



Contexte

Les infections bactériennes liées à la contamination microbienne de DVI peuvent être traitées par instillation d'une solution concentrée d'antibiotique à l'intérieur de la lumière du cathéter. Cependant, la formation de biofilms dans les DVI réduit l'efficacité de ce traitement. L'association d'un antibiotique (e.g. gentamicine sulfate) et EDTA disodique augmente l'efficacité de l'antibiotique contre les biofilms formés *in vitro* et *in vivo* (1-2).

Objectifs

L'objectif principal et spécifique de cette étude était (i) de préparer une solution stérile injectable combinant gentamicine sulfate (GS) et EDTA disodique (verrou) à des concentrations actives et conditionnée en flacon unidose prêt à l'emploi, et (ii) d'évaluer les effets d'une stérilisation terminale sur la stabilité physico-chimique de cette solution GS/ EDTA disodique.

Méthode

Une solution stérile commerciale de GS (20 mg/ml) et une solution EDTA disodique (40 mg/ml) ont été mélangées sous plafond soufflant (classe A). La solution finale gentamicine-EDTA (5 mg/ml-30 mg/ml) a été ajustée à pH 8.5, puis filtrée (0.22 µm) dans des flacons en verre ambré (type I ; 5 ml) avant stérilisation par autoclavage (121°C – 20 min). Le dosage gentamicine-EDTA a été réalisé par une méthode de chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) en phase inverse (C18) avec un gradient de phase mobile composé d'une solution d'acide trifluoroacétique et d'acétonitrile. Deux méthodes de complexations ont été réalisées: la première méthode consiste à complexer la GS et la phtalaldéhyde et la deuxième l'EDTA avec du sulfate de cuivre. L'élution d'EDTA disodique (1 min) et des 4 composés (C1, C1a, C2 et C2a) de GS (10-14 min) a été réalisée par gradient de phase mobile. La détection de l'EDTA disodique et de la GS a été effectuée à 330 nm. La dégradation forcée de l'EDTA et de la GS a été réalisée en utilisant du NaOH, HCL, H2O2 et l'UV. Le dosage des impuretés respectives a été réalisé: la sisomicine (7.2 min) pour la GS et l'acide nitrilotriacétique (0.85 min) pour l'EDTA. La validation analytique des dosages UHPLC GS/ EDTA disodique a été réalisée selon les recommandations de la Conférence Internationale d'Harmonisation (2).

Résultats

Aucune modification macroscopique de la solution gentamicine-EDTA n'a été notée après autoclavage. Aucune particule visible n'a été détectée par mirage. Le taux de particules invisibles et l'osmolalité, avant et après autoclavage, n'était pas significativement différent ($\leq 10 \mu\text{m} = 0.31$ et $\leq 25 \mu\text{m} = 0.045$ part/ml et 308 mosm/l vs $\leq 10 \mu\text{m} = 0.48$ et $\leq 25 \mu\text{m} = 0.038$ part/ml et 310 mosm/l). L'analyse chromatographique de la solution gentamicine-EDTA, avant et après autoclavage, ne montrait aucune modification de l'intensité des pics d'intérêts ou l'apparition de produits de dégradation. Les dosages de gentamicine-EDTA par UHPLC présentaient une linéarité respective (GS $r^2=0.997$; EDTA $r^2=0.998$) une fidélité (CV < 5%) et une exactitude (GS : 97,9% -99,8% ; EDTA : 100%-103%) satisfaisantes. Les limites de détection et de quantification étaient de 7,99 et 24,23 µg/ml pour la GS et de 44,9 et 136 µg/ml pour EDTA. Les résultats de dégradations forcées au NaOH, HCL et à l'UV n'ont montré aucune dégradation de la GS et de l'EDTA. La réaction oxydative au H2O2 a montré la dégradation de la gentamicine-EDTA à 91.5% et 96%.

Conclusion

Dans cette étude, une préparation et une méthode originale de dosage analytique d'une solution stérile injectable Gentamicine-EDTA destinée à être administrée dans des DVI sont rapportées.

Une étude de stabilité de la solution gentamicine-EDTA (5-30 mg/mL), préalable à la conduite d'un essai clinique, est en cours pour une durée de 18 mois. Les résultats à J0, J1 et M1 ont montré que la solution est stable à température ambiante.

1. Lebeaux, D., V. Leflon-Guibout, J.M. Ghigo, and C. Beloin. (2015). *In vitro* activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
2. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the registration of pharmaceuticals for humane use: Validation of analytical procedure methodology: Text and methodology » Q2 (R1); 1999.

a Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, UMR 5305, Plateforme FRIPHARM, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, 8, avenue Rockefeller, F-69373 Lyon cedex 08, France.

b Service Pharmaceutique, Unité de Préparation et de Contrôle du Médicament, Pavillon X, Groupe Hospitalier Centre Edouard Herriot, 5, Place d'Arsonval, F-69437 Lyon cedex 03, France.

c Genetics of Biofilms Unit Department of Microbiology, Institut Pasteur, 28 rue du docteur Roux Paris cedex 15, France

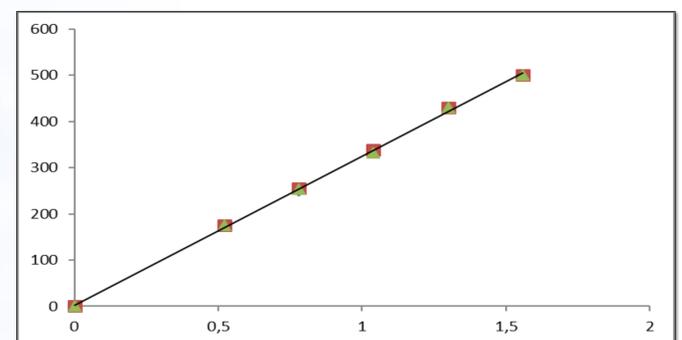


Fig. courbe d'étalonnage typique de la validation de méthode EDTA $R^2=0.9989$;
équation de droite $y= 321.81x + 2.9286$

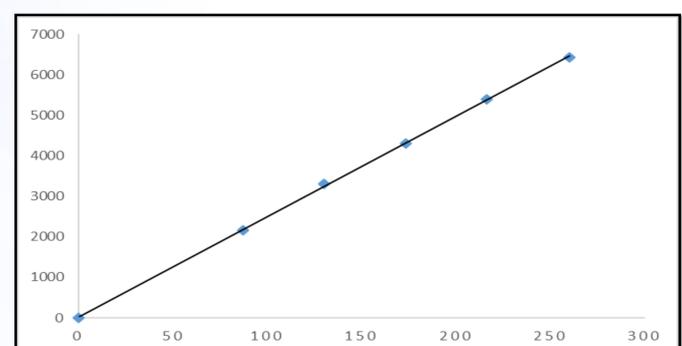


Fig. courbe d'étalonnage typique de la validation de méthode gentamicine $R^2=0.99$;
équation de droite $y= 24.799x + 21.965$

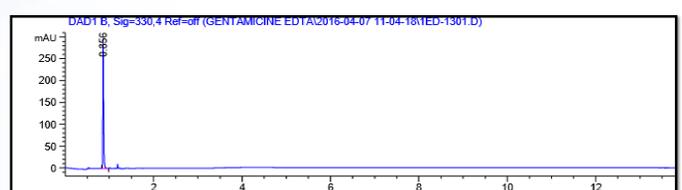


Fig. Chromatogramme typique du dosage gentamicine-EDTA selon la méthode de complexation au sulfate de cuivre. Temps de rétention 1 min

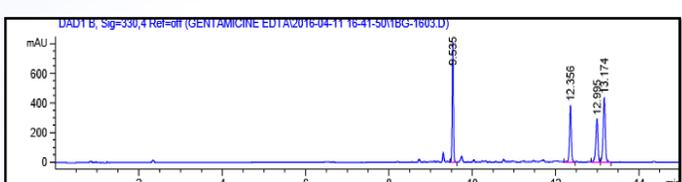


Fig. Chromatogramme typique du dosage gentamicine-EDTA selon la méthode de complexation à la phtalaldéhyde. Méthode de dosage de l'identification de la gentamicine Temps de rétention des composés C1a:9.5 C2: 12.4 C2a: 12.9 C1: 13.1 min