HAL
open science

Étude de la stabilité microbiologique de trois collyres renforcés en antibiotiques (Amikacine, Ceftazidime et Vancomycine)

Lucile Pinon

To cite this version:

Lucile Pinon. Étude de la stabilité microbiologique de trois collyres renforcés en antibiotiques (Amikacine, Ceftazidime et Vancomycine). Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03019637

HAL Id: dumas-03019637

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03019637

Submitted on 23 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université de BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020 Thèse n°.58

THESE D'EXERCICE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Lucile PINON

Né(e) le 18/10/1993 à Poitiers (86)

Le 15/06/2020

ETUDE DE LA STABILITE MICROBIOLOGIQUE DE TROIS COLLYRES RENFORCES EN ANTIBIOTIQUES (AMIKACINE, CEFTAZIDIME ET VANCOMYCINE)

Sous la direction de : Monsieur le Docteur Arnaud Venet

Membres du jury :

Madame le Professeur Sylvie CRAUSTE-MANCIET	Présidente
Monsieur le Docteur Arnaud VENET	Directeur
Monsieur le Professeur Antoine DUPUIS	Jury
Madame le Docteur Hélène BOULESTREAU	Jury
Madame le Docteur Bérangère DESSANE	Jury

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

A madame la Professeur Sylvie Crauste-Manciet,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je suis heureuse et particulièrement fière d'avoir pu apprendre à vos côtés. Que ce travail soit pour moi l'occasion de vous assurer de mes remerciements les plus sincères et de ma profonde considération.

A monsieur le Professeur Antoine Dupuis,

Merci d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse et de juger ce travail. Je vous remercie également pour votre formation très enrichissante au cours de mes études à la faculté de pharmacie de Poitiers.

A madame le Docteur Hélène Boulestreau,

Je vous remercie d'avoir aussi spontanément accepté de faire partie de ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A madame le Docteur Bérangère Dessane,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail ainsi que pour toute l'aide que tu m'as apportée notamment lors de la partie expérimentale de ce projet.

A monsieur le Docteur Arnaud Venet,

Je te remercie pour ton encadrement et tes nombreux conseils tant pour ce projet que tout au long de ma formation. J'ai énormément apprécié travailler à tes côtés et j'ai beaucoup appris avec toi. Merci pour ta gentillesse, ton professionnalisme et toute l'aide que tu m'as apportée. Je te suis reconnaissante d'avoir accepté de diriger ce travail.

A toutes les équipes avec lesquelles j'ai travaillé

A l'équipe de la PUI de Pellegrin,

Pharmaciens, préparateurs, magasiniers, secrétaire sans oublier notre très précieuse technicienne de laboratoire, Laurence. J'ai eu la chance de travailler à vos côtés pendant un an et demi et je vous en remercie. Je n'oublierai pas cette année passée au préparatoire au côté de Charlotte (meilleure co-interne que l'on puisse avoir), Magali, Laurence et notre chouette brochette d'externes. J'ai énormément apprécié travailler à vos côtés et ce fut toujours dans la joie et la bonne humeur. Je tiens particulier à remercier les préparateurs de technie sans qui je n'aurai rien eu à analyser pour ce projet et Laurence pour tout ce que tu m'as appris au cours de cette année ainsi que pour l'aide et le soutien que tu m'as apportés dans ce projet.

A l'équipe du CRPV du CHU de Limoges,

Hélène, Claire, Anne, Muriel, Marie-Laure, Marie-Pierre et surtout, mes petits dinosaures, Sophie, Soline et JB sans qui ce semestre n'aurait pas été le même. Je garde un excellent souvenir de ces 6 mois à Limoges et notamment de nos (très) nombreux goûters.

A l'équipe de la PUI de Saint André,

Aux pharmaciens et à toute l'équipe des préparateurs sans oublier mon super co-interne de l'époque, Sacha. Je vous remercie pour ce semestre passé ensemble.

A l'équipe de la stérilisation de Pellegrin,

Merci à Mr Marque et à Alice de m'avoir initié au monde de la stérilisation et de m'avoir donné l'envie d'y retourner. C'était un plaisir de travailler avec vous.

A l'équipe de la pharmacie de Libourne,

Merci aux pharmaciens, préparateurs, magasiniers et secrétaires pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre bonne humeur. Vous avez rendu ce semestre à Libourne très agréable. Je tiens à remercier particulièrement Marie-Amélie et Solène pour m'avoir fait découvrir et apprécier l'univers des dispositifs médicaux. Merci également à Chloé, ma co-interne, c'était vraiment sympa d'avoir quelqu'un dans le même bateau et d'avoir pu se soutenir dans nos rédactions de thèses. Tu vois on aura fini par réussir à l'écrire cette thèse.

A l'équipe de la PDMS,

Merci de m'accueillir parmi vous pour mon dernier semestre d'internat.

A mes amis et co-internes,

A mes pharmach'

Mathilde et Charlotte, merci pour toutes ces belles années d'amitié. Vous avez transformé ces premières années d'études en éclats de rire et en complicité. A tous nos voyages, nos week-ends et tous ceux à venir.

A mes morues,

A Charlotte, il y aurait tant de choses à dire sur ces 4 dernières années … Merci pour cette belle amitié, pour ton soutien et ton énergie positive inépuisable. Je te remercie également pour tes conseils et ton aide précieuse dans ce projet. A tous ces bons moments passés ensemble et à tous ceux à venir : à notre semestre à l'internat de Limoges, à notre duo de co-internes au préparatoire (et à nos pauses thés), à nos vacances passées ensembles (de Majorque à la Réunion en passant par le ski) et toutes ces soirées …

A Maïté, merci d'être toujours présente et merci pour ta bonne humeur. Tu as été une super partenaire « de galère » et ces dernières années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Tu es toujours partante (même quand on te propose un aller – retour à Limoges juste pour une soirée) et cela a contribué à rendre ces dernières années inoubliables. Merci également pour ton aide apportée dans ce projet (tes petites bactéries m'auront bien servi).

A Hélène, tout a commencé le premier jour de mon internat quand tu m'as ouvert la porte. Merci pour ta gentillesse, ta douceur et pour toutes ces soirées « traquenards »

A Marine, pour tous ces moments partagés depuis notre arrivée à Bordeaux, et tous ceux à venir.

A tous ses co-internes qui sont devenus des amis : Marine, Thibault, Micka, Thomas, Kévin, Jérémy, Nico, Solène, Sacha, Jean, Julie, Jeanne, Guillaume, And-Nan …

A mes piou-pious, Marie-Sophie, Alexandra, Alexiane, Amélie, Clémence, Romain … merci pour votre bonne humeur et d'accepter de sortir avec des « vieux ». Profitez, ça passe trop vite et ça sera bientôt vous les anciens.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin à rendre ces années inoubliables et ont transformé cet internat en formidable aventure professionnelle mais surtout, en formidable aventure humaine !

A ma famille,

A mes parents,

Cette thèse est une belle occasion de vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi. Merci de votre soutien permanent, d'avoir toujours été présents pour moi et de m'avoir permis de réaliser mes études dans les meilleures conditions possibles. Je suis fière de l'éducation que j'ai reçue et je vous suis reconnaissante d'avoir contribué à faire de moi celle que je suis, avec mes qualités et mes défauts. Ce travail vous est dédié.

A Guillaume,

Mon petit frère, qui m'a supporté autant de temps et qui devra encore me supporter. A moins que ce ne soit l'inverse ?

A mes grands-parents,

Merci pour cette enfance heureuse à vos côtés et pour votre bienveillance si rassurante. Je n'oublierai pas les précieux moments passés ensemble.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines,

Merci pour toutes ses belles années passées à vos côtés, toutes ces vacances pleines de rires, ces petits moments de bonheurs partagés.

Et enfin, à Maxime,

Merci d'être présent tous les jours à mes côtés. Merci pour ta compréhension, ta patience et ton soutien inconditionnel tant dans l'écriture de cette thèse qu'au quotidien. Une page se tourne mais le livre reste ouvert pour les beaux projets que nous accomplirons ensembles.

A tous ces moments passés en famille, qui sont de loin les plus précieux …

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES **7**

ABREVIATIONS **11**

INDEX DES FIGURES **12**

INDEX DES TABLEAUX **13**

TABLE DES ANNEXES **17**

INTRODUCTION **18**

PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE **20**

I. ANATOMIE DE L'ŒIL **20**

A. LES TUNIQUES 20
1. La tunique externe : la membrane fibreuse *20*
2. La tunique médiane : la membrane vasculaire *21*
3. La tunique interne : la membrane nerveuse *22*
B. LES MILIEUX TRANSPARENTS 22
1. L'humeur aqueuse *22*
2. Le cristallin *22*
3. Le corps vitré *23*

II. PATHOLOGIE OCULAIRE : LA KERATITE BACTERIENNE **23**

A. GERMES IMPLIQUES 23
B. FACTEURS DE RISQUE 27
C. PHYSIOPATHOLOGIE 27
D. SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE 28
E. DIAGNOSTIC 29
1. Diagnostic clinique *29*
a) Interrogatoire 30
b) Examen biomicroscopique 30
2. Diagnostic microbiologique *31*
F. STRATEGIE THERAPEUTIQUE 32
1. Traitement médical *32*
2. Traitement chirurgical *34*
G. EVOLUTION 34
H. PRONOSTIC 35

III. PREPARATIONS DESTINEES A LA VOIE OPHTALMIQUE **35**

A. DEFINITIONS 35
B. CRITERES DE QUALITE DES COLLYRES 36
1. Stérilité *36*
2. Limpidité *38*
3. Isotonie *38*
4. pH *38*
5. Viscosité *39*

IV. PRESENTATION DE L'AMIKACINE, CEFTAZIDIME ET VANCOMYCINE **39**

A. AMIKACINE 39
1. Structure *39*
2. Mécanisme d'action *40*
3. Spectre d'activité *40*

B. CEFTAZIDIME 41
1. Structure 41
2. Mécanisme d'action 41
3. Spectre d'activité 41
C. VANCOMYCINE 42
1. Structure 42
2. Mécanisme d'action 42
3. Spectre d'activité 42

V. PRINCIPE DE LA CONGELATION - DECONGELATION 43

A. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA CONGELATION 43
B. CHOIX DE LA METHODE DE DECONGELATION 43

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE 45

I. OBJECTIFS 45

II. MATERIELS ET METHODES 45

A. PROCEDE DE FABRICATION DES COLLYRES 45
1. Formulation 45
a) Principes actifs 48
b) Véhicules 48
c) Excipients 49
2. Conditionnement 50
3. Préparations et contrôles 54
a) Préparations 54
(1) Environnement de travail 54
(2) Protocole de fabrication 56
(a) Amikacine 57
(b) Ceftazidime 57
(c) Vancomycine 58
b) Contrôles 58
c) Stockage : congélation 60
4. Usage en vie réelle 60
B. ETUDE DE STABILITE PHYSICO-CHIMIQUE 61
1. Stabilité physique 61
a) Contrôle visuel : coloration, limpidité 61
b) pH 62
c) Osmolalité 62
2. Suivi de la concentration en principe actif 63
C. ETUDE DE STABILITE MICROBIOLOGIQUE 63
1. Sélection et reconstitution des souches microbiennes 64
2. Echantillonnage 64
3. Protocole 65
a) Essai de fertilité 65
b) Essai d'applicabilité de la méthode 67
c) Essai de stérilité 68

III. RESULTATS 70

A. AMIKACINE 70
1. Stabilité physique 70
a) pH 70
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 70
(2) Conditionnement Novelia® 71
b) Osmolalité 72
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 72
(2) Conditionnement Novelia® 74
c) Limpidité et coloration 76

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 76
(2) Conditionnement Novelia® 77
2. Suivi de la concentration en principe actif 77
3. Stabilité microbiologique 78
a) Essai de fertilité 78
b) Essai d'applicabilité de la méthode 79
c) Essai de stérilité 81
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 81
(2) Conditionnement Novelia® 82
4. Synthèse 83
B. CEFTAZIDIME 84
1. Stabilité physique 84
a) pH 84
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 84
(2) Conditionnement Novelia® 85
b) Osmolalité 86
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 86
(2) Conditionnement Novelia® 88
c) Limpidité et coloration 89
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 89
(2) Conditionnement Novelia® 90
2. Suivi de la concentration en principe actif 91
3. Stabilité microbiologique 92
a) Essai de fertilité 92
b) Essai d'applicabilité de la méthode 93
c) Essai de stérilité 95
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 95
(2) Conditionnement Novelia® 96
4. Synthèse 97
C. VANCOMYCINE 98
1. Stabilité physique 98
a) pH 98
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 98
(2) Conditionnement Novelia® 99
b) Osmolalité 100
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 100
(2) Conditionnement Novelia® 102
c) Limpidité et coloration 103
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 103
(2) Conditionnement Novelia® 105
2. Suivi de la concentration en principe actif 105
3. Stabilité microbiologique 106
a) Essai de fertilité 106
b) Essai d'applicabilité de la méthode 107
c) Essai de stérilité 111
(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité 111
(2) Conditionnement Novelia® 112
4. Synthèse 113

IV. DISCUSSION 114

A. FORMULATION 114
B. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION 114
C. CHOIX DE LA CONGELATION 115
D. ETUDE DE LA STABILITE 117
1. Stabilité physique 117
2. Stabilité microbiologique 119

CONCLUSION **120**
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **122**
ANNEXES **127**
SERMENT DE GALIEN **147**
RESUME **148**

ABREVIATIONS

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

BSS : Balanced Salt Solution

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DDL : Degré De Liberté

DEHP : DiEthylHexylPhtalate

GERPAC : Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée

HEPA : Haute Efficacité pour les Particules d'Air

HDPE : High Density PolyEthylene

IR : InfraRouge

ISO : International Organization for Standardization

IV : IntraVeineux

PEBD : PolyEthylène Basse Densité

PEHD : PolyEthylène Haute Densité

PLP : Protéine Liant la Pénicilline

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

PVC : PolyChlorure de Vinyle

SFPC : Société Française de Pharmacie Clinique

UFC : Unité Formant Colonie

UV : UltraViolet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Schéma anatomique de l'œil 20

Figure 2 : Histologie de la cornée 21

Figure 3 : Abcès à *Streptococcus pneumoniae* après un traumatisme cornéen 26

Figure 4 : Kératite à *Staphylococcus aureus* chez un porteur de lentilles de contact 26

Figure 5 : Abcès à *Pseudomonas aeruginosa* chez un porteur de lentilles de contact 26

Figure 6 : Structure moléculaire de l'amikacine 40

Figure 7 : Structure moléculaire de la ceftazidime 41

Figure 8 : Structure moléculaire de la vancomycine 42

Figure 9 : Système ABAK® de 3ème génération 51

Figure 10 : Système COMOD® 52

Figure 11 : Schéma du fonctionnement du dispositif Novelia adapté de la brochure des laboratoires Rexam 53

Figure 12 : Schéma du dispositif Novelia adapté de la brochure des laboratoires Rexam ... 53

Figure 13 : Osmomètre cryoscopique 63

Figure 14 : Dispositif de filtration sterisure membrane en esters de cellulose 0,45 µm 66

Figure 15 : Rampe de filtration à vide 3 postes en acier inoxydable 66

Figure 16 : Schéma de l'essai de stérilité 69

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Bactéries responsables de kératites bactériennes 25

Tableau 2 : Principaux critères de gravité d'une kératite bactérienne 29

Tableau 3 : Revue de la littérature des différentes formulations 46

Tableau 4 : Caractéristiques particulaires des différentes ZAC 55

Tableau 5 : Recommandations pour la surveillance microbiologique des ZAC en activité ... 55

Tableau 6 : Recommandations pour le choix de la ZAC pour la réalisation d'une préparation stérile pour un risque faible de contamination 56

Tableau 7 : Recommandations pour le choix de la ZAC pour la réalisation d'une préparation stérile pour un risque élevé de contamination 56

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différents prélèvements et essais réalisés lors de l'étude de stabilité 58

Tableau 9 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 70

Tableau 10 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 71

Tableau 11 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia® 71

Tableau 12 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia® 72

Tableau 13 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 73

Tableau 14 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 74

Tableau 15 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia® 75

Tableau 16 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia® 75

Tableau 17 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité 76

Tableau 18 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® 77

Tableau 19 : Résultats du suivi des concentrations en principe actif pour l'amikacine 5% .. 77

Tableau 20 : Résultats de l'essai de fertilité pour les collyres d'amikacine 5% 78

Tableau 21 : Résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres d'amikacine à 5% 80

Tableau 22 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à l'amikacine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité 81

Tableau 23 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à l'amikacine 5% conditionnés en flacons Novelia® 82

Tableau 24 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 84

Tableau 25 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité..... 85

Tableau 26 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia® 85

Tableau 27 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia® 86

Tableau 28 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 87

Tableau 29 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 87

Tableau 30 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia® 88

Tableau 31 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia® 89

Tableau 32 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité 90

Tableau 33 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons Novelia® 91

Tableau 34 : Résultats du suivi des concentrations en principe actif pour la ceftazidime 5% 91

Tableau 35 : Résultats de l'essai de fertilité pour les collyres de ceftazidime 5% 92

Tableau 36 : Résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres de ceftazidime à 5% 94

Tableau 37 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à la ceftazidime 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité 95

Tableau 38 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à la ceftazidime 5% conditionnés en flacons Novelia 96

Tableau 39 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 98

Tableau 40 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 99

Tableau 41 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia® 99

Tableau 42 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia® 100

Tableau 43 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 101

Tableau 44 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité 101

Tableau 45 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia® 102

Tableau 46 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia® 103

Tableau 47 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité..... 104

Tableau 48 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons Novelia® 105

Tableau 49 : Résultats du suivi des concentrations en principe actif pour la vancomycine 5% 105

Tableau 50 : Résultats de l'essai de fertilité pour les collyres de vancomycine 5% 106

Tableau 51 : Résultats de l’essai d’applicabilité de la méthode pour les collyres de vancomycine à 5% avec un volume de rinçage de 300mL 108

Tableau 52 : Résultats de l’essai d’applicabilité de la méthode pour les collyres de vancomycine à 5% avec un volume de rinçage de 1000mL 109

Tableau 53 : Résultats de l’essai de stérilité des collyres à la vancomycine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité..... 111

Tableau 54 : Résultats de l’essai de stérilité des collyres à la vancomycine 5% conditionnés en flacons Novelia® 112

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Procédure de fabrication des collyres à l'amiakcine à 50 mg/mL 127
Annexe 2 : Procédure de fabrication des collyres à la ceftazidime 50 mg/mL 128
Annexe 3 : Procédure de fabrication des collyres à la vancomycine 50 mg/mL 129
Annexe 4 : Fiche de contrôle des collyres à l'amikacine 50 mg/mL 130
Annexe 5 : Fiche de contrôle des collyres à la ceftazidime 50 mg/mL 131
Annexe 6 : Fiche de contrôle des collyres à la vancomycine 50 mg/mL 132
Annexe 7 : Schéma de la réalisation de l'essai de stabilité microbiologique 133
Annexe 8 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité 134
Annexe 9 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® 135
Annexe 10 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité 136
Annexe 11 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® 137
Annexe 12 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité 138
Annexe 13 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® 139
Annexe 14 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité 140
Annexe 15 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® 141
Annexe 16 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité 142
Annexe 17 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® 143
Annexe 18 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité 144
Annexe 19 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® 145
Annexe 20 : Notice d'utilisation d'un collyre de ceftazidime 50mg/mL à destination des patients 146

INTRODUCTION

La kératite bactérienne est une maladie infectieuse oculaire grave pouvant entraîner des troubles visuels importants comme une déficience visuelle, une opacité cornéenne, une endophtalmie ou, dans le pire des cas, une perte de vision.
La survenue d'une kératite bactérienne est rare en l'absence de facteurs prédisposants. Jusqu'à récemment, la plupart des cas de kératites bactériennes était associée à un traumatisme oculaire ou à des maladies de la surface oculaire.

Les principaux symptômes de cette pathologie sont une douleur locale, la diminution soudaine de l'acuité visuelle et la rougeur anormale de l'œil (1).
Les germes les plus souvent responsables sont (2) :

- Dans 70% des cas:
    - Gram +: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*
- Dans 30% des cas:
    - Gram -: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*
- Mycoses: plus rares.

Toutefois, la généralisation du port de lentilles de contact a considérablement augmenté l'incidence de la kératite. En effet, le port de lentilles de contact est le facteur de risque le plus important de survenue de kératites (3).

La kératite bactérienne est une urgence ophtalmologique et le traitement antibiotique doit être instauré sans délai pour éviter de graves dommages irréversibles à la cornée. Ainsi, le traitement sera mis en place avant même l'identification de la bactérie responsable car de telles procédures prennent du temps. Le traitement antibiotique local est basé sur des antibiotiques à fortes doses tels que l'amikacine, la ceftazidime, la gentamicine ou la vancomycine en fonction du germe suspecté. Une biopsie cornéenne doit être réalisée avant de débuter un traitement antibiotique et l'antibiothérapie sera ensuite adaptée lorsque les résultats microbiologiques seront disponibles (1,3).

Les préparations commerciales d'antibiotiques topiques sont suffisantes pour traiter la plupart des infections superficielles ou des cas bénins, mais elles s'avèrent trop faiblement dosées pour traiter rapidement et efficacement les traumatismes oculaires ou les infections graves ou encore les ulcères cornéens (4,5). C'est pourquoi, dans les cas sévères, des solutions ophtalmiques enrichies contenant une forte concentration en antibiotiques peuvent être nécessaires pour améliorer la pénétration oculaire ainsi que l'efficacité du traitement (2,3).

Comme celles-ci ne sont pas disponibles dans le commerce, une production hospitalière est requise pour la fabrication de ces collyres renforcés en antibiotiques à partir de solutions injectables disponibles dans le commerce. Ces collyres sont reconstitués extemporanément et leur prescription est faite de façon probabiliste après réalisation d'un prélèvement oculaire. Le traitement sera adapté après identification du germe et réalisation d'un antibiogramme (6).

Au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, la pharmacie à usage intérieur (PUI) produit à l'avance trois collyres renforcés en antibiotiques : la ceftazidime à 50 mg/ml, l'amikacine à 50 mg/ml et la vancomycine à 50 mg/ml.
En 2019, 1 240 collyres renforcés en antibiotiques ont été produits : 580 ceftazidime 5%, 300 amikacine 5% et 360 vancomycine 5%. Ces collyres sont ensuite conservés à + 4°C et ont une stabilité, avant ouverture, de 10 jours pour la ceftazidime 5% et d'un mois pour la vancomycine 5% et l'amikacine 5% (7–10).
En raison de leur stabilité assez courte, ces collyres sont produits chaque semaine. Afin de limiter les contraintes organisationnelles liées à une production très fréquente et de répondre sans délai aux urgences ophtalmologiques, une production en série et une congélation de ces collyres renforcés en antibiotiques sont envisagées afin de prolonger leur stabilité (8,9,11–15).

Des études précédemment menées ont démontré que des solutions ophtalmiques d'amikacine ou de ceftazidime à 5% dans du chlorure de sodium à 0,9% et de vancomycine à 5% dans du glucose à 5% étaient physiquement et chimiquement stables après conservation à -20°C pendant 190 jours (14,15).

L'objectif de cette étude est, dans un premier temps, de valider, au CHU de Bordeaux, la stabilité microbiologique de trois collyres renforcés en antibiotiques (amikacine 5%, ceftazidime 5% et vancomycine 5%) après 3 mois de congélation, selon les exigences de la Pharmacopée Européenne (2.6.1) et du guide sur les études de stabilité publié par le Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée (GERPAC) et la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC) (16,17).
Dans un deuxième temps, l'objectif est de comparer leur stabilité microbiologique dans 2 conditionnements multidoses différents : des flacons en PolyEthylène Haute Densité (PEHD) et des flacons munis du dispositif Novelia®.

PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE

I. Anatomie de l'œil

L'œil, ou globe oculaire, est une structure creuse de forme globalement sphérique. Il se compose de trois membranes ou tuniques : la sclérotique, la choroïde et la rétine ainsi que de trois milieux transparents : l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré.

Les membranes sont hétérogènes et opaques, à l'exception de la cornée, et se situent à la périphérie de l'œil. Tandis que les milieux transparents, qui sont eux homogènes, se localisent au centre de l'œil. Ces milieux transparents garantissent l'acheminement des rayons lumineux à l'écran rétinien (18).

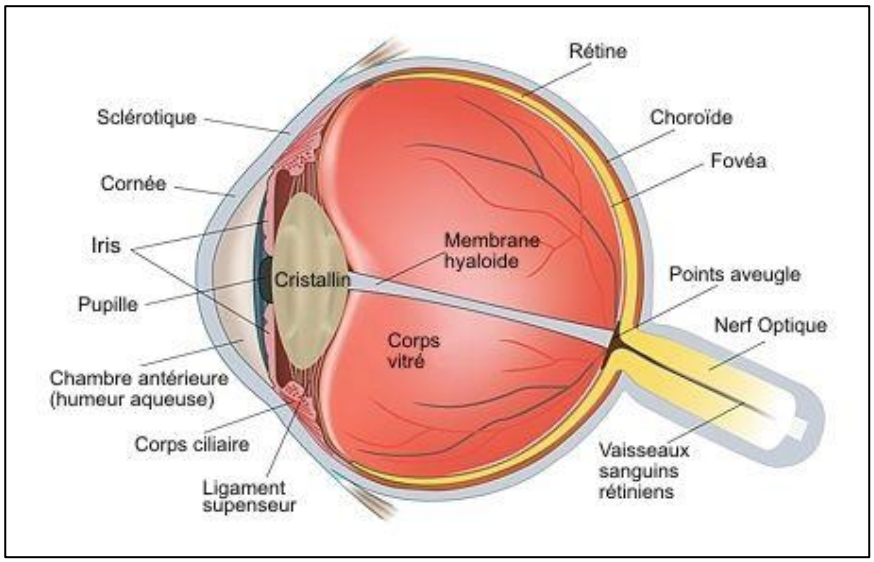


Figure 1 : Schéma anatomique de l'œil

A. Les tuniques

1. La tunique externe : la membrane fibreuse

La tunique externe se compose de la sclérotique, tissu conjonctif dense et peu vascularisé, qui forme ce que l'on appelle couramment "le blanc de l'œil". La sclérotique a un rôle de protection et est entourée d'une membrane très fine et transparente, appelée conjonctive, qui couvre la face interne des paupières et la portion antérieure de la sclérotique.

Du côté antérieur, cette sclérotique est remplacée par la cornée, membrane fibreuse et transparente qui permet l'entrée des rayons lumineux dans le globe oculaire. La cornée constitue la lentille principale du système optique oculaire et est composée de cinq couches différentes : l'épithélium cornéen, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium.

La frontière entre la cornée et la sclérotique est appelée le limbe, c'est une zone semi-transparente qui a la particularité d'adhérer à la conjonctive. Tandis que la cornée est avasculaire, le limbe est richement innervé et vascularisé (19).

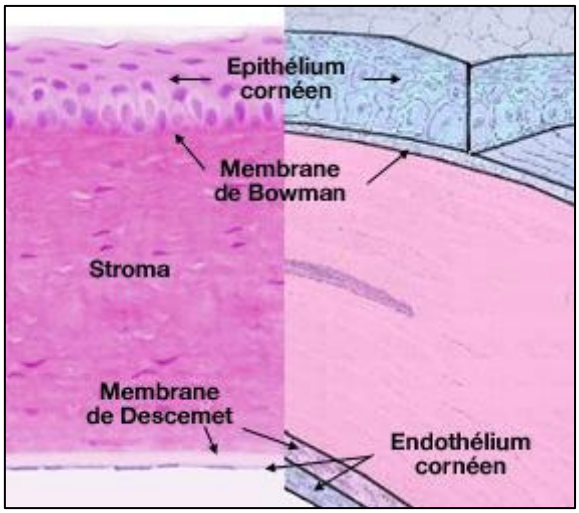


Figure 2 : Histologie de la cornée

2. <u>La tunique médiane : la membrane vasculaire</u>

La tunique vasculaire, aussi appelée uvéale, est formée de trois éléments : l'iris en avant, le corps ciliaire et la choroïde en arrière.

L'iris présente une structure pigmentée et correspond donc à la partie colorée de l'œil. Il est situé dans l'humeur aqueuse entre la cornée et le cristallin, séparant ainsi la chambre antérieure de la chambre postérieure de l'œil.

Le corps ciliaire est un anneau formé de muscles lisses qui maintiennent le cristallin et en modifient la forme permettant ainsi l'accommodation. Le corps ciliaire produit une substance liquide appelée humeur aqueuse.

La choroïde est une membrane vasculaire, de couleur noire, tapissant l'intérieur du globe. Elle est très vascularisée et constitue le tissu nourricier de l'œil en apportant l'oxygène et les nutriments dont les cellules ont besoin pour leur métabolisme (19).

3. La tunique interne : la membrane nerveuse

La tunique interne se compose de la rétine qui est formée de deux couches :

- La couche pigmentaire (externe) empêche la lumière de diffuser dans l'œil.
- La couche interne est une structure nerveuse composée de deux types de photorécepteurs : les cônes, responsables de la vision diurne, et les bâtonnets, responsables de la vision nocturne ainsi que de cellules traitant et acheminant l'information visuelle vers le cerveau (19).

B. Les milieux transparents

Ces tuniques renferment des milieux transparents, indispensables à la vision. Ces milieux transparents sont au nombre de trois et forment une lentille convergente (20).

1. L'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse est un liquide transparent qui remplit l'espace entre la cornée et le cristallin, liquide continuellement renouvelé et qui, avec le corps vitré, maintient la pression oculaire. S'il y a trop de pression oculaire, il y a une mauvaise irrigation sanguine de la pupille, le lieu d'émergence du nerf optique.

2. Le cristallin

Le cristallin est une capsule mince et élastique, composée de cellules anuclées et de fibres spécifiques, et est maintenu en place par une série de fibres amarrées au corps ciliaire, la zonule de Zinn. Il joue le rôle d'une lentille biconvexe et permet la mise au point par sa propriété essentielle qu'est sa plasticité qui lui permet de focaliser la lumière sur la rétine en modifiant ses courbures lors de l'accommodation. Le cristallin et son ligament suspenseur divisent le globe oculaire en deux chambres : la chambre antérieure remplie par l'humeur aqueuse, continuellement renouvelée et la chambre postérieure remplie par le corps vitré qui contribue à maintenir la pression intra-oculaire et ainsi la forme de l'œil.

Tout cet organe fonctionne comme une chambre noire et donne une image inversée de l'objet sur la surface sensible de la rétine, selon les lois de l'optique. L'œil est mobile et toute une gamme de muscles entre en action pour assurer ses déplacements.

3. Le corps vitré

Le corps vitré est une masse gélatineuse et transparente, contenant 99% d'eau et représentant 60% du volume oculaire. Le corps vitré maintient la rétine contre les parois de l'œil.

II. Pathologie oculaire : la kératite bactérienne

La kératite est une infection cornéenne qui doit être prise en charge sans délai car elle met directement en jeu le pronostic visuel, surtout si elle est dans l'axe optique.
Tout patient dont l'œil est rouge, douloureux, photophobe, larmoyant avec une vision abaissée doit bénéficier d'un examen ophtalmologique en urgence (21).

L'instillation d'un collyre à la fluoroscéine permet de caractériser les ulcérations de la cornée et ainsi de déterminer l'étiologie de la kératite. Ainsi, les kératites peuvent avoir plusieurs origines infectieuses : bactériennes, fongiques, virales ou parasitaires (22).

Nous nous intéresserons ici uniquement aux kératites d'origines bactériennes.

A. Germes impliqués

Un grand nombre de bactéries aérobies et anaérobies peuvent provoquer une infection de la cornée (tableau 1). Cependant, quatre groupes prédominent très largement puisqu'ils sont à l'origine de 90% des cas de kératites bactériennes : les staphylocoques, les streptocoques, les Pseudomonas et les entérobactéries (21,22).

Ainsi, les staphylocoques à coagulase négative sont les germes les plus fréquemment retrouvés dans les isolats oculaires et *Staphylococcus epidermidis* est le plus fréquent d'entre eux.

La kératite à Pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) fait suite à une contamination rétrograde par les voies lacrymales et est associée à une dacryocystite chronique. Sa fréquence a diminué mais elle reste une cause importante de kératites infectieuses dans les pays développés.

La survenue d'une kératite induite par des bacilles à gram négatifs (*Pseudomonas aeruginosa* ou Entérobactéries) est liée à un manque d'hygiène. Ces germes sont présents particulièrement dans les lésions cornéennes des porteurs de lentilles de contact, des patients hospitalisés, brûlés, ou sous assistance respiratoire. La kératite à *Pseudomonas aeruginosa* était spécifiquement associée au port de lentilles souples.

Enfin, en présence d'un abcès cornéen ou d'une kératite d'allure infectieuse, ceux-ci sont considérés comme bactériens jusqu'à preuve du contraire car les bactéries sont responsables de plus de 90 à 95% des ulcères et kératites infectieuses non virales recensés dans les pays industrialisés (21–23).

Tableau 1 : Bactéries responsables de kératites bactériennes

Bactéries	Aérobies	Anaérobies
Cocci à Gram positif	Staphylococcus : • Aureus • Epidermidis et à coagulase négative Micrococcus Streptococcus : • Pneumoniae • Autres streptocoques oraux Enterococcus	Peptococcus Peptostreptococcus
Cocci à Gram négatif	Branhamella Neisseria : • Gonorrheae • Meningitidis • Autres	Veillonella
Bacilles à Gram positif	Bacillus Corynebacterium Listeria	Propionibacterium Actinomyces Clostridium
Bacilles à Gram négatif	Pseudomonas : • Aeruginosa • Non aeruginosa Stenotrophomonas Burkholderia Enterobacteriaceae : • Klebsiella • Enterobacter • Serratia • Proteus • Escherichia • Citrobacter Acinetobacter Alcaligenes Azotobacter Haemophilus	Fusobacterium Bacteroides Capnocytophaga
Bacille à Gram positif ramifié	Nocardia	
Coccobacille à Gram négatif	Moraxella	
Bacille acido-alcoolo-résistant (BARR)	Mycobacterium	

Figure 3 : Abcès à Streptococcus pneumoniae après un traumatisme cornéen

Figure 4 : Kératite à Staphylococcus aureus chez un porteur de lentilles de contact

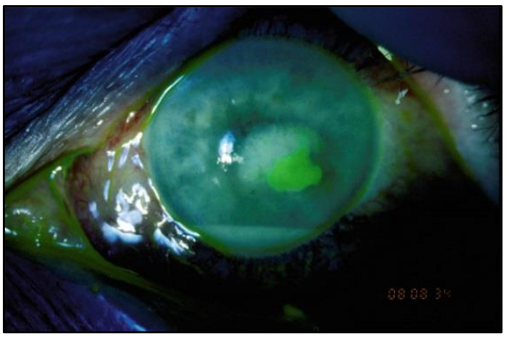


Figure 5 : Abcès à Pseudomonas aeruginosa chez un porteur de lentilles de contact

B. Facteurs de risque

La recherche des facteurs prédisposants est un préalable à la conduite diagnostique et thérapeutique des kératites bactériennes.

La distribution des facteurs de risque varie de façon bimodale avec l'âge du patient (3) :

- Chez le sujet jeune : les lentilles de contact et les traumatismes cornéens, avec ou sans corps étranger, sont le plus souvent en cause.
- Chez le sujet âgé, sont le plus souvent en cause :
    - Les pathologies chroniques de la surface oculaire : œil sec, dystrophie bulleuse, trachome, conjonctivites fibrosantes, kératites neurotrophiques, neuroparalytiques, insuffisance en cellules souches limbiques.
    - Les anomalies palpébrales : blépharite, entropion, ectropion, lagophtalmie.

D'autres facteurs de risque peuvent être retrouvés à tout âge (21,22) :

- La chirurgie cornéenne : greffe de cornée, chirurgie réfractive.
- Toute forme d'immunodépression : diabète, virus de l'immunodéficience humaine (VIH), corticothérapie, alcoolisme, dénutrition.
- L'automédication ou la prescription prolongée de collyres : corticoïdes, antibiotiques au long cours.

Cependant, le port de lentilles de contact constitue, dans la plupart des cas, le premier facteur de risque. Le risque est majoré en cas de port nocturne ou prolongé, en cas de mauvaise hygiène des mains ou du boîtier ou en cas de pathologie cornéenne sous-jacente. Chez les porteurs de lentilles, les facteurs favorisants la survenue de kératites infectieuses sont l'hypoxie et l'hypercapnie cornéennes, la modification de la flore conjonctivale, la contamination par la lentille ou les produits d'entretien (23). Les interactions entre l'épithélium cornéen, la membrane bactérienne et le biomatériau sont également impliquées et sont un défi permanent pour l'industrie des lentilles oculaires.

C. Physiopathologie

Le développement du processus infectieux requiert, quasiment obligatoirement, la présence d'un épithélium cornéen altéré. Ainsi, les bactéries vont adhérer à la surface épithéliale lésée, soit via des récepteurs aux glycoprotéines grâce à des adhésines non filamenteuses ou des pilis, soit de façon non spécifique par le glycocalix bactérien.

Certaines bactéries, comme *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* ont des capacités d'adhésion supérieures à celles des autres bactéries permettant d'expliquer leur fréquence élevée dans la survenue de kératites bactériennes.

Les bactéries vont ensuite se multiplier dans l'épithélium cornéen puis pénétrer dans le stroma cornéen grâce aux toxines et enzymes protéolytiques qu'elles sécrètent. En l'absence de traitement, les bactéries vont progresser jusqu'au stroma profond en élargissant l'ulcère (22).

L'invasion bactérienne va induire une réponse inflammatoire de l'hôte à la fois cellulaire et humorale. Cette réaction inflammatoire débute dès les premières heures de l'inoculation bactérienne. Elle peut être délétère en soi en provoquant une fonte stromale et une nécrose tissulaire (22).

Enfin, certaines bactéries peuvent exceptionnellement infecter la cornée malgré un épithélium intact. C'est le cas de *Neisseria, Corynebacterium diphteriae, Haemophilus influenzae* biogroupe *aegyptius*, *Shigella* et *Listeria*. Pour se faire, elles utilisent certaines protéases qui permettent une pénétration intracellulaire.

D. Symptomatologie clinique

Les signes cliniques d'une kératite infectieuse comprennent des signes non spécifiques d'irritation cornéenne : douleur exacerbée par les mouvements des paupières, baisse de vision, larmoiement réflexe, photophobie, blépharospasme (21).

Les signes qui orientent vers l'origine infectieuse de la kératite sont l'ulcération de l'épithélium et l'inflammation stromale suppurative qui peut être focale, diffuse, multifocale ou marginale. Le tyndall associé peut aller jusqu'à l'hypopyon, mais reste le plus souvent stérile lorsque la membrane de Descemet est intègre (23).

On distingue trois formes cliniques de kératites bactériennes (22) :

- La kératite simple : en présence d'un simple œdème cornéen ou d'une kératite ponctuée.
- L'ulcère de cornée : lorsqu'il existe un défect épithélial visible après instillation de fluorescéine.
- L'abcès de cornée : lorsqu'il existe une infiltration blanchâtre du stroma cornéen. L'abcès de cornée correspond à la forme suppurative de la kératite.

Aucun signe clinique n'est pathognomonique de tel ou tel germe, et l'analyse bactériologique demeure la seule façon de faire un diagnostic précis.

La recherche de critères de gravité est essentielle pour déterminer les modalités de prise en charge. Ces signes de gravité sont répartis en critères locaux ou généraux et sont définis dans le tableau n°2 (21,22,24).

Tableau 2 : Principaux critères de gravité d'une kératite bactérienne

Critères locaux	Critères généraux
✓ Règles des “1-2-3" ; abcès ou kératite o Accompagnée d’un tyndall > +1 o De diamètre > 2 mm o Situé à moins de 3 mm de l’axe optique ✓ Sclérite associée ✓ Endophtalmie associée ✓ Performation imminente ou avérée ✓ Suspicion de *Pseudomonas*, *Neisseria* ✓ Aggravation malgré un traitement antibiotique de 24h ✓ Atteintes bilatérales ✓ Greffe de cornée ✓ Post-opératoire de chirurgie réfractaire	✓ Monophtalmie ✓ Enfant ✓ Immunodéprimé ✓ Mauvaise observance du traitement

E. Diagnostic

1. Diagnostic clinique

L’intensité des signes fonctionnels et cliniques dépend de la virulence de la bactérie et de l’état préexistant de la cornée infectée.

a) Interrogatoire

L'interrogatoire du patient a pour objectif (21,22):

- De préciser le mode d'apparition de la rougeur oculaire :
  - Récente ou ancienne, aiguë ou chronique, d'apparition brutale ou progressive
  - Unilatérale ou bilatérale, soit d'emblée soit avec un intervalle libre
- De préciser le type de douleur : douleurs superficielles ou plus profondes
- De rechercher une baisse de l'acuité visuelle
- De rechercher une notion de traumatisme et les conditions de survenue
- De rechercher les signes associés :
  - Locaux : prurit, sécrétions …
  - Généraux : céphalées, fièvre, ORL …
- De préciser les antécédents ophtalmologiques et généraux, l'âge et la profession du patient
- De préciser l'existence de facteurs favorisants ainsi que le nom des collyres ou médicaments systémiques déjà prescrits et la notion d'allergie médicamenteuse.

Ainsi, dans le cas d'une kératite bactérienne, l'interrogatoire du patient retrouve des signes fonctionnels associés à l'infection cornéenne : œil rouge douloureux accompagné de larmoiement, baisse de l'acuité visuelle, photophobie voire blépharospasme.

b) Examen biomicroscopique

L'examen biomicroscopique ou examen à la lampe à fente permet d'inspecter la surface oculaire (conjonctive, cornée) mais également les structures internes de l'œil (cristallin, rétine au fond d'œil). Il est bilatéral et comparatif.

Cet examen permet d'apprécier la gravité des lésions cornéennes et l'existence de complications.

Les éléments suivants vont être examinés au biomicroscope (21,22,25) :

- <u>L'acuité visuelle</u> : elle est mesurée de loin et de près, avec correction optique éventuelle.
- <u>Examen après instillation dans le cul-de-sac conjonctival d'un collyre à la fluorescéine</u> (colorant orange) : cela permet de rechercher une ulcération cornéenne car l'épithélium cornéen normal ne retient pas la fluorescéine qui, en revanche, se fixe sur

le stroma en l'absence d'épithélium. Les ulcérations apparaitront vertes en lumière bleue, leurs nombres et leurs localisations permettront d'orienter le diagnostic. Ainsi, une ulcération cornéenne localisée avec une zone blanche adjacente évoque une kératite bactérienne avec un abcès de cornée.

- Examen de l'iris et de la pupille : recherche d'un myosis évocateur d'une kératite aiguë ou d'une uvéite aiguë.
- Examen de la chambre antérieure
- Mesure du tonus oculaire : elle est effectuée au tonomètre à l'air ou à aplanation.
- Examen du fond d'œil

Dans le cas d'une kératite bactérienne, l'examen à la lampe à fente retrouve : des érosions et des ulcérations de la cornée, une diminution de transparence de la cornée, souvent localisée au niveau de l'ulcération, et un cercle périkératique. La chambre antérieure est de profondeur et d'aspect normal.

Toutefois, la plupart des signes cliniques de kératites bactériennes sont peu spécifiques, l'observation clinique ne peut en aucun cas se substituer à la réalisation, pour les cas les plus sévères, d'un diagnostic microbiologique au laboratoire.

2. Diagnostic microbiologique

Un examen microbiologique doit être effectué en cas de kératite présumée bactérienne comportant un ou plusieurs critères locaux de gravité et / ou en cas de suspicion de kératite amibienne ou fongique associée. Il permet d'identifier et de tester la sensibilité aux antibiotiques de la ou des bactéries responsables de l'infection. En pratique, les prélèvements microbiologiques devront être réalisés en urgence (22).

Le grattage cornéen est le prélèvement de référence et permet de poser le diagnostic de certitude. Celui-ci est effectué par un ophtalmologiste, à la lampe à fente ou au bloc. L'utilisation d'un kit de prélèvement standardisé comprenant l'ensemble des outils nécessaires au grattage et à l'ensemencement est souhaitable. Les prélèvements doivent être effectués, si possible, avant tout traitement anti-infectieux ou après une fenêtre thérapeutique de quelques heures. Le grattage concerne la base et les berges de l'abcès. Le débridement mécanique de l'abcès constitue, en outre, le premier temps thérapeutique puisqu'il permet de diminuer la charge bactérienne et d'augmenter la pénétration des antibiotiques.

L'ensemencement doit être réalisé, dans la mesure du possible, par l'ophtalmologiste lui-même.
Un premier prélèvement est apposé sur une lame porte-objet pour examen direct. Celui-ci se fait après coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) et coloration de Gram. Il permet de déterminer immédiatement la présence ou l'absence de micro-organismes et de commencer à les caractériser : cocci ou bacille, Gram positif ou Gram négatif.
Un second prélèvement est ensemencé sur différents milieux de culture permettant la recherche de bactéries (gélose chocolat, milieu PGY ou milieu Portagerm®). La croissance microbienne est obtenue en 24 à 72 heures, sauf si un traitement antibiotique était en cours au moment du prélèvement.
En cas de port de lentilles, le boîtier, le liquide de conservation et les lentilles seront également analysés.

Un antibiogramme adapté au(x) germe(s) identifié(s) est rendu dans les 48 à 96 heures. Il permet de tester, in vitro, la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques et de fournir une évaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques utiles au traitement. L'antibiogramme permet de guider le choix thérapeutique en évitant des antibiotiques dont les CMI sont élevées pour la souche isolée (22,25).

F. Stratégie Thérapeutique

Une kératite bactérienne constitue une urgence thérapeutique et un traitement antibiotique par une spécialité ou un collyre fortifié doit être instauré immédiatement, après réalisation des prélèvements microbiologiques.

1. Traitement médical

Le traitement antibiotique par voie topique est débuté, en urgence, dès les prélèvements effectués. Il est adapté à la gravité des lésions, à l'orientation clinique et, si possible, aux résultats de l'examen direct (21–23,25).

Il n'existe pas de consensus international concernant les collyres antibiotiques à utiliser dans les kératites bactériennes. Le traitement initial dépend de l'orientation clinique (caractéristiques de l'infection, facteurs de risque associés) et de la gravité des lésions.

Les protocoles suivants sont donnés à titre d'exemple (1,21,22,25–27) :

- En cas de kératite bactérienne peu sévère ne menaçant pas immédiatement la vision (critères de la règle des « 1-2-3 » absents) : quinolone ± aminoside ou rifamycine.
- Pour les kératites bactériennes menaçant la vision (critères de gravité locaux de la règle des « 1-2-3 » présents) :
    - association ticarcilline (6,6 mg/ml) + gentamicine (15 mg/ml) ou amikacine (50 mg/mL) + vancomycine (50 mg/ml) ; la ticarcilline n'étant plus commercialisée celle-ci n'est plus utilisée ;
    - ceftazidime (20 mg/ml) + vancomycine (50 mg/ml) ;
    - céfazoline (50 mg/ml) + tobramycine (20 mg/ml) ;
    - céfazoline (50 mg/ml) + ciprofloxacine.

Pour les abcès importants, il est préférable d'hospitaliser le patient et d'instaurer un traitement par des collyres dit "fortifiés" administrés toutes les heures. Ces collyres à fortes concentrations sont obtenus à partir de préparations pour injections intraveineuses et sont indispensables dans le traitement des kératites bactériennes sévères. Cependant, leur toxicité locale non négligeable (pH acide, hyperosmolarité relative) induit très souvent un réflexe de larmoiement lors de l'instillation, qui a pour effet de diminuer la concentration de principe actif. Ces collyres ne peuvent être délivrés que sur prescription d'un médecin hospitalier.
Quel que soit l'antibiotique prescrit, renforcé ou non, une « dose de charge » (instillations répétées toutes les 5 à 10 minutes la première heure de traitement) permet d'obtenir rapidement des concentrations cornéennes satisfaisantes. En cas de bi- ou trithérapie, le respect d'un intervalle de 5 minutes entre chaque instillation de collyre est nécessaire. Les collyres sont ensuite prescrits à la posologie d'une goutte par heure pendant 48 heures (22).

Les antibiotiques systémiques (voie intraveineuse ou orale) sont indiqués en cas de perforation, sclérite ou endophtalmie associées.

L'antibiothérapie initiale (nature des produits, fréquence d'instillation) est ensuite modifiée en fonction de l'évolution clinique, des résultats de l'examen direct, de la culture et de l'antibiogramme. Il est souhaitable de conserver au moins deux antibiotiques actifs sur la bactérie identifiée. La fréquence d'instillation des antibiotiques est généralement diminuée, après 48 heures, en raison de leur mauvaise tolérance locale et de l'apparition de phénomène de toxicité. La durée du traitement antibiotique est d'environ 2 semaines pour les kératites bactériennes peu sévères et 4 semaines voire plus pour les kératites plus sévères.

Des traitements adjuvants sont associés au traitement anti-infectieux (23,27) :

- Des lavages oculaires pluriquotidiens au sérum physiologique avec utilisation de compresses stériles sont préconisés.
- Le lavage quotidien du visage au savon et des mains avec une solution hydro-alcoolique est nécessaire avant l'instillation des collyres.
- D'autres types de collyres peuvent être administrés selon les besoins : collyres cycloplégiques (en l'absence de contre-indication) à visée antalgique en association avec des antalgiques oraux ; collyres hypotonisants.
- La corticothérapie topique, agissant sur l'ensemble des composants de la réaction inflammatoire, sera initiée en fonction de l'évolution et du germe causal :
    - En cas de bactéries Gram + identifiées : possible dès 24 à 48 heures d'évolution.
    - En cas de bactéries Gram - identifiées : possible après 4 à 5 jours d'évolution en fonction de la taille de l'abcès, du contrôle de l'infection et du degré d'inflammation associée.

2. Traitement chirurgical

Il est parfois nécessaire de réaliser une greffe de cornée « à chaud » lorsque l'intégrité du globe est menacée : infection sévère et évolutive malgré le traitement médical, perforation cornéenne avérée ou imminente. Les techniques de kératoplastie lamellaire profonde (KLP) ou de kératoplastie transfixiante (KT) peuvent être employées à titre thérapeutique. Cependant, le pronostic des kératoplasties est mauvais sur un œil infecté et inflammatoire. On tentera dans la mesure du possible de le différer et d'attendre au moins 9 à 12 mois après résolution de l'épisode infectieux (21,22,28).

G. Evolution

Les paramètres suivants sont à surveiller dans l'évolution des kératites bactériennes : l'acuité visuelle, l'intensité des signes fonctionnels (douleurs), l'infiltrat (taille, profondeur), l'état de l'épithélium et le degré d'inflammation (de surface, intraoculaire) (21).

En cas de sensibilité du germe au traitement, une amélioration doit survenir dans les 24 à 48 heures. On observe alors : une ré-épithélialisation de la surface de l'infiltrat dont la densité, la profondeur et la surface diminuent ; une régression de l'inflammation conjonctivale et de la

chambre antérieure. L'évolution dépend de la virulence de la bactérie, de la précocité du traitement mais aussi des moyens de défense du patient (22).

H. Pronostic

Le pronostic des abcès de cornée dépend du pathogène en cause, du délai diagnostique, de la réponse de l'hôte et des facteurs de risques associés. (21,22,25).

Pour des kératites à *S. epidermidis*, une amélioration clinique survient dans les 24 à 48 heures suivant le début du traitement. La guérison est généralement obtenue en 5 à 7 jours. Tandis qu'une kératite causée par *S. aureus* peut ne pas s'améliorer pendant 1 ou 2 jours puis guérir rapidement en 10 à 12 jours.
L'évolution est plus lente et le pronostic visuel plus mauvais pour les bactéries à Gram négatif. Une tendance à l'aggravation des lésions cornéennes est même possible pendant les 48 premières heures malgré un traitement antibiotique efficace dans les infections à *Pseudomonas aeruginosa*, qui guérissent beaucoup plus lentement (plusieurs semaines).

III. Préparations destinées à la voie ophtalmique

A. Définitions

Les préparations ophtalmiques sont des préparations liquides, semi-solides ou solides stériles destinées à être appliquées sur le globe oculaire et / ou les conjonctives ou à être introduites dans le sac conjonctival. Plusieurs catégories de préparations ophtalmiques peuvent être distinguées : les collyres, les solutions pour le lavage oculaire, les poudres pour collyres ou pour lavage ophtalmique, les préparations ophtalmiques semi-solides et les inserts ophtalmiques (30).

Les collyres sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles aqueuses ou huileuses, contenant une ou plusieurs substances actives et destinées à l'instillation oculaire. Ils sont utilisés dans le traitement des infections du segment antérieur de l'œil (la cornée, l'iris, l'humeur aqueuse et le cristallin). Ils peuvent être présentés en flacons multidoses, en monodoses ou en seringues. En milieu hospitalier, ils peuvent avoir le statut de préparation hospitalière ou magistrale (30).

Une préparation magistrale est un médicament préparé extemporanément suite à une prescription et destiné à un malade déterminé.

Une préparation hospitalière est un médicament préparé selon les indications de la Pharmacopée et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée dans une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients.
Un des grands intérêts des préparations hospitalières résident dans le fait qu'elles peuvent être préparées à l'avance. La PUI dispose donc d'un stock de préparations dont la qualité est validée.

B. Critères de qualité des collyres

1. Stérilité

La stérilité de toutes les formes ophtalmiques est une obligation. Elle garantit la sécurité microbiologique de la préparation ainsi que le maintien de la stabilité du principe actif.

Il existe 3 procédés de préparation permettant l'obtention de médicaments stériles (31) :

- La stérilisation terminale : la stérilisation par la chaleur humide en autoclave est la méthode de choix et elle doit être envisagée dès lors que la nature du principe actif le permet.
- La filtration terminale : certains principes actifs ou matières premières qui ne peuvent pas faire l'objet d'une stérilisation terminale peuvent être traités par filtration. La filtration terminale consiste à filtrer la solution sur un filtre stérile à pores de diamètre nominal inférieur ou égal à 0,22 µm, ou sur un autre type de filtre possédant des propriétés de rétention bactérienne équivalentes. La filtration est à effectuer aussi près que possible du point de remplissage. L'équipement, les récipients, les fermetures et les fluides en contact avec la solution, et si possible, les composants de la préparation sont soumis à un procédé de stérilisation approprié. Les opérations qui suivent la filtration stérilisante sont réalisées dans des conditions aseptiques.
- La préparation aseptique : elle a pour objectif de maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants stériles en utilisant des matériels de préparation stérilisés selon les méthodes décrites par la Pharmacopée Européenne. Pour cela, il

est nécessaire d'opérer dans des conditions et au sein d'installations conçues pour empêcher une contamination microbienne.

Quelle que soit la méthode utilisée, celle-ci assure l'obtention d'une préparation stérile mais ne garantit pas la conservation de l'état stérile tout au long de la durée d'utilisation de la préparation. C'est pourquoi, il est obligatoire d'ajouter des conservateurs dans les conditionnements multidoses sauf si le principe actif possède des propriétés antimicrobiennes ou si le conditionnement présente des propriétés particulières comme c'est le cas pour les systèmes Novelia®, ABAK® ou COMOD® (32,33).

Toutefois, des études ont montré que les conservateurs étaient à l'origine de problème de tolérance entraînant des effets secondaires inflammatoires, allergiques, toxiques ainsi qu'une source de complexité en termes de formulation (34–36).

Quelle que soit le procédé employé pour obtenir une préparation stérile, celui-ci doit être validé par des contrôles adéquats.

L'essai de stérilité proprement dit doit être associé à un essai de validation préalable : la validation de la fertilité des milieux de culture utilisés pour l'ensemencement et la vérification que la préparation ne présente pas elle-même un effet inhibiteur sur la croissance microbienne.
Deux méthodes d'ensemencement des milieux sont proposées dans la Pharmacopée Européenne pour l'essai de stérilité : la méthode par ensemencement direct et la filtration sur membrane qui est généralement privilégiée car plus sensible que l'ensemencement direct.

Lors de la filtration sur membrane, le produit est filtré sur une membrane de porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm dont l'efficacité de rétention des micro-organismes a été établie. Si le produit possède des propriétés antimicrobiennes, la Pharmacopée Européenne recommande de rincer la membrane au moins 3 fois, en filtrant à chaque fois le volume de diluant stérile utilisé dans l'essai d'applicabilité de la méthode. La membrane est ensuite incubée dans deux milieux de culture, l'un au thioglycolate de sodium, convenant principalement aux bactéries anaérobies mais également aux bactéries aérobies, à 30-35°C, l'autre à l'hydrolysat de caséine de soja, convenant à la fois aux bactéries aérobies, aux levures et aux moisissures, à 20-25°C. Une période d'incubation de 14 jours est requise pour obtenir les résultats finaux de l'essai (17,30).

2. Limpidité

Un collyre doit être limpide, s'il se présente en solution.
Les particules peuvent provenir des récipients, de la filtration et du remplissage lors de la fabrication, au cours de la conservation ou encore au moment de l'administration.
La recherche de particules est un paramètre important à prendre en compte pour les collyres en suspension et les préparations ophtalmiques injectables car les particules peuvent affecter la tolérance de la préparation. En effet, la granulométrie doit être suffisamment fine et homogène afin d'éviter une irritation locale.
Les collyres doivent contenir au plus vingt-cinq particules de taille supérieure à 25 µm, au plus deux d'entre elles dépassent 50 µm et aucune ne doit dépasser 90 µm.
La limpidité de la formule peut être contrôlée par turbidimétrie, par néphélométrie ou par méthode visuelle, en comparaison à des solutions de référence décrites dans la Pharmacopée Européenne (17,37).

3. Isotonie

L'isotonie est un facteur important de confort pour l'œil. Il est conseillé d'ajuster les collyres à une tonicité équivalente à celle du liquide lacrymal (280 mOsm/kg) car les muqueuses oculaires sont sensibles aux variations de pression osmotique. Le chlorure de sodium et le glucose sont généralement utilisés afin d'ajuster l'isotonie tandis que les solutions tampons permettent d'ajuster à la fois l'isotonie et le pH (38,39).

Néanmoins, l'œil peut supporter des osmolalités comprises entre 240 et 550 mOsm/kg mais un collyre sera mieux supporté par l'œil et moins douloureux s'il est isotonique.

L'osmolalité est mesurée grâce à un osmomètre par la mesure de l'abaissement cryoscopique ΔT. Une faible quantité de collyre est prélevée à l'aide d'une pipette et insérée dans la machine. Il s'en suit une congélation de l'échantillon et la mesure de l'abaissement cryoscopique. Elle est exprimée en mOsm/kg.

$$\xi = [\Delta T / 1,86] \times 1000 \text{ mosmol/kg}$$

4. pH

Les pH du liquide lacrymal et du plasma sanguin sont voisins de 7,4. Le pH des collyres devra se rapprocher de cette valeur, sauf exception, pour éviter tout picotement (pH acide) ou

brûlure (pH alcalin) lors de l'utilisation du collyre. Toutefois, certains principes actifs, comme la vancomycine, sont instables, précipitent ou sont inactifs à un pH voisin de la neutralité. Le choix du pH est donc basé sur un compromis entre la solubilité de la molécule, sa stabilité et la tolérance de la préparation (38–40).

Le pouvoir tampon des larmes est parfois suffisant pour que l'on puisse instiller une solution dont le pH permette au principe actif d'être stable en solution. Ainsi, l'œil peut tolérer des pH compris entre 3 et 10 pour des petits volumes d'instillations (41).

Le pH des collyres est mesuré par un pH-mètre. La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes plongeant dans la solution à examiner.

5. Viscosité

La viscosité peut se définir comme les forces de frottement qui s'opposent à l'écoulement des couches de liquide les unes par rapport aux autres et elle n'est pas soumise à une limite de valeurs particulières.
Le liquide lacrymal étant visco-élastique, un collyre présentant une viscosité élevée entraînera une irritation locale par augmentation du temps de contact de la goutte avec l'œil. Toutefois, une certaine viscosité peut être souhaitable dans un collyre car elle améliore la biodisponibilité de la substance active qu'il contient par augmentation du temps de contact du collyre.
Le choix de la viscosité de la préparation est donc basé sur un compromis entre la meilleure tolérance possible et un temps de résidence suffisant à la surface de l'œil.
La viscosité dynamique (η) peut se mesurer grâce à un viscosimètre d'Ostwald, via la loi de Poiseuille.

IV. Présentation de l'Amikacine, Ceftazidime et Vancomycine

A. Amikacine

1. Structure

L'amikacine est un antibiotique polyosidique aminé de la famille des aminosides. Il s'agit d'une molécule cationique, très hydrosoluble, chimiquement stable, de faible poids moléculaire. Sa masse molaire est de 585,603 g/mol (42).

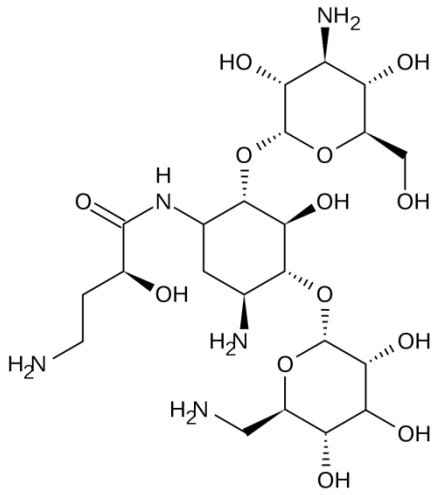


Figure 6 : Structure moléculaire de l'amikacine

2. Mécanisme d'action

L'activité bactéricide de l'amikacine est basée principalement sur l'inhibition de la synthèse des protéines ce qui altère la perméabilité de la membrane cellulaire. Cela entraîne alors la rupture progressive de l'enveloppe cellulaire puis éventuellement la mort de la cellule.

L'amikacine se lie avec la sous-unité 30S des ribosomes bactériens et bloque la première étape de la synthèse protéique appelée l'initiation. Cette molécule possède une activité bactéricide concentration-dépendante qui est rapide et puissante à des concentrations égales ou légèrement supérieures aux concentrations inhibitrices (42).

3. Spectre d'activité

Dans le cas des kératites bactériennes sévères, les espèces sensibles à l'amikacine sont (42) :

- Aérobies à Gram + : *Corynebacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia asteroïdes*, *Staphylococcus méti-S* ;
- Aérobies à Gram - : *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* ;
- Autre : mycobactéries.

B. Ceftazidime

1. Structure

La ceftazidime est un antibiotique appartenant à la famille des bêta-lactamines du groupe des céphalosporines. La structure chimique de base des céphalosporines est constituée d'un noyau bêta-lactame et d'un noyau dihydrothiazine. On distingue, à l'heure actuelle, quatre générations de céphalosporines. La ceftazidime est classée dans le groupe des céphalosporines de troisième génération. Sa masse molaire est de 637 g/mol.

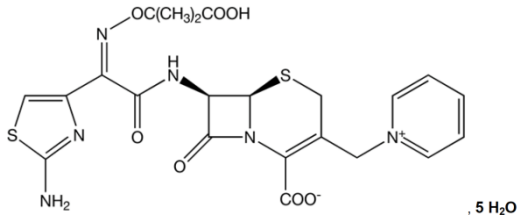


Figure 7 : Structure moléculaire de la ceftazidime

2. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de la ceftazidime repose sur l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne consécutive à sa fixation aux protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Cela entraîne l'interruption de la biosynthèse de la paroi cellulaire (peptidoglycanes) de la bactérie, ce qui provoque la lyse et la mort de celle-ci. Son activité bactéricide est temps-dépendant (43).

3. Spectre d'activité

Dans le cas des kératites bactériennes sévères, les espèces sensibles à la ceftazidime sont (43) :

- Aérobies à Gram + : S*treptococcus pneumoniae*
- Aérobies à Gram - : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, S*erratia*.
- Anaérobies : *Clostridium perfringens*, *fusobacterium*, *peptostreptococcus*.

C. Vancomycine

1. Structure

La vancomycine est un antibiotique bactéricide de la famille des glycopeptides. Elle est naturellement produite par un micro-organisme isolé d'une boue de Bornéo, *Streptomyces orientalis*. Le principe actif est un glycopeptide tricyclique dichloré possédant une chaîne heptapeptidique comportant cinq cycles aromatiques. Sur cette chaîne est fixé un disaccharide composé de glucose et de vancosamine. Sa masse moléculaire est de 1 449,3 g/mol (44).

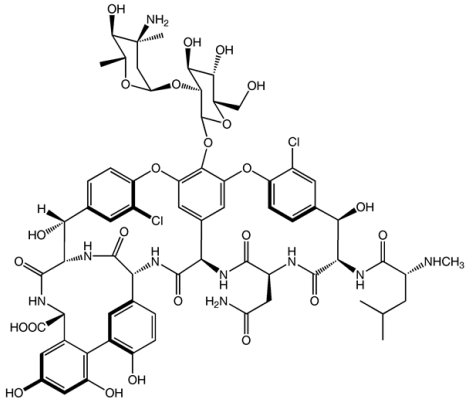


Figure 8 : Structure moléculaire de la vancomycine

2. Mécanisme d'action

Les glycopeptides sont, au même titre que les β-lactames, des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leur action est toutefois différente car la vancomycine inhibe la biosynthèse du peptidoglycane en ciblant l'undécaprényl-phosphate, transporteur transmembranaire des précurseurs de la paroi (44).

Les glycopeptides sont des antibiotiques temps-dépendants.

3. Spectre d'activité

Dans le cas des kératites bactériennes sévères, les espèces sensibles à la vancomycine sont (44) :

- Aérobies à Gram + : *Bacillus*, les entérocoques, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* non *aureus*, *Streptococcus*, *Streptococcus pneumonia.*
- Anaérobies : *Clostridium*, *Peptostreptococcus*.

V. Principe de la congélation - décongélation

La congélation est une technique visant à faire passer un produit à l'état solide par des techniques de refroidissement forcé. Cette technique consiste à abaisser la température du produit et à la maintenir en dessous de la température de fusion de la glace (0 °C) afin de supprimer toute activité biologique (qui dépend de la présence d'eau sous forme liquide) voire chimique et enzymatique (pour les très basses températures) (45,46).

Le système eau-glace va se maintenir exactement à 0°C durant tout le temps de son évolution dans un sens ou l'autre. Une fois la congélation ou la fusion achevée, le système prend la température extérieure. La congélation de l'eau s'accompagne d'une augmentation de volume de 10% et dégage de l'énergie (réaction exothermique).

A. Avantages et inconvénients de la congélation

L'avantage majeur de la congélation est que ce procédé permet d'augmenter la durée de stabilité physico-chimique de certaines molécules en solution tout en conservant leurs qualités microbiologiques. Cela permet donc la production de plus grandes séries de préparations stériles prêtes à l'emploi permettant ainsi de réduire les coûts de production (11,45,46).

Toutefois, il existe également des inconvénients liés à ce procédé de congélation. Tout d'abord, l'inconvénient majeur de la congélation est lié à la durée importante de temps de décongélation. De plus, la disposition des conditionnements dans le congélateur a une importance notamment pour les substances dont la stabilité dépend de la température finale de congélation, c'est par exemple le cas pour l'ampicilline ou l'amoxicilline.
Enfin, ce procédé nécessite de disposer d'un espace suffisant pour accueillir un ou plusieurs congélateurs et d'investir dans l'achat de congélateurs associés à un système de surveillance de la température.

B. Choix de la méthode de décongélation

Dans la littérature, on retrouve quatre méthodes de décongélation (45) :

- Décongélation à température ambiante : ce procédé est intéressant lorsque la préparation se présente sous une forme à faible volume, c'est par exemple le cas des collyres.

- Décongélation dans un flux laminaire pour un renouvellement constant de l'air à la surface du conditionnement : cette technique nécessite un équipement particulier qui n'est généralement présent que dans certaines unités et qui requiert également un habillage spécifique.
- Décongélation avec de l'eau chaude : ce procédé peut être réalisé en plongeant la préparation dans un bac rempli d'eau chaude ou en la plaçant sous un filet d'eau chaude. Toutefois, cette technique n'est pas recommandée car elle présente un risque de contamination microbiologique.
- Décongélation par four à micro-ondes : cette technique permet de réduire de façon significative le temps de décongélation mais peut influencer l'intégrité de la substance active. De plus, ce procédé nécessite d'investir dans un équipement particulier.

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

I. Objectifs

Les objectifs de notre étude sont multiples :

- Premièrement, l'objectif est de réaliser une étude de stabilité microbiologique de trois collyres renforcés en antibiotiques (amikacine 5%, ceftazidime 5% et vancomycine 5%) afin de valider, au CHU de Bordeaux, la stérilité de ces collyres après 3 mois de congélation à -20°C.
- Dans un second temps, nous souhaitons comparer la stabilité microbiologique de ces trois collyres renforcés en antibiotiques (amikacine 5%, ceftazidime 5% et vancomycine 5%) dans deux types de conditionnements multidoses : des flacons en polyéthylène haute densité (PEHD) et, un nouveau dispositif, des flacons Novelia® afin de changer de conditionnement si la supériorité de ce dernier est démontrée.
- Et, enfin, l'objectif est d'étudier l'évolution de la stérilité au cours du temps de ces 3 collyres renforcés en antibiotiques (amikacine 5%, ceftazidime 5% et vancomycine 5%) lors d'un usage en vie réelle, après décongélation et stockage entre 2 – 8°C dans les deux types de conditionnements multidoses.

II. Matériels et Méthodes

A. Procédé de fabrication des collyres

1. Formulation

L'objectif de la formulation est d'obtenir un collyre à la fois stable physiquement, chimiquement et microbiologiquement tout en étant bien toléré par le patient afin de favoriser l'observance.

Ainsi, le choix des principes actifs, des véhicules et des excipients vont avoir un impact sur la stabilité et la tolérance de la préparation car ils vont influer sur le pH, l'osmolalité ou encore la viscosité du collyre.

Afin de trouver la formulation la plus adaptée, une recherche bibliographique a été réalisée (7,10,11,14,15,41,47–50).

Tableau 3 : Revue de la littérature des différentes formulations

Molécules	Dosage	Flacon	Excipients	Conditions de conservation		Durée	Mode de décongélation	Références
Amikacine	50 mg/mL	Verre Type I	NaCl 0,9%	moins 20°C	Abri lumière	6 mois	Décongélation à température ambiante pendant 30 min	(14)
Ceftazidime	10 mg/mL	Verre	Tampon citrate pH 6,64 >> 10g	4°C	Abri lumière	27 jours		(49)
	50 mg/mL	Verre	Tampon citrate pH 6,64 >> 10g	4°C	Abri lumière	21 jours		(49)
	10 mg/mL	Verre	Borate de phenylmercure 0,04 250 mg ßphenylethylalcool 40 mg Tampon citrate pH 6,24 >> 9,21 g	4°C	Abri lumière	24 jours		(49)
	50 mg/mL	Verre	Borate de phenylmercure 0,04 250 mg ßphenylethylalcool 40 mg Tampon citrate pH 6,24 >> 9,21 g	4°C	Abri lumière	15 jours		(49)
	20 mg/mL	Verre Type I	NaCl 0,9%	Moins 20°C	Abri lumière	3 mois	Décongélation à température ambiante pendant 30 min	(15)
	20 mg/mL	Verre Type I	NaCl 0,9%	4°C	Abri lumière	7 jours		(15)
	20 mg/mL	Verre Type I	NaCl 0,9%	25°C	Abri lumière	24 heures		(15)
	50 mg/mL	Verre	SnoTears® 10 mL	7°C	Abri lumière	5 jours		(50)
	40 mg/mL	PEBD	NaCl 0,9% >> 8 mL	2 - 8°C	Abri lumière	10 jours		(7)

	50 mg/mL	Verre	Conservateur antimicrobien : chlorure de benzalkonium 0,04 mg/mL soit 6,4 mg BSS solution 10 mL	moins 20 °C	Abri lumière	75 jours	Décongélation à température ambiante pendant 30 min (minimum 30 minutes mais pas plus de 2h) puis stocké à 4°C	(13)
	50 mg/mL	Verre Type I	NaCl 0,9%	moins 20°C	Abri lumière	6 mois	Décongélation à température ambiante pendant 30 min	(14)
Vancomycine	25 mg/mL	Verre	Glucose 5% >> 5 mL	moins 20°C	Abri lumière	90 jours	Trois types de décongélation : 1. Décongélation sous eau chaude 2. Décongélation à température ambiante 3. Au réfrigérateur à +4°C pendant 48h	(11)
	50 mg/mL	Verre	NaCl 0,9% >> 10 mL	24 - 26°C	Abri lumière	15 jours		(10)
	50 mg/mL	Verre	NaCl 0,9% >> 10 mL	4°C	Abri lumière	20 jours		(10)
	50 mg/mL	Verre Type I	Glucose 5%	moins 20°C	Abri lumière	6 mois	Décongélation à température ambiante pendant 30 min	(14)

a) Principes actifs

Les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) recommandent que les matières premières utilisées pour la préparation de médicaments stériles soient des matières premières à usage pharmaceutiques ou des spécialités pharmaceutiques stériles en privilégiant, si possible, cette dernière solution. Ainsi, en milieu hospitalier, les formulations de préparations ophtalmiques sont généralement conçues à partir de principes actifs purs ou de spécialités injectables déjà commercialisées que l'on adapte à la spécificité oculaire (31).
Toutefois, l'emploi de spécialités commerciales pour la formulation de préparations ophtalmiques peut induire des effets secondaires toxiques liés au détournement de la voie d'administration. Ainsi, une substance, sans effet toxique sur les tissus vasculaires, dans une formulation injectable pourra entraîner des toxicités sur les cellules de la surface oculaire. Ces effets secondaires toxiques sont dus au faite que les cellules oculaires soient parmi les cellules les plus sensibles aux substances iatrogènes toxiques.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser des principes actifs provenant de spécialités injectables déjà commercialisées comme recommandé dans les BPP. Ainsi, l'amikacine provient de la spécialité Amikacine 500 mg commercialisée par Mylan, la ceftazidime de la spécialité Ceftazidime 1 000 mg également commercialisée par Mylan et la vancomycine de la spécialité Vancomycine 1 000 mg commercialisée par Sandoz.

b) Véhicules

Les principaux critères de choix d'un véhicule sont (31) :

+ Des critères galéniques : pouvoir solvant, miscibilité à l'eau, non inflammabilité, inertie chimique
+ Des critères physiologiques : bonne tolérance locale au niveau de l'œil et bonne tolérance générale.

Ainsi, le choix du solvant aura un impact sur le pH, l'osmolalité et la viscosité de la préparation ophtalmique ce qui aura un effet sur la tolérance locale de la préparation.

Parmi les véhicules le plus fréquemment utilisés, on retrouve : le Balanced Salt Solution (BSS), le chlorure de sodium 0,9%, le glucose 5% ou encore de l'eau stérile.
Le BSS est considéré comme le solvant de choix en raison de sa composition proche de celle de l'humeur aqueuse mais sa manipulation est moins aisée que celle du chlorure de sodium 0,9% ou du glucose 5% qui sont disponibles en poche stérile de 500 mL ou 1 000 mL.

Dans notre étude, le chlorure du sodium 0,9% (Fresenius Kabi, Sèvres, France) a été employé comme solvant pour la reconstitution des solutions d'amikacine et de ceftazidime à 5% tandis que du glucose 5% (Fresenius Kabi, Sèvres, France) a été utilisé comme solvant pour la reconstitution de la solution de vancomycine 5%.

c) Excipients

Les préparations ophtalmiques peuvent contenir des excipients destinés à adapter ou stabiliser le pH, à ajuster le pouvoir osmotique ou la viscosité de la préparation, à augmenter la solubilité de la substance active ou encore à stabiliser la préparation. Ces excipients ne doivent pas nuire à l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne doivent pas provoquer d'irritation locale notable.

Parmi les excipients pouvant être employés dans les collyres, on retrouve les conservateurs qui préservent la préparation d'une contamination microbienne et / ou fongique. En effet, dans des conditions normales d'emploi, notamment pour des récipients multidoses, une contamination pourrait se produire ce qui entraînerait un risque d'infection pour le malade et la détérioration de la préparation.
Quatre grandes familles de conservateurs peuvent être employées dans la formulation de préparations oculaires (36) : les ammoniums quaternaires dont fait partie le chlorure de benzalkonnium, les alcools, les dérivés mercuriels et les sels de chlorhexidine.
Toutefois, de nombreuses études ont démontré la toxicité oculaire de ces conservateurs aussi bien au niveau des structures superficielles (cornée, conjonctive) qu'au niveau des structures plus profondes (trabéculum, cristallin). Cette toxicité se traduit, pour le patient, par des picotements, des brûlures, une sensation de sécheresse oculaire ou encore une allergie.

La majorité des préparations ophtalmiques réalisées à l'hôpital ne contiennent pas de conservateurs car les principes actifs concernés sont des antibiotiques, des antifongiques ou des antimicrobiens. Or, la Pharmacopée Européenne ne requiert pas la présence de conservateurs si le principe actif présente lui-même des propriétés antimicrobiennes. C'est pourquoi, dans le cadre de notre formulation, nous avons décidé de nous affranchir de conservateurs.

Ainsi, l'optimisation de la formulation galénique a pour but de diminuer, dans la mesure du possible, le nombre et la quantité d'excipient entrant dans la composition des préparations. L'objectif est de réduire la survenue d'effets secondaires et d'améliorer la tolérance de ces préparations afin de favoriser l'observance du patient.

2. Conditionnement

Un article de conditionnement se définit comme tout élément utilisé lors du conditionnement d'une préparation, à l'exclusion de l'emballage destiné au transport. Les articles de conditionnement sont appelés primaires ou extérieurs selon qu'ils soient, respectivement, destinés ou non à être en contact direct avec la préparation. Ainsi, dans le cas des préparations ophtalmiques réalisées à l'hôpital, le conditionnement est essentiellement primaire. Celui-ci doit assurer la stabilité physico-chimique et microbiologique de la préparation tout en étant adapté à l'administration et doit être facile à manipuler pour le patient.

Dans le cas des préparations ophtalmiques, la Pharmacopée Européenne précise qu'elles doivent être conservées dans des conditionnements stériles, étanches, à fermeture inviolable. Le volume des flacons de collyres multidoses est limité à 10 mL.

Actuellement, dans le commerce, plusieurs types de flacons sont disponibles pour le conditionnement des préparations ophtalmiques :

+ Des flacons en verre : les flacons en verre sont les conditionnements les plus utilisés pour les préparations ophtalmiques réalisées à l'hôpital. On distingue 4 catégories parmi les verres pour usage pharmaceutique :
    - Verre de type I : verre borosilicate ou verre neutre à résistance hydrolytique élevée
    - Verre de type II : verre sodocalcique à résistance hydrolytique élevée
    - Verre de type III : verre sodocalcique à résistance hydrolytique moyenne
    - Verre de type IV : verre sodocalcique à résistance hydrolytique faible

  La Pharmacopée n'impose rien en ce qui concerne la qualité du verre mais il est préférable de prendre un verre neutre (type I) pour ne pas modifier le pH des collyres. Les flacons en verre présentent de nombreux avantages comme une grande résistance mécanique et thermique leur permettant d'être autoclavés. Ils sont également étanches aux gaz et à la vapeur d'eau et présentent une bonne inertie. Toutefois, ils présentent aussi des inconvénients notamment une mauvaise ergonomie due à l'absence de déformabilité du flacon rendant l'instillation difficile pour le patient.

+ Des flacons en PolyChlorure de Vinyle (PVC) : ce type de conditionnement n'est pas recommandé en raison de la présence de diéthylhexylphtalate (DEHP) dans la composition du PVC pouvant être relargué dans la formulation (51,52). De plus, des cas d'adsorption des particules de principes actifs ont été rapportés avec l'emploi de flacons en PVC.

+ Des flacons en polyéthylène haute ou basse densité (PEHD ou PEBD) : le polyéthylène ne contient aucune trace de plastifiant comme le DEHP. Ce type de conditionnement présente l'avantage d'être à la fois économique tout en permettant une administration aisée pour le patient du fait de la souplesse de sa paroi en polyéthylène qui lui confère une grande ergonomie.

+ Des flacons avec des systèmes de protection bactérienne : ces flacons consistent à délivrer le collyre à travers une membrane filtrante de porosité 0,2 µm ou sont munis d'un système anti-retour ou d'un système à pression variable afin d'empêcher une contamination bactérienne de la préparation. Ces dispositifs présentent de nombreux avantages car, autre l'absence de conservateurs, leur paroi en polyéthylène leur confère une grande ergonomie rendant l'instillation du collyre aisée pour le patient. A ce jour, il existe trois systèmes différents, le système ABAK®, le système COMOD® et le système NOVELIA®.

    - Système ABAK® (32): il s'agit du premier flacon multidose sans conservateur qui a été mis sur le marché. Il est commercialisé par le laboratoire Théa. La dénomination ABAK signifie A privatif de BAK pour Benzalkonium. Ce dispositif est muni d'une membrane filtrante en polyéther sulfone de porosité 0,2 µm qui protège le collyre de la contamination par des micro-organismes dont la taille varie entre 1 et 10 microns. La déformabilité du flacon sous la pression joue un rôle essentiel dans la facilité d'instillation des gouttes. Le flacon a une contenance de 10 mL (environ 300 gouttes).

Figure 9 : Système ABAK® de 3ème génération

- Système COMOD® (33) : le terme COMOD® signifie COntinuous MOno Dose et décrit un système d'application AIRLESS intégré pour une instillation sans germes d'un produit pharmaceutique liquide. En appuyant sur la pompe doseuse, un conduit de ventilation sophistiqué empêche, à tout moment, la solution du flacon d'entrer en contact avec l'air ambiant. Ce système est assuré par une pompe spéciale et un flacon spécifique doté d'un réservoir flexible. Après l'instillation de la solution, l'égalisation de pression se fait en dirigeant le volume d'air dans l'espace situé entre la paroi du flacon et celle du réservoir interne flexible et non par un apport d'air dans le réservoir. Au fur et à mesure que l'on instille, le volume de la solution diminue et le réservoir se rétracte progressivement en raison de la baisse de pression croissante. Ainsi, les micro-organismes comme les bactéries ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur du flacon. Ce dispositif est commercialisé par les laboratoires Ursapharm.

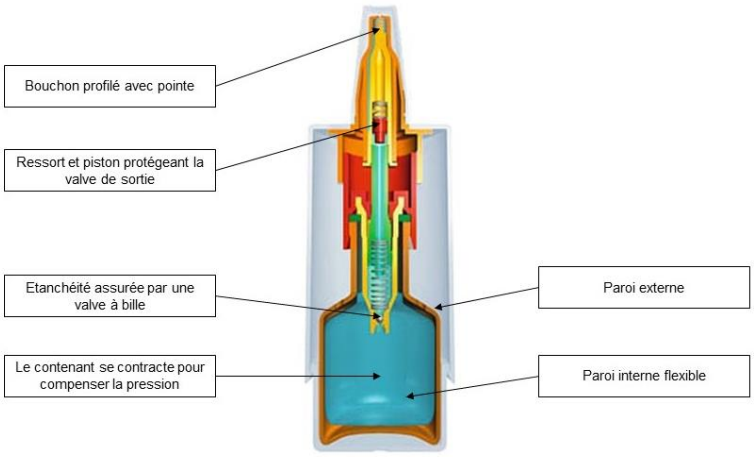


Figure 10 : Système COMOD®

- Système NOVELIA® (53,54) : ce dispositif se compose d'une valve anti-retour et d'un système d'évacuation des contaminants. Le flacon est en polyéthylène basse densité (PEBD), la valve anti-retour en silicone et le bouchon en polyéthylène haute densité (PEHD). Ce système est commercialisé par la société Nemera appartenant au groupe Rexam Inc.

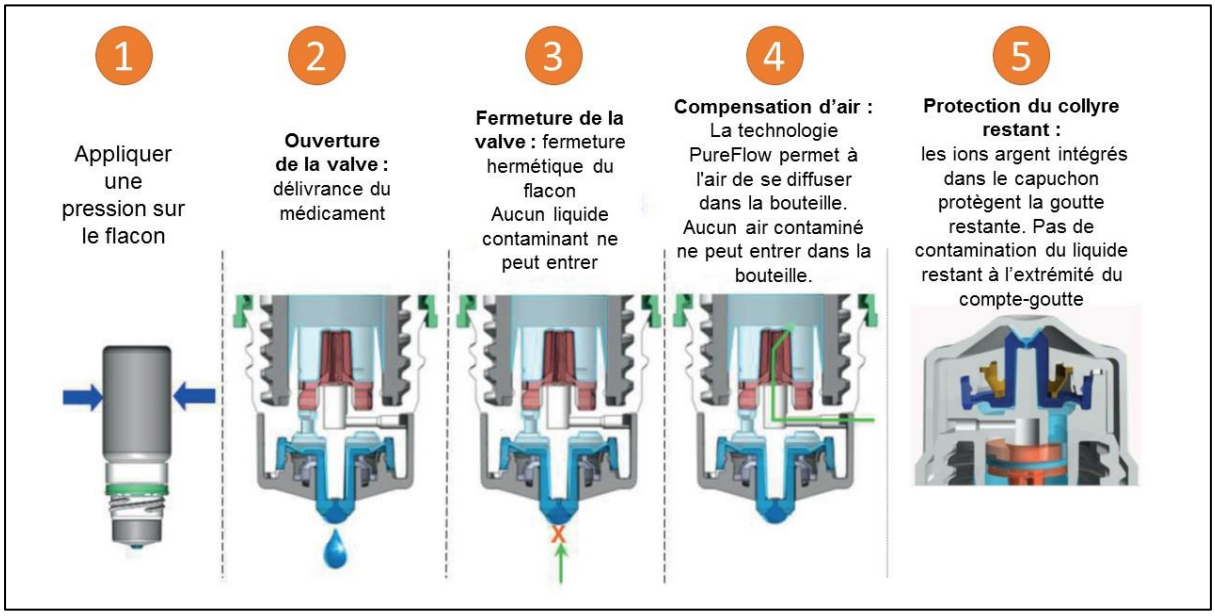


Figure 11 : Schéma du fonctionnement du dispositif Novelia adapté de la brochure des laboratoires Rexam

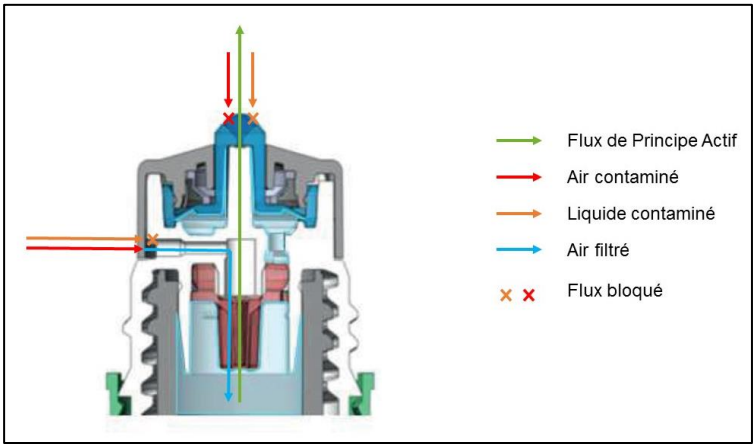


Figure 12 : Schéma du dispositif Novelia adapté de la brochure des laboratoires Rexam

Dans le cas de notre étude, nous avons choisi d'évaluer la stabilité des solutions ophtalmiques à 5% d'amikacine, de ceftazidime et de vancomycine dans deux types de conditionnements multidoses : des flacons en PolyEthylène Haute Densité (CAT, Montereau, France) et des flacons munis du dispositif Novelia® (Nemera, La Verpillière, France).

Enfin, le conditionnement doit permettre l'identification de la préparation par un étiquetage qui indiquera (31) :

+ La dénomination, le nom et l'adresse de la PUI de l'établissement ayant réalisée la dispensation
+ La dénomination de la préparation, sa forme pharmaceutique, sa voie d'administration et son dosage en principe actif
+ Le numéro d'ordonnancier ou le numéro de lot
+ La date limite d'utilisation
+ Le mode de conservation spécifique, le cas échéant
+ Des indications éventuelles aidant au bon usage de la préparation (posologie, mode d'utilisation, précautions d'emploi, présence d'excipients à effet notoire…)
+ Les mentions réglementaires selon l'article R. 5132-18 du CSP et, le cas échéant, l'article R. 5121-16 du CSP.

3. Préparations et contrôles

a) Préparations

(1) Environnement de travail

Les préparations stériles doivent être préparées dans des Zones à Atmosphères Contrôlées (ZAC) qui sont constituées de locaux et / ou d'équipements dont les qualités microbiologiques et particulaires sont maîtrisées et qui font l'objet de contrôles réguliers. Ces qualités sont obtenues notamment grâce à un traitement de l'air par un système équipé de filtre Haute Efficacité pour les Particules de l'Air (HEPA).

On distingue 4 classes de ZAC selon leur niveau de contamination (31). Chaque opération de préparation requiert un niveau approprié de propreté de l'environnement de façon à réduire le risque de contamination particulaire ou microbienne des matières premières et des préparations terminées. Les caractéristiques particulaires et les recommandations pour la surveillance microbiologique des quatre classes de ZAC sont présentées dans les tableaux n°4 et n°5.

Tableau 4 : Caractéristiques particulaires des différentes ZAC

	Au repos		En activité	
Classe	Nombre maximal autorisé de particules en m^3, de taille égale ou supérieure à			
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3500	0	3 500	0
B	3500	0	350 000	2 000
C	350 000	2 000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	NR	NR

Tableau 5 : Recommandations pour la surveillance microbiologique des ZAC en activité

Classe	Limites recommandées de contamination microbiologique			
	Echantillons d'air Ufc/m^3	Boîtes de Pétri (diamètre 90 mm) Ufc/4 heures	Gélose de contact (diamètre 55 mm) Ufc/plaque	Empreintes de gant (5 doigts) Ufc/gant
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Pour les procédés par filtration stérilisante et préparation aseptique, deux niveaux de risque sont définis (55) :

+ Le risque faible de contamination : lorsque la préparation est réalisée en système clos, avec du matériel stérile non réutilisable et des matières premières stériles. Le système clos est un système permettant le prélèvement et le transfert d'un produit stérile sans qu'il ne rentre en contact avec l'environnement.
+ Le risque élevé de contamination : lorsque la préparation est réalisée en système ouvert au moins lors d'une des étapes.

Le choix de la ZAC pour la réalisation d'une préparation stérile, comme les collyres, dépend du niveau de risque de contamination et du procédé de stérilisation.

Ainsi, pour un risque faible de contamination :

Tableau 6 : Recommandations pour le choix de la ZAC pour la réalisation d'une préparation stérile pour un risque faible de contamination

	Zone de préparation	Environnement immédiat
Isolateur en surpression	Classe A	Non classé
Isolateur en dépression	Classe A	Classe C
Salle à atmosphère contrôlée avec hotte à flux laminaire	Classe A	Classe C

Et, pour un risque élevé de contamination :

Tableau 7 : Recommandations pour le choix de la ZAC pour la réalisation d'une préparation stérile pour un risque élevé de contamination

	Zone de préparation	Environnement immédiat
Isolateur en surpression	Classe A	Non classé
Isolateur en dépression	Classe A	Classe C
Salle à atmosphère contrôlée avec hotte à flux laminaire	Classe A	Classe B

Au CHU de Bordeaux, les préparations ophtalmiques sont réalisées, par un préparateur habilité, sous un Poste de Sécurité Microbiologique de type II qui constitue un environnement de préparation de classe A. L'environnement immédiat dans la salle est de classe B. La salle dans l'environnement immédiat du Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) II est en surpression par rapport à l'environnement extérieur. Une gradation de la qualité particulaires et microbiologiques est respectée entre les différents locaux afin que la zone de préparation située sous un flux d'air laminaire présente les qualités particulaires et microbiologiques les plus élevées (classe A). Nos locaux et nos procédés de fabrication respectent donc les BPP.

(2) Protocole de fabrication

Les solutions ophtalmiques d'amikacine 5%, ceftazidime 5% et vancomycine 5% sont reconstituées sous une hotte à flux laminaire (PSM II) dans une salle à atmosphère contrôlée (ISO 7). Toutefois, comme la fabrication des collyres ne peut se faire en circuit entièrement clos, cela nécessite une asepsie rigoureuse lors de la production ainsi qu'un recours à une filtration stérilisante.

(a) Amikacine

Trois lots (A, B et C) de 12 collyres d'amikacine 5% sont réalisés de la façon suivante (Annexe 1) :

+ Prélever 50 mL de chlorure de sodium 0,9% avec une seringue de 50mL et transférer ce volume dans une poche vide
+ Prendre 10 flacons d'amikacine 500 mg (Mylan)
+ Prélever 50 mL d'eau PPI avec une seringue de 50 mL et reconstituer chaque flacon d'amikacine 500mg avec 5 mL d'eau PPI
+ Prélever l'ensemble des flacons avec une seringue de 50mL
+ Transférer ce volume de 50mL dans la poche préalablement remplie avec 50mL de chlorure de sodium 0,9%
+ Homogénéiser la poche
+ Prélever la solution avec une seringue de 50 mL, adapter un filtre plat de 0,22 µm et remplir chaque flacon de collyre avec 6 mL

(b) Ceftazidime

Trois lots (A, B et C) de 12 collyres de ceftazidime 5% sont réalisés de la façon suivante (Annexe 2) :

+ Prélever 50 mL de chlorure de sodium 0,9% avec une seringue de 50 mL et transférer ce volume dans une poche vide
+ Prendre 5 flacons de ceftazidime 1 g (Mylan)
+ Prélever 50 mL de chlorure de sodium 0,9% avec une seringue de 50 mL et reconstituer chaque flacon de ceftazidime 1 g avec 10 mL de chlorure de sodium 0,9%
+ Prélever l'ensemble des flacons avec une seringue de 50mL
+ Transférer ce volume de 50 mL dans la poche préalablement remplie avec 50 mL de chlorure de sodium 0,9%
+ Homogénéiser la poche
+ Prélever la solution, adapter un filtre plat de 0,22 µm et remplir chaque flacon de collyre avec 6 mL de solution.

(c) Vancomycine

Trois lots (A, B et C) de 12 collyres de vancomycine 5% sont réalisés de la façon suivante (Annexe 3) :

+ Injecter 20 mL de glucose 5% dans chaque flacon de Vancomycine 1 000 mg (Sandoz)
+ Homogénéiser les flacons et reprendre la solution ainsi reconstituée.
+ Prélever la solution avec une seringue de 50 mL, adapter un filtre plat de 0,22 µm et remplir chaque flacon de collyre avec 6 mL.

Les solutions ophtalmiques obtenues ont donc subi une filtration stérilisante à l'aide d'un filtre à 0,22 µm (PharmaAssure 0,2 µm, Pall Medical, Fribourg, Switzerland).

Elles sont ensuite conditionnées dans deux types de conditionnements multidoses :

+ des flacons en PolyEthylène Haute Densité (CAT, Montereau, France)
+ des flacons munis du dispositif Novelia® (Nemera, La Verpillière, France)

Une fois le remplissage terminé, le compte-goutte et le bouchon sont positionnés sur chaque flacon.

b) Contrôles

Les préparations terminées, en attente de contrôle, doivent être maintenues en quarantaine et les locaux de contrôle doivent être séparés des autres zones. Une fois terminée, les collyres en attente de contrôle sont envoyés au laboratoire pour y constituer le dossier de lots et les contrôles s'y afférant (Annexes 4, 5 et 6).

A chaque temps de prélèvement, les contrôles suivants sont réalisés (tableau n°8) :

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différents prélèvements et essais réalisés lors de l'étude de stabilité

	T = 0H	T = 90 jours	T = 90 jours + 4	T = 90 jours + 8	T = 90 jours + 14
pH	X	X	X	X	X
Osmolalité	X	X	X	X	X
Stérilité	X	X	X	X	X
Limpidité	X	X	X	X	X
Couleur	X	X	X	X	X
Dosage chimique	X	X			X

A chaque temps de prélèvement, quatre flacons de chaque lot de collyres sont prélevés :

+ Un pour les analyses physico-chimiques
+ Trois pour le contrôle de stérilité

Le pharmacien ou l'interne en charge des contrôles récupère l'ensemble des collyres constitutifs du lot et constitue le dossier de lot. Il réalise les premiers contrôles après la fabrication.

Il contrôle tout d'abord :

- L'adéquation entre l'identification, le numéro de lot, la péremption des matières premières et la fiche de fabrication
- Le nombre de flacons de principe actif correspondant à la fiche de fabrication
- Le nombre de flacons de collyres dans chaque lot correspondant à la fiche de fabrication et donc que la quantité de collyres préparée correspond à la quantité théorique de la fiche de fabrication
- L'étiquetage.

Trois échantillons de chaque lot de collyre sont ensuite prélevés pour réaliser :

+ Un dosage en teneur de principe actif par une méthode de spectrophotométrie UV-Visible-IR (Multispec, Microdom). La stabilité d'une solution est considérée comme satisfaisante lorsqu'il est retrouvé une concentration en principe actif au moins égale à 90% de la concentration en principe actif originale (17).
+ Un contrôle du pH avec un pH-mètre (pH meter CG 818, Schott Gerate, Mainz, Germany)
+ Un contrôle de l'osmolalité avec un osmomètre à abaissement cryoscopique (Osmometer Löser Type 15, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France)
+ Un contrôle visuel :
    - Contrôle de la limpidité : se fait par analyse visuelle des échantillons dans des tubes à essais identiques, de verre neutre, incolores et transparents. L'échantillon est alors comparé à de l'eau pour préparation injectable.
    - Contrôle de la couleur : en comparant dans un tube à essai le collyre à un instant t à de l'eau pour préparation injectable.
+ Un essai de stérilité par la méthode de filtration sur membrane : pour la fabrication d'un lot inférieur à 200 récipients (soit 200 collyres), la Pharmacopée Européenne impose d'examiner au moins 5% des récipients avec un minimum de deux (16). Comme nous devrions réaliser des lots de 12 collyres, l'essai de stérilité devra

examiner, au minimum, deux collyres par lot mais nous avons choisi de réaliser cet essai de stérilité sur trois collyres de chaque lot.

c) Stockage : congélation

Nous avons choisi la congélation car différentes études ont montré que ce mode de conservation permettait d'allonger parfois jusqu'à six mois la durée de péremption de ces collyres renforcés en antibiotiques tout en garantissant leur intégrité physico-chimique et leur stérilité (11,14,15,40,47).

Après avoir réalisé les différents contrôles, les collyres sont alors stockés au congélateur à -20°C, pendant 90 jours, à l'abri de la lumière. Un congélateur, dédié au stockage de ces préparations, se trouve dans la zone de stockage attenante à la salle de préparation.

4. Usage en vie réelle

Après 90 jours de congélation à -20°C, les collyres vont être décongelés par mise à température ambiante pendant 30 minutes. Nous avons opté pour ce mode de décongélation car celui-ci est rapide et pratique pour des préparations de faibles volumes, comme c'est le cas pour les collyres et qu'il ne nécessite pas de matériel particulier.

Après décongélation pendant 30 minutes à température ambiante, les contrôles suivants sont effectués sur des échantillons de chaque lot de collyres : pH, osmolalité, limpidité, coloration, essai de stérilité et dosage chimique.

Les collyres sont ensuite stockés au réfrigérateur, à +4°C, pendant 14 jours et une simulation d'usage en vie réelle est réalisée.

Pour cela, les collyres sont ouverts à J90 et des instillations sont simulées deux fois par jour à heures fixes (10h et 17h) tous les jours pendant 14 jours. Durant cette période d'utilisation simulée, les collyres sont stockés au réfrigérateur à +4°C.

B. Etude de stabilité physico-chimique

1. Stabilité physique

L'étude de stabilité physique est réalisée à 6 temps différents :

+ J0 : témoin
+ J90 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante
+ J90 + 4 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante et 4 jours d'utilisation simulée avec stockage à +4°C
+ J90 + 8 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante et 8 jours d'utilisation simulée avec stockage à +4°C
+ J90 + 14 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante et 14 jours d'utilisation simulée avec stockage à +4°C

A chaque temps de prélèvement, un flacon de chaque lot de collyre est utilisé pour effectuer les différentes analyses physiques.

a) Contrôle visuel : coloration, limpidité

- Limpidité

Dans une étude de stabilité, le contrôle visuel de la limpidité permet de vérifier, d'une part, que le produit est correctement dissout et, d'autre part, qu'il n'existe pas de modification de l'aspect au cours du temps qui témoignerait d'une altération de la préparation traduite par un trouble ou un précipité (17).

Le contrôle de la limpidité se fait par analyse visuelle des échantillons dans des tubes à essais identiques, de verre neutre, incolores et transparents. L'échantillon est alors comparé à de l'eau pour préparation injectable. Les liquides sont examinés dans l'axe du tube sur fond noir et sur fond blanc en opérant à la lumière diffuse du jour. Un liquide est considéré comme limpide si sa limpidité correspond à celle de l'eau pour préparations injectables (56).

- Couleur

Le changement de couleur d'une solution pharmaceutique est un marqueur de changement de composition du produit. La couleur des collyres sera déterminée par un contrôle visuel en comparant dans un tube à essai le collyre à un instant t à une solution de référence à la même concentration préparée extemporanément. Il ne doit pas y avoir de différence visible.

Ainsi, les solutions seront considérées comme stables si aucun trouble, précipité ni particule n'est détecté.

b) pH

Le pH des collyres est mesuré par un pH-mètre (pH meter CG 818, Schott Gerate, Mainz, Germany). La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes plongeant dans la solution à examiner (57).

Des solutions tampons (pH = 4 et pH = 7) sont utilisées pour effectuer la calibration de l'appareil. Ces solutions tampons proviennent du laboratoire VWR Chemicals.

La sonde du pH-mètre est plongée dans le collyre. Après avoir attendu la stabilisation de la valeur numérique du pH, le résultat est obtenu directement.

A chaque temps d'analyse, trois mesures du pH sont effectuées sur chacun des trois collyres de lots différents, ce qui permet d'obtenir neuf échantillons.

c) Osmolalité

L'osmolalité est mesurée grâce à un osmomètre (Osmometer Löser Type 15, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) par la mesure de l'abaissement cryoscopique ΔT et s'exprime en mmOsm/kg (58).

$$\xi = [\Delta T / 1{,}86] \times 1000 \text{ mOsm/kg}$$

Des solutions de calibration à 0, 300 et 900 mOsm/kg (Löser™ Standard Solution, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) sont utilisées pour le calibrage de l'appareil tandis que des solutions de contrôle (Pediaven Nouveau-Né 1 ; 2 et Olimel N7E) sont quant à elles utilisées pour la vérification journalière du bon fonctionnement de l'appareil. Une fois les étapes de calibration et de vérification du bon fonctionnement de l'appareil effectuées, une faible quantité de collyre est prélevée dans un microtube et insérée dans la machine. Il s'en suit une congélation de l'échantillon et la mesure de l'abaissement cryoscopique.

A chaque temps d'analyse, trois mesures de l'osmolalité sont effectuées sur chacun des trois collyres de lots différents, ce qui permet d'obtenir neuf échantillons.

Figure 13 : Osmomètre cryoscopique

2. Suivi de la concentration en principe actif

Dans cette étude, nous avons choisi de réaliser uniquement un suivi des caractéristiques physico-chimiques des collyres car de nombreux travaux ont déjà démontré la stabilité physico-chimique de collyres renforcés en antibiotiques après une période de congélation dans des conditions similaires.

En effet, deux études précédemment menées par Chédru-Legros *et al.* ont montré la stabilité physique et chimique des collyres d'amikacine, de ceftazidime et de vancomycine à 5% conservés à -20°C pendant 3 mois et 6 mois (14,40).

Ainsi, nous nous sommes placés dans des conditions similaires à ces deux études et un contrôle de la concentration en principe actif a été effectué par dosage par un spectrophotomètre UV-Visible-IR (Multispec, Microdom®).

C. Etude de stabilité microbiologique

La stérilité est un critère obligatoire pour toutes les formes ophtalmiques. Elle assure la sécurité microbiologique de la préparation. L'état stérile est obtenu par l'utilisation d'une technique de fabrication respectant des règles d'asepsie. Ce processus permet ainsi d'assurer un état initial stérile mais n'assure pas la conservation de l'état stérile au cours de l'utilisation du collyre. L'objectif de cette étude de stérilité est donc de démontrer la conservation dans le temps de l'état stérile de la préparation jusqu'à utilisation (16).

Deux méthodes d'ensemencement des milieux sont proposées dans la Pharmacopée Européenne pour l'essai de stérilité (16) : la méthode par ensemencement direct et la filtration

sur membrane. Pour effectuer notre essai de stérilité, nous avons opté pour la méthode de filtration sur membrane. Le choix du test de stérilité a été guidé par les particularités des préparations ophtalmiques et la nécessité de neutraliser l'activité antimicrobienne. La filtration sur membrane est la technique de choix pour les tests de stérilité et la Pharmacopée Européenne recommande d'utiliser cette méthode dès que la nature du produit testé le permet. De plus, bien que la méthode d'ensemencement direct permette d'obtenir des résultats plus rapidement, sa sensibilité est plus faible et elle ne permet pas une neutralisation optimale de l'activité antimicrobienne du collyre.

Quelle que soit la méthode utilisée, celle-ci doit être validée pour chaque préparation à contrôler. En effet, l'essai de stérilité proprement dit doit être associé à un essai de validation préalable : la validation de la fertilité des milieux de culture utilisés pour l'ensemencement et la vérification que la préparation ne présente pas, par elle-même, un effet inhibiteur sur la croissance microbienne. Les étapes de cet essai de validation seront décrites ci-après.

1. Sélection et reconstitution des souches microbiennes

Les micro-organismes utilisés pour réaliser l'essai de stérilité microbiologique ont été choisies selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne : *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (NCTC 13167), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Toutes les souches microbiennes ont été fournies par Eurofins (BioRéférence, Eurofins Scientific, Luxembourg).

Ces souches microbiennes se présentent sous forme de comprimés lyophilisés, conditionnés individuellement dans des tubes stériles. Chaque comprimé contient une quantité fixe et calibrée de micro-organismes et est fourni avec un certificat d'analyse. Les comprimés de souches microbiennes sont reconstitués avec du bouillon de tryptone et des dilutions en série sont réalisées pour garantir que 1 mL de solution contienne bien 50 Unités Formant Colonies (UFC) de micro-organismes.

2. Echantillonnage

La stérilité du lot de fabrication doit être vérifiée sur un échantillon représentatif de ce lot.

Les conditions d'échantillonnage sont précisées par la Pharmacopée et les BPP, à savoir :

- Pour une préparation liquide de 1 à 40 mL, la quantité minimale à utiliser pour chaque milieu est de la moitié de chaque récipient mais pas moins de 1mL.
- Dans le cas particulier des liquides antibiotiques, le volume prescrit par la Pharmacopée est de 1 mL quel que soit le volume de la préparation.
- Le nombre minimal d'unités du lot de fabrication à examiner dépendra de la taille du lot. Pour un lot ≤ 200 unités, le nombre minimal d'unités du lot à examiner sera de 5%, et au minimum 2.

En prenant en compte ces recommandations, à chaque temps de prélèvement, trois collyres de chaque lot sont prélevés pour réaliser l'essai de stérilité.

3. Protocole

L'essai de stérilité est une validation du processus de stérilisation ou des procédés de préparation aseptique. La technique d'analyse doit se dérouler dans des conditions aseptiques afin d'éviter toute contamination microbienne qui ne soit pas liée au collyre. C'est pourquoi, les manipulations se font sous hotte à flux laminaire dans un environnement contrôlé (ISO 8). Un schéma de la réalisation de l'essai de stabilité microbiologique est présenté en annexe 7.

a) Essai de fertilité

L'essai de fertilité a pour objectif de démontrer la fertilité des milieux de culture. Il consiste à ensemencer des fractions séparées du milieu de culture utilisé lors de l'essai de stérilité avec 10 à 100 UFC des souches microbiennes reconstituées. A savoir dans notre cas : *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (NCTC 13167), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Ces fractions de milieu de culture sont ensuite incubées 3 à 5 jours selon les micro-organismes.

Pour cela, une rampe de filtration à vide 3 postes en acier inoxydable (Merck, Millipore) est installée sur un champ stérile sous une hotte à flux laminaire. Des dispositifs de filtration Sterisure (Merck, Millipore) munis de membrane en PVDF de 0,45 µm sont fixés sur les 3 postes et un vide est préalablement réalisé, grâce à une pompe à vide reliée à la rampe de filtration, de façon a bien fixer la membrane au fond de chaque canister.

Figure 14 : Dispositif de filtration sterisure membrane en esters de cellulose 0,45 µm

Figure 15 : Rampe de filtration à vide 3 postes en acier inoxydable

Six témoins positifs sont ensuite réalisés de la façon suivante :

- 1 mL soit 50 UFC d'une des 6 souches microbiennes est ensemencé dans un canister à l'aide d'une seringue à tuberculine stérile
- Allumage du vide pendant 10 secondes puis celui-ci est coupé
- Les canisters sont alors retirés de la rampe de filtration et fermés par un bouchon stérile à l'extrémité inférieure
- 100 mL de milieu de culture au trypcase-soja est ensuite ajouté dans chacun des 6 canisters puis ceux-ci sont fermés à l'extrémité supérieure par un capuchon stérile.

On obtient donc 6 témoins positifs, chacun ensemencé avec une des 6 souches microbiennes. Ces canisters sont ensuite incubés dans une enceinte thermostatée pendant :

- 3 jours à 30°C pour les souches bactériennes : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (NCTC 13167), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
- 5 jours à 25°C pour les souches fongiques : *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) et *Candida albicans* (ATCC 10231)

Trois témoins négatifs sont également réalisés en incubant 100 mL de bouillon trypcase-soja dans les dispositifs de filtration Sterisure pendant 5 jours à une température de 30°C.

L'essai de fertilité sera validé si une croissance des micro-organismes est clairement observable dans le milieu de culture des témoins positifs et si aucune croissance n'est observée dans les milieux de culture des témoins négatifs.

b) Essai d'applicabilité de la méthode

Dans un second temps, un essai d'applicabilité de la méthode est réalisé. Il permet de s'assurer que cette technique ne fera pas obstacle à une croissance microbienne clairement observable et visuellement comparable à celle observée avec le témoin positif.

Étant donné que nos solutions ophtalmiques ont une activité antimicrobienne, un test de neutralisation de cette activité doit impérativement précéder le test de stérilité afin de ne pas inhiber le développement de micro-organismes, ce qui pourrait conduire à de faux négatifs (16,17). L'inhibition de l'activité antimicrobienne est effectuée, dans notre cas, par rinçage avec de l'eau versable stérile (Versylène®, Fresenius Kabi, Sèvres, France) de la membrane en PVDF des dispositifs Sterisure après filtration du produit à tester.

Le volume d'eau stérile nécessaire à l'élimination totale de l'activité antibiotique a été préalablement déterminé, grâce aux données de la littérature, à 750 mL pour l'amikacine, 500 mL pour la ceftazidime et 300 mL pour la vancomycine (14,40).

L'essai d'applicabilité de la méthode a alors été réalisé de la façon suivante :

- Mise en place de la rampe de filtration et de la pompe à vide sur un champ stérile sous une hotte à flux laminaire
- Fixation des dispositifs Sterisure sur les pores d'entrée de la rampe de filtration
- Après avoir désinfecté les collyres avec du Surfa'safe® (Anios, Lezennes, France), le bouchon du collyre est retiré en veillant à ne pas toucher le compte-gouttes du flacon. Un millilitre du collyre est prélevé avec une seringue stérile à travers le compte-gouttes et transvasé sur la membrane.
- La membrane est ensuite rincée avec le volume approprié d'eau stérile de façon à inhiber l'activité antimicrobienne du produit testé.

Après rinçage, la membrane a été incubée dans un bouillon de trypticase soja contenant un inoculum de 50 UFC pendant 5 jours. Les souches microbiennes utilisées pour valider l'essai d'applicabilité de la méthode sont les suivantes :

- Pour l'amikacine : *Bacillus subtilis, Escherichia coli* et *Candida albicans*
- Pour la ceftazidime : *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* et *Aspergillus brasiliensis*
- Pour la vancomycine : *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* et *Aspergillus brasiliensis*

La validation de cet essai d'applicabilité de la méthode est ensuite qualitative : l'obtention après incubation d'une croissance microbienne clairement observable (dans les canisters) et visuellement comparable à celle observée avec le témoin positif (réalisée lors de l'essai de fertilité), signifie que le produit ne possède pas d'activité antimicrobienne dans les conditions de l'essai ou que son activité microbienne a été éliminée de façon satisfaisante. L'essai de stérilité, à proprement parler, peut alors être effectué sans autre modification.

c) Essai de stérilité

L'étude de la stabilité microbiologique est réalisée, pour les deux types de conditionnements, à 5 temps différents :

- J0 : témoin
- J90 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante
- J90 + 4 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante et 4 jours d'utilisation simulée avec stockage à +4°C
- J90 + 8 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante et 8 jours d'utilisation simulée avec stockage à +4°C
- J90 + 14 : après 90 jours de congélation à -20°C puis 30 minutes de décongélation à température ambiante et 14 jours d'utilisation simulée avec stockage à +4°C

A chaque temps de prélèvement et pour chaque type de conditionnement, trois flacons de chaque lot de collyre sont utilisés pour effectuer l'essai de stérilité. Un contrôle négatif et un contrôle positif sont également réalisés pour chaque temps défini.

L'essai de stérilité se déroule de la façon suivante (Fig. 16) :

+ Mise en place de la rampe de filtration et de la pompe à vide sur un champ stérile sous une hotte à flux laminaire
+ Fixation des dispositifs Sterisure sur les pores d'entrée de la rampe de filtration
+ Après avoir désinfecté les collyres avec du Surfa'safe® (Anios, Lezennes, France), le bouchon du collyre est retiré en veillant à ne pas toucher le compte-gouttes du flacon. Un millilitre du collyre est prélevé avec une seringue stérile à travers le compte-gouttes et transvasé sur la membrane.
+ La membrane est ensuite rincée avec le volume approprié d'eau stérile de façon à inhiber l'activité antimicrobienne du produit testé
+ Après rinçage, la membrane est incubée dans un bouillon de trypcase-soja pendant 14 jours.

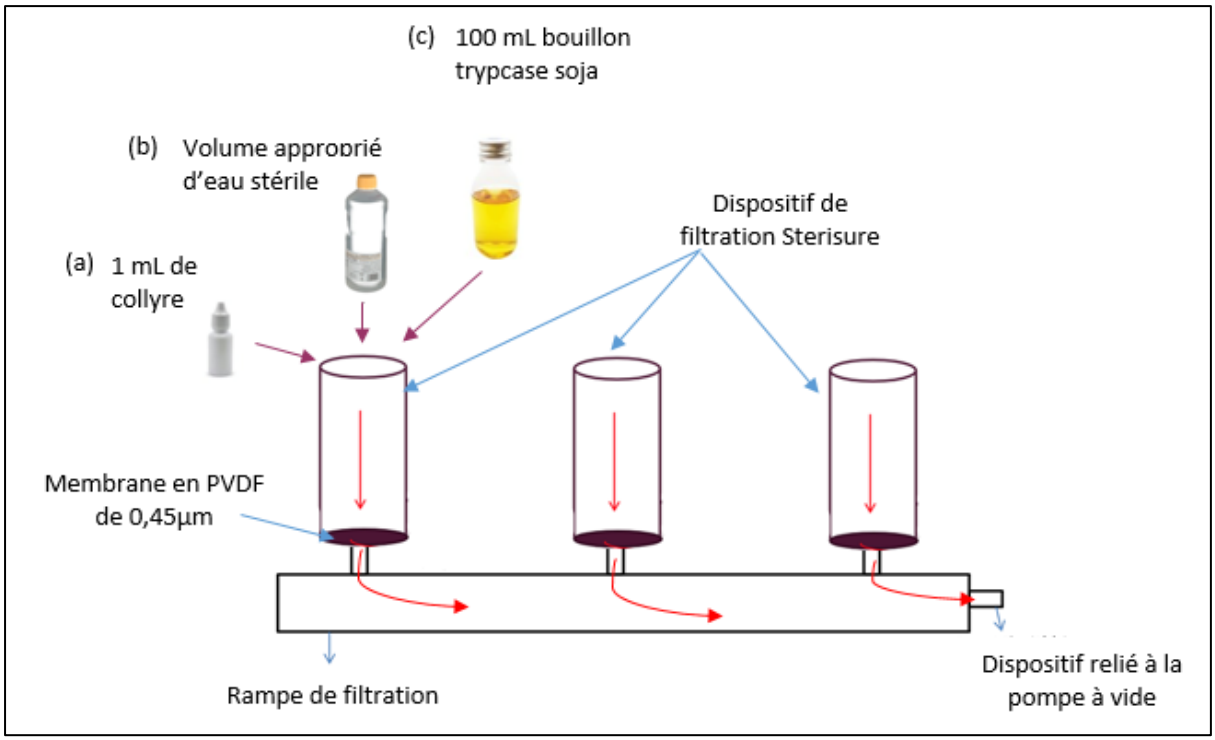


Figure 16 : Schéma de l'essai de stérilité

Chaque échantillon est ensuite incubé dans une enceinte thermostatée à 30°C et lu à J3, J7 et J14. La stérilité du collyre est validée si aucune croissance microbienne n'est observée pour les trois collyres de chaque lot testé et pour le témoin négatif, et qu'une croissance microbienne est observée pour le témoin positif.

III. Résultats

A. Amikacine

1. Stabilité physique

a) pH

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

A J0, les solutions d'amikacine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont un pH compris entre 6,41 et 6,60. Le pH moyen est de 6,50 (± 0,05). Ces valeurs de pH permettent une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, les mesures du pH des solutions d'amikacine sont comprises entre 6,17 et 6,26 avec une valeur moyenne de 6,20 (± 0,03). Le pH a diminué en moyenne de 4,1% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% **avec** $|\boldsymbol{Tobservé}|$ **= 12,36 > $T_{critique}$ = 2,12** et **p-value = $1{,}34.10^{-9}$** (Tableau n°9)

Tableau 9 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90
Moyenne	6,5	6,2
Ecart-type	0,0571	0,0305
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	12,36	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne du pH est de 6,10 (± 0,13) avec des valeurs comprises entre 5,99 et 6,40.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, le pH moyen des solutions d'amikacine est de 6,20 (± 0,31) avec des valeurs comprises entre 6,03 et 7,01.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, le pH des solutions d'amikacine est compris entre 5,95 et 6,22 avec une valeur moyenne de 6,10 (± 0,11). Cela correspond à une diminution de 6,1% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec $|\boldsymbol{Tobservé}|$ **= 9,53 > $T_{critique}$ = 2,12** et **p-value = $5{,}33.10^{-8}$** (Tableau n°10)

Tableau 10 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90+14
Moyenne	6,5	6,1
Ecart-type	0,0571	0,1102
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	9,53	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des pH à J0, J90 et J90+14, l'ensemble des valeurs de pH mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions d'amikacine 5% conditionnées en flacons en PEHD sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des pH mesurés pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon PEHD sont présentés en annexe 8.

(2) Conditionnement Novelia®

A J0, les solutions d'amikacine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont un pH compris entre 6,13 et 6,26. Le pH moyen est de 6,20. Ces valeurs de pH sont compatibles avec une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, les mesures du pH des solutions d'amikacine sont comprises entre 6,31 et 6,41 avec une valeur moyenne de 6,36 (± 0,03). Le pH a augmenté en moyenne de 2,6% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% $|\boldsymbol{Tobservé}|$ **= -10,16 > $T_{critique}$ = 2,12** et **p-value = $4{,}71.10^{-8}$** (Tableau n°11)

Tableau 11 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90
Moyenne	6,19	6,36
Ecart-type	0,04	0,03
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-10,16	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne du pH est de 6,30 (± 0,06) avec des valeurs comprises entre 6,17 et 6,35.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, le pH moyen des solutions d'amikacine n'a pas varié par rapport au point précédent et est toujours de 6,30 (± 0,02) avec des valeurs comprises entre 6,23 et 6,29.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, le pH des solutions d'amikacine est compris entre 6,21 et 6,35 avec une valeur moyenne de 6,27 (± 0,06). Cela correspond à une augmentation de 1,3% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% $|\boldsymbol{Tobserv}é|$ **= -3,519 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,0033** (Tableau n°12)

Tableau 12 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90+14
Moyenne	6,19	6,27
Ecart-type	0,04	0,06
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-3,519	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des pH à J0, J90 et J90+14, l'ensemble des valeurs de pH mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions d'amikacine 5% conditionnées en flacons Novelia® sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des pH mesurés pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® sont présentés en annexe 9.

b) Osmolalité

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

A J0, les solutions d'amikacine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont une osmolalité comprise entre 232 et 236 mOsm/kg. L'osmolalité moyenne est de 233,4 mOsm/kg (± 1,2).

Ces valeurs d'osmolalité sont compatibles avec une tolérance oculaire correcte malgré des valeurs basses.

Après 90 jours de congélation, l'osmolalité des solutions d'amikacine présente une valeur moyenne de 230,7 mOsm/kg (± 7,73). Les mesures sont comprises entre 220 et 243 mOsm/kg. L'osmolalité a diminué en moyenne de 1,2% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des osmolalités à J0 et J90 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% avec $|\boldsymbol{Tobserv}é|$ **= 1,064 < $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,303** (Tableau n°13).

Tableau 13 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90
Moyenne	233,4	230,7
Ecart-type	1,2	7,73
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	1,064	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne des osmolalités est de 232,7 mOsm/kg (± 2,74) avec des valeurs comprises entre 228 et 235 mOsm/kg.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité moyenne des solutions d'amikacine est de 232,7 mOsm/kg (± 3,35) avec des valeurs comprises entre 226 et 236 mOsm/kg.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité des solutions d'amikacine est compris entre 230 et 248 mOsm/kg avec une valeur moyenne de 237,7 mOsm/kg (± 6,34). Cela correspond à une augmentation de 1,8% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% avec $|\boldsymbol{Tobserv}é|$ **= -1,960 < $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,084** (Tableau n°14)

Tableau 14 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90+14
Moyenne	233,4	237,7
Ecart-type	1,2	6,34
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-1,96	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

L'ensemble des valeurs d'osmolalités mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions d'amikacine 5% conditionnées en flacons en PEHD sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des osmolalités mesurées pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon PEHD sont présentés en annexe 10.

(2) Conditionnement Novelia®

A J0, les solutions d'amikacine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont une osmolalité comprise entre 230 et 240 mOsm/kg. L'osmolalité moyenne est de 233,1 mOsm/kg (± 3,1). Ces valeurs d'osmolalité sont compatibles avec une tolérance oculaire correcte malgré des valeurs basses.

Après 90 jours de congélation, l'osmolalité des solutions d'amikacine présente une valeur moyenne de 231,4 mOsm/kg (± 4,64). Les mesures sont comprises entre 226 et 242 mOsm/kg. L'osmolalité a diminué en moyenne de 0,7% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des osmolalités à J0 et J90 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% avec $|\boldsymbol{Tobservé}|$ **= 0,830 < $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,419** (Tableau n°15)

Tableau 15 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90
Moyenne	233,1	231,6
Ecart-type	3,1	4,67
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	0,83	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne des osmolalités est de 236,3 mOsm/kg (± 3,91) avec des valeurs comprises entre 226 et 242 mOsm/kg.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité moyenne des solutions d'amikacine est de 237 mOsm/kg (± 7,04) avec des valeurs comprises entre 232 et 248 mOsm/kg.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité des solutions d'amikacine est compris entre 224 et 234 mOsm/kg avec une valeur moyenne de 228,9 mOsm/kg (± 3,14). Cela correspond à une diminution de 1,2% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% avec |**Tobserv**é| **= 1,422 < $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,17** (Tableau n°16)

Tableau 16 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour l'amikacine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90+14
Moyenne	233,1	230,2
Ecart-type	3,1	3,35
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	1,4222	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

L'ensemble des valeurs d'osmolalités mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions d'amikacine 5% conditionnées en flacons Novelia® sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des osmolalités mesurées pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® sont présentés en annexe 11.

c) *Limpidité et coloration*

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

Les résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité sont répertoriés dans le tableau n°17.

Tableau 17 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité

	Lot	**Limpidité**	**Couleur**	**Lot**	**Limpidité**	**Couleur**	**Lot**	**Limpidité**	**Couleur**
J0	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+4	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+8	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+14	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE

Les collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons en PEHD sont restés incolores et limpides après 3 mois de congélation à -20°C. De même, ils sont restés incolores et limpides pendant 14 jours après ouverture et utilisation simulée.

(2) Conditionnement Novelia®

Les résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont répertoriés dans le tableau n°18.

Tableau 18 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia®

	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur
J0	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+4	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+8	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+14	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE

Les collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont restés incolores et limpides après 3 mois de congélation à -20°C. De même, ils sont restés incolores et limpides pendant 14 jours après ouverture et utilisation simulée.

2. Suivi de la concentration en principe actif

Les résultats du suivi des concentrations en principe actif sont présentés dans le tableau n°19.

Tableau 19 : Résultats du suivi des concentrations en principe actif pour l'amikacine 5%

		J0	J90	J90+14
PolyEthylène Haute Densité	Lot A	47,7 mg/L	50,2 mg/L	48,5 mg/L
	Lot B	48,2 mg/L	50,2 mg/L	48,9 mg/L
	Lot C	48,0 mg/L	49,9 mg/L	48,8 mg/L
Novelia®	Lot A	47,9 mg/L	46,7 mg/L	48,6 mg/L
	Lot B	48,3 mg/L	46,7 mg/L	49,4 mg/L
	Lot C	48,1 mg/L	45,9 mg/L	49,5 mg/L

Le suivi des concentrations en principe actif par spectrophotométrie ne montre de variation significative de la concentration en amikacine entre J0 et J90 dans les deux types de conditionnements. De plus, les concentrations en amikacine sont restées stables pendant les 14 jours d'utilisation simulée ayant suivis les 3 mois de congélation.

3. Stabilité microbiologique

a) Essai de fertilité

Après avoir ensemencé des canisters contenant 100 mL de bouillon trypcase-soja avec 50 UFC d'une des six souches microbiennes suivantes : *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (NCTC 13167), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), des lectures sont effectuées à J1, J3 et J5. Les résultats microbiologiques des bouillons de culture sont présentés dans le tableau n°20.

Tableau 20 : Résultats de l'essai de fertilité pour les collyres d'amikacine 5%

Souche	Lecture à J1	Lecture à J3	Lecture à J5
Aspergillus brasiliensis	**-**	**+**	**+**
Bacillus subtilis	**+**	**+**	**+**
Candida albicans	**-**	**-**	**+**
Escherichia coli	**+**	**+**	**+**
Pseudomonas aeruginosa	**+**	**+**	**+**
Staphylococcus aureus	**-**	**+**	**+**
Contrôle interne	**-**	**-**	**-**
	-	**-**	**-**

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Ces résultats permettent de démontrer la stérilité des bouillons de culture non ensemencés comme le confirme l'absence de turbidité des témoins négatifs. Ils permettent également de démontrer la fertilité du milieu de culture au trypcase-soja par l'obtention d'une turbidité dans chacun des canisters ensemencé avec une des six souches microbiennes traduisant ainsi une croissance microbienne.

b) Essai d'applicabilité de la méthode

Un test de neutralisation de l'activité antimicrobienne des solutions ophtalmiques d'amikacine à 5% est ensuite réalisé afin de ne pas inhiber le développement de micro-organismes, ce qui pourrait conduire à de faux négatifs. L'inhibition de cette activité antimicrobienne est effectuée par rinçage avec 750 mL d'eau versable stérile (Versylène®, Fresenius Kabi, Sèvres, France) de la membrane en PVDF des dispositifs Sterisure (canisters) après filtration de 1 mL de collyres d'amikacine 5%.

Trois souches microbiennes sont testées dans le cadre de ce test d'inhibition de l'activité antimicrobienne des solutions ophtalmiques d'amikacine 5% : *Bacillus subtilis, Escherichia coli* et *Candida albicans*

Les résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres d'amikacine à 5% sont présentés dans le tableau n°21.

Tableau 21 : Résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres d'amikacine à 5%

Filtration			Lecture à J1	Lecture à J3	Lecture à J5
Amikacine Lot A N°91 012		1 mL collyre + 50 UFC de B. subtilis + 750 mL d'eau versable stérile	-	-	+
			-	+	+
			-	+	+
	Témoin positif	50 UFC de B. subtilis + 750 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	750 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Amikacine Lot B N°91 013		1 mL collyre + 50 UFC de E. coli + 750 mL d'eau versable stérile	+	+	+
			+	+	+
			+	+	+
	Témoin positif	50 UFC de E. coli + 750 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	750 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Amikacine Lot C N°91 014		1 mL collyre + 50 UFC de C. albicans + 750 mL d'eau versable stérile	-	-	+
			-	-	+
			-	-	+
	Témoin positif	50 UFC de C. albicans + 750 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	750 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

L'obtention, après incubation, d'une turbidité dans les canisters traduisant une croissance microbienne qui est clairement observable et visuellement comparable à celle observée avec les témoins positifs, signifie que l'activité antimicrobienne du collyre d'amikacine 5% a été éliminée de façon satisfaisante dans les conditions de l'essai.

Un rinçage avec 750 mL d'eau stérile versable a permis aux bactéries et champignons de se développer dans le bouillon de culture au trypcase soja. Ainsi, une turbidité a été observée dès le premier jour pour *Escherchia coli*, au troisième jour pour *Bacillus subtilis* et au 5ème jour pour *Candida albicans.*

L'ensemble des souches microbiennes testées se sont donc développées rapidement permettant ainsi de valider l'essai d'applicabilité de la méthode. Le protocole de rinçage mis en place avec 750 mL d'eau versable stérile permet de correctement inhiber l'activité antimicrobienne de l'amikacine. L'essai de stérilité des collyres peut donc être envisagé selon ce protocole.

c) Essai de stérilité

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

Les résultats de l'essai de stérilité des collyres à l'amikacine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité sont répertoriés dans le tableau n°22.

Tableau 22 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à l'amikacine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité

Amikacine 50 mg/ml										
		Lot A			**Lot B**			**Lot C**		
		Lecture J3	**Lecture J7**	**Lecture J14**	**Lecture J3**	**Lecture J7**	**Lecture J14**	**Lecture J3**	**Lecture J7**	**Lecture J14**
J0 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90+4 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90+8 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90+14 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Une croissance microbienne est observée à J90 pour le collyre B2. Il s'agit probablement d'une contamination environnementale survenue lors de la période d'incubation et provenant d'une mauvaise fermeture du canister car les résultats pour le collyre B2 indiquent que celui-ci est stérile à J90+4 et J90+8.

A J90+14, soit après 14 jours d'utilisation simulée, les collyres B2, B3, C2 et C3 ne sont plus stériles.

(2) Conditionnement Novelia®

Les résultats de l'essai de stérilité des collyres à l'amikacine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont répertoriés dans le tableau n°23.

Tableau 23 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à l'amikacine 5% conditionnés en flacons Novelia®

Amikacine 50 mg/ml											
		Lot A			Lot B			Lot C			
		Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14	Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14	Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14
J0 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90+4 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90+8 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J90+14 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Une croissance microbienne est observée à J0 pour le collyre B2. Il s'agit probablement d'une contamination environnementale survenue lors de la manipulation.

A J90+14, soit après 14 jours d'utilisation simulée, l'ensemble des collyres d'amikacine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia sont stériles.

4. Synthèse

Concernant la stabilité physique, quel que soit le conditionnement utilisé pour les collyres d'amikacine 5%, les valeurs de pH et d'osmolalité sont restées compatibles avec une administration intra-oculaire pendant toute la durée de l'étude soit de J0 à J90+14.

L'ensemble des solutions ophtalmiques d'amikacine 5% sont restées limpides et incolores, dans les deux types de conditionnements entre J0 et J90+14.

Le suivi des concentrations en principe actif par spectrophotométrie n'a pas montré de variation significative de la concentration en amikacine entre J0 et J90 dans les deux types de conditionnements. De plus, les concentrations en amikacine sont restées stables pendant les 14 jours d'utilisation simulée ayant suivis les 3 mois de congélation.

Concernant la stabilité microbiologique, dans les conditionnements en PEHD, la stérilité des collyres d'amikacine 5% est démontrée après 3 mois de congélation à -20°C suivis d'une décongélation à température ambiante. Après ouverture, lors d'une utilisation journalière, la stérilité des collyres est maintenue pendant 8 jours lors d'une conservation entre 2 et 8°C.

Dans les conditionnements munis du dispositif Novelia®, la stérilité des collyres d'amikacine 5% est également démontrée après 3 mois de congélation à -20°C suivis d'une décongélation à température ambiante. Après ouverture, lors d'une utilisation journalière, la stérilité des collyres est maintenue jusqu'à 14 jours lors d'une conservation entre 2 et 8°C.

L'ensemble de ces résultats permettent de fixer la stabilité des collyres à 5% d'amikacine à 8 jours après ouverture, avec un stockage entre 2 et 8°C après 3 mois de congélation -20°C lorsqu'ils sont conditionnés en flacons en PEHD.

Toutefois, lorsqu'ils sont conditionnés en flacons Novelia®, la stabilité peut être étendue à 14 jours après ouverture avec un stockage entre 2 et 8°C après 3 mois de congélation -20°C.

B. Ceftazidime

1. Stabilité physique

a) pH

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

A J0, les solutions de ceftazidime 5% des trois lots de collyres A, B et C ont un pH compris entre 6,98 et 7,70. Le pH moyen est de 7,20 (± 0,22). Ces valeurs de pH permettent une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, les mesures du pH des solutions de ceftazidime sont comprises entre 7,15 et 7,30 avec une valeur moyenne de 7,24 (± 0,06). Le pH a augmenté en moyenne de 0,4% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des pH à J0 et J90 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% **avec |Tobservé| = -0.428 < $T_{critique}$ = 2,12** et **p-value = 0,674** (Tableau n°24).

Tableau 24 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90
Moyenne	7,2	7,24
Ecart-type	0,2189	0,0557
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-0,428	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne du pH est de 6,96 (± 0,07) avec des valeurs comprises entre 6,86 et 7,10.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, le pH moyen des solutions de ceftazidime est de 7,05 (± 0,15) avec des valeurs comprises entre 6,90 et 7,40.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, le pH des solutions de ceftazidime est compris entre 6,98 et 7,05 avec une valeur moyenne de 7,02 (± 0,02). Cela correspond à une diminution de 2,6% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec **$T_{observé}$ = 2,517 > $T_{critique}$ = 2,12** et **p-value = 0,023** (Tableau n°25)

Tableau 25 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90+14
Moyenne	7,2	7,02
Ecart-type	0,2189	0,02
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	2,517	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des pH à J0 et J90+14, l'ensemble des valeurs de pH mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions de ceftazidime 5% conditionnées en flacons en PEHD sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des pH mesurés pour la ceftazidime à 50 mg/mL conditionnés en flacon en PEHD sont présentés en annexe 12.

(2) Conditionnement Novelia®

A J0, les solutions de ceftazidime 5% des trois lots de collyres A, B et C ont un pH compris entre 6,70 et 7,10. Le pH moyen est de 6,98 (± 0,13). Ces valeurs de pH sont compatibles avec une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, les mesures du pH des solutions de ceftazidime sont comprises entre 6,92 et 7,07 avec une valeur moyenne de 7,01 (± 0,06). Le pH a augmenté en moyenne de 0,5% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des pH à J0 et J90 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% **|Tobservé| = -0,710 < $T_{critique}$ = 2,12** et **p-value = 0,488** (Tableau n°26)

Tableau 26 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90
Moyenne	6,98	7,01
Ecart-type	0,1284	0,0581
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-0,71	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne du pH est de 7,28 (± 0,09) avec des valeurs comprises entre 7,20 et 7,40.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, le pH moyen des solutions de ceftazidime est de 7,54 (± 0,09) avec des valeurs comprises entre 7,36 et 7,70.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, le pH des solutions de ceftazidime est compris entre 7,20 et 7,49 avec une valeur moyenne de 7,37 (± 0,11). Cela correspond à une augmentation de 5,5% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% |**Tobservé**| **= -6,760 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 4,582.10^{-6}** (Tableau n°27)

Tableau 27 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90+14
Moyenne	6,98	7,37
Ecart-type	0,1284	0,1131
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-6,76	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des pH à J0 et J90+14, l'ensemble des valeurs de pH mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions de ceftazidime 5% conditionnées en flacons Novelia® sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des pH mesurés pour la ceftazidime à 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® sont présentés en annexe 13.

b) Osmolalité

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

A J0, les solutions de ceftazidime 5% des trois lots de collyres A, B et C ont une osmolalité comprise entre 464 et 473 mOsm/kg. L'osmolalité moyenne est de 467,1 mOsm/kg (± 2,7). Ces valeurs d'osmolalité sont compatibles avec une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, l'osmolalité des solutions de ceftazidime présente une valeur moyenne de 434,2 mOsm/kg (± 11,89). Les mesures sont comprises entre 422 et 453

mOsm/kg. L'osmolalité a diminué en moyenne de 7% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des osmolalités à J0 et J90 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec |**Tobservé**|**= 8,095 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 4,755.10^{-7}** (Tableau n°28)

Tableau 28 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90
Moyenne	467,1	434,2
Ecart-type	2,6667	11,893
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	8,095	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne des osmolalités est de 451,3 mOsm/kg (± 3,74) avec des valeurs comprises entre 447 et 457 mOsm/kg.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité moyenne des solutions de ceftazidime est de 448,3 mOsm/kg (± 4,06) avec des valeurs comprises entre 442 et 456 mOsm/kg.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité des solutions de ceftazidime est compris entre 452 et 467 mOsm/kg avec une valeur moyenne de 460,7 mOsm/kg (± 5,66). Cela correspond à une diminution de 1,4% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec |**Tobservé**| **= 3,091 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,007** (Tableau n°29)

Tableau 29 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90+14
Moyenne	467,1	460,7
Ecart-type	2,6667	5,6569
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	3,091	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des osmolalités à J0, J90 et J90+14, l'ensemble des valeurs d'osmolalités mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions de ceftazidime 5% conditionnées en flacons en PEHD sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des osmolalités mesurées pour la ceftazidime à 50 mg/mL conditionnés en flacon en PEHD sont présentés en annexe 14.

(2) Conditionnement Novelia®

A J0, les solutions de ceftazidime 5% des trois lots de collyres A, B et C ont une osmolalité comprise entre 434 et 457 mOsm/kg. L'osmolalité moyenne est de 444,9 mOsm/kg (± 8,2). Ces valeurs d'osmolalité sont compatibles avec une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, l'osmolalité des solutions de ceftazidime présente une valeur moyenne de 441,6 mOsm/kg (± 5,32). Les mesures sont comprises entre 435 et 448 mOsm/kg. L'osmolalité a diminué en moyenne de 0,7% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des osmolalités à J0 et J90 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% avec |**Tobservé**| **= 1,026 < $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,320** (Tableau n°30).

Tableau 30 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90
Moyenne	444,9	441,6
Ecart-type	8,1616	5,3177
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	1,026	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne des osmolalités est de 452,3 mOsm/kg (± 2,55) avec des valeurs comprises entre 449 et 457 mOsm/kg.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité moyenne des solutions de ceftazidime est de 453,3 mOsm/kg (± 3,35) avec des valeurs comprises entre 448 et 458 mOsm/kg.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité des solutions de ceftazidime est compris entre 414 et 426 mOsm/kg avec une valeur moyenne de 417,9 mOsm/kg (± 3,86). Cela correspond à une diminution de 6,1% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec **|Tobservé| = 8,974 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 1,212.10^{-7}** (Tableau n°31).

Tableau 31 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la ceftazidime conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90+14
Moyenne	444,9	417,9
Ecart-type	8,1616	3,855
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	8,974	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14, l'ensemble des valeurs d'osmolalités mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions de ceftazidime 5% conditionnées en flacons Novelia® sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des osmolalités mesurées pour les collyres de ceftazidime à 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® sont présentés en annexe 15.

c) Limpidité et coloration

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

Les résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité sont répertoriés dans le tableau n°32.

Tableau 32 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité

	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur
J0	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+4	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+8	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+14	**A1**	LIMPIDE	JAUNE	**B1**	LIMPIDE	JAUNE	**C1**	LIMPIDE	JAUNE
	A2	LIMPIDE	JAUNE	**B2**	LIMPIDE	JAUNE	**C2**	LIMPIDE	JAUNE
	A3	LIMPIDE	JAUNE	**B3**	LIMPIDE	JAUNE	**C3**	LIMPIDE	JAUNE

Les collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons en PEHD sont restés incolores et limpides après 3 mois de congélation à -20°C. De même, ils sont restés incolores et limpides pendant 8 jours après ouverture et utilisation simulée. Toutefois, 14 jours après ouverture et utilisation simulée une coloration jaune des collyres de ceftazidime est observée même si ceux-ci sont toujours limpides.

(2) Conditionnement Novelia®

Les résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont répertoriés dans le tableau n°33.

Tableau 33 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons Novelia®

	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur
J0	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+4	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+8	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+14	**A1**	LIMPIDE	JAUNE	**B1**	LIMPIDE	JAUNE	**C1**	LIMPIDE	JAUNE
	A2	LIMPIDE	JAUNE	**B2**	LIMPIDE	JAUNE	**C2**	LIMPIDE	JAUNE
	A3	LIMPIDE	JAUNE	**B3**	LIMPIDE	JAUNE	**C3**	LIMPIDE	JAUNE

Les collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons Novelia® sont restés incolores et limpides après 3 mois de congélation à -20°C. De même, ils sont restés incolores et limpides pendant 8 jours après ouverture et utilisation simulée. Toutefois, 14 jours après ouverture et utilisation simulée une coloration jaune des collyres de ceftazidime est observée même si ceux-ci sont toujours limpides.

2. Suivi de la concentration en principe actif

Les résultats du suivi des concentrations en principe actif sont présentés dans le tableau n°34.

Tableau 34 : Résultats du suivi des concentrations en principe actif pour la ceftazidime 5%

		J0	**J90**	**J90+14**
PolyEthylène Haute Densité	Lot A	53 mg/mL	53,5 mg/mL	55,9 mg/mL
	Lot B	52,4 mg/mL	53,6 mg/mL	55,5 mg/mL
	Lot C	51,8 mg/mL	53 mg/mL	55,1 mg/mL
Novelia®	Lot A	53 mg/mL	47,8 mg/mL	55,8 mg/mL
	Lot B	52,4 mg/mL	46,8 mg/mL	55,5 mg/mL
	Lot C	51,8 mg/mL	45,3 mg/mL	56,4 mg/mL

Le suivi des concentrations en principe actif par spectrophotométrie n'a pas montré de variation significative de la concentration en ceftazidime entre J0 et J90 dans les deux types de conditionnements. Après ouverture, les concentrations en ceftazidime ne sont plus stables

après 14 jours d'utilisation simulée. En effet, des études ont précédemment démontré que le principe actif n'était plus stable au-delà de 8 jours d'ouverture en raison de l'ouverture du cycle béta-lactame (13,14,40). Les concentrations observées à J90+14 pourraient s'expliquer par un dosage des produits de dégradation.

3. Stabilité microbiologique

a) Essai de fertilité

Après avoir ensemencé des canisters contenant 100 mL de bouillon trypcase-soja avec 50 UFC d'une des six souches microbiennes suivantes : *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (NCTC 13167), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), des lectures sont effectuées à J1, J3 et J5. Les résultats microbiologiques des bouillons de culture sont présentés dans le tableau n°35.

Tableau 35 : Résultats de l'essai de fertilité pour les collyres de ceftazidime 5%

Souche	Lecture à J1	Lecture à J3	Lecture à J5
Aspergillus brasiliensis	-	+	+
Bacillus subtilis	+	+	+
Candida albicans	-	-	+
Escherichia coli	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+
Staphylococcus aureus	-	+	+
Contrôle interne	-	-	-
	-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Ces résultats permettent de démontrer la stérilité des bouillons de culture non ensemencés comme le confirme l'absence de turbidité des témoins négatifs. Ils permettent également de démontrer la fertilité du milieu de culture au trypcase-soja par l'obtention d'une turbidité dans chacun des canisters ensemencé avec une des six souches microbiennes traduisant ainsi une croissance microbienne.

b) Essai d'applicabilité de la méthode

Un test de neutralisation de l'activité antimicrobienne des solutions ophtalmiques de ceftazidime à 5% est ensuite réalisé afin de ne pas inhiber le développement de micro-organismes, ce qui pourrait conduire à de faux négatifs. L'inhibition de cette activité antimicrobienne est effectuée par rinçage avec 500 mL d'eau versable stérile (Versylène®, Fresenius Kabi, Sèvres, France) de la membrane en PVDF des dispositifs Sterisure (canisters) après filtration de 1 mL de collyre de ceftazidime 5%.

Trois souches microbiennes sont testées dans le cadre de ce test d'inhibition de l'activité antimicrobienne des solutions ophtalmiques de ceftazidime 5% : *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli et Aspergillus brasiliensis.*

Les résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres de ceftazidime à 5% sont présentés dans le tableau n°36.

Tableau 36 : Résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres de ceftazidime à 5%

Filtration			Lecture à J1	Lecture à J3	Lecture à J5
Ceftazidime Lot A N°91009		1 mL collyre + 50 UFC de P. aeruginosa + 500 mL d'eau versable stérile	+	+	+
			+	+	+
			+	+	+
	Témoin positif	50 UFC de P. aeruginosa + 500 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	500 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Ceftazidime Lot B N°91010		1 mL collyre + 50 UFC de E. coli + 500 mL d'eau versable stérile	-	+	+
			-	+	+
			-	-	-
	Témoin positif	50 UFC de E. coli + 500 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	500 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Ceftazidime Lot C N°91011		1 mL collyre + 50 UFC de A. brasiliensis + 500 mL d'eau versable stérile	-	+	+
			-	+	+
			-	-	+
	Témoin positif	50 UFC de A. brasiliensis + 500 mL d'eau versable stérile	-	+	+
	Témoins négatifs	500 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

L'obtention, après incubation, d'une turbidité dans les canisters traduisant une croissance microbienne qui est clairement observable et visuellement comparable à celle observée avec les témoins positifs, signifie que l'activité antimicrobienne du collyre de ceftazidime 5% a été éliminée de façon satisfaisante dans les conditions de l'essai.

Un rinçage avec 500 mL d'eau stérile versable a permis aux bactéries et champignons de se développer dans le bouillon de culture au trypcase soja. Ainsi, une turbidité a été observée dès le premier jour pour *Pseudomonas aeruginosa* et au troisième jour pour *Escherichia coli* et *Aspergillus brasiliensis.*

Les trois souches microbiennes testées se sont développées permettant ainsi de valider l'essai d'applicabilité de la méthode. Le protocole de rinçage mis en place avec 500 mL d'eau versable stérile permet de correctement inhiber l'activité antimicrobienne de la ceftazidime. L'essai de stérilité des collyres peut donc être envisagé selon ce protocole.

c) Essai de stérilité

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

Les résultats de l'essai de stérilité des collyres à la ceftazidime 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité sont répertoriés dans le tableau n°37.

Tableau 37 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à la ceftazidime 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité

Ceftazidime 50 mg/ml										
		Lot A			**Lot B**			**Lot C**		
		Lecture J3	**Lecture J7**	**Lecture J14**	**Lecture J3**	**Lecture J7**	**Lecture J14**	**Lecture J3**	**Lecture J7**	**Lecture J14**
J0 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	+	-	-	-
J 90+4 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+8 PEHD	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+14 PEHD	**1**	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	3	-	+	+	-	-	-	+	+	+

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Une croissance microbienne est observée à J90 pour le collyre B3. Il s'agit probablement d'une contamination environnementale survenue lors de la période d'incubation et provenant d'une mauvaise fermeture du canister car les résultats pour le collyre B3 indiquent que celui-ci est stérile à J90+4, J90+8 et J90+14.

A J90+14, soit après 14 jours d'utilisation simulée, les collyres A1, A3, C2 et C3 ne sont plus stériles.

(2) Conditionnement Novelia®

Les résultats de l'essai de stérilité des collyres à la ceftazidime 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont répertoriés dans le tableau n°38.

Tableau 38 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à la ceftazidime 5% conditionnés en flacons Novelia

Ceftazidime 50 mg/ml										
		Lot A			Lot B			Lot C		
		Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14	Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14	Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14
J0 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+4 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+8 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+14 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Aucune croissance microbienne n'est observée pendant toute la durée de l'étude soit entre J0 et J90+14 pour les collyres à 5% de ceftazidime conditionnés en flacons Novelia®. Ainsi, à J90+14, soit après 14 jours d'utilisation simulée, l'ensemble des collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont stériles.

4. Synthèse

Concernant la stabilité physique, quel que soit le conditionnement utilisé pour les collyres de ceftazidime 5%, les valeurs de pH et d'osmolalité sont restées compatibles avec une administration intra-oculaire pendant toute la durée de l'étude soit de J0 à J90+14.

L'ensemble des solutions ophtalmiques de ceftazidime 5% sont restées limpides, dans les deux types de conditionnements entre J0 et J90+14. Toutefois, une coloration jaune est apparue à J90+14.

Le suivi des concentrations en principe actif par spectrophotométrie n'a pas montré de variation significative de la concentration en ceftazidime entre J0 et J90 dans les deux types de conditionnement. Après ouverture, les concentrations en ceftazidime ne sont plus stables après 14 jours d'utilisation simulée en raison de l'ouverture du cycle béta-lactame.

Concernant la stabilité microbiologique, dans les conditionnements en PEHD, la stérilité des collyres de ceftazidime 5% est démontrée après 3 mois de congélation à -20°C suivis d'une décongélation à température ambiante. Après ouverture, lors d'une utilisation journalière, la stérilité des collyres est maintenue pendant 8 jours lors d'une conservation entre 2 et 8°C.

Dans les conditionnements munis du dispositif Novelia®, la stérilité des collyres de ceftazidime 5% est également démontrée après 3 mois de congélation à -20°C suivis d'une décongélation à température ambiante. Après ouverture, lors d'une utilisation journalière, la stérilité des collyres est maintenue jusqu'à 14 jours lors d'une conservation entre 2 et 8°C.

L'ensemble de ces résultats permettent de fixer la stabilité des collyres à 5% de ceftazidime à 8 jours après ouverture avec un stockage entre 2 et 8°C après 3 mois de congélation -20°C quel que soit le type de conditionnement. En effet, le principe actif n'étant pas stable au-delà de 8 jours, il n'est pas possible de définir une stabilité à 14 jours après ouverture même pour les collyres conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia®.

C. Vancomycine

1. Stabilité physique

a) pH

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

A J0, les solutions de vancomycine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont un pH compris entre 3,30 et 3,58. Le pH moyen est de 3,46 (± 0,11). Ces valeurs de pH sont acides mais elles restent compatibles avec une administration intra-oculaire du fait de l'utilisation limitée à quelques jours de ces collyres et du pouvoir tampon des larmes.

Après 90 jours de congélation, les mesures du pH des solutions de vancomycine sont comprises entre 3,18 et 3,33 avec une valeur moyenne de 3,25 (± 0,05). Le pH a diminué en moyenne de 5,9% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% **avec** $|T_{observé}|$ **= 4,850 >** $T_{critique}$ **= 2,12** et **p-value = 0,0002** (Tableau n°39).

Tableau 39 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90
Moyenne	3,46	3,25
Ecart-type	0,1154	0,0533
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	4,85	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne du pH est de 3,56 (± 0,04) avec des valeurs comprises entre 3,50 et 3,65.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, le pH moyen des solutions de vancomyine est de 3,33 (± 0,06) avec des valeurs comprises entre 3,25 et 3,40.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, le pH des solutions de vancomycine est compris entre 3,22 et 3,28 avec une valeur moyenne de 3,25 (± 0,02). Cela correspond à une diminution de 6,1% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des pH à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec $|T_{observé}|$**= 5,368 >** $T_{critique}$ **= 2,12** et **p-value = 6,279.10**$^{-5}$ (Tableau n°40).

Tableau 40 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90+14
Moyenne	3,46	3,25
Ecart-type	0,1154	0,0245
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	5,368	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des pH à J0, J90 et J90+14, l'ensemble des valeurs de pH mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions de vancomycine 5% conditionnées en flacons en PEHD sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des pH mesurés pour la vancomycine à 50 mg/mL conditionnés en flacon en PEHD sont présentés en annexe 16.

(2) Conditionnement Novelia®

A J0, les solutions de vancomycine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont un pH compris entre 3,43 et 3,61. Le pH moyen est de 3,50 (± 0,09). Ces valeurs de pH sont acides mais elles restent compatibles avec une administration intra-oculaire du fait de l'utilisation limitée à quelques jours de ces collyres et du pouvoir tampon des larmes.

Après 90 jours de congélation, les mesures du pH des solutions de vancomycine sont comprises entre 3,35 et 3,65 avec une valeur moyenne de 3,48 (± 0,12). Le pH a diminué en moyenne de 0,6% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des pH à J0 et J90 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% |**Tobservé**| **= 0,3999 < $T_{critique}$ = 2,12** et **p-value = 0,695** (Tableau n°41).

Tableau 41 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90
Moyenne	3,5	3,48
Ecart-type	0,0901	0,1201
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	0,3999	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne du pH est de 3,41 (± 0,07) avec des valeurs comprises entre 3,34 et 3,52.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, le pH moyen des solutions de vancomycine est de 3,45 (± 0,13) avec des valeurs comprises entre 3,34 et 3,80.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, le pH des solutions de vancomycine est compris entre 3,34 et 3,50 avec une valeur moyenne de 3,41 (± 0,06). Cela correspond à une diminution de 2,5% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des pH à J0 et J90+14 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% |**Tobservé**| **= 2,035 < $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,032** (Tableau n°42).

Tableau 42 : Test de Student comparant les moyennes des pH mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90+14
Moyenne	3,5	3,41
Ecart-type	0,0901	0,064
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	2,035	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Aucune différence significative entre les moyennes des pH à J0, J90 et J90+14 n'est observée pour les solutions de vancomycine à 5% conditionnées en flacons Novelia et malgré des valeurs de pH acides, celles-ci sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des pH mesurés pour la vancomycine à 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® sont présentés en annexe 17.

b) Osmolalité

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

A J0, les solutions de vancomycine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont une osmolalité comprise entre 348 et 351 mOsm/kg. L'osmolalité moyenne est de 349,8 mOsm/kg (± 0,83). Ces valeurs d'osmolalité sont compatibles avec une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, l'osmolalité des solutions de vancomycine présente une valeur moyenne de 350,7 mOsm/kg (± 7,42). Les mesures sont comprises entre 338 et 363

mOsm/kg. L'osmolalité a augmenté en moyenne de 0,3% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student permet de démontrer que les moyennes des osmolalités à J0 et J90 ne sont pas significativement différentes au seuil de signification de 5% avec |**Tobservé**| **= -0.357 < $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,727** (Tableau n°43).

Tableau 43 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90
Moyenne	349,8	350,7
Ecart-type	0,8333	7,4162
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-0,357	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne des osmolalités est de 350,7 mOsm/kg (± 6,28) avec des valeurs comprises entre 343 et 363 mOsm/kg.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité moyenne des solutions de vancomycine est de 347,7 mOsm/kg (± 3,81) avec des valeurs comprises entre 342 et 355 mOsm/kg.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité des solutions de vancomycine est compris entre 356 et 368 mOsm/kg avec une valeur moyenne de 360,7 mOsm/kg (± 4,39). Cela correspond à une augmentation de 3,1% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec |**Tobservé**| **= -7,315 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = $1,737.10^{-6}$** (Tableau n°44).

Tableau 44 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon polyéthylène haute densité

	J0	J90+14
Moyenne	349,8	360
Ecart-type	0,8333	4,3875
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-7,315	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14, l'ensemble des valeurs d'osmolalité mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions de vancomycine 5% conditionnées en flacons en PEHD sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des osmolalités mesurées pour la vancomycine à 50 mg/mL conditionnés en flacon en PEHD sont présentés en annexe 18.

(2) Conditionnement Novelia®

A J0, les solutions de vancomycine 5% des trois lots de collyres A, B et C ont une osmolalité comprise entre 348 et 352 mOsm/kg. L'osmolalité moyenne est de 350,2 mOsm/kg (± 1,20). Ces valeurs d'osmolalité sont compatibles avec une bonne tolérance oculaire.

Après 90 jours de congélation, l'osmolalité des solutions de vancomycine présente une valeur moyenne de 354,8 mOsm/kg (± 4,02). Les mesures sont comprises entre 348 et 360 mOsm/kg. L'osmolalité a augmenté en moyenne de 1,3% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des osmolalités à J0 et J90 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec |**Tobservé**| **= -3,254 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 0,005** (Tableau n°45).

Tableau 45 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90
Moyenne	350,2	354,8
Ecart-type	1,2019	4,0242
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-3,254	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Après 90 jours de congélation suivis de 4 jours d'utilisation simulée et conservation entre 2 et 8°C, la valeur moyenne des osmolalités est de 349,3 mOsm/kg (± 3,00) avec des valeurs comprises entre 346 et 354 mOsm/kg.

Après 90 jours de congélation suivis de 8 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité moyenne des solutions de vancomycine est de 356,3 mOsm/kg (± 2,18) avec des valeurs comprises entre 353 et 361 mOsm/kg.

Enfin, après 90 jours de congélation suivis de 14 jours d'utilisation simulée, l'osmolalité des solutions de vancomycine est compris entre 352 et 360 mOsm/kg avec une valeur moyenne de 355,7 mOsm/kg (± 2,87). Cela correspond à une augmentation de 1,6% par rapport à J0. La réalisation d'un test de Student démontre que les moyennes des osmolalités à J0 et J90+14 sont significativement différentes au seuil de signification de 5% avec **|Tobservé| = -5,246 > $T_{critique}$ = 2,12 et p-value = 7,999.10^{-5}** (Tableau n°46).

Tableau 46 : Test de Student comparant les moyennes des osmolalités mesurées à J0 et J90+14 pour la vancomycine conditionnée en flacon Novelia®

	J0	J90+14
Moyenne	350,2	355,7
Ecart-type	1,2019	2,8723
Observation	9	9
Degré de liberté	16	
Statistique T observé	-5,246	
Valeur critique de T en bilatéral	2,12	

Malgré des différences significatives entre les moyennes des osmolalités à J0, J90 et J90+14, l'ensemble des valeurs d'osmolalité mesurées entre J0 et J90+14 pour les solutions de vancomycine 5% conditionnées en flacons Novelia® sont compatibles avec une administration intra-oculaire. Les résultats des osmolalités mesurées pour les collyres de vancomycine à 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia® sont présentés en annexe 19.

c) Limpidité et coloration

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

Les résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité sont répertoriés dans le tableau n°47.

Tableau 47 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité

	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur
J0	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+4	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+8	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+14	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE

Les collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons en PEHD sont restés incolores et limpides après 3 mois de congélation à -20°C. De même, ils sont restés incolores et limpides pendant 14 jours après ouverture et utilisation simulée.

(2) Conditionnement Novelia®

Les résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont répertoriés dans le tableau n°48.

Tableau 48 : Résultats des contrôles de couleur et de limpidité des collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons Novelia®

	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur	Lot	Limpidité	Couleur
J0	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+4	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+8	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE
J90+14	**A1**	LIMPIDE	INCOLORE	**B1**	LIMPIDE	INCOLORE	**C1**	LIMPIDE	INCOLORE
	A2	LIMPIDE	INCOLORE	**B2**	LIMPIDE	INCOLORE	**C2**	LIMPIDE	INCOLORE
	A3	LIMPIDE	INCOLORE	**B3**	LIMPIDE	INCOLORE	**C3**	LIMPIDE	INCOLORE

Les collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont restés incolores et limpides après 3 mois de congélation à -20°C. De même, ils sont restés incolores et limpides pendant 14 jours après ouverture et utilisation simulée.

2. Suivi de la concentration en principe actif

Les résultats du suivi des concentrations en principe actif sont présentés dans le tableau n°49.

Tableau 49 : Résultats du suivi des concentrations en principe actif pour la vancomycine 5%

		J0	J90	J90+14
PolyEthylène Haute Densité	Lot A	49,2 mg/mL	46,7 mg/mL	46,7 mg/mL
	Lot B	49,2 mg/mL	46,3 mg/mL	47,2 mg/mL
	Lot C	49,3 mg/mL	46 mg/mL	46,5 mg/mL
Novelia	Lot A	46,4 mg/mL	45,5 mg/mL	51,6 mg/mL
	Lot B	46,7 mg/mL	45,1 mg/mL	51,0 mg/mL
	Lot C	46,1 mg/mL	45,3 mg/mL	50,8 mg/mL

Le suivi des concentrations en principe actif par spectrophotométrie n'a pas montré de variation significative de la concentration en vancomycine entre J0 et J90 dans les deux types de conditionnements. De plus, les concentrations en vancomycine sont restées stables pendant les 14 jours d'utilisation simulée ayant suivis les 3 mois de congélation.

3. Stabilité microbiologique

a) Essai de fertilité

Après avoir ensemencé des canisters contenant 100 mL de bouillon trypcase-soja avec 50 UFC d'une des six souches microbiennes suivantes : *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (NCTC 13167), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), des lectures sont effectuées à J1, J3 et J5. Les résultats microbiologiques des bouillons de culture sont présentés dans le tableau n°50.

Tableau 50 : Résultats de l'essai de fertilité pour les collyres de vancomycine 5%

Souche	Lecture à J1	Lecture à J3	Lecture à J5
Aspergillus brasiliensis	-	+	+
Bacillus subtilis	+	+	+
Candida albicans	-	-	+
Escherichia coli	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+
Staphylococcus aureus	-	+	+
Contrôle interne	-	-	-
	-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Ces résultats permettent de démontrer la stérilité des bouillons de culture non ensemencés comme le confirme l'absence de turbidité des témoins négatifs. Ils permettent également de démontrer la fertilité du milieu de culture au trypcase-soja par l'obtention d'une turbidité dans chacun des canisters ensemencé avec une des six souches microbiennes traduisant ainsi une croissance microbienne.

b) Essai d'applicabilité de la méthode

Un test de neutralisation de l'activité antimicrobienne des solutions ophtalmiques de vancomycine à 5% est ensuite réalisé afin de ne pas inhiber le développement de micro-organismes, ce qui pourrait conduire à de faux négatifs. L'inhibition de cette activité antimicrobienne est effectuée par rinçage avec 300 mL d'eau versable stérile (Versylène®, Fresenius Kabi, Sèvres, France) de la membrane en PVDF des dispositifs Sterisure (canisters) après filtration de 1 mL de collyres de vancomycine 5%.

Trois souches microbiennes sont testées dans le cadre de ce test d'inhibition de l'activité antimicrobienne des solutions ophtalmiques de vancomycine 5% : *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis et Aspergillus brasiliensis.*

Les résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres de vancomycine à 5% sont présentés dans le tableau n°51.

Tableau 51 : Résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres de vancomycine à 5% avec un volume de rinçage de 300mL

Filtration			Lecture à J1	Lecture à J3	Lecture à J5
Vancomycine Lot A N°91 005		1 mL collyre + 50 UFC de S. aureus + 300 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
	Témoin positif	50 UFC de S. aureus + 300 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	300 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Vancomycine Lot B N°91 006		1 mL collyre + 50 UFC de B. subtilis + 300 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
	Témoin positif	50 UFC de B. subtilis + 300 mL d'eau versable stérile	-	+	+
	Témoins négatifs	300 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Vancomycine Lot C N°91 008		1 mL collyre + 50 UFC de A. brasiliensis + 300 mL d'eau versable stérile	-	+	+
			-	+	+
			-	+	+
	Témoin positif	50 UFC de A. brasiliensis + 300 mL d'eau versable stérile	-	+	+
	Témoins négatifs	300 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

L'absence, après incubation, d'une turbidité dans les canisters démontre une absence de croissance microbienne pour les souches *de Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Cela signifie que l'activité antimicrobienne du collyre de vancomycine 5% n'a pas été éliminée de façon satisfaisante dans les conditions de l'essai.

Ainsi, un rinçage avec 300 mL d'eau stérile versable n'a permis aux bactéries de se développer dans le bouillon de culture au trypcase soja.

Un nouvel essai est réalisé avec les mêmes souches microbiennes mais en réalisant un protocole de rinçage avec 1 000 mL d'eau versable stérile.

Les résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres de vancomycine à 5% avec un protocole de rinçage avec 1000 mL d'eau versable stérile sont présentés dans le tableau n°52.

Tableau 52 : Résultats de l'essai d'applicabilité de la méthode pour les collyres de vancomycine à 5% avec un volume de rinçage de 1000mL

Filtration			Lecture à J1	Lecture à J3	Lecture à J5
Vancomycine Lot A N°91 005		1 mL collyre + 50 UFC de S. aureus + 1000 mL d'eau versable stérile	+	+	+
			-	+	+
			-	-	-
	Témoin positif	50 UFC de S. aureus + 1000 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	1000 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Vancomycine Lot B N°91 006		1 mL collyre + 50 UFC de B. subtilis + 1000 mL d'eau versable stérile	-	+	+
			-	+	+
			+	+	+
	Témoin positif	50 UFC de B. subtilis + 1000 mL d'eau versable stérile	+	+	+
	Témoins négatifs	1000 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
Vancomycine Lot C N°91 008		1 mL collyre + 50 UFC de A. brasiliensis + 1000 mL d'eau versable stérile	-	+	+
			-	+	+
			-	+	+
	Témoin positif	50 UFC de A. brasiliensis + 1000 mL d'eau versable stérile	-	+	+
	Témoins négatifs	1000 mL d'eau versable stérile	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

L’obtention, après incubation, d’une turbidité dans les canisters traduisant une croissance microbienne qui est clairement observable et visuellement comparable à celle observée avec les témoins positifs, signifie que l’activité antimicrobienne du collyre de vancomycine 5% a été éliminée de façon satisfaisante dans les conditions de l'essai.

Un rinçage avec 1000 mL d’eau stérile versable a permis aux bactéries et champignons de se développer dans le bouillon de culture au trypcase soja. Ainsi, une turbidité a été observée dès le premier jour pour *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* et dès le 3ème jour pour *Aspergillus brasiliensis*.

Les trois souches microbiennes testées se sont développées rapidement permettant ainsi de valider l’essai d’applicabilité de la méthode. Le protocole de rinçage mis en place avec 1 000 mL d’eau versable stérile permet de correctement inhiber l’activité antimicrobienne de la vancomycine. L’essai de stérilité des collyres peut donc être envisagé selon ce protocole.

c) Essai de stérilité

(1) Conditionnement en PolyEthylène Haute Densité

Les résultats de l'essai de stérilité des collyres à la vancomycine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité sont répertoriés dans le tableau n°53

Tableau 53 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à la vancomycine 5% conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité

Vancomycine 50 mg/ml										
		Lot A			**Lot B**			**Lot C**		
		Lecture J3	**Lecture J7**	**Lecture J14**	**Lecture J3**	**Lecture J7**	**Lecture J14**	**Lecture J3**	**Lecture J7**	**Lecture J14**
J0 PEHD	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	2	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	3	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
J 90 PEHD	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	2	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	3	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
J 90+4 PEHD	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	2	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	3	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
J 90+8 PEHD	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	2	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
	3	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
J 90+14 PEHD	**1**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**+**	**+**	**+**
	2	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**
	3	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**+**

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Aucune croissance microbienne n'est observée ni à J90, ni à J90+4 et ni à J90+8. Toutefois, à J90+14, une croissance microbienne est observée pour les collyres A1, A2, B2, C1, C2 et C3.

Ainsi, à J90+14, soit après 14 jours d'utilisation simulée, les collyres A1, A2, B2, C1, C2 et C3 ne sont plus stériles.

(2) Conditionnement Novelia®

Les résultats de l'essai de stérilité des collyres à la vancomycine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont répertoriés dans le tableau n°54.

Tableau 54 : Résultats de l'essai de stérilité des collyres à la vancomycine 5% conditionnés en flacons Novelia®

Vancomycine 50 mg/ml										
		Lot A			Lot B			Lot C		
		Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14	Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14	Lecture J3	Lecture J7	Lecture J14
J0 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+4 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+8 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 90+14 Novelia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : observation d'une turbidité traduisant une croissance microbienne
- : absence de turbidité traduisant la stérilité du milieu de culture

Aucune croissance microbienne n'est observée pendant toute la durée de l'étude soit entre J0 et J90+14 pour les collyres à 5% de vancomycine conditionnés en flacons Novelia®. Ainsi, à J90+14, soit après 14 jours d'utilisation simulée, l'ensemble des collyres de vancomycine 5% conditionnés en flacons munis du dispositif Novelia® sont stériles.

4. Synthèse

Concernant la stabilité physique, quel que soit le conditionnement utilisé pour les collyres de vancomycine 5%, les valeurs de pH et d'osmolalité sont restées compatibles avec une administration intra-oculaire pendant toute la durée de l'étude soit de J0 à J90+14. Toutefois, on note que le pH des solutions de vancomycine à 5% est acide. Malgré cette acidité, ces valeurs restent compatibles avec une administration intra-oculaire du fait de l'utilisation limitée à quelques jours de ces collyres et du pouvoir tampon des larmes.

L'ensemble des solutions ophtalmiques de vancomycine 5% sont restées limpides et incolores, dans les deux types de conditionnement entre J0 et J90+14.

Le suivi des concentrations en principe actif par spectrophotométrie n'a pas montré de variation significative de la concentration en vancomycine entre J0 et J90 dans les deux types de conditionnement. De plus, les concentrations en vancomycine sont restées stables pendant les 14 jours d'utilisation simulée ayant suivis les 3 mois de congélation.

Concernant la stabilité microbiologique, dans les conditionnements en PEHD, la stérilité des collyres de vancomycine 5% est démontrée après 3 mois de congélation à -20°C suivis d'une décongélation à température ambiante. Après ouverture, lors d'une utilisation journalière, la stérilité des collyres est maintenue pendant 8 jours lors d'une conservation entre 2 et 8°C.

Dans les conditionnements munis du dispositif Novelia®, la stérilité des collyres de vancomycine 5% est également démontrée après 3 mois de congélation à -20°C suivis d'une décongélation à température ambiante. Après ouverture, lors d'une utilisation journalière, la stérilité des collyres est maintenue jusqu'à 14 jours lors d'une conservation entre 2 et 8°C.

L'ensemble de ces résultats permet de fixer la stabilité des collyres à 5% de vancomycine à 8 jours après ouverture avec un stockage entre 2 et 8°C après 3 mois de congélation -20°C lorsqu'ils sont conditionnés en flacons en PEHD.

Toutefois, lorsqu'ils sont conditionnés en flacons Novelia®, la stabilité peut être étendue à 14 jours après ouverture avec un stockage entre 2 et 8°C après 3 mois de congélation -20°C.

IV. Discussion

A. Formulation

Lors de la formulation de ces collyres, nous avons fait le choix de nous affranchir de l'utilisation de conservateurs. D'une part, de nombreuses études ont démontré que les conservateurs étaient une source de problèmes de tolérance mais également de complexité en termes de formulation (59–61). D'autre part, la Pharmacopée Européenne ne requiert pas de conservateurs dès lors que le principe actif possède lui-même une activité antimicrobienne ; ce qui est le cas pour l'amikacine, la ceftazidime et la vancomycine (16). De plus, une étude menée par Gautier *et al.* a démontré une stabilité à 75 jours à -20°C suivis de 7 jours à +4°C pour une formulation de ceftazidime à 50 mg/mL avec un conservateur, le chlorure de benzalkonnium (13). Ainsi, dans le cas des solutions ophtalmiques de ceftazidime à 50 mg/mL, la stabilité microbiologique est identique avec ou sans l'emploi de conservateurs.

Le recours à une forme topique telle qu'un collyre plutôt qu'une forme intraveineuse est nécessaire de par la sévérité de l'infection. De plus, la forme ophtalmique sera préférée à la forme systémique en raison des nombreux avantages qu'elle possède : faible diffusion systémique, meilleure tolérance et risque de toxicité plus faible que par voie intraveineuse. L'administration systémique, qu'elle soit orale ou parentérale, permet difficilement d'atteindre la concentration souhaitée dans l'œil en raison de la barrière hémato-oculaire (62).

Enfin, d'autres conditionnements multidoses adaptés aux formes collyres sont disponibles dans le commerce, tels que des flacons en polyéthylène basse densité munis d'une membrane filtrante de 0,2 µm. Cependant, ces conditionnements ne conviennent pas à tous les types de collyres, en particulier aux solutions visqueuses, contrairement aux flacons Novelia® qui présentent trois versions de technologie de contrôle de débit qui sont adaptées aux différentes viscosités (1 à 1500 cP) (63).

B. Optimisation de la production

Les résultats obtenus dans cette étude devraient encourager la préparation hospitalière de lots de grandes quantités de collyres fortifiés standardisés. Ainsi, un changement de mode de production est envisagé afin de limiter les contraintes organisationnelles liées à une production hebdomadaire de ces collyres. En effet, maintenant que cette étude a montré que les collyres d'amikacine, de ceftazidime et de vancomycine à 5% pouvaient être congelés en toute sécurité pendant 90 jours, ils ne seront préparés que quatre à cinq fois par an pour

chaque antibiotique, diminuant ainsi le coût de production. Cette optimisation de l'activité de production pourrait également permettre de diminuer le nombre de collyres périmés et ainsi rationaliser la production tout en assurant une sécurité toujours aussi importante pour le patient. Enfin, le meilleur contrôle de l'activité de production apporté par le stockage de ces solutions pendant 3 mois au congélateur, permettrait d'étendre l'activité de sous-traitance en proposant des collyres renforcés en antibiotiques aux autres établissements de santé, notamment au sein du Groupement Hospitalier de Territoire (GHT).

Toutefois, la mise en place d'un nouveau mode de production de grandes séries de collyres renforcés en antibiotiques nécessite de réfléchir à une organisation optimale. Chaque mois, une des trois solutions ophtalmiques pourrait être produite en quantité suffisante pour trois mois. Ainsi, un lot de 100 unités de chaque collyre pourrait être produit trimestriellement. Ce mode de production nécessiterait la présence de deux préparateurs, sur une journée, dédiés à cette tâche. Cela permettrait également une optimisation des ressources humaines par rapport à notre fonctionnement actuel.

C. Choix de la congélation

Nous avons préféré la congélation comme méthode de conservation à un stockage au réfrigérateur car de nombreuses études ont montré que ce processus permettait de prolonger la durée de conservation du collyre jusqu'à six mois tout en garantissant leur intégrité physicochimique et leur stérilité (6–11,13–15,40,41).

En effet, la réfrigération ne fait que ralentir la multiplication des micro-organismes alors que la congélation stoppe toute multiplication en limitant la quantité d'eau disponible pour ces micro-organismes par transformation de l'eau en glace. De plus, en conservant l'intégrité physicochimique des molécules, la congélation limite le risque d'apparition des effets indésirables des collyres renforcés en antibiotiques : retard de cicatrisation, toxicité épithéliale cornéenne, nécrose conjonctivale, réaction allergique, sensation de brulures ou encore prurit oculaire (64–66). La congélation, en permettant un maintien de la stabilité physique (pH et osmolalité), permet une bonne tolérance oculaire et empêche ainsi la dégradation du principe actif en impureté pouvant être responsable des irritations.

L'autre procédé de conservation au long cours qui aurait pu être testé est la lyophilisation. Ce processus consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (67). Le principe de base est que, lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est-à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. La vapeur d'eau (ou de tout

autre solvant) quitte le produit et elle est capturée par congélation à l'aide d'un condenseur, ou piège froid. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement, ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur. Toutefois, ce procédé est extrêmement onéreux de par le coût des machines et de leurs consommations en eau de refroidissement, en azote et en énergie.

C'est pourquoi, cette méthode de conservation a été écartée et nous avons préféré avoir recours à la congélation.

Toutefois, la congélation présente également des inconvénients, le principal étant le risque de décongélation et re-congélation. Ainsi, une grande rigueur sera nécessaire afin d'éviter que ne se produise une rupture de cette chaîne du froid.

Le recours à un processus de congélation nécessite également de réfléchir à la mise en place d'un protocole de décongélation. Nous avons opté pour une décongélation à température ambiante pendant 30 minutes qui est le mode de décongélation le plus simple parmi les quatre retrouvés dans la littérature (46) : décongélation à température ambiante, décongélation dans un flux laminaire, décongélation avec de l'eau chaude et décongélation par four à micro-ondes. De plus, ce mode de décongélation ne nécessite pas d'investir dans un équipement spécifique. Toutefois, même si cette décongélation semble simple, il est nécessaire de réfléchir aux règles qui devront être mises en place : la décongélation se fera-t-elle uniquement à la PUI ou des collyres encore congelés pourront-ils être délivrés aux patients et / ou aux services de soins qui les laisseront eux-mêmes décongelés selon un protocole défini sur une fiche explicative délivrée avec le traitement ?
Un nouvel étiquetage devra également être mis en place après chaque décongélation afin de définir la date de péremption du collyre qui sera conservé au réfrigérateur après décongélation.

Enfin, la dispensation de ces préparations devra être accompagnée de conseils délivrés au patient afin de garantir une utilisation adéquate du collyre et une bonne observance. Pour cela, des notices d'utilisation sont remises aux patients en rétrocession lors de la délivrance de collyres (Annexe 20). En ce qui concerne la conservation des collyres après décongélation, au réfrigérateur, il est préférable d'éviter le bac à légumes ainsi que la porte où les températures avoisinent les + 8°C voire plus. Il est également indispensable de rappeler au patient les règles essentielles à une utilisation optimale de son traitement notamment en raison du risque de contamination microbiologique des collyres. Ainsi, les patients devront, au préalable, réaliser un lavage des mains pensant 30 secondes, à l'eau et au savon, ou réaliser une friction avec une solution hydro-alcoolique. Ensuite, il faudra préparer le matériel

nécessaire sur une surface propre ou protégée par un essuie-mains : compresses, flacon de collyre après vérification de la date de péremption. L'instillation sera à réaliser dans le cul-de-sac conjonctival et, afin d'allonger le temps de contact et éviter une élimination trop rapide, le patient pourra fermer les yeux pendant 60 secondes et appuyer en même temps sur l'angle interne de l'œil. Si plusieurs traitements en instillation sont prescrits, il conviendra de respecter l'ordre dans lesquels ils ont été prescrits ainsi qu'un intervalle de 5 minutes entre chaque administration. Il faudra également rappeler les règles suivantes : ne pas toucher l'œil avec les doigts, ne pas toucher l'embout du flacon avec les doigts, ne pas toucher l'œil ou la paupière avec l'embout du flacon en plaçant par exemple le flacon de médicament sur l'arête nasale et éviter de poser le bouchon de l'embout compte-gouttes ou, le cas échéant, sur une surface propre.

D. Etude de la stabilité

Les résultats obtenus dans cette étude sont comparables à ceux retrouvés dans la littérature pour chaque molécule étudiée (7–11,13–15,40,47). Cependant, bien que plusieurs études aient déjà démontré la stabilité de l'amikacine, de la ceftazidime ou de la vancomycine à 50 mg / mL lors d'une conservation à -20°C, très peu se sont intéressées à la stabilité de ces molécules après une période de congélation de 90 jours suivie d'une utilisation simulée après ouverture, en particulier d'un point de vue microbiologique.

1. Stabilité physique

Idéalement, le pH d'un collyre devrait se rapprocher du pH physiologique des larmes qui se situe autour de 7,2 – 7,8 selon les auteurs (68). Toutefois, l'œil peut résister à des écarts de pH plus importants car le liquide lacrymal possède un pouvoir tampon (40). Ainsi, l'œil tolère un pH allant de 3 à 10 pour des instillations de faibles volumes (41).

Dans notre étude, le pH des trois solutions ophtalmiques renforcées en antibiotiques était acceptable. Seule la solution de vancomycine présente un pH acide (3,46 en moyenne) mais celui-ci reste compatible avec une administration oculaire compte tenu de son utilisation limitée (seulement quelques jours) et de la dilution avec le liquide lacrymal.

Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par *Chédru-Legros et al.* (14) qui avaient observé un pH moyen de 6,51 à J0 et de 6,36 à J190 après congélation pour une solution d'amikacine 5% dans du NaCl 0,9% ; 6,47 à J0 et 6,48 à J190 pour une solution de ceftazidime

5% dans du NaCl 0,9% et 3,77 à J0 et 3,76 à J190 pour une solution de vancomycine 5% dans du glucose 5%.

Un changement de pH peut être observé dans les situations suivantes : une dégradation du principe actif lui-même ou d'un excipient, une interaction contenant – contenu ou la diffusion du dioxyde de carbone ambiant à travers l'emballage.

A contrario, un pH constant témoigne du respect de trois qualités essentielles des collyres : une bonne tolérance, une stabilité physique et une bonne solubilité.

La solubilité est vérifiée par examen visuel de nos solutions ophtalmiques. Toutes nos solutions d'amikacine et de vancomycine 5% sont restées limpides et incolores pendant toute la durée de notre étude. En revanche, les solutions de ceftazidime 5% ont présenté une coloration légèrement jaunâtre au-delà du 8ème jour de conservation post-ouverture tout en restant parfaitement limpides.

De même, les valeurs de pressions osmotiques pour une solution ophtalmique peuvent fluctuer entre 230 et 550 mOsm/kg sans engendrer de douleurs ou de dommages cellulaires au niveau oculaire (40,69). Les valeurs de pression osmotique mesurées pour les 3 solutions antibiotiques sur la durée de l'étude sont donc bien tolérables au niveau oculaire. Cependant, les valeurs d'osmolalité pour les solutions d'amikacine 5% sont un peu faibles (231 mOsm/kg en moyenne). Cela peut s'expliquer par le fait que la poudre d'amikacine a été reconstituée avec de l'eau pour préparation injectable. Il serait donc préférable de reconstituer la poudre d'amikacine avec du chlorure de sodium à 0,9% afin d'obtenir des valeurs d'osmolalité plus élevées. En effet, la tonicité des larmes est voisine d'une solution de chlorure de sodium 0,9% avec une osmolarité variant en général entre 300 à 320 mOsm/L. Le fait d'utiliser du chlorure de sodium 0,9% dans la constitution de nos collyres nous permet d'avoir une osmolarité plus physiologique et donc une meilleure tolérance. De plus, une étude menée par Chedru-Legros *et al.* a montré qu'un collyre à 5% d'amikacine reconstitué dans du chlorure de sodium à 0,9% permettait d'obtenir une osmolalité autour de 360 mOsm/kg et était physico-chimiquement stable après une période de congélation de 190 jours à -20°C (14).

Ainsi, les valeurs de pH et d'osmolalité mesurées pour nos trois types de collyres renforcés en antibiotiques sur la totalité de la durée de notre étude (90 jours de congélation suivis de 14 jours au réfrigérateur) sont donc tout à fait tolérables au niveau oculaire.

Enfin, bien que la taille des particules soit un paramètre important pour la tolérance, il n'a pas été possible d'étudier la taille des particules présentes dans ces collyres. Les particules doivent avoir un diamètre de préférence inférieur à 25 µm et jamais supérieur à 90 µm (70). Une analyse granulométrique par diffraction de la lumière laser a été réalisé mais ne s'est pas

avérée concluante car la concentration des particules dans le collyre était trop faible ce qui ne permettait pas de produire un signal de bonne qualité (71).

2. Stabilité microbiologique

Pour réaliser le test de stérilité, nous avons choisi la méthode de filtration sur membrane. Le choix de cette méthode a été guidé par les particularités des solutions ophtalmiques et la nécessité de neutraliser l'activité antimicrobienne de ces solutions. La filtration sur membrane est la technique de choix pour les tests de stérilité et la Pharmacopée Européenne recommande d'utiliser cette méthode dès que la nature du produit testé le permet. De plus, bien que la méthode d'ensemencement direct permette d'obtenir des résultats plus rapidement, sa sensibilité est plus faible et elle ne permet pas une neutralisation optimale de l'activité antimicrobienne des solutions ophtalmiques (72).

Pour chaque collyre antibiotique, nous n'avons testé que 3 souches microbiennes au lieu des 6 recommandées par la Pharmacopée Européenne pour évaluer la neutralisation de l'activité antimicrobienne. En effet, pour chaque molécule antibiotique, nous avons sélectionné deux bactéries : *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* pour l'amikacine ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Eschierichia coli* pour la ceftazidime ; *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* pour la vancomycine ainsi qu'un type de champignons : *Candida albicans* pour l'amikacine ; *Aspergillus brasiliensis* pour la ceftazidime et la vancomycine.

Cette étude a permis de démontrer que le conditionnement multidose Novelia® permet de maintenir la stérilité de trois collyres renforcés en antibiotiques (Amikacine, Ceftazidime et Vancomycine à 5%) pendant une période de congélation de 90 jours suivie, après ouverture, de 14 jours d'utilisation simulée avec conservation entre 2 et 8°C. Comparativement, les conditionnements multidoses en polyéthylène haute densité ne peuvent maintenir la stérilité, après ouverture, que pendant 8 jours d'utilisation simulée après une période de congélation de 90 jours. Ainsi, le conditionnement multidose Novelia® semble apporter un avantage majeur en permettant d'étendre la stabilité microbiologique de ces collyres renforcés en antibiotiques de 8 à 14 jours. Toutefois, cet avantage est à contraster avec le coût unitaire de ce conditionnement qui est multiplié par 5 par rapport à un conditionnement multidose en polyéthylène haute densité.

CONCLUSION

La kératite bactérienne est une urgence ophtalmologique qui nécessite la mise en place, sans délai, d'un traitement antibiotique par voie topique. L'absence de spécialité pharmaceutique adaptée a conduit les pharmacies hospitalières à produire des collyres renforcés en antibiotiques à partir de solutions injectables disponibles dans le commerce. La très courte stabilité au réfrigérateur de ces préparations nous a amené à envisager un autre mode de conservation au long cours. Ainsi, afin de limiter les contraintes organisationnelles liées à une production très fréquente et de répondre sans délai aux urgences ophtalmologiques, une production en série et une congélation de trois collyres renforcés en antibiotiques (amikacine, ceftazidime et vancomycine à 5%) ont été testés afin de prolonger leur stabilité.

Les résultats de cette étude ont démontré que les solutions ophtalmiques à 5% d'amikacine, de ceftazidime et de vancomycine sont physiquement et microbiologiquement stables à -20°C pendant 90 jours. Après décongélation, ils doivent être conservés entre 2°C et 8°C. Les collyres à 5% d'amikacine et de vancomycine doivent être utilisés dans les 8 jours suivant ouverture s'ils sont conditionnés en flacons en polyéthylène haute densité et jusqu'à 14 jours après ouverture s'ils sont conditionnés dans des flacons Novelia®. Toutefois, les collyres à 5% de ceftazidime doivent être utilisés dans les 8 jours après ouverture quel que soit le conditionnement.

Des études précédemment menées ont permis de démontrer la stabilité chimique de ces collyres renforcés en antibiotiques lorsqu'ils sont conservés à -20°C pendant 6 mois (14).

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de fixer la stabilité de ces trois collyres fortifiés à :

- 14 jours entre 2 – 8°C après 90 jours de congélation pour les collyres d'amikacine et de vancomycine à 5% conditionnés dans des flacons Novelia®
- 8 jours entre 2 – 8°C après 90 jours de congélation pour les collyres d'amikacine et de vancomycine à 5% conditionnés dans des flacons en PEHD.
- 8 jours entre 2 – 8°C après 90 jours de congélation pour les collyres de ceftazidime à 5% qu'ils soient conditionnés en flacons Novelia® ou en PEHD.

Nos résultats devraient encourager la préparation hospitalière de lots de grandes quantités de collyres fortifiés standardisés. En effet, la préparation en série et la prolongation de la péremption de ces collyres en ayant recours à une méthode de congélation permettent de

limiter les contraintes organisationnelles et de répondre sans délai aux urgences ophtalmologiques.

Les avantages de la congélation pour la conservation des collyres renforcés en antibiotiques sont nombreux. Tout d'abord, il est possible de préparer à l'avance un stock important de collyres fortifiés, les rendant ainsi plus rapidement disponibles. De plus, la qualité de ces solutions ophtalmiques est améliorée par rapport aux préparations extemporanées car, comme elles sont préparées à l'avance et en série, elles peuvent être soumises à des contrôles de qualité physique, chimique et microbiologique avant l'administration aux patients. Enfin, un stockage de ces solutions pendant 3 mois au congélateur permet un meilleur contrôle de l'activité de production. En effet, maintenant que cette étude a montré que les collyres d'amikacine, de ceftazidime et de vancomycine à 5% pouvaient être congelés en toute sécurité pendant 90 jours, ils ne seront préparés que quatre à cinq fois par an pour chaque antibiotique, diminuant ainsi le coût de production.

Les perspectives de cette étude sont, d'une part, d'étendre notre activité de sous-traitance en proposant des collyres renforcés en antibiotiques aux autres établissements de santé, notamment au sein du Groupement Hospitalier de Territoire (GHT), mais aussi, de développer de nouvelles préparations ophtalmiques grâce au gain de temps généré en optimisant l'activité de production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Saillard J, Spiesser-Robelet L, Gohier P, Briot T. Bacterial keratitis treated by strengthened antibiotic eye drops: An 18 months review of clinical cases and antibiotic susceptibilities. Ann Pharm Fr. mars 2018;76(2):107-13.

2. Sourdeau P, Evrard J-M, Remy G, Hecq J-D. Stabilité physico-chimique de solutions ophtalmiques renforcées prêtes à l'emploi : une revue de la littérature. Ann Pharm Fr. mars 2012;70(2):104-12.

3. Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. Br J Ophthalmol. juill 2003;87(7):834-8.

4. Peyron F, Ibrahim E, Elias R, Bues-Charbit M, Balansard G. Étude de stabilité de collyres renforcés à l'amphotéricine B, à la ceftazidime et à la vancomycine. J Pharm Clin Paris. 1999;48-52.

5. Achach K, Peroux E. Solutions ophtalmiques renforcées en antibiotiques : étude de stabilité. J Pharm Clin Paris. 1999;65-6.

6. Rhee MK, Kowalski RP, Romanowski EG, Mah FS, Ritterband DC, Gordon YJ. A laboratory evaluation of antibiotic therapy for ciprofloxacin-resistant Pseudomonas aeruginosa. Am J Ophthalmol. août 2004;138(2):226-30.

7. Jobard M, Brandely-Piat M-L, Deeb GE, Labat L, Cros C, Chast F, et al. Etude de stabilité d'un collyre de ceftazidime à 50 mg/ml conditionné en flacon de polyéthylène basse densité. 12ème Rencontres Convergences Santé Hôpital; 2017 sept; Dijon.

8. Curti C, Lamy E, Primas N, Fersing C, Jean C, Bertault-Peres P, et al. Stability studies of five anti-infectious eye drops under exhaustive storage conditions. Pharmazie. 1 déc 2017;72(12):741-6.

9. Mehta S, Armstrong BK, Kim SJ, Toma H, West JN, Yin H, et al. Long-term potency, sterility, and stability of vancomycin, ceftazidime, and moxifloxacin for treatment of bacterial endophthalmitis. Retina Phila Pa. août 2011;31(7):1316-22.

10. Barbault S, Aymard G, Feldman D, Pointerrau-Bellanger A, Thuillier A. Étude de stabilité d'un collyre à la vancomycine à 50 mg/ml. J pharm clin (Paris). 1999;18(2):183-9.

11. Sautou-Miranda V, Libert F, Grand-Boyer A, Gellis C, Chopineau J. Impact of deep freezing on the stability of 25 mg/ml vancomycin ophthalmic solutions. Int J Pharm. 2 mars 2002;234(1-2):205-12.

12. Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, Perdriel A, Albessard F, Debruyne D, et al. Stabilité à – 20 °C des collyres antibiotiques renforcés (amikacine, ceftazidime, vancomycine). J Fr Ophtalmol. Octobre 2017;30(8):807-813.

13. Gautier E, Saillard J, Deshayes C, Vrignaud S, Lagarce F, Briot T. Stability of a 50 mg/mL Ceftazidime Eye-Drops Formulation. Pharm Technol Hosp Pharm. 2018;3(4):219–226.

14. Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, Perdriel A, Albessard F, Debruyne D, et al. In Vitro Stability of Fortified Ophthalmic Antibiotics Stored at −20°C for 6 Months. Cornea. juill 2010;29(7):807.

15. Berthomieu A. Mise au point d'une préparation en série de collyres renforcés. Université de Rouen; 2009.

16. Pharmacopée Européenne. 2.6.1 Stérilité. In: 9ème édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe; 2017.

17. Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Préparation en Atmosphère Contrôlée (GERPAC), Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC). Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. SFPC ; GERPAC; 2013.

18. Navarro A. Anatomie et physiologie de l'œil [Internet]. 2012 [cité 4 janv 2020]; Unité d'ophtalmologie de l'hôpital du Valais. Disponible sur: https://pldo.hug-ge.ch/sites/pldo/files/documents/2012_anatomie_physiologie_oeil_sion_navarro.pdf

19. Le Gargasson J-F. L'oeil et la vision [Internet]. 2013 [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: http://lodel.irevues.inist.fr/oeiletphysiologiedelavision/index.php?id=210

20. Histologie : organes, systèmes et appareils [Internet]. [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.7.2.html

21. Bourcier T. Abcès de cornée : que faire ou ne pas faire en urgence ?. Réalités Ophtalmologiques. 2012;191

22. Bourcier T, Sauer A, Saleh M, Dory A, Prevost G, Labetoulle M. Chapitre 6 : Infections de la surface oculaire. In: Surface Oculaire [Internet]. [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100018.html

23. Robert PY, Adenis JP. Les kératites bactériennes. J Fr Ophtalmol. 1999;22(10):1104-9.

24. AFSSAPS. Collyres et autres topiques antibiotiques dans les infections oculaires superficielles. [cité 23 oct 2019]. Disponible sur: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/2004-atb-locale-OPH-recos-afssaps.pdf

25. Collège des Ophtalmologistes Universitaires de France (COUF). Item 81 : Oeil rouge et/ou douloureux. 2013:16.

26. Les kératites bactériennes [Internet]. [cité 6 mars 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/showarticlefile/111129/index.pdf

27. Bron A. M. Le traitement curatif des endophtalmies aiguës post chirurgicales. J Fr Ophtalmol. 2019;22(10):1076.

28. Ancele E, Lequeux L, Fournié P, Chapotot E, Douat J, Arné J-L. Kératites bactériennes sévères. Étude épidémiologique, clinique et microbiologique. J Fr Ophtalmol. oct 2009;32(8):558-65.

29. Petellat F. Gestion de l'endophtalmie après chirurgie de la cataracte. Images en ophtalmologie. 2008;2(2):4.

30. Pharmacopée Européenne. 5.1.1 Méthodes de préparation des produits stériles. In: 9ème édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe; 2017.

31. Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM). Bonnes pratiques de préparation. 2019;1-91.

32. Laboratoires Théa. ABAK : un concentré de technologie dans un flacon. [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: https://www.laboratoires-thea.com/medias/abak_brochure_fr.pdf

33. Laboratoires Ursapharm : Système COMOD® [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: https://www.ursapharm.fr/systeme-et-fabrication/systeme-comod/

34. Yee RW. The effect of drop vehicle on the efficacy and side effects of topical glaucoma therapy: a review. Curr Opin Ophthalmol. mars 2007;18(2):134-9.

35. Beden C, Helleboid L, Marmouz F, Liard F. Etude comparative de la survenue d'effets indésirables suite à l'administration de collyres anti-allergiques sans ou avec conservateur. Therapies. 1 mars 2004;59(2):259-64.

36. Vaede D, Baudouin C, Warnet J-M, Brignole-Baudouin F. Les conservateurs des collyres : vers une prise de conscience de leur toxicité. J Fr Ophtalmol. 27 sept 2010;33(7):505-24.

37. Pharmacopée Européenne. 2.2.1 Limpidité et degré d'opalescence des liquides. In: 9ème édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe; 2017.

38. Brossard D. Formulation des formes ophtalmiques hospitalières. 13ème journées scientifiques du GERPAC; 2010; Giens.

39. Sadeghipour F. Liquides externes, collyres et injectables [Internet]. Cours de 2ème année de master en pharmacie; [cité 31 mars 2020]; Ecole de pharmacie, Genève. Disponible sur: https://pharmacie.hug-ge.ch/sites/pharmacie/files/ens/cours/pfpq/PPPQ08-P3.pdf

40. Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, Perdriel A, Albessard F, Debruyne D, et al. Stabilité à – 20°C des collyres antibiotiques renforcés (amikacine, ceftazidime, vancomycine). J Fr Ophtalmol. oct 2007;30(8):807-13.

41. Sourdeau P, Evrard J-M, Remy G, Hecq J-D. Stabilité physico-chimique de solutions ophtalmiques renforcées prêtes à l'emploi : une revue de la littérature. Ann Pharm Fr. mars 2012;70(2):104-12.

42. VIDAL - Amikacine [Internet]. [cité 31 mars 2020]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/substances/6676/amikacine/

43. VIDAL - Ceftazidime [Internet]. [cité 31 mars 2020]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/substances/6722/ceftazidime/

44. VIDAL - Vancomycine [Internet]. [cité 31 mars 2020]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/substances/6898/vancomycine/

45. Hecq J-D. Congélation des préparations injectables prêtes à l'emploi. 12ème journées scientifiques du GERPAC; 2009.

46. Hecq J, Godet M, Jamart J, Bihin B, Galanti L. Stabilité chimique à long terme de médications injectables reconstituées en Pharmacie Hospitalière. J Pharm Belg. 2015;10.

47. David C. Etude de stabilité de collyres fortifiés à la vancomycine. Université de Lille; 2015.

48. Pharmacie des Hôpitaux de Genève (HUG). Préparations ophtalmiques préparées à la pharmacie des HUG. [Internet]. [cité 31 mars 2020]. Disponible sur: https://pharmacie.hug-ge.ch/infomedic/utilismedic/PrepOphtalmo.pdf

49. Kodym A, Hapka-Zmich D, Gołab M, Gwizdala M. Stability of ceftazidime in 1% and 5% buffered eye drops determined with HPLC method. Acta Pol Pharm. févr 2011;68(1):99-107.

50. Barnes AR, Nash S. Stability of ceftazidime in a viscous eye drop formulation. J Clin Pharm Ther. 1999;24(4):299-302.

51. Fauvel M, Morand K, Brandely M-L, Batista R, Renard G, Chast F. Collyre de ciclosporine 2 % : validation d'un conditionnement en polyéthylène basse densité. J Pharm Clin. 1 oct 2008;27(4):221-6.

52. Gotardo MA, Monteiro M. Migration of diethylhexyl phthalate from PVC bags into intravenous cyclosporine solutions. J Pharm Biomed Anal. 15 juill 2005;38(4):709-13.

53. Rexam. Rexam présente un nouveau collyre multidose sans conservateur : Novelia [Internet]. 2010 [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: http://www.worldpressonline.com/PressRelease/rexam-pr%C3%A9sente-un-nouveau-collyre-multidose-sans-conservateur-noveliatm-23619.html

54. Sellier F. User testing : critical for truly understanding patient needs. On Drug Delivery. 2019;4.

55. AFSSAPS. Bonnes Pratiques de Préparation à l'Hôpital [Internet]. 2002 [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: http://www.hosmat.fr/hosmat/bonnes-pratiques/pharmacie-hospitaliere/guide-preparation-hopital.pdf

56. Bugmann A. Mise au point d'un protocole de qualification de l'inspection visuelle des médicaments injectables. Genève; 2005.

57. Pharmacopée Européenne. 2.2.3 Détermination potentiométrique du pH. In: 9ème édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe; 2017.

58. Pharmacopée Européenne. 2.2.35 Osmolalité. In: 9ème édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe; 2017.

59. Chibret H. Ophthalmic preservatives and preparations : reality and perspectives. Ann Pharm Fr. 1997;55(5):228-31.

60. Sklubalová Z. Antimicrobial agents in eyedrops. Ceska Slov Farm Cas Ceske Farm Spolecnosti Slov Farm Spolecnosti. mai 2004;53(3):107-16.

61. Baudouin C. Allergic reaction to topical eyedrops. Curr Opin Allergy Clin Immunol. oct 2005;5(5):459-63.

62. Bänninger PB, Becht CN. Comment un médicament atteint-il son site d'action dans l'œil? Forum Med Suisse. 2011;(11):192-5.

63. Sellier F. Nemera eyedroppers designed for patients [Internet]. 2018 [cité 1 avr 2020]. Disponible sur: https://secureservercdn.net/160.153.138.177/369.861.myftpupload.com/wp-content/uploads/2018/01/NEMERA_ONdrugDelivery-OPHTHALMIC_Jan-2018.pdf

64. Chiquet C, Romanet J-P. Prescrire les collyres fortifiés. J Fr Ophtalmol. 8 mars 2008;30(4):423-30.

65. Heitz A, Bourcier T. L'antibiothérapie dans les abcès cornéens. Prat En Ophtalmol. 2012;6(58):255-60.

66. Gabison E. Kératites bactériennes : conduite à tenir et antibiothérapie. Rev Générale Infect. 2013;(200).

67. Hedoux A. Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques [Internet]. Médicaments et produits pharmaceutiques. 2013 [cité 1 avr 2020]. Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/mise-en-forme-des-medicaments-42611210/lyophilisation-de-produits-pharmaceutiques-et-biopharmaceutiques-pha2026/

68. Dermu M. Étude de stabilité d'un collyre à l'Amphotéricine B 0.5%. Université de Poitiers; 2014.

69. McNab AA. Lacrimal canalicular obstruction associated with topical ocular medication. Aust N Z J Ophthalmol. août 1998;26(3):219-23.

70. Pharmacopée Européenne. 2.9.19 Contamination particulaire : particules non visibles. In: 9ème édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe; 2017. p. 360-2.

71. Pharmacopée Européenne. 2.9.31 Analyse de la taille des particules par diffraction de la lumière laser. In: 9ème édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe; 2017. p. 6648-51.

72. Ing H, Saadi J, Dharan S. Can the sterility testing of a solution be easy and inexpensive ? Pharm Hosp. 2003;155-60.

ANNEXES

Annexe 1 : Procédure de fabrication des collyres à l'amiakcine à 50 mg/mL

C.H.U. DE BORDEAUXPellegrin	FICHE DE FABRICATION	UF :
Reconstitution le 12/04/19 à 11:30	N° ordonnancier : 91 012	Prescripteur :
Patient : **DOTATION HOSPITALISATION**		N.I.P. : 1252 — Né(e) le 01/01/2001
Poids : 60 kg - Taille : 160 cm - S.C. : 1.62 m² - Créat. : 0 µmol/l		Administration le 12/04/2019 à 00:00

Dose prescrite : **500,00 mg** (500.00 mg/J) sur 1 Jour(s)

DCI : **amikacine collyre**

Protocole : OPH : Amikacine 5 % -10ml- flacon collyre (Classique) — Sas : — Cycle **1** Jour **1**

Spécialité	Dosag	Nb	Vol. (ml)	Solvant	Vol à prélever (ml	Dose utilisé	N° lot
AMIKACINE 500mg (mylan)	500,0	1	5,00	Eau P.P.I.	Tot. (5 ml)	500,00	B2111
Stab : 12/04/19 à 11:30 T° amb.		V. Tot.	5,00	Total	**5,00 ml**	500,00	

Volume de solvant à AJOUTER : 5.00 ml

Dispositif : **Flacon 10ml usage oph** — N° lot :

Véhicule utilisé **NaCl**

Volume Final : **10.00 ml à 50.00 mg/ml** — Péremp. : 12/05/2019 à : 11:30

Voie adm. : Collyre — Conservation à +4° C

Val. Pharm. : Val. Fiche : Manip. :

Mode opératoire :

Pour une dotation de 10 collyres d' amikacine :
- Prélever 50ml de NaCl0.9% avec une seringue de 50ml et transférer ce volume dans une poche vide
- Prendre 10 flacons d'amikacine 500 mg
- Prélever 50ml d'EPPI avec une seingue de 50ml
- Reconstituer chaque flacon d'amikacine 500 mg avec 5ml d'EPPI
- Prélever l'ensemble des flacons avec une seringue de 50ml
- Transférer ce volume de 50ml dans la poche préalablement remplie avec 50ml de NaCl0.9%
- Homogénéiser la poche
- Prélever la solution avec une seringue de 50ml, adapter un filtre plat 0.22µ et remplir chaque flacon de collyre avec ~~9ml.~~

Matériel nécessaire :

Annexe 2 : Procédure de fabrication des collyres à la ceftazidime 50 mg/mL

C.H.U. DE BORDEAUXPellegrin	FICHE DE FABRICATION	UF :
Reconstitution le 12/04/19 à 10:30	N° ordonnancier : 91 009	Prescripteur :
Patient : **DOTATION HOSPITALISATION**		N.I.P. : 1252 — Né(e) le 01/01/2001
Poids : 60 kg - Taille : 160 cm - S.C. : 1.62 m² - Créat. : 0 µmol/l		Administration le 12/04/2019 à 00:00

Dose prescrite : **500,00 mg** (500.00 mg/J) sur 1 Jour(s)

DCI : **ceftazidime collyre**

Protocole : OPH : Ceftazidime 50mg/ml (500mg/10ml) (Classique) — Sas : — Cycle 1 — Jour 1

Spécialité	Dosag	Nb	Vol. (ml)	Solvant	Vol à prélever (ml	Dose utilisé	N° lot
CEFTAZIDIME 1000mg inj (Mylan)	1 000,0	1	10,00	NaCl	5.00 ml	500,00	180157
Stab : 19/04/19 à 10:30 + 4 °C		V. Tot.	10,00	Total	**5,00 ml**	500,00	

Volume de solvant à AJOUTER : 5.00 ml

Dispositif : **Flacon 10ml usage oph** — N° lot :

Véhicule utilisé **NaCl**

Volume Final : **10.00 ml à 50.00 mg/ml** — Péremp. : 22/04/2019 à : 10:30

Voie adm. : Collyre — Conservation à +4° C

Val. Pharm. : Val. Fiche : Manip. :

Mode opératoire : 12

Pour une dotation de ~~10~~ collyres de ceftazidime :
- Prélever 50ml de NaCl0.9% avec une seringue de 50ml et transférer ce volume dans une poche vide
- Prendre ~~5~~ flacons de ceftazidime 1g
- Prélever 50ml de NaCl0.9% avec une seingue de 50ml
- Reconstituer chaque flacon de ceftazidime 1g avec 10ml de NaCl0.9%
- Prélever l'ensemble des flacons avec une seringue de 50ml
- Transférer ce volume de 50ml dans la poche préalablement remplie avec 50ml de NaCl0.9%
- Homogénéiser la poche
- Prélever la solution avec une seringue de 50ml, adapter un filtre plat 0.22µ et remplir chaque flacon de collyre avec ~~8~~ml. 6

Matériel nécessaire :

Preparer 12 flacons collyres à 6mL.

Garder seringue + aliquot.

C.H.U. DE BORDEAUX
Pôle produits de santé
Tél : 0557820229
Ceftazidime collyre 50mg/ml – 9ml
Lot : 91009
Pér : entre 4 et 8°C : 22/04/2019
ouvert le : .....
Uniquement sur ordonnance
voie ophtalmique - ne pas avaler
Liste 1 - Respecter les doses prescrites

CHIMIO - Computer Engineering/ le 11/04/19 à 16:59 — ***C.H.U. DE BORDEAUX***

Annexe 3 : Procédure de fabrication des collyres à la vancomycine 50 mg/mL

C.H.U. DE BORDEAUXPellegrin	FICHE DE FABRICATION	UF :	
Reconstitution le 12/04/19 à 09:15	N° ordonnancier : 91 006	Prescripteur :	
Patient : **DOTATION HOSPITALISATION**		N.I.P. : 1252	Né(e) le 01/01/2001
Poids : 60 kg - Taille : 160 cm - S.C. : 1.62 m² - Créat. : 0 µmol/l		Administration le 12/04/2019 à 00:00	

Dose prescrite : **500,00 mg** (500.00 mg/J) sur 1 Jour(s)

DCI : **vancomycine collyre**

Protocole : OPH : Vancomycine 50mg/ml - 10ml - flacon collyre (Clas | Sas : | Cycle **2** | Jour **1**

Spécialité	Dosag	Nb	Vol. (ml)	Solvant	Vol à prélever (ml	Dose utilisé	N° lot
VANCOMYCINE 1000mg inj (SANDOZ)	1 000,0	**1**	20,00	Glucose	**10.00 ml**	500,00	EC0115
Stab : 12/04/19 à 09:15 T° amb.		V. Tot.	20,00	Total	**10,00 ml**	500,00	

Dispositif : **Flacon 10ml usage oph** N° lot :

Véhicule utilisé **Glucose**

Volume Final : **10.00 ml à 50.00 mg/ml** Péremp. : 12/05/2019 à : 09:15

Voie adm. : Collyre Conservation à +4° C

Val. Pharm. : Val. Fiche : Manip. :

Commentaire préparation : 4 x lots EC0115 + 1 x lot EC0113

Mode opératoire :

Pour un lot de 12 flacons
1/Désinfecter 6 flacons de vancomycine 1000mg
2/Adapter un spike sur chaque flacon
3/Injecter dans chaque flacon 20 ml de GLUCOSE 5%
4/Homogénéiser
5/ Reprendre la solution ainsi reconstituée
6/Injecter dans chaque flacon 9ml en filtrant a 0.22 µm - Fermer - identifier
7/ POUR LE LABO
a/Conserver les flacons de vancomycine
b/Conserver le reliquat de solution diluée de vancomycine dans une seringue bouchée + aliquot microdon

Matériel nécessaire :

Annexe 4 : Fiche de contrôle des collyres à l'amikacine 50 mg/mL

C·H·U Hôpitaux de Bordeaux	CHU de Bordeaux	EN-LAB- 062
	FICHE DE CONTRÔLE DE AMIKACINE Collyre - 50mg/ml	Laboratoire de Contrôle Pharmacie de l'hôpital Pellegrin
	Référence mode opératoire: IN-UPS- 127	Durée de validité des produits : 1 mois avant ouverture / 15 jours après ouverture A conserver au réfrigérateur
		Manipulateur : CO Date : 12/04/2019

Conditionnement : Flacon collyre 10ml

n° ordonnancier
91 012

Contrôle qualitatifs

Respect de la taille du lot	conforme	taille du lot théorique 12 flacons
Contrôle de la date de péremption sur les étiquettes du collyre	conforme	*Etiquettes de tracabilité présente (EN-UPS-013)* conforme
Flacon fermé hermetiquement	conforme	
Présence des têtes de collyres	conforme	
Contrôle matière première (nom - péremption - n° lot)	conforme	Numéro de Lot B2111 EXP : 01/2021

Controles quantitatifs

Concentration Théorique	50	erreur 4,60
Résultat Microdom	47,7	conforme
Osmolalité	236	conforme
osmolalité théorique	260	(+/- 10%) mosm/L
pH	6,5	conforme
pH théorique	6,5	

visa (s) du (des) contrôleur (s) *		
erreur	9,230769231	
Nom (s)	Interne	Conforme X
Signature		Non conforme

Annexe 5 : Fiche de contrôle des collyres à la ceftazidime 50 mg/mL

CHU de Bordeaux		EN-LAB- 063
FICHE DE CONTRÔLE DE CEFTAZIDIME Collyre - 50 mg/ml		Laboratoire de Contrôle Pharmacie de l'hôpital Pellegrin
Référence mode opératoire:	IN-UPS- 154	

Durée de validité des produits :
10 jours avant ouverture /
1 semaine après ouverture
A conserver au réfrigérateur

Date : 12/04/19
Manipulateur : CO

n° ordonnancier
91 011

Conditionnement : Flacon collyre 10ml

Contrôle qualitatifs

Respect de la taille du lot	conforme	taille du lot théorique 12 flacons
Contrôle de la date de péremption sur les étiquettes du collyre	conforme	*Étiquettes de traçabilité présente (EN-UPS-013)* conforme
Flacon fermé hermétiquement	conforme	
Présence des têtes de collyres	conforme	
Contrôle matière première (nom - péremption - n° lot)	conforme	Numéro de Lot 180157 exp : 12/2019

Controles quantitatifs

Concentration Théorique	50	erreur	3.6
Résultat Microdom	51,8	conforme	
Osmolalité	468	conforme	
osmolalité théorique	500	(+/- 10%) mosm/L	
pH	7	conforme	
pH théorique	6 à 7		

visa (s) du (des) contrôleur (s) *		
Nom (s)	interne	Conforme X
Signature	12/04/19	Non conforme

C·H·U Hôpitaux de Bordeaux	CHU de Bordeaux	EN-LAB- 061
	FICHE DE CONTRÔLE DE VANCOMYCINE Collyre - 50mg/ml	Laboratoire de Contrôle Pharmacie de l'hôpital Pellegrin
	Référence mode opératoire: IN-UPS- 127	

Conditionnement :	Flacon collyre 10ml

n° ordonnancier
91 008

Durée de validité des produits :
1 mois avant ouverture /
15 jours après ouverture
A conserver au réfrigérateur

Manipulateur : CO
Date 12/04/2019

Contrôle qualitatifs				
Respect de la taille du lot	conforme	taille du lot théorique 12 flacons	*Etiquettes de tracabilité présente (EN-UPS-013)*	conforme
Contrôle de la date de péremption sur les étiquettes du collyre	conforme			
Flacon fermé hermetiquement	conforme			
Présence des têtes de collyres	conforme			
Contrôle matière première (nom - péremption - n° lot)	conforme	Numéro de Lot EC0115 Exp05/2020 EC0114 Exp 03/2020		

Controles quantitatifs			
Concentration Théorique	50	erreur	8
Résultat Microdom	46	conforme	
Osmolalité	350	conforme	erreur
osmolalité théorique	360	(+/- 10%) mosm/L	2,78
pH	3	conforme	
pH théorique	3 à 4		

visa (s) du (des) contrôleur (s) *			
Nom (s)	Interne	**Conforme**	**X**
Signature		**Non conforme**	

12/04/19

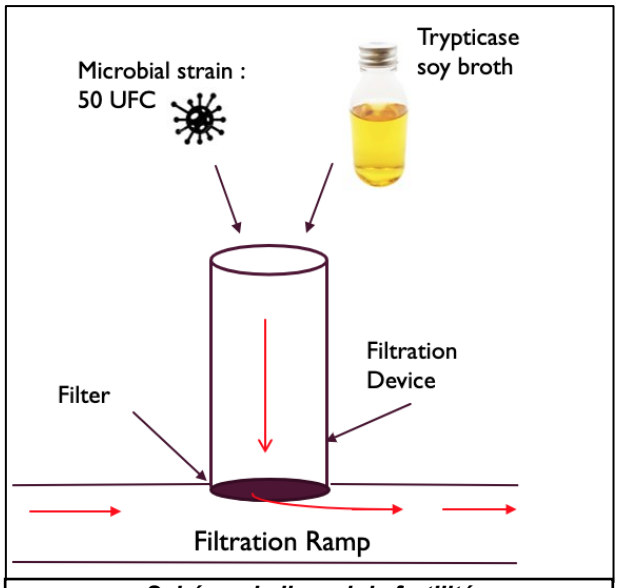


Schéma de l'essai de fertilité

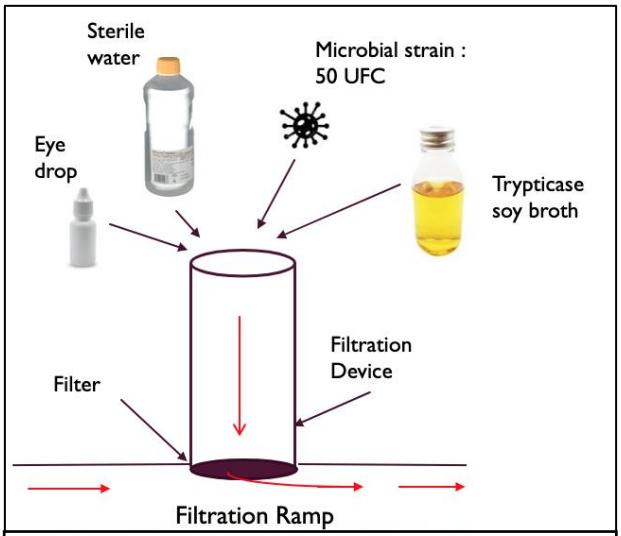


Schéma de l'essai d'applicabilité de la méthode

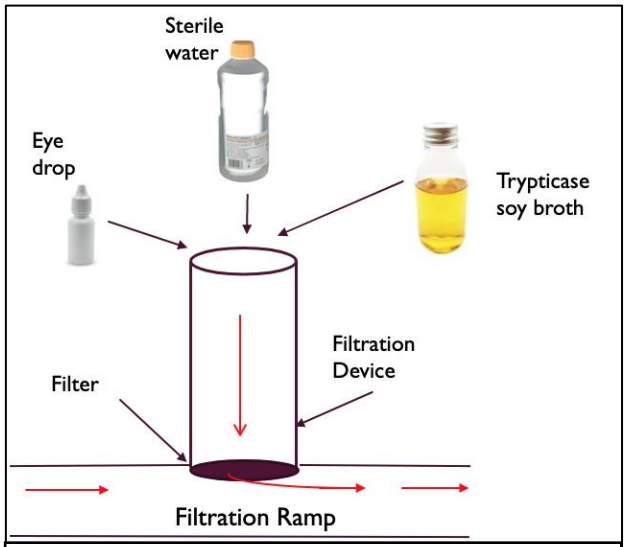


Schéma de l'essai de stérilité

Annexe 8 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,44	6,51	6,45	6,26	6,26	6,22	97,2%	95,8%	96,1%
6,47	6,6	6,44	6,18	6,21	6,21	96,0%	95,1%	96,0%
6,41	6,49	6,52	6,17	6,21	6,21	95,8%	95,1%	96,0%
6,4	6,5	6,5	6,2	6,2	6,2	96,3%	95,3%	96,0%
0,03	0,06	0,04	0,05	0,03	0,01			
0,47%	0,90%	0,67%	0,80%	0,46%	0,09%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
6,5			6,2			95,9%		
0,1			0,03					
0,88%			0,49%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,44	6,51	6,45	6,2	6,04	6,01	96,3%	92,4%	92,9%
6,47	6,6	6,44	6,4	6,01	6,03	99,4%	92,0%	93,2%
6,41	6,49	6,52	6,09	6,01	5,99	94,6%	92,0%	92,6%
6,4	6,5	6,5	6,2	6,0	6,0	96,7%	92,1%	92,9%
0,03	0,06	0,04	0,16	0,02	0,02			
0,47%	0,90%	0,67%	2,52%	0,29%	0,33%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
6,5			6,1			93,9%		
0,1			0,13					
0,88%			2,20%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,44	6,51	6,45	6,11	6,09	6,13	94,9%	93,2%	94,7%
6,47	6,6	6,44	6,04	6,07	6,14	93,8%	92,9%	94,9%
6,41	6,49	6,52	6,03	7,01	6,12	93,6%	107,3%	94,6%
6,4	6,5	6,5	6,1	6,4	6,1	94,1%	97,8%	94,7%
0,03	0,06	0,04	0,04	0,54	0,01			
0,47%	0,90%	0,67%	0,72%	8,40%	0,16%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
6,5			6,2			95,6%		
0,1			0,31					
0,88%			4,98%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,44	6,51	6,45	5,95	6,17	6,2	92,4%	94,4%	95,8%
6,47	6,6	6,44	5,98	6,22	6,04	92,9%	95,2%	93,4%
6,41	6,49	6,52	5,95	6,18	6,09	92,4%	94,6%	94,1%
6,4	6,5	6,5	6,0	6,2	6,1	92,5%	94,7%	94,4%
0,03	0,06	0,04	0,02	0,03	0,08			
0,47%	0,90%	0,67%	0,29%	0,43%	1,34%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
6,5			6,1			93,9%		
0,1			0,11					
0,88%			1,81%					

Annexe 9 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia®

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,22	6,22	6,16	6,32	6,36	6,37	101,6%	102,9%	103,1%
6,26	6,19	6,21	6,31	6,36	6,36	101,4%	102,9%	102,9%
6,18	6,13	6,17	6,36	6,36	6,41	102,3%	102,9%	103,7%
6,2	6,2	6,2	6,3	6,4	6,4	101,8%	102,9%	103,2%
0,04	0,05	0,03	0,03	0,00	0,03			
0,64%	0,74%	0,43%	0,42%	0,00%	0,41%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
6,2			6,4			102,6%		
0,039			0,03					
0,63%			0,45%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,22	6,22	6,16	6,18	6,33	6,22	99,4%	102,4%	100,6%
6,26	6,19	6,21	6,26	6,35	6,17	100,6%	102,8%	99,8%
6,18	6,13	6,17	6,22	6,31	6,27	100,0%	102,1%	101,5%
6,2	6,2	6,2	6,2	6,3	6,2	100,0%	102,4%	100,6%
0,04	0,05	0,03	0,04	0,02	0,05			
0,64%	0,74%	0,43%	0,64%	0,32%	0,80%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
6,2			6,3			101,0%		
0,0			0,06					
0,63%			1,03%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,22	6,22	6,16	6,25	6,23	6,28	100,5%	100,8%	101,6%
6,26	6,19	6,21	6,25	6,28	6,27	100,5%	101,6%	101,5%
6,18	6,13	6,17	6,28	6,24	6,29	101,0%	101,0%	101,8%
6,2	6,2	6,2	6,3	6,3	6,3	100,6%	101,1%	101,6%
0,04	0,05	0,03	0,02	0,03	0,01			
0,64%	0,74%	0,43%	0,28%	0,42%	0,16%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
6,2			6,3			101,1%		
0,0			0,02					
0,63%			0,34%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,22	6,22	6,16	6,28	6,22	6,21	101,0%	100,6%	100,5%
6,26	6,19	6,21	6,24	6,24	6,24	100,3%	101,0%	101,0%
6,18	6,13	6,17	6,35	6,35	6,33	102,1%	102,8%	102,4%
6,2	6,2	6,2	6,3	6,3	6,3	101,1%	101,5%	101,3%
0,04	0,05	0,03	0,06	0,07	0,06			
0,64%	0,74%	0,43%	0,89%	1,12%	1,00%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
6,2			6,3			101,3%		
0,0			0,06					
0,63%			0,89%					

Annexe 10 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
233	234	232	223	230	234	95,4%	98,6%	100,3%
236	233	234	222	232	234	95,0%	99,4%	100,3%
232	233	234	220	243	238	94,2%	104,1%	102,0%
233,7	233,3	233,3	221,7	235,0	235,3			
2,08	0,58	1,15	1,53	7,00	2,31			
0,89%	0,25%	0,49%	0,69%	2,98%	0,98%	94,9%	100,7%	100,9%
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
233,4			230,7					
1,2			7,73					
0,53%			3,35%			98,8%		

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
233	234	232	228	233	235	97,6%	99,9%	100,7%
236	233	234	233	231	235	99,7%	99,0%	100,7%
232	233	234	229	235	235	98,0%	100,7%	100,7%
233,7	233,3	233,3	230,0	233,0	235,0			
2,08	0,58	1,15	2,65	2,00	0,00			
0,89%	0,25%	0,49%	1,15%	0,86%	0,00%	98,4%	99,9%	100,7%
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
233,4			232,7					
1,2			2,74					
0,53%			1,18%			99,7%		

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
233	234	232	233	234	236	99,7%	100,3%	101,1%
236	233	234	234	234	235	100,1%	100,3%	100,7%
232	233	234	226	234	228	96,7%	100,3%	97,7%
233,7	233,3	233,3	231,0	234,0	233,0			
2,08	0,58	1,15	4,36	0,00	4,36			
0,89%	0,25%	0,49%	1,89%	0,00%	1,87%	98,9%	100,3%	99,9%
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
233,4			232,7					
1,2			3,35					
0,53%			1,44%			99,7%		

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
233	234	232	230	237	245	98,4%	101,6%	105,0%
236	233	234	230	236	242	98,4%	101,1%	103,7%
232	233	234	233	238	248	99,7%	102,0%	106,3%
233,7	233,3	233,3	231,0	237,0	245,0			
2,08	0,58	1,15	1,73	1,00	3,00			
0,89%	0,25%	0,49%	0,75%	0,42%	1,22%	98,9%	101,6%	105,0%
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
233,4			237,7					
1,2			6,34					
0,53%			2,67%			101,8%		

Annexe 11 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour l'amikacine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia®

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
240	233	231	233	226	235	99,7%	97,0%	101,0%
230	231	232	229	230	230	98,0%	98,7%	98,9%
231	235	235	230	229	242	98,4%	98,3%	104,0%
233,7	233,0	232,7	230,7	228,3	235,7			
5,51	2,00	2,08	2,08	2,08	6,03			
2,36%	0,86%	0,89%	0,90%	0,91%	2,56%	98,7%	98,0%	101,3%
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
233,1			231,6					
3,1			4,67					
1,35%			2,02%			99,3%		

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
240	233	231	230	239	237	98,4%	102,6%	101,9%
230	231	232	231	241	236	98,9%	103,4%	101,4%
231	235	235	235	237	241	100,6%	101,7%	103,6%
233,7	233,0	232,7	232,0	239,0	238,0			
5,51	2,00	2,08	2,65	2,00	2,65			
2,36%	0,86%	0,89%	1,14%	0,84%	1,11%	99,3%	102,6%	102,3%
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
233,1			236,3					
3,1			3,91					
1,35%			1,65%			101,4%		

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
240	233	231	232	232	248	99,3%	99,6%	106,6%
230	231	232	232	235	248	99,3%	100,9%	106,6%
231	235	235	232	232	242	99,3%	99,6%	104,0%
233,7	233,0	232,7	232,0	233,0	246,0			
5,51	2,00	2,08	0,00	1,73	3,46			
2,36%	0,86%	0,89%	0,00%	0,74%	1,41%	99,3%	100,0%	105,7%
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
233,1			237,0					
3,1			7,04					
1,35%			2,97%			101,7%		

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
240	233	231	228	234	227	97,6%	100,4%	97,6%
230	231	232	228	232	232	97,6%	99,6%	99,7%
231	235	235	228	236	227	97,6%	101,3%	97,6%
233,7	233,0	232,7	228,0	234,0	228,7			
5,51	2,00	2,08	0,00	2,00	2,89			
2,36%	0,86%	0,89%	0,00%	0,85%	1,26%	97,6%	100,4%	98,3%
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
233,1			230,2					
3,1			3,35					
1,35%			1,45%			98,8%		

Annexe 12 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
7,25	7,2	7	7,23	7,18	7,29	99,8%	97,5%	104,1%
7,3	7,2	7,02	7,3	7,3	7,15	100,7%	99,1%	102,1%
7,19	7,7	6,98	7,2	7,27	7,21	99,4%	98,7%	103,0%
7,2	7,4	7,0	7,2	7,3	7,2	100,0%	98,4%	103,1%
0,06	0,29	0,02	0,05	0,06	0,07			
0,76%	3,92%	0,29%	0,71%	0,86%	0,97%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
7,20			7,24			100,4%		
0,2189			0,0557					
3,04%			0,77%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
7,25	7,2	7	6,9	6,94	7,05	95,2%	94,2%	100,7%
7,3	7,2	7,02	6,86	6,94	7,1	94,7%	94,2%	101,4%
7,19	7,7	6,98	6,94	6,97	6,96	95,8%	94,6%	99,4%
7,2	7,4	7,0	6,9	7,0	7,0	95,2%	94,3%	100,5%
0,06	0,29	0,02	0,04	0,02	0,07			
0,76%	3,92%	0,29%	0,58%	0,25%	1,01%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
7,2			6,96			96,6%		
0,2			0,07					
3,04%			1,05%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
7,25	7,2	7	6,93	7,02	7,1	95,6%	95,3%	101,4%
7,3	7,2	7,02	6,9	7,04	7,1	95,2%	95,6%	101,4%
7,19	7,7	6,98	6,93	7,06	7,4	95,6%	95,8%	105,7%
7,2	7,4	7,0	6,9	7,0	7,2	95,5%	95,6%	102,9%
0,06	0,29	0,02	0,02	0,02	0,17			
0,76%	3,92%	0,29%	0,25%	0,28%	2,41%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
7,2			7,05			97,9%		
0,2			0,15					
3,04%			2,13%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
7,25	7,2	7	7,03	7,02	7,05	97,0%	95,3%	100,7%
7,3	7,2	7,02	7,03	7,01	6,98	97,0%	95,2%	99,7%
7,19	7,7	6,98	7,03	7,03	7	97,0%	95,4%	100,0%
7,2	7,4	7,0	7,0	7,0	7,0	97,0%	95,3%	100,1%
0,06	0,29	0,02	0,00	0,01	0,04			
0,76%	3,92%	0,29%	0,00%	0,14%	0,51%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
7,20			7,02			97,4%		
0,2189			0,0206					
3,04%			0,29%					

Annexe 13 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia®

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,9	7,01	7,1	6,93	7,03	7,05	100,9%	99,9%	100,2%
6,7	7,06	6,9	6,97	7,06	7,03	101,5%	100,3%	100,0%
7,01	7,04	7,1	6,92	7,06	7,07	100,7%	100,3%	100,5%
6,9	7,0	7,0	6,9	7,1	7,1	101,0%	100,2%	100,2%
0,16	0,03	0,12	0,03	0,02	0,02			
2,29%	0,36%	1,64%	0,38%	0,25%	0,28%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
6,98			7,01			100,5%		
0,1284			0,0581					
1,84%			0,83%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,9	7,01	7,1	7,2	7,25	7,4	104,8%	103,0%	105,2%
6,7	7,06	6,9	7,23	7,27	7,4	105,2%	103,3%	105,2%
7,01	7,04	7,1	7,23	7,17	7,4	105,2%	101,9%	105,2%
6,9	7,0	7,0	7,2	7,2	7,4	105,1%	102,7%	105,2%
0,16	0,03	0,12	0,02	0,05	0,00			
2,29%	0,36%	1,64%	0,24%	0,73%	0,00%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
7,0			7,28			104,3%		
0,1			0,09					
1,84%			1,26%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,9	7,01	7,1	7,46	7,6	7,53	108,6%	108,0%	107,1%
6,7	7,06	6,9	7,36	7,58	7,52	107,1%	107,7%	106,9%
7,01	7,04	7,1	7,7	7,52	7,57	112,1%	106,9%	107,6%
6,9	7,0	7,0	7,5	7,6	7,5	109,3%	107,5%	107,2%
0,16	0,03	0,12	0,17	0,04	0,03			
2,29%	0,36%	1,64%	2,33%	0,55%	0,35%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
7,0			7,54			108,0%		
0,1			0,09					
1,84%			1,25%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
6,9	7,01	7,1	7,22	7,4	7,45	105,1%	105,2%	105,9%
6,7	7,06	6,9	7,2	7,46	7,43	104,8%	106,0%	105,6%
7,01	7,04	7,1	7,24	7,4	7,49	105,4%	105,2%	106,5%
6,9	7,0	7,0	7,2	7,4	7,5	105,1%	105,4%	106,0%
0,16	0,03	0,12	0,02	0,03	0,03			
2,29%	0,36%	1,64%	0,28%	0,47%	0,41%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
6,98			7,37			105,5%		
0,1284			0,1131					
1,84%			1,54%					

Annexe 14 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
467	468	465	423	434	428	90,3%	92,9%	91,9%
473	468	468	423	431	448	90,3%	92,3%	96,2%
466	465	464	453	422	446	96,7%	90,4%	95,8%
468,7	467,0	465,7	433,0	429,0	440,7			
3,79	1,73	2,08	17,32	6,24	11,02	92,4%	91,9%	94,6%
0,81%	0,37%	0,45%	4,00%	1,46%	2,50%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
467,1			434,2					
2,6667			11,8930			93,0%		
0,57%			2,74%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
467	468	465	450	447	455	96,0%	95,7%	97,7%
473	468	468	453	453	457	96,7%	97,0%	98,1%
466	465	464	447	453	447	95,4%	97,0%	96,0%
468,7	467,0	465,7	450,0	451,0	453,0			
3,79	1,73	2,08	3,00	3,46	5,29			
0,81%	0,37%	0,45%	0,67%	0,77%	1,17%	96,0%	96,6%	97,3%
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
467,1			451,3					
2,7			3,74					
0,57%			0,83%			96,6%		

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
467	468	465	446	449	446	95,2%	96,1%	95,8%
473	468	468	442	450	446	94,3%	96,4%	95,8%
466	465	464	456	448	452	97,3%	95,9%	97,1%
468,7	467,0	465,7	448,0	449,0	448,0			
3,79	1,73	2,08	7,21	1,00	3,46	95,6%	96,1%	96,2%
0,81%	0,37%	0,45%	1,61%	0,22%	0,77%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
467,1			448,3					
2,7			4,06			96,0%		
0,57%			0,91%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
467	468	465	454	465	467	96,9%	99,6%	100,3%
473	468	468	452	465	464	96,4%	99,6%	99,6%
466	465	464	456	465	458	97,3%	99,6%	98,4%
468,7	467,0	465,7	454,0	465,0	463,0			
3,79	1,73	2,08	2,00	0,00	4,58			
0,81%	0,37%	0,45%	0,44%	0,00%	0,99%	96,9%	99,6%	99,4%
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
467,1			460,7					
2,6667			5,6569					
0,57%			1,23%			98,6%		

Annexe 15 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la ceftazidime 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia®

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
434	449	449	435	445	440	99,6%	98,5%	98,7%
438	457	437	440	446	445	100,8%	98,7%	99,8%
438	450	452	432	448	443	98,9%	99,1%	99,3%
436,7	452,0	446,0	435,7	446,3	442,7	99,8%	98,7%	99,3%
2,31	4,36	7,94	4,04	1,53	2,52			
0,53%	0,96%	1,78%	0,93%	0,34%	0,57%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
444,9			441,6			99,3%		
8,1616			5,3177					
1,83%			1,20%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
434	449	449	449	453	452	102,8%	100,2%	101,3%
438	457	437	449	457	452	102,8%	101,1%	101,3%
438	450	452	452	455	452	103,5%	100,7%	101,3%
436,7	452,0	446,0	450,0	455,0	452,0	103,1%	100,7%	101,3%
2,31	4,36	7,94	1,73	2,00	0,00			
0,53%	0,96%	1,78%	0,38%	0,44%	0,00%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
444,9			452,3			101,7%		
8,2			2,55					
1,83%			0,56%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
434	449	449	456	456	454	104,4%	100,9%	101,8%
438	457	437	449	451	454	102,8%	99,8%	101,8%
438	450	452	454	458	448	104,0%	101,3%	100,4%
436,7	452,0	446,0	453,0	455,0	452,0	103,7%	100,7%	101,3%
2,31	4,36	7,94	3,61	3,61	3,46			
0,53%	0,96%	1,78%	0,80%	0,79%	0,77%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
444,9			453,3			101,9%		
8,2			3,35					
1,83%			0,74%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
434	449	449	417	416	416	95,5%	92,0%	93,3%
438	457	437	415	416	414	95,0%	92,0%	92,8%
438	450	452	419	422	426	96,0%	93,4%	95,5%
436,7	452,0	446,0	417,0	418,0	418,7	95,5%	92,5%	93,9%
2,31	4,36	7,94	2,00	3,46	6,43			
0,53%	0,96%	1,78%	0,48%	0,83%	1,54%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
444,9			417,9			93,9%		
8,1616			3,8550					
1,83%			0,92%					

Annexe 16 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,3	3,45	3,56	3,3	3,19	3,27	99,6%	90,5%	92,5%
3,33	3,58	3,55	3,25	3,18	3,3	98,1%	90,2%	93,4%
3,31	3,55	3,49	3,2	3,25	3,33	96,6%	92,2%	94,2%
3,3	3,5	3,5	3,3	3,2	3,3	98,1%	90,9%	93,4%
0,02	0,07	0,04	0,05	0,04	0,03			
0,46%	1,93%	1,07%	1,54%	1,18%	0,91%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
3,46			3,25			94,1%		
0,1154			0,0533					
3,34%			1,64%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,3	3,45	3,56	3,52	3,55	3,6	106,2%	100,7%	101,9%
3,33	3,58	3,55	3,5	3,58	3,65	105,6%	101,5%	103,3%
3,31	3,55	3,49	3,54	3,57	3,55	106,8%	101,2%	100,5%
3,3	3,5	3,5	3,5	3,6	3,6	106,2%	101,1%	101,9%
0,02	0,07	0,04	0,02	0,02	0,05			
0,46%	1,93%	1,07%	0,57%	0,43%	1,39%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
3,5			3,56			103,0%		
0,1			0,04					
3,34%			1,25%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,3	3,45	3,56	3,38	3,38	3,27	102,0%	95,8%	92,5%
3,33	3,58	3,55	3,33	3,3	3,25	100,5%	93,6%	92,0%
3,31	3,55	3,49	3,4	3,4	3,29	102,6%	96,4%	93,1%
3,3	3,5	3,5	3,4	3,4	3,3	101,7%	95,3%	92,5%
0,02	0,07	0,04	0,04	0,05	0,02			
0,46%	1,93%	1,07%	1,07%	1,57%	0,61%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
3,5			3,33			96,4%		
0,1			0,06					
3,34%			1,75%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,3	3,45	3,56	3,27	3,25	3,22	98,7%	92,2%	91,1%
3,33	3,58	3,55	3,26	3,23	3,28	98,4%	91,6%	92,8%
3,31	3,55	3,49	3,22	3,27	3,22	97,2%	92,7%	91,1%
3,3	3,5	3,5	3,3	3,3	3,2	98,1%	92,2%	91,7%
0,02	0,07	0,04	0,03	0,02	0,03			
0,46%	1,93%	1,07%	0,81%	0,62%	1,07%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
3,46			3,25			93,9%		
0,1154			0,0245					
3,34%			0,75%					

Annexe 17 : Résultats de pH mesurés durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia®

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,61	3,45	3,43	3,63	3,42	3,39	100,6%	98,8%	99,1%
3,61	3,45	3,46	3,61	3,47	3,37	100,0%	100,3%	98,5%
3,61	3,48	3,37	3,65	3,4	3,35	101,1%	98,3%	98,0%
3,6	3,5	3,4	3,6	3,4	3,4	100,6%	99,1%	98,5%
0,00	0,02	0,05	0,02	0,04	0,02			
0,00%	0,50%	1,34%	0,55%	1,05%	0,59%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
3,50			3,48			99,4%		
0,0901			0,1201					
2,58%			3,45%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,61	3,45	3,43	3,51	3,37	3,35	97,2%	97,4%	98,0%
3,61	3,45	3,46	3,5	3,37	3,39	97,0%	97,4%	99,1%
3,61	3,48	3,37	3,52	3,37	3,34	97,5%	97,4%	97,7%
3,6	3,5	3,4	3,5	3,4	3,4	97,2%	97,4%	98,2%
0,00	0,02	0,05	0,01	0,00	0,03			
0,00%	0,50%	1,34%	0,28%	0,00%	0,79%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
3,5			3,41			97,6%		
0,1			0,07					
2,58%			2,17%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,61	3,45	3,43	3,42	3,8	3,38	94,7%	109,8%	98,8%
3,61	3,45	3,46	3,43	3,42	3,34	95,0%	98,8%	97,7%
3,61	3,48	3,37	3,47	3,4	3,42	96,1%	98,3%	100,0%
3,6	3,5	3,4	3,4	3,5	3,4	95,3%	102,3%	98,8%
0,00	0,02	0,05	0,03	0,23	0,04			
0,00%	0,50%	1,34%	0,77%	6,37%	1,18%			
Total J0			Total J90+8					
3,5			3,45			98,8%		
0,1			0,13					
2,58%			3,90%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
3,61	3,45	3,43	3,38	3,34	3,49	93,6%	96,5%	102,0%
3,61	3,45	3,46	3,36	3,34	3,48	93,1%	96,5%	101,8%
3,61	3,48	3,37	3,4	3,4	3,5	94,2%	98,3%	102,3%
3,6	3,5	3,4	3,4	3,4	3,5	93,6%	97,1%	102,0%
0,00	0,02	0,05	0,02	0,03	0,01			
0,00%	0,50%	1,34%	0,59%	1,03%	0,29%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
3,50			3,41			97,5%		
0,0901			0,0640					
2,58%			1,88%					

Annexe 18 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon polyéthylène haute densité

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
350	350	350	348	350	357	99,4%	100,2%	102,0%
351	348	350	350	363	348	100,0%	103,9%	99,4%
349	350	350	338	357	345	96,6%	102,2%	98,6%
350,0	349,3	350,0	345,3	356,7	350,0	98,7%	102,1%	100,0%
1,00	1,15	0,00	6,43	6,51	6,24			
0,29%	0,33%	0,00%	1,86%	1,82%	1,78%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
349,8			350,7			100,3%		
0,8333			7,4162					
0,24%			2,11%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
350	350	350	349	353	350	99,7%	101,0%	100,0%
351	348	350	343	363	347	98,0%	103,9%	99,1%
349	350	350	343	355	353	98,0%	101,6%	100,9%
350,0	349,3	350,0	345,0	357,0	350,0	98,6%	102,2%	100,0%
1,00	1,15	0,00	3,46	5,29	3,00			
0,29%	0,33%	0,00%	1,00%	1,48%	0,86%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
349,8			350,7			100,3%		
0,8			6,28					
0,24%			1,79%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
350	350	350	344	348	351	98,3%	99,6%	100,3%
351	348	350	346	349	347	98,9%	99,9%	99,1%
349	350	350	342	347	355	97,7%	99,3%	101,4%
350,0	349,3	350,0	344,0	348,0	351,0	98,3%	99,6%	100,3%
1,00	1,15	0,00	2,00	1,00	4,00			
0,29%	0,33%	0,00%	0,58%	0,29%	1,14%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
349,8			347,7			99,4%		
0,8			3,81					
0,24%			1,10%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
350	350	350	357	357	365	102,0%	102,2%	104,3%
351	348	350	357	364	368	102,0%	104,2%	105,1%
349	350	350	363	356	359	103,7%	101,9%	102,6%
350,0	349,3	350,0	359,0	359,0	364,0	102,6%	102,8%	104,0%
1,00	1,15	0,00	3,46	4,36	4,58			
0,29%	0,33%	0,00%	0,96%	1,21%	1,26%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
349,8			360,7			103,1%		
0,8333			4,3875					
0,24%			1,22%					

Annexe 19 : Résultats de l'osmolalité mesurées durant l'étude de stabilité pour la vancomycine 50 mg/mL conditionnés en flacon Novelia®

J0			J90					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
351	350	349	359	355	360	102,4%	101,5%	102,8%
351	348	352	357	348	352	101,8%	99,5%	100,5%
350	351	350	356	350	356	101,5%	100,1%	101,6%
350,7	349,7	350,3	357,3	351,0	356,0	101,9%	100,4%	101,6%
0,58	1,53	1,53	1,53	3,61	4,00			
0,16%	0,44%	0,44%	0,43%	1,03%	1,12%			
Total J0			Total J90			Recouvrement sur J0		
350,2			354,8			101,3%		
1,2019			4,0242					
0,34%			1,13%					

J0			J90+4					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
351	350	349	350	347	349	99,8%	99,2%	99,6%
351	348	352	346	346	349	98,7%	99,0%	99,6%
350	351	350	354	354	349	101,0%	101,2%	99,6%
350,7	349,7	350,3	350,0	349,0	349,0	99,8%	99,8%	99,6%
0,58	1,53	1,53	4,00	4,36	0,00			
0,16%	0,44%	0,44%	1,14%	1,25%	0,00%			
Total J0			Total J90+4			Recouvrement sur J0		
350,2			349,3			99,7%		
1,2			3,00					
0,34%			0,86%					

J0			J90+8					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
351	350	349	356	356	353	101,5%	101,8%	100,8%
351	348	352	355	357	357	101,2%	102,1%	101,9%
350	351	350	357	361	355	101,8%	103,2%	101,3%
350,7	349,7	350,3	356,0	358,0	355,0	101,5%	102,4%	101,3%
0,58	1,53	1,53	1,00	2,65	2,00			
0,16%	0,44%	0,44%	0,28%	0,74%	0,56%			
Total J0			Total J90+8			Recouvrement sur J0		
350,2			356,3			101,7%		
1,2			2,18					
0,34%			0,61%					

J0			J90+14					
A	B	C	A	B	C	Recouvrement sur Moy A J0	Recouvrement sur Moy B J0	Recouvrement sur Moy C J0
351	350	349	355	352	353	101,2%	100,7%	100,8%
351	348	352	356	358	360	101,5%	102,4%	102,8%
350	351	350	357	358	352	101,8%	102,4%	100,5%
350,7	349,7	350,3	356,0	356,0	355,0	101,5%	101,8%	101,3%
0,58	1,53	1,53	1,00	3,46	4,36			
0,16%	0,44%	0,44%	0,28%	0,97%	1,23%			
Total J0			Total J90+14			Recouvrement sur J0		
350,2			355,7			101,6%		
1,2019			2,8723					
0,34%			0,81%					

Annexe 20 : Notice d'utilisation d'un collyre de ceftazidime 50mg/mL à destination des patients

Précaution et mise en garde

- Respecter la posologie prescrite par votre ophtalmologiste.
- En cas d'aggravation de l'infection, d'intolérance au produit, ou de gêne lors de l'utilisation, consultez immédiatement votre ophtalmologiste.
- Attendre environ 5 min avant l'instillation éventuelle d'un autre collyre ou d'une pommade ophtalmologique.
- Ne pas utiliser le collyre au-delà de sa péremption.
- Ne pas porter de lentilles de contact pendant votre traitement.
- Tenir ce médicament hors de portée et de la vue des enfants.

Renseignements administratifs

Prix pour 1 flacon de 10 ml : 39,72 €

Taux de remboursement : 100 %

Service Pharmacie
Groupe hospitalier Pellegrin
Place Amélie Raba-Léon
33076 Bordeaux cedex

Pour la délivrance du collyre

Service de rétrocession
du lundi au vendredi de 9h00 à 18h00
le samedi de 8h30 à 16h00
Tél. 05 56 79 49 10

Veuillez-vous munir de votre ordonnance et de votre carte Vitale (ou une attestation de sécurité sociale à jour) et de votre carte de mutuelle si vous en possédez une

Un délai de 48 heures est nécessaire pour préparer votre collyre : pensez à nous contacter avant votre venue à l'hôpital.

Vos prochaines venues à l'hôpital

- .....
- .....
- .....
- .....
- .....

CHU Hôpitaux de Bordeaux

Pôle produits de santé
Pharmacie Pellegrin

Notice d'utilisation

COLLYRE de Ceftazidime 50mg/ml

Ceftazidime 500 mg
Flacon de 10ml

Cette notice contient toutes les informations nécessaires au bon usage de votre traitement, lisez la attentivement avant d'utiliser votre collyre.

www.chu-bordeaux.fr

Composition

Pour 1 flacon de 10 ml :
Ceftazidime.....500 mg
Chlorure de sodium 0,9%.....QSP 10 ml

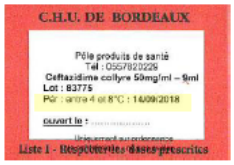
Indication

Le collyre de Ceftazidime est utilisé lors d'infection oculaire en association avec d'autres collyres antibiotiques ou antifongiques.

Posologie

Veuillez respecter rigoureusement la prescription de votre médecin.

Etiquetage du collyre



NB: La date de péremption de l'étiquetage est la date de péremption **AVANT** ouverture

Mode d'administration

Lors de l'utilisation du collyre de Ceftazidime, veuillez suivre les étapes suivantes :

- Se laver soigneusement les mains
- Vérifier la péremption du produit
- Faire couler une première goutte (photo 3)
- Tirer légèrement la paupière inférieure vers le bas et regarder en haut (photo 4)
- Exercer une pression douce et progressive sur le flacon pour instiller la ou les gouttes dans le coin intérieur de l'œil (photo 5)
- Eviter le contact de l'embout avec l'œil ou la paupière
- Fermer ensuite la paupière, cligner des yeux pour répartir le collyre tout en appuyant avec un doigt dans l'angle interne de l'œil (photos 6 et 7)
- Refermer soigneusement le flacon de collyre (photo 1 et 2)

Respecter les conditions de conservation indiquées sur cette plaquette et l'étiquetage du flacon.

Conservation

Conservez votre collyre entre + 4° C et + 8° C au réfrigérateur

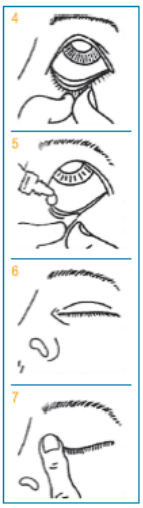
Avant ouverture, se référer à la date figurant sur l'étiquette,

Après ouverture, se conserve 10 jours entre + 4° C et + 8° C au réfrigérateur, sans dépasser la date figurant sur l'étiquette

Photo 1

Photo 2

Photo 3



SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

RESUME

Les collyres renforcés en antibiotiques constituent un traitement d'urgence de la kératite bactérienne. Au CHU de Bordeaux, ces collyres sont produits chaque semaine en raison de leur courte stabilité au réfrigérateur. Afin d'optimiser la production, l'objectif de cette étude est d'évaluer la stabilité physique et microbiologique de collyres d'amikacine, de ceftazidime et de vancomycine à 5% stockés à -20°C pendant 3 mois et de comparer leur stabilité dans 2 conditionnements multidoses différents : des flacons en polyéthylène haute densité (PEHD) et des flacons munis du dispositif Novelia®. Pour cela, des solutions d'amikacine et de ceftazidime à 5% ont été préparées en les diluant dans du chlorure de sodium à 0,9% et une solution de vancomycine à 5% en le diluant dans du glucose à 5% puis conditionnées dans deux types de conditionnements multidoses. Sur une période de 90 jours, les caractéristiques physico-chimiques ont été évaluées et la stérilité in vitro a été testée par la méthode de filtration sur membrane comme indiqué dans la Pharmacopée européenne (2.6.1). La stérilité et les propriétés physiques ont également été étudiées après 4, 8 et 14 jours d'utilisation simulée. Les résultats de cette étude ont démontré que l'amikacine, la ceftazidime et la vancomycine à 5% sont physiquement et microbiologiquement stables pendant 90 jours à -20°C. Après ouverture, les collyres conditionnés en flacons en PEHD doivent être stockés entre 2 et 8°C et utilisés dans les 8 jours tandis que les collyres d'amikacine et de vancomycine 5% conditionnés en flacons Novelia® peuvent être utilisés jusqu'à 14 jours après ouverture. Toutefois, les collyres de ceftazidime 5% conditionnés en flacons Novelia® doivent être utilisés dans les 8 jours suivant l'ouverture en raison de leur courte stabilité physico-chimique.

Title : Microbiological stability of three fortified antibiotic eye drops (amikacin, ceftazidime and vancomycin)

Summary
Fortified antibiotic ophthalmic solutions are emergency treatment for bacterial keratitis. At Bordeaux University Hospital, they were produced weekly because of their short stability at fridge. In order to optimize production, this study evaluates the sterility of 5% solutions of amikacin, ceftazidime and vancomycin stored at -20°C for 3 months and compare their microbiological stability in 2 different containers : High-Density-PolyEthylene (HDPE) bottles and Novelia® bottles. Solutions of 5% amikacin and 5% ceftazidime were diluted in 0,9% sodium chloride and 5% vancomycin in 5% dextrose. Over a 90-day period, physico-chemical characteristics were monitored and in vitro sterility was assayed by the membrane filtration method according to the European Pharmacopoeia (2.6.1) for each solution. The sterility and physical properties were also studied after 4, 8 and 14 days of simulated use. The results of this study demonstrated that 5% amikacin, ceftazidime and vancomycin are physically and microbiologically stable at -20°C for 90 days. After delivery, in HDPE bottles, they must be stored at 2 - 8°C and used within 8 days whereas, in Novelia® bottles, 5% amikacin and vancomycin could be used until 14 days after opening. However, 5% ceftazidime in Novelia® bottles must be used within 8 days after delivery because of the short physico-chemical stability.

Mots-clés : amikacine, ceftazidime, vancomycine, kératite bactérienne, collyre, stabilité

Discipline : Pharmacie
Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques
Collège Sciences de la Santé
146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux Cedex