supply.
- *B. cepacia* AND pharmaceutical contamination, *B. cepacia* AND standards
- *B. cepacia* AND virulence, *B. cepacia* AND biofilm *B. cepacia* AND pathogenesis, *B. cepacia* AND genes
- *B. cepacia* AND epidemiology, *B. cepacia* AND disease outbreaks

### **4.3.1 Criterios de inclusión - elegibilidad**

Para iniciar la búsqueda en la literatura científica se incluyeron artículos de revisión, de investigación, tesis, metaanálisis, estudio de casos, libros y ensayos clínicos, en idioma español e inglés.

Inicialmente con el fin de obtener un panorama amplio de la temática, la búsqueda se realizó de manera general abordando desde el año 1980 al 2022. Para determinar la evolución y la importancia que ha cobrado *B. cepacia* en la industria farmacéutica a lo

largo de los años se realizó un análisis y selección de la información desde 2010 hasta 2022.

#### **4.3.2 Criterios de exclusión**

No fue considerada la literatura científica fuera del periodo de búsqueda.

Se descartaron las publicaciones similares de acuerdo con su título o que contaban con la misma información en cuanto a la población de estudio.

No se incluyeron los estudios de identificación y reportes de *B. cepacia* fuera de la industria farmacéutica.

## 5. Resultados

### 5.1 Publicaciones seleccionados desde las diferentes bases de datos

A partir de los criterios de búsqueda establecidos, y dentro del periodo ampliado desde el año 1980 hasta el año 2000 se logró obtener información clave sobre los antecedentes de hallazgos de contaminación por *B. cepacia* en la industria farmacéutica, así como las posibles causas, y las medidas que han tomado las diferentes entidades a nivel internacional, que han llevado a la generación de la normativa de control y regulación que hoy en día existe.

Con referencia al periodo 2010 al 2022, se realizó una exhaustiva búsqueda en las bases de datos seleccionadas. En la Tabla 3 se resume la cantidad de documentos identificados en cada una de las bases de datos.

- Science Direct

Búsqueda en **ScienceDirect**: con la palabras clave: Burkholderia cepacia, Burkholderia cepacia AND water, Burkholderia cepacia AND water system, Burkholderia cepacia AND water supply, Burkholderia cepacia AND pharmaceutical contamination, Burkholderia cepacia AND standards, Burkholderia cepacia AND virulence, Burkholderia cepacia AND biofilm Burkholderia cepacia AND pathogenesis, Burkholderia cepacia AND genes, Burkholderia cepacia AND epidemiology, Burkholderia cepacia AND disease outbreaks y aplicando el filtro de los últimos 10 años período 2010-2022, se obtuvo un total de 24220 resultados.

- PubMed

Búsqueda en **PubMed**: con la palabras clave: Burkholderia cepacia, Burkholderia cepacia AND water, Burkholderia cepacia AND water system, Burkholderia cepacia AND water supply, Burkholderia cepacia AND pharmaceutical contamination, Burkholderia cepacia AND standards, Burkholderia cepacia AND virulence, Burkholderia cepacia AND biofilm Burkholderia cepacia AND pathogenesis, Burkholderia cepacia AND genes, Burkholderia cepacia AND epidemiology, Burkholderia cepacia AND disease outbreaks y aplicando el filtro de los últimos 10 años período 2010-2022, se obtuvo un total de 3232 resultados.

**Tabla 3.** Resultados de Búsqueda en base de datos de 2010 a 2022

Base de datos Palabra clave	PubMed		Science Direct		Total
	Búsqueda	2010-2022	Búsqueda	2010-2022	
B. cepacia	3410	1241	8908	5486	8908
B. cepacia AND disease outbreaks	153	64	964	562	964
B. cepacia AND epidemiology	489	183	1263	719	1263
B. cepacia AND water system	64	33	4097	2673	4097
B. cepacia AND water supply	22	6	1422	967	1422
B. cepacia AND water	326	130	4784	3082	4784
B. cepacia AND pharmaceutical contamination	60	38	500	375	500
B. cepacia AND standards	190	92	4914	3124	4914
B. cepacia AND sistema de agua	--	--	64	36	64
B. cepacia AND virulence	534	207	1703	1020	1703
B. cepacia AND pathogenesis	2272	717	1314	801	1314
B. cepacia AND prevalence	574	226	2026	1276	1276
B. cepacia AND biofilm	228	105	1806	1252	1252
B. cepacia AND genes	528	190	4745	2847	2847
<b>TOTAL</b>	8850	3232	38510	24220	35308

Se enlistan las palabras claves para la revisión bibliográfica de acuerdo con el periodo de tiempo seleccionado, con el total de resultados arrojados por las búsquedas en las bases de datos.

De todos los artículos revisados, se seleccionaron aquellos que cumplían con los criterios de inclusión previamente definidos, como periodo de búsqueda del 2010 a 2022 y empleando criterios , se excluyeron artículos sin acceso libre, o que no concordaban. Por medio del diagrama de flujo Prisma se resumen los resultados finales.

**Figura 4.** Flujograma de búsqueda y selección de estudios

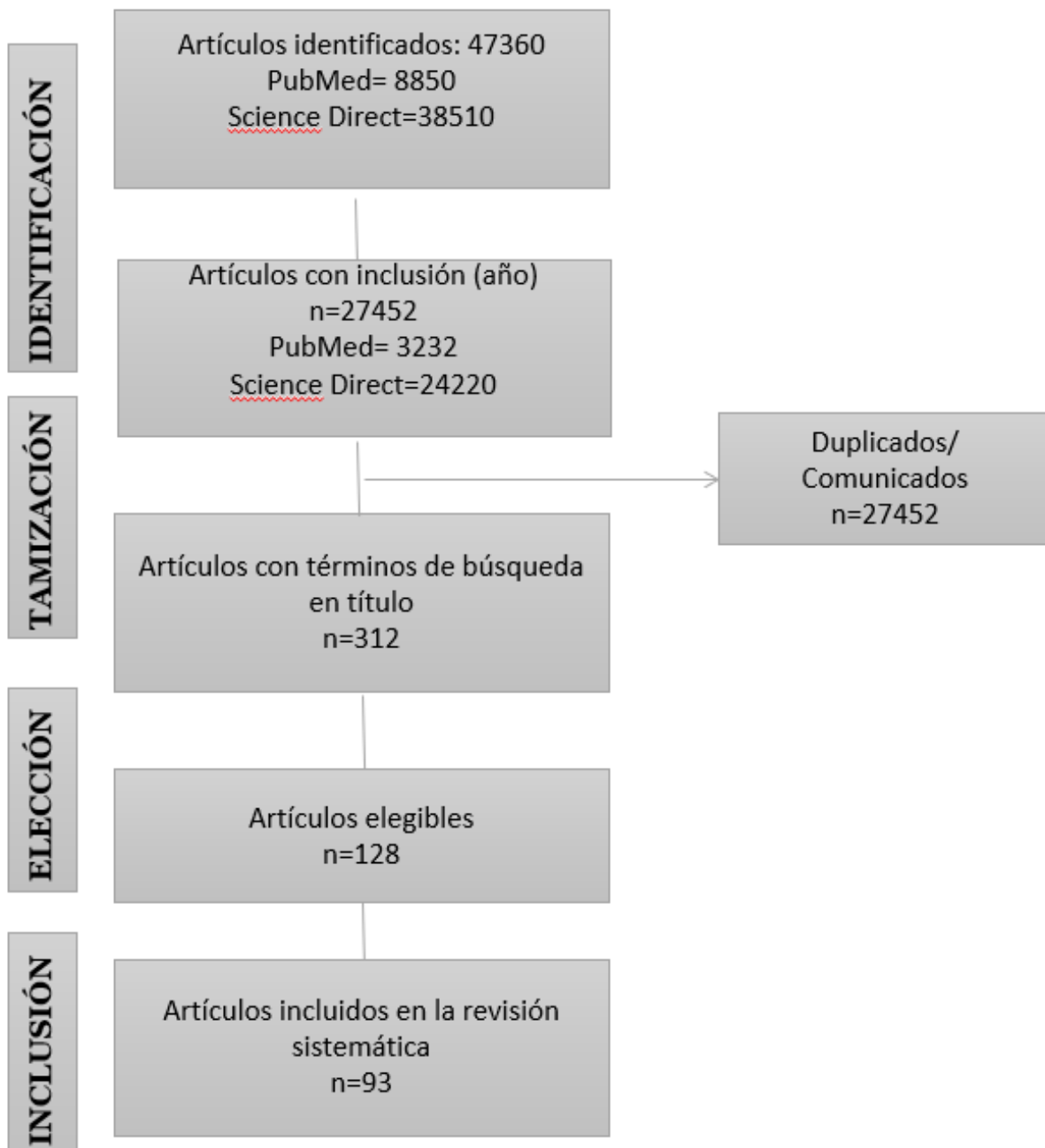


Diagrama de flujo del proceso de identificación y selección de textos incluidos en la revisión sistemática periodo entre 2010 a 2022 y como parte de antecedentes de 1980 hasta el año 2000.

La estrategia implementada de manera preliminar cuenta con un número importante de artículos encontrados, la cual se basa en la búsqueda empleando el filtro inicial de cada una de las bases de datos. Por consiguiente, se organiza la información obtenida en tablas del programa Microsoft Excel que permitan realizar un seguimiento del proceso de selección de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión propuestos para cada una de las etapas de búsqueda y determinar la efectividad de la estrategia de identificación de los artículos relacionados al objeto de estudio.

De esta manera, se logra recopilar cada una de las etapas de recolección de información, se realiza una correlación simple entre las palabras clave seleccionadas y del criterio de exclusión y año de publicación de los textos. De los reportes de retiro de producto por *B. cepacia* desde el año 2004 al 2022 (Figura 5), se observa un incremento en el año 2017 y manera más marcada en el año 2019.

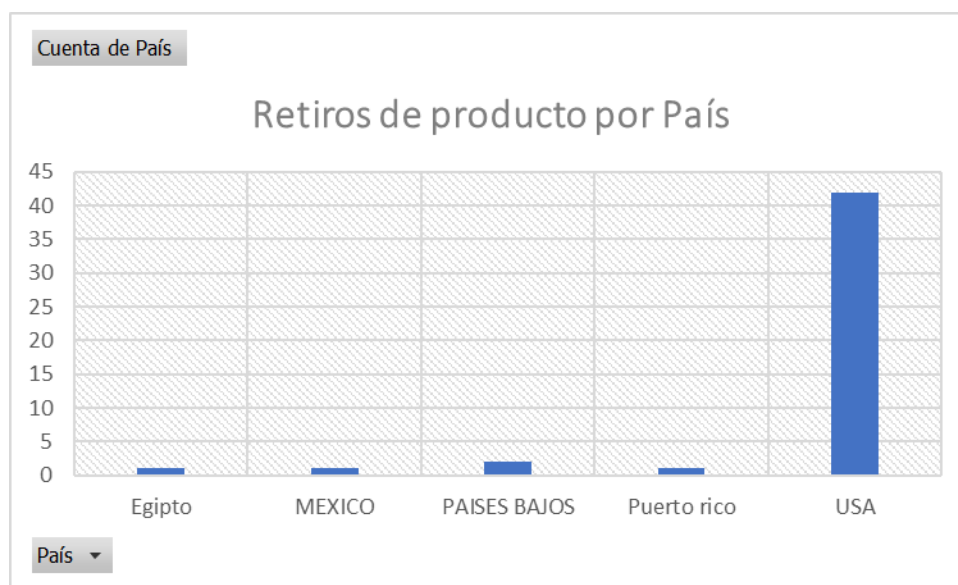
**Figura 5.** Reportes de retiro de producto por año a nivel mundial por *B. cepacia*.



Con respecto a los reportes de retiro de producto por país se destaca que, a nivel mundial, Estados Unidos representa el mayor número de casos de contaminación de productos farmacéuticos por *B. cepacia* reportados (Figura 6). Lo que podría obedecer

al aumento de resistencia del patógeno a antibióticos y desinfectantes, así como a las exigencias en las regulaciones a nivel internacional en la fabricación de productos. Fuera de América, de acuerdo con la búsqueda realizada, se observa que Egipto y Países bajos, son los únicos países que han reportado retiro de producto por contaminación por *B. cepacia*.

**Figura 6.** Reportes de retiro de productos por contaminación por país.



## 5.2 Retiro de producto asociado a la contaminación por *B. cepacia*

De acuerdo con la información revisada en el periodo de búsqueda extendido desde 1980 al año 2010, se encuentra que para el año 1981, la FDA emitió un comunicado a las industrias farmacéuticas, en el cuál informa “la FDA encuentra que, la falta de validación y control del sistema utilizado para producir agua desionizada, conllevó a la contaminación de un medicamento con *P. cepacia*. Este evento posteriormente ocasionó el retiro del producto, y la empresa tomó medidas correctivas. Un seguimiento de la FDA concluyó para ese momento que, la falta de validación y control de los sistemas de agua desionizada no es una instancia aislada limitada a este caso en particular” (44).



Por lo anterior, la FDA emite en 1993 un documento de orientación “*Guide to Inspections of Microbiological Pharmaceutical Quality Control Laboratories*”, en el cual declara: “Por lo tanto, se espera que cada empresa desarrolle especificaciones microbianas para sus productos no estériles. Asimismo, el Capítulo <61> de Límites Microbianos de la USP proporciona una metodología para organismos indicadores seleccionados, pero no para todos los organismos objetables (49). Los organismos objetables para la FDA son “microorganismos que, debido a su número y patogenicidad, pueden causar infección, respuesta alérgica o toxemia en pacientes que reciben el producto” (50). Estos organismos objetables son:

- *Burkholderia cepacia*
- *Escherichia coli* – indicador de contaminación fecal
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Especies de Salmonella* – que son patógenas
- *Las especies de Shigella*
- *Staphylococcus aureus* – mala higiene de producción

Si son productos de fabricación estéril, todos los organismos se consideran objetables.

Por ejemplo, se reconoce ampliamente que *P. cepacia* es un organismo objetable si se encuentra en un producto tópico o solución nasal en grandes cantidades; sin embargo, no existen métodos de prueba proporcionados en la USP que permitan la identificación de la presencia de este microorganismo. Un ejemplo relevante de este problema es el retiro del mercado de la solución para inhalación de sulfato de metaproterenol. En la monografía USP indica que no se requieren pruebas microbianas para este producto. La FDA ha clasificado los retiros en 3 clases:

- Clase I – Retiro de productos peligrosos o defectuosos que pueden causar serios problemas de salud o la muerte.
- Clase II – Retiro de productos que pueden causar un problema de salud temporal. La probabilidad de que el producto sea una amenaza seria es baja.

- Clase III – Retiro de productos que improbablemente causen alguna reacción adversa a la salud.

Así que la agencia clasificó esto como un retiro de Clase I, porque el producto estaba contaminado con *Pseudomonas gladioli / cepacia*. En este caso, la evaluación de riesgos para la salud indicó que, el riesgo de infección pulmonar es especialmente grave y potencialmente mortal para los pacientes con enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, fibrosis quística (FQ) y pacientes inmunodeprimidos. Además, estos organismos no se habrían identificado mediante los procedimientos de prueba descritos en la sección general de “Límites microbianos” (51). Si bien esta guía de inspección para laboratorios de control de calidad farmacéutica proporciona una orientación limitada para los análisis en el laboratorio de microbiología, la guía aborda diferente interés como lo es el análisis fisicoquímico.

El centro para el control de enfermedades (CDC) estableció una moratoria sobre la autorización internacional y el uso de *B. cepacia* en la agricultura. Incluso las cepas "seguras" podrían desarrollarse rápidamente en patógenos para los humanos debido a su capacidad excepcional de modificar su genoma. De esta manera, son examinados cuidadosamente los permisos para potencial uso experimental o registro de nuevas cepas de *B. cepacia* para biocontrol. Se requiere control cualitativo y se aplican medidas de restricción a los registros recientes, así como eliminar o minimizar el uso de aerosoles de inhalación y la exposición a poblaciones de riesgo. Las aplicaciones en áreas de césped, en forma de aerosol, ahora están totalmente prohibidas (52).

Durante los años 2004 a 2011 y de acuerdo con lo reportado por la FDA, en Estados Unidos se realizó un análisis de 642 retiros de producto relacionados con contaminación microbiológica. Las principales categorías de productos utilizadas en los informes de aplicación incluyen:

- Alimentos (incluidos los productos de cuidado personal)
- Medicamentos (venta libre y recetados)
- Biológicos
- Dispositivos
- Veterinario

Esta revisión se centra en los productos de cuidado personal, los productos farmacéuticos y de venta libre, y los dispositivos médicos. Más del 70% de los retiros durante este periodo involucraron productos estériles. De estos retiros, aproximadamente el 80% se debió a la "falta de garantía de esterilidad" y el resto se debió a "contaminación microbiana". Una prueba de producto final fallida (eficiencia antimicrobiana), o fue un problema con una prueba de diagnóstico, generalmente involucrando medios o kits de identificación microbiana.

Al observar las causas subyacentes de la "falta de garantía de esterilidad", podemos ver que la mayoría de ellas son el resultado de problemas de embalaje, sellos incompletos o débiles, pinchazos en la barrera estéril, problemas de transporte, entre otros. Del resto, casi todos son problemas indeterminados de BPM o errores de fabricación francos (esterilización incompleta, componentes no estériles agregados a productos estériles, etc.). Relativamente pocos de estos retiros de "falta de garantía de esterilidad" en realidad mostraron contaminación. Es más común emitir el retiro sobre la base de "producto contaminado" en lugar de citar "falta de..." para estas situaciones.

A partir de esto, parece evidente que "falta de garantía de esterilidad" significa que existe un problema potencial con el producto o los paquetes, o que el fabricante no puede documentar que el producto fue fabricado y esterilizado en un estado de control. Si el producto está obviamente contaminado, esa es la razón citada para el retiro, en la gran mayoría de los casos.

Un área de particular interés para los autores es la regulación de los medicamentos no estériles. En cuanto a los informes de cumplimiento de los productos no estériles, aproximadamente el 70% de los retiros reportados se deben a productos de venta libre o productos de cuidado personal durante este período.

A continuación, y de acuerdo con lo reportado durante los años 2000 al 2022, en la Tabla 4 se resumen las principales recogidas de producto, señalando que Estados Unidos y Canadá, son los principales países donde se evidencia retiro de producto.

**Tabla 4.** Principales retiros de producto por *B. cepacia*

Año	Evento	Producto
2004	8	Loción Aloe Vera, Spray nasal, loción de bebe, agua,
2005	1	Aceites y lociones
2006	2	Enjuague bucal libre de alcohol, Cuidado personal perineal. Demeticon 3%
2007	2	Pañitos, solución oral
2008	5	Enjuague bucal, pañitos, gel
2009	2	Pañitos
2010	4	Spray nasal, gel sanitizante, alcohol,
2011	9	Alcohol sanitizante, emulsión, enjuague bucal, spray nasal
2012	6	Gel nasal, solución nasal,
2013 - 2015	0	No reportado
2016	11	Solución nasal, alcohol gel, pañitos
2017	25	Medicina homeopática, pañitos alcohol gel, pañitos alcohol gel, solución oral
2018	4	solución de lactulosa, toallitas alcohol, solución oral
2019	56	Espuma limpiadora, soluciones orales, spray nasal, alcohol gel, gel de cabello, medicamentos para alergias, medicina para la tos, productos líquidos
2020	4	Hidrogel tópico, medicamento homeopático, espuma limpiadora
2021	2	Dispositivo médico, sanitizante de manos
2022	1	Hidrogel tópico

Aunque *B. cepacia* se encuentra comúnmente en entornos naturales como el suelo, el agua y las plantas, puede infiltrarse en los entornos de fabricación de productos farmacéuticos y contaminar las materias primas y el producto farmacéutico terminado (21). En 2017, la FDA emitió un aviso a los fabricantes de medicamentos sobre el riesgo de contaminación de productos farmacéuticos a base de agua no estériles con microorganismos del BCC. Este aviso fue en respuesta a retiradas de productos farmacéuticos con respecto a su contaminación por *B. cepacia* (39). Algunos de ellos fueron, el desinfectante de manos antimicrobiano *durisan*, producto fuera de especificación debido a contaminación microbiana. El *durisan* es un producto sin alcohol, este problema fue descubierto durante una auditoría de rutina. El producto está destinado a ser aplicado tópicamente para ayudar a reducir las bacterias en la piel que podrían causar enfermedades cuando no se dispone de agua y jabón. El uso de un desinfectante

para manos contaminado por *B. cepacia* puede infectar a una persona con una herida o raspaduras en la mano porque la bacteria podría ingresar al torrente sanguíneo, especialmente en pacientes con sistemas inmunitarios comprometidos.

Regenecare HA Hydrogel, es retirado del mercado por dos quejas de usuarios por contaminación. Finalmente se determinó que el producto estaba contaminado con la bacteria *B. cepacia*. La aplicación tópica del producto puede provocar infecciones cutáneas locales. Para los pacientes inmunocomprometidos, incluidos los pacientes que reciben quimioterapia y los pacientes con FQ, es más probable que la infección de la piel se propague al torrente sanguíneo y provoque una sepsis potencialmente mortal que incluye síntomas como fiebre, dificultad para respirar, presión arterial baja, frecuencia cardíaca rápida, confusión mental y posiblemente la muerte.

### **5.2.1 Reporte de brotes por *B. cepacia* en Colombia**

En el año 2014, se reportó en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de adultos y pediátrica, de un hospital universitario en la ciudad de Bogotá – Colombia, un pseudobrote, es decir un aumento del número de casos positivos, por infección por BCC. Se evidenció en los aislamientos realizados a las muestras de sangre de los pacientes presencia de *B. cepacia*. De manera interesante, también fue identificado este patógeno en un lote de jabón de clorhexidina en presentación de bolsa (sachet), empleado para la asepsia de la piel y algunos aislamientos de lavamanos se evidencio la presencia del patógeno (53).

Como resultado de la revisión de las bases y reportes nacionales emitidos por el INVIMA sobre alertas sanitarias en medicamentos y productos biológicos, y ampliando la búsqueda en <todos los productos>, que incluye alimentos y bebidas; medicamentos y productos biológicos; cosméticos, productos de aseo, plaguicidas y productos de higiene doméstica; dispositivos médicos y otras tecnologías, se encontraron más de 2.145 reportes desde el año 2012 hasta el 2022, dentro de los cuales no se evidenciaron reportes de contaminación por *B. cepacia* o por BCC.

Con respecto a la búsqueda de información en las publicaciones y boletines epidemiológicos emitidos en el INS, fue realizado en dos etapas. La primera sobre la revisión de brotes entre los años 2014 al 2018, y la segunda investigación de los años 2018 al 2022, de acuerdo con las publicaciones emitidas no se encontraron reportes asociados a BCC. En conclusión, para Colombia a la fecha no hay reportes de retiro de productos por el BCC.

Actualmente, en consideración a que el número de retiradas de producto sigue siendo alto debido a la contaminación por *B. cepacia*, ha hecho que la FDA continúe advirtiendo a las compañías farmacéuticas sobre el peligro de contaminación que presentan el BCC cuando están presentes en productos farmacéuticos estériles y no estériles (54).

Las fuentes comunes de infección por BCC en entornos de atención médica se han rastreado en el suministro de agua de ósmosis inversa para diálisis contaminada, gel de ultrasonido utilizado durante la biopsia transrectal de próstata, lavadora-desinfectadora en unidad de broncoscopia, solución de clorhexidina, gasometría, tapones de emulsión lipídica, leche corporal hidratante, antiséptico cutáneo con alcohol y enjuague bucal, entre otros productos (55).

El agua es la materia prima más utilizada en la industria farmacéutica y se considera una fuente frecuente de contaminación por BCC. De hecho, varios brotes por BCC que ocurrieron a lo largo de los años han identificado el agua de calidad farmacéutica como la causa principal de la contaminación del producto, mientras que la contaminación de las materias primas y los procedimientos de control de calidad inadecuados fueron los menos implicados en el retiro de productos (56, 57). Por lo tanto, en entornos industriales, cada fuente de agua debe considerarse un depósito potencial (57) y cada equipo utilizado para el procesamiento, como tanques, bombas y líneas de llenado, debe limpiarse, desinfectarse y secarse adecuadamente (56).

Desde el año 1998 al 2011 los autores Jiménez L y Sutton SW en sus reportes de contaminación de productos, describieron que la especie aislada principalmente es el patógeno *B. cepacia*, encontrando contaminación en productos estériles y no estériles provocando el retiro de los productos (58).

Durante el periodo 2004 al 2011, de 642 productos retirados del mercado por contaminación, se identificó que una de las principales causas es contaminación microbiológica, sin informar el agente involucrado (15 %), y en el 72 % de los casos se informa el microorganismo contaminante. Se destaca que el 34% de estos retiros de productos es por el patógeno *B. cepacia* (38).

Para el año 2011 Torbeck Lynn y colaboradores, realizaron una revisión de la causa raíz del retiro del mercado realizado por la División de Fabricación y Calidad de Productos del Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos, evidenciando que *B. cepacia* fue el causante de contaminación de un número considerable de productos farmacéuticos terminados e identificado en los entornos utilizados para fabricar productos farmacéuticos. Torbeck y colaboradores concluyeron que identificaron diversos puntos de contaminación microbiana por *B. cepacia* lo que “representó una seria amenaza para los pacientes susceptibles, particularmente aquellos con FQ o que están inmunosuprimidos” (57). Finalmente se constata que es importante evitar que *B. cepacia* contamine los entornos de fabricación de productos farmacéuticos, las materias primas y los productos terminados.

Para el año 2016 se presenta un brote por el BCC, Richar Brooks y colaboradores investigaron la causa y el alcance del brote, reportando que el brote ocasionó 162 casos de infecciones al torrente sanguíneo de los pacientes. Los mismos autores señalan que, se realizó una recopilación de la información sobre exposiciones a productos y medicamentos, retiros de productos, aislamientos correspondientes a la infección y posteriormente luego de una serie de investigación identificaron que los pacientes tenían en común el suministro de solución salina por vía intravenosa. Se realizó aislamiento microbiológico en el lote de solución salina, identificando así al patógeno *B. cepacia*. Concluyeron que el BCC puede sobrevivir en los sistemas de agua y que es requerido alertar a la industria farmacéutica para establecer un control en el análisis microbiológico para todos los materiales utilizados en la producción de un producto o de dispositivos médicos (57).

El mantenimiento de unas condiciones ambientales adecuadas evita en gran medida la entrada de microorganismos en los medicamentos (59). Ya que, para obtener un

medicamento de calidad microbiológica adecuada para la industria farmacéutica donde se fabrican medicamentos se deben seguir los principios de las Buenas Prácticas de Fabricación.

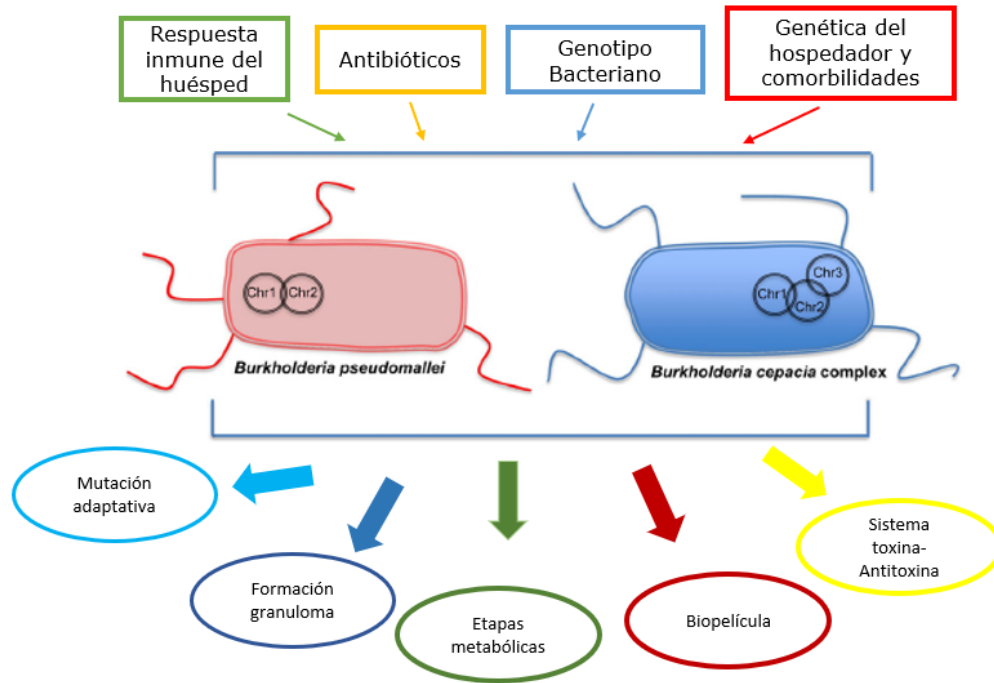
### **5.3 Factores de virulencia y capacidad patogénica de *B. cepacia***

En términos epidemiológicos, el modo de transmisión de este patógeno oportunista principalmente ocurre a través del contacto directo con otras personas, por ejemplo, un apretón de manos, o por contacto con el cuerpo transpiración. Aunque *B. cepacia* no parece sobrevivir en superficies completamente secas durante más de una semana, puede sobrevivir durante muchos meses en el agua (60). La capacidad del género *Burkholderia* para prosperar en ambientes diferentes no es comparable con otros géneros, esto se debe a la diversidad genética, como lo es el fenómeno de intercambio genético no ligado a la reproducción, en el que el material genético se transfiere entre organismos sin relación de descendencia conocido como la transferencia horizontal de genes (61) y la modulación de expresión génica con secuencias de inserción que determina el fenotipo de los diferentes tipos celulares, su morfología, su funcionalidad y su habilidad de responder ante diversas condiciones (62).

La virulencia de *B. cepacia* es multifactorial, como los factores de *quorum sensing*, la adquisición de hierro a través de sideróforos y la biosíntesis de lipopolisacáridos son requeridos para una patogenicidad completa (63). Se ha reportado la identificación de las estrategias de persistencia y virulencia del BCC para persistir en un huésped (64). Estas estrategias se resumen en la figura 7.



**Figura 7.** Principales mecanismos de virulencia y otros factores que influyen en la persistencia de *B. cepacia* en el hospedero. Tomado y adaptado de (64)



Los principales factores de persistencia-virulencia de *B. cepacia*, son los sistemas de toxina-antitoxina (TA), etapas metabólicas, biopelículas y mutaciones adaptativas. Con frecuencia los factores de persistencia tienen relación asociado con infecciones crónicas, recurrentes y latentes. Uno de esos mecanismos que se ha caracterizado es la funcionalidad de la toxina HicA del sistema HicAB TA en Bpm (65). A continuación, se describen las características de estos:

### 5.3.1 Sistemas de quorum sensing (QS)

Se conoce como quorum sensing (QS) al mecanismo mediante el cual la bacteria detecta una señal y responde mediante comunicación bacteriana de célula a célula mediada por la producción de moléculas de señalización, llamadas como autoinductores (64). Cuando las condiciones ambientales son favorables, la densidad bacteriana aumenta (*quorum sensing*), lo que conlleva a la expresión de sus factores de virulencia como la síntesis de

toxoflavina, la biogénesis de flagelos, la respuesta quimiotáctica, el sistema de secreción tipo III y la síntesis de la enzima catalasa (66).

Algunos de estos sistemas de *B. cepacia* son Acil homoserina lactona (AHL) como molécula de señalización, LuxR (represor), LuxI (inductor), sistema CepIR y CepR (son comunicaciones globales de célula a célula reguladora) y RpfF (67).

Dentro del BCC la producción de AHL depende del tipo de molécula y la cantidad asociada a la cepa, el sistema CepIR está dirigido a la síntesis de N-octanoil homoserina lactona (C8-HSL) y en menor cantidad de N-hexanoil-homoserina lactona (C6-HSL).

Se ha demostrado que el sistema CepIR y CepR controla varias funciones mediadas por AHL donde se incluye la motilidad, formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia como lo son las toxinas, antifúngicos y proteasas como las ZmpA y ZmpB (67).

Este complejo presenta o está formado por cuatro sistemas Quorum Sensing, compuestos por:

- Una sintasa
- Un receptor: CepIR, CciIR
- Un sistema basado en el factor de señal difusible de *Burkholderia* (BDSF) RpfF BC
- Una péptido sintetasa no ribosomal

Esta detección de Quorum Sensing, es un proceso en el que existe una comunicación entre el contenido interno de las células de las bacterias, debido a que allí se puede reconocer u observar la producción de moléculas de tamaño pequeño o péptidos que tienen como función la señalización, lo cuales son conocidos como autoinductores. Estos autoinductores o moléculas se unirán a efectores específicos, que tendrán como función intervenir en la regulación de la expresión de los principales factores de virulencia como proteasas, toxinas, además de estimular la producción de biofilm o biopelículas por parte de las bacterias (68).

### **5.3.2 Biopelículas**

La capacidad de formar biopelícula por parte de las bacterias Gram negativas como de las Gram positivas ha sido ampliamente demostrada y una de sus principales características es su matriz exopolisacárida (69) y su resistencia a los antibióticos (70). A nivel celular la biopelícula tiene una gran heterogeneidad, así la respuesta de antimicrobianos varía según el punto donde se encuentra ubicada la célula dentro de la biopelícula (31). Sin embargo, la resistencia a los antibióticos es multifactorial y lo que ha contribuido al aumento de esta resistencia dentro de las biopelículas es la heterogeneidad de las tasas de crecimiento y las limitaciones de difusión de antibióticos de la matriz de la biopelícula y la conversión de células a fenotipos "persistentes" (72).

La producción de factores de virulencia extracelular que incluyen proteasa, hemolisina, lipasa y gelatinasa, sideróforos quelantes de hierro, T3SS y T4SS, LPS, pili y flagelos y cápsulas, se identifican mediante el uso de diferentes modelos de infección (73). Además, *B. cepacia* puede producir un exopolisacárido que permite reforzar la integridad de la biopelícula (74).

### **5.3.3 Lipopolisacárido**

Los lipopolisacárido (LPS), de las membranas externas, tienen como rol principal la interacción huésped-patógeno. La producción de LPS está controlada por el mecanismo de Quorum sensing, las estructuras del polisacárido son O que consta de 2 polímeros conocidos como Gal 2 y GalNAc 1 y además se cuenta con uno que es menor polímero, compuesto de GalNAc. El lipopolisacárido principalmente constituye la resistencia a los péptidos antimicrobianos y la respuesta de las citocinas proinflamatorias (71) e induce una respuesta inmune que puede contribuir al daño de la célula huésped (75).

### **5.3.4 Fosfolipasas y lipasas, factor sigma**

En las bacterias Gram negativas, estas características de virulencia están controladas por el sistema Quorum sensing de comunicación célula-célula y el factor sigma y RpoS de respuesta al estrés, que juegan un papel importante en la adaptación bacteriana a la

fase estacionaria y las respuestas al estrés (76), tienen un mecanismo regulador de retroalimentación para controlar la expresión de cada uno (77).

*B. cepacia* se encuentra catalogado y considerado como uno de los principales patógenos en producir lipasa, por la vía de secreción de tipo II del sistema CepIR del mecanismo *quorum sensing*. Un estudio *in vivo* en ratones demostró que la lipasa de *B. cepacia* inhibió la función fagocítica de los macrófagos alveolares, proporcionando evidencia de que las lipasas bacterianas pueden alterar la morfología de las células eucariotas (78). Las lipasas juegan un papel importante en la adquisición de nutrientes, particularmente en los sistemas de aguas residuales y el procesamiento de alimentos (79).

Se ha identificado una vía de secreción de tipo II para la secreción de lipasa, que al igual que muchas vías de secreción tipo II están bajo control de detección de quórum, aunque su regulación en BCC es independiente del sistema de detección de CepIR. La expresión de lipasa entre los aislamientos del complejo es más alta entre las cepas de *B. multivorans*, seguida de *B. cenocepacia* (80).

*B. cepacia* presentan una alta resistencia, tanto natural como adquirida, a fármacos o antibióticos comúnmente usados en la medicina para atacar infecciones. Esto causado por varios factores que pueden ser, una inactivación enzimática, una modificación del objetivo, la permeabilidad deficiente de la pared celular y la presencia de muchas bombas de flujo (81).

Un mecanismo utilizado por las bacterias para adaptarse al estrés implica la actividad del factor sigma alternativo RpoE, un importante regulador de la respuesta al estrés extracitoplasmático (82).

Como consecuencia de complejos mecanismos, *B. cepacia* es naturalmente resistente a diferentes clases de antibióticos (64), sin embargo estudios han demostrado algunos mecanismos intrínsecos que ha adquirido la resistencia a los antibióticos, como el sistemas de bombeo, modificaciones enzimáticas y de membrana, enzimas B-lactamasas, entre otros. En la Tabla 5 se resumen estos mecanismos de resistencia y la afectación antimicrobiana (71).

**Tabla 5.** Mecanismos de Resistencia de *Burkholderia cepacia*.

<b>Categoría</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>	<b>Afectación antimicrobiana</b>
B-lactamasas	Clase C cromosómica inducible de Ambler (PenA); más otros (Ambler clase A y D)	$\beta$ -lactámicos
Sistemas de flujo	Transportador de eflujo de la familia RND	Aminoglucósidos, ciprofloxacina, trimetoprima, cloranfenicol
Modificación enzimática	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos; Dihidrofolato reductasa	Resistencia a los aminoglucósidos, trimetoprima
Cambios en la membrana externa	Falta de sitios de unión en la capa de lipopolisacáridos.	Resistencia intrínseca a los antimicrobianos catiónicos, polimixinas y aminoglucósidos
Sitio de destino alterado	Cambio en las proteínas de unión a penicilina; Mutaciones en la región determinante de la resistencia a quinolonas, QRDR ( <i>gyrA</i> y <i>parC</i> )	$\beta$ -lactámicos; fluoroquinolonas

Tomado y adaptado de (47)

## **5.4 Métodos de identificación de *B. cepacia***

Dentro de la práctica rutinaria en el laboratorio de Microbiología, se aplican diferentes técnicas fenotípicas para la identificación de microorganismos. Sin embargo, estas técnicas requieren de varios días, y poseen limitantes en la interpretación de resultados. Se requiere tiempo y experiencia y se pueden presentar resultados dudosos o no tan confiables. En las pruebas moleculares estos limitantes logran mitigarse, sin embargo, representa un costo más elevado y se requiere personal calificado, especializado y entrenado para la aplicación.

### **5.4.1 Pruebas de identificación fenotípicas para *B. cepacia***

Los esquemas tradicionales de identificación de *B. cepacia*, se basan en sus características fenotípicas bacterianas como, la morfología, crecimiento, propiedades bioquímicas y metabólicas.

El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección. Permite el aislamiento del microorganismo, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos (83).

Los medios de cultivo más utilizados para el crecimiento del BCC en el laboratorio son el agar nutritivo, agar sangre y chocolate. Sin embargo, lo ideal es recurrir a medios de cultivo selectivos como agar MacConkey, que es de gran utilidad para muestras como esputo o de otras zonas que son no estériles, ya que las cepas de *B. cepacia* crecen bien en este medio de cultivo.

Para diferenciar a *B. cepacia* de *Pseudomonas* es empleado el medio selectivo agar *Burkholderia cepacia* (BSCA). Este medio contiene peptona de caseína y lactosa, para el aporte de nutrientes para el crecimiento; además de sacarosa, cloruro de sodio, extracto de levadura, rojo fenol, cristal violeta y antibióticos como polimixina, gentamicina o vancomicina. Este medio de cultivo favorece en gran medida el crecimiento de las diferentes especies del BCC y descarta o inhibe el crecimiento de otras especies. Se incuba a 30 - 35°C durante 48 a 72 horas. Este medio se puede utilizar con métodos USP capítulo 62 (2). Las colonias de *B. cepacia* en este medio causan un cambio de color de rojo anaranjado a amarillo.

Otros medios de cultivo sólidos son teóricamente capaces de recuperar organismos del BCC, como agar de oxidación-fermentación polimixina-bacitracina-lactosa (OFPBL). Este medio es ideal para el crecimiento de *P. cepacia* (PC). Sin embargo, las alteraciones simples en la fuente de carbono pueden, cambiar la morfología colonial de las especies BCC cultivadas en agar. Esta capacidad de alterar su metabolismo y perfil bioquímico de esta manera, puede hacer que su identificación mediante métodos fenotípicos sea muy difícil. Sin embargo, debe señalarse que los problemas de identificación del complejo basados en métodos fenotípicos son multifactoriales, y no necesariamente debido a las diferencias de crecimiento en diferentes medios (36).

Sumado al diagnóstico bacteriológico, las pruebas bioquímicas de identificación permiten evaluar los diferentes complejos de *B. cepacia* en Genomovar de acuerdo a sus marcadores bioquímicos. Como se describió en el apartado 2.4, mediante la evaluación de la propiedad oxidativa, fermentadora, temperatura de crecimiento y la identificación

de enzimas como catalasa, ureasa, lactasa,  $\beta$ -Galactosidasa, entre otras, es posible acercarse a la identificación de género y Genovar (31). Sin embargo, no es posible identificar para el BCC por métodos bioquímicos convencionales.

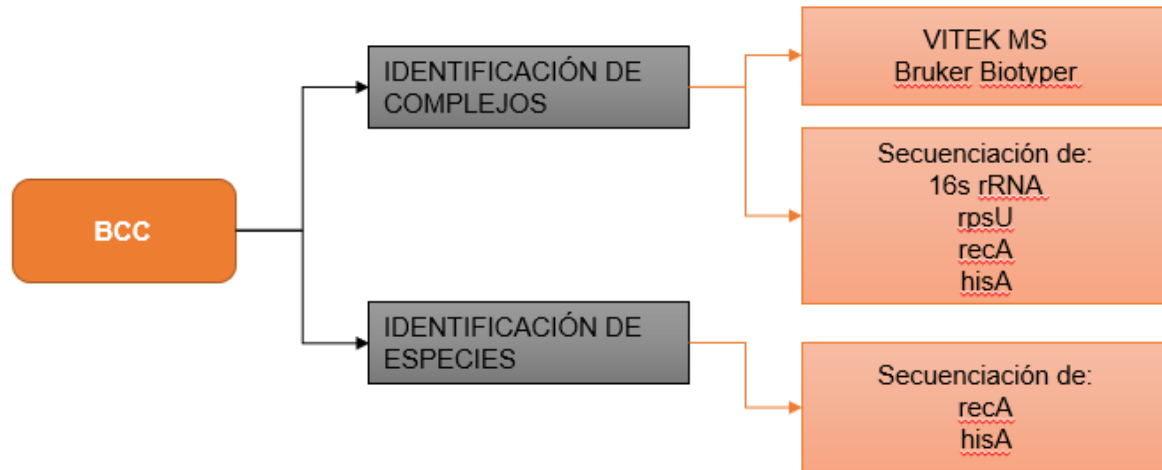
#### 5.4.2 Pruebas Moleculares

Una amplia variedad de genes ha sido utilizada como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en las distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del *ARNr 16S* el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el *ARNr 16S* una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas para realizar asignación de especie (85).

Los sistemas de diagnóstico fenotípico automatizado no son muy específicos, en cambio, los métodos moleculares, aunque a un costo elevado y dispendiosos, permiten hacer una clara diferenciación de especies con poca cantidad de muestra o copias de genes. Por esto, una técnica simple, rápida y confiable es la necesidad del momento, como la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción e ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) está emergiendo como una herramienta alternativa eficiente, precisa y rentable en la identificación microbiana (86).

Es así como técnicas más robustas y con alto potencial de secuenciación automatizado, que permiten la rápida amplificación de genes específicos de *B. cepacia* como como *16S rRNA*, *rec A*, *his A* y *rps U*, son aspectos importantes a considerar en la identificación(87) (88).

**Figura 8.** Identificación del complejo *B. cepacia*.



Se describen de manera general las principales tecnologías de diagnóstico molecular para *B. cepacia* y los genes más empleados para la amplificación e identificación. Tomado y adaptado de (89).

#### 5.4.2.2 Secuenciación de genes *hisA*

Estudios con respecto a la secuenciación a partir de genes llamados *hisA* tuvo como resultado la diferenciación de 17 especies del BCC en diferentes grupos con valores altos de confiabilidad. El gen *hisA* presenta similitud en la estructura los genes *16SrRNA*. La proteína HisA pertenece al núcleo biosintético de histidina (hisBHAF), que consta de cuatro genes cuyos productos se ha hipotetizado para formar un metabolón, lo que se constituye como un multi complejo de enzima constituida por proteínas que interactúan transitoriamente. Así, estas proteínas presentan fuertes restricciones funcionales y estructurales, lo que limita el número de mutaciones que pueden ocurrir en los genes que las codifican. Este gen *hisA* representaría una nueva herramienta para la identificación de bacterias del BCC (88).



#### 5.4.2.3 Secuenciación de genes *rpsU*

Se ha demostrado científicamente que genes conocidos como *rpsU* pueden ser utilizados para la identificación molecular de diferentes especies, incluido el género *Burkholderia*, el gen *rpsU* codifica para el homólogo de la proteína ribosómica S21.

Las secuencias de *rpsU*, en la identificación de este último género arrojó cuatro grupos:

- **Grupo I:** *B. plantarii*, *B. glumae*, *B. cocovenenans* y *B. gladioli*
- **Grupo II:** el complejo *Burkholderia pseudomallei* (*B. mallei*, *B. pseudomallei* y *B. thailandensis*).
- **Grupo III:** *B. caryophylli*, *B. multivorans*, *P. norimbergensis*, *B. Ubonensi*, *B. stabilis*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. pyrrocinia*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. vietnamiensis* y *B. dolosa*.
- **Grupo IV:** *B. sacchari*, *B. graminis*, *B. fungorum*, *B. phytofirmans*, *B. xenovorans*, *B. fenoliruptrix*, *B. phenazinium*, *B. caribensis*, *B. hospita* y *B. phymatum*

Sin embargo, esta secuenciación *rpsU* tiene una desventaja o un límite, y es que con este no es posible obtener una diferenciación confiable o altamente específica a nivel de especies de BCC (90).

#### 5.4.2.4 Secuenciación del gen *recA*

El gen *recA* es otra alternativa con altas posibilidades de lograr diferenciar totalmente las especies de BCC, por su contenido genético (91).

Una prueba de reacción en cadena de la polimerasa o PCR realizada del gen *recA* en el estudio realizado por Furlan y colaboradores, tuvo como resultado una alta especificidad del gen con respecto a la identificación de las bacterias pertenecientes al BCC, en comparación con la secuenciación de los genes 16S y 23S *rRNA* (87). Estudios han demostrado que es posible diferenciar estas 19 especies *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. humptydoensis*, *B. oklahomensis*, *B. oklahomensis*, *B. ubonensis*, *B. ambifaria*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis*, *B. fungorum*, *B. glumae*, *B. cepacia*, *B. xenovorans*, *B. dolosa*, *B. gladioli* y Bc, realizando secuenciación con el gen *recA* (89).

## 6. Conclusiones

Este trabajo incluyó la revisión de 93 artículos en inglés y español, publicados que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión, asociados con la contaminación del sistema de agua en la industria farmacéutica; además se incluyó información referente a las normativas como la USP, FDA, OMS y reportes nacionales del INVIMA y del INS.

De los reportes de retiro de productos farmacéuticos por *B. cepacia*, desde el año 2004 al 2022, se identificó a nivel mundial un incremento en el año 2017 y manera más marcada en el año 2019, siendo Estados Unidos el país con el mayor número de casos de contaminación reportados. Para Colombia a la fecha no hay reportes de retiro de productos por el BCC.

Si bien las guías de inspección para laboratorios de control de calidad farmacéutica publicadas, proporcionan una orientación para los análisis en el laboratorio de microbiología, los hallazgos de contaminación por *B. cepacia*, indican en algunos casos, una limitada exigencia en el control microbiológico en los sistemas de tratamiento de agua y en los productos terminados.

La virulencia y persistencia de *B. cepacia* es multifactorial e incluye principalmente a los sistemas de quorum sensing, sistema CepIR y CepR, formación de biopelículas, la adquisición de hierro a través de sideróforos y la biosíntesis de lipopolisacáridos.

Aunque existen métodos fenotípicos de diagnóstico para *B. cepacia* y BCC como el uso de medios de cultivos selectivos y la aplicación de pruebas bioquímicas metabólicas para la clasificación en Genomovar, la sensibilidad disminuye en el caso de identificación a partir de muestras de agua, como el sistema de agua en las industrias farmacéuticas.

Los métodos moleculares como PCR cuantitativa o espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), aunque a un costo elevado, permiten hacer una clara identificación microbiana y diferenciación de especies con poca cantidad de muestra o copias de genes, emergiendo como una herramienta eficiente y precisa que podría mejorar la notificación de la contaminación para la industria farmacéutica, lo que a su vez ayudará a contener una posible infección en pacientes inmunosuprimidos por causa de estos productos contaminados.

## 7. Referencias

1. Haleem RM, Salem MY, Fatahallah FA, Abdelfattah LE. Quality in the pharmaceutical industry - A literature review. Vol. 23, Saudi Pharmaceutical Journal. 2015.
2. The United States pharmacopeial convention. United States Pharmacopeia (USP). In: USP 43. 2022.
3. Resolución 1160 de 2016. Ministerio de salud y protección social. 2016.
4. Tavares M, Kozak M, Balola A, Sá-Correia I. Burkholderia cepacia Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR>
5. Vial L, Chapalain A, Groleau MC, Déziel E. The various lifestyles of the Burkholderia cepacia complex species: A tribute to adaptation. Vol. 13, Environmental Microbiology. 2011. p. 1–12.
6. John J. Lipuma BJCJP. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, and Acidovorax \*. In: Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. 2015.
7. Hendry S, Steinke S, Wittstein K, Stadler M, Harmrolfs K, Adewunmi Y, et al. Functional Analysis of Phenazine Biosynthesis Genes in Burkholderia spp. Appl Environ Microbiol. 2021;87 (11).
8. Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains [Internet]. 2001. Available from: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
9. Lobo F. La Industria Farmacéutica en la Actualidad: Un Vistazo a sus características. Papeles de Economía Española. 2019;160.
10. Sanidad M de, Bienestar CY. Fabricación de sustancias activas biológicas y medicamentos biológicos para uso humano. Guía NFC. 2018;
11. López Aguirre J, Pérez Aguilera M de J. Diseño experimental para el desarrollo de metodología en productos farmacéuticos preservados. Celaya. 2013;5(3).
12. Márquez R, Marveya M. Configuración económica de la industria farmacéutica. Vol. 38, Mérida. Venezuela. 2019.
13. Sarkis M, Bernardi A, Shah N, Papathanasiou MM. Emerging challenges and opportunities in pharmaceutical manufacturing and distribution. Processes. 2021;9(3).

14. Tait K, D. Zaebst D. Industria farmacéutica industria farmacéutica. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 2022;
15. Ainurofiq A, Esther Dinda K, Widia Pangestika M, Himawati U, Dyah Wardhani W, Tamarin Sipahutar Y. The effect of polymorphism on active pharmaceutical ingredients: A review. Vol. 11, International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. 2020.
16. Abrantes CG, Duarte D, Reis CP. An Overview of Pharmaceutical Excipients: Safe or Not Safe? Vol. 105, Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016.
17. Huang J, Romero-Torres S, Moshgbar M. Practical considerations in data pre-treatment for NIR and Raman spectroscopy. Vol. 13, American Pharmaceutical Review. 2010.
18. Mohan S. Compression Physics of Pharmaceutical Powders: A Review. Int J Pharm Sci Res. 2012;3 (06).
19. Pan X mei, Li J, Gan R, Hu X nan. Preparation and in vitro evaluation of enteric-coated tablets of rosiglitazone sodium. Saudi Pharmaceutical Journal. 2015;23(5).
20. Priya, Chaudhary M. Hazard Analysis and Critical Control Points as a Quality Risk Management Tool in the Pharmaceutical Industry: A Systematic Review. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2021;11(5-S).
21. United States Pharmacopeia (USP). <60> Microbiological Examination of Non-Sterile Products Tests for Burkholderia Cepacia Complex. USP 43.
22. World Health Organization (WHO). Quality assurance of pharmaceuticals. In 2004.
23. Administración de Drogas y Alimentos (FDA). Administración de Drogas y Alimentos (FDA). In 2005.
24. International Conference on Harmonization (ICH). International Conference on Harmonization (ICH). In 2008.
25. International Organization for Standardization. International Organization for Standardization (ISO). In.
26. Suvarna K, Lolas A, Hughes P, Friedman RL. Case studies of microbial contamination in biologic product manufacturing. Vol. 14, American Pharmaceutical Review. 2011.
27. Jimenez L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. Vol. 61, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2007.

28. di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, Fani R, Paffetti D, Tabacchioni S, et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(11).
29. de Volder AL, Teves S, Isasmendi A, Pinheiro JL, Ibarra L, Breglia N, et al. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from industrial processes and contaminated products in argentina. *International Microbiology.* 2021 May 1; 24(2):157–67.
30. Butt AT, Thomas MS. Iron acquisition mechanisms and their role in the virulence of Burkholderia species. Vol. 7, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2017.
31. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Vol. 9, *Trends in Microbiology.* 2001.
32. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Vandamme P, Govan JR, Wayne DJ, et al. Environmental Burkholderia cepacia complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis.* 2007;13 (3).
33. Jung BK, Hong SJ, Park GS, Kim MC, Shin JH. Isolation of Burkholderia cepacia JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Appl Biol Chem.* 2018;61(2).
34. Défago G, Haas D. Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: Modes of action and genetic analysis. In: *Soil Biochemistry: Volume 6: Volume 6.* 2017.
35. Lessie TG, Hendrickson W, Manning BD, Devereux R. Genomic complexity and plasticity of Burkholderia cepacia. Vol. 144, *FEMS Microbiology Letters.* 1996.
36. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG. Burkholderia cepacia complex bacteria: Opportunistic pathogens with important natural biology. Vol. 104, *Journal of Applied Microbiology.* 2008.
37. Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. *Phytopathology.* 1950;40 (1).
38. U.S. Food and Drug Administration. A review of reported recalls involving microbiological control 2004-2011 with emphasis on FDA. 2012;
39. U.S. Food and Drug Administration. Burkholderia cepacia.
40. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40 (11).

41. O'Grady EP, Sokol PA. Burkholderia cenocepacia differential gene expression during host-pathogen interactions and adaptation to the host environment. *Front Cell Infect Microbiol.* 2011;1:15.
42. Chatteraj SS, Murthy R, Ganesan S, Goldberg JB, Zhao Y, Hershenson MB, et al. Pseudomonas aeruginosa alginate promotes Burkholderia cenocepacia persistence in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *Infect Immun.* 2010;78(3).
43. Paganin P, Tabacchioni S, Chiarini L. Pathogenicity and biotechnological applications of the genus Burkholderia. Vol. 6, *Central European Journal of Biology.* 2011.
44. Cauduro GP, Leal AL, Marmitt M, de Ávila LG, Kern G, Quadros PD, et al. New benzo(a)pyrene-degrading strains of the Burkholderia cepacia complex prospected from activated sludge in a petrochemical wastewater treatment plant. *Environ Monit Assess.* 2021;193(4).
45. Minogue E, Tuite NL, Smith CJ, Reddington K, Barry T. A rapid culture independent methodology to quantitatively detect and identify common human bacterial pathogens associated with contaminated high purity water. *BMC Biotechnol.* 2015 Feb 18;15(1).
46. Elshafie HS, Camele I. An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of burkholderia spp. Vol. 11, *Metabolites.* MDPI AG; 2021.
47. Abbott IJ, Peleg AY. Stenotrophomonas, achromobacter, and nonmelioid burkholderia species: Antimicrobial resistance and therapeutic strategies. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015;36 (1):99–110.
48. Glowicz J, Crist M, Gould C, Moulton-Meissner H, Noble-Wang J, de Man TJB, et al. A multistate investigation of health care–associated Burkholderia cepacia complex infections related to liquid docusate sodium contamination, January-October 2016. *Am J Infect Control.* 2018 Jun 1;46(6):649–55.
49. Fernández-Acosta EL, Fretes de Aquino SL, González Ruiz Díaz R, Domenech MG. Análisis de riesgo de un microorganismo objetable en un suplemento dietario para la liberación de lotes. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.* 2021;19 (3).
50. Parenteral Drug Association. Exclusion of Objectionable Microorganisms from Nonsterile Pharmaceuticals, Medical Devices, and Cosmetics. Vol. No. 67. 2014.
51. Bill Huitt WM. Appendix C: Guide to Inspections of High Purity Water Systems. In: *Bioprocessing Piping and Equipment Design.* 2016.

52. World Federation for Culture Collections Statutes. *Int J Syst Bacteriol.* 1972;22(4).
53. Valderrama-Beltrán SL, Gualtero-Trujillo SM, Rodríguez-Peña J, Linares-Miranda CJ, Gonzalez-Rubio AP, Vega-Galvis MC, et al. Pseudobrote por *Burkholderia cepacia* en dos unidades de cuidados intensivos de un Hospital Universitario en Bogotá – Colombia. *Infectio.* 2019;23(2).
54. U.S. Food and Drug Administration SSMD. FDA advises drug manufacturers that *Burkholderia cepacia* complex poses a contamination risk in non-sterile, water-based drug products. 2017.
55. Souza Dias MB, Cavassin LGT, Stempluk V, Xavier LS, Lobo RD, Sampaio JLM, et al. Multi-institutional outbreak of *Burkholderia cepacia* complex associated with contaminated mannitol solution prepared in compounding pharmacy. *Am J Infect Control.* 2013;41 (11).
56. Cundell T. Excluding *burkholderia cepacia* complex from aqueous, non-sterile drug products. *Am Pharm Rev.* 2019;22 (1).
57. Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle DE, Friedman RL, Hussong D. *Burkholderia cepacia*: This decision is overdue. Vol. 65, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 2011.
58. A review of reported recalls involving microbiological control 2004-2011 with emphasis on FDA.
59. Ratajczak M, Kaminska D, Dlugaszewska J, Gajecka M. Antibiotic resistance, biofilm formation, and presence of genes encoding virulence factors in strains isolated from the pharmaceutical production environment. *Pathogens.* 2021;10 (2).
60. Holmes A, Govan J, Goldstein R. Agricultural use of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: A threat to human health? Vol. 4, *Emerging Infectious Diseases.* 1998.
61. Boto L. Horizontal gene transfer in evolution: Facts and challenges. Vol. 277, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2010.
62. Estrada-de los Santos P, Rojas-Rojas FU, Tapia-García EY, Vásquez-Murrieta MS, Hirsch AM. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. Vol. 66, *Annals of Microbiology.* 2016.
63. Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra JA, Estrada-de los Santos P. The controversial *Burkholderia cepacia* complex, a group of plant growth promoting species and plant, animals and human pathogens. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51(1).

64. Lewis ERG, Torres AG. The art of persistence-the secrets to Burkholderia chronic infections. Vol. 74, Pathogens and Disease. 2016.
65. Butt A, Higman VA, Williams C, Crump MP, Hemsley CM, Harmer N, et al. The HicA toxin from Burkholderia pseudomallei has a role in persister cell formation. Biochemical Journal. 2014;459(2).
66. Kim J, Kang Y, Choi O, Jeong Y, Jeong JE, Lim JY, et al. Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in Burkholderia glumae. Mol Microbiol. 2007;64(1).
67. Suppiger A, Schmid N, Aguilar C, Pessi G, Eberl L. Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the Burkholderia cepacia complex. Vol. 4, Virulence. 2013.
68. Buroni S, Scoffone VC, Fumagalli M, Makarov V, Cagnone M, Trespido G, et al. Investigating the mechanism of action of diketopiperazines inhibitors of the burkholderia cenocepacia quorum sensing synthase CepI: A site-directed mutagenesis study. Front Pharmacol. 2018;9.
69. Narayanaswamy VP, Duncan AP, LiPuma JJ, Wiesmann WP, Baker SM, Townsend SM. In vitro activity of a novel glycopolymer against biofilms of burkholderia cepacia complex cystic fibrosis clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(6).
70. Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T. Regulation of biofilm formation in Pseudomonas and Burkholderia species. Vol. 16, Environmental Microbiology. 2014.
71. Ganesh PS, Vishnupriya S, Vadivelu J, Mariappan V, Vellasamy KM, Shankar EM. Intracellular survival and innate immune evasion of Burkholderia cepacia: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. Vol. 64, Microbiology and Immunology. 2020.
72. Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Comparison of antibiotic susceptibility of Burkholderia cepacia complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2007 Mar 1;26(3):213–6.
73. Nelson J. Virulence factors of Burkholderia cepacia. FEMS Immunol Med Microbiol. 1994;8(2).
74. RAJASEKHARAN SK, RAMESH S. Cellulase Inhibits Burkholderia cepacia Biofilms on Diverse Prosthetic Materials. India; 2013 Jul.
75. Leitão JH, Sousa SA, Ferreira AS, Ramos CG, Silva IN, Moreira LM. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against Burkholderia



- cepacia complex pathogens and related species. Vol. 87, Applied Microbiology and Biotechnology. 2010.
76. Srisanga K, Suthapot P, Permsirivisarn P, Govitrapong P, Tungpradabkul S, Wongtrakoongate P. Polyphosphate kinase 1 of *Burkholderia pseudomallei* controls quorum sensing, RpoS and host cell invasion. *J Proteomics*. 2019;194.
  77. Wongtrakoongate P, Tumapa S, Tungpradabkul S. Regulation of a quorum sensing system by stationary phase sigma factor RpoS and their co-regulation of target genes in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol Immunol*. 2012;56 (5).
  78. Mullen T, Markey K, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007;26(12).
  79. Willsey GG, Wargo MJ. Extracellular lipase and protease production from a model drinking water bacterial community is functionally robust to absence of individual members. *PLoS One*. 2015;10(11).
  80. McClean S, Callaghan M. *Burkholderia cepacia* complex: Epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention. Vol. 58, *Journal of Medical Microbiology*. 2009.
  81. Scoffone VC, Chiarelli LR, Trespidi G, Mentasti M, Riccardi G, Buroni S. *Burkholderia cenocepacia* infections in cystic fibrosis patients: Drug resistance and therapeutic approaches. Vol. 8, *Frontiers in Microbiology*. 2017.
  82. Sousa SA, Feliciano JR, Pita T, Guerreiro SI, Leitão JH. *Burkholderia cepacia* complex regulation of virulence gene expression: A review. Vol. 8, *Genes*. 2017.
  83. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2011;29 (8).
  84. Meza-Radilla G, Larios-Serrato V, Hernández-Castro R, Ibarra JA, Estrada-De Los Santos P. *Burkholderia* species in human infections in Mexico: Identification of *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis*, *B. pseudomallei* and a new *Burkholderia* species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15 (6).
  85. Burns JL, Rolain JM. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? Vol. 13, *Journal of Cystic Fibrosis*. 2014.

86. Gautam V, Sharma M, Singhal L, Kumar S, Kaur P, Tiwari R, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging tool for unequivocal identification of non-fermenting Gram-negative bacilli. *Indian Journal of Medical Research*. 2017 May 1;145 (May):665–72.
87. Furlan JPR, Pitondo-Silva A, Braz VS, Gallo IFL, Stehling EG. Evaluation of different molecular and phenotypic methods for identification of environmental *Burkholderia cepacia* complex. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019 Mar 1;35 (3).
88. Papaleo MC, Perrin E, Maida I, Fondi M, Fani R, Vandamme P. Identification of species of the *Burkholderia cepacia* complex by sequence analysis of the *hisA* gene. *J Med Microbiol*. 2010 Oct;59 (10):1163–70.
89. Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: An update. Vol. 18, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. BioMed Central Ltd.; 2019.
90. Frickmann H, Neubauer H, Loderstaedt U, Derschum H, Hagen RM. *rpsU* - based discrimination within the genus *Burkholderia* . *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2014;4(2).
91. Cesarini S, Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Dalmastrì C. *RecA* gene sequence and Multilocus Sequence Typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49 (5).
92. Tavares M, Kozak M, Balola A, Coutinho CP, Godinho CP, Hassan AA, et al. Adaptation and Survival of *Burkholderia cepacia* and *B. contaminans* During Long-Term Incubation in Saline Solutions Containing Benzalkonium Chloride. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Jun 26;8.
93. Ahn Y, Lee UJ, Lee YJ, LiPuma JJ, Hussong D, Marasa B, et al. Oligotrophic Media Compared with a Tryptic Soy Agar or Broth for the Recovery of *Burkholderia cepacia* Complex from Different Storage Temperatures and Culture Conditions. *J Microbiol Biotechnol*. 2019;29(10).