

PREPARATI GALENICI ANTIBIOTICI OFTALMICI: STUDIO DI STABILITÀ CHIMICO FISICA E MICROBIOLOGICA COLIRIO DI VANCOMICINA FORTIFICATA

Chiara DEL NOCE¹, Antonella PITTALUGA², Marina PAPADIA¹, Giorgia LAGOSTENA², Carlo Enrico TRAVERSO¹

¹Clinica Oculistica, Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica (DINOG), Università degli Studi di Genova

²Settore di Galenica Clinica della U.O.C Farmacia interna dell'IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST, Genova

ABSTRACT

Purpose: Recently the University Eye Clinic of Genoa implemented the distribution of fortified antibiotic eye drops. The Hospital Pharmacy Unit (HPU) ensures, to now, according to the Good Manufacturing Practises (GMP), a validity period of the preparation of one week at a temperature of 2-8 ° C. Through the collaboration with the Laboratory of Toxicology of the Hospital San Martino, the HPU with the Clinic of Ophthalmology brought on a study on the chemical and physical stability of that eye drops with the aim of ensuring a continuity in home care for the patient with a stable and effective over-time product, optimizing the preparation of eye drops to extend their period of validity.

Basic procedures: It was evaluated the physical, chemical and microbiological stability of 5% Vancomycin fortified eye drops. Each preparation was divided in two glass bottles and stored in the dark at two different temperatures: 5 ° C and -4 ° C. On days 0, 3, 7; 14; 21 were measured pH and bacterial concentration of the solutions. The last one was measured using two blood culture media with BD BACTEC solutions adding 5 ml of 5% Vancomycin. The BACTEC

vials contain a chromogenic substrate (which can be colored and emit fluorescence) that is activated in the presence of carbon dioxide, main catabolites of bacterial metabolism. For analytical determinations we used the High Performance Liquid Chromatography with the following conditions: Column: C18 150 X 4,6 mm, 5 µm; Flow rate: 1.2 ml / min; Mobile phase: 0.05 M KH₂PO₄ / acetonitrile (90:10 v/v); Wavelength: 255 nm; Injection volume: 30 µl. **Results:** The samples demonstrated a low degradation rate in the two different storage conditions (refrigerator-freezer). If we consider 100 the concentration value at t= 0 days, the percentage changes through the observations falling within 95% and 105%, range established by FUXXI.

Conclusions: Solutions of 5% vancomycin were found to be stable over time without significant changes. At the end of the stability tests the fortified eye drops solutions of 5% Vancomycin are stable for at least 21 days at the temperature of 2-8°C and -4 ° C. Through the realization of this study can be ensure a continuity of care to the patient.

Ottica fisiopat 2013; XVIII: 185-193

185

INTRODUZIONE E OBIETTIVO

L'ampio utilizzo di colliri antibiotici ha determinato un aumento nell'incidenza di infezioni causate da germi resistenti ai colliri presenti in commercio¹.

Le infezioni oculari batteriche sono gravi patologie per le quali non esistono farmaci topici efficaci in commercio².

L'efficacia e la sicurezza nell'utilizzo di terapie topiche antibiotiche è già stata provata in letteratura³.

I colliri antibiotici rinforzati con preparazione galenica sono indicati nelle infezioni batteriche oculari gravi². Per colliri antibiotici rinforzati

si intendono preparati galenici oftalmici magistrali personalizzati che contengono principi attivi antibiotici. Tali preparati galenici sono da considerarsi Farmaci Orfani, in quanto non sono reperibili nelle Farmacie esterne e non sono prodotti industrialmente ma, come clinicamente dimostrato, sono indispensabili per l'esito di guarigione di gravi patologie oculari.

Il Settore di Galenica Clinica della U.O.C Farmacia interna dell'IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST di Genova, ad oggi, allestisce questi preparati secondo le N.B.F.F.U.XII, e assicura un periodo di

AUTORE CORRISPONDENTE

Marina Papadia
Clinica Oculistica,
Dipartimento di
Neuroscienze,
Oftalmologia,
Genetica e
Ginecologia,
Università degli
Studi di Genova
Viale Benedetto XV 5
16145 Genova
tel. 010 353 8452
Fax 010 353 8452
marinapapadia@
yahoo.com

PAROLE CHIAVE:

colliri rinforzati
antibiotici,
sterilità, stabilità,
disponibilità.

KEY WORDS:

Fortified antibiotics
eye drops, sterility,
stability and
availability.

validità del preparato di una settimana a temperatura fra +2 e +8°C. Questo vuole dire che il paziente, a cui viene data la disponibilità di erogazione del preparato anche ambulatorialmente, settimanalmente deve recarsi presso l'ambulatorio per ritirare il collirio che il personale della Farmacia deve allestire. Proprio per ovviare a questo limite, riguardante la ridotta validità dei preparati, in collaborazione con la U.O. Farmacia e il Laboratorio di Tossicologia della Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino di Genova, si è intrapreso uno studio relativo alla stabilità chimico-fisica del collirio rinforzato di Vancomicina al fine di garantire al paziente una continuità terapeutica domiciliare con un prodotto stabile ed efficace nel tempo ed ottimizzare inoltre l'organizzazione dell'attività di produzione galenica allungando i periodi di validità del collirio.

Scopo dello studio è valutare la stabilità e sterilità dei colliri a 7, 15 e 21 giorni per ridurre il numero di allestimenti sotto cappa ed aumentare la validità del collirio.

La preparazione del farmaco sarà garantita dal Settore di Galenica Clinica dell'U.O.C Farmacia interna dell' IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST di Genova.

METODOLOGIA

Preparazione galenica magistrale dei farmaci antibiotici topici

I preparati oftalmici, di cui segue composizione e metodica di preparazione vengono allestiti tutti con tecnica asettica: sotto cappa a

flusso laminare verticale con l'uso di guanti e camici sterili, mascherina e copricapo⁴. L'assicurazione della sterilità è garantita da un processo controllato che prevede la standardizzazione dei necessari controlli.

Sui preparati finiti vengono effettuati controlli microbiologici; il collirio viene inoculato in terreni di coltura BACTEC PLUS+(Aerobic /F ed Anaerobic /F) e/o BACTEC PEDS PLUS/F ed il campione viene inviato presso il Laboratorio di Batteriologia per il controllo microbiologico come da Farmacopea Ufficiale XI Ed., DM 2/5/02, GU n. 115 del 18/5/02 e "Norme di Buona Preparazione" e Farmacopea Ufficiale XII Ed, DM 3/12/08, GU n. 304 del 31/12/08 e "Norme di Buona Preparazione".

I terreni sono idonei all'isolamento eventuale di batteri aerobi ed anaerobi e funghi.

Stabilità chimico-fisica e microbiologica

È stata valutata la stabilità chimico-fisica e microbiologica del collirio di Vancomicina fortificata al 5% (p/V). Ogni preparato è stato diviso in due bottiglie in vetro e conservato al buio a due differenti temperature: +5°C e -4°C. Ai giorni 0; 7; 14; 21 sono stati misurati pH ed osmolarità (criteri di stabilità) e concentrazione batterica (criteri di sterilità). Durante il periodo di studio, i controlli di stabilità fisica, chimica e microbiologica sono stati eseguiti sul collirio ad intervalli regolari. Il collirio è stato testato nel riparo della luce in quanto essa aumenta il rischio di degradazione dei principi attivi. Tutte le analisi sono

state effettuate in triplicato, e l'analisi di varianza ha permesso di verificare se i valori ottenuti in tempi diversi fossero statisticamente differenti. Osmolarità e pH delle soluzioni sono stati misurati rispettivamente con un misuratore di pH e uno osmometro. Nello studio di stabilità chimica è stata valutata l'integrità chimica e conservazione del contenuto di ciascun principio attivo. La concentrazione delle soluzioni è stata determinata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Ad ogni data è stata inclusa una verifica della identificazione del principio attivo confrontando i tempi di ritenzione dei composti.

Studio di sterilità

Lo studio della sterilità è stato effettuato mediante l'utilizzo di membrane filtranti⁵. La rilevazione della crescita batterica in fase liquida avviene mediante un metodo fluorimetrico⁶. Il principio di trattamento di un antibiotico è quello di ottenere concentrazioni minime inibenti sempre inferiori che permettano la completa inibizione, o quasi, della crescita batterica in determinate condizioni. Tutto questo è strettamente dipendente dalle caratteristiche dell'antibiotico stesso che devono tenere conto del pH, dell'osmolarità e della sterilità della preparazione. Per questo motivo nel nostro studio abbiamo tenuto conto dei suddetti parametri, che sono stati misurati in diversi giorni:
D0: prima giornata
D7: settima giornata

D14: quattordicesima giornata
D21: ventunesima giornata.

RISULTATI

pH

Il pH della vancomicina ha registrato una media di 4,50 con una variazione del pH inferiore al 5%; ed ha presentato notevoli differenze a seconda del diluente utilizzato. Infatti il pH dell'antibiotico diluito in BSS è risultato più favorevole per l'occhio rispetto a quello diluito con il sodio cloruro 0,9% e al glucosio 5%. Le variazioni del pH in tutte le preparazioni ed a tutti i tempi non sono risultate statisticamente significative ($p < 0.01$). La tabella 1 e la figura 1 riassumono i dati riguardanti le variazioni del pH nei diversi diluenti e ai diversi tempi di consultazione.

Osmolarità

Nel nostro studio, l'osmolarità delle soluzioni, definita come la concentrazione di principio attivo in acqua sterile, è risultata di 50mOsm/L a cui va aggiunta l'osmolarità delle soluzioni utilizzate, rispettivamente 294 mOsm/L per il BSS; 278 mOsm/L per il glucosio e 300 mOsm/L per il sodio cloruro. Tenendo conto che l'occhio può tollerare variazioni di pressione osmotica da 240 a 550 mOsm/L, i nostri risultati sono da considerarsi pienamente accettabili. Le variazioni dell'osmolarità in tutte le preparazioni ed a tutti i tempi non sono risultate statisticamente significative ($p < 0.01$). La tabella 2 e la figura 2 riassumono i dati riguardanti le variazioni

Tabella 1

Variazioni del pH delle differenti preparazioni di Vancomicina rinforzata (5 mg/10 ml) dal giorno 0 al giorno 21

pH	BSS	NaCl 0,9%	Destroso 5%
D0	5,82	4,02	3,77
D7	5,80	4,02	3,76
D14	5,80	4,07	3,76
D21	5,82	4,07	3,76

fig. 1

pH delle differenti preparazioni del collirio di vancomicina fortificata

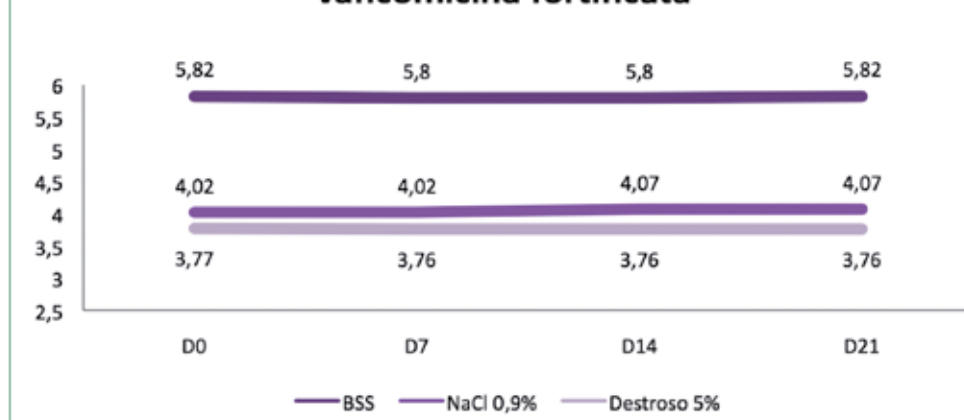


fig. 1
Variazioni del pH delle differenti preparazioni di Vancomicina rinforzata (5 mg/10 ml) dal giorno 0 al giorno 21.

dell'osmolarità nei diversi diluenti e ai diversi tempi di consultazione.

Concentrazione dell'antibiotico

Le variazioni della concentrazione del collirio di Vancomicina in tutte le preparazioni non sono risultate statisticamente significative ($p < 0.01$) tra il giorno D0-D14-D21 ($p < 0.01$). Si è invece riscontrata una variazione della concentrazione antibiotica delle soluzioni al giorno 7 ma sempre statisticamente non significativa ($p < 0.01$).

La tabella 3 e la figura 3 riassumono i dati riguardanti le variazioni della concentrazione dell'antibiotico di Vancomicina nei diversi diluenti e ai diversi tempi di consultazione.

Sterilità

Durante lo studio del test di neutralizzazione è stata osservata una crescita batterica, mostrando che l'attività antimicrobica dell'antibiotico è completamente eliminata per volumi di risciacquo del filtro pari a 300 ml, utilizzati per eliminare tutte le tracce di antibiotici che possono inibire la crescita batterica.

Al di sotto questi volumi, non è stata osservata alcuna crescita di colonie di origine batterica, segno di una completa sterilità della soluzione analizzata.

La tabella 4 riassume i dati riguardanti lo studio della sterilità dei colliri rinforzati.

Per lo studio del collirio abbiamo

Tabella 2

Variazione dell'osmolarità delle diverse preparazioni di Vancomicina rinforzata (5 mg/10 ml) dal giorno 0 al giorno 21

Osmolarità	BSS	NaCl 0,9%	Destrosio 5%
D0	344	331	351
D7	344	330	351
D14	345	330	351
D21	344	330	351

fig. 2

Osmolarità delle differenti preparazioni del collirio di vancomicina fortificata



utilizzato una concentrazione al 5% che corrisponde a quella utilizzata nella pratica clinica e che è conforme con la letteratura⁷. Abbiamo utilizzato due metodi di conservazione: frigo (5°C) freezer (-5°C).

La conservazione in frigorifero può mantenere una stabilità adeguata anche se alcuni batteri mantengono una capacità di proliferazione fino a 0 gradi. Il frigo dunque non fa che rallentare la crescita batterica mentre il freezer la arresta. Nel nostro studio i campioni analizzati hanno dimostrato una ridotta cinetica di degradazione nelle due diverse condizioni di conservazione (frigo-freezer). Posto 100 il valore di concentrazione calcolato al t = 0 giorni, le variazioni percentuali ai diversi tempi rientrano

tutte all'interno del range della F.U.XII, ovvero tra il 95% e il 105%.

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha dimostrato che il preparato galenico oftalmico di Vancomicina 5mg/10ml è stabile da un punto di vista chimico-fisico e microbiologico a 21 giorni se conservato fra + 2 e + 8°C e a - 4°C. I dati ottenuti sul pH e sull'osmolarità evidenziano come sia preferibile utilizzare la soluzione salina bilanciata, in quanto permette di ottenere un pH adeguato ed un osmolarità migliore del sodio cloruro 0,9% e del glucosio 5%. L'occhio è in grado di tollerare un range di pH tra 3 e 10 e di osmolarità tra 240-550 mOsm/L.

fig. 2
Variazione dell'osmolarità delle diverse preparazioni di Vancomicina rinforzata (5 mg/10 ml) dal giorno 0 al giorno 21.

Tabella 3

Concentrazione antibiotica delle soluzioni

D0	51,7
D7	47,1
D14	52,4
D21	52,4

fig. 3

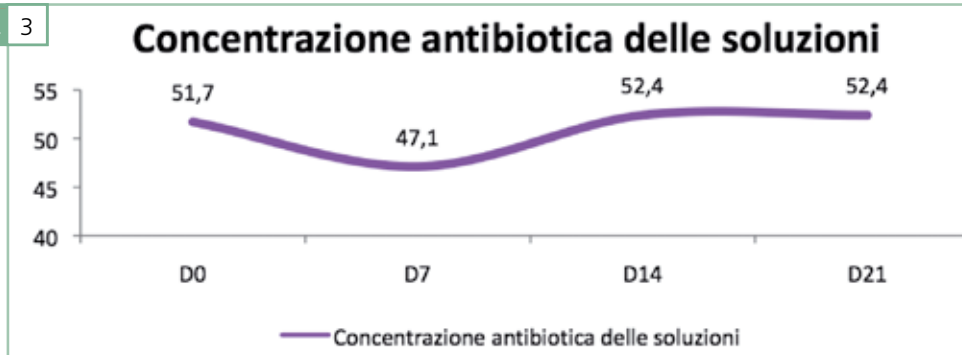


fig. 3
Variazioni della
concentrazione
antibiotica
delle soluzioni
dal giorno 0 al
giorno 21.

La figura 4 rappresenta il rapporto tra pH e osmolarità al 21 giorno del collirio di Vancomicina nei diversi diluenti. Il quadrato delimitato dalle linee nere racchiude il range di tollerabilità dell'occhio riferito ai valori di pH ed osmolarità. Il collirio preparato con la soluzione salina bilanciata (BSS) è risultato cadere nella zona più centrale dell'area di tollerabilità, dimostrando un maggiore equilibrio.

Questo studio ci ha permesso di aumentare il periodo di validità del collirio, rispettando la qualità dei parametri chimico fisici e microbiologici che assicurano la concentrazione costante ed efficace del chemioterapico garantendo sicurezza ed appropriatezza terapeutica.

A questo corrisponde una migliore organizzazione dell'allestimento dei colliri rinforzati che permetterà di garantire un'adeguata terapia ad un maggior numero di pazienti. Questo

deriva dal fatto che riducendo i costi per l'allestimento si aumenta la possibilità che l'Azienda possa continuare a rendere disponibili questi farmaci per un numero crescente di pazienti.

Inoltre il reparto avrà la possibilità di conservare un certo numero di flaconi che potranno essere immediatamente utilizzati in caso di urgenza.

Le ulcere corneali sono emergenze oftalmiche che, se non curate adeguatamente, possono portare anche alla perdita del bulbo oculare⁸. Potere iniziare una terapia corretta tempestivamente risulta quindi essenziale per migliorare la prognosi del paziente⁹.

La possibilità di avere dei flaconi di colliri rinforzati a disposizione in qualsiasi momento permetterà al paziente di iniziare tempestivamente la cura, anche nei momenti critici quali week-end o nei periodi di ferie. Il personale della Farmacia potrà inoltre ridurre il numero delle sedute

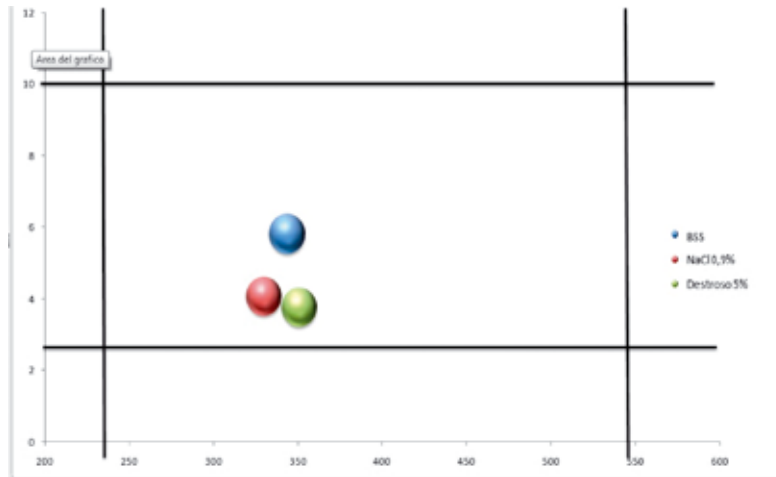
Tabella 4

Risultati dello studio di sterilità

Sterilità	1° Flacone	2° Flacone	3° Flacone
D0	-	-	-
D7	-	-	-
D14	-	-	-
D21	-	-	-

- : indica l'assenza di crescite batteriche nel campione analizzato

fig. 4



destinate alla preparazione dei colliri, ed il paziente potrà ridurre il numero di volte in cui è tenuto a recarsi in ospedale a prelevare il preparato. I processi di preparazione messi a punto da questo studio, dimostrano che le soluzioni potranno essere preparate e messe a disposizione dei pazienti con meno difficoltà dalla farmacia ospedaliera.

La figura 5 rappresenta la variazione della richiesta di colliri antibiotici rinforzati di Vancomicina dal 2005 al 2012, evidenziando un notevole aumento della richiesta. Dal 2005 ad oggi sono stati prodotti per i nostri pazienti 215 flaconi di

collirio di Vancomicina rinforzata.

Il costo di ogni singolo collirio comprensivo di materiali di base, tempo di fabbricazione e controlli fisici, chimici e microbiologici è di 21,786 Euro.

In previsione di una maggiore conservazione del prodotto messa a punto dal nostro studio si potrà assistere, oltre che ad una continuità terapeutica maggiore per il paziente anche ad un risparmio notevole dal punto di vista economico considerando che i colliri non dovranno essere più prodotti settimanalmente ma mensilmente. Il nostro proposito futuro è quello

fig. 4
Osmolarità e pH al giorno 21 delle diverse soluzioni di Vancomicina fortificata (5 mg/10 ml). Le linee nere racchiudono l'area di tollerabilità oculare per pH ed osmolarità.

fig. 5

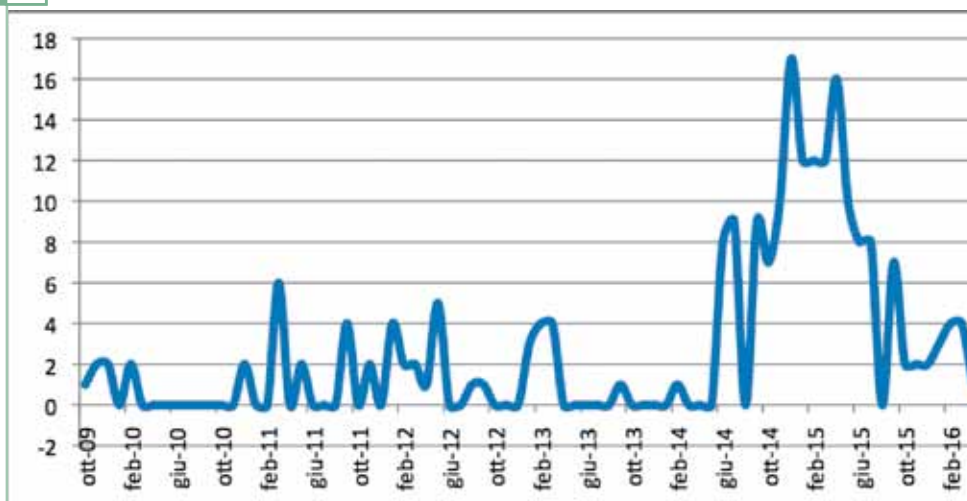


fig. 5
Variazione
nel tempo
della richiesta
di colliri
antibiotici
rinforzati di
Vancomicina.

di ampliare l'organizzazione interna multidisciplinare a favore dei pazienti per potere garantire la prosecuzione delle terapie oftalmiche galeniche non reperibili in commercio e tramite protocolli d'intesa allestire i colliri rinforzati per altri Ospedali della Regione Liguria che non offrono ai pazienti questo importante servizio. In conclusione possiamo affermare che i risultati della nostra ricerca permetteranno un'ottimizzazione del lavoro con conseguente riduzione dei costi ad una maggiore disponibilità del farmaco per la prosecuzione delle terapie a domicilio e quindi ad una migliore compliance del paziente.

RIASSUNTO

Obiettivi: negli ultimi anni la Clinica Oculistica dell'Università degli Studi di Genova ha implementato l'attività di distribuzione di colliri rinforzati antibiotici. La U.O. Farmacia assicura, ad oggi, secondo le Norme Buona Fabbricazione della Farmacopea Ufficiale XII edizione (N.B.F.F.U.XII), un periodo di validità del preparato di una settimana a temperatura di 2-8 °C. In collaborazione con il Laboratorio di Tossicologia dell'IRCCS

Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST, si è intrapreso uno studio relativo alla stabilità chimico-fisica del suddetto collirio al fine di garantire al paziente una continuità terapeutica domiciliare con un prodotto stabile ed efficace nel tempo ed ottimizzare inoltre l'organizzazione dell'attività di allestimento allungando i periodi di validità del collirio.

Procedure di base: è stata valutata la stabilità chimico-fisica e microbiologica del collirio di Vancomicina fortificata al 5% (p/V). Ogni allestimento è stato diviso in due contenitori in vetro e conservato al buio a due differenti temperature : 5°C e -4°C. Ai giorni 0; 3; 7; 14; 21 sono stati misurati pH e concentrazione batterica. Per quest'ultima sono stati utilizzati due terreni di coltura con soluzione BD BACTEC aggiungendo 5 ml di soluzione di Vancomicina al 5%. I flaconi Bactec contengono un substrato cromogeno (in grado di colorarsi e di emettere fluorescenza) che si attiva in presenza di anidride carbonica, principale catabolita del metabolismo batterico. Per le determinazioni analitiche abbiamo utilizzato l'HPLC con riferimento alle seguenti condizioni analitiche:

Colonna: C18 150x4,6 mm; 5µm
 Flusso: 1,2 ml/min Fase mobile:
 KH₂PO₄ 0,05 M / acetonitrile (V/V
 90:10) Lunghezza d'onda 255 nm
 Volume di iniezione: 30 µl.
 Risultati: i campioni analizzati hanno
 dimostrato una ridotta cinetica di
 degradazione nelle due diverse
 condizioni di conservazione (frigo-
 freezer). Posto 100 il valore di
 concentrazione calcolato al t = 0
 giorni, le variazioni percentuali ai
 diversi tempi rientrano tutte all'interno
 del range della F.U.XII, ovvero tra il
 95% e il 105%.
 Conclusioni: da questo studio si evince
 che il preparato galenico oftalmico di
 Vancomicina 5mg/10ml risulta essere
 stabile nel tempo senza variazioni
 rilevanti. Al termine delle prove di
 stabilità, il prodotto in questione,
 mantenuto a temperatura controllata
 a 2-8°C e a -4°C, si presenta stabile
 per almeno 21 giorni. Tramite la
 realizzazione di questo studio si può
 garantire al paziente la continuità
 terapeutica.

BIBLIOGRAFIA

1. Shalchi Z, Gurbaxani A, Baker M, Nash J. *Antibiotic resistance in microbial keratitis: ten-year experience of corneal scrapes in the United Kingdom*. *Ophthalmology* **118**(11): 2161-2165, 2011 Nov
2. Chiquet C, Romanet JP. *[Prescribing fortified eye drops]*. *J Fr Ophtalmol* **30**(4): 423-430, 2007 Apr
3. Wong RL, Gangwani RA, Yu LW, Lai JS. *New treatments for bacterial keratitis*. *J Ophthalmol* **2012**: 831502. Epub 2012 Sep 6, 2012
4. Charlton JF, Dalla KP, Kniska A. *Storage of extemporaneously prepared ophthalmic antimicrobial solutions*. *Am J Health Syst Pharm* **55**(5): 463-466, 1998 Mar 1
5. Shilova SV, Braginskaia PS, Chaïkovskaia SM, Massot A, Lemonie J. *[Use of the "Steritest" apparatus for testing the sterility of antibiotic preparations]*. *Antibiotiki* **23**(10): 879-882, 1978 Oct
6. Parveen S, Kaur S, David SA, Kenney JL, McCormick WM, Gupta RK. *Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products*. *Vaccine* 2011 Oct 19; **29**(45): 8012-8023. Epub 2011 Aug 24.
7. Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, Perdriel A, Albessard F, Debruyne D, Mouriaux F. *[Fortified antibiotic (vancomycin, amikacin and ceftazidime) eye drop stability assessment at -20 degrees C]*. *J Fr Ophtalmol* **30**(8): 807-813, 2007 Oct
8. Jan S, Khan S, Khan MN, Iqbal A, Mohammad S. *Ocular emergencies*. *J Coll Physicians Surg Pak* **14**(6): 333-336, 2004 Jun
9. Darugar A, Gaujoux T, Goldschmidt P, Chaumeil C, Laroche L, Borderie V. *[Clinical, microbiological and therapeutic features of severe bacterial keratitis]*. *J Fr Ophtalmol* 2011 Jun; **34**(6): 362-368. Epub 2011 Apr 19.
10. Good Manufacturing Practices Europee (GMP Vol 4 All 1) Fabbricazione di medicinali sterili – (rev 25 November 2008)
11. Farmacopea Ufficiale XI Ed., DM 2/5/02, GU n. 115 del 18/5/02 e "Norme di Buona Preparazione"
12. Farmacopea Ufficiale XII Ed, DM 3/12/08, GU n. 304 del 31/12/08 e "Norme di Buona Preparazione"