



**PREVENCIÓN DEL PATÓGENO *BURKHOLDERIA CEPACIA* POR MEDIO DE
SU IDENTIFICACIÓN EN LOS PRODUCTOS Y LAS INSTALACIONES DE LA
EMPRESA COMERCIALIZADORA CBD S.A.S.**

Daniela Arango Ciro 1

Ingeniera bioquímica

Informe de práctica presentado para optar al título de Ingeniero Bioquímico

Asesora

Luisa Fernanda Patiño Cervantes, interno

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Bioquímica

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2024

Cita

(Arango Ciro Daniela, 2024)

Referencia

(Arango Ciro, 2024). *PREVENCIÓN DEL PATÓGENO BURKHOLDERIA CEPACIA POR MEDIO DE SU IDENTIFICACIÓN EN LOS PRODUCTOS Y LAS INSTALACIONES DE LA EMPRESA COMERCIALIZADORA CBD S.A.S.* Informe de práctica, Ingeniería bioquímica. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.

Estilo APA 7 (2020)



Seleccione biblioteca, CRAI o centro de documentación UdeA (A-Z)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Este trabajo está escrito con mucho esfuerzo y dedicación, fruto de aprendizajes invaluable adquiridos en mi Alma Mater, dedicado a mi familia que ha sido un apoyo incondicional y un pilar gigante en mi vida y sobre todo a Dios que me da el conocimiento y la vida para seguir adelante con mis proyectos.

Agradecimientos

Agradezco inicialmente a mi familia y mi novio, a mis profesores guías en todo el proceso universitario, a mis compañeros de estudio que se han vuelto mis amigos y han estado conmigo desde el inicio de mi vida en la universidad y son el mejor equipo de trabajo que pude haber pedido; a mis compañeros de prácticas que me han enseñado mucho sobre la vida laboral, el compañerismo y la responsabilidad y, sobre todo, a mi jefe de aseguramiento y control de calidad en la empresa en la que hice mi práctica profesional en este periodo, el director técnico y el jefe de investigación y desarrollo.

Tabla de contenido

Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
1 Planteamiento del problema	11
1.1 Antecedentes.....	12
2 Justificación	14
3 Objetivos.....	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 Marco teórico.....	16
5 Metodología.....	22
6 Resultados.....	24
7 Discusión	28
8 conclusiones.....	30
Referencias	31

Lista de figuras

Figura 1. Muestras con posible presencia de Bcc en agar cetrimide. **M1:** punto de muestreo de agua #3 en planta de fabricación; **M2:** biomascarilla capilar (PP); **M3:** biomascarilla capilar (PT); **M4:** punto de muestreo de agua #2 en planta de fabricación..... 24

Figura 2. Tinción de Gram realizada a muestras con posible evidencia de Bcc con objetivo de 40x .**M1:** biomascarilla capilar (PT); **M2:** punto de muestreo #3 de agua en la planta de fabricación; **M3:** biomascarilla capilar (PP)..... 24

Figura 3. Medio BCSA sin presencia de Bcc..... 25

Figura 4. Muestras de la empresa COMERCIALIZADORA CBD S.A.S. con presencia de Bcc. **M1:** bronceador de zanahoria y canela (PT); **M2:** punto de muestreo #2 de agua en la planta de fabricación; **M3:** punto de muestreo #3 de agua en la planta de fabricación; **M4:** biomascarilla capilar (PT); **M5:** biomascarilla capilar (PT); **M6:** tónico capilar kaba (PT). 25

Figura 5. Muestras finales con presencia de Bcc. **M1:** biomascarilla capilar (PT); **M2:** biomascarilla capilar (PT); **M3:** uniforme operario 1; **M4:** plato; **M5:** vaso; **M6:** manos operario 2; **M7:** manos operario 3; **M8:** uniforme operario 1; **M9:** manos operario 4; **M10:** uniforme operario 2; **M11:** manos operario 5; **M12:** punto de muestreo de agua #3 de la planta de producción; **M13:** punto de muestreo #2 de la planta de fabricación..... 26

Figura 6. Identificación morfológica realizada con tinción de gram, (bacilos gram negativos) en un microscopio con objetivo de 40x. **M1:** shampoo de romero (PP); **M2:** biomascarilla capilar (PT); **M3:** biomascarilla capilar (PT); **M4:** shampoo de romero (PP); **M5:** biomascarilla capilar (PT). 27

Siglas, acrónimos y abreviaturas

UdeA	Universidad de Antioquia
PP	Producto en proceso
PT	Producto terminado
MP	Materia Prima
USP-NF	United States Pharmacopeia
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
MO	Microorganismo
FDA	Food and Drug Administration
Bcc	Complejo <i>Burkholderia Cepacia</i>
BCSA	<i>Burkholderia Cepacia</i> Selective Agar

Resumen

En la empresa Comercializadora CBD S.A.S. se fabrican productos cosméticos que deben someterse a pruebas fisicoquímicas y microbiológicas según la farmacopea. Se realizaron cultivos para identificar microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, utilizando medios como agar TSA, Manitol, Cetrimida y Colinstant. Con el presente trabajo, se busca establecer la presencia del complejo *Burkholderia cepacia* (*B.cepacia*) en productos en proceso, terminados, mangueras y tuberías. Aunque la presencia del complejo *B. cepacia* no está regulado por la farmacopea, su prevención es crucial debido a sus riesgos para la salud. Se identificó el complejo *B. cepacia* mediante el medio de cultivo Burkholderia Cepacia Selective Agar (BCSA) y un suplemento selectivo, así mismo, se realizó una identificación morfológica de la bacteria de manera preliminar. Se tomaron muestras de diferentes áreas para identificar posibles focos de contaminación.

Finalmente, se propone un protocolo de desinfección para prevenir la propagación de patógenos. Como resultado se logra evidenciar exitosamente la presencia de *B. cepacia* en los productos y áreas mencionadas.

Palabras clave: *Burkholderia cepacia*, patógeno, productos, cosméticos, microorganismo.

Abstract

The company Comercializadora CBD S.A.S. manufactures cosmetic products that must undergo physicochemical and microbiological tests according to the pharmacopoeia. Cultures were performed to identify microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, using media such as TSA agar, Mannitol, Cetrimide and Colinstant. The present work seeks to establish the presence of *Burkholderia cepacia* complex (*B. cepacia*) in in-process and finished products, hoses and pipes. Although the presence of *B. cepacia* complex is not regulated by pharmacopoeia, its prevention is crucial due to its health risks. *B. cepacia* complex was identified using Burkholderia Cepacia Selective Agar (BCSA) culture medium and a selective supplement, as well as a preliminary morphological identification of the bacteria. Samples were taken from different areas to identify possible sources of contamination.

Finally, a disinfection protocol was proposed to prevent the spread of pathogens. As a result, the presence of *B. cepacia* complex in the mentioned products and areas was successfully demonstrated.

Keywords: *Burkholderia cepacia*, pathogen, products, cosmetics, microorganism.

Introducción

En la industria, no hay un sector específico con normativas exclusivas para los cosméticos; en su lugar, se aplican los reglamentos y directrices de la industria farmacéutica, adaptados para la cosmética. Esto asegura altos estándares de calidad para garantizar la seguridad y la higiene adecuadas.

En la empresa Comercializadora CBD S.A.S., se manufacturan productos cosméticos que deben someterse a pruebas físico-químicas y microbiológicas para garantizar su calidad. Estos productos están regulados por las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la farmacopea [1], que establece las normativas para el correcto funcionamiento de los laboratorios. Según estos estándares, se realizan cultivos para identificar microorganismos aerobios o mesófilos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Además, se evalúa la presencia o ausencia de estos microorganismos en medios de cultivo como agar TSA, Manitol, Cetrimide y Colinstant.

Cuando hay presencia de *Pseudomonas aeruginosa* se observa en el agar Cetrimide colonias amarillas fosforescentes. En ocasiones se observan colonias blancas lechosas lo cual corresponde a un resultado no específico que podría corresponder al complejo *B. cepacia*. Esta es una cepa ambiental que se encuentra principalmente en ambientes húmedos y puede permanecer y sobrevivir por largo tiempo en aguas, soluciones de antisépticos y desinfectantes.

Este proyecto tiene como objetivo determinar la presencia del complejo *B. cepacia* en los productos en proceso, productos terminados, mangueras de transferencia, aguas y tuberías de acero inoxidable en la empresa COMERCIALIZADORA CBS S.A.S. Aunque la farmacopea no establece su identificación ni control, es crucial prevenir su propagación en los productos comercializados debido a su capacidad para causar enfermedades en humanos [2]. Estas bacterias patógenas pueden ser aisladas de fuentes de agua, tuberías y mangueras utilizadas para dispensar materias primas o transportar productos desde las marmitas hasta su envasado o almacenamiento. A pesar de que la infraestructura de la empresa es relativamente nueva, es imperativo

implementar un protocolo de prevención contra el complejo *B. cepacia* para evitar su propagación generalizada.

Con este trabajo se pretende identificar al complejo *B. cepacia* haciendo uso del medio de cultivo *B. cepacia* Selective Agar (BCSA) y un suplemento selectivo para *B. cepacia*. Para esto se tomarán muestras de diferentes áreas de la empresa y de los productos con el fin de identificar posibles focos de contaminación. Posteriormente, se presentará un protocolo de desinfección con distintos sanitizantes. El objetivo es reducir al mínimo la contaminación por patógenos y garantizar la seguridad tanto de las áreas como de los productos.

1 Planteamiento del problema

Los microorganismos pueden deteriorar el producto y pueden ser peligrosos para la salud del consumidor. Los cosméticos proporcionan un medio óptimo para la contaminación microbiológica: contienen proteínas, azúcares, vitaminas, aceites y agua, todo lo que los microorganismos necesitan para crecer. El pH neutro y el almacenamiento en un baño cálido y húmedo contribuyen a un clima ideal para las bacterias y mohos. Una gran cantidad de microorganismos entran al producto vía manos y boca. A veces el producto se contamina durante el proceso de producción, por ejemplo, a partir de materias primas contaminadas. La mayoría de los microorganismos son inofensivos para el consumidor. Sin embargo, los contaminantes microbianos pueden causar infecciones peligrosas en lactantes y personas mayores o enfermos. Además, algunos mohos y bacterias producen toxinas que pueden causar reacciones alérgicas e irritaciones de la piel [3].

En la empresa Comercializadora CBD S.A.S. desde el área de aseguramiento y control de calidad se realizan análisis microbiológicos para detectar si hay presencia de patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y microorganismos mesófilos aerobios en los productos en proceso (PP), productos terminados (PT), aguas y operarios. Sin embargo, en muchas de las muestras recolectadas en el agar cetrimide (específico para *Pseudomonas aeruginosa*), se evidencia la presencia de colonias no específicas de aspecto blanco lechoso. Debido a la naturaleza de crecimiento de estas colonias, se llega a la conclusión de que puede ser el complejo *B. cepacia* ya que comparte similitudes morfológicas con *P. aeruginosa* y tiene sentido que se desarrolle en este agar.

Las bacterias Bcc pueden adaptarse a las condiciones estresantes que caracterizan el entorno pulmonar de la fibrosis quística, lo que las hace prácticamente imposible de erradicar, lo que conduce a resultados impredecibles y variables, que van desde la portación asintomática hasta un deterioro rápido y a veces inesperado del estado del paciente, que culmina en una neumonía necrotizante mortal [2].

Por esta razón, se decidió establecer un protocolo para la identificación y prevención del complejo *B. cepacia* en muestras de producto en proceso (PP), producto terminado (PT), aguas, tuberías de acero inoxidable y mangueras de transferencia en las instalaciones de la empresa COMERCIALIZADORA CBD S.A.S

1.1 Antecedentes

En la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, se llevó a cabo un proyecto titulado “estudio de los factores asociados a la presencia del complejo *B. cepacia* en el sistema de tratamiento de agua utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos” [4], en el cual se realizó una revisión sistemática en diferentes bases de datos sobre los factores asociados a la persistencia y virulencia del complejo *B. cepacia* en esta industria y los métodos diagnósticos que permiten su identificación. Así, hasta el año 2022 no se habían reportado retiros de productos en Colombia por contaminación con este patógeno. Por el contrario, en Estados Unidos a esa fecha se identificaron 109 retiros de productos por contaminación con esta bacteria.

En la universidad de pamplona, en territorio colombiano, se hizo un estudio [5] el cual tenía como objetivo verificar la capacidad de detección del método analítico microbiológico de la Farmacopea Estadounidense (USP-NF): detección del complejo *B. cepacia* UFC/g o mL, en productos no estériles, el cual establece los siguientes pasos:

- **Preparación de muestras y pre-incubación.**

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

- **Selección y Subcultivo.**

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

- **Interpretación.**

La posible presencia del complejo de *B. cepacia* está indicada por el crecimiento de colonias de color marrón verdoso con halos amarillos o colonias blancas, rodeado por una zona rosa-roja en BCSA. Cualquier crecimiento en BCSA se confirma mediante pruebas de identificación.

El producto cumple con la prueba si no existen colonias de los tipos descritos o si las pruebas de identificación confirmatorias son negativas.

- **Resultados.**

El resultado será expresado como Negativo o Positivo para el complejo *B. cepacia* UFC/g o mL.

Dicho proyecto tuvo como conclusión que el método de la Farmacopea estadounidense Formulario Nacional (USP-NF) para la detección del Complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) demostró un buen desempeño respecto los parámetros de sensibilidad, límite de detección y especificidad/selectividad en la detección de *Bcc* en cosméticos y medicamentos no estériles [5].

El complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) se ha convertido en un patógeno oportunista importante que genera una creciente preocupación en los productos farmacéuticos y cosméticos. Por esto, algunos investigadores han desarrollado métodos para su identificación de manera rápida. Por ejemplo, se implementó un sistema automatizado para la detección rápida del Bcc en productos cosméticos, denominado “Soleris® Next Generation” [6]. Este método es un sistema de análisis microbiano rápido diseñado para detectar los microorganismos objetivo en una variedad de matrices, incluidos alimentos, bebidas, cosméticos y artículos de tocador. El sistema se basa en la detección en tiempo real de cambios de color o fluorescencia en los medios de crecimiento debido al metabolismo microbiano.

Como conclusión, se demostró con éxito que el método automatizado Soleris es robusto, sensible y específico para la detección de Bcc en productos cosméticos. El método Soleris Bcc es fácil de usar. Muestra los resultados en tiempo real y genera el informe automáticamente. La implementación de este método para la detección de Bcc en cosméticos ahorraría mucho tiempo y recursos.

2 Justificación

Para la compañía Comercializadora CBD S.A.S. es de alta importancia saber cuándo hay presencia de los patógenos reportados en la USP [1] en pruebas microbiológicas. Según este documento, en ningún producto, materia prima, instrumentos, accesorios, equipos u operarios puede presentarse la existencia de estas bacterias u hongos ya que son perjudiciales para la salud de los consumidores. Por ejemplo, para la Organización Panamericana de la Salud [7], las enfermedades producidas por *Pseudomonas aeruginosa* se asocian principalmente a infecciones en la sangre, los pulmones, las vías urinarias y las heridas quirúrgicas. Para *Staphylococcus aureus* se asocian a infecciones de la piel y tejidos blandos, osteomielitis, neumonías adquiridas en el hospital y endocarditis.

El presente proyecto tiene como objetivo identificar la morfología del microorganismo no identificado en agar cetrimide para conocer si en la empresa hay presencia del Bcc debido al crecimiento de colonias que no se habían visto o determinado antes y establecer un protocolo para su prevención.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Establecer un protocolo para la identificación y prevención de Bcc en muestras de producto en proceso (PP), producto terminado (PT), aguas, tuberías de acero inoxidable y mangueras de transferencia en las instalaciones de la empresa COMERCIALIZADORA CBD S.A.S

3.2 Objetivos específicos

- Identificar Bcc de cultivos en agar BCSA usando suplemento selectivo de *B. cepacia* en los productos en proceso, productos terminados, mangueras de transferencia y tuberías de acero inoxidable.
- Identificación morfológica en microscopio de Bcc en los medios *B. cepacia* Selective Agar (BCSA) y Cetrimide Agar.
- Establecer un protocolo de desinfección para combatir Bcc en los distintos productos desarrollados por la empresa Comercializadora CBD S.A.S.

4 Marco teórico

La industria cosmética produce sustancias o formulaciones destinadas a ser puestas en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano o con los dientes y mucosas bucales con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, ayudar a modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado, corregir los olores corporales o atenuar o prevenir deficiencias o alteraciones en el funcionamiento de la piel sana [8].

En Colombia, se ha presentado un crecimiento notable en la industria de cosméticos, destacándose como uno de los países líderes en consumo per cápita en productos de belleza en América Latina. Este fenómeno ha impulsado la producción local y las ventas internas, posicionando a esta industria en aproximadamente \$30.4 billones en 2022, un aumento significativo del 9.5% en comparación con el año anterior [9].

La empresa COMERCIALIZADORA CBD S.A.S. es la encargada de fabricar los productos como bronceadores, mantequillas corporales, exfoliantes e hidratantes, exfoliantes corporales y capilares, cremas autobronceadoras y fotoprotectores, gel de aloe vera, regenerador de almendras, loción de oro, biomascarilla capilar, shampoos de cebolla, con cannabis de variedad argán y romero, acondicionadores de ceramidas y con aceite de cannabis, tónicos capilares, aceites faciales, tónicos despigmentantes, cremas antienvjecimiento, contorno de ojos, serum de vitamina c, tónico de rosas, depilador instantáneo, perfumes para el cabello, aceite reparador de puntas, entre otros; de las marcas D'luchi, Kaba, la receta CBD y OMG.

Desde el área de calidad, se hacen ensayos físico-químicos de los productos en proceso y posteriormente microbiológicos para conocer si hay presencia o ausencia de diferentes patógenos establecidos por la USP en farmacéuticos y cosméticos [1].

Las Buenas prácticas de Manufactura o (BPM) son un conjunto de principios básicos cuyo objetivo es garantizar que los productos se fabriquen en condiciones sanitarias adecuadas y se disminuyan los riesgos inherentes en la producción y distribución [10].

La United States Pharmacopeia (USP) es la documentación por la cual los laboratorios fabricantes de farmacéuticos y cosméticos se rigen para tener toda su normativa en orden, por lo cual, en ella están plasmados los protocolos para la identificación de patógenos que se deben analizar en los productos fabricados por medio de resultados de ausencia o presencia de ellos con agares selectivos para cada especie de microorganismo. Los patógenos buscados son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, hongos como *Aspergillus brasiliensis* y microorganismos mesófilos aerobios totales [1].

En la empresa Comercializadora CBD S.A.S., se hacen ensayos microbiológicos de presencia/ausencia para los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, hongos, levaduras y aerobios totales en los agares selectivos para cada especie como Agar Manitol, Cetrimide, Colinstant, Sabouraud Dextrosa y TSA respectivamente.

Cuando hay crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimide, las colonias son blancas, lechosas y fluorescentes. Por lo tanto, un resultado diferente se procede a reportarlo como una respuesta no específica. *P. aeruginosa*, está presente en el suelo y el agua en todo el planeta. Estas bacterias crecen en áreas húmedas, tales como fregaderos, lavabos, piscinas inadecuadamente cloradas y jacuzzis, y en soluciones antisépticas caducadas o inactivadas. En ocasiones, estas bacterias están presentes en las axilas y área genital de las personas sanas [11]; otro microorganismo reportado capaz de crecer en agar Cetrimide es *B. cepacia*. *B. cepacia*, fue catalogado anteriormente en el género de *Pseudomonas*, pero con el pasar de los años se establecieron diferencias entre estas dos bacterias. Por esta razón el objetivo del presente trabajo es identificar el microorganismo no específico que aparece en el Cetrimide, el cual podría pertenecer al Bcc.

Para la Sociedad Chilena de infectología, *B. cepacia* son bacterias Gram negativas, catalogadas como patógenos oportunistas, con una amplia distribución ambiental. En el extranjero este complejo ha sido reportado como uno de los más frecuentes contaminantes de productos farmacéuticos estériles y no estériles, especialmente los de contenido acuoso [12].

Estas bacterias crecen en medios habituales y en medios selectivos/diferenciales. Generalmente a las 24 horas de incubación se pueden observar colonias, pero en algunos casos se puede necesitar hasta 3 días de incubación. Las colonias son lisas, levemente solevantadas y, generalmente de aspecto mucoso. Todas las especies crecen entre 30 y 37°C [13].

Según la FDA [14], *B. cepacia* es una bacteria que se encuentra en el suelo y el agua. Esta bacteria es peligrosa porque a menudo es resistente a los antibióticos regulares. La bacteria representa una seria amenaza para aquellos que ya han comprometido el sistema inmunológico y los bebés que aún no han desarrollado un sistema inmunitario completamente funcional.

Bcc está formado por 22 especies conocidas como patógenos oportunistas en personas inmunocomprometidas, especialmente en aquellas con fibrosis quística. También se aíslan de infecciones nosocomiales y son difíciles de erradicar debido a su capacidad intrínseca para resistir una gran variedad de antibióticos. En general, estas especies presentan genomas de gran tamaño (hasta 9 Mpb) divididos en 2-5 replicones [15]. Esta característica aporta una gran versatilidad metabólica, que se considera importante para habitar el suelo, el agua, las plantas, incluso los nódulos en leguminosas. Algunas especies del Bcc exhiben actividades benéficas, como biorremediación, biocontrol y promoción del crecimiento vegetal. No obstante, debido a su papel en infecciones de humanos, su uso en la agricultura está restringido. Bcc es un tema constante de estudio debido a su impacto en el sector salud y su potencial en la agricultura [15].

B. cepacia puede causar cuadros clínicos como infecciones respiratorias, infección de heridas o del tracto urinario; además, muestra resistencia pronunciada a varios antibióticos. Por ejemplo, se ha descrito la resistencia a los aminoglucósidos, la polimixina B y las fluoroquinolonas [16].

Según la página de abogados Ged Lawyers [14] se registran algunos brotes graves de infecciones por *B. cepacia*. A continuación, se presentan algunos casos:

- En 2016, las jeringas salinas precargadas contaminadas con la bacteria provocaron un brote multietatal de infecciones, enfermando a 163 personas y matando a 7.

- Los productos de docusato líquido PharmaTech estuvieron vinculados a dos brotes diferentes en años consecutivos. Un bebé murió después de tomar el suavizante de heces. Hubo 63 casos conocidos de infección en un lapso de dos años.
- En diciembre de 2020, la FDA emitió el retiro del producto de piel tópico, Regenecare HA Hydrogel debido a la contaminación con *B. cepacia*.

Para alcanzar los objetivos previamente plasmados en el presente trabajo, se usó el *B. cepacia* Selective Agar o BCSA y el suplemento selectivo para *B. cepacia*. Los componentes de este medio facilitan el crecimiento adecuado y óptimo del Bcc, inhibiendo el crecimiento de otras bacterias, gracias a su formulación [17]. El agar para utilizar en este proyecto será de la marca Merck y está compuesto por agar, cristal violeta, lactosa, rojo fenol, cloruro sódico y sacarosa.

Los suplementos de *B. cepacia* que contienen gentamicina, polimixina B y vancomicina se utilizan comúnmente en medios de cultivo selectivos para el aislamiento y la identificación de esta bacteria [18].

- **Gentamicina:** Es un antibiótico aminoglucósido que inhibe la síntesis proteica en bacterias sensibles. Se añade al medio para inhibir el crecimiento de bacterias gramnegativas que podrían competir con *B. cepacia* en el cultivo. *B. cepacia* es intrínsecamente resistente a muchos antibióticos, incluidos los aminoglucósidos, pero en concentraciones bajas, la gentamicina puede suprimir el crecimiento de contaminantes gramnegativos sin afectar significativamente a *B. cepacia* [19].
- **Polimixina B:** Es un antibiótico péptido cíclico que afecta la membrana celular de bacterias gramnegativas sensibles. Se agrega al medio para suprimir el crecimiento de bacterias gramnegativas que no son inhibidas por la gentamicina, proporcionando así una mayor selectividad para *B. cepacia* [20].
- **Vancomicina:** Es un antibiótico glicopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular en bacterias grampositivas. Aunque no afecta directamente a *B. cepacia* (que es gramnegativa), se incluye en el medio para inhibir el crecimiento de posibles contaminantes grampositivos que podrían estar presentes en la muestra [21].

Para evitar la propagación del Bcc y demás patógenos que pueden presentarse en los productos cosméticos se propone el establecimiento de un protocolo de desinfección para minimizar o controlar la aparición de este microorganismo. Algunos de los desinfectantes son bacteriostáticos, no corrosivos y amigables con el producto para evitar su degradación [22]. Tales desinfectantes son:

1. **Sani-Tyzer** es un producto de uso industrial a base de amonio cuaternario; es eficaz tanto sobre las bacterias Gram positivas como las Gram negativas, incluyendo *Pseudomonas*; puede ser usado en superficies tales como acero inoxidable, vidrio, plástico, aluminio, y en general toda superficie dura, no porosa y resistente al agua.

2. **Clean by Peroxy** es un novedoso limpiador biocida, cuya formulación incluye una combinación única de tensoactivos de última tecnología y peróxido de hidrógeno. No contiene compuestos peligrosos como alcoholes, glicol éteres, cáusticos, amoníaco, ni cloro. También, reacciona con las bacterias inactivándolas y neutralizando los olores molestos causados por compuestos que contienen amoníaco o sulfuros.

3. **Biospar 50** es un moderno desinfectante / bacteriostático, formulado con polímeros catiónicos de amplio espectro bactericida y rápida acción. El modo de acción biocida “no específico” de Biospar 50 sobre las bacterias, evita que se genere algún tipo de resistencia en estos microorganismos. No es corrosivo, ni inflamable, asimismo, tiene actividad esporicida, sobre varias cepas de bacilos formadores de esporas tales como: *subtilis*, *cereus*, *megaterium*, *lichenformis* y *pumilus*.

4. **SANITYZER POW**, es un producto desinfectante en polvo con amonios cuaternarios de tercera generación para eliminar bacterias, hongos, virus y malos olores; es un producto de eficacia comprobada contra bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En la compañía, los sanitizantes, especialmente los dos primeros, se utilizan para procesos de desinfección de áreas y se alternan cada dos semanas para evitar que las bacterias se adapten a un solo tipo. En el presente trabajo, se propone el uso diario de un nebulizador desinfectante para esparcir estas sustancias, incrementando así el área de contacto y garantizando una mayor desinfección. Además, se recomienda limpiar los equipos utilizados durante toda la semana con

el desinfectante, en lugar de hacerlo solo con alcohol al final de esta. Asimismo, se sugiere añadir Biospar 50 para realizar dosis de choque cada tres meses, lo que permitirá limpiezas más profundas de máquinas envasadoras, marmitas, mangueras de transferencia y tanques de almacenamiento que estén en contacto con los productos y el agua. Paralelamente, se puede agregar SANITYZER POW en polvo, a los ductos de aire, para que se esparza a través de la ventilación y combata cualquier bacteria presente en el ambiente.

5 Metodología

Identificación morfológica y muestreo:

En la primera fase de este proyecto, se hizo una identificación morfológica del microorganismo no específico que creció en el agar cetrímide. Para su identificación parcial se realizaron tinciones de Gram, con el fin de verificar si las colonias reportadas como no específicas eran Gram negativas como el caso de Bcc

Posteriormente, se tomaron muestras de diferentes lugares de la empresa y se realizaron repiques en el medio de cultivo BCSA para evaluar el crecimiento y morfología del microorganismo.

El proceso para tener el agar BCSA de Merck listo para su uso, es primero diluir el agar que viene en polvo desde su fabricación como dicen las instrucciones, luego, llevarlo a ebullición para ponerlo a esterilizar por 15 minutos a 121°C y finalmente, cuando estuviera a 50°C y asépticamente, adicionarle el contenido de un vial del suplemento selectivo para *B. cepacia*. Así pues, se sirve el BCSA con suplemento en las cajas de Petri para poder repicar por agotamiento e incubar las muestras de 1 a 3 días a una temperatura óptima de crecimiento de entre 30°C a 35°C para poder evidenciar la presencia de este patógeno.

El muestreo se hizo de la siguiente manera:

- Productos en proceso (PP): se recolectó una muestra en un frasco schott esterilizado de las marmitas o de las canecas en las que se almacenan los productos antes de ser envasados.
- Productos terminados (PT): se recolectó una muestra del producto envasado.
- Mangueras de transferencia: Se hizo frotis de las mangueras con un isopo y agua peptonada.
- Tuberías de acero inoxidable: Se hizo frotis de las mangueras con un isopo y agua peptonada.

- Operarios: Se tomaron dos muestras de los operarios del área de producción, unos de las manos y otros de los uniformes, de igual manera haciendo frotis con isopo y agua peptonada.
- Aguas: Se recolectaron muestras de los 3 puntos de agua desionizada en fabricación en frascos schott esterilizados.

Cultivo e identificación de *B. cepacia*:

La siembra inicial para aguas y productos se llevó a cabo añadiendo a un frasco schott esterilizado 5 gramos de la muestra recolectada y 45 gramos de TSB. De esta mezcla resultante, se tomó un mililitro y se añade a una caja Petri esterilizada para hacer la siembra por profundidad o por inmersión con TSA, esto con el fin de verificar la presencia o ausencia de organismos mesófilos aerobios totales y su recuento. La siembra en caldo se dejó en incubación por 24 horas a 30°C para proseguir con el repique en los agares mencionados anteriormente para patógenos. En operarios, mangueras y tuberías donde solo se hizo frotis, se repicó inmediatamente en todos los agares. Las cajas se dejaron incubando por 24 horas a 30°C.

Adicionalmente, se propone un protocolo de desinfección para evitar la propagación del Bcc. Este protocolo consiste en el uso de 3 sanitizantes, Sani-Tyzer, Clean by peroxy y Biospar 50, los cuales se dispensarán por medio de un nebulizador desinfectante. De igual manera, se debe usar al mismo tiempo el sanitizante en polvo Sanityzer pow para aplicar en los ductos de ventilación y conseguir mayores áreas de contacto para garantizar una mejor limpieza y desinfección en la planta.

6 Resultados

A continuación, se presentan los resultados más relevantes del proyecto. Como se muestra en la figura 1, están las 4 primeras muestras de productos a los que se les hizo el proceso inicial con tinción de Gram para establecer si había presencia de Bcc. Estas muestras tuvieron resultados de crecimiento de colonias no específicas en agar cetrimide, selectivo para *P. aeruginosa*.

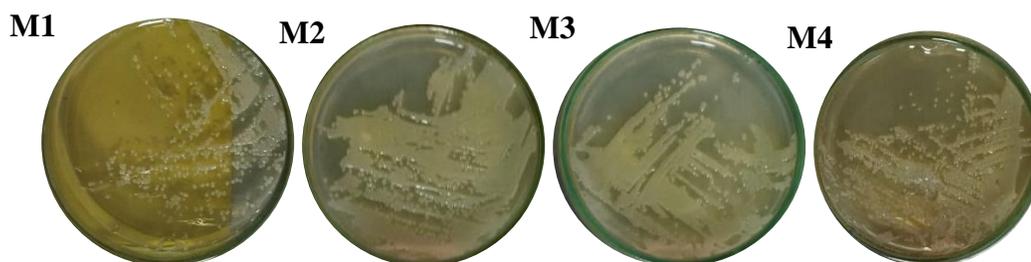


Figura 1. Muestras con posible presencia de Bcc en agar cetrimide. **M1:** punto de muestreo de agua #3 en planta de fabricación; **M2:** biomascarilla capilar (PP); **M3:** biomascarilla capilar (PT); **M4:** punto de muestreo de agua #2 en planta de fabricación.

En la figura 2, se muestran los resultados de la tinción de Gram lo que podría indicar la presencia de Bcc en el agar cetrimide.

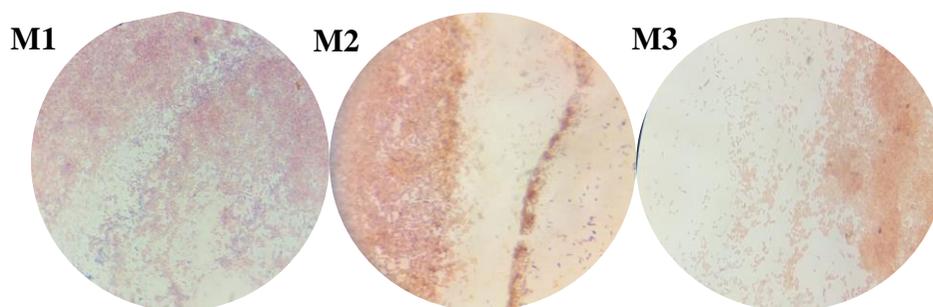


Figura 2. Tinción de Gram realizada a muestras con posible evidencia de Bcc con objetivo de 40x. **M1:** biomascarilla capilar (PT); **M2:** punto de muestreo #3 de agua en la planta de fabricación; **M3:** biomascarilla capilar (PP).

Luego de haber establecido la posible presencia de este patógeno en las primeras muestras, se procedió a realizar ensayos con BCSA y comprobar su presencia en este medio de cultivo. La figura 3, muestra el medio BCSA sin la presencia de Bcc.



Figura 3. Medio BCSA sin presencia de Bcc.

Inicialmente, los primeros ensayos que se hicieron en el agar BCSA con el suplemento selectivo para *B. cepacia* se muestran en la figura 4, donde se presume la presencia de Bcc. Las colonias se observan planas y blancas con halo rosado o halo amarillo.

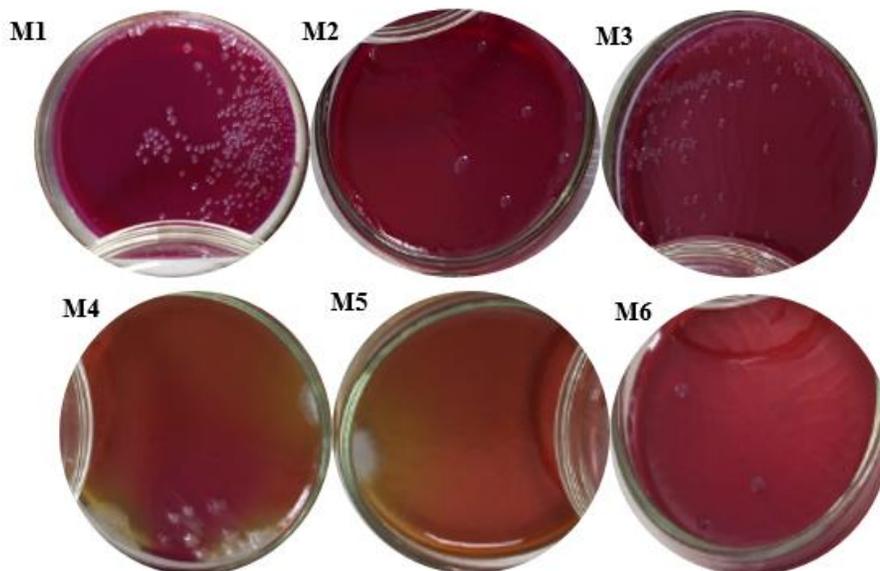


Figura 4. Muestras de la empresa COMERCIALIZADORA CBD S.A.S. con presencia de Bcc. **M1:** bronceador de zanahoria y canela (PT); **M2:** punto de muestreo #2 de agua en la planta de fabricación; **M3:** punto de muestreo #3 de agua en la planta de fabricación; **M4:** biomascarilla capilar (PT); **M5:** biomascarilla capilar (PT); **M6:** tónico capilar kaba (PT).

Luego, se hicieron más ensayos para afianzar la presencia de Bcc, que se evidencian en la figura 5; en esta ocasión también crecieron colonias en los uniformes, manos de los operarios y en frotis realizado a utensilios de cocina.

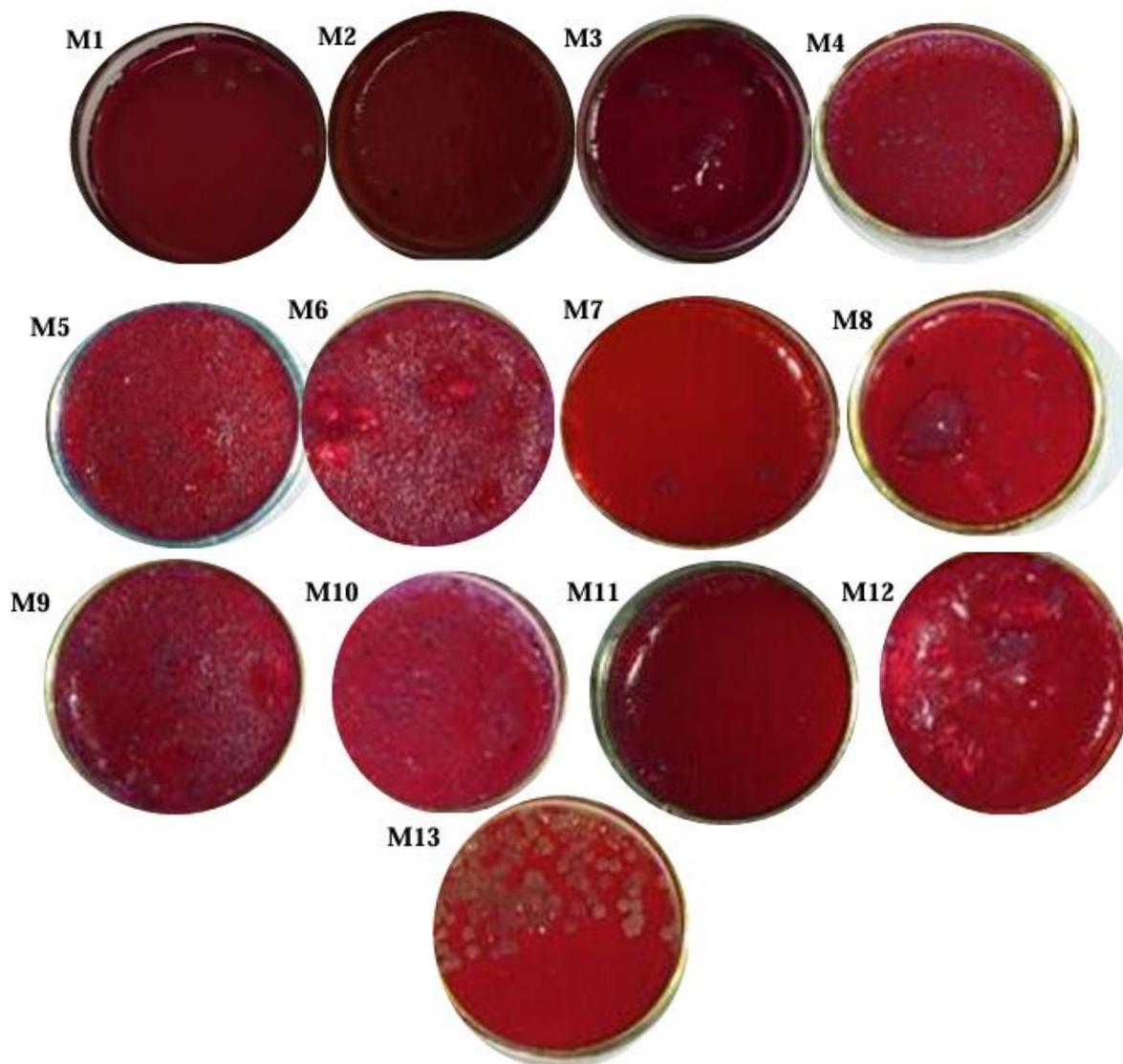


Figura 5. Muestras finales con presencia de Bcc. **M1:** biomascarilla capilar (PT); **M2:** biomascarilla capilar (PT); **M3:** uniforme operario 1; **M4:** plato; **M5:** vaso; **M6:** manos operario 2; **M7:** manos operario 3; **M8:** uniforme operario 1; **M9:** manos operario 4; **M10:** uniforme operario 2; **M11:** manos operario 5; **M12:** punto de muestreo de agua #3 de la planta de producción; **M13:** punto de muestreo #2 de la planta de fabricación.

Finalmente, para poder corroborar que había presencia de Bcc se procede a hacer una identificación morfológica de algunas de las muestras detectadas mencionadas anteriormente mediante tinción de Gram. En la figura 6, se logra evidenciar bacilos teñidos de color rosa lo que posiblemente comprueba la hipótesis de la presencia de Bcc.

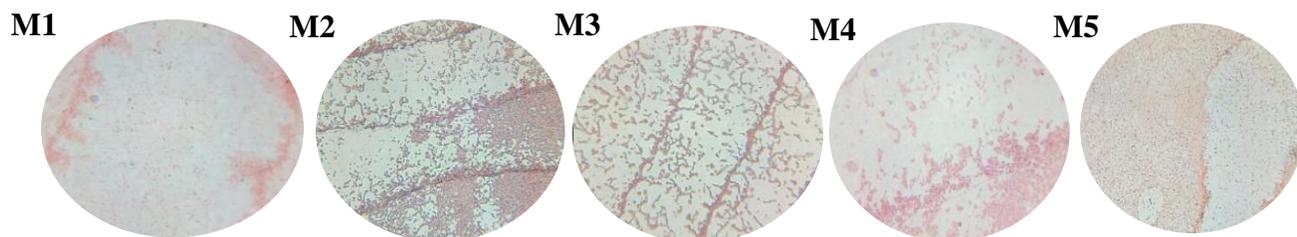


Figura 6. Identificación morfológica realizada con tinción de gram, (bacilos gram negativos) en un microscopio con objetivo de 40x. **M1:** shampoo de romero (PP); **M2:** biomascarilla capilar (PT); **M3:** biomascarilla capilar (PT); **M4:** shampoo de romero (PP); **M5:** biomascarilla capilar (PT).

7 Discusión

La contaminación por Bcc de productos de gran consumo es una preocupación creciente por el riesgo que supone para la salud pública. Como patógenos oportunistas, el Bcc afecta especialmente a pacientes con fibrosis quística (FQ) causando infecciones de las vías respiratorias que en muchos casos tienen consecuencias fatales [23].

Además, en todo el mundo se han notificado numerosos casos de infecciones nosocomiales asociadas al uso de productos contaminados con estas bacterias en pacientes sin FQ [23].

Independientemente de la frecuente presencia de Bcc en productos industriales (especialmente farmacéuticos) y su impacto en la salud pública, la mayoría de las codificaciones farmacéuticas no tienen en cuenta la búsqueda específica de estas bacterias [23]. Por lo tanto, como no se incluyen los métodos anteriormente mencionados para la detección de Bcc en el documento por el que se rigen las industrias cosméticas que es la farmacopea [1], se desarrolló un plan para la posible identificación de Bcc basado en bibliografía recolectada de anteriores investigaciones.

La presencia de Bcc en la empresa Comercializadora CDB S.A.S. se debe a la falta de protocolos adecuados y efectivos de limpieza y desinfección en las áreas y equipos utilizados para la producción de cosméticos de las marcas manufacturadas en el lugar. Además, puede estar relacionada con el mal lavado de manos de los operarios o de su uniforme, con materias primas que no han sido manipuladas correctamente por los proveedores o con fuentes de agua de la planta de producción que podrían estar contaminadas, incluyendo las tuberías y mangueras.

La biomascarilla capilar fue el producto más contaminado con Bcc, debido a que en su formulación incluye componentes como papaya, aguacate y extractos naturales que promueven el crecimiento de microorganismos. Además, este tipo de formulaciones requiere el uso de grandes cantidades de agua, lo cual también favorece el desarrollo de este complejo patógeno.

En la empresa, se pudo comprobar que posiblemente la cepa no específica que crece en los agares haga parte del Bcc. Por tal motivo, se deben hacer controles más seguidos del proceso de limpieza y desinfección de manos y uniformes de los operarios, áreas e instrumentos de la planta de producción y las fuentes de agua para evitar la contaminación de productos y materias primas. Asimismo, para evitar la formación de biopelículas formadas posiblemente por Bcc en los equipos de trabajo se debe capacitar en protocolos de limpieza al personal que se encarga de esta área.

8 conclusiones

- Se llevó a cabo una identificación morfológica preliminar del complejo patógeno *B. cepacia* mediante tinción de Gram bajo microscopio en varias muestras extraídas de la empresa Comercializadora CBD S.A.S. Sin embargo, para una identificación precisa, se requieren pruebas adicionales bioquímicas y/o moleculares
- Se identificó la posible presencia de Bcc en el agar selectivo para *B. cepacia* (BCSA) en la empresa Comercializadora CBD S.A.S. en los productos en proceso, producto terminado, aguas, en manos y uniformes de operarios y en accesorios para transporte
- Se propuso el establecimiento de un protocolo de limpieza y desinfección óptimo para la prevención de la aparición de los diferentes patógenos analizados en la empresa incluido Bcc.
- Hubo muchas muestras de frotis realizados a manos de operarios en los cuales había Bcc y esto se debe a que no usan debidamente el alcohol o los sanitizantes que provee la empresa o no lavan sus manos como se muestra en los protocolos de lavado.

Referencias

1. The United States pharmacopeia (2018). Rockville, MD: the United States Pharmacopeial Convention.
2. Tavares, M., Kozak, M., Balola, A., & Sá-Correia, I. (2020). Burkholderia cepacia Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00139-19>
3. Microorganismos en los cosméticos: ¿Puede su maquillaje enfermarlo? (n.d.). *Food & Feed Analysis*. <https://food.r-biopharm.com/es/news/microorganismos-en-los-cosmeticos-puede-su-maquillaje-enfermarlo/>
4. Andrea, S. R. P. (2022, October 1). 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. Disponible en: <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/6545>
5. Carolina, G. R. A. (2022). Verificación del método analítico microbiológico USP-NF: detección del complejo burkholderia cepacia UFC/G o ML, en productos no estériles. Disponible en: <http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/handle/20.500.12744/3578>
6. Zhang, L., Tolan, J., Lavigne, N., Montei, C., Donofrio, R., & Biswas, P. (2022). Soleris® Automated System for the Rapid Detection of Burkholderia cepacia Complex in Cosmetic Products. *Journal of AOAC International*, 106(1), 171–178. Disponible en : <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac109>
7. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. (2021, March 4). OPS/OMS | Organización Panamericana De La Salud. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
8. Cosmética. (n.d.). Disponible en: <https://guiaquimica.mx/industria/5/cosmetica#:~:text=La%20industria%20cosm%C3%A9tica%20produce%20sustancias,mantenerlos%20en%20buen%20estado%2C%20>

9. Panorama de la industria de belleza y cuidado personal en Colombia. (2024, January 2). Esenttia S.A. Disponible en: <https://www.esenttia.co/blog/panorama-de-la-industria-de-cosmeticos-en-colombia/>
10. Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). (n.d.). Disponible en; <https://www.intedya.com/internacional/103/consultoria-buenas-practic-as-de-manufactura-bpm.html>
11. Bush, L. M. (2023, September 21). Infecciones por Pseudomonas. Manual MSD Versión Para Público General. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-pseudomonas>
12. ¿Qué es y cómo estudiar el complejo Burkholderia cepacia? – SOCHINF. (n.d.). Disponible en: <https://sochinf.cl/que-es-y-como-estudiar-el-complejo-burkholderia-cepacia-2/>
13. Ormaechea, D. E., & Ormaechea, D. E. (2024, May 31). ¿En qué consiste la tinción de Gram? Blogs MAPFRE. Disponible en: <https://www.salud.mapfre.es/pruebas-diagnostic-as/otras-pruebas-diagnostic-as/tincion-de-gram/>
14. Ged Lawyers, LLP Attorneys At Law. (2023, December 14). Demanda por contaminación de Burkholderia Cepacia. Ged Lawyers, LLP Attorneys at Law. Disponible en: <https://www.gedlawyers.com/espanol/areas-de-practica/abogados-de-responsabilidad-del-producto/demanda-por-contaminacion-de-burkholderia-cepacia/>
15. Rojas-Rojas, F. U., López-Sánchez, D., Meza-Radilla, G., Méndez-Canarios, A., Ibarra, J. A., & Santos, P. E. L. (2019). El controvertido complejo Burkholderia cepacia, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. Revista Argentina Microbiología/Revista Argentina De Microbiología, 51(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>
16. Burkholderia cepacia - Importancia en endoscopia. (n.d.). <https://infectionprevention.olympus.com/es-es/evidencia-cientifica/microorganismos/burkholderia-cepacia>
17. Burkholderia cepacia Selective Agar suitable for microbiology, NutriSelect® Prime | Sigma-Aldrich. (n.d.). Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/product/sial/39573>.

18. Suplemento selectivo para *Burkholderia cepacia* Formato 10 Vials. (n.d.). Condalab. Disponible en: <https://www.condalab.com/int/es/suplementos/1620-15329-suplemento-selectivo-para-burkholderia-cepacia.html>
19. Holmes, R. K., Minshew, B. H., Gould, K., & Sanford, J. P. (1974). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin and Related Aminoglycoside Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6(3), 253–262. <https://doi.org/10.1128/aac.6.3.253>.
20. Chung, J., Bhat, A., Kim, C., Yong, D., & Ryu, C. (2016). Combination therapy with polymyxin B and netropsin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep28168>.
21. Okano, A., Isley, N. A., & Boger, D. L. (2017). Total syntheses of Vancomycin-Related glycopeptide antibiotics and key analogues. *Chemical Reviews*, 117(18), 11952–11993. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00820>.
22. Línea institucional – Spartan Colombia. (n.d.). <https://www.spartancolombia.com/linea-institucional/>
23. De Volder, A. L., Teves, S., Isasmendi, A., Pinheiro, J. L., Ibarra, L., Breglia, N., Herrera, T., Vazquez, M., Hernandez, C., & Degrossi, J. (2020). Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from industrial processes and contaminated products in Argentina. *International Microbiology*, 24(2), 157–167. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00151-z>.