

Microbiological control of parenteral dosage forms

Controlo microbiológico de formulações farmacêuticas parentéricas

**Catarina P Reis¹; Nuno Ramalheite¹; A.Barbosa¹; R. Bito¹; A.Candeias²; J.Gonçalves¹; A.Pinheiro¹,
F.Teixeira¹ & Manuel Fitas²**

CBIOS – Research Center for Health Science and Technologies, Universidade Lusófona, Campo Grande, 376,
1749-024, Lisboa, Portugal

¹LNBN - Laboratory of Nanoscience and Biomedical Nanotechnology

² UDE - Experimental Dermatology Unit (UDE)

Email: catarina.reis@ulusofona.pt

Abstract

The microbiological control of injectable forms aims to ensure that the product does not contain any microorganisms that may be pathogenic or induce pathological symptoms after administration. Thus, the study of techniques that allow the elimination and prevention of microorganisms is extremely important. In this field, there are classic techniques that are used to evaluate certain drugs, and novel techniques are currently under development. These new approaches have advantages over the previous ones since they have a higher level of efficacy and accuracy. This review presents a simple description of the main techniques available (from the classic to the most recent) for microbiological control of parenteral dosage forms. It can be regarded as a useful practical tool for all professionals already working (or aiming to work) in this area.

Keywords: Sterility, Parenteral dosage forms, Quality Control, Microorganisms

Resumo

O controlo microbiológico de formulações injectáveis visa garantir a isenção de um produto farmacêutico em termos microorganismos, possivelmente patogénicos, que possam induzir sintomas patológicos após a sua administração. Assim, o estudo das técnicas que permitam a eliminação de agentes patogénicos e a sua prevenção é de extrema importância. Nesta área são utilizadas diversas técnicas clássicas para avaliar determinados medicamentos e estão a ser desenvolvidas outras novas técnicas. Estas últimas revelam-se mais vantajosas comparativamente às clássicas uma vez que apresentam maior eficácia e rigor. Este artigo de revisão apresenta uma descrição simples das principais técnicas disponíveis (clássicas e as mais recentes) para o controlo microbiológico de medicamentos injectáveis podendo ser visto como uma ferramenta prática útil para os profissionais que trabalham ou poderão vir a trabalhar nesta área.

Palavras-chave: Esterilidade, Formas Injectáveis, Controlo de Qualidade, Microorganismos

Introduction

The parenteral administration is a high risk contamination route for public health that may lead to disease and death. For this reason, the pharmaceutical products that are mainly injectable have to be sterilized and kept in this condition from conception to administration ^[1]. Thus, both the adoption of extreme security measures during the “life cycle” of the injectable solution and laboratory techniques that are capable of analyzing and verifying the state of these solutions when it comes to the presence or absence of microorganisms become crucial.

The sterilization process may be defined as a process of complete destruction or removal of viable microorganisms and is achieved through physical processes or by using chemical agents. As stated before, there are multiple methods and the choice should be based on the resistance capacity of the formulation. However to be sure that a product or material is sterilized even after being submitted to a sterilization process, the absence of viable microorganisms needs to be verified by microbiological control. As the absolute sterilization of a product cannot be guaranteed due to the high amount of variables that this product is subject to, a pharmaceutical product is considered sterile when the probability of survival of viable microorganisms is in the order of 10^{-6} ^[2,3].

The development of sterile preparations requires special care in order to minimize the risk of microbiological contamination. The microbiological control must be performed in clean rooms in laminar air flow cabinets ^[2,3]. In the pharmaceutical industry there are multiple sources of microbiological contamination such as raw materials, equipment and instruments, the actual production process, packaging recipients, the production environment, the staff, etc. Therefore, when a microbial contamination occurs it is possible to quantify it and to detect and identify the number and type of microorganisms present through standard methods. These microbial control methods are based on inoculation, in an appropriate culture environment, incubation and isolation of the microorganisms from pharmaceutical samples (raw materials or final products), with results after 14 incubation days or more ^[1-3].

Due to the lack of sensibility, reproduction, precision and resolution of these methods, new techniques that are more efficient in microbiological control have appeared – examples of these technologies are the ATP–Bioluminescent, API galleries, direct growth system, flow cytometry, viable direct counting, PCR, and others. These can be used to complement the conventional methods due to their suitable characteristics for microbial control, and therefore result in a better discrimination between the different

Introdução

A entrada de microrganismos por administração parentérica é fonte de grandes riscos para a saúde pública, levando ao aparecimento de patologias ou até mesmo à morte. Desta forma, os produtos farmacêuticos, nomeadamente, os injectáveis, têm de ser estéreis e manter-se desta forma desde a sua concepção até à sua administração ^[1]. Assim, torna-se crucial a adopção de medidas de segurança extremas durante o “ciclo de vida” do injectável e de técnicas laboratoriais capazes de analisar e verificar o estado dos mesmos, quanto à presença ou ausência de microrganismos.

A esterilização pode ser definida como o processo de destruição completa ou remoção de microrganismos viáveis, podendo ser realizada ou por processos físicos ou por um agente químico. Assim, existem diversos métodos de esterilização sendo a sua escolha realizada de acordo com a capacidade da formulação resistir ao tratamento que lhe irá ser aplicado. Contudo, para garantirmos que um produto ou material é estéril, é necessário verificar a ausência de microrganismos viáveis, procedendo-se à realização do controlo microbiológico. Como a esterilidade absoluta de um produto não pode ser garantida, um produto farmacêutico é considerado estéril quando a probabilidade de sobrevivência dos microrganismos viáveis está na ordem dos 10^{-6} ^[2,3].

A produção de preparações estéreis necessita de cuidados especiais de forma a minimizar os riscos de contaminação microbiológica. Para tal, o controlo microbiológico tem de ser feito em salas limpas e em câmaras de fluxo laminar ^[2,3].

Na indústria farmacêutica existem diversas fontes de contaminação microbiológica, como sendo, as matérias-primas, equipamentos e instrumentos, o próprio processo de produção, os recipientes de acondicionamento, o ambiente de produção, o pessoal técnico, entre outras. Assim, quando existe contaminação microbiana de produtos farmacêuticos é possível quantificar, detectar e identificar o número e tipo de microrganismos presentes através de métodos *standard*, ou seja, métodos usados frequentemente (ou clássicos). Estes métodos de controlo microbiológico são baseados na inoculação, num meio de cultura apropriado, incubação e isolamento dos microrganismos a partir de amostras farmacêuticas (matérias-primas ou produtos finais), obtendo-se os resultados normalmente em 14 dias ou mais ^[1-3].

Surgiram, devido à falta de sensibilidade, reprodutibilidade, precisão e resolução destes métodos, novas técnicas que se consideram mais eficazes para o controlo microbiológico – exemplos destas são a ATP-Bioluminescência, as galerias API, o sistema de crescimento directo, a técnica imunoenzimática, a

microbial species.

More detailed information about pharmaceutical environments can lead to optimization of processes that aim at minimizing the distribution, viability, growth and microbial proliferation^[1,3].

Microbiological Control

Pharmaceutical environments are also exposed to microorganisms from air, water, staff, materials and instruments that are present at the different installations where pharmaceutical products are produced and tested. Information about the distribution, survival, growth and reproduction of microorganisms in pharmaceutical environments can lead to optimizing the control of microbiological contaminations in these places^[1,3].

Validation of the sterilization process

The sterilization process is based on and validated in a range of samples and experimental protocols which should demonstrate that the sterilization process and the associated controls can be reproduced, are consistent and trustworthy so that the final product can be designated as a sterile product. Therefore, at least 3 production bulk samples are used for validation,^[3,4]

The biological indicators used for validation of the sterilization process enables us to prove that lethal sterilizing conditions were achieved during the process. These indicators are standard preparation of bacterial spores with higher resistance in comparison to the vegetative form. Thus, if the sterilizing process destroys the spores, other sources/structures of the microorganism will not survive either. In sterilization, the D value is used to measure the microbial destruction rate. This value is the time needed to reduce by 90%, the number of viable microorganisms^[2-4].

Sterility Standard methods

Sterility tests are performed on injectable solutions that have already been submitted to a sterilization process previously validated. For this, we can use one out of four methodologies – to change the optimal pH of the preservative agent, to create a diluted solution in which

citometria de fluxo, a contagem viável directa, o PCR, entre outras. Estas podem ser usadas para complementar os métodos clássicos devido às suas características aliciantes para um melhor controlo microbiológico.

Uma informação mais detalhada acerca dos microrganismos presentes em ambientes farmacêuticos pode levar à optimização de processos que visam minimizar a distribuição, viabilidade, crescimento e proliferação microbiana^[1,3].

O Controlo Microbiológico

Os ambientes farmacêuticos estão também expostos a microrganismos que podem ser provenientes do ar, água, pessoal, materiais e instrumentos introduzidos nas diferentes instalações onde os produtos farmacêuticos são produzidos e testados. Informações sobre a distribuição, sobrevivência, crescimento e reprodução dos microrganismos poderão conduzir à optimização do controlo das contaminações microbianas em ambientes farmacêuticos^[1,3].

Validação do Processo de Esterilização

A esterilização é validada, com base numa série de ensaios e protocolos experimentais, que devem demonstrar que o processo de esterilização e os controlos associados são reprodutíveis, consistentes e confiáveis, para que o produto final possa ser designado por estéril. Assim, para a validação são usados, no mínimo, 3 lotes de produção^[3,4].

Os indicadores biológicos permitem evidenciar que as condições letais de esterilização foram alcançadas durante a esterilização. Tratam-se de preparações *standard* de esporos bacterianos resistentes, cuja utilização é devida ao facto de serem as estruturas bacterianas com maior resistência. Assim, se os esporos forem destruídos pelo processo de esterilização, podemos garantir que ocorreu o mesmo a todas as outras estruturas. Na esterilização, o valor D é usado para medir a taxa de destruição microbiana. Este valor representa o tempo necessário, em condições específicas, para reduzir 90% o número de microrganismos viáveis^[2-4].

Testes de Esterilidade *Standard*

Antes de se iniciar estes testes, é necessário eliminar agentes conservantes que o produto farmacêutico possa conter para não surgirem falsos negativos. Para tal, pode-se usar uma das quatro metodologias: alterar o pH ótimo do agente conservante, realizar diluições para que este não

this agent is not at an efficient concentration level, to filtrate or to add a chemical agent that will complex the preservative agent. However, there may be some false negatives as a result of the use of an inappropriate environment, attenuation due to the UV light, or due to the reduced size of the inoculum. There is also the possibility that false positives occur due to accidental contamination during the test.^[2,3]

To perform any of these tests, different culture medium are used. The FTM (*Fluid Thioglycollate Medium*) and the SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*) enable the detection of anaerobic bacteria, yeast and aerobic yeast. Later, the SCDB method (*Soy Casein Digest Broth*) replaced the SDB in the detection of aerobic bacteria. The current procedures require incubation at 20-25°C in order to detect fungus and yeast or at 37°C, in the case of bacteria^[1-3].

There are two standard methods that are frequently used to determine the sterility of an injectable solution. First, the method of direct seeding and second, the filtration method. The **Direct Seeding Method** is based on the direct transfer of a part of or the full testing sample to the sampling environment. The volume of the sample to be added to the sampling environment varies, but should be an average of 10% of the volume of the sampling environment. Then, samples are observed in order to determine the presence or absence of microbiological growth which is revealed by the turbidity of the medium. In some cases this turbidity can develop immediately after the addition of the sample. Therefore one should use a plaque or a fresh liquid medium as an alternative. The **Method of Filtration by a Membrane** allows for the use of higher quantities of the sample. The sample of the pharmaceutical product is then filtered through a sterile membrane filter (polymeric type) of 0,2 µm porosity in order to guarantee the bacteria retention. After the filtration the filter is washed to remove residual product and any external contaminations. In some cases it is necessary, when possible, to use a tensioactive agent. The **Millipore System** is also a filtration method that has the presence of vacuum that increases the filtration speed of large sample volumes (simultaneous filtration of various solutions)^[1-3].

Fast Methods for Pharmaceutical Analysis

Although they are frequently used, the standard sterility tests are time-consuming. So, there are technologies that provide a quantitative and qualitative fast analysis of microorganisms present in a specific

esteja numa concentração em que seja eficaz, realizar-se uma filtração ou adicionar um agente complexante que irá precipitar o conservante. Falsos negativos podem também resultar do uso de um meio inadequado ou condições de cultura inapropriadas, por atenuação resultante da luz UV, devido ao reduzido tamanho do inóculo, entre outros. Também existe a possibilidade de aparecimento de resultados falsos positivos devido a contaminação accidental durante o teste^[2,3].

Para realizar qualquer um destes testes, recorre-se à utilização de diferentes meios de cultura. Os meios Tioglicolato (FTM- *Fluid Thioglycollate Medium*) e SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*) permitem a detecção de bactérias anaeróbias, leveduras e leveduras aeróbias. Mais tarde, o meio SCDB (*Soy Casein Digest Broth*) veio substituir o SDB, sendo este utilizado para detecção de bactérias aeróbias, leveduras e fungos. Os procedimentos actuais requerem a incubação a 20-25°C para detectar fungos e leveduras ou a 37°C, no caso de bactérias^[1-3].

Existem dois métodos *standard* frequentemente utilizados para determinar a esterilidade de um injectável, sendo estes o método da sementeira directa e o método da filtração. O **Método da Sementeira Directa** baseia-se na transferência directa da amostra ou apenas de uma alíquota para o meio de cultura, sendo que este volume deverá ser correspondente até 10% do volume do meio. As amostras são depois observadas para determinar a presença ou ausência de crescimento microbiano, o que é indicado pela turbidez do meio. Em alguns casos, a turbidez é desenvolvida imediatamente após a adição da amostra pelo que se deve usar em alternativa uma placa ou um meio liquido fresco. O **Método da Filtração por Membrana** apresenta a grande vantagem de permitir analisar maiores quantidades de amostra. A amostra do produto farmacêutico é filtrada através de um filtro de membrana estéril (do tipo polimérico), de porosidade igual a 0,2µm, de modo a garantir a adsorção das bactérias. Após a filtração, o filtro é lavado, para tirar resíduos de produto e possíveis contaminações externas e inoculado. Por vezes, torna-se necessário, quando possível, hidrolisar as membranas de filtração com um agente tensioactivo. O **Sistema Millipore** é também um método de filtração através de vácuo que permite maior rapidez de filtração para grandes volumes de amostras (filtração simultânea de várias soluções)^[1-3].

Métodos Rápidos para Análise Farmacêutica

Os testes de esterilidade *standard*, apesar de serem muito utilizados, são também muito morosos. Assim, foram desenvolvidas tecnologias que providenciam uma análise quantitativa ou qualitativa rápida dos

pharmaceutical sample. However, the validation and implementation of these methods has not yet been widely adopted by the industry^[1,3].

Fast methods have proved to be sensitive, robust and exact. A faster detection of the microbiological contamination allows a faster implementation of corrective actions resulting in a minimization of loss and in an optimization of risk evaluation^[1,4]. Listed below are further methods that present some utility in the process of microbiological control of injectable drugs. The **Method of Direct Count of Viable Colonies** allows microbial cells to be counted using epifluorescence microscopes. The samples are filtered and the bacteria are then dyed. The different dyes used are specific to different types of cellular metabolic reactions. However, this method requires time and does not allow for a fast analysis of multiple samples simultaneously^[1,6]. The **Flow Cytometry** allows for fast counting. The Chemchome B dye reacts with an esterase present in the cellules of the microorganisms, and the microbial cells with an intact cellular wall store the fluorescent by-product. The bacteria are then counted using a detection instrument with a laser. One of the applications of the flow cytometry in the pharmaceutical industry is for the counting of the biological indicator, making this process much faster. Consequently this reduces waiting times and provides a more accurate value of the lethality and sterility of the process^[1,4]. The **PCR Technology** is used to amplify the DNA that contains all the genetic information responsible for the genotypic and phenotypic development potential of the microbiological cells. This way, this technique allows for the amplification of specific sequences of this nucleic acid and therefore the identification of the microorganisms containing it. This technique has been used to monitor water in the pharmaceutical industry. Recently, a simultaneous detection of bacteria and DNA molds was carried out on pharmaceutical samples using a gradient thermal cyler^[1,6]. The **Genetic Identification** method is useful for characterizing microorganisms types by gender and strain. This method is based on the chemical and structural differences of membranes and cell walls of negative and positive Gram bacteria, presenting a superior guarantee and reproducibility when compared to lipidic and biochemical methods^[1,6]. A non-destructive quantitative analysis is achieved by the **Direct Growth System**. The samples are applied to the membranes and then placed in the growth media and incubated, obtaining the image with a CCD detector. Colonies are detected by autofluorescence of the microbial cell. This system allows for faster enumeration and identification of the microbial cells in comparison with traditional methods. This method also presents a large range of applications and is easily validated^[1]. The **Colorimetric Technique** is also used in the detection of microorganisms which

microorganismos presentes numa determinada amostra farmacêutica. No entanto, a validação e implementação destes novos métodos ainda não está a ser adoptada pela indústria de forma generalizada^[1,3].

Estes métodos mostraram-se sensíveis, robustos e exactos. Uma detecção mais rápida da contaminação microbiana permite uma implantação rápida de acções correctivas resultando numa minimização de perdas e numa optimização da avaliação de riscos^[1,4]. Enumeram-se de seguida mais alguns métodos que apresentam alguma utilidade no processo de controlo microbiológico de injectáveis. O **Método da Contagem Directa das Colónias Viáveis** permite a contagem das células microbianas usando microscopia de epifluorescência. As amostras são filtradas e as bactérias que ficam retidas no filtro são posteriormente coradas. Os corantes utilizados são específicos para diferentes tipos de reacções metabólicas celulares. Este método é muito moroso e não permite uma análise rápida de várias amostras em simultâneo^[1,6]. A **Citometria de Fluxo** permite a rápida contagem de microorganismos presentes na água para injectáveis. A coloração “*chemchrome B*” reage com uma esterase presente nas células dos microorganismos, sendo que as células microbianas com uma parede celular intacta retêm o derivado fluorescente. As bactérias são depois contadas, utilizando um instrumento de detecção com laser. Uma das aplicações da citometria de fluxo na indústria farmacêutica é a contagem de indicadores biológicos, tornando este processo mais rápido e aumentando a precisão da letalidade e esterilidade do processo^[1,4].

A **Tecnologia de PCR** baseia-se no facto de o DNA conter toda a informação genética responsável pelo desenvolvimento e potencial genotípico e fenotípico da célula microbiana. Assim, esta técnica permite a amplificação de sequências específicas deste ácido nucleico e, conseqüentemente, a identificação do microorganismo. Esta técnica tem sido usada na indústria farmacêutica, especialmente no controlo da água. Recentemente foi realizada a detecção simultânea de bactérias e moldes de DNA em amostras farmacêuticas, usando um termociclador de gradiente^[1,6]. O método da **Identificação Genética** é útil na caracterização dos tipos de microorganismos por género e estirpe. Este método baseia-se nas diferenças químicas e estruturais das membranas e paredes celulares de bactérias Gram negativas e Gram positivas, demonstrando uma maior garantia e reprodutibilidade em relação aos métodos lipídicos e bioquímicos^[1,6]. Uma análise quantitativa não destrutiva de amostras farmacêuticas é conseguida com o **Sistema de Crescimento Directo**. As amostras são aplicadas nas membranas, colocadas em meio de cultura e incubadas, obtendo-se a imagem recorrendo a um detector CCD. As colónias são detectadas através de autofluorescência das células microbianas. Este

are mainly aerobics, anaerobics, fungi and yeast and it is based on the CO₂ production. The microorganisms in a sampling environment release CO₂ and when this increases, the coloration on the container sensor becomes tenuous. Therefore, this technique allows for immediate detection by the naked eye which leads to faster results. This is a non-destructive technique that allows for detection even in turbid solutions, and it works at temperatures of between 10 and 30°C^[1,6]. The **ATP-bioluminescent Method** is based on the reaction between a luciferase-luciferin enzymatic complex with the ATP released by the microbial cells, in the presence of oxygen and magnesium, which results in light production. The quantity of light emitted is proportional to the quantity of ATP released and is measured by a luminometer. Multiple studies were conducted showing that this technique presents reproducibility, precision and linearity. It is a qualitative or quantitative technique, indicating the presence or absence of microorganisms in the pharmaceutical samples or values for the biomass of the samples, which enables more than 180 samples to be tested per day^[1]. The **Media Fill Tests (MFT)** are crucial tests when it comes to validating and controlling aseptic processes in the pharmaceutical industries. This consists of exposing the growth media to the same process that was applied to the injectable solution and later observing the medium turbidity. This method presents some difficulties. In particular it does not detect the presence of anaerobic bacteria which requires a high precision. However, considering this last limitation, the *BioMérieux* company developed two dehydrated growth media, one of which has a colour indicator that decreases the risk of error and simplifies the interpretation of results. This medium allows for the detection of some anaerobic bacteria. Therefore, when the solution has a red coloration, it means that it has no microorganisms. When it has a yellow coloration, it indicates microbiological contamination^[6,7].

According to the USP, these tests must be done annually when it comes to lower-medium risk solutions, and every 6 months for high-risk solutions. A positive result in this test could mean a greater need for control of the aseptic environment and not in a specific section of the production process^[6,7].

sistema, quando comparado com os métodos tradicionais, permite uma rápida contagem e identificação das células microbianas. Este método apresenta também uma vasta gama de aplicações e a sua validação é facilitada^[1]. A **Técnica Colorimétrica** permite a detecção de microrganismos aeróbios, anaeróbios, fungos e leveduras e tem por base a monitorização da produção de CO₂. Os microrganismos, num meio de cultura, libertam CO₂ e, à medida que aumenta a sua produção, a coloração do sensor torna-se mais ténue. Portanto, esta técnica permite uma detecção imediata a olho nú, conferindo resultados rápidos. É uma técnica não-destrutiva que permite a detecção, mesmo em soluções turvas, e tem a capacidade de funcionamento a temperaturas de 10-30°C^[1,6].

O **Método ATP-bioluminescência** baseia-se numa reacção entre um complexo enzimático luciferase-luciferina com o ATP libertado das células microbianas, na presença de oxigénio e magnésio, que resulta na produção de luz. A luz emitida é proporcional à quantidade de ATP libertada e é medida recorrendo a um luminómetro. Foram realizados estudos que demonstraram que esta técnica apresenta reprodutibilidade, precisão e linearidade. Trata-se de uma técnica qualitativa ou quantitativa, indicando a presença ou ausência de microrganismos nas amostras farmacêuticas ou valores para a biomassa das amostras, que nos permite testar mais de 180 amostras por dia^[1]. Os **Testes Media Fill (MFT)** são testes cruciais para a validação e controlo de processos assépticos nas indústrias farmacêuticas. Este processo consiste em sujeitar os meios de cultura a todo o processo a que o injectável 'e também sujeito, observando-se, posteriormente, a turbidez do meio. Este método apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, não detectar a presença de bactérias anaeróbias e de exigir uma elevada precisão. No entanto, tendo presente esta última limitação, a empresa *BioMérieux* desenvolveu dois meios de cultura desidratados, um dos quais contém um indicador de cor, diminuindo o risco de erro e simplificando a interpretação dos resultados. Este meio permite a detecção de bactérias, leveduras, fungos e também algumas bactérias anaeróbias. Assim, quando a solução apresenta uma coloração vermelha, significa que está isenta deste tipo de microrganismos, enquanto que, caso apresente uma coloração amarela, isto significa contaminação microbiológica^[6,7].

Estes testes, de acordo com a USP, devem realizar-se anualmente, para soluções de baixo-médio risco, e de 6 em 6 meses, para soluções de elevado risco. Um resultado positivo neste teste pode ser indicativo de uma maior necessidade de controlo do ambiente asséptico e não numa secção específica do processo de produção^[6,7].

Conclusion

The microbiological control of parenteral formulations has a great impact on public health, since a small error in the sterilization of the pharmaceutical product may turn out to be lethal. To prevent this it is necessary to check the effectiveness of the microorganism's elimination process. Currently, the industry has 2 classes of microbiological control methods: the standard methods and the rapid detection methods.

The pharmaceutical industry regularly uses standard methods for microbiological control. However, new complementary methods are being developed since standard methods do not allow for the full identification of microorganisms. Furthermore, there is a great need to speed up data acquisition and release of production. According to the available information, we can assume that these methods will not be entirely replaced, especially because they are simple and low in cost.

The most recent methods have many advantages, especially when it comes to reliability, precision, rapidity and security. Not only do they enable us to detect the contaminant microorganism, they also make quantification and identification possible. However, the absence of validation methods, the limited knowledge, the need of qualified people and the associated costs, make the widespread implementation of these methods in the industry slow.

The detection of microorganisms indicates that there is not an aseptic environment and it would be necessary to re-evaluate the working conditions and adopt preventive measures against future contaminations. It could also indicate that the raw materials, the material or the operator are the source of contamination.

Conflict of interests

The authors declare that there are no financial and personal relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interests.

References / Referências

- [1] Swarbrick J, Jimenez L, editors, Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry. 1st ed. Marcel Dekker, Inc. (New York); 2005.
- [2] Prista LN, Alves AC, Morgado R. Tecnologia Farmacêutica. 6th ed. Fundação Calouste Gulbenkian (Lisbon); 2002.
- [3] U.S. Food and drug administration. Inspection Guides [cited 2012 January 1]. In URL: <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/Inspection>

- Guides/ucm074914.html
- [4] Infarmed. Dispositivos médicos [cited 2011 December 27]. In URL: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/DISPOSITIVOS_MEDICOS/ORGANISMO_NOTIFICADO/RECOMENDACOES/REQUISITOS_ESTERILIZACAO_CALOR_HUMIDO
- [5] Denyer SP, Baird RM. Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices.

2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group (Boca Raton); 2006.

- [6] BioMérieux Portugal. [cited 2012 January 3] In URL: <http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/home>
- [7] Simmons H., Best practices for aseptic media-fill testing. Pharm Purchasing & Products, 2007; 2-5.

Conclusão

O controlo microbiológico para formulações parentéricas apresenta um grande impacto na saúde pública, na medida em que um pequeno erro que ocorra na esterilização de um produto farmacêutico pode ser fatal. Para que tal não aconteça, é necessária a verificação de que o processo de eliminação de microrganismos foi eficaz na sua totalidade. Actualmente, a indústria dispõe de 2 classes de métodos de controlo microbiológico, os métodos *standard* e os métodos de detecção rápida.

A indústria farmacêutica tem bastante presente no dia-a-dia os métodos *standard* usados no controlo microbiológico, no entanto, tem também sentido a necessidade de desenvolver novos métodos, não para substituir os existentes, mas para os complementar. Esta necessidade advém do facto dos métodos *standard* não permitirem a identificação completa dos microrganismos e da existência de uma enorme necessidade na rapidez de obtenção de resultados e dispensa de lotes. De acordo com a informação disponível no momento, podemos afirmar que aqueles métodos não serão substituídos na sua totalidade, uma vez que são bastante simples e apresentam baixo custo.

Os métodos mais recentes apresentam inúmeras vantagens, especialmente no que respeita ao nível de fiabilidade, precisão, rapidez e segurança, permitindo não só a detecção, mas também a quantificação e identificação do microorganismo contaminante. No entanto, a ausência de métodos de validação, o conhecimento pouco aprofundado, a necessidade de pessoal qualificado e os custos associados, tornam a implementação destes métodos na indústria mais morosa e não generalizada.

A detecção de microrganismos significa que, ou não estamos presentes num ambiente de assépsia e será necessário reavaliar as condições em que estamos a trabalhar e adoptar medidas preventivas de futuras contaminações, ou que as matérias-primas, o material ou o operador são a fonte de contaminação.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir qualquer relação pessoal ou financeira que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.