PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2005-820

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.06.2004**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.06.2003 10.09.2003**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2003/476274 2003/659413**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **31.01.2007**
(Věstník č. 5/2007)

(86) PCT číslo: **PCT/US2004/018009**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2004/108093**

(71) Přihlašovatel:
TYCO HEALTHCARE GROUP LP, Mansfield, MA, US

(72) Původce:
Kite Peter, Leeds, GB
Hatton David, Seattle, WA, US

(74) Zástupce:
ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN Patentová, známková a advokátní kancelář, Ing. Ivana Jirotková, Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Antiseptické prostředky, způsoby a systémy

(57) Anotace:

Jsou popsány antiseptické prostředky obsahující alespoň jednu sůl EDTA. Tyto prostředky mají širokospektrou antimikrobiální a antimykotickou aktivitu, společně s antikoagulačními vlastnostmi. Antiseptické prostředky též prokázaly aktivitu při penetrování a narušování mikrobiálního povlaku nebo biofilmů. Prostředky jsou bezpečné pro použití v lékařství a u člověka a mohou být použity pro prevenci infekce nebo pro redukci proliferace a/nebo eliminace existující nebo zjištěné infekce.

CZ 2005 - 820 A3

PV 2005 - 820

Antiseptické prostředky, způsoby a systémy

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká antiseptických prostředků, způsobů a systémů pro použití v různých medicinských aplikacích, stejně jako sanitárních aplikací obecně, včetně průmyslových a environmentálních sanitárních aplikací. Prostředky podle předkládaného vynálezu mají antimikrobiální, antimykotické, protivirové a protiamébové vlastnosti a mohou sloužit také jako antikoagulační prostředky. Jsou použity konkrétní soli a směsi kyseliny ethylen-diamin-tetraoctové (EDTA) ($C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8$) v uvedených koncentracích a při uvedených hodnotách pH. Mezi příklady aplikací patří inhibování, redukce nebo eliminace přítomnosti mikrobiálních a/nebo mykotických organismů na površích, v roztocích nebo ve formách komplexů, jako jsou biofilmy. Příkladem způsobů jsou antiseptické potahy povrchů předmětů za účelem snížení incidence infekcí, pokrytí objektů a/nebo povrchů omytím, ponořením a/nebo vypláchnutím antiseptickým roztokem za účelem inhibice proliferace, redukce nebo eliminace mikrobiální populace.

Dosavadní stav techniky

Infekce jsou významným problémem v mnoha oblastech, ve kterých jsou hygienické podmínky významné, jako je zdravotnictví. Problematické infekce mohou způsobovat bakteriální, mykotické, amébové, protozoární a/nebo virové organismy. Existují potřeby jak v prevenci infekcí, tak v redukci nebo eliminaci infekcí, když již vzniknou. Infikovaným prostředím mohou být povrchy objektů, kapaliny a rozvody kapalin a/nebo lidé či zvířata.

K desinfekci povrchů se běžně používá roztoků alkoholu a otírání isopropylalkoholem a ukázalo se, že mají antibakteriální aktivitu. Nejvýraznější inhibiční antimikrobiální efekt mají 70% roztoky isopropanolu. Roztoky alkoholu v této koncentraci jsou dosti nákladné a rychle se odpařují, což významně snižuje jejich účinnost a zvyšuje náklady. Kromě toho, ačkoliv mohou být roztoky isopropanolu použity na površích, včetně lidské kůže, a v různých medicinských aplikacích, nemohou být alkoholové roztoky této koncentrace podávány člověku pro medicinské účely jinak než lokálně.

Ve zdravotnictví jsou infekce různých typů a příčin časté a často vedou k delším hospitalizacím, což zvyšuje náklady na nemocniční péči. Co je ještě horší je to, že více než 90 000 pacientů ročně zemře v důsledku nosokomiálních infekcí – to znamená infekcí, které jsou získány v nemocnicích nebo jinde ve zdravotnictví. Stálá kontrola nosokomiálních infekcí se stala integrální součástí nemocničního provozu. Studie provedené před více než 20 lety v Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dokumentovaly účinnost těchto kontrolních aktivit při snižování četnosti nosokomiálních infekcí. I přes pozornost věnovanou problematice nosokomiálních infekcí se však dramaticky nesnížil počet těchto infekcí a nosokomiální infekce stále představují pro zdravotnictví významné riziko.

Jedním problematickým zdrojem infekcí v medicíně a veterinární medicíně jsou katetry, zejména dlouhodobě zavedené katetry. Katetry jsou nezbytné v péči o pacienty na lůžkách intenzivní péče, ale vnitřek katetru je často značným zdrojem infekce. Katetry jsou používány pro aplikaci kapalin, krevních přípravků, léků a živin, stejně jako pro hemodialýzu, hemofiltraci, peritoneální dialýzu, odběr vzorků krve, monitorování stavu pacienta atd. Transkutánní katetry se často infikují při průniku katetru přes kůži. Bylo zjištěno, že sedmdesát procent (70 %) všech nosokomiálních infekcí krve se vyskytuje u pacientů s centrálními žilními katetry. Daouicher et al. New Engl. J. Med. 340:1-8 (1999).

Konkrétně v některých situacích musí být pacientům zaveden katetr, který musí být ponechán u pacientů po relativně dlouhou dobu, například více než třicet dnů. Katetry pro intravenosní (IV) terapii a močové katetry obvykle zůstávají zavedené po značnou dobu. V důsledku poranění tkání během zavádění a bolesti spojené se zaváděním nemohou být takové katetry odstraňovány a zaváděny příliš často. Předpokládá se, že bakterie pocházející z katetru jsou primárním zdrojem infekce močového traktu. Také bylo zjištěno, že pacientky, kterým byl periferně zaveden centrální katetr během těhotenství, mají významné riziko infekčních komplikací. Ogura et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 188(5): 1223-5 (2003). Dále se infekce z centrálního žilního katetru, které mohou způsobit katedrovou sepsi, uvádějí jako nejčastější komplikace během parenterální výživy v domácím prostředí. Reimund et al., Clinical Nutrition, 21 (1):33-38 (2002). Vzhledem k rizikům infekce by katetrizace měla být omezena pouze na případy, kdy je absolutně nezbytná. Tento zákrok vážně ohrožuje zdraví pacienta.

Po nejčastěji indikovaných zákrocích zahrnujících katetrizaci je katetr propláchnut fyziologickým roztokem a potom je naplněn kapalinou, jako je fyziologický roztok nebo roztok heparinu, pro zabránění srážení krve v katetru, aby se zabránilo zpětnému vtékání pacientovi krve do katetru a aby se zabránilo vniknutí plynů do katetru. Kapalina, která je použita pro propláchnutí katetru, se označuje jako "tekutinový zámek" a kapalina použitá k naplnění katetru po propláchnutí nebo během období, kdy se katetr nepoužívá, se označuje jako roztok pro vytvoření "zámku".

Tradičně se jako zámek používal normální fyziologický roztok nebo roztok heparinu, které mají antikoagulační aktivitu. Heparin a fyziologický roztok jsou někdy používány v kombinaci. Normální fyziologický roztok se obyčejně používá pro krátkodobé uzamčení periferních intravenosních katetrů, ale nemá antikoagulační ani antimikrobiální aktivitu. Heparinové roztoky se obvykle používají pro uzamčení cévních katetrů. Heparin má antikoagulační aktivitu, ale nemá aktivitu antimikrobiální a nezabraňuje ani nezmírňuje infekce. Existují také důvodná podezření, že heparin v nepatinových zámcích může přispívat k heparinem-indukované trombocytopenii, což je závažná krvácivá komplikace, ke které dochází u pacientů, kterým je aplikován injekční heparin.

Byly navrženy roztoky pro uzamčení katetrů obsahující taurolidin, kyselinu citronovou a citrát sodný. Nedávná publikace (Kidney International, Sept 2002) popisuje použití 70% alkoholového roztoku jako zámku pro podkožní port. Použití alkoholu jako roztoku pro vytvoření zámku je sporné, protože nepůsobí antikoagulačně a protože existují rizika při vniknutí tohoto roztoku do oběhu. Původci vynálezu dále neznají žádný důkaz o tom, že 70% roztok alkoholu má eradikační aktivitu pro biofilm.

Nyní se objevujícím trendem a doporučením z Center for Infectious Disease (CID) je léčit existující katedrové infekce systémově specifickými nebo širokospektrými antibiotiky. Použití antibiotik v roztocích pro zámky za účelem zabránění infekce není doporučeno. Použití antibiotik pro léčbu existující katetrové infekce má určitá rizika, včetně: (1) rizika vzniku kmenů resistentních na antibiotika; (2) neschopnost antibiotik zahubit sesilní neboli v hloubce biofilmu usazené bakterie, které mohou vyžadovat použití antibiotik v toxických koncentracích; a (3) vysoké náklady na dlouhodobou antibiotickou terapii. Jsou dostupné katetry potažené antiseptickým nebo antibiotickým materiálem. Tyto potažené katetry však

mohou poskytnout pouze omezenou ochranu po relativně krátkou dobu.

Obecně mohou být na antibiotika citlivé volně cirkulující organismy. Avšak bakterie a houby se mohou stát odolnými vůči antibiotikům tím, že se agregují na površích a produkují hlenovité protektivní substance, které jsou často označovány jako extracelulární polymerní substance (BPS), které vytvářejí biofilm. V průběhu proliferace mikrobů se může vyskytnout více než padesát genetických aktivací nebo inaktivací, což vede ke vzniku mikrobiálního biofilmu více rezistentního na antibiotika. Dvě třetiny bakteriálních infekcí, se kterými se klinik setkává v praxi, se přisuzuje biofilmům. Netting, Science News, 160:28 (2001).

Tvorba biofilmu je geneticky řízeným procesem v životním cyklu bakterií, kde tento proces vyvolává mnoho změn v buněčné fyziologii organismu, často včetně větší resistence na antibiotika (až 100- až 1000-násobné), ve srovnání s růstem za podmínek planktonu (volné cirkulace). Jak organismy rostou, nutí je problémy s přemnožením a nedostatkem živin k dělení organismů hledání nových lokalit a zdrojů živin. Nové dělením vzniklé organismy se rychle navracejí do své původní volně cirkulující fáze a stávají se znovu citlivými na antibiotika. Volně cirkulující organismy však mohou vstupovat do krevního oběhu pacienta, způsobovat infekce v krevním řečišti, které vyvolávají klinické příznaky, například horečku, a závažnější příznaky spojené s infekcí. Sesilní pláty biofilmu se mohou odlučovat a ulpívat na povrchu tkání, jako jsou srdeční chlopně, což způsobuje proliferaci biofilmu a závažné problémy, jako je endokarditida.

V průmyslových zařízeních je tvorba biofilmu velmi běžná a obecně se označuje jako biologické znečištění. Například růst biofilmů na strojních konstrukcích, jako jsou filtrační zařízení, je primární příčinou biologické kontaminace systémů pro distribuci pitné vody. Tvorba biologických filmů v průmyslových zařízeních může vést k degradaci materiálů, kontaminaci produktů, mechanické blokádě a poruchám přenosu tepla ve zpracovatelských systémech. Tvorba biofilmu a následná kontaminace je také běžným problémem při přípravě a zpracování potravin.

By byla situace ještě komplikovanější, běžné testy sensitivity hodnotí pouze antibiotickou citlivost organismů volně cirkulujících, nikoli ve stavu biofilmu. V důsledku toho je dávka antibiotika podávaná pacientovi, například katetrem, zřídkakdy taková, aby

měla žádoucí efekt na organismus ve fázi biofilmu, který může být přítomen v katetru. Biofilm může nadále odlučovat volně cirkulující organismy nebo se může dostat do klidového stadia a proliferovat později pod obrazem klinické infekce.

Pro eradikaci organismů biofilmu pomocí antibiotik musí laboratoř určit koncentraci antibiotika nutnou pro usmrcení specifické genetické fáze organismu, kterou označujeme jako biofilm. Pro stanovení minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu je nutné vysoce specializované vybavení. Navíc jsou současné diagnostické protokoly časově náročné a výsledky často nejsou dostupné po dobu několika dnů, například pěti dnů. Tato doba zjevně neumožňuje rychlou léčbu infekcí. Tato prodleva a oprávněný strach z infekcí mohou vést k nadužívání širokospektrých antibiotik a zbytečně častému vyjímání a znovuzavádění katetrů. Nadužívání širokospektrých antibiotik může vést ke vzniku bakteriálních kmenů resistentních na antibiotika, které nemohou být efektivně léčeny. Zbytečné odstraňování a zavádění katetrů je bolestivé, nákladné a může vést k poranění a poškození tkáně v místě zavádění katetru.

Antibiotická rezistence biofilmů, spolu s komplikacemi používání antibiotik, jako je riziko vzniku kmenů rezistentních na antibiotika, činí z antibiotické léčby neatraktivní volbu. V důsledku tohoto je použití antibiotik omezeno na symptomatické infekce a profylaktické podávání antibiotik se k prevenci kontaminace obvykle nepoužívá. Vzhledem k tomu, že biofilm může účinkovat jako selektivní fenotypová překážka způsobující resistenci k většině antibiotik, musí být katetr pro eradikaci katedrové infekce často odstraněn. Odstranění a výměna katetru je časově náročná, stresující pro pacienta a komplikuje lékařské zákroky. Proto existuje potřeba účinné a pohodlné metody pro usmrcování organismů, zejména organismů osídlujících katetry, bez nutnosti vyjmutí katetru z těla.

Kromě bakteriálních a mykotických infekcí mohou být také velmi vážné a bolestivé, stejně jako potenciálně život ohrožující, infekce amébové. Bylo například zjištěno, že člověka infikuje několik kmenů *Acanthamoeba*. *Acanthamoeba* se vyskytuje po celém světě v hlíně a prachu a ve sladkovodních vodních zdrojích, stejně jako v brakické a mořské vodě. Často se nachází ve vytápěcích, ventilačních a klimatizačních zařízeních, ve zvlhčovačích vzduchu, v dialyzačních jednotkách a v příslušenství kontaktních čoček. Acanthamébová infekce může být také, kromě mikrobiální a mykotické infekce, častá v dalších lékařských a zubařských

nástrojích, včetně zubních kartáčků, zubních protéz a dalšího zubolékařského příslušenství, apod. Acanthamébová infekce je často důsledkem nesprávného skladování, užívání a desinfekce kontaktních čoček a jiných pomůcek, které přicházejí do kontaktu s lidským tělem, kde může tato infekce vstupovat do těla přes škrábnutí, rány, nosní dírky, oko apod.

Existuje mnoho různých druhů mikrobů, které způsobují problematické infekce, včetně odrůd bakterií a hub. Současné metody pro eliminaci infekce však obecně využívají roztoky, které jsou účinné proti omezenému počtu různých mikrobů. Root et al. (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 32:1627-1633 (1988)) popisují in vitro použití disodné soli EDTA in vitro proti konkrétnímu izolátu patogenního *Staphylococcus epidermidis* souvisejícího s katetrovou infekcí.

EDTA byla tradičně použitelná jako činidlo chelatující kovy a používá se, v kombinaci s jinými aktivními sloučeninami, pro různé účely. EDTA je často používána v nízkých koncentracích jako in vitro antikoagulační činidlo pro odběr a testování vzorků krve a jako synergické antioxidační činidlo a také se přidává do roztoků, například jako chelatační činidlo, stabilizátor nebo jako konzervační činidlo pro farmaceutické přípravky. EDTA může existovat v různých formách, například ve formě sodné soli, jako je disodná, trisodná a tetrasodná sůl, a dalších, jako jsou chaláty s kovy, jako je železo, měď, hořčík apod. Některé formy EDTA se používají společně s dalšími substancemi jako pomocnými činidly v přípravcích pro ošetřování infikovaných katetrů. V klinickém použití nebo v prostředcích používaných u lidí nebo zvířat jsou roztoky obvykle upraveny na fyziologické nebo neutrální pH.

Kombinace alkoholu s přísadou, jako je jiná forma EDTA než sodná sůl, je popsána ve zveřejněné PCT přihlášce WO 02/05188. Zveřejněná PCT přihláška WO 00/72906 A1 popisuje lyofilizovanou směs antimikrobiálního činidla, například antibiotika, a druhého činidla, kterým může být jiná forma EDTA než sodná sůl, jako chelatační činidlo pro proplachování katetrů. V US patentu č. 5 688 516 jsou popsány prostředky obsahující antikoagulační činidlo, chelatační činidlo, jako je EDTA, a antimikrobiální činidlo, jako je minocyclin, pro potahování lékařských nástrojů a pro inhibici katetrových infekcí. V konkrétních popsaných příkladech je disodná-forma EDTA upravena na fyziologické pH 7,4 a použita v prostředku. Zveřejněná PCT přihláška WO 99/09997 popisuje léčbu

mykotické infekce kombinací antimykotického činidla a chelatačního činidla, jako je EDTA.

Dalšími oblastmi, ve kterých představuje infekce problém, jsou lékařské nástroje a materiály používané v očích, jako jsou kontaktní čočky, sklerální náhrady, šicí materiály, nitrooční čočky apod. Konkrétně byl kladen důraz na vývoj metod pro desinfekci očních protéz, například kontaktních čoček. Bakteriální biofilmy se mohou podílet na očních infekcích a umožňují persistenci bakterií na abiotických površích, které přicházejí do kontaktu s okem nebo jsou do něj implantovány. Biofilmy se mohou vytvářet také na biotických površích oka. Zegans et al., DNA Cell Biol., 21:415-20 (2002). Protozoární amébou, která může kontaminovat desinfekční tekutiny pro čočky, může být také vyvolána vážná forma keratitidy. Oční přípravek obsahující tetrasodnou EDTA a alkalické soli, pufrované na pH 6-8, pro desinfekci kontaktních čoček, je popsán v US patentu č. 5 300 296. US patent č. 5 998 488 popisuje oční přípravek obsahující EDTA a další substance, jako je cyklodextrin a kyselina boritá.

V oblasti dentální musejí být předměty vkládané do úst, jako jsou dentální nástroje, dentální a ortodontické pomůcky, jako jsou nástavce, můstky, umělý chrup apod., udržovány ve sterilním stavu, zejména během skladování a před vložením do úst. V opačném případě se může přenést infekce do krevního řečiště a stát se závažnou. US patent č. 6 077 501 popisuje použití EDTA v prostředku pro čištění dentální protéz ve směsi s dalšími aktivními složkami.

Dodávky vody jsou také náchylné na mikrobiální a jiné infekce. Zařízení pro skladování vody, stejně jako potrubí a odpadní potrubí, jsou často infikovány. Vnitřní povrchy trubic vedoucích kapaliny v lékařských a zubních ordinacích představují prostředí, které je vhodné pro usídlení a růst mikroorganismů, a adherence mikrobů a tvorba vysoce protektivních biofilmových vrstev je často problémem při skladování a dodávání kapalin.

Existuje tedy potřeba lepších metod a prostředků pro prevenci a ničení infekcí v různých prostředích. Takové antiseptické roztoky by měly mít široké spektrum antimikrobiálních vlastností. Konkrétně by měl mít roztok schopnost penetrovat biofilmem za účelem eradikace organismů v biofilmech. Metody a roztoky by měly být dostatečně bezpečné pro to, aby mohly být použity pro prevenci infekcí, stejně jako pro léčbu již existujících infekcí.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje antiseptické roztoky zahrnující, v podstatě sestávající nebo sestávající z jedné nebo více solí EDTA při pH, které je vyšší než fyziologické pH, a při předepsané koncentraci. Původci vynálezu zjistili, že některé prostředky obsahující EDTA mají účinné antiseptické aktivity a fungují jako širokospektré antimikrobiální prostředky, jakož i fungují jako fungicidní prostředky proti mnoha kmenům patogenních kvasinek. Přípravky EDTA podle předkládaného vynálezu jsou také vysoce účinné při usmrcování patogenních organismů v biofilmu a eliminaci existujících biofilmů, stejně jako při prevenci tvorby biofilmu. Přípravky a kombinace EDTA podle vynálezu dále vykazují jak anti-protozoární, tak protiamébovou aktivitu. Na základě publikovaných zpráv se dále předpokládá, že přípravky EDTA podle vynálezu budou mít protivirovou aktivitu.

Přípravky EDTA podle vynálezu jsou bezpečné pro podání člověku a jsou biologicky kompatibilní a nekorosivní. Mohou mít také antikoagulační vlastnosti a jsou proto použitelné pro prevenci a/nebo léčbu různých infekcí souvisejících s katetry. Antiseptické roztoky podle vynálezu mají mnoho použití, včetně použití při tvorbě zámkových roztoků pro různé typy katetrů, použití jako antiseptických činidel nebo roztoků pro desinfekci různých lékařských, dentálních a veterinárních přístrojů, nástrojů a jiných předmětů, povrchů apod. Dále jsou použitelné k desinfekci v průmyslu a ve výrobě a zpracování potravin.

Antiseptické prostředky podle vynálezu mohou být použity profylakticky pro zabránění infekci nebo pro redukci a/nebo eliminaci existující nebo rozvinuté infekce. Vynález poskytuje způsoby pro prevenci nebo léčbu infekce nežádoucího mikroorganismu na předmětu nebo povrchu, přičemž se kontaktuje povrch nebo předmět s přípravkem podle vynálezu. Přípravky podle vynálezu mohou být tedy použity pro inhibici růstu a proliferace mikrobiálních populací a/nebo mykotických patogenů, včetně inhibice tvorby a proliferace biofilmů; pro inhibici růstu a proliferace protozoárních populací; pro inhibici růstu a proliferace amébových populací a pro prevenci amébových infekcí, zejména infekce způsobené *Acanthamoeba*.

Vynález poskytuje také metody pro podstatnou eradikaci mikrobiálních populací,

včetně jak planktonických mikrobiálních populací, tak mikrobiálních populací ve formě biofilmů, společně s metodami pro eradikaci populace *Acanthamoeba*. Tyto metody zahrnují kontaktování infikovaného objektu nebo povrchu nebo objektu nebo povrchu s podezřením na infekci s prostředkem podle vynálezu. V závislosti na typu antiseptického prostředku použitého v různých metodách je pro inhibici tvorby a proliferace různých populací a/nebo pro podstatnou eradikaci různých populací nutná různá doba kontaktu. Vhodné doby kontaktu pro různé prostředky jsou uvedeny v příkladech provedení vynálezu a mohou být též určeny rutinními pokusy.

V jednom provedení mají antiseptické prostředky podle vynálezu alespoň čtyři, výhodně alespoň pět z následujících vlastností: antikoagulační vlastnosti; inhibiční a/nebo baktericidní aktivita proti širokému spektru bakterií v planktonické formě; inhibiční a/nebo fungicidní aktivita proti spektru mykotických patogenů; inhibiční a/nebo baktericidní aktivita proti širokému spektru bakterií v sesilní formě neboli formě biofilmu; inhibiční aktivita proti protozoární infekci; inhibiční aktivita proti acanthamébové infekci; bezpečnost a biologická kompatibilita, alespoň střední úrovně, při kontaktu s pacientem; bezpečnost a biologická kompatibilita, alespoň střední úrovně, při kontaktu s krví pacienta a bezpečnost a biologická kompatibilita při kontaktu s průmyslovými objekty a povrchy.

V prostředcích podle vynálezu jsou použity rozpustné soli EDTA. Sodné soli EDTA jsou běžně dostupné a všeobecně používané, včetně disodné, trisodné a tetrasodné soli, i když mohou být použity i další soli EDTA, jako jsou amonné, diamonné, draselné, didraselné, disodné-měďnaté, disodné-hořečnaté, sodné-železité soli, a jejich kombinace, pod podmínkou, že mají požadované antibakteriální, fungicidní, anti-protozoární a/nebo protiamébové vlastnosti, a že jsou dostatečně rozpustné v požadovaném rozpouštědle. Mohou být použity různé kombinace EDTA solí a tyto mohou být výhodné pro určité aplikace. Důležité je, že ve většině provedení prostředky a způsoby podle vynálezu nevyužívají tradičních antibiotických činidel a tak nepřispívají ke vzniku organismů resistentních na antibiotika.

Antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnují, sestávají nebo v podstatě sestávají z jedné nebo více solí EDTA v roztoku při pH vyšším než je fyziologická hodnota pH. Výhodně mají takové prostředky pH alespoň 8,0, Zejména mají prostředky podle vynálezu pH

v rozmezí mezi 8,5 a 12,5, mezi 9,5 a 11,5 nebo mezi 10,5 a 11,5. Sůl EDTA je obvykle přítomna v množství alespoň 0,01 % hmot./obj. Ve výhodných provedeních obsahují prostředky podle vynálezu alespoň jednu sůl EDTA v množství od 0,2 do 10 % hmot./obj., výhodněji 0,2 až 6,0 % hmot./obj. a zejména 0,2 až 4,0 % hmot./obj.

V konkrétních provedeních přípravky podle vynálezu zahrnují nebo v podstatě sestávají z rozpouštědla a alespoň jedné soli EDTA v koncentraci mezi 0,01 a 10 % hmot./obj., kde roztok má pH alespoň 9,0 a má baktericidní aktivitu proti širokému spektru bakterií. Výhodně je alespoň jednou solí EDTA trisodná nebo tetrasodná sůl EDTA. Rozpouštědlo je obvykle vybráno ze skupiny zahrnující: vodu, fyziologický roztok, alkoholy a jejich kombinace. V jednom provedení je rozpouštědlem kombinace vody a ethanolu.

Antiseptické prostředky podle vynálezu mohou být použity jako zámkové nebo proplachovací roztoky pro různé typy permanentních katetrů, včetně cévních katetrů užívaných pro aplikaci kapalin, krevních produktů, léků a výživy, odběry kapalin nebo krve, dialýzu, monitorování stavu pacienta apod. Antiseptické roztoky podle vynálezu mohou být také používány jako zámkové a proplachovací roztoky pro močové katetry, nasální sondy, tracheální sondy apod. Pro tyto účely jsou vhodné roztoky mající obecné parametry popsané dále. V jednom provedení se antiseptický roztok zahrnující, sestávající nebo v podstatě sestávající z jedné nebo více sodných solí EDTA při pH vyšším než je fyziologické pH používá pro udržování průchodnosti zavedených intravaskulárních katetrů. Vynález poskytuje rovněž způsoby pro desinfekci katetrů a jiných lékařských trubic, jako jsou nasální sondy, tracheální sondy apod., které zahrnují kontaktování katetru nebo jiné trubice s desinfekčním prostředkem podle vynálezu.

V jiném provedení jsou poskytnuty antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnující, sestávající nebo v podstatě sestávající z jedné nebo více sodných solí EDTA při pH vyšším než je fyziologické pH jako desinfekční roztoky pro lékařské prostředky, jako jsou zubní protézy a jiné dentální, orthodontické a/nebo periodontální prostředky, kontaktní čočky a jiné optické prostředky, pro lékařské a veterinární nástroje, zařízení apod., a jako desinfekční roztoky pro desinfekci povrchů a předmětů. Vynález dále poskytuje způsoby pro desinfekci takových zařízení, které zahrnují kontaktování zařízení s antiseptickým prostředkem podle vynálezu. Obecně mohou být antiseptické prostředky podle vynálezu použity jako roztoky pro

ukládání dentálních, orthodontických a periodontálních prostředků, včetně zubních kartáčků, a mohou být použity též jako roztoky pro ukládání kontaktních čoček a jiných optických zařízení, stejně jako dalších lékařských a veterinárních nástrojů, zařízení apod. Pro tyto aplikace jsou antiseptické prostředky podle vynálezu obecně připravovány jako roztoky, nebo dodány v suché formě, která po přidání vhodného rozpouštědla vytvoří roztok.

V dalším provedení jsou antiseptické prostředky podle vynálezu připraveny pro použití v roztocích, gelech, krémech nebo jiných přípravcích určených pro lokální použití jako antiseptická činidla, roztoky, antibakteriální léčiva apod. Antiseptické prostředky podle vynálezu mohou být také použity jako antibakteriální činidla ve spojení s obvazy, obklady, prostředky a přípravky pro hojení ran apod. V příbuzných provedeních vynález poskytuje krytí pro použití při hojení ran, jako jsou obvazy a náplasti, které jsou impregnovány jedním nebo více prostředky podle vynálezu.

Antiseptické prostředky podle vynálezu mohou být použity také v průmyslových aplikacích jako jsou systémy pro skladování a distribuci vody, čištění vody, zvlhčovací a vysoušecí zařízení, a při přípravě, balení a manipulaci s potravinami, pro inhibici, snížení nebo podstatnou eliminaci mikrobiálních populací jak ve volně cirkulující, tak v sesilní formě, jakož i mnohých mykotických, amébových a protozoárních populací. Průmyslová zařízení a povrchy mohou být kontaktovány, oplachovány nebo ponořovány do antiseptických prostředků podle vynálezu. Vynález také poskytuje antiseptické přípravky s načasovaným uvolňováním, které působí během určité doby, což je vhodné zejména pro místa, do kterých je obtížný častý přístup.

Podrobný popis vynálezu

EDTA se používá v nízkých koncentracích v mnoha přípravcích v kombinaci s jinými aktivními složkami jako stabilizační nebo konzervační prostředek. Antiseptické prostředky podle vynálezu obsahují obecně vyšší koncentrace EDTA a výhodně obsahují alespoň 0,01 % soli nebo solí EDTA, vyjádřeno jako hmotnost na objem roztoku (hmot./obj.), a mohou obsahovat až 15 % (hmot./obj.) solí EDTA. Pro mnohé aplikace obsahují antiseptické prostředky podle vynálezu výhodně alespoň 0,1 % (hmot./obj.) solí EDTA a méně než 10 % (hmot./obj.) solí EDTA, výhodněji mezi 0,1 % (hmot./obj.) solí EDTA a 8,0 % (hmot./obj.)

solí EDTA, a nejvýhodněji mezi 0,1 a 6,0 % solí EDTA. Příkladné prostředky, popsané dále, obsahují 3,6 až 4,4 % (hmot./obj.) solí EDTA ve vodném roztoku nebo 0,01 až 0,2 % (hmot./obj.) solí EDTA ve směsi vody a ethanolu.

Žádoucí koncentrace solí EDTA pro různé aplikace může záviset na použité EDTA soli nebo kombinaci solí, na typu léčené infekce a v určité míře na rozpouštědle použitém pro antiseptické prostředky. Když se například použije vodných rozpouštědel obsahujících ethanol, může být koncentrace solí EDTA nutná pro dosažení požadované aktivity nižší než je koncentrace solí EDTA použitá v prostředcích obsahujících jako rozpouštědlo vodu. Antiseptické prostředky obsahující jednu nebo více solí EDTA mají prokázanou inhibiční a/nebo baktericidní účinnost v rozsahu koncentrací 0,01 až 30 % nebo více, jak je doloženo v datech z pokusů uvedených dále. "Účinné" koncentrace požadovaných solí EDTA v antiseptických prostředcích podle vynálezu pro účely inhibiční, baktericidní, fungicidní účinek, pro eradikaci biofilmu a jiné mohou být stanoveny rutinním experimentováním, které je popsáno v dále uvedených příkladech.

Britský Lékopis (BP) specifikuje, že 5% roztok disodné soli EDTA má pH 4,0 až 5,5. BP také specifikuje rozsah pH 7,0 až 8,0 pro roztoky trisodné soli EDTA. Hodnoty pH pro další soli EDTA ve vodném roztoku jsou uvedeny dále v příkladu 10. Při fyziologickém pH existují sodné soli EDTA jako kombinace disodné a trisodné soli EDTA, s tím, že převládá trisodná sůl EDTA. V USA je farmaceutická "disodná sůl" EDTA připravená pro injekce obvykle titrována hydroxidem sodným tak, aby měla pH 6,5 až 7,5. Při tomto pH obsahuje roztok EDTA ve skutečnosti primárně trisodnou sůl EDTA, s menším podílem disodné soli EDTA. Další přípravky obsahující sodné soli EDTA, které jsou používány v lékařských nebo zdravotnických aplikacích, mají obvykle pH upravené tak, že je v podstatě fyziologické.

V některých provedeních antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnují, v podstatě sestávají nebo sestávají ze sodné soli EDTA (nebo kombinace sodných solí EDTA) v roztoku při pH vyšším než je fyziologické pH, výhodně při pH vyšším než 8,0, při pH vyšším než 8,5, při pH vyšším než 9, při pH vyšším než 9,5 nebo při pH vyšším než 10. V jiných provedeních antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnují, v podstatě sestávají nebo sestávají ze sodné soli EDTA (nebo kombinace sodných solí EDTA) v roztoku při pH v rozmezí mezi 8,5 a 12,5, při pH mezi 9,5 a 11,5 nebo při pH mezi 10,5 a 11,5. Termín "sůl EDTA", je-li zde používán,

může označovat jedinou sůl, jako je disodná, trisodná nebo tetrasodná sůl, nebo jinou formu EDTA soli, nebo může označovat kombinaci takových solí. Složení solí EDTA závisí jak na EDTA solích použitých v prostředku, tak na pH prostředku. Pro antiseptické prostředky podle vynálezu obsahující sodné soli EDTA při požadovaném pH (uvedeném výše) jsou sodné soli EDTA přítomny především jako trisodná a tetrasodná forma.

V jednom provedení antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnují nebo v podstatě sestávají z kombinace alespoň trisodné a tetrasodné soli EDTA. V jiném provedení antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnují nebo v podstatě sestávají z kombinace alespoň trisodné a tetrasodné soli EDTA, kde alespoň 10 % EDTA v prostředku je přítomno ve formě tetrasodné soli. V dalších provedeních antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnují nebo v podstatě sestávají z kombinace alespoň trisodné a tetrasodné soli EDTA, kde alespoň 50 % nebo alespoň 60 % EDTA v prostředku je přítomno ve formě trisodné soli. V jiném provedení antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnují nebo v podstatě sestávají z kombinace disodné, trisodné a tetrasodné EDTA, kde alespoň 10 % EDTA v prostředku je přítomno ve formě disodné soli.

Antiseptické prostředky zahrnující, v podstatě sestávající nebo sestávající ze solí EDTA jiných než sodné soli EDTA nebo navíc k nim mají odlišné "efektivní" rozmezí pH. "Efektivní" rozmezí pH pro požadované soli EDTA v antiseptických prostředcích podle vynálezu pro účely inhibiční, baktericidní, fungicidní, pro eradikaci biofilmu a jiné účely může být stanoveno rutinními pokusy.

V některých provedeních sestávají antiseptické prostředky podle vynálezu ze solí EDTA, jak bylo popsáno výše, a antiseptické roztoky sestávají ze solí EDTA rozpuštěných v rozpouštědlu, obvykle ve vodném rozpouštědlu jako je voda nebo salinický roztok. V jiných provedeních sestávají antiseptické prostředky podle vynálezu v podstatě ze solí EDTA, jak jsou popsány výše, obvykle ve vodném rozpouštědle, jako je voda nebo fyziologický roztok. Antiseptické prostředky podle vynálezu sestávající v podstatě ze soli EDTA nebo kombinace solí EDTA, v podstatě neobsahují jiné účinné látky mající podstatnou antimikrobiální a/nebo antimykotickou aktivitu. Podstatná antimikrobiální a/nebo antimykotická aktivita v tomto kontextu znamená antimikrobiální a/nebo antimykotickou aktivitu, která je alespoň 50% ve srovnání s antimikrobiální a/nebo antimykotickou aktivitou prostředku na bázi sodné soli

EDTA ve vodném roztoku při koncentraci 4,0 % (hmot./obj.) při pH 10,5.

V některých provedeních zahrnují antiseptické prostředky podle vynálezu soli EDTA soli v uvedených koncentracích s uvedeným rozmezím pH, a mohou obsahovat kromě solí EDTA popsaných výše další látky, včetně aktivních složek. Antiseptické prostředky podle vynálezu mohou obsahovat další antimikrobiální nebo biocidní složky, ačkoliv použití tradičních antibiotických a biocidních činidel se obecně nedoporučuje kvůli hrozivým důsledkům vzniku organismů resistentních na antibiotika a biocidní látky. V některých provedeních antiseptické prostředky podle vynálezu obsahující soli EDTA v daných rozmezích koncentrací a pH v podstatě neobsahují jiné účinné látky mající podstatnou antimikrobiální a/nebo antimykotickou aktivitu.

Antiseptické prostředky podle vynálezu mohou obsahovat další aktivní nebo inaktivní složky, pokud nemají škodlivý vliv na aktivitu a/nebo stabilitu solí EDTA. Pro některé aplikace mohou antiseptické prostředky obsahovat proteolytická činidla. Antiseptické prostředky připravené pro lokální aplikace mohou zahrnovat například krémy, emoliencia a přípravky pro péči o pleť, jako je aloe vera apod. Antiseptické prostředky podle vynálezu připravené ve formě roztoku mohou také obsahovat další aktivní nebo neaktivní složky, pokud neinterferují negativně s aktivitou a/nebo stabilitou solí EDTA.

Prostředky podle vynálezu mohou být používány ve formě roztoku nebo v suché formě. V roztoku jsou soli EDTA výhodně rozpuštěny v rozpouštědle, které může zahrnovat vodný roztok, jako je voda nebo fyziologický roztok, nebo jiný biologicky kompatibilní roztok, ve kterém jsou soli EDTA rozpustné. Mohou být použita i další rozpouštědla, včetně roztoků alkoholu. V jednom provedení jsou přípravky solí EDTA podle vynálezu připravovány ve směsi vody a ethanolu. Takové roztoky jsou vysoce účinné a mohou být připraveny tak, že se vyrobí zásobní koncentrovaný roztok solí EDTA ve vodě a potom se přidá požadovaná koncentrace ethanolu. Vhodné jsou koncentrace solí EDTA od asi 0,01 do 10 % hmot./obj. a koncentrace ethanolu mezi asi 0,1 a asi 10 % obj./obj. vedou k získání účinných antiseptických prostředků. V některých provedeních jsou koncentrace soli EDTA soli asi 2 mg/ml (0,2 % hmot./obj.) ve vodě s koncentrací ethanolu asi 1 % (obj./obj.) vysoce účinné proti širokému spektru bakteriálních kmenů. Když se použije sodných solí EDTA, jsou rozmezí pH takových antiseptických prostředků, jak bylo uvedeno výše. Mohou být také

použita biologicky kompatibilní nevodná rozpouštědla, s podmínkou, že soli EDTA jsou v takových rozpouštědlech rozpustné a zůstávají v roztoku během skladování a použití.

EDTA roztoky podle předkládaného vynálezu jsou výhodně poskytovány ve sterilní a nepyrogenní formě a mohou být baleny jakýmkoli vhodným způsobem. V některých provedeních mohou být antiseptické EDTA prostředky podle vynálezu dodány společně nebo jako součást lékařského nástroje, jako je například předem plněná injekční stříkačka nebo jiný lékařský prostředek. Prostředky mohou být připravovány za sterilních, aseptických podmínek, nebo mohou být sterilizovány po dokončení přípravy a/nebo balení za použití různých vhodných sterilizačních technik. Pro roztoky EDTA může být použito lahviček, injekčních stříkaček nebo nádobek na jedno nebo opakované použití. Systémy podle vynálezu zahrnují takovéto lahvičky, injekční stříkačky nebo nádobky obsahující roztoky EDTA podle vynálezu.

Prostředky podle vynálezu mohou být také poskytovány ve v podstatě "suché" formě, například jako v podstatě suchý potah povrchů trubic nebo vedení, nebo lékařských nebo průmyslových přístrojů a nástrojů, jako jsou katetry nebo vedení nebo zásobníky apod. Takové v podstatě suché formy přípravků EDTA podle vynálezu mohou být poskytovány v práškové nebo lyofilizované formě, která může být rekonstituována na roztok přidáním rozpouštědla. V podstatě suché formy přípravků EDTA mohou být alternativně ve formě potahu nebo mohou být zapracovány do gelu nebo jiného typu nosiče, nebo mohou být obsaženy v kapslích, nebo mohou být baleny jinak, a mohou být poskytnuty na površích ve formě potahu nebo v nádobce. Takové v podstatě suché formy EDTA přípravků podle vynálezu se připravují tak, že za přítomnosti roztoku v podstatě suchý prostředek tvoří roztok EDTA mající složení a vlastnosti popsané výše. V některých provedeních mohou být použity odlišné techniky enkapsulace nebo skladování, takže se dosáhne účinného načasovaného uvolňování EDTA při dlouhodobém působení roztoků. V tomto provedení mohou mít v podstatě suché roztoky EDTA antiseptickou aktivitu po dlouhou dobu a/nebo při opakovaném působení roztoku.

Přípravky obsahující EDTA mají dobře ověřený profil bezpečnosti při lékařském použití a při podávání člověku. Pro léčbu hyperkalcemie u lidí se podávají dávky disodné soli EDTA do 3000 mg infusí během 3 hodin denně a jsou dobře tolerovány. Soli EDTA jsou

přítomny, spolu s dalšími složkami, také v mnoha roztocích používaných v medicíně a u člověka, a in vitro i in vivo bylo ověřeno, že jsou bezpečné pro humánní aplikaci. Soli EDTA jsou snadno dostupné a cenově přijatelné a jsou v roztoku stabilní v čase.

Příprava a produkce antiseptických prostředků podle vynálezu je obecně snadná. V jednom provedení jsou požadované antiseptické prostředky podle vynálezu připravovány rozpuštěním alespoň jedné soli EDTA ve vodném rozpouštědle, jako je přečištěná voda, do požadované koncentrace a upravením pH roztoku EDTA na požadované pH. V alternativních provedeních jsou požadované antiseptické prostředky podle předkládaného vynálezu rozpuštěním alespoň jedné soli EDTA v rozpouštědle, ve kterém je EDTA sůl nebo kombinace solí rozpustná, za vzniku koncentrovaného roztoku solubilizované EDTA soli. Pak mohou být přidána další rozpouštědla nebo složky. Alternativně mohou být přípravky solubilizované soli EDTA připravovány v jiné formě než ve formě roztoku, jako například ve formě lokálního přípravku. Antiseptický roztok může být potom sterilizován za použití běžných způsobů, jako je autoklávování, UV ozáření, filtrace, ultrafiltrace a/nebo jiné metody. Výhodné rozmezí osmolarity pro roztoky EDTA je 240 až 500 mOsm/kg, výhodněji 300 až 420 mOsm/kg. Roztoky se výhodně připravují za použití materiálů USP.

Antiseptické prostředky zahrnující, sestávající nebo v podstatě sestávající z trisodné nebo tetrasodné soli nebo jejich směsí, jsou výhodné pro mnohé aplikace a mohou být připraveny za použití sodných solí EDTA jiných než je trisodná a tetrasodná sůl, jako je disodná sůl EDTA, která je snadno dostupná. Roztoky disodné sůl EDTA mají nižší pH v roztoku než je požadované pH pro prostředky podle vynálezu. Avšak po úpravě pH na požadované rozmezí hodnot za použití materiálů pro úpravu pH, jako je hydroxid sodný, octan sodný nebo jiný známý prostředek pro úpravu pH, jsou roztoky EDTA připravené za použití disodné soli přeměněny na výhodnou kombinaci di-, tri- a/nebo tetrasodné soli EDTA podle vynálezu. Tak mohou být při přípravě EDTA přípravků podle vynálezu použity různé formy a kombinace EDTA solí, s podmínkou, že se pH prostředků před použitím upraví na požadované pH. V jednom provedení jsou antiseptické prostředky obsahující směs tri- a tetrasodnou sůl EDTA připravovány rozpuštěním disodné soli EDTA ve vodném roztoku v množství 3 až 5 % hmot./obj. a přidáním hydroxidu sodného v množství dostatečném pro dosažení požadovaného pH mezi 8,5 a 12,0.

Antiseptické prostředky podle vynálezu zahrnující, v podstatě sestávající nebo sestávající z alespoň jedné soli EDTA, jak jsou popsány výše, jsou použitelné také pro mnohé další aplikace. EDTA roztoky mohou být použity jako antiseptické roztoky pro namáčení, oplachování nebo kontaktování lékařských, dentálních nebo veterinárních povrchů a objektů. EDTA roztoky podle vynálezu mohou být používány například pro skladování a/nebo desinfikování kontaktních čoček a jiných optických prostředků; pro skladování a/nebo desinfikování dentálních prostředků, jako je umělý chrup, můstky, zubní kartáčky apod. a pro skladování a/nebo desinfikování lékařských, dentálních a veterinárních nástrojů a přístrojů. V těchto aplikacích mohou být nástroje nebo povrchy kontaktovány nebo ponořeny do EDTA roztoků podle vynálezu na dobu dostatečnou pro podstatnou eliminaci mikrobiální a/nebo fungicidní infekce. EDTA přípravky podle vynálezu mohou být dále používány pro desinfikování potrubí pro dodávku vody a jiných kapalin. Desinfekce potrubí může být provedena občasným propláchnutím potrubí EDTA přípravky podle vynálezu. Obdobně mohou být EDTA přípravky podle vynálezu použity pro eradikaci biofilmů a mikrobiálních (včetně některých virových a protozoárních) a mykotických populací v zařízeních pro dodávku a uskladnění vody.

S přípravky obsahujícími EDTA podle vynálezu bylo provedeno mnoho testů a pokusů, jejichž cílem bylo stanovit jejich vlastnosti a jejich účinnost jako antiseptických přípravků. Dále je podrobněji popsáno několik experimentálních postupů. Tyto postupy a experimentální výsledky jsou uvedeny pouze pro dokreslení a nijak neomezují rozsah vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1A-1D ukazují minimální inhibiční koncentraci (MIC) a minimální baktericidní koncentraci (MBC) pro různé gram-pozitivní a gram-negativní bakteriální organismy u roztoků solí EDTA, sestávajících v podstatě z: didraselné soli EDTA; diamonné soli EDTA; disodné soli EDTA; trisodné soli EDTA a tetrasodné soli EDTA, za použití metody ředění na agaru. Bakteriální organismy byly izolovány z infekcí souvisejících s katetry od lidských pacientů. Experimentální metody jsou popsány v příkladu 1.

Obr. 2 ukazuje koncentrace MIC a MBC pro různé mykotické organismy u různých přípravků EDTA metodou ředění na agaru. Experimentální metody jsou popsány v příkladu 1.

Mykotické organismy byly získány ze vzorků od lidských pacientů.

Obr. 3A a 3B ukazují MIC a MBC data pro gram-pozitivní a gram-negativní bakteriální organismy u roztoků soli EDTA solí, sestávajících v podstatě z: disodné-měďnaté soli EDTA; disodné-hořečnaté soli EDTA a sodné-železité soli EDTA. Bakteriální organismy byly izolovány z infekcí souvisejících s katetry od lidských pacientů. Experimentální metody jsou popsány v příkladu 1.

Obr. 4A-4C ukazují MIC a MBC data pro různé gram-pozitivní a gram-negativní bakteriální organismy u kombinovaných roztoků solí EDTA sestávajících v podstatě z: disodné-měďnaté a tetrasodné soli EDTA; disodné-měďnaté a didraselné soli EDTA a disodné-měďnaté a diamonné soli EDTA. Bakteriální organismy byly izolovány z infekcí souvisejících s katetry od lidských pacientů. Experimentální metody jsou popsány v příkladu 1.

Obr. 5A-5C ukazují MIC a MBC data pro různé gram-pozitivní a gram-negativní bakteriální organismy u kombinovaných roztoků solí EDTA sestávajících v podstatě z: tetrasodné a diamonné soli EDTA; tetrasodné a didraselné soli EDTA a diamonnné a didraselné soli EDTA. Bakteriální organismy byly izolovány z infekcí souvisejících s katetry od lidských pacientů. Experimentální metody jsou popsány v příkladu 1.

Obr. 6 ukazuje hodnoty minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu (MBEC) pro různé organismy, vyjádřené v mg/ml tetrasodné soli EDTA (hmot./obj.) za použití metody popsané v příkladu 2.

Obr. 7 ukazuje experimentální výsledky z ošetřování infikovaných katetrů pro renální hemodialýzu za použití antiseptického prostředku v podstatě sestávajícího z tetrasodné soli EDTA v koncentraci 40 mg/ml (hmot./obj.).

Obr. 8 ukazuje experimentální výsledky z ošetřování infikovaných katetrů pro renální hemodialýzu, jakož i jednoho arteriálního a jednoho venosního katetru, za použití antiseptického prostředku v podstatě sestávajícího z tetrasodné soli EDTA v koncentracích 20 až 100 mg/ml (hmot./obj.).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Data minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) pro organismy u různých přípravků EDTA, stanovená metodou ředění na agaru

Pro několik různých formulací EDTA se stanovily minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) pro různé gram-pozitivní a gram-negativní bakteriální a kvasinkové organismy, za použití metody ředění na agaru popsané níže. MIC a MBC pro různé organismy se také testovaly pro různé kombinace solí EDTA.

Gram-pozitivní a gram-negativní bakteriální organismy se izolovaly od lidských pacientů s infekcemi souvisejícími s katetry, aby bylo jisté, že bakteriální kmeny jsou aktivně patogenní a že se jedná o kmeny běžné při katetrových infekcích u člověka. Kvasinkové organismy se odebraly od pacientů majících závažné septikemické infekce. Organismy se katalogizovaly a uložily v laboratoři, kterou vede Peter Kite na University of Leeds.

Různé roztoky solí EDTA a kombinací solí EDTA se připravily rozpuštěním relevantních solí EDTA reakční čistoty v destilované vodě na požadovanou koncentraci soli EDTA (hmot./obj.). Pro každou sůl EDTA nebo kombinaci solí EDTA se připravil koncentrovaný zásobní roztok soli EDTA a byl použit pro stanovení MIC a MBC pro různé organismy. Roztoky tetra- a trisodné soli EDTA se připravily za použití tetra- a trisodné soli EDTA místo použití disodné soli EDTA a úpravy pH roztoku na požadované rozmezí pH. Roztoky solí EDTA se před použitím sterilizovaly a uchovávaly se při 4 °C.

Protokol metody ředění na agaru

Příprava agaru

- 2 litry živného agaru se vloží do parní lázně a ponechají se v ní po dobu 1 hodiny (do roztavení)
- Agar se nechá vychladnout na 50 °C .
- Do každé z 20 sterilních (125ml) skleněných lahviček se vloží 100 ml živného agaru. Do

agaru se přidá 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 mg/ml tetrasodné soli EDTA (nebo jiné testované soli EDTA nebo kombinace solí EDTA), za použití zásobního roztoku s koncentrací 200 mg/ml.

- 20 ml agaru se nalije do sterilní Petriho misky a nechá se usadit. Totéž se provede pro další 3 misky. Na miskách se označí, jakou koncentraci EDTA obsahují. Toto se provede pro každou koncentraci.
- Tyto plotny mohou být potom uskladněny do použití v lednici při 4 °C.

Naočkování ploten

- Přes noc se kultivuje v živném mediu 23 Gram-pozitivních organismů a 19 Gram-negativních organismů.
- Každá kultura se naředí na 10^6 cfu/ml za použití fosfátem pufrovaného fyziologického roztoku (PBS).
- Použije se automatické zařízení pro inokulaci ploten pro naočkování každé plotny 21 organismy.
- Plotny se inkubují přes noc při 37 °C.
- Následující den se provede skórování růstu: + nebo -.
- Pomocí sterilního filtračního papíru se kultury přenesou z původních ploten na čerstvé agarové plotny Cled, kde se stanoví MBC.
- Tyto plotny se inkubují přes noc při 37 °C.
- Následující den se provede hodnocení (+ nebo -) růstu. MIC a MBC se stanoví jako nejnižší koncentrace, při které není patrný žádný růst.

Výsledky jsou uvedeny na obr. 1A-5C. Obr. 1A-1D ukazují data MIC a MBC (prezentovaná jako mg/ml EDTA roztoku, hmot./obj.) pro mnoho gram-pozitivních a gram-negativních organismů u roztoků solí EDTA sestávajících v podstatě z: didraselné soli EDTA; diamonné soli EDTA; disodné soli EDTA; trisodné soli EDTA a tetrasodné soli EDTA.

Obr. 2 ukazuje data MIC a MDC (prezentovaná jako mg/ml EDTA roztoku, hmot./obj.) pro kvasinky u roztoků solí EDTA v podstatě sestávající z: tetrasodné soli EDTA; didraselné soli EDTA a diamonné soli EDTA.

Obr. 3A a 3B ukazují data MIC a MDC (prezentovaná jako mg/ml EDTA roztoku,

hmot./obj.) pro gram-pozitivní a gram-negativní organismy u roztoků solí EDTA v podstatě sestávající z: disodné-měďnaté soli EDTA; disodné-hořečnaté soli EDTA a sodné-železité soli EDTA.

Obr. 4A-4C ukazují data MIC a MDC (prezentovaná jako mg/ml EDTA roztoku, hmot./obj.) pro gram-pozitivní a gram-negativní organismy u kombinací roztoků solí EDTA v podstatě sestávající z: disodné-měďnaté a tetrasodné soli EDTA; disodné měďnaté a didraselné soli EDTA a disodné-měďnaté a diamonné soli EDTA.

Obr. 5A-5C ukazují data MIC a MDC (prezentovaná jako mg/ml EDTA roztoku, hmot./obj.) pro gram-pozitivní a gram-negativní organismy u kombinací roztoků solí EDTA v podstatě sestávající z: tetrasodné a diamonné soli EDTA; tetrasodné a didraselné soli EDTA a diamonné a didraselné soli EDTA.

Některé EDTA soli a kombinace EDTA solí byly v přiměřených koncentracích účinné při inhibici a/nebo eliminování širokého spektra bakteriálních kmenů. Předchozí lékařské testování a používání ověřilo dobré profily biokompatibility pro použití sodných solí EDTA u člověka a u zvířat, zatímco biologická kompatibilita jiných solí EDTA nebyla doposud stanovena. Tetra- a trisodná sůl EDTA se zdají být nejúčinnějšími proti širokému spektru patogenních bakterií. Navíc bylo, nebo snadno může být, ověřeno, že jsou biologicky kompatibilní pro použití u člověka a zvířat, a jsou levné a stabilní. Tetrasodná sůl EDTA je navíc aktivní jako antikoagulační činidlo a je vysoce rozpustná ve vodných rozpouštědlech. Na základě těchto faktorů a výsledků uvedených výše byly tetra- a trisodná sůl EDTA vybrány jako nejslibnější sloučeniny pro antiseptické prostředky podle vynálezu.

Příklad 2: Data minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu (MBEC) pro organismy a tetrasodnou sůl EDTA, stanovená za použití modifikované metody Calgary

Tvorba biofilmu je důležitým faktorem při bakteriální kontaminaci. Účinný antiseptický přípravek má výhodně schopnost redukovat proliferaci biofilmu nebo bránit nebo inhibovat tvorbu biofilmu. Proto jsme testovali vybraný antiseptický roztok tetrasodné soli EDTA, zda může bránit nebo inhibovat tvorbu biofilmů. Minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu (MBEC) u tetrasodné soli EDTA pro různé organismy se stanovily pomocí

modifikované metody Calgary. Metoda Calgary je popsána v Olsen et al., Canadian Journal of Veterinary Research, 66:86-92 (2002) a v US patentu 6 599 714. Metoda a výsledky jsou popsány dále.

Roztoky tetrasodné soli EDTA se připravily rozpuštěním tetrasodné soli EDTA reakční čistoty v destilované vodě na požadovanou koncentraci soli EDTA (hmot./obj.). Byly připraveny koncentrované zásobní roztoky tetrasodné soli EDTA pro stanovení MBEC pro různé organismy v sesilní formě nebo ve formě biofilmu. Roztoky tetrasodné soli EDTA se před použitím sterilizovaly a uchovávaly se při 4 °C.

Metoda

Vytvoření biofilmu:

- Použilo se 100 ml media Muller Hinton pro kultivaci požadovaného organismu přes noc.
- Pipetou se přeneslo 200 µl do každé jamky 96jamkové mikrotitrační plotny. Plotna se přikryla víčkem s 96 hroty. Provedla se inkubace na orbitální třepačce po dobu 24 hodin při 37 °C a rychlosti 200 rpm.

Test citlivosti:

- Použil se biofilm připravený výše.
- Víčko s hroty se umístilo na novou 96-jamkovou mikrotitrační plotnu obsahující 250 µl testovaného činidla v požadované koncentraci. Provedla se inkubace po dobu 1 až 24 hodin při 37 °C. (Ne na třepačce).
- V intervalech 1, 3, 6 a 24 hodin se z víčka odebraly 4 hroty pro každou koncentraci tak, že se hrot šroubovákem odlomil do jamky.
- 3 hroty pro každou koncentraci se přemístily do 5 ml promývacího PBS a jednou se otočily.
- 3 hroty se umístily do 3 ml PBS a provedla se sonifikace po dobu 15 minut. 2 µl roztoku se umístilo na plotny 3X CLED a rozetřelo se sterilní plastovou stěrkou. Provedla se inkubace přes noc při 37 °C. Další den se odečetl počet kolonií.
- Zbylý volný hrot (pro každou koncentraci) se vložil do 600 µl 4% formálního salinického roztoku pro určení SEM.

Hodnoty MBEC pro různé organismy, vyjádřené v mg/ml tetrasodné soli EDTA (hmot./obj.), určené za použití této metody, jsou uvedeny na obr. 6. Tyto výsledky ukazují, že 40 mg/ml tetrasodné soli EDTA (4 % hmot./obj.) je účinná koncentrace pro eradikaci biofilmu pro všechny testované mikrobiální populace.

Dále jsou uvedena exemplární data získaná v MBEC pokusech pro různé mikroorganismy. Pro všechny pokusy, které byly prováděny trojmo, byla použita tetrasodná sůl EDTA.

Tabulka 1: Organismus: 250 *E. coli*

Koncentrace EDTA mg/ml	Počet kolonií/ ml po 1 hodině	Počet kolonií/ ml po 3 hodinách	Počet kolonií/ ml po 6 hodinách	Počet kolonií/ ml po 24 hodinách
0	40152	53285	64234	6133
	48175	62044	56934	4960
	43796	61314	76642	5120
5	0	520	80	0
	0	540	80	0
	0	620	133	730
10	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
15	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
20	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0

Pro 250 *E. coli* je MBEC = 10 mg/ml tetrasodné soli EDTA.

Tabulka 2: Organismus: J26 *Pseudomonas aeruginosa*

Koncentrace EDTA mg/ml	Počet kolonií/ ml po 1 hodině	Počet kolonií/ ml po 3 hodinách	Počet kolonií/ ml po 6 hodinách	Počet kolonií/ ml po 24 hodinách
0	86861	4400	92701	66667
	89781	3060	79562	35036
	94891	3080	83212	41606
5	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
10	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
15	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
20	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0

Pro J26 *Pseudomonas aeruginosa* je MBEC < 5 mg/ml tetrasodné soli EDTA.

Tabulka 3: Organismus: 292 *Enterobacter cloacae*

Koncentrace EDTA mg/ml	Počet kolonií/ ml po 1 hodině	Počet kolonií/ ml po 3 hodinách	Počet kolonií/ ml po 6 hodinách	Počet kolonií/ ml po 24 hodinách
0	1,00E + 06	103704	94444	91241
	1,00E + 06	118519	131481	116667
	1,00E + 06	107407	100000	131481
5	69343	35036	36496	0
	67153	15974	32197	0
	67153	19697	39416	0
10	38686	12035	80	0
	42336	17803	219	0
	40909	18561	0	0
15	8000	8133	379	0
	8533	8133	219	0
	7467	8267	133	0
20	137896	2840	0	0
	12473	2820	0	0
	14661	2600	0	0

Pro 292 *Enterobacter cloacae* je MBEC < 5 mg/ml tetrasodné soli EDTA.

Tabulka 4: Organismus: *H. Enterococcus* sp.

Koncentrace EDTA mg/ml	Počet kolonií/ ml po 1 hodině	Počet kolonií/ ml po 3 hodinách	Počet kolonií/ ml po 6 hodinách	Počet kolonií/ ml po 24 hodinách
0	5600	3520	4000	6133
	8133	3980	3440	4720
	6800	3920	3760	4640
5	1380	780	80	0
	1160	580	100	0
	1140	500	120	0
10	40	0	0	0
	100	0	0	0
	20	0	0	0
15	40	0	20	0
	0	0	0	0
	80	0	20	0
20	1480	730	160	0
	1560	379	160	0
	2000	320	140	0

Pro *H. Enterococcus* sp. je MBEC < 5 mg/ml tetrasodné soli EDTA.

Tabulka 5: Organismus: J22 *Enterobacter cloacae*

Koncentrace EDTA mg/ml	Počet kolonií/ ml po 1 hodině	Počet kolonií/ ml po 3 hodinách	Počet kolonií/ ml po 6 hodinách	Počet kolonií/ ml po 24 hodinách
0	124074	107407	105556	101852
	116667	91241	105556	120370
	112963	98540	92701	100000
5	6400	267	2040	0
	5200	133	2160	0
	8933	379	1820	0
10	3540	1920	267	80
	3040	2900	160	1532
	3760	2340	219	800
15	2620	1560	740	0
	2100	1740	720	0
	2720	1580	920	0
20	2040	80	960	0
	2360	1460	840	0
	1620	133	560	0

Pro J22 *Enterobacter cloacae* je MBEC = 15 mg/ml tetrasodné soli EDTA.

Tabulka 6: Organismus: R81 *Proteus vulgaris*

Koncentrace EDTA mg/ml	Počet kolonií/ ml po 1 hodině	Počet kolonií/ ml po 3 hodinách	Počet kolonií/ ml po 6 hodinách	Počet kolonií/ ml po 24 hodinách
0	62044	81752	112963	59259
	55474	73723	103704	68519
	54015	78832	107407	59124
5	3160	160	3460	0
	4000	400	3120	0
	4000	160	3140	0
10	1520	730	400	0
	1920	533	1460	0
	1900	438	160	0
15	2960	379	1100	0
	2580	80	780	0
	2560	400	1220	0
20	4560	400	1520	0
	4480	320	1280	0
	2820	240	720	0

Pro R81 *Proteus vulgaris* je MBEC < 5 mg/ml tetrasodné soli EDTA.

Příklad 3: In vitro postup pro ošetřování katetrů na pozitivních katetrech od pacientů

Byl vyvinut postup pro ošetřování katetrů za použití testovaného roztoku tetrasodné soli EDTA o koncentraci 40 mg/ml (4 % hmot./obj.) a použit pro hemodialyzační katetry od pacientů, které byly pozitivní na různé mikrobiální infekce. Katetry, u kterých byla potvrzena mikrobiální infekce, se ošetřily tetrasodnou solí EDTA a zjišťoval se počet kolonií za různou dobu. V prvním pokusu se všechny katetry ošetřily 4% roztokem (hmot./obj.) tetrasodné soli EDTA, zatímco ve druhém pokusu se katetry ošetřovaly roztokem tetrasodné soli EDTA o různých koncentracích. Roztoky tetrasodné soli EDTA se připravily a skladovaly způsobem popsaným v příkladech 1 a 2. Postup a výsledky jsou popsané dále.

Metoda:

- Katetry pro hemodialýzu odstraněné při podezření na infekci se vyšetřovaly pomocí

výplachu lumen 1 ml sterilního fosfátem pufrovaného salinického roztoku. Provedla se kvantitativní kultivace za použití alikvotních podílů 1 a 10 µl, které se naočkovaly na plotny obsahující krevní agar a inkubovaly.

- Katetry se nejprve uskladnily při 4 °C do dokončení vyšetření a zevní lumen katetru se sterilizoval otěrem alkoholem.
- Před testováním roztoků pro zámky se testované pozitivní katetry naplnily živným mediem pomocí 5 ml injekční stříkačky a provedla se inkubace přes noc při 37 °C, aby se zajistila životaschopnost biofilmu a aby se zajistila úplná kolonizace všech vnitřních povrchů infikujícím organismem.
- Po kultivaci přes noc se lumen každého katetru propláchlo 5 ml sterilního fyziologického roztoku a z distálního konce se odstřihly dva 1 cm kousky a každý se vložil do 1 ml 1M sterilního chloridu vápenatého (pro neutralizaci činidla), pro skenovaní elektronovou mikroskopii (SEM) a druhý pro kultivaci, ve sterilních univerzálních nádobkách.
- Pro kultivaci se zásobník umístil na dobu 15 minut při pokojové teplotě do sonifikační lázně a potom se po dobu 20 sekund provířil.
- Provedla se kvantitativní kultivace za použití alikvotních podílů 1 µl a 10 µl, které se vnesly na plotny s krevním agarem a rozetřely se sterilními plastovými tyčkami tvaru L, inkubovaly přes noc při 37 °C a následující den se spočítaly kolonie.
- Katetr se propláchl a uzamkl se příslušnou koncentrací tetrasodné soli EDTA a provedla se inkubace při 37 °C po dobu 18 hodin.
- Po 3., 6. a 18. hodině inkubace se odstřihly dva 1 cm kousky z distálního konce katetru a neutralizovaly se 1 ml sterilního roztoku chloridu sodného.
- Pro každou dobu se provedlo kvantitativní vyšetření, jak bylo popsáno výše, a jeden z kousků se ponechal pro SEM.

Antiseptickým prostředkem obsahujícím tetrasodnou sůl EDTA v koncentraci 40 mg/ml (4 % hmot./obj.) se ošetřilo sedmnáct (17) infikovaných katetrů pro hemodialýzu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 7. Deset dalších infikovaných hemodialyzačních katetrů, jakož i jeden arteriální a jeden venosní katetr, se ošetřilo antiseptickým přípravkem obsahujícím tetrasodnou sůl EDTA v koncentraci 20 až 100 mg/ml (2 až 10 % hmot./obj.). Výsledky jsou uvedeny na obr. 8.

Výsledky ukazují, že koncentrace 40 mg/ml (4 % hmot./obj.) tetrasodné soli EDTA je účinná při usmrcování nebo dramatické redukci populace většiny organismů po 24 hodinové inkubaci. Tato koncentrace tetrasodné soli EDTA je bezpečná pro použití ve spojení s člověkem a zvířaty a je považována za účinnou, a jde tedy o žádoucí koncentraci pro antiseptické prostředky a způsoby podle vynálezu.

Příklad 4: Efekt tetrasodné soli EDTA na *Acanthamoeba* a efekt tetrasodnou solí EDTA ošetřených Klebsiella na *Acanthamoeba*

Člověka je schopno infikovat několik druhů *Acanthamoeba*. Acanthamébové infekce jsou často důsledkem nesprávného uskladnění kontaktních čoček a jiných lékařských pomůcek, které přicházejí do kontaktu s lidským tělem. Acanthaméby se živí na bakteriálních populacích a jsou resistentní na mnohou léčbu. Efekt tetrasodné soli EDTA, připravené způsobem popsaným výše, na populace *Acanthamoeba* se testoval následujícím způsobem. Byly připraveny přípravky tetrasodné soli EDTA také za použití Pagesova solného roztoku a fyziologického roztoku jako rozpouštědel. Experimentálně byl rovněž testován efekt Klebsiella, ošetřené tetrasodnou solí EDTA, na *Acanthamoeba* za použití dále uvedené metody.

Efekt tetrasodné soli EDTA na *Acanthamoeba*

Metoda:

- Před testováním se plotny s čerstvým krevním agarem s *Klebsiella edwardsii* inkubovaly při 37 °C po dobu 18 hodin.
- Použil se zásobní roztok tetrasodné soli EDTA (100 mg/ml) pro přípravu roztoku s koncentrací 22 a 44 mg/ml v Pagesově solném roztoku.
- 9 ml každé koncentrace se vneslo do sterilní skleněné zkumavky. 9 ml sterilního Pagesova solného roztoku se vneslo do další sterilní skleněné zkumavky a použilo se jako kontrola.
- Připravila se suspenze *Klebsiella edwardsii* v 6 ml sterilního Pagesova solného roztoku. Suspenze se upravila na McFarlandův standard 5.
- 1 ml suspenze se přidalo do každého sériového ředění a kontroly. Vzhledem k ředění klebsiellové suspenze byla nyní každá koncentrace 20 a 40 mg/ml. Kontrola stále neobsahuje tetrasodnou sůl EDTA. Všechny koncentrace se zopakovaly ve fyziologickém roztoku.

- Směs se promíchala. Každá zkumavka nyní obsahovala suspenzi Klebsiella v McFarlandově standardu 0,5.
- Povrch celé plotny s Acanthamoeba se seškrábl a suspendoval se v 1,5 ml Pagesova solného roztoku. Směs se promíchala.
- Do každého sériového ředění se přidala 200 µl acanthamébové suspenze.
- Zkumavky se umístily do inkubátoru s teplotou 30 °C na dobu 24 hodin.
- Po inkubaci se každá zkumavka odstředila po dobu 10 minut při 3000 rpm.
- Supernatant se slil a peleta se resuspendovala.
- 10 µl každého ředění a kontroly (dvojmo) se naneslo na plotnu bez živného agaru s kulturou Klebsiella. Do centra každé plotny se vyryla drážka, aby se zabránilo migraci, a na každou stranu se naneslo 10 µl testovaného ředění.
- Každé místo naočkování se označilo černým značkovacím perem.
- Plotny se inkubovaly po dobu 72 hodin při 30 °C.
- Růst Acanthamoeba se zhodnotil vizualizací ploten za použití světelného mikroskopu s okulárem s 10-násobným zvětšením, počínaje každým místem naočkování.

Tabulka 7: Růst po 24 hodinové inkubaci s tetrasodnou solí EDTA

Koncentrace EDTA (mg/ml) v roztoku	Růst Acanthamoeba
0 (Pagesův solný roztok)	+++
0 (Pagesův solný roztok)	+++
20 (Pagesův solný roztok)	++
20 (Pagesův solný roztok)	++
40 (Pagesův solný roztok)	-
40 (Pagesův solný roztok)	-
0 (fyziologický roztok)	+++
0 (fyziologický roztok)	+++
20 (fyziologický roztok)	++
20 (fyziologický roztok)	++
40 (fyziologický roztok)	-
40 (fyziologický roztok)	+

Tabulka 8: Růst po 24 hodinové inkubaci s tetrasodnou solí EDTA (opakování)

Koncentrace EDTA (mg/ml) v roztoku	Růst Acanthamoeba
0 (Pagesův solný roztok)	+++
0 (Pagesův solný roztok)	+++
20 (Pagesův solný roztok)	++
20 (Pagesův solný roztok)	++ (přítomni trofozoiti)
40 (Pagesův solný roztok)	-
40 (Pagesův solný roztok)	-
0 (fyziologický roztok)	+++
0 (fyziologický roztok)	+++
20 (fyziologický roztok)	-
20 (fyziologický roztok)	-
40 (fyziologický roztok)	+++
40 (fyziologický roztok)	++ (přítomni trofozoiti)

Tabulka 9: Růst po 48 hodinové inkubaci s tetrasodnou solí EDTA

Koncentrace EDTA (mg/ml) v roztoku	Růst Acanthamoeba
0 (Pagesův solný roztok)	+++ (přítomni trofozoiti)
0 (Pagesův solný roztok)	+++ (přítomni trofozoiti)
20 (Pagesův solný roztok)	-
20 (Pagesův solný roztok)	-
40 (Pagesův solný roztok)	-
40 (Pagesův solný roztok)	-
0 (fyziologický roztok)	+++
0 (fyziologický roztok)	+++
20 (fyziologický roztok)	-
20 (fyziologický roztok)	-
40 (fyziologický roztok)	-
40 (fyziologický roztok)	-

Výsledky ukazují, že koncentrace 20 až 40 mg/ml (2 až 4 % hmot./obj.) tetrasodné soli EDTA v Pagesově a fyziologickém roztoku je účinná při redukci nebo podstatné eliminaci acanthamébových populací po 48 hodinách expozice. Přípravky obsahující tetrasodnou sůl EDTA připravené za použití vody jako rozpouštědla byly také účinné (data nejsou uvedena). Tyto výsledky naznačují, že antiseptické prostředky podle vynálezu jsou vhodné pro použití jako desinfekční roztoky pro namáčení různých lékařských nástrojů a pomůcek, včetně kontaktních čoček, a dentálních, orthodontických a/nebo periodontických prostředků. Antiseptické prostředky podle vynálezu jsou účinné také při podstatné eliminaci acanthamébových populací v dalších aplikacích, včetně použití při skladování a distribuci vody, v klimatizačních a ventilačních jednotkách, zvlhčovačích vzduchu, dialyzačních jednotkách apod.

Acanthamoeba se živí na bakteriálních populacích. Proto jsme testovali, zda bakteriální populace, která byla ošetřena antiseptickými EDTA prostředky podle vynálezu, bude mít nějaký vliv na růst *Acanthamoeba* na ošetřené bakteriální populaci.

Efekt Klebsiella, ošetřených tetrasodnou solí EDTA, na Acanthamoeba
Metoda:

- Plotna s čerstvým krevním agarem s *Klebsiella edwardsii* se před testem inkubovala při 37 °C po dobu 18 hodin.
- Zásobní roztok tetrasodné soli EDTA (100 mg/ml) se použil pro přípravu roztoku s koncentrací 22 a 44 mg/ml v Pagesově solném roztoku.
- 9 ml každé koncentrace se umístilo do skleněných sterilních zkumavek. 9 ml sterilního Pagesova solného roztoku se umístilo do jiné sterilní skleněné zkumavky a použilo se jako kontrola.
- Připravila se suspenze *Klebsiella edwardsii* v 6 ml sterilního Pagesova solného roztoku. Suspenze se upravila na McFarlandův standard 5.
- 1 ml suspenze se přidá do každého sériového ředění a kontroly. Vzhledem k ředění klebsiellové suspenze bude nyní každá koncentrace 20 a 40 mg/ml. Kontrola stále neobsahuje tetrasodnou sůl EDTA. Všechny koncentrace se zopakují ve fyziologickém roztoku.
- Směs se promíchala. Každá zkumavka nyní obsahovala suspenzi Klebsiella v McFarlandově standardu 0,5.

- Zkumavky se inkubovaly přes noc při 37 °C.
- Následující den se zkumavky odstředily při 300 rpm po dobu 10 minut. Odstranil se supernatant; přidalo se 10 ml čerstvého fyziologického roztoku nebo Pagesova solného roztoku, směs se resuspendovala a opět se odstředila. Supernatant se odstranil a zbytek se resuspendoval v 1 ml fyziologického roztoku nebo Pagesova solného roztoku.
- Povrch celé acanthamébové plotny se seškrábl a suspendoval se v 1,5 ml Pagesova solného roztoku. Směs se promíchala.
- Do 3 zkumavek obsahujících 9 ml fyziologického roztoku a do 3 zkumavek obsahujících 3 ml Pagesova solného roztoku se přidalo 200 µl acanthamébové suspenze. Každá zkumavka se označila stejně jako při značení koncentrací EDTA použitých při inkubaci s Klebsiellou.
- 1 ml resuspendované klebsiellové suspenze se přidalo do příslušné zkumavky obsahující acanthaméby.
- Zkumavky se umístily do inkubátoru s teplotou 30 °C na dobu 24 hodin.
- Připravila se další sada zkumavek pro inkubaci Klebsiella s EDTA při 37 °C přes noc, stejně jako předtím.
- Po inkubaci se každá zkumavka odstředila během 10 minut při 3000 rpm.
- Supernatant se slil a peleta se resuspendovala.
- 10 µl každého ředění a kontroly (dvojmo) se naneslo na plotnu bez živného agaru s kulturou Klebsiella (neinkubovanou s EDTA). Do centra každé plotny se vyryla drážka, aby se zabránilo migraci, a na každou stranu se naneslo 10 µl testovaného ředění.
- Každé místo naočkování se označilo černým značkovacím perem.
- Plotny se inkubovaly při 30 °C.
- Růst Acanthamoeba se zhodnotil přímým prohlížením ploten za použití světelného mikroskopu s 10-násobným zvětšením okuláru, počínaje v každém místě naočkování.
- Zbytek acanthamébové suspenze se umístil do nové sady zkumavek obsahujících buď čerstvý fyziologický roztok nebo čerstvý Pagesův solný roztok.
- Promyly a resuspendovaly se Klebsielly, které byly inkubovány přes noc s EDTA, stejně jako předtím, a přidaly se do příslušné zkumavky obsahující Acanthamoeba.
- Zkumavky se inkubovaly přes noc při 30 °C.
- Po inkubaci se všechny zkumavky odstředily během 10 minut při 3000 rpm.
- Supernatant se slil a peleta se resuspendovala.
- 10 µl každého ředění a kontroly (dvojmo) se naneslo na plotnu bez živného agaru

s kulturou Klebsiella (neinkubovanou s EDTA). Do centra každé plotny se vyryla drážka, aby se zabránilo migraci, a na každou stranu se naneslo 10 µl testovaného ředění.

- Každé místo naočkování se označilo černým značkovacím perem.
- Plotny se inkubovaly při 30 °C.
- Růst Acanthamoeba se zhodnotil přímým prohlížením ploten za použití světelného mikroskopu s 10-násobným zvětšením okuláru, počínaje v každém místě naočkování.

Tabulka 10: Růst Acanthamoeba po 24 hodinové inkubaci s Klebsiella (předem inkubovanou s EDTA)

Koncentrace EDTA (mg/ml)	Růst Acanthamoeba
0 (Pagesův solný roztok)	+++
0 (Pagesův solný roztok)	--
20 (Pagesův solný roztok)	++
20 (Pagesův solný roztok)	++
40 (Pagesův solný roztok)	++
40 (Pagesův solný roztok)	-
0 (fyziologický roztok)	+++
0 (fyziologický roztok)	+++
20 (fyziologický roztok)	++
20 (fyziologický roztok)	++
40 (fyziologický roztok)	-
40 (fyziologický roztok)	-

Tabulka 11: Růst Acanthamoeba po 48 hodinové inkubaci s Klebsiella (předem inkubovanou s EDTA)

Koncentrace EDTA (mg/ml)	Růst Acanthamoeba
0 (Pagesův solný roztok)	+++
0 (Pagesův solný roztok)	+++
20 (Pagesův solný roztok)	+
20 (Pagesův solný roztok)	-
40 (Pagesův solný roztok)	-
40 (Pagesův solný roztok)	-
0 (fyziologický roztok)	+++
0 (fyziologický roztok)	+++
20 (fyziologický roztok)	-
20 (fyziologický roztok)	-
40 (fyziologický roztok)	-
40 (fyziologický roztok)	-

Tyto výsledky ukazují, že růst Acanthamoeba může být zastaven a acanthamébové populace mohou být podstatně eliminovány ošetřením bakteriálních populací, na kterých rostou, antiseptickými přípravky obsahujícími EDTA podle vynálezu. Účinné byly antiseptické přípravky obsahující tetrasodnou sůl EDTA v koncentraci 20 až 40 mg/ml (2 až 4 % hmot./obj.). Tato skutečnost opodstatňuje použitelnost antiseptických prostředků podle vynálezu jako desinfekční roztoky pro namáčení různých lékařských nástrojů a pomůcek, včetně kontaktních čoček, dentálních, orthodontických a/nebo periodontických prostředků, jakož i v jiných aplikacích, včetně použití při skladování a distribuci sladké i mořské vody, v klimatizačních a ventilačních jednotkách, zvlhčovačích vzduchu, dialyzačních jednotkách apod.

Příklad 5

Byly provedeny pokusy pro stanovení, zda přípravky obsahující tetrasodnou sůl EDTA brání uchycování nebo ulpívání mikroorganismů na silikonových trubicích. Pokud lze zabránit uchycování nebo ulpívání mikroorganismů na povrchu silikonových trubic, může být

redukována tvorba biofilmů. Dále je uveden protokol pokusu a získané výsledky.

Metoda:

- 1 cm kousky silikonových trubic se naplní roztaveným voskem aby se uzavřel vnitřní lumen, a vosk se nechá ztuhnout při 4 °C.
- 4 kousky se vloží do 30 ml sterilního fosfátem pufrovaného salinického roztoku (PBS) a použijí se jako kontrola. 8 kousků se vloží do 30 ml 4% tetrasodné soli EDTA.
- Po 30 minutách se 4 kousky z PBS a 4 kousky z 4% tetrasodné soli EDTA vloží do čistých nádobek na horkém bloku a nechají se uschnout.
- Zbylé 4 kousky se přenesou do 30 ml sterilního PBS pro vypláchnutí a nechají se vyschnout na vzduchu stejně jako v předchozím kroku.
- Po usušení se všech 12 kousků umístí do směsi organismů s 10^5 cfu/ml (kultury *Klebsiella pneumoniae* a CNS kultivované přes noc v živném mediu při 37 °C) a provede se inkubace při 37 °C.
- Po 30 minutách se vyjmou 2 kousky každého typu a propláchnou se v 2 X 30 ml sterilního PBS. Kousky se usuší na vzduchu jako v předchozích krocích. Použijí se separátní zkumavky pro výplach a pro sušení, aby se zabránilo kontaminaci.
- Každý kousek se vloží do 1 ml PBS ve zkumavce pro odstředění a provede se sonifikace po dobu 15 minut v sonifikační vodní lázni.
- Každý kousek se naočkuje, duplikovaně, na automatickém inokulátoru ploten, 50 µl na log ředění.
- Dvojmo se naočkuje každý kousek v ředění 1/10.
- Plotny se inkubují při 37 °C přes noc. Počet kolonií se odečte na automatické čtečce ploten ProtoCOL. Odečet se opakuje po 6 hodinách.

Výsledky pro kontroly a řezy katetrů ošetřené EDTA jsou uvedeny dále.

Tabulka 12

Typ řezu katetru	Doba inkubace	Počet řezů katetru	Počet kolonií (cfu/ml)	Počet kolonií v 1/10 (cfu/ml)
Kontrola	30 min	1	240	0
			220	0
Kontrola	30 min	2	280	1
			140	0
Kontrola	6 hodin	1	1480	0
			1120	0
Kontrola	6 hodin	2	5200	7800
			5497	5800
Vzduchem sušený EDTA	30 min	1	240	1333
			400	800
Vzduchem sušený EDTA	30 min	2	267	0
			720	0
Vzduchem sušený EDTA	6 hodin	1	1280	16800
			1120	8800
Vzduchem sušený EDTA	6 hodin	2	2240	21333
			2340	16000
Vypláchnutý EDTA	30 min	1	267	0
			379	0
Vypláchnutý EDTA	30 min	2	1040	0
			0	0
Vypláchnutý EDTA	6 hodin	1	1980	9600
			1740	12800
Vypláchnutý EDTA	6 hodin	2	3600	19000
			3660	8600

Ukázalo se, že výsledky v čistém roztoku EDTA byly reprodukovatelnější a proto byly použity pro další analýzu. Protože byly kousky katetru umístěny do 1 ml roztoku, jsou počty na ml rovny počtům na řez katetru.

Tabulka 13

Typ katetrového řezu	Průměrný počet kolonií po 30 minutách (cfu/řez)	Průměrný počet kolonií po 6 hodinách (cfu/řez)
Kontrola	880	3317
Vzduchem sušený EDTA	407	1745
Vypláchnutý EDTA	421	2745

Tabulka 14

Typ katetrového řezu	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 30 minutách	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 6 hodinách
Vzduchem sušený EDTA	53,8%	47,4%
Vypláchnutý EDTA	52,2%	17,3%

Opakováno po 24 hodinách pro Klebsiella + CNS:

Tabulka 15

Typ katetrového řezu	Průměrný počet kolonií po 30 minutách (cfu/řez)	Průměrný počet kolonií po 6 hodinách (cfu/řez)	Průměrný počet kolonií po 24 hodinách (cfu/řez)
Kontrola	377	9205	105806
Vzduchem sušený EDTA	273	3720	70370
Vypláchnutý EDTA	474	9499	77051

Tabulka 16

Typ katetrového řezu	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 30 minutách	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 6 hodinách	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 24 hodinách
Vzduchem sušený/EDTA	27,4%	59,6%	33,5%
Vypláchnutý/ EDTA	+25,7%	31,9%	27,2%

+ označuje zvýšení průměrného cfu/řez vzhledem ke kontrole

Výsledky pro *Pseudomonas aeruginosa*:

Tabulka 17

Typ katetrového řezu	Průměrný počet kolonií po 30 minutách (cfu/řez)	Průměrný počet kolonií po 6 hodinách (cfu/řez)	Průměrný počet kolonií po 24 hodinách (cfu/řez)
Kontrola	6400	341194	1290000
Vzduchem sušený EDTA	4108	30000	474494
Vypláchnutý EDTA	5200	153758	1150000

Tabulka 18

Typ katetrového řezu	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 30 minutách	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 6 hodinách	Průměrné % snížení cfu/řez vzhledem ke kontrole po 24 hodinách
Vzduchem sušený EDTA	35,8	91,2	63,2
Vypláchnutý EDTA	18,8	55,0	10,9

Tyto výsledky prokazují alespoň krátkodobou redukci bakteriálních populací na vzduchem sušených i propláchnutých katetrových řezech.

Příklad 6: Změněné hodnoty MBC, jeli tetrasodná sůl EDTA kombinována s ethanolem

Byly připraveny roztoky mající různé koncentrace tetrasodné soli EDTA (0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 a 8 mg/ml, hmot./obj.) za použití vody a ethanolu (k dosažení konečné koncentrace ethanolu 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 a 40 % ve vodě) za účelem testování účinnosti samotných roztoků EDTA, samotných roztoků alkoholu a roztoků EDTA/alkohol. Byly připraveny koncentrované zásobní roztoky tetrasodné soli EDTA v destilované vodě a byl k nim přidán ethanol tak, aby se dosáhlo požadované koncentrace ethanolu.

Metoda:

- Organismus se kultivuje v živném mediu přes noc při 37 °C.
- Použití se zásobní roztoky alkoholu a tetrasodné soli EDTA pro naplnění (střídavě) 96 jamkových ploten (jedné na kulturu), za použití roztoků EDTA majících koncentraci tetrasodné soli 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 a 8 mg/ml, hmot./obj., v rozpouštědle isopropyl-alkoholu o koncentraci alkoholu 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 a 40 % obj./obj.,ve vodě.
- Každá jamka obsahuje 150 µl každého ředidla a 50 µl organismu v počtu $1x10^8$ cfu/ml.
- V intervalech 5 minut, 6 hodin a 24 hodin se každá jamka kultivuje tak, že se plotna přikryje víčkem s 96 hroty a potom se víčko přenese na 96-jamkové plotny obsahující 300 µl čerstvého živného media v každé jamce. Plotny se inkubují přes noc při 37 °C. Každá naočkovaná plotna se inkubuje během inkubační doby při 37 °C.
- Po 24 hodinách se zhodnotí zákal každé jamky.

Výsledky pro několik organismů jsou uvedeny dále.

Tabulka 19

Organismus	MBC tetrasodná sůl EDTA (mg/ml)	MBC alkohol (%)	MBC tetrasodná sůl EDTA (mg/ml) + alkohol (%)
E. coli	3	10	0,5 a 0,5
Proteus sp.	3	10	2 a 1
CNS (I)	8	10	2 a 1
Klebsiella sp.	8	10	1 a 1
Staphylococcus aureus	0,1	0,1	0,1 a 0,1
Pseudomonas sp.	2	10	2 a 1
CNS (II)	8	10	0,5 a 0,5

Roztoky tetrasodné soli EDTA ve vodě byly účinnější při usmrcování testovaných mikroorganismů než roztoky ethanolu (samotného). Kombinace tetrasodné soli EDTA v alkoholických roztocích zabíjela mikroorganismy při nejnižších koncentracích. Roztok 2 mg/ml (0,2 hmot./obj.) tetrasodné soli EDTA v 1% alkoholu měl vynikající výsledky a měl baktericidní efekt na všechny testované organismy. Tento antiseptický roztok je účinný při nižší koncentraci tetrasodné soli EDTA a ethanolu než roztoky tetrasodné soli EDTA ve vodě samotné nebo ethanol samotný. Dále je levný, bezpečný a jednoduše vyrobitelný a použitelný. Antiseptické prostředky podle vynálezu pro lokální použití proto obsahují EDTA soli ve směsném vodném rozpouštědle a ethanolu.

Příklad 7: Rozpustnost tetrasodné soli EDTA v ethanolu a vliv na pH

Testovala se solubilita tetrasodné soli EDTA v ethanolu a měřilo se pH různých roztoků tetrasodné soli EDTA v alkoholových rozpouštědlech.

Metoda:

- Tetrasodná sůl EDTA se navážila dvojmo v rozmezí 10 až 100 mg do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek. Do každé zkumavky se přidal 1 ml 74% ethanolu a provedlo se promíchání po dobu 30 sekund.
- Do dvojité sady navážené tetrasodné soli EDTA se přidalo 0,5 ml sterilní destilované

vody a směs se promíchala a potom se přidalo 0,5 ml 74% ethanolu.

- Každá zkumavka s tetrasodnou solí EDTA se testovala na pH, když byla pozorována rozpustnost.

Výsledky pokusů ukazují, že tetrasodná sůl EDTA je zcela nerozpustná v 74% roztoku ethanolu. Výsledky dále ukazují, že když se tetrasodná sůl EDTA rozpustí v destilované vodě v koncentraci v rozmezí 10 až 100 mg/ml hmot./obj., zůstane tetrasodná sůl EDTA po přidání ethanolu v roztoku. Výhodná technika tedy zahrnuje rozpuštění soli EDTA nejprve ve vodném roztoku a potom přidání ethanolu nebo jiného rozpouštědla, ve kterém jsou soli EDTA méně rozpustné nebo nerozpustné. Při přípravě tímto způsobem se předpokládá, že budou roztoky solí EDTA stabilní v čase. Naměřené hodnoty pH pro různé roztoky byly následující:

74%ethanol, samotný	pH 7,8
voda	pH 7,1
+ 10 mg tetrasodné soli EDTA	pH 9,0
+ 20 mg tetrasodné soli EDTA	pH 10,8
+ 40 mg tetrasodné soli EDTA	pH 11
+ 80 mg tetrasodné soli EDTA	pH 11,15
+ 100 mg tetrasodné soli EDTA	pH 11,25

Příklad 8: Efekt autoklávování při 121 °C na roztoky tetrasodné soli EDTA

Testovali jsme efekt autoklávování na roztoky tetrasodné soli EDTA pro stanovení, zda může být autoklávování použito pro sterilizování roztoků tetrasodné soli EDTA před použitím. Použité postupy a výsledky jsou popsány dále.

Metoda:

- Připravily se (dvakrát) 0, 20, 80 a 100 mg/ml koncentrace tetrasodné soli EDTA ve sterilní vodě a sterilním, roztátém živném agaru při 50 °C.
- Jedna sada se ponechala při teplotě místnosti (nezahřívala se) a druhá se autoklávovala (zahřála).
- Následující den se všechny agarové lahvičky daly do parní lázně, aby agar během 40

minut roztál.

Měření zón difuse:

- Pomocí korkovrtu se v 16 plotnách s čerstvým krevním agarem navrtají dva otvory.
- Připraví se suspenze CNS v MacFarlandově standardu 0,5 a tato suspenze se naočkuje sterilním očkem na plotny, aby se vytvořila kultura.
- Pipetou se odměří 150 µl každého roztoku tetrasodné soli EDTA a roztok se umístí do otvorů a provede se inkubace při 37 °C přes noc.
- Následující den se změří zóny difuse a zaznamenají se výsledky.

Výsledky, měřené jako velikosti zón (mm) jsou uvedeny dále. Velikosti zón pro kontroly se vynesly do grafu v závislosti na koncentraci, aby bylo možno stanovit skutečné koncentrace EDTA v testovaných vzorcích, které jsou též uvedeny dále. Tyto výsledky ukazují, že autoklávování přípravků tetrasodné soli EDTA, ať ve sterilní vodě nebo v agaru, podstatně neovlivňuje antimikrobiální aktivitu přípravků tetrasodné soli EDTA.

Tabulka 20: Velikosti zón v mm

Koncentrace EDTA mg/ml	EDTA ve sterilní vodě (kontrola)	EDTA v autoklávované sterilní vodě	EDTA v agaru	EDTA v autoklávovaném agaru
0	0	0	0	0
	0	0	0	0
20	13,2	11,6	13,5	12,7
	13,2	11,6	13,5	12,7
80	16,1	15,2	17,2	15,3
	16,1	15,2	17,2	15,3
100	17,1	17,0	17,1	16,4
	17,1	17,0	17,1	16,4

Tabulka 21: Skutečná koncentrace EDTA

Koncentrace EDTA mg/ml	EDTA ve sterilní vodě (kontrola)	EDTA v autoklávované sterilní vodě	EDTA v agaru	EDTA v autoklávovaném agaru
0	0	0	0	0
20	20	16	26	19
80	80	60	101	62
100	100	98	100	83

Příklad 9: Vliv autoklávování při 121 °C na různé formulace EDTA

Testovali jsme efekt autoklávování na různé formulace roztoků EDTA za účelem stanovení, zda může být autoklávování použito pro sterilizování různých roztoků EDTA před použitím. Postup a výsledky jsou uvedeny dále.

Metoda:

Příprava agaru:

- 50 ml roztoku živného agaru se nalije do 7X 100 ml sterilních skleněných lahviček.
- Do první lahvičky (označené 0) se nepřidá prášková EDTA.
- Do druhé lahvičky se přidá 2000 mg práškové EDTA (označeno jako 40 mg/ml auto)
- Do třetí lahvičky se přidá 4000 mg práškové EDTA (označeno jako 80 mg/ml auto)
- Do čtvrté lahvičky se přidá 5000 mg práškové EDTA (označeno jako 100 mg/ml auto)
- Do lahviček pět, šest a sedm se nepřidá EDTA (ale tyto lahvičky se označí jako 40, 80 a 100 mg/ml neautoklávované), a tyto lahvičky se ponechají při teplotě místnosti.
- Toto se provede pro každý testovaný přípravek EDTA a všechny lahvičky označené jako auto se autoklávují po dobu 20 minut při 121 °C.
- Následující den se všechny lahvičky umístí do parní lázně pro roztavení agaru.
- Po roztátí agaru se lahvičky nechají zchladnout na 50 °C a potom se do lahviček označených jako neautoklávované přidá příslušné množství EDTA. Všechny lahvičky jsou nyní připraveny k testu.

Měření zón difuse

- Pomocí korkovrtu se v 7 plotnách s čerstvým krevním agarem navrtají dva otvory.

- Připraví se suspenze CNS v MacFarlandově standardu 0,5 a tato suspenze se naočkuje sterilním očkem na plotny, aby se vytvořila kultura.
- Nepipetuje se 150 µl z každé lahvičky zvlášť do každého ze 2 otvorů a provede se inkubace při 37 °C přes noc.
- Toto se provede pro každou formulaci EDTA.
- Následující den se změří zóny difuse a zaznamenají se výsledky. Použije se dvou otvorů a 2 měření na zónu.

Roztoky měďnaté a železité soli EDTA neprodukují žádné zóny. Efekt zahřívání na tyto roztoky proto nemůže být touto metodou měřen. Velikost zón měřená pro roztoky diamonné soli EDTA, didraselné soli EDTA a hořečnaté soli EDTA je uvedena dále. Velikosti zón pro kontroly (bez zahřívání) se vynesly do grafu v závislosti na koncentraci, aby se umožnilo stanovení skutečné koncentrace EDTA v testovaných (zahřívaných) vzorcích. Výsledky jsou uvedeny dále.

Tabulka 21. Velikosti zón (mm)

Koncentrace EDTA (mg/ml)	Diamonná sůl EDTA – bez zahřívání	Diamonná sůl EDTA – zahřívání	Didraselná sůl EDTA – bez zahřívání	Didraselná sůl EDTA zahřívání	Hořečnatá sůl EDTA – bez zahřívání	Hořečnatá sůl EDTA – zahřívání
0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
40	18,3	17,9	16,2	15,5	6,8	10,6
	18,3	17,9	16,2	15,5	6,8	10,6
	18,3	17,9	16,2	15,5	6,8	10,6
	18,3	17,9	16,2	15,5	6,8	10,6
80	19,7	19,7	18,9	18,3	10,0	10,8
	19,7	19,7	18,9	18,3	10,0	10,8
	19,7	19,7	18,9	18,3	10,0	10,8
	19,7	19,7	18,9	18,3	10,0	10,8
100	20,0	20,6	18,2	20,0	8,3	11,8
	20,0	20,6	18,2	20,0	8,3	11,8
	20,0	20,6	18,2	20,0	8,3	11,8
	20,0	20,6	18,2	20,0	8,3	11,8

Tabulka 22: Skutečné hodnoty autoklávované EDTA

Koncentrace EDTA (mg/ml)	Diamonná sůl EDTA - zahřívání	Didraselná sůl EDTA - zahřívání	Hořečnatá sůl EDTA zahřívání
0	0	0	0
40	39	38	>140
80	80	71	>140
100	150	>140	>140

Tyto výsledky ukazují, že autoklávování nesnižuje účinnost většiny přípravků solí EDTA. Autoklávování antiseptických prostředků podle vynálezu může být proto prováděno k získání sterilních antiseptických prostředků.

Příklad 10: Hodnoty pH solí EDTA, chloridu sodného a citrátu sodného

Měřily se hodnoty pH pro různé roztoky solí EDTA, chloridu vápenatého a citrátu sodného za použití destilované vody jako rozpouštědla a při daných koncentracích. Výsledky jsou uvedeny dále.

Volná kyselina EDTA, 10%	pH 4,7
Diamonná sůl EDTA 10%	pH 4,38
Vápenatosodná sůl EDTA 10%	pH 6,68
Didraselná sůl EDTA 10%	pH 4,5
Měďná sůl EDTA 10%	pH 6,15
Tetrasodná sůl EDTA 10%	pH 11,6
Tetrasodná sůl EDTA 2%	pH 11
Tetrasodná sůl EDTA neutralizovaná chloridem vápenatým	pH 7,3
Chlorid vápenatý, 1 molární	pH 3,8
Citrát sodný 50%, 25%	pH 8,5

Příklad 11: Potvrzení antikoagulačních vlastností roztoků EDTA

Antikoagulační vlastnosti roztoků EDTA se potvrdily za použití následujících postupů.

Metody:

- 100 µl alikvotní podíly z koncentračního rozmezí (0,5 až 100 mg/ml) roztoků tetrasodné nebo disodné soli EDTA, upravené na pH 11,0 až 11,6, se umístily do zkumavek s plastovou zátkou.
- Ke každému alikvotu roztoku EDTA bylo přidáno 900 µl čerstvé krve od zdravých dobrovolníků a jemně promíseno obracením zkumavky v pravidelných intervalech.

Výsledky ukázaly, že kontrolní zkumavky obsahující krev bez roztoku EDTA měly dobu srážení 10 až 23 minut. Zkumavky obsahující roztoky EDTA měly všechny doby srážení větší než 5 dnů. Zkumavky s tetrasodnou solí EDTA v koncentraci vyšší než 1 mg/ml měly dobu srážení vyšší než 5 dnů. Zkumavky obsahující tetrasodnou sůl EDTA v koncentraci 0,5 mg/ml měly dobu srážení 28 minut. Tetrasodná sůl EDTA je tedy v koncentraci vyšší než 1 mg/ml (1 % hmot./obj.) účinná jako antikoagulační činidlo.

Příklad 12: Osmolarita suspenzí tetrasodné soli EDTA

Byla testována osmolarita a lýza erytrocytů v roztocích tetrasodné soli EDTA ve vodě a fyziologickém roztoku majícím různé koncentrace za použití standardních laboratorních technik. Lýza erytrocytů se testovala přidáním 50 µl krve s EDTA do 2 ml každé koncentrace každého roztoku na dobu 2 hodin. Rozmezí osmolarity plasmy bylo 275 až 295 m/osmol.

Tabulka 23

	Osmolarita (m/osmol)	Lýza erytrocytů
2% Tet Sod EDTA v destilované vodě	142	++
4% Tet Sod EDTA v destilované vodě	277	+
2% Tet Sod EDTA ve fyziol. roztoku	219	+/-
4% Tet Sod EDTA ve fyziol. roztoku	588	-

Příklad 13: Vliv tří solí EDTA na rozpouštění umělých močových krystalů (AUC)

Jedním problémem spojeným s močovými katetry je skutečnost, že na povrchu katetrů mají tendenci se hromadit močové krystaly. Ukládání močových krystalů může podpořit mikrobiální kolonizaci a/nebo vznik biofilmu, stejně jako může snižovat průtok katetrem. Je proto žádoucí použít pro močové katetry desinfekční přípravek, který by redukoval tvorbu močových krystalů. Byla testována účinnost tří různých roztoků EDTA solí za použití metody popsané dále.

Materiály:

- Umělá moč ve 25 ml plastových universálních nádobkách s ureasou, inkubována po dobu 7 dnů při teplotě 45°C.
- Roztoky diamonné, didraselné a tetrasodné soli EDTA v koncentraci 100 mg/ml.

Metoda:

- Krystaly v umělé moči se odstředily při 4000 rpm během 2 minut.
- Supernatant se dekantoval a krystaly se promyly vodou, načež se provedlo odstředění.
- Krystaly se resuspendovaly v 1 ml vody a odebraly se alikvoty po 200 µl do čtyř universálních nádobek.
- Ke každé universální nádobce byly při teplotě místnosti přidány 4 ml 100 mg/ml roztoku každé soli EDTA a vody jako kontrola.
- Po 1, 2 a 3 hodinách se vizuálně hodnotilo rozpouštění krystalů ve srovnání s kontrolou.

Výsledky jsou uvedeny dále. Všechny roztoky solí EDTA snižovaly ukládání močových krystalů ve srovnání s vodným roztokem. Roztoky solí EDTA jsou tedy vhodné pro použití v močových katetrech.

Tabulka 24

Roztok	Ukládání krystalů
Voda + AUC	+++++
Tetrasodná sůl EDTA + AUC	++
Diamonná sůl EDTA + AUC	+
Didraselná sůl EDTA + AUC	+/-

Všechny citované odkazy, včetně patentových i nepatentových publikací, jsou zde odkazem zahrnuty ve své úplnosti.

Ačkoliv byl předkládaný vynález popsán ve vztahu k určitým výhodným provedením a pro jeho ilustrování bylo uvedeno mnoho detailů, bude odborníkům v oboru zřejmé, že existují další provedení vynálezu a že určité zde uvedené detaily mohou být značně obměňovány bez odchýlení se od základních principů vynálezu.

PV 2007 - 820

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Antiseptická kompozice, zahrnující alespoň jednu sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové EDTA v roztoku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tato alespoň jedna sůl EDTA zahrnuje tetrasodnou sůl EDTA v koncentraci alespoň 0,01 % hmot./obj. a méně než 15 % hmot./obj., kde antiseptická kompozice má baktericidní účinek proti širokému spektru bakterií, přičemž antiseptická kompozice má pH alespoň 9,5 a přičemž antiseptická kompozice je balena ve sterilní apyrogenní formě.

2. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má pH mezi 9,5 a 11,5.

3. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má pH mezi 10,5 a 11,5.

4. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedna sůl EDTA je přítomna v koncentraci 0,2 až 10,0 % hmot./obj.

5. Kompozice podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedna sůl EDTA je přítomna v koncentraci 0,2 až 6,0 % hmot./obj.

6. Roztok podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedna sůl EDTA je přítomna v koncentraci 0,2 až 4,0 % hmot./obj.

7. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpouštědlo je vybráno ze skupiny zahrnující vodu, fyziologický roztok, alkoholy a jejich kombinace.

8. Kompozice podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpouštědlem je kombinace vody a ethanolu.

9. Kompozice podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje ethanol v množství 0,1 až 10 % obj./obj..

10. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má antibakteriální aktivitu proti bakteriím v planktonické formě a v sesilní formě.

11. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má dále alespoň jednu vlastnost vybranou ze skupiny zahrnující:

(a) antikoagulační aktivitu;

(b) fungicidní aktivitu proti mykotickým patogenům;

(c) inhibiční aktivitu proti protozoárním infekcím a

(d) inhibiční aktivitu proti amébové infekci.

12. Suchá forma antiseptické kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že po rekonstituci rozpouštědlem vytvoří kompozici podle nároku 1.

13. Formulace kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je vhodná pro lokální aplikaci na povrchy a objekty.

14. Formulace kompozice podle nároku 1 s časovaným uvolňováním, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má antiseptickou aktivitu během dlouhého časového období.

15. Uzavírací proplachovací kompozice, zahrnující alespoň jednu sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové EDTA v roztoku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tato alespoň jedna sůl EDTA zahrnuje tetrasodnou sůl EDTA v koncentraci alespoň 0,01 % hmot./obj. a méně než 15 % hmot./obj., kde uzavírací proplachovací kompozice má pH alespoň 9,5, přičemž uzavírací proplachovací kompozice je balena ve sterilní apyrogenní formě a přičemž uzavírací proplachovací je biokompatibilní pro použití v trvale zavedených katetrech, močových katetrech, nasálních sondách a tracheálních sondách.

16. Kompozice podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpouštědlo je vybráno ze skupiny zahrnující vodu, fyziologický roztok, alkoholy a jejich kombinace.

17. Antiseptická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje trisodnou a tetrasodnou sůl EDTA v roztoku v koncentraci alespoň 0,01 % hmot./obj. a menší než 15 % hmot./obj., kde antiseptická kompozice má baktericidní účinek proti širokému spektru bakterií, kde antiseptická kompozice má pH alespoň 9,5 a kde antiseptická kompozice je balena ve sterilní apyrogenní formě.

18. Kompozice podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má pH mezi 9,5 a 11,5.

19. Kompozice podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má pH mezi 10,5 a 11,5.

20. Kompozice podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedna sůl EDTA je přítomna v koncentraci 0,02 až 10,0 % hmot./obj.

21. Kompozice podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedna sůl EDTA je přítomna v koncentraci 0,2 až 6,0 % hmot./obj.

22. Kompozice podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedna sůl EDTA je přítomna v koncentraci 0,2 až 4,0 % hmot./obj.

23. Kompozice podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpouštědlo je vybráno ze skupiny zahrnující vodu, fyziologický roztok, alkoholy a jejich kombinace.

24. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpouštědlem je kombinace vody a ethanolu.

25. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kompozice zahrnuje ethanol v množství 0,1 až 10 % obj./obj..

26. Kompozice podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má antibakteriální aktivitu proti bakteriím v planktonické formě a v sesilní formě.

27. Způsob inhibice růstu a proliferace populace alespoň jednoho nežádoucího mikroorganismu na povrchu nebo v objektu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kontaktování povrchu nebo objektu s kompozicí podle kteréhokoliv z nároků 1 až 26.

28. Způsob podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nežádoucí mikroorganismus je vybrán ze skupiny zahrnující mikrobiální populace, mykotické patogeny, protozoární populace a amébové populace.

29. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nežádoucím mikroorganismem je *Acanthamoeba*.

30. Způsob podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že povrch nebo objekt je vybrán ze skupiny zahrnující katetry, lékařské trubice a okruhy, intravaskulární prostředky, implantované lékařské prostředky, lékařské a veterinární nástroje, kontaktní čočky, optické implantáty, dentální, orthodontické a periodontální prostředky, zařízení pro skladování, distribuci a zpracování vody, průmyslová zařízení a zařízení pro přípravu a zpracování potravin.

31. Způsob inhibice růstu a proliferace biofilmu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kontaktování biofilmu s kompozicí podle kteréhokoliv z nároků 1 až 26.

32. Krytí pro použití při hojení ran, kde uvedené krytí je impregnováno kompozicí podle kteréhokoliv z nároků 1 až 32.

Obr. 1A

Organismus ID	Dikalium-EDTA		Diammonium-EDTA		Dinatrium sůl EDTA		Trinatrium-EDTA		Tetranatrium-EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S24 Staph. epidermidis	<0.5	8	<0.5	4	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
31 Staph. epidermidis	<0.5	8	<0.5	8	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
301 Staph. xylosus	<0.5	6	<0.5	4	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	20
300 Staph.capitis	<0.5	10	<0.5	8	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	10
J46 Staph.lentus	<0.5	10	<0.5	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
S24 Staph.capitis	<0.5	8	<0.5	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
R8 Staph. simulans	<0.5	8	<0.5	10	<0.5	1	<0.5	1.5	<0.5	1
72 S.aureus	1	6	1	6	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
R57 S.aureus	1	8	1	10	<0.5	10	<0.5	<0.5	<0.5	8
R13 S.aureus	1	6	1	15	<0.5	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
R30 S.aureus	1	8	1	15	<0.5	10	<0.5	<0.5	-----	-----
8 S.aureus	1	8	1	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	-----	-----
R64 MRSA	1	6	1	8	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

PV 2003-820

Obr. 1B

Organismus ID	Dikalium-EDTA		Diammonium-EDTA		Dinatrium sůl EDTA		Trinatrium-EDTA		Tetranatrium-EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
R51 MRSA	1	10	1	6	<0.5	1	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
R92 MRSA	1	8	1	>15	<0.5	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
S93 MRSA	1	8	1	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
J67 MRSA	1	8	1	10	<0.5	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
R8 VRE	<0.5	8	<0.5	15	<0.5	100	<0.5	20	<0.5	30
Woods VRE	1	8	1	>15	<0.5	100	<0.5	2	<0.5	1
S77 Enterococcus Faecium	<0.5	8	<0.5	15	<0.5	100	<0.5	20	<0.5	6
S76 Enterococcus faecalis	1	15	1	15	<0.5	100	<0.5	1.5	<0.5	40
68 Klebsiella pneumoniae	1.5	15	4	>10	8	60	20	40	6	6
R51 Klebsiella pneumoniae	1	15	1.5	>10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
128 Klebsiella oxytoca	1	15	1	>10	1	90	4	20	4	6
J7 Klebsiella ornitholytica	1	>15	1	>10	1	60	20	70	4	8
250 E. coli	1	>15	1	>10	1.5	80	10	20	1.5	1.5
B/C E. coli	1	15	1.5	>10	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Obr.1C

Organismus ID	Dikalium-EDTA		Diammonium-EDTA		Dinatrium sůl EDTA		Trinatrium-EDTA		Tetranatrium-EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
137 E. coli	1	15	4	>10	4	60	4	10	2	2
292 Ent. cloacae	4	15	4	>10	4	>100	20	20	6	15
190 Ent. cloacae	4	>15	4	>10	4	100	20	20	6	15
J22 Ent. cloacae	6	>15	<0.5	>10	6	>100	20	20	6	10
R4 Steno. maltophilia	<0.5	10	1	>10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B/C Pseudomonas aeruginosa	1	>15	1	>10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
J20 Pseudomonas aeruginosa	1	>15	1	>10	<0.5	50	4	20	2	4
J26 Pseudomonas sp.	1	15	<0.5	>10	<0.5	25	4	60	8	4
R75 Coryne. amycolatum	<0.5	<0.5	<0.5	1	NG	NG	NG	NG	<0.5	20
R23 Coryne. strait/amy	<0.5	<0.5	<0.5	1	NG	NG	NG	NG	<0.5	<0.5
177 Acinetobacter baumanii	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
J44 Acinetobacter baumanii	<0.5	60-70	<0.5	>10	<0.5	1	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

Obr. 1D

Organismus ID	Dikalium-EDTA		Diammonium-EDTA		Dinatrium sůl EDTA		Trinatrium-EDTA		Tetranatrium-EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
R16 Proteus mirabilis	<0.5	>15	<0.5	>10	<0.5	50	<0.5	40	<0.5	15
R81 Proteus vulgaris	1	>15	<0.5	>10	<0.5	15	<0.5	40	<0.5	8
R26 Proteus mirabilis	<0.5	15	<0.5	>10	<0.5	50	<0.5	60	1	15

Obr. 2

Organismus ID	Tetranatrium-MIC	Tetranatrium-MBC	Dikalium-MIC	Dikalium-MBC	Diammonium-MIC	Diammonium-MBC
J96 Candida albicans	0.5	15	0.5	>100	0.5	>100
J92 Candida albicans	0.5	15	0.5	>100	0.5	>100
Myc. Candida albicans	0.5	0.5	0.5	>100	0.5	>100
I98 Candida lucitaniae	0.5	6	0.5	>100	0.5	>100
Myc. Candida tropicalis	0.5	10	1	>100	1	100
Myc. Candida Guilliermondii	0.5	0.5	0.5	>100	0.5	>100
Myc. Candida glabrata	0.5	2	0.5	>100	0.5	90
Myc. Candida parapsilosis	0.5	8	0.5	>100	0.5	100
J96 Candida glabrata	0.5	8	0	100	0.5	>100

PV 2005-870

Obr. 3A

Organismus ID	Disodná-měďnatá sůl EDTA		Disodná-hořečnatá sůl EDTA		Sodná-železitá sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S24 Staph. epidermidis	≤0.5	≤0.5	6	30	>20	>30
31 Staph. epidermidis	≤0.5	≤0.5	6	30	>20	>30
301 Staph. xylosus	≤0.5	≤0.5	2	>30	>20	>30
300 Staph. capitis	≤0.5	≤0.5	1.5	>30	>20	>30
J46 Staph. lentus	≤0.5	≤0.5	6	>30	>20	>30
S24 Staph. capitis	≤0.5	≤0.5	6	>30	>20	>30
R8 Staph. simulans	≤0.5	≤0.5	1.5	>30	>20	>30
72 S.aureus	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
R57 S.aureus	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
R13 S.aureus	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
R30 S.aureus	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
8 S.aureus	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
R64 MRSA	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
R51 MRSA	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
R92 MRSA	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
S93 MRSA	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
J67 MRSA	≤0.5	≤0.5	>30	>30	>20	>30
R8 VRE	≤0.5	≤0.5	25	>30	2	>30
Woods VRE	>30	>30	>30	>30	>20	>30
S77 Entero-coccus faecium	≤0.5	≤0.5	1.5	>30	4	>30
S76 Entero-coccus faecalis	≤0.5	≤0.5	>30	>30	4	>30
68 Klebsiella pneumoniae	>30	>30	>30	>30	>15	>15
R51 Klebsiella pneumoniae	>30	>30	>30	>30	15	>15

Obr. 3B

Organismus ID	Disodná-měďnatá sůl EDTA		Disodná-hořečnatá sůl EDTA		Sodná-železitá sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
128 Klebsiella oxytoca	>30	>30	>30	>30	>15	>15
J7 Klebsiella ornitholytica	>30	>30	>30	>30	15	>15
250 E. coli	>30	>30	>30	>30	15	>15
B/C E. coli	6	>30	>30	>30	>15	>15
137 E. coli	>30	>30	>30	>30	>15	>15
292 Ent. cloacae	>30	>30	>30	>30	>15	>15
190 Ent. cloacae	>30	>30	>30	>30	>15	>15
J22 Ent. cloacae	6	8	>30	>30	>15	>15
R4 Steno. maltophilia	6	>30	>30	>30	10	>15
B/C Pseudomonas aeruginosa	>30	>30	>30	>30	15	>15
J20 Pseudomonas aeruginosa	>30	>30	>30	>30	15	>15
J26 Pseudomonas sp.	>30	>30	>30	>30	15	>15
R75 Coryne. amycolatum	<0.5	<0.5	<0.5	4	10	10
R23 Coryne. strait/amy	<0.5	<0.5	<0.5	4	10	10
177 Acinetobacter baumanii	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	6	10
J44 Acinetobacter baumanii	6	15	>30	>30	>15	>15
R16 Proteus mirabilis	6	>30	>30	>30	>15	>15
R81 Proteus vulgaris	>30	>30	>30	.30	>15	>15
R26 Proteus mirabilis	6	>30	>30	>30	>15	>15

PV 2005-820

Obr. 4A

Organismus ID	Disodná-měďnatá + tetrasodná sůl EDTA		Disodná-měďnatá + didraselná sůl EDTA		Disodná-měďnatá + diamonná sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S24 Staph. epidermidis	0.25	2	0.25	15	0.5	20
31 Staph. epidermidis	0.25	8	0.25	20	0.5	20
301 Staph. xylosus	<0.1	>20	<0.1	>20	<0.1	20
300 Staph. capitis	<0.1	>20	<0.1	20	<0.1	20
J46 Staph. lentus	0.25	6	0.25	15	0.5	20
S24 Staph. capitis	0.25	8	0.25	20	0.5	20
R8 Staph. simulans	0.25	>20	1	>20	1	20
72 S.aureus	<0.1	>20	<0.1	>20	<0.1	20
R57 S.aureus	<0.1	>20	<0.1	20	<0.1	20
R13 S.aureus	<0.1	>20	<0.1	20	<0.1	>20
R30 S.aureus	<0.1	15	<0.1	20	<0.1	>20
8 S.aureus	<0.1	>20	<0.1	>20	<0.1	20
R64 MRSA	<0.1	>20	<0.1	>20	<0.1	>20
R51 MRSA	<0.1	>20	<0.1	20	<0.1	>20

Obr. 4B

Organismus ID	Disodná-měďnatá + tetrasodná sůl EDTA		Disodná-měďnatá + didraselná sůl EDTA		Disodná-měďnatá + diamonná sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
R92 MRSA	<0.1	>20	<0.1	>20	<0.1	>20
S93 MRSA	<0.1	15	<0.1	20	<0.1	20
J67 MRSA	<0.1	>20	<0.1	20	<0.1	20
R8 VRE	0.25	20	0.25	20	0.5	>20
Woods VRE	0.25	>20	<0.1	20	<0.1	>20
S77 Entero-coccus faecium	0.5	>20	0.5	>20	1	>20
S76 Entero-coccus faecalis	0.25	>20	<0.1	>20	<0.1	>20
68 Klebsiella pneumoniae	10	>20	6	>20	2	>20
R51 Klebsiella pneumoniae	4	>20	4	>20	2	>20
128 Klebsiella oxytoca	4	>20	2	>20	2	>20
J7 Klebsiella ornitholytica	6	>20	2	>20	2	>20
250 E. coli	6	15	2	>20	2	>20
B/C E. coli	6	1	2	>20	2	>20
137 E. coli	6	4	2	>20	2	>20
292 Ent. cloacae	20	>20	8	>20	8	>20

PV 2007-810

FIG Obr. 4C

Organismus ID	Disodná-měďnatá + tetrasodná sůl EDTA		Disodná-měďnatá + didraselná sůl EDTA		Disodná-měďnatá + diamonná sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
190 Ent. cloacae	20	>20	8	>20	6	>20
J22 Ent. cloacae	20	>20	8	>20	6	>20
R4 Steno. maltophilia	6	10	1	>20	1	>20
B/C Pseudo-monas aeruginosa	6	10	2	>20	2	>20
J20 Pseudo-monas aeruginosa	6	15	2	>20	2	>20
J26 Pseudo-monas sp.	6	>20	2	>20	2	>20
R75 Coryne. amycolatum	<0.1	<0.1	0.25	0.25	0.25	0.25
R23 Coryne. strait/amy	6	10	1	>20	1	>20
177 Acineto-bacter baumanii	6	0.5	0.5	0.25	0.25	<0.1
J44 A. baumanii	6	>20	2	>20	1	>20
R16 Proteus mirabilis	6	>20	2	>20	1	>20
R81 Proteus vulgaris	6	>20	2	>20	2	>20
R26 Proteus mirabilis	6	>20	2	>20	1	>20

PV 2005-810

Obr. 5A

Organismus ID	Tetrasodná + Diamonná sůl EDTA		Tetrasodná + didraselná sůl EDTA		Diamonná + didraselná sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S24 Staph. epidermidis	0.5	>20	1	20	0.5	>8
31 Staph. epidermidis	0.5	>20	1	6	0.5	>8
301 Staph. xylosus	0.5	>20	1	>20	0.5	>8
300 Staph. capitis	0.5	>20	1	>20	0.5	8
J46 Staph. lentus	0.5	>20	0.5	8	0.5	>8
S24 Staph. capitis	0.5	>20	0.5	8	0.5	>8
R8 Staph. simulans	0.5	>20	0.5	>20	0.5	>8
72 S.aureus	1	>20	0.5	20	0.5	8
R57 S.aureus	1	>20	1	20	1	>8
R13 S.aureus	0	0	0	0	0	0
R30 S.aureus	1	4	1	4	1	8
8 S.aureus	1	>20	1	20	1	8
R64 MRSA	1	>20	1	20	1	>8
R51 MRSA	1	>20	1	20	0.5	>8

PV 2007-846

Obr. 5B

Organismus ID	Tetrasodná + Diamonná sůl EDTA		Tetrasodná + didraselná sůl EDTA		Diamonná + didraselná sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
R92 MRSA	1	>20	1	>20	1	>8
S93 MRSA	1	>20	1	20	1	8
J67 MRSA	1	>20	1	>20	1	8
R8 VRE	1	>20	1	>20	1	>8
Woods VRE	1	>20	1	>20	1	>8
S77 Entero-coccus faecium	0.5	>20	1	>20	1	>8
S76 Entero-coccus faecalis	1	>20	1	>20	1	>8
68 Klebsiella pneumoniae	>20	>20	>20	>20	10	>10
R51 Klebsiella pneumoniae	1	>20	1	>20	1	>10
128 Klebsiella oxytoca	1	>20	1	>20	1	>10
J7 Klebsiella ornitholytica	>20	>20	20	>20	10	>10
250 E. coli	>20	>20	20	>20	2	>10
B/C E. coli	1	0.5	1	1	0.5	>10
137 E. coli	4	>20	20	>20	1	>10
292 Ent. cloacae	8	>20	>20	>20	4	>10

PV 2001-822

Obr. 5C

Organismus ID	Tetrasodná + Diamonná sůl EDTA		Tetrasodná + didraselná sůl EDTA		Diamonná + didraselná sůl EDTA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
190 Ent. cloacae	>20	>20	>20	>20	6	>10
J22 Ent. cloacae	>20	>20	>20	>20	4	>10
R4 Steno. maltophilia	1	>20	1	>20	0.5	>10
B/C Pseudo-monas aeruginosa	8	>20	15	15	2	>10
J20 Pseudo-monas aeruginosa	6	>20	15	20	2	>10
J26 Pseudo-monas sp.	8	>20	20	>20	2	>10
R75 Coryne. amycolatum	0.5	4	0.5	1	0.5	2
R23 Coryne. strait/amy	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
177 Acinetobacter baumanii	4	8	1	>20	0.5	>10
J44 A. baumanii	>20	>20	>20	>20	2	>10
R16 Proteus mirabilis	1	>20	1	>20	0.5	>10
R81 Proteus vulgaris	1	>20	1	>20	0.5	>10
R26 Proteus mirabilis	>20	>20	>20	>20	2	>10

PV 2005-820

Obr. 6

Organismus	Tetrasodná sůl EDTA MBEC (mg/ml, w/v)
31 Staph. epidermidis	20-40
301 Staph. xylosus	20-40
300 Staph. capitis	<5
J46 Staph. lentus	<5
R8 Staph. simulans	20-40
72 Staph. aureus	<5
R57 Staph. aureus	<5
8 Staph. aureus	<5
R92 MRSA	<5
S93 MRSA	<5
J67 MRSA	<5
68 Klebsiella pneumoniae	<5
J7 Klebsiella ornitholytica	<5
292 Enterobacter cloacae	<5
190 Enterobacter cloacae	20
J22 Enterobacter cloacae	15
R4 Stenotrophomonas maltophilia	<20
J20 Pseudomonas aeruginosa	<10
J26 Pseudomonas aeruginosa	<5
J44 Acinetobacter baumanii	10
R16 Proteus mirabilis	<5
R81 Proteus vulgaris	<5
H Enterococcus	<5
7097651 E. coli	<5
250 E. coli	<10
7115649 Klebsiella oxytoca	<5

Obr. 7

Katetr č.	Konc. EDTA (mg/ml)	Počet kolonií v 0 hod. (cfu/ml)	Počet kolonií ve 3 hod (cfu/ml)	Počet kolonií v 6 hod (cfu/ml)	Počet kolonií ve 24 hod (cfu/ml)	Přítomné organismy
G	40	>100000	120000	6000	0	Směs G- a G+ Kultur
H	40	>100000	80000	0	0	Směs G- a G+ Kultur
I	40	200000	>500000	25000	0	CNS + Coryneforms
J	40	>500000	180000	0	0	CNS
K	40	>1000000	600000	500000	180000	Streptococcus sp., CNS a Gram-ve bacillus
P	40	>500000	2500000	150000	54500	Pseudomonas sp. + Streptococcus sp.
Q	40	205000	650000	1000	5500	Enterococcus sp.
R	40	5000	500	0	0	MRSA
S	40	>500000	100000	30000	0	CNS
T	40	137500	1000	0	0	MRSA
U	40	>500000	182500	67500	13500	CNS
V	40	700000	38500	37500	13000	CNS + Skupina D Streptococcus
W	40	>500000	0	0	0	Enterobacter cloacae
X	40	>500000	20000	0	0	Směs CNS
Z	40	>500000	0	0	0	CNS
A1	40	700000	37000	60000	0	MRSA
B1	40	24000	0	0	0	MRSA

Obr. 8

Katetr č.	Konc. EDTA (mg/ml)	Počet kolonií v 0 hod. (cfu/ml)	Počet kolonií ve 3 hod (cfu/ml)	Počet kolonií v 6 hod (cfu/ml	Počet kolonií ve 24 hod (cfu/ml)	Přítomné organismy
A	100	10000000	0	0	0	CNS
B	100	10000000	100	200	0	CNS
C	50	10000000	0	0	0	Smíšené koliformní
D	20	>100000	250000	100000	0	Směs G- a G+ Kultur
E	30	>100000	400000	360000	0	Směs G- a G+ Kultur
F	30	300000	57000	2000	0	Směs G- a G+ Kultur
L	60	600000	5000	4000	0	Enterococcus sp.
M	60	>500000	300000	17000	17000	Proteus sp. a CNS
O	50	500000	30000	130000	0	Staphylococcus aureus
N (arterial)	50	500000	10000	0	0	CNS
N (venous)	50	300000	10000 (CNS only)	60000 (CNS only)	0	Klebsiella pneumoniae + CNS

PV 2557-320