

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243079 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **430455**

(22) Data zgłoszenia: **2019.07.01**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.01.11 BUP 01/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.06.19 WUP 25/2023**

(51) MKP:

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/60 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**AGATA PRZEKORA-KUŚMIERZ, Lublin, PL
VLADYSLAV VIVCHARENKO, Lublin, PL
PAULINA KAZIMIERCZAK,
Kolonia Miłoszewice, PL
MICHAŁ WÓJCIK, Ożarów, PL**

(74) Pełnomocnik:

Anna Bełz, Lublin, PL

(54) Tytuł:

Piankowy materiał opatrunkowy na rany na bazie chitozanu oraz sposób jego wytwarzania

PL 243079 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest piankowy materiał opatrunkowy na rany na bazie chitozanu do zastosowań w medycynie regeneracyjnej oraz sposób jego wytwarzania.

Gojenie ran jest dynamicznym i złożonym procesem, który wymaga odpowiedniego środowiska wspierającego proces regeneracji. W zależności od typu rany należy zastosować odpowiedni materiał opatrunkowy, który będzie spełniać stosowne wymagania, m.in.: zapewniać i utrzymywać wilgotne środowisko, stymulować migrację naskórka, wspierać angiogenezę i syntezę tkanki łącznej, umożliwiać wymianę gazową między zranioną tkanką a środowiskiem zewnętrznym, zapewniać ochronę przed infekcjami bakteryjnymi. Ponadto opatrunek powinien być nietoksyczny, nie uczulać oraz nie przylegać (przysychać) dołożyska rany (Dhivya i wsp., *BioMedicine*, 2015, 5(4):24–28; Gonzalez i wsp., *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2016, 91(5):614–20).

Wraz z rozwojem technologii i nauki, na rynku farmaceutycznym pojawiły się różnorodne rodzaje materiałów opatrunkowych (biologiczne, syntetyczne, biologiczno-syntetyczne). Bardzo często strategie opracowywania nowych materiałów opatrunkowych opierają się na wykorzystaniu naturalnych polisacharydów ze względu na ich cenne właściwości biologiczne oraz szeroką dostępność. Chitozan to naturalny polisacharyd, który charakteryzuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością, hydrofilnością, brakiem toksyczności oraz właściwościami przeciwbakteryjnymi. Materiały opatrunkowe na bazie chitozanu przyspieszają proces regeneracji rany oraz regulują proces zapalny (Jayakumar i wsp., *Bio-technology Advances*, 2011, 29(3):322–37).

Celem wynalazku jest otrzymanie piankowego materiału opatrunkowego na rany na bazie chitozanu, który – ze względu na cenne właściwości biologiczne wchodzących w jego skład polisacharydów – będzie wspierał proces gojenia w taki sposób, że będzie absorbował wysięk z rany oraz zatrzymywał go w obrębie struktury opatrunku.

Dotychczas nie został opracowany materiał opatrunkowy piankowego o strukturze porowatej składający się z kurdlanu (bakteryjnego β -1,3 glukanu) oraz chitozanu użytych w określonych proporcjach. W dostępnej literaturze naukowej z zakresu medycyny regeneracyjnej istnieją wyłącznie doniesienia opisujące sposób produkcji oraz przypuszczalne zastosowanie materiałów opatrunkowych powstałych z chitozanu lub z chitozanu i β -glukanu pochodzenia innego niż bakteryjne.

Z czeskiego opisu wynalazku nr CZ2007683 znany jest sposób otrzymywania kompleksu chitozan-schizofylan (grzybowy β -1,3-D-glukan) lub jego soli, występujących samodzielnie lub w połączeniu z jednym lub większą liczbą innych naturalnych polisacharydów, do zastosowań jako preparat do przyspieszania gojenia się ran oraz zapobiegania przywierania bandaża do rany. Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że chitozan i schizofylan oraz środek antyseptyczny rozprowadza się w sterylnej wodzie i następnie poddaje suszeniu na powietrzu lub zamrożeniu i liofilizacji.

Z czeskiego opisu wynalazku nr CZ201398 znany jest sposób otrzymywania włókien oraz osłony na rany składających się z kompleksu chityny/chitozan-schizofylan (grzybowy β -1,3-D-glukan). Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że kompleks chityna/chitozan-schizofylan rozpuszcza się w zasadzie sodowej i moczniku lub w mieszaninie N,N-dimetyloacetamidu i chlorku litu, po czym następuje ich wirowanie w mieszaninie alkoholu i kwasu.

Znany jest sposób otrzymywania powłoki składającej się z chitozanu i β -(1,3-1,6)-glukanu pochodzenia drożdżowego do zastosowań w leczeniu ran. Metoda otrzymywania polega na rozprowadzeniu chitozanu w roztworze wodnym β -glukanu, a następnie żelowaniu β -glukanu w kwasie octowym i suszeniu w temperaturze pokojowej (Kofuji i wsp., *Reactive and Functional Polymers*, 2010, 70(10):784–89).

Przedmiotem wynalazku jest piankowy materiał opatrunkowy na rany zbudowany z chitozanu oraz kurdlanu, rozprowadzonych w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe komponentów wynoszą odpowiednio 0,5–4% (w/v) chitozanu oraz 2–15% (w/v) kurdlanu w odniesieniu do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy chitozan występuje w ilości 0,5–1% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego, zaś kurdlan występuje w ilości 2–3% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.

Sposób wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego na rany według wynalazku polega na tym, że przygotowuje się mieszaninę 0,5–4%, korzystnie 0,5–1% (w/v) chitozanu oraz 2–15% korzystnie 2–3% (w/v) kurdlanu w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, korzystnie 1% (v/v), a następnie mieszaninę przekłada się do formy, którą inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze 90–95°C, korzystnie 95°C, przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, a następnie studzi w temperaturze 4–8°C, po czym ostudzoną próbkę umieszcza się w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej korzystnie na okres 20 minut,

a następnie po wyjęciu materiału z roztworu zasady sodowej, płucze się go w wodzie dejonizowanej korzystnie trzykrotnie, próbkę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -60 do -80°C korzystnie na okres 1–2 godzin, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji do momentu całkowitego wysuszenia próbki.

Otrzymany według wynalazku biomateriał może znaleźć zastosowanie jako porowaty, chłonny opatrunek na rany z obfitym wysiękiem, którego powierzchnia kontaktowa nie przysycha do łożyska rany, minimalizując ryzyko uszkodzenia nowo powstałych tkanek.

Alternatywnie wynalazek zawiera dodatkowo oprócz chitozanu i kurdlanu, w ilościach wcześniej opisanych, substancje bioaktywne takie jak witaminy, antybiotyki, czynniki wzrostu, hormony, kurkuminę, gdzie jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę, jako czynniki wzrostu zawiera FGF i EGF, zaś jako hormony zawiera insulinę i hydrokortyzon.

Korzystnie, gdy nasączoną i wysuszoną próbkę nasącza się roztworem związków bioaktywnych – takim jak roztwór witaminy C (kwasu askorbinowego) w stężeniu 0,05–2 mg/ml lub/i roztwór witaminy E w stężeniu 0,05–2 mg/ml lub/i roztwór hydrokortyzonu w stężeniu 1–20 $\mu\text{g/ml}$ lub/i roztwór insuliny w stężeniu 5–50 $\mu\text{g/ml}$ lub/i roztwór czynnika wzrostu FGF w stężeniu 5–50 ng/ml lub/i roztwór czynnika wzrostu EGF w stężeniu 5–50 ng/ml lub/i roztwór kurkuminy w stężeniu 0,5–50 mg/ml lub/i roztwór gentamycyny w stężeniu 1–20 $\mu\text{g/ml}$ lub/i roztwór wankomycyny w stężeniu 1–20 $\mu\text{g/ml}$ lub/i roztwór daptomycyny w stężeniu 0,5–10 $\mu\text{g/ml}$ lub/i roztwór tygecykliny w stężeniu 0,5–10 $\mu\text{g/ml}$ – przygotowanym w soli fizjologicznej (0,9% NaCl), roztworze Ringera, HBSS lub buforze PBS przez okres 10 minut lub do momentu całkowitego nasączenia materiału.

Zaletą opracowanego według wynalazku sposobu wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego na rany jest otrzymanie porowatego, chłonnego biomateriału, który będzie absorbował wysięk z rany oraz zatrzymywał go w obrębie struktury opatrunku, co będzie zapewniać odpowiednią wilgotność środowiska rany, zapobiegając tworzeniu się strupów. Ponadto porowata struktura piankowego materiału będzie ułatwiać wymianę gazową między zranioną tkanką a środowiskiem zewnętrznym. Ważną cechą materiału opatrunkowego według wynalazku jest jego brak toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych oraz powierzchnia materiału uniemożliwiająca adhezję fibroblastów skóry, dzięki czemu opatrunek może być usunięty bez naruszenia łożyska rany, zapobiegając tworzeniu się nieestetycznych blizn. Ponadto, alternatywny sposób produkcji piankowego materiału opatrunkowego, umożliwia stopniowe uwalnianie substancji bioaktywnych (np. witamina C, witamina E, kurkumina, antybiotyki, czynniki wzrostu, hydrokortyzon, insulina) w miejscu zranienia, znacząco przyspieszając regenerację skóry oraz chroniąc łożysko rany przed infekcjami.

Piankowy materiał opatrunkowy będący przedmiotem wynalazku, ze względu na swoje właściwości strukturalne i biologiczne będzie zapewniał odpowiednie warunki wspierające gojenie rany. Opracowany materiał opatrunkowy może znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako chłonny opatrunek na rany wysiękowe, którego zastosowanie jest szczególnie pożądane w fazie oczyszczania i silnego wydzielania z rany. Powierzchnia kontaktowa materiału opatrunkowego według wynalazku nie sprzyja adhezji fibroblastów, zatrzymuje wysięk oraz utrzymuje wilgotne środowisko, dzięki czemu nie będzie przysychać do łożyska rany, minimalizując ryzyko uszkodzenia nowo powstałych tkanek podczas zmiany opatrunku.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

Przykład I.

Do 0,02 g chitozanu i 0,04 g kurdlanu dodano 2 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm^2 i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 6°C . Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład II.

Do 0,04 g chitozanu i 0,16 g kurdlanu dodano 2 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 25 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 4°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -70°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład III.

Do 0,01 g chitozanu i 0,03 g kurdlanu dodano 1 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 1,5 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -78°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład IV.

Do 0,02 g chitozanu i 0,06 g kurdlanu dodano 2 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i wysuszono na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 10 minut roztworem zawierającym witaminę C w stężeniu 300 µg/ml oraz czynnik wzrostu (FGF lub EGF) w stężeniu 25 ng/ml, przygotowanym w buforze PBS i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład V.

Do 0,04 g chitozanu i 0,08 g kurdlanu dodano 4 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 6 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i wysuszono na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 10 minut roztworem zawierającym hydrokortyzon w stężeniu 10 µg/ml oraz insulinę w stężeniu 20 µg/ml, przygotowanym w roztworze Ringera i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład VI.

Do 0,04 g chitozanu i 0,08 g kurdlanu dodano 2 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano

w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i wysuszono na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 15 minut roztworem zawierającym antybiotyki – wankomycynę w stężeniu 10 µg/ml oraz witaminę E w stężeniu 300 µg/ml, przygotowanym w roztworze soli fizjologicznej i umieszczono w zamrażarce w temperaturze –75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Analogicznie postępowano stosując jako antybiotyki gentamycynę, daptomycynę lub tygecyklinę.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład VII.

Do 0,08 g chitozanu i 0,12 g kurdlanu dodano 4 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymałą masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 6 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i wysuszono na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 15 minut roztworem kurkuminy o stężeniu 20 mg/ml przygotowanym w buforze PBS i umieszczono w zamrażarce w temperaturze –75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Zastrzeżenia patentowe

1. Piankowy materiał opatrunkowy na bazie chitozanu **znamienny tym**, że stanowi go chitozan i kurdlan (bakteryjny β -1,3-D-glukan) rozprowadzone w 0,5–3% wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 0,5–4% (w/v) chitozanu oraz 2–15% (w/v) kurdlanu w odniesieniu do kwasu octowego.
2. Piankowy materiał opatrunkowy według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że chitozan występuje w ilości 0,5–1% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
3. Piankowy materiał opatrunkowy według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że kurdlan występuje w ilości 2–3% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
4. Piankowy materiał opatrunkowy według zastrzeżenia 1 **znamienny tym**, że zawiera substancje bioaktywne takie jak: witaminy, antybiotyki, czynniki wzrostu, hormony, kurkuminę, gdzie jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę, jako czynniki wzrostu zawiera FGF i EGF, zaś jako hormony zawiera insulinę i hydrokortyzon.
5. Sposób wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego na bazie chitozanu **znamienny tym**, że przygotowuje się mieszaninę 0,5–4% (w/v) chitozanu oraz 2–15% (w/v) kurdlanu w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, korzystnie 1% (v/v), a następnie mieszaninę inkubuje się w temperaturze 90–95°C, korzystnie 95°C, przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, po czym studzi w temperaturze 4–8°C a ostudzoną próbkę umieszcza się w 1% w/v wodnym roztworze zasady sodowej na okres korzystnie 20 minut, a następnie po wyjęciu materiału z roztworu zasady sodowej, płucze się go w wodzie dejonizowanej korzystnie trzykrotnie i zamraża w temperaturze od –60 do –80°C przez okres 1–2 godzin, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji.
6. Sposób według zastrzeżenia 5 **znamienny tym**, że chitozan stosuje się w ilości 0,5–1% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
7. Sposób według zastrzeżenia 5 **znamienny tym**, że kurdlan stosuje się w ilości 2–3% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
8. Sposób według zastrzeżenia 5 **znamienny tym**, że wypłukaną i wysuszoną próbkę nasącza się roztworem związków bioaktywnych jak witaminy, antybiotyki, czynniki wzrostu, hormony,

kurkuminy, gdzie jako witaminy stosuje się witaminę C oraz witaminę E, jako antybiotyki wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę, jako czynniki wzrostu FGF i EGF, zaś jako hormony insulinę i hydrok, przy czym próbkę nasącza się przez okres około 10 minut lub do momentu całkowitego nasączenia materiału.

9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że roztwór witaminy C (kwasu askorbinowego) stosuje się w stężeniu 0,05–2 mg/ml i/lub roztwór witaminy E w stężeniu 0,05–2 mg/ml i/lub roztwór hydrokortyzonu w stężeniu 1–20 µg/ml i/lub roztwór insuliny w stężeniu 5–50 µg/ml i/lub roztwór czynnika wzrostu FGF w stężeniu 5–50 ng/ml lub/i roztwór czynnika wzrostu EGF w stężeniu 5–50 ng/ml i/lub roztwór kurkuminy w stężeniu 0,5–50 mg/ml i/lub roztwór gentamycyny w stężeniu 1–20 µg/ml i/lub roztwór wankomycyny w stężeniu 1–20 µg/ml i/lub roztwór daptomycyny w stężeniu 0,5–10 µg/ml lub/i roztwór tygecykliny w stężeniu 0,5–10 µg/ml – przygotowanym w soli fizjologicznej (0,9 %NaCl) lub roztworze Ringera lub HBSS lub buforze PBS.