

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 511**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61L 29/00 (2006.01)
A61L 31/08 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 33/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2004 E 04754579 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1628655**

54 Título: **Composiciones antisépticas, procedimientos y sistemas**

30 Prioridad:

04.06.2003 US 476274 P
10.09.2003 US 659413

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.04.2016

73 Titular/es:

ASEPTICA, INC. (33.3%)
704 Melcher St.
Port Orchard, WA 98366, US;
KITE, PETER (33.3%) y
HATTON, DAVID (33.3%)

72 Inventor/es:

KITE, PETER y
HATTON, DAVID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 565 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones antisépticas, procedimientos y sistemas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones antisépticas, procedimientos y sistemas para el uso en varias aplicaciones médicas, así como aplicaciones de desinfección en general, incluyendo aplicaciones de desinfecciones industriales y ambientales. Las composiciones de la presente invención poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiamebianas y también pueden servir como anticoagulantes. Las sales y composiciones específicas de ácido etilendiamin tetraacético (EDTA) ($C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8$) se emplean a concentraciones y niveles de pH
10 específicos. Las aplicaciones ejemplares incluyen inhibición, reducción o eliminación de la presencia de organismos microbianos y/o fúngicos en superficies, en soluciones, o en formas complejas, tales como en biopelículas. Los procedimientos ejemplares incluyen proporcionar un revestimiento antiséptico en superficies de objetos para reducir la incidencia de infección, y poner en contacto los objetos y/o superficies por chorro de agua, remojo y/o enjuague con una solución antiséptica para inhibir la proliferación, reducir o eliminar las poblaciones microbianas.

Antecedentes de la invención

15 Las infecciones son un problema significativo en muchos campos donde las condiciones sanitarias son importantes, tal como en el cuidado de la salud. Las infecciones problemáticas pueden surgir de organismos bacterianos, fúngicos, amebianos, protozoarios y/o virales. Los desafíos se encuentran tanto en la prevención de infección como en la reducción o eliminación de la infección una vez que está establecida. Los ambientes infectados pueden incluir superficies de objetos, fluidos y conductos de fluidos, y/o humanos o animales.

20 Las soluciones alcohólicas y toallitas con alcohol isopropílico son comúnmente usados para desinfectar superficies y han mostrado tener actividad antibacteriana. El efecto antimicrobiano inhibitor más efectivo se ve con soluciones de isopropanol al 70 %. Las soluciones alcohólicas a esta concentración son bastante costosas y se evaporan rápidamente, lo cual sustancialmente disminuye su eficacia e incrementa su costo. Además, aunque las soluciones de isopropanol se pueden usar en superficies, incluyendo piel humana, y en una variedad de aplicaciones médicas, las
25 soluciones alcohólicas de esta concentración no se pueden administrar más que tópicamente a humanos para propósitos médicos.

En el campo del cuidado de la salud, las infecciones de varios tipos y causas son comunes y frecuentemente resultan en estancias más largas en hospitales, conduciendo a costos de hospital mayores. Aún peor, alrededor de 90 000 muertes de pacientes anualmente son atribuidas a infecciones nosocomiales - es decir, infecciones adquiridas en un
30 hospital o en otros ambientes sanitarios. La vigilancia de infección nosocomial ha llegado a ser una parte integral de la práctica de hospitales. Los estudios realizados hace más de 20 años por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CCE) documentan la eficacia de estas actividades de vigilancia en la reducción de la ocurrencia de infección nosocomial. A pesar de la atención dada a los problemas de infección nosocomial, sin embargo, las proporciones de infección no se han reducido drásticamente, y las infecciones nosocomiales siguen siendo un riesgo sustancial y un problema de salud sustancial.
35

Una fuente problemática de infecciones en los campos médicos y veterinarios se encuentra en los catéteres, y particularmente en catéteres permanentes. Los catéteres han llegado a ser esenciales en el manejo de pacientes de cuidado intensivo, aunque el interior de un catéter frecuentemente es la fuente principal de infección. Los catéteres se usan para suministrar fluidos, productos sanguíneos, fármacos y nutrientes, así como para hemodiálisis,
40 hemofiltración, diálisis peritoneal, extracción de muestras sanguíneas, supervisión de condiciones del paciente, etc. Los catéteres transcutáneos frecuentemente se infectan a través de la penetración de la piel del catéter. Se ha encontrado que el setenta por ciento (70 %) de todas las infecciones de corriente sanguínea nosocomiales ocurren en pacientes con catéteres venosos centrales. Daouicher y col. *New Engl. J. Med.* 340:1-8 (1999).

En particular, durante algunos procedimientos, un catéter debe ser implantado, y permanecer implantado, en un paciente durante un período de tiempo relativamente largo, por ejemplo, más de treinta días. Los catéteres de terapia intravenosa (IV) y catéteres urinarios típicamente permanecen implantados durante un periodo de tiempo sustancial. Como resultado del trauma a las áreas de inserción, y del dolor a los pacientes, tales catéteres no pueden eliminarse e implantarse frecuentemente. Las bacterias que se desarrollan el catéter han implicado una fuente primaria de infecciones del tracto urinario. En las pacientes que reciben un catéter central periféricamente insertado durante el embarazo también se ha encontrado que están en riesgo significativo de complicaciones infecciosas. Ogura y col. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188(5):1223-5 (2003). Además, la infección del catéter venoso central, que resulta en sepsis relacionada con catéter, se ha citado como la complicación más frecuente durante la nutrición parenteral doméstica. Reimund y col. *Clinical Nutrition*, 21(1):33-38 (2002). Debido al riesgo de infecciones, la cateterización se puede limitar a incidencias cuando el procedimiento es absolutamente necesario. Esto compromete seriamente la salud del
55 paciente.

Después de los procedimientos de acceso médico más prescritos que involucran un catéter, el catéter se lava a chorro con solución salina y luego se llena con un líquido, tal como solución salina o una solución de heparina, para impedir que la sangre se coagule dentro del catéter, inhibir que la sangre del paciente se estanque en el catéter, e

impedir que los gases entren al catéter. El líquido que se usa para lavar a chorro el catéter se conoce como un "lavado y enjuague", y el líquido usado para llenar el catéter después del lavado a chorro o durante períodos de no uso se conoce como una solución de "enjuague".

5 Tradicionalmente, los catéteres se han enjuagado con solución salina normal o soluciones de heparina, las cuales proporcionan actividad anticoagulante. La heparina y solución salina son algunas veces usadas en combinación. La solución salina normal es generalmente usada para enjuagar catéteres intravenosos periféricos a corto plazo, pero no tiene actividad anticoagulante o antimicrobiana. Las soluciones de heparina generalmente son usadas para enjuagar catéteres vasculares. La heparina tiene actividad anticoagulante pero no funciona como un antimicrobiano y no previene o mejora las infecciones. También existen claros indicios de que la heparina en soluciones de enjuague puede contribuir a trombocitopenia inducida por heparina, una complicación de sangrado grave que ocurre en un subconjunto de pacientes que reciben inyecciones de heparina.

10 Se han propuesto soluciones de enjuague de catéter que comprendan taurolidina, ácido cítrico y citrato de sodio. Una publicación reciente (*Kidney International*, Sept. 2002) describe el uso de una solución alcohólica al 70 % como solución de enjuague para un orificio de catéter subcutáneo. El uso de alcohol como una solución de enjuague es cuestionable, puesto que no es un anticoagulante, y puesto que podrían existir riesgos asociados si esta solución entra a la corriente sanguínea. Los inventores también desconocen cualquier evidencia que indique que una solución alcohólica al 70 % tenga alguna actividad de erradicación de biopelícula.

15 Una recomendación y opinión que surge del Centro de Enfermedades Infecciosas (CEI) es tratar las infecciones de catéter existentes sistemáticamente ya sea con un antibiótico específico o de amplio intervalo. El uso de un antibiótico en una solución de enjuague para prevenir la infección no es recomendado. El uso de antibióticos para tratar infecciones de catéter existentes tiene ciertos riesgos, incluyendo: (1) el riesgo de desarrollar cepas resistentes a antibióticos; (2) la incapacidad del antibiótico para matar bacterias sésiles, o biopelícula de capa profunda, las cuales pueden requerir el uso de antibióticos a concentraciones tóxicas; y (3) el alto costo de terapia de antibiótico prolongada. Están disponibles catéteres revestidos con un material antiséptico o antibiótico. Sin embargo, estos catéteres revestidos solamente pueden proporcionar protección limitada por un período de tiempo relativamente corto.

20 En general, los organismos flotantes libres pueden ser vulnerables a antibióticos. Sin embargo, las bacterias y hongos pueden llegar a ser impermeables a antibióticos agregándose en superficies y produciendo una sustancia protectora viscosa, frecuentemente referida como sustancia polimérica extracelular (SPE) para formar una biopelícula. Cuando los microbios proliferan, pueden ocurrir más de cincuenta regulaciones genéticas arriba o abajo, resultando en la formación de una biopelícula microbiana más resistente a los antibióticos. Dos tercios de las infecciones bacterianas que los médicos encuentran se han atribuido a biopelículas. Netting, *Science News*, 160:28 (2001).

25 La formación de biopelícula es un proceso genéticamente controlado en el ciclo de vida de bacterias que produce numerosos cambios en la fisiología celular del organismo, frecuentemente incluyendo resistencia antibiótica incrementada (de hasta 100 a 1000 veces), cuando se compara con el crecimiento bajo condiciones planctónicas (flotación libre). Cuando los organismos crecen, los problemas con el amontonamiento y disminución de la nutrición activan el esparcimiento de los organismos para buscar nuevas ubicaciones y recursos. Los organismos recientemente esparcidos rápidamente se revierten de nuevo a su fase de flotación libre original y una vez de nuevo son vulnerables a antibióticos. Sin embargo, el organismo flotante libre puede entrar a la corriente sanguínea del paciente, creando infecciones en la corriente sanguínea las cuales producen signos clínicos, por ejemplo, fiebre, y síntomas relacionados con infección más serios. Las balsas sésiles de biopelícula pueden desprenderse y unirse a superficies de tejido, tales como válvulas cardíacas, originando proliferación de biopelícula y serios problemas, tal como endocarditis.

30 En instalaciones industriales, la formación de biopelículas es muy común y generalmente se conoce como bioincrustación. Por ejemplo, el crecimiento de biopelícula en estructuras mecánicas, tales como dispositivos de filtración, es una causa primaria de contaminación biológica de sistemas de distribución de agua potable. La formación de biopelícula en instalaciones industriales puede conducir a degradación de material, contaminación de producto, bloqueo mecánico e impedancia de transferencia de calor en sistemas de procesamiento. La formación de biopelícula y la contaminación resultante también es un problema común en las instalaciones de preparación y procesamiento de alimentos.

35 Para asuntos complicados adicionales, las pruebas de sensibilidad convencionales miden solamente la sensibilidad antibiótica de los organismos flotantes libres, más que los organismos en un estado de biopelícula. Como resultado, se administra una dosis de antibióticos al paciente, tal como a través de un catéter, en cantidades que raramente tienen el efecto deseado en los organismos en fase biopelícula que pueden residir en el catéter. Los organismos de biopelícula pueden continuar esparciendo más organismos planctónicos o pueden quedar latentes y proliferar más tarde como una infección recurrente aparente.

40 Para erradicar los organismos de biopelícula a través del uso de antibióticos, un laboratorio debe determinar la concentración de antibiótico requerida para matar la fase de biopelícula genética específica del organismo. Se requiere equipo altamente especializado para proporcionar la mínima concentración para erradicación de biopelícula. Además, los protocolos de diagnóstico actuales exigen mucho tiempo, y los resultados frecuentemente no están disponibles en

muchos días, por ejemplo, cinco días. Este período de tiempo claramente no permite el tratamiento rápido de infecciones. Este retraso, y la preocupación de infección bien justificada, puede resultar en el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro y procedimientos de reemplazo y eliminación de catéter innecesarios continuos y. El uso excesivo de antibióticos de amplio espectro puede resultar en el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a antibióticos las cuales no se pueden tratar efectivamente. El reemplazo y eliminación de catéter innecesario es doloroso, costoso y puede resultar en trauma y daño al tejido en el sitio de inserción del catéter.

La resistencia a antibiótico de biopelículas, acoplada con complicaciones de uso de antibiótico tal como el riesgo del desarrollo de cepas resistentes a antibióticos, ha hecho al tratamiento con antibiótico una opción poco atractiva. Como resultado, el uso de antibiótico se limita a infecciones sintomáticas y los antibióticos profilácticos no se emplean típicamente para prevenir la contaminación. Debido a que la biopelícula puede actuar como una barrera de resistencia fenotípica selectiva a la mayoría de los antibióticos, el catéter frecuentemente se debe eliminar para erradicar una infección relacionada con el catéter. La eliminación y reemplazo del catéter exige mucho tiempo, estresa al paciente y complica el procedimiento médico. Por lo tanto, existe una necesidad de procedimientos convenientes y efectivos para matar organismos, y especialmente aquellos que viven dentro de catéteres, sin la necesidad de eliminar el catéter del cuerpo.

Además de las infecciones bacterianas y fúngicas, las infecciones amebianas pueden ser muy graves y dolorosas, así como potencialmente mortales. Se ha descubierto que diversas especies de *Acanthamoeba*, por ejemplo, infectan humanos. *Acanthamoeba* se encuentran en el mundo en la tierra y el polvo, y en fuentes de agua dulce así como en agua salobre y agua de mar. Frecuentemente se encuentran en unidades de calefacción, ventilación y aire acondicionado, en humidificadores, unidades de diálisis, y en parafernalia de lentes de contacto. Las infecciones por *Acanthamoeba*, además de infecciones microbianas y fúngicas, también pueden ser comunes en relación con otros dispositivos médicos y dentales, incluyendo cepillos de dientes, dentaduras y otras aplicaciones dentales, y similares. Las infecciones por *Acanthamoeba* frecuentemente resultan del almacenamiento, manejo y desinfección incorrectos de lentes de contacto y otros dispositivos médicos que entran en contacto con el cuerpo humano, donde pueden entrar en la piel a través de un corte, herida, las fosas nasales, los ojos, y similares.

Existen numerosos tipos diferentes de microbios que presentan infecciones problemáticas, incluyendo variedades de bacterias y hongos. Sin embargo, los presentes procedimientos de eliminación de infecciones generalmente emplean soluciones que son efectivas contra un número limitado de diferentes microbios. Root y col. (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32:1627-1633 (1988)) describe el uso *in vitro* de EDTA disódico contra un particular aislado de patógeno *Staphylococcus epidermidia* asociado a catéter.

El EDTA tradicionalmente ha sido útil como quelante metálico y se ha usado, en combinación con otros compuestos activos, para una variedad de propósitos. El EDTA frecuentemente se usa, en concentraciones bajas, como un anticoagulante *in vitro* para prueba y recogida de muestras de sangre y como un sinergista antioxidante, y también se agrega a soluciones, por ejemplo, como quelante, estabilizador o conservador para preparaciones farmacéuticas. El EDTA puede existir en una variedad de formas, algunas de las cuales son formas de sal de sodio, tales como sales de disodio, trisodio y tetrasodio, y otras de las cuales son quelatos de metal tal como hierro, cobre, magnesio, etc. Ciertas formas de EDTA se han utilizado, en conjunto con otras sustancias como adyuvante, en composiciones para tratar catéteres infectados. Cuando se usa en una instalación clínica, o en una composición empleada con humanos o animales, las soluciones generalmente se ajustan a un intervalo de pH fisiológico, o neutro.

Una combinación de un alcohol con un aditivo, tal como una forma de sal sin sodio de EDTA, se describe en la publicación de PCT WO 02/05188. La publicación de PCT WO 00/72906 A1 describe una mezcla liofilizada de un agente antimicrobiano, por ejemplo, un antibiótico, y un segundo agente, que puede ser una forma de sal sin sodio de EDTA, como un agente quelante para lavado a chorro de catéter. En la patente estadounidense n.º 5.688.516, se describen composiciones que tienen un anticoagulante, un agente quelante, tal como EDTA, y un agente antimicrobiano, tal como minociclina, para revestir dispositivos médicos e inhibir la infección de catéter. En ejemplos descritos particulares, una forma disódica de EDTA se hace llegar a un pH fisiológico de 7,4 y se usa en la composición. La publicación de PCT WO 99/09997 describe el tratamiento de infección fúngica con una combinación de un agente antifúngico y un quelante, tal como EDTA.

Otras áreas en las cuales las infecciones presentan un problema incluyen dispositivos médicos y materiales usados en relación con los ojos, tales como lentes de contacto, bucles esclerales, materiales de sutura, lentes intraoculares, y similares. En particular, ha existido énfasis en el desarrollo de procedimientos para desinfectar prótesis oculares, por ejemplo, lentes de contacto. Las biopelículas bacterianas pueden participar en infecciones oculares y permitir que las bacterias persistan en superficies abióticas que entran en contacto con, o se implantan en, los ojos. Las biopelículas también pueden formarse en las superficies bióticas del ojo, Zegans y col., *DNA Cell Biol.*, 21:415-20 (2002). Una forma severa de queratitis también se puede iniciar por una amiba protozoaria la cual puede contaminar fluidos desinfectantes de lentes. Una formulación oftálmica de EDTA tetrasódico y sales alcali, tamponada hasta un pH de 6-8, para la desinfección de lentes de contacto se describe en la patente estadounidense n.º 5.300.296. La patente estadounidense n.º 5.998.488 describe una composición oftálmica de EDTA y otras sustancias, tal como ciclodextrina y ácido bórico.

En el campo dental, los artículos a ser colocados en una boca, tales como herramientas dentales, y dispositivos dentales y ortodónticos tales como retenedores, puentes, dentaduras, y similares, tienen que estar mantenidos en condición estéril, particularmente durante el almacenamiento y previamente a la colocación en la boca. De otra forma, la infección se puede transmitir a la corriente sanguínea y agravarse. La patente estadounidense n.º 6.077.501 describe el uso de EDTA en una composición limpiadora de dentadura con otros componentes activos.

El suministro de agua también es propenso a infecciones microbianas y otros tipos de infecciones. Los dispositivos de almacenamiento de agua, así como conductos de suministro y extracción de agua, se infectan frecuentemente. Las superficies internas de la tubería que transporta fluido en consultorios médicos y dentales presentan un ambiente que es adecuado para el crecimiento e infección microbiana, y la adherencia de microbios y formación de capas de biopelícula altamente protectoras frecuentemente es problemático en dispositivos de almacenamiento y suministro de fluido.

Existe una necesidad de procedimientos y composiciones mejorados para prevenir y destruir las infecciones en una variedad de ambientes. Tales soluciones antisépticas deberían tener un amplio intervalo de propiedades antimicrobianas. En particular, las soluciones deberían ser capaces de penetrar las biopelículas para erradicar los organismos en las biopelículas. Los procedimientos y soluciones deberían ser suficientemente seguros para ser usados como una medida preventiva así como en el tratamiento de infecciones existentes.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona soluciones antisépticas que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, una o más sal(es) de EDTA a un pH que es mayor que el pH fisiológico y a una concentración prescrita. Los inventores han descubierto que ciertas composiciones de EDTA poseen actividades antisépticas potentes y funcionan como agentes antimicrobianos de amplio espectro, así como funcionan como agentes fungicidas contra muchas cepas de levadura patogénica. Las composiciones de EDTA de la presente invención también son altamente efectivas en la aniquilación de organismos de biopelícula patogénicos y en la reducción y eliminación de biopelículas existentes, así como en la prevención de formación de biopelícula. Las combinaciones y composiciones de EDTA de la invención adicionalmente exhiben actividad tanto antiprotozoaria como antiamebiana. Basado en los informes publicados, se espera adicionalmente que las composiciones de EDTA de la presente invención exhiban actividad antiviral.

Las formulaciones de EDTA de la presente invención son seguras para la administración humana, y son biocompatibles y no corrosivas. También pueden tener propiedades anticoagulantes y por consiguiente son útiles para la prevención y/o tratamiento de una variedad de infecciones relacionadas con el catéter. Las soluciones antisépticas de la presente invención tienen numerosas aplicaciones, incluyendo soluciones de enjuague y lavado y enjuague para varios tipos de catéteres, uso como agentes antisépticos o soluciones para desinfectar un intervalo de dispositivos, instrumentos y otros objetos médicos, dentales y veterinarios, superficies, y similares. Además, tienen aplicaciones de desinfección en instalaciones industriales, y en manejo y preparación de alimentos.

Las composiciones antisépticas de la invención se pueden emplear profilácticamente para prevenir la infección, o para reducir y/o eliminar infecciones existentes o establecidas. Se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar la infección de un objeto o superficie con un microorganismo indeseable, tales procedimientos comprenden poner en contacto la superficie u objeto con una composición de la presente invención. Las composiciones de la invención por consiguiente se pueden emplear para inhibir el crecimiento y proliferación de poblaciones microbianas y/o patógenos fúngicos, incluyendo la inhibición de la formación y proliferación de biopelículas; inhibir el crecimiento y proliferación de poblaciones protozoarias; inhibir el crecimiento y proliferación de poblaciones amebianas; y prevenir la infección amebiana, particularmente infecciones por *Acanthamoeba*.

La presente invención también proporciona procedimientos para erradicar sustancialmente las poblaciones microbianas, incluyendo tanto poblaciones microbianas planctónicas como poblaciones microbianas en forma de biopelículas, conjuntamente con procedimiento para erradicar sustancialmente una población de *Acanthamoeba*. Tales procedimientos comprenden poner en contacto un objeto o superficie infectada, o un objeto o superficie sospechosa de estar infectada, con una composición de la presente invención. Dependiendo de la composición antiséptica usada en los diversos procedimientos, se pueden requerir diversos periodos de tiempo de contacto para inhibir la formación y proliferación de varias poblaciones, y/o para erradicar sustancialmente varias poblaciones. Los períodos de tiempo de contacto adecuados para varias composiciones se proporcionan en los ejemplos y también se pueden determinar por experimentación rutinaria.

En una modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención tienen al menos cuatro, y preferiblemente al menos cinco, de las siguientes propiedades: propiedades anticoagulantes; actividad inhibitoria y/o bactericida contra un amplio espectro de bacterias en una forma planctónica; actividad inhibitoria y/o fungicida contra un espectro de patógenos fúngicos; actividad inhibitoria y/o bactericida contra un amplio espectro de bacterias en una forma sétil, o biopelícula; actividad inhibitoria contra infecciones por protozoarios; actividad inhibitoria contra infecciones por *Acanthamoeba*; seguras y biocompatibles, al menos en volúmenes modestos, en contacto con un paciente; seguras y biocompatibles, al menos en volúmenes modestos, en la corriente sanguínea de un paciente; y seguras y compatibles con objetos y superficies industriales.

Las sales solubles de EDTA se usan en las composiciones de la presente invención. Las sales de sodio de EDTA están comúnmente disponibles y generalmente se usan, incluyendo sales de disodio, trisodio y tetrasodio, aunque otras sales de EDTA, incluyendo amonio, diamonio, potasio, dipotasio, disodio cúprico, disodio magnesio, sodio férrico, y combinaciones de las mismas, se pueden usar, siempre que tengan las propiedades antibacterianas, fungicidas, antiprotozoarias y/o antiamebianas deseadas, y que sean suficientemente solubles en el disolvente deseado. Las diversas combinaciones de sales de EDTA se pueden usar y pueden ser preferidas para aplicaciones particulares. De manera importante, en la mayoría de las modalidades, las composiciones y procedimientos de la presente invención no emplean agentes antibióticos tradicionales y por consiguiente no contribuyen al desarrollo de organismos resistentes a antibióticos.

Las composiciones antisépticas de la invención comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en una o más sal(es) de EDTA en solución a un pH mayor que el pH fisiológico. Preferiblemente, tales composiciones tienen un pH de al menos 9,5. Preferiblemente, las composiciones de la invención tienen un pH en el intervalo entre 9,5 y 11,5, o entre 10,5 y 11,5. La sal de EDTA generalmente está presente a una cantidad de al menos el 0,01 % p/v. En modalidades preferidas, las composiciones de la invención comprenden al menos una sal de EDTA en una cantidad del 0, 2% al 10 % p/v, más preferiblemente del 0, 2% al 6,0 % p/v y muy preferiblemente del 0,2 % al 4,0 % p/v.

En modalidades específicas, las composiciones de la invención comprenden, o consisten esencialmente en, un disolvente y al menos una sal de EDTA a una concentración de entre el 0,01 % y el 10 % p/v, en donde la solución tiene un pH de al menos 9,5 y posee actividad bactericida contra un amplio espectro de bacterias. Preferiblemente, la al menos una sal de EDTA es EDTA trisódico o tetrasódico. El disolvente generalmente se selecciona del grupo que consiste en: agua, solución salina, alcoholes y combinaciones de los mismos. En una modalidad, el disolvente es una combinación de agua y etanol.

Las composiciones antisépticas de la invención se pueden emplear como soluciones de enjuague y lavado y enjuague para varios tipos de catéteres de acceso permanentes, incluyendo catéteres vasculares usados para el suministro de fluidos, productos sanguíneos, fármacos y nutrición, extracción de fluidos o sangre, diálisis, supervisión de condiciones del paciente, y similares. Las soluciones antisépticas de la presente invención también se pueden usar como soluciones de enjuague y lavado y enjuague para catéteres urinarios, tubos nasales, tubos para garganta, y similares. Los parámetros de solución generales descritos posteriormente son adecuados para estos propósitos. En una modalidad, una solución antiséptica que comprende, consiste en o consiste esencialmente en una o más sal(es) de EDTA sódico a un pH mayor que el pH fisiológico se emplea para mantener la permeabilidad de dispositivos de acceso intravascular permanentes. Los procedimientos de desinfección de catéteres y otros tubos médicos, tales como tubos nasales, tubos para garganta y similares, también se proporcionan e involucran poner en contacto el catéter u otro tubo médico con una composición desinfectante de la presente invención.

En otra modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención que comprenden, consisten en o consisten esencialmente en una o más sal(es) de sodio de EDTA a un pH mayor que el pH fisiológico se proporcionan como soluciones desinfectantes para dispositivos médicos tales como dentaduras y otros dispositivos dentales, ortodónticos y/o periodontales, para lentes de contacto y otros dispositivos ópticos, para instrumentos médicos y veterinarios, dispositivos y similares, y como soluciones desinfectantes para desinfectar superficies y objetos. También se proporcionan procedimientos de desinfección de tales dispositivos, los procedimientos comprenden poner en contacto un dispositivo con una composición antiséptica de la presente invención. En general, las composiciones antisépticas de la presente invención se pueden usar como soluciones de remojo para dispositivos dentales, ortodónticos y periodontales, incluyendo cepillos de dientes, y también se pueden usar como soluciones de remojo para lentes de contacto y otros dispositivos ópticos, así como instrumentos médicos y veterinarios, dispositivos y similares. Para estas aplicaciones, las composiciones antisépticas de la presente invención generalmente se formulan como soluciones, o se proporcionan en una forma seca la cual, con la adición de un disolvente adecuado, forma una solución.

En todavía otra modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención se formulan para el uso en soluciones, geles, cremas y otras preparaciones designadas para el uso tópico como agentes antisépticos, toallitas, tratamientos antibacterianos y similares. Las composiciones antisépticas de la presente invención también se pueden usar como agentes antibacterianos en relación con vendas, apósitos, agentes de cicatrización de heridas y dispositivos, y similares. En modalidades relacionadas, las cubiertas para el uso en cicatrización de heridas, tales como vendas y apósitos, se proporcionan en donde la cubierta se impregna con una o más de las composiciones de la presente invención.

Las composiciones antisépticas de la presente invención también se pueden emplear en instalaciones industriales tales como sistemas de almacenamiento y distribución de agua, purificación de agua, dispositivos de humidificación y deshumidificación, y en instalaciones de preparación, manejo y envasado de alimentos, para inhibir, reducir o eliminar sustancialmente poblaciones microbianas tanto en formas flotantes libres como sésiles, así como numerosas poblaciones fúngicas, amebianas y protozoarias. Las superficies y equipo industriales se pueden poner en contacto con, lavar a chorro con, o remojar en, composiciones antisépticas de la presente invención. Las formulaciones de composición antiséptica de liberación temporal también se pueden proporcionar para proporcionar el tratamiento con el tiempo, particularmente en ubicaciones que son difíciles de acceder frecuentemente.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1D muestran la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentraciones bactericidas mínimas (CBM) para varios organismos bacterianos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente en: EDTA dipotásico; EDTA diamónico; EDTA disódico; EDTA trisódico; y EDTA tetrasódico, usando el procedimiento de dilución en agar. Los organismos bacterianos se aislaron de infecciones relacionadas con catéter en pacientes humanos. Las técnicas experimentales se describen en el Ejemplo 1.

La figura 2 muestra las concentraciones CIM y CBM para varios organismos fúngicos contra diferentes formulaciones de EDTA, usando el procedimiento de dilución en agar. Las técnicas experimentales se describen en el Ejemplo 1. Los organismos fúngicos se recogieron de muestras de paciente humano.

Las figuras 3A y 3B muestran datos de CIM y CBM para organismos bacterianos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente en: EDTA disódico cúprico; EDTA disódico de magnesio; y EDTA sódico férrico. Los organismos bacterianos se aislaron de infecciones relacionadas con catéter en pacientes humanos. Las técnicas experimentales se describen en el Ejemplo 1.

Las figuras 4A-4C muestran datos de CIM y CBM para varios organismos bacterianos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA en combinación que consisten esencialmente en: EDTA disódico y tetrasódico cúprico; EDTA disódico y dipotásico cúprico; y EDTA disódico y diamónico cúprico. Los organismos bacterianos se aislaron de infecciones relacionadas con catéter en pacientes humanos. Las técnicas experimentales se describen en el Ejemplo 1.

Las figuras 5A-5C muestran datos de CIM y CBM para varios organismos bacterianos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA en combinación que consisten esencialmente en: EDTA tetrasódico y diamónico; EDTA tetrasódico y dipotásico; y EDTA diamónico y dipotásico. Los organismos bacterianos se aislaron de infecciones relacionadas con catéter en pacientes humanos. Las técnicas experimentales se describen en el Ejemplo 1.

La figura 6 muestra los valores de concentración de erradicación de biopelícula mínima (CEBM) para varios organismos, expresados en mg/ml de EDTA tetrasódico (p/v) usando la metodología descrita en el Ejemplo 2.

La figura 7 muestra los resultados experimentales del tratamiento de catéteres de hemodiálisis renal infectados con una composición antiséptica que consiste esencialmente en EDTA tetrasódico a una concentración de 40 mg/ml (p/v).

La figura 8 muestra los resultados experimentales del tratamiento de catéteres de hemodiálisis renal infectados, así como un catéter arterial y uno venoso, con una composición antiséptica que consiste esencialmente en EDTA tetrasódico a una concentración de 20-100 mg/ml (p/v).

Descripción detallada de la invención

El EDTA se usa a bajas concentraciones en muchas composiciones, en combinación con otros componentes activos, como agente estabilizador o conservador. Las composiciones antisépticas de la presente invención generalmente comprenden concentraciones mayores de EDTA y preferiblemente comprenden al menos el 0,01 % de sal(es) de EDTA en peso por volumen de solución (p/v), y pueden comprender hasta el 15 % (p/v) de sal(es) de EDTA. Para muchas aplicaciones, las composiciones antisépticas de la invención preferiblemente comprenden al menos el 0,1 % (p/v) de sal(es) de EDTA y menos del 10 % (p/v) de sal(es) de EDTA, más preferiblemente entre el 0,1 % (p/v) de sal(es) de EDTA y el 8,0 % (p/v) de sal(es) de EDTA, y muy preferiblemente entre el 0,1 % y el 6,0 % de sal(es) de EDTA. Las composiciones ejemplares, descritas posteriormente, comprenden el 3,6-4,4 % (p/v) de sal(es) de EDTA en solución acuosa, o el 0,01-0,2 % (p/v) de sal(es) de EDTA en una mezcla de agua y etanol.

La concentración de sal(es) de EDTA deseada para varias aplicaciones puede depender de la sal de EDTA, o combinación de sales, empleada, el tipo de infección a ser tratada y, hasta cierto punto, del disolvente usado para las composiciones antisépticas. Por ejemplo, cuando se usan disolventes acuosos que comprenden etanol, la concentración de sal(es) de EDTA requerida para proporcionar el nivel deseado de actividad se puede reducir comparado con la concentración de sal(es) de EDTA usada en composiciones que tienen agua como disolvente. Las composiciones antisépticas que comprenden una o más sal(es) de EDTA han demostrado eficacia inhibitoria y/o bactericida a intervalos de concentración del 0,01 % al 30 % o más, como se muestra en los datos ejemplares proporcionados posteriormente. Las concentraciones "efectivas" de sal(es) de EDTA deseadas en las composiciones antisépticas de la presente invención para propósitos inhibidores, bactericidas, fungicidas, de erradicación de biopelícula y otros, se pueden determinar por experimentación rutinaria, como se describe en los ejemplos proporcionados posteriormente.

La Farmacopea Británica (FB) especifica que una solución al 5 % de EDTA disódico tiene un pH de 4,0 a 5,5. La FB también especifica un intervalo de pH de 7,0 a 8,0 para soluciones de EDTA trisódico. Los valores de pH para otras sales de EDTA en solución acuosa se proporcionan en el Ejemplo 10, posteriormente. A pH fisiológico, las sales de sodio de EDTA existen como una combinación de EDTA disódico y trisódico, siendo predominante la sal trisódica de EDTA. En los Estados Unidos, el EDTA "disódico" farmacéutico preparado para inyección generalmente se ha titulado con hidróxido de sodio a un pH de 6,5 a 7,5. A este pH, la solución de EDTA actualmente comprende principalmente EDTA trisódico, con una proporción menor de la sal de disodio. Otras composiciones que comprenden sales de sodio de EDTA que se usan en aplicaciones médicas o del cuidado de la salud generalmente se ajustan a un pH que es sustancialmente fisiológico.

En ciertas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, una sal de EDTA sódico (o una combinación de sales de EDTA sódico) en solución a un pH mayor que fisiológico, preferiblemente a un pH mayor que 9,5, o a un pH mayor que 10. En otras modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, una sal de EDTA sódico (o una combinación de sales de EDTA sódico) en solución a un pH en el intervalo 9,5 y 11,5, o a un pH entre 10,5 y 11,5. Cuando se usa en el presente documento, el término "sal de EDTA" puede referirse a una sal única, tal como sal de disodio, trisodio o tetrasodio, u otra forma de sal de EDTA, o puede referirse a una combinación de tales sales. La composición de sal(es) de EDTA depende tanto de las sales de EDTA usadas para formular la composición, como del pH de la composición. Para composiciones antisépticas de la presente invención que comprenden sal(es) de EDTA sódico a los intervalos de pH deseados (especificados anteriormente), las sales de EDTA sódico están predominantemente presentes tanto en formas de sal de trisodio como tetrasodio.

En una modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, o consisten esencialmente en, una combinación de al menos las sales de trisodio y tetrasodio de EDTA. En otra modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, o consisten esencialmente en, una combinación de al menos las sales de trisodio y tetrasodio de EDTA, en las cuales al menos el 10 % del EDTA en la composición está presente en la forma de sal de tetrasodio. En todavía otras modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, o consisten esencialmente en, una combinación de al menos sales de trisodio y tetrasodio de EDTA, en las cuales al menos el 50 % o al menos el 60 % del EDTA en la composición está presente en la forma de sal de trisodio. En otra modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, o consisten esencialmente en, una combinación de EDTA disódico, trisódico y tetrasódico, en las cuales menos del 10 % del EDTA en la composición está presente en la forma de sal de disodio.

Las composiciones antisépticas que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en sal(es) de EDTA diferentes de, o además de, sales de EDTA sódico tienen diferentes intervalos de pH "efectivos". Los intervalos de pH "efectivos" para sal(es) de EDTA deseadas en composiciones antisépticas de la presente invención para el uso en propósitos inhibidores, bactericidas, fungicidas, de erradicación de biopelícula y otros, se pueden determinar por experimentación rutinaria.

En algunas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención consisten en la(s) sal(es) de EDTA, como se describió anteriormente, y las soluciones antisépticas consisten en sales de EDTA disueltas en un disolvente, generalmente un disolvente acuoso tal como agua o solución salina. En otras modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención consisten esencialmente en la(s) sal(es) de EDTA, como se describió anteriormente, generalmente en un disolvente acuoso tal como agua o solución salina. Las composiciones antisépticas de la presente invención que consisten esencialmente en una sal de EDTA, o una combinación de sales de EDTA, están sustancialmente libres de otras sustancias activas que tienen actividad antimicrobiana y/o antifúngica sustancial. La actividad antimicrobiana y/o antifúngica sustancial, en este contexto, significa la actividad antimicrobiana y/o antifúngica, es decir, al menos el 50 % de la actividad antimicrobiana y/o antifúngica de una composición de sal(es) de EDTA sódico en solución acuosa a una concentración del 4,0 % (p/v) a un pH de 10,5.

En algunas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden sal(es) de EDTA que tienen concentración(es) específicas, a intervalos de pH específicos, y pueden contener materiales, incluyendo componentes activos, además de las sales de EDTA descritas anteriormente. Pueden incorporarse otros componentes antimicrobianos o biocidas en las composiciones antisépticas de la presente invención, aunque el uso de antibióticos y agentes biocidas tradicionales generalmente se desaconseja como consecuencia de las nefastas consecuencias del desarrollo de organismos resistentes a antibióticos y biocidas. En algunas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención que comprenden sal(es) de EDTA a concentración(es) específicas e intervalos de pH, están sustancialmente libres de otras sustancias activas que tienen actividad antimicrobiana y/o antifúngica sustancial.

Otros componentes activos o inactivos también pueden incorporarse en las composiciones antisépticas de la presente invención, siempre que no afecten de manera nociva la actividad y/o estabilidad de la(s) sal(es) de EDTA. Se pueden incorporar agentes proteolíticos en las composiciones antisépticas para algunas aplicaciones. Las composiciones antisépticas formuladas para la aplicación tópica pueden incluir varias cremas, emolientes y composiciones para el cuidado de la piel tal como aloe vera, y similares, por ejemplo. Las composiciones antisépticas de la presente invención proporcionadas en una formulación de solución también pueden comprender otros componentes activos e inactivos, siempre que no interfieran negativamente con la actividad y/o estabilidad de la(s) sal(es) de EDTA.

Las composiciones de la presente invención se pueden usar en una solución o una forma seca. En solución, la(s) sal(es) de EDTA preferiblemente se disuelven en un disolvente, el cual puede comprender una solución acuosa, tal como agua o solución salina, u otra solución biocompatible en la cual son solubles la(s) sal(es) de EDTA. También se pueden usar otros disolventes, incluyendo soluciones alcohólicas. En una modalidad, las composiciones de sal de EDTA de la presente invención se formulan en una mezcla de agua y etanol. Tales soluciones son altamente eficaces y se pueden preparar produciendo una solución madre de sal(es) de EDTA concentrada en agua y luego introduciendo la concentración deseada de etanol. Son adecuadas concentraciones de sal de EDTA de aproximadamente el 0,01 % al 10 %, p/v, y concentraciones de etanol de entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 10 %, v/v, proporcionan composiciones antisépticas efectivas. En algunas modalidades, las concentraciones de sal de EDTA de

aproximadamente 2 mg/ml (0,2 % p/v) en agua con una concentración de etanol de aproximadamente el 1 % (v/v) son altamente efectivas contra un amplio espectro de cepas bacterianas. Cuando se usan sales de EDTA sódico, los intervalos de pH de estas composiciones antisépticas son como se describieron anteriormente. También se pueden emplear disolventes no acuosos biocompatibles, siempre que la(s) sal(es) de EDTA se puedan solubilizar y permanezcan en solución durante el almacenamiento y uso.

Las soluciones de EDTA de la presente invención preferiblemente se proporcionan en una forma estéril y no pirogénica, y se pueden envasar en cualquier forma conveniente. En algunas modalidades, las composiciones de EDTA antisépticas de la presente invención se pueden proporcionar en relación con o como parte de un dispositivo médico, tal como en una jeringa precargada u otro dispositivo médico. Las composiciones se pueden preparar bajo condiciones estériles y asépticas, o se pueden esterilizar después de la preparación y/o envasado usando alguna de una variedad de técnicas de esterilización adecuadas. Se pueden proporcionar viales, jeringas o recipientes de uso único o múltiple de soluciones de EDTA. Los sistemas de la presente invención incluyen tales viales, jeringas o recipientes que contienen soluciones de EDTA de la presente invención.

Las composiciones de la presente invención también se pueden proporcionar en una forma sustancialmente "seca", tal como un revestimiento sustancialmente seco una superficie de tubería o un conducto, o un dispositivo médico o industrial tal como un catéter o conducto, o un recipiente, o similares. Tales formas sustancialmente secas de las composiciones de EDTA de la invención se pueden proporcionar en forma de polvo o liofilizada que se puede reconstituir para formar una solución con la adición de un disolvente. Las formas sustancialmente secas de las composiciones de EDTA se pueden proporcionar alternativamente como un revestimiento, o se pueden incorporar en un gel u otro tipo de portador, o encapsuladas, o envasadas de otra forma, y proporcionarse en una superficie como un revestimiento o en un recipiente. Tales formas sustancialmente secas de las composiciones de EDTA de la invención se formulan de modo que, en presencia de una solución, la composición sustancialmente seca forma una solución de EDTA que tiene la composición y propiedades descritas anteriormente. En ciertas modalidades, se pueden emplear diferentes técnicas de encapsulación o almacenamiento de modo que la liberación por tiempo efectiva del EDTA se realiza en exposición prolongada a las soluciones. En esta modalidad, las soluciones de EDTA sustancialmente secas pueden proporcionar actividad antiséptica durante un periodo de tiempo prolongado y/o en exposiciones múltiples a soluciones.

Las composiciones que comprenden EDTA tienen un perfil de seguridad bien establecido en conexión con el uso médico y administración a humanos. Las dosis hasta 3000 mg de EDTA disódico se infusionan durante 3 horas, diariamente, para el tratamiento de hipercalcemia en humanos y son bien toleradas. Las sales de EDTA también están presentes, en combinación con otros componentes, en muchas soluciones usadas en aplicaciones de salud humana y médica, y se han establecido como seguras para el uso humano, tanto *in vitro* como *in vivo*. Las sales de EDTA están fácilmente disponibles a un costo razonable, y son estables con el tiempo en solución.

La formulación y producción de composiciones antisépticas de la presente invención es generalmente sencilla. En una modalidad, las composiciones antisépticas deseadas de la presente invención se formulan disolviendo al menos una sal de EDTA en un disolvente acuoso, tal como agua purificada, a la concentración deseada y ajustando el pH de la solución de sal de EDTA al pH deseado. En modalidades alternativas, las composiciones antisépticas deseadas de la presente invención se formulan disolviendo al menos una sal de EDTA en un disolvente en el cual la sal de EDTA, o combinación de sales, es soluble para proporcionar una solución de sal de EDTA concentrada y solubilizada. Los componentes o disolventes adicionales pueden añadirse después. Alternativamente, la composición de sal de EDTA solubilizada se puede formular en una forma diferente de una solución, tal como una preparación tópica. La solución antiséptica se puede esterilizar después usando medios convencionales, tal como autoclave, irradiación por UV, filtración, ultrafiltración y/u otros medios. El intervalo de osmolaridad preferido para soluciones de EDTA es de 240-500 mOsm/kg, más preferiblemente de 300-420 mOsm/kg. Las soluciones preferiblemente se formulan usando materiales USP.

Las composiciones antisépticas que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en, sal(es) de tri- o tetrasodio, o una mezcla de las mismas, son preferidas para muchas aplicaciones y se pueden preparar usando sales de sodio de EDTA diferentes de sales de tri- y tetrasodio, tal como EDTA disódico el cual está fácilmente disponible. Las soluciones de EDTA disódico tienen un pH inferior en solución que el intervalo de pH deseado de las composiciones de la presente invención. Sin embargo, en el ajuste de pH al intervalo deseado usando un material de ajuste de pH, tal como hidróxido de sodio, acetato de sodio u otros agentes de ajuste de pH bien conocidos, las soluciones de EDTA preparadas usando sales de disodio se convierten en las composiciones de EDTA de sal de di-, tri- y/o tetrasodio en combinación preferidas de la presente invención. Por consiguiente, diferentes formas y combinaciones de sales de EDTA se pueden usar en la preparación de las composiciones de EDTA de la presente invención, siempre que el pH de la composición se ajuste al intervalo de pH deseado antes de su uso. En una modalidad, las composiciones antisépticas que consisten en una mezcla principalmente de EDTA tri- y tetrasódico se proporcionan disolviendo EDTA disódico en una solución acuosa en una cantidad del 3 %-5 % en una base peso/volumen, y añadiendo hidróxido de sodio en una cantidad suficiente para proporcionar el pH deseado de entre 8,5 y 12,0.

Las composiciones antisépticas de la presente invención que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, al menos una sal de EDTA como se describe anteriormente también son útiles para muchas otras aplicaciones. Las

5 soluciones de EDTA se pueden usar como soluciones antisépticas para remojar, enjuagar, o poner en contacto superficies y objetos médicos, dentales y veterinarios. Las soluciones de EDTA de la presente invención se pueden usar, por ejemplo, para almacenar y/o desinfectar lentes de contacto y otros dispositivos ópticos; para almacenar y/o desinfectar dispositivos dentales tales como dentaduras, puentes, retenedores, cepillos de dientes, y similares; y para almacenar y/o desinfectar dispositivos e instrumentos médicos, dentales y veterinarios. En estas aplicaciones, los dispositivos o superficies se pueden poner en contacto con, o remojar en, soluciones de EDTA de la presente invención durante un tiempo suficiente para eliminar sustancialmente infecciones microbianas y/o fungicidas. Las composiciones de EDTA de la presente invención se pueden usar adicionalmente para desinfectar agua y otras líneas de suministro de fluido. La desinfección de líneas de suministro de fluido se puede realizar lavando a chorro intermitentemente las líneas con composiciones de EDTA de la presente invención. De manera similar, las composiciones de EDTA de la presente invención se pueden usar para erradicar biopelículas, y poblaciones microbianas (incluyendo algunos virus y protozoos) y fúngicas en dispositivos de almacenamiento y suministro de agua.

15 Se han realizado numerosos procedimientos y pruebas experimentales usando composiciones que contienen EDTA de la presente invención para establecer sus propiedades y su eficacia como composiciones antisépticas. Se describen con detalle a continuación diversos procedimientos experimentales. Estos procedimientos y los resultados experimentales se proporcionan solamente para propósitos ilustrativos y no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

20 **Datos de concentración inhibidora mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) para organismos contra diferentes formulaciones de EDTA, usando el procedimiento de dilución en agar**

Las concentraciones inhibidoras mínimas (CIM) y concentraciones bactericidas mínimas (CBM) para varios organismos de levadura y bacterianos gram-positivos y gram-negativos se establecieron para diversas formulaciones diferentes de EDTA usando el procedimiento de dilución en agar descrito posteriormente. También se probaron las CIM y CBM para varios organismos en combinaciones de sal(es) de EDTA.

Los organismos bacterianos gram-positivos y gram-negativos se aislaron de pacientes humanos con infecciones relacionadas con catéter para asegurar que las cepas bacterianas eran activamente patogénicas y eran del tipo común en infecciones bacterianas humanas relacionadas con catéter. Los organismos de levadura se recogieron de pacientes con infecciones septicémicas graves. Los organismos se catalogaron y mantuvieron en el laboratorio de Peter Kite de la Universidad de Leeds.

Se prepararon varias soluciones de sal de EDTA y soluciones de sal de EDTA en combinación disolviendo sales de EDTA grado reactivo relevantes en agua destilada a la concentración (p/v) de sal de EDTA deseada. Se prepararon soluciones de sal de EDTA madres concentradas para cada sal de EDTA o combinación de sal de EDTA y se emplearon para determinar la CIM y CBM para varios organismos. Se prepararon soluciones de EDTA tetra- y trisódico usando las sales de tetra- y trisodio de EDTA antes que usando EDTA disódico y ajustando el pH de la solución para lograr los intervalos de pH deseados. Se esterilizaron las soluciones de sal de EDTA antes de su uso y se almacenaron a 4 °C.

Protocolo del procedimiento de dilución en agar

Producción del agar

- 40 • Colocar 2 litros de agar nutriente en un baño de vapor y dejar por aproximadamente 1 hora (hasta fusión).
- Dejar enfriar el agar a 50 °C.
- Recoger 20 botellas de vidrio estériles (125 ml) y distribuir 100 ml del agar nutriente en cada una. A esto, añadir 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/ml de EDTA tetrasódico (u otra sal de EDTA o combinación de sal de EDTA que se está probando), usando una solución madre a 200 mg/ml.
- 45 • Verter 200 ml de agar en una placa de Petri estéril y dejar sedimentar. Verter 3 placas más. Etiquetar las placas con la concentración de EDTA que contienen. Hacer esto para cada concentración.
- Estas placas pueden almacenarse, hasta que se necesiten, en un refrigerador a 4 °C.

Inoculación de las placas

- 50 • Hacer crecer durante la noche cultivos de 23 organismos gram-positivos y 19 organismos gram-negativos en caldo nutriente.
- Diluir cada cultivo a 10⁶ cfu/ml, usando solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés).
- Usar un inoculador de placa automático para inocular cada placa con 21 organismos.
- Incubar las placas durante la noche a 37 °C.
- Al siguiente día marcar + o - para crecimiento.
- 55 • Usar papel filtro estéril para transferir el crecimiento de las placas iniciales a placas de agar Cled nuevas para determinar las CBM.
- Incubar las placas duplicadas durante la noche a 37 °C.

- Al día siguiente, marcar + o - para crecimiento. Las CIM y CBM se describieron como la concentración más baja en la cual no hubo crecimiento.

Los resultados se muestran en las figuras 1A-5C. Las figuras 1A-1D muestran datos de CIM y CBM (presentados como mg/ml de solución de EDTA, p/v) para muchos organismos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente en: EDTA dipotásico; EDTA diamónico; EDTA disódico; EDTA trisódico y EDTA tetrasódico.

La figura 2 muestra datos de CIM y CBM (presentados como mg/ml de solución de EDTA, p/v) para levaduras contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente en: EDTA tetrasódico; EDTA dipotásico; y EDTA diamónico.

Las figuras 3A y 3B muestran datos de CIM y CBM (presentados como mg/ml de solución de EDTA, p/v) para organismos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente en: EDTA disódico cúprico; EDTA disódico de magnesio y EDTA sódico férrico.

Las figuras 4A-4C muestran datos de CIM y CBM (presentados como mg/ml de solución de EDTA, p/v) para organismos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA en combinación que consisten esencialmente en: EDTA disódico cúprico y tetrasódico; EDTA disódico cúprico y dipotásico; y EDTA disódico cúprico y diamónico.

Las figuras 5A-5C muestran datos de CIM y CBM (presentados como mg/ml de solución de EDTA, p/v) para organismos gram-positivos y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA en combinación que consisten esencialmente en: EDTA tetrasódico y diamónico; EDTA tetrasódico y dipotásico; y EDTA diamónico y dipotásico.

Diversas sales de EDTA y combinaciones de sal de EDTA fueron efectivas en la inhibición y/o eliminación de un amplio espectro de cepas bacterianas a concentraciones razonables. El uso y prueba médica previa han establecido buenos perfiles de biocompatibilidad para el uso de sales de EDTA sódico en humanos y animales, mientras que la biocompatibilidad de otras sales de EDTA todavía no se ha establecido. Las sales de EDTA tetra- y trisódico parecen ser más eficaces contra un amplio espectro de bacterias patogénicas. Además, se han, o podrían fácilmente ser, establecidas para ser biocompatibles para uso humano y veterinario, y son económicas y estables. La sal de EDTA tetrasódico adicionalmente es activa como un anticoagulante y es altamente soluble en solventes acuosos. Basado en estos factores y los experimentos resumidos anteriormente, las sales de EDTA tetra- y trisódico fueron elegidas como los candidatos más prometedores para composiciones antisépticas de la presente invención.

Ejemplo 2

Datos de concentración de erradicación de biopelícula mínima (CEBM) para organismos contra EDTA tetrasódico, usando el procedimiento de dispositivo de Calgary modificado

La formación de biopelícula es un factor importante en la contaminación bacteriana. Una composición antiséptica efectiva preferiblemente tiene la capacidad de reducir la proliferación de biopelícula, o prevenir o inhibir la formación de biopelículas. Por lo tanto, se probó nuestra solución antiséptica de EDTA tetrasódico candidata para determinar si podría prevenir o inhibir la formación de biopelículas. La concentración de erradicación de biopelícula mínima (CEBM) para varios organismos contra EDTA tetrasódico se estableció usando un procedimiento de dispositivo de Calgary modificado. El procedimiento de Calgary se describe en Olsen y col., *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66:86-92 (2002) y en la Patente estadounidense 6.599.714. El procedimiento y resultados se describen posteriormente.

Las soluciones de sal de EDTA tetrasódico se prepararon disolviendo la sal de EDTA tetrasódico grado reactivo en agua destilada a la concentración (p/v) de sal de EDTA deseada. Las soluciones de sal de EDTA tetrasódico madres concentradas se prepararon para determinar la CEBM para varios organismos en una forma sésil, o biopelícula. Las soluciones de EDTA tetrasódico se esterilizaron antes de su uso y se almacenaron a 4 °C.

Procedimiento

Formación de biopelícula:

- Usar 100 ml de caldo Muller Hinton del organismo requerido durante la noche.
- Pipetear 200 µl en todas las cavidades en una bandeja de microtitulación de 96 cavidades. Colocar una tapa con 96 pasadores. Incubar en un agitador orbital durante 24 horas a 37 °C a una velocidad de 200 rpm.

Prueba de susceptibilidad:

- Usar biopelícula formada anteriormente.
- Colocar tapa (con pasadores) en una nueva bandeja de microtitulación de 96 cavidades que contiene 250 µl de concentraciones requeridas de agente de prueba. Incubar durante 1 a 24 horas a 37 °C (no en agitador).
- A intervalos de tiempo de 1, 3, 6 y 24 horas, eliminar 4 pasadores por cada concentración de la tapa insertando un destornillador y desprendiendo el pasador de la cavidad.
- Colocar 3 pasadores para cada concentración en un lavado de 5 ml de PBS e invertir una vez.

- Colocar los tres pasadores en 3 ml de PBS y someter a ultrasonidos durante 15 minutos. Depositar 2 µl sobre placas 3X CLED y esparcir usando una espátula de plástico estéril. Incubar a 37 °C durante la noche. Leer los recuentos de colonia al siguiente día.
- Colocar el pasador suelto restante (para cada concentración) en 600 µl de solución salina formal al 4 % para SEM.

5 Los valores de CEBM para varios organismos, expresados en mg/ml de EDTA tetrasódico (p/v) determinados usando este procedimiento se muestran en la figura 6. Los resultados demuestran que 40 mg/ml de EDTA tetrasódico (4 % p/v) fue una concentración de erradicación de biopelícula efectiva para todas las poblaciones microbianas probadas.

Los datos ejemplares generados por los experimentos de CEBM para varios microorganismos se proporcionan a continuación. El EDTA tetrasódico se utilizó para todos los experimentos, los cuales fueron realizados por triplicado.

10

Tabla 1: Organismo: 250 *E. coli*

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
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

Para 250 *E. Coli*, la CEBM = 10 mg/ml de EDTA tetra-sódico.

Tabla 2: Organismo: J26 *Pseudomonas aeruginosa*

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
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

(continuación)

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
20	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0

Para J26 *Pseudomonas aeruginosa*, la CEBM = < 5 mg/ml de EDTA tetrasódico

Tabla 3: Organismo: 292 *Enterobacter cloacae*

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
0	1,00E+Q6	103704	94444	91241
	1,00E+06	118519	131481	116667
	1,00E+06	107407	100000	131431
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	13786	2840	0	0
	12473	2820	0	0
	14661	2600	0	0

5

Para 292 *Enterabacter cloacae*, la CEBM = < 5 mg/ml de EDTA tetrasódico.

Tabla 4: Organismo: *H. Enterococcus sp.*

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
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

(continuación)

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
20	1480	730	160	0
	1560	379	160	0
	2000	320	140	0

Para *H. Enterococcus* sp., la CEBM = < 5 mg/ml de EDTA tetrasódico.

Tabla 5: Organismo: J22 *Enterobacter cloacae*

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
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

5

Para J22 *Enterobacter cloacae*, la CEBM = 15 mg/ml de EDTA tetrasódico.

Tabla 6: Organismo: R81 *Proteus vulgaris*

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
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

(continuación)

Conc. de EDTA mg/ml	Recuento de colonias/ml después de 1 hora	Recuento de colonias/ml después de 3 horas	Recuento de colonias/ml después de 6 horas	Recuento de colonias/ml después de 24 horas
20	4560	400	1520	0
	4480	320	1280	0
	2820	240	720	0

Para R81 *Proteus vulgaris*, la CEBM = < 5 mg/ml de EDTA tetrasódico

Ejemplo 3

5 Procedimiento de tratamiento de enjuague de catéter *in vitro* en catéteres positivos de paciente

Se desarrolló un procedimiento de tratamiento de enjuague de catéter usando la solución de EDTA tetrasódico candidata 40 mg/ml (4 % p/v) y se utilizó para catéteres de hemodiálisis de paciente de muestra que probaron ser positivos para varias infecciones microbianas. Los catéteres que fueron determinados por tener infecciones microbianas se sometieron a tratamiento de enjuague de catéter usando EDTA tetrasódico, y los recuentos de colonia se tomaron en varios puntos de tiempo. En un primer experimento, todos los catéteres se trataron con una solución de EDTA tetrasódico al 4 % p/v mientras que en un segundo equipo, los catéteres se trataron con soluciones de EDTA tetrasódico a varias concentraciones. Las soluciones de EDTA tetrasódico se prepararon y almacenaron como se describió anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. El procedimiento y resultados se describen a continuación.

Procedimiento:

- 15 • Los catéteres de hemodiálisis renal eliminados por sospecha de infección se seleccionaron, lavando a chorro con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril debajo de cada lumen. El cultivo cuantitativo se realizó usando alícuotas de 1 y 10 μ esparcidas sobre placas de agar sangre y se incubó.
- Los catéteres se almacenaron inicialmente a 4 °C hasta después de la selección y el lumen externo se esterilizó con una toallita con alcohol.
- 20 • Antes de la prueba de tratamiento de enjuague, los catéteres positivos seleccionados se enjuagaron con caldo nutriente usando una jeringa de 5 ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para asegurar la viabilidad de biopelícula y para asegurar la colonización total de todas las superficies endoluminales con el organismo de infección.
- Después de la incubación durante la noche, cada lumen de catéter se lavó a chorro con 5 ml de solución salina estéril y se cortaron dos piezas de 1 cm del extremo distal, cada una se colocó en 1 ml de cloruro de calcio estéril 1M, (para neutralización del agente) una para microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y la otra para cultivo, en recipientes universales estériles.
- 25 • Para el procedimiento de cultivo, el universal se colocó en un baño de sonicación durante 15 min a temperatura ambiente y luego se sometió a vórtice durante 20 segundos.
- 30 • El cultivo cuantitativo se realizó usando alícuotas de 1 μ l y 10 μ l colocadas en placa en placas de agar sangre y esparcidas por medio de varillas en forma de L de plástico estériles, se incubaron a 37 °C durante la noche, y las colonias se contaron al siguiente día.
- El catéter se lavó a chorro y enjuagó con la concentración apropiada de fluido de enjuague de EDTA tetrasódico y se incubó a 37 °C durante 18 horas.
- 35 • A las 3, 6 y 18 horas de incubación se cortaron dos piezas de 1 cm del extremo del catéter y se neutralizaron en 1 ml de solución de cloruro de calcio estéril 1M.
- El procedimiento de recuento cuantitativo se siguió, a cada intervalo de tiempo, como se describió previamente y se retuvo una pieza para SEM.

40 Diecisiete (17) catéteres de hemodiálisis renal infectados se trataron con una composición antiséptica que consiste en EDTA tetrasódico a una concentración de 40 mg/ml (4 % p/v). Los resultados se muestran en la figura 7. Diez catéteres de hemodiálisis renal infectados adicionales, así como un catéter arterial y uno venoso, se trataron con una composición antiséptica que consiste en EDTA tetrasódico a concentraciones de 20-100 mg/ml (2-10 % p/v). Los resultados se muestran en la figura 8.

45 Los resultados demuestran que 40 mg/ml (4 % p/v) de EDTA tetrasódico son eficaces en la aniquilación, o reducción drástica, de la población de la mayoría de los organismos después de un tratamiento de 24 horas. Esta concentración de EDTA tetrasódico es segura para el uso en relación con humanos y otros animales y se considera que es eficaz y, por consiguiente, es una concentración deseada para composiciones antisépticas y procedimientos de la presente invención.

Ejemplo 4**El efecto de EDTA tetrasódico en *Acanthamoeba* y el efecto de *Klebsiella* tratada con EDTA tetrasódico en *Acanthamoeba***

5 Diversas especies de *Acanthamoeba* son capaces de infectar humanos. Las infecciones por *Acanthamoeba* frecuentemente resultan como una consecuencia del almacenamiento no apropiado de lentes de contacto y otros dispositivos médicos que entran en contacto con el cuerpo humano. Las *Acanthamoeba* se alimentan de poblaciones bacterianas y son resistentes a muchos tratamientos. El efecto de EDTA tetrasódico, preparado como se describió anteriormente, en poblaciones de *Acanthamoeba* se probó como sigue. Las composiciones de EDTA tetrasódico también se prepararon usando solución salina de Page y solución salina fisiológica como disolventes. El efecto de *Klebsiella* tratada con EDTA tetrasódico en *Acanthamoeba* también se probó experimentalmente usando el siguiente procedimiento.

El efecto de EDTA tetrasódico en *Acanthamoeba***Procedimiento:**

- 15 • Incubar una placa de agar sangre nueva con *Klebsiella edwardsii* a 37 °C 18 horas antes de la prueba.
- Usar una solución madre de EDTA tetrasódico (100 mg/ml), hacer una concentración de 22 y 44 mg/ml en solución salina de Page.
- Colocar 9 ml de cada concentración en un tubo de ensayo de vidrio estéril. Colocar 9 ml de solución salina de Page estéril en otro tubo de ensayo de vidrio estéril para actuar como un control.
- Hacer una suspensión de *Klebsiella edwardsii* en 6 ml de solución salina de Page estéril. Ajustar a estándar 5 de McFarland.
- 20 • Añadir 1 ml de la suspensión a cada dilución en serie y el control. Debido al factor de dilución de la suspensión de *Klebsiella*, cada concentración ahora estará a 20 y 40 mg/ml. El control aún no contiene EDTA tetrasódico. Repetir todas las concentraciones en solución salina fisiológica.
- Someter a vórtice para mezclar. Cada tubo ahora debería contener una suspensión de *Klebsiella* a 0,5 McFarland.
- 25 • Raspar la superficie de toda la placa de *Acanthamoeba* y suspender en 1,5 ml de solución salina de Page. Someter a vórtice.
- Añadir 200 µl de la suspensión de *Acanthamoeba* a cada dilución en serie y el control.
- Colocar los tubos de prueba en un incubador a 30 °C durante 24 horas.
- Después de la incubación, centrifugar cada universal durante 10 minutos a 3000 rpm.
- 30 • Verter el sobrenadante y resuspender el sedimento.
- Colocar 10 µl por duplicado de cada dilución y el control sobre una placa de agar no nutriente con un tamiz de *Klebsiella*. Cortar una ranura por debajo del centro de cada placa para impedir la migración y colocar 10 µl de la dilución que se prueba en cada lado.
- Marcar cada sitio de inoculación con un rotulador negro.
- 35 • Incubar las placas durante 72 horas a 30 °C.
- Verificar el crecimiento de *Acanthamoeba* por visualización directa de las placas usando un microscopio de luz ocular de aumento X10, empezando en cada sitio de inoculación.

Tabla 7: Crecimiento después de 24 horas de incubación con EDTA tetrasódico

Concentración de EDTA mg/ml en (solución)	Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i>
0 (solución salina de Page)	+++
0 (solución salina de Page)	+++
20 (solución salina de Page)	++
20 (solución salina de Page)	++
40 (solución salina de Page)	-
40 (solución salina de Page)	-
0 (solución salina fisiológica)	+++
0 (solución salina fisiológica)	+++
20 (solución salina fisiológica)	++
20 (solución salina fisiológica)	++
40 (solución salina fisiológica)	-
40 (solución salina fisiológica)	++

Tabla 8: Crecimiento después de 24 horas de incubación con EDTA tetrasódico (repetición)

Concentración de EDTA (mq/ml)	Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i>
0 (solución salina de Page)	+++
0 (solución salina de Page)	+++
20 (solución salina de Page)	++
20 (solución salina de Page)	++ (trofozoitos presentes)
40 (solución salina de Page)	-
40 (solución salina de Page)	. -
0 (solución salina fisiológica)	+++
0 (solución salina fisiológica)	+++
20 (solución salina fisiológica)	-
20 (solución salina fisiológica)	-
40 (solución salina fisiológica)	+++
40 (solución salina fisiológica)	++ (trofozoitos presentes)

Tabla 9: Crecimiento después de 48 horas de incubación con EDTA tetrasódico

Concentración de EDTA (mg/ml)	Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i>
0 (solución salina de Page)	+++ (trofozoitos presentes)
0 (solución salina de Page)	+++ (trofozoitos presentes)
20 (solución salina de Page)	-
20 (solución salina de Page)	~
40 (solución salina de Page)	-
40 (solución salina de Page)	-
0 (solución salina fisiológica)	+++
0 (solución salina fisiológica)	+++
20 (solución salina fisiológica)	-
20 (solución salina fisiológica)	-
40 (solución salina fisiológica)	-
40 (solución salina fisiológica)	-

5 Los resultados demuestran que 20-40 mg/ml (2-4 % p/v) de EDTA tetrasódico en solución salina de Page y fisiológica es efectivo para reducir, o eliminar sustancialmente, poblaciones de *Acanthamoeba* después de 48 horas de exposición. Las composiciones de EDTA tetrasódico preparadas usando agua como disolvente también fueron efectivas (datos no mostrados). Estos resultados indican que las composiciones antisépticas de la presente invención son adecuadas para la aplicación como soluciones de remojo para varios instrumentos y dispositivos médicos, incluyendo lentes de contacto, y dispositivos dentales, ortodónticos y/o periodónticos. Las composiciones antisépticas de la presente invención también son efectivas para eliminar sustancialmente poblaciones de *Acanthamoeba* en otras aplicaciones, incluyendo en sistemas de distribución y almacenamiento de agua dulce y de mar, en unidades de calefacción, ventilación y aire acondicionado, humidificadores, unidades de diálisis, y similares.

15 Las *Acanthamoeba* se alimentan de poblaciones bacterianas. Por lo tanto, se probó si una población bacteriana que se trató con composiciones de EDTA antisépticas de la presente invención podría tener algún efecto sobre *Acanthamoeba* que se alimentan de la población bacteriana tratada.

El efecto de *Klebsiella* tratada con EDTA tetrasódico en *Acanthamoeba***Procedimiento:**

- Incubar una placa de agar de sangre fresca con *Klebsiella edwardsii* a 37 °C 18 horas antes de la prueba.
- 5 • Usar una solución madre de EDTA tetrasódico (100 mg/ml), hacer una concentración de 22 y 44 mg/ml en solución salina de Page.
- Colocar 9 ml de cada concentración en un tubo de ensayo de vidrio estéril. Colocar 9 ml de solución salina de Page estéril en otro tubo de ensayo de vidrio estéril para actuar como un control.
- Hacer una suspensión de *Klebsiella edwardsii* en 6 ml de solución salina de Page estéril. Ajustar a estándar 5 de McFarland.
- 10 • Añadir 1 ml de la suspensión a cada dilución en serie y el control. Debido al factor de dilución de la suspensión de *Klebsiella*, cada concentración ahora estará a 20 y 40 mg/ml. El control aún no contiene EDTA tetrasódico. Repetir todas las concentraciones en solución salina fisiológica.
- Someter a vórtice para mezclar. Cada tubo ahora debería contener una suspensión de *Klebsiella* a 0,5 McFarland.
- Incubar los tubos a 37 °C durante la noche.
- 15 • Al siguiente día, centrifugar los tubos a 300 rpm durante 10 minutos. Verter el sobrenadante; añadir 10 ml de solución salina o solución salina de Page nueva, resuspender y volver a centrifugar. Verter el sobrenadante y resuspender en 1 ml ya sea de solución salina o solución salina de Page.
- Raspar la superficie de toda la placa de *Acanthamoeba* y suspender en 1,5 ml de solución salina de Page. Someter a vórtice.
- 20 • Añadir 200 µl de la suspensión de *Acanthamoeba* a 3 tubos que contienen 9 ml de solución salina y 3 tubos que contienen 3 ml de solución salina de Page. Etiquetar cada tubo como si fueran las concentraciones de EDTA usadas en la incubación con la *Klebsiella*.
- Añadir 1 ml de *Klebsiella* resuspendida al tubo apropiado que contiene *Acanthamoeba*.
- Colocar los tubos de prueba en un incubador a 30 °C durante 24 horas.
- 25 • Establecer otro conjunto de tubos para incubar *Klebsiella* con el EDTA a 37 °C, durante la noche como antes.
- Después de la incubación, centrifugar cada tubo que contiene la *Acanthamoeba* durante 10 minutos a 3000 rpm.
- Verter el sobrenadante y resuspender el sedimento.
- Colocar 10 µl por duplicado de cada dilución y el control sobre una placa de agar no nutriente con un tamiz de *Klebsiella* (no incubada con EDTA). Cortar una ranura por debajo del centro de cada placa para impedir la migración y colocar 10 µl de la dilución que se prueba en cada lado.
- 30 • Marcar cada sitio de inoculación con un rotulador negro.
- Incubar las placas a 30 °C.
- Verificar el crecimiento de *Acanthamoeba* por visualización directa de las placas usando un microscopio de luz ocular de aumento X10, empezando en cada sitio de inoculación.
- 35 • Colocar el resto de la suspensión de *Acanthamoeba* en un conjunto nuevo de tubos que contienen ya sea solución salina nueva o solución salina de Page nueva.
- Lavar y resuspender la *Klebsiella*, que se ha incubado durante la noche con EDTA, como antes y añadir a cada tubo apropiado que contiene la *Acanthamoeba*.
- Incubar los tubos a 30 °C durante la noche.
- 40 • Después de la incubación, centrifugar cada universal durante 10 minutos a 3000 rpm.
- Verter el sobrenadante y resuspender el sedimento.
- Colocar 10 µl por duplicado de cada dilución y el control sobre una placa de agar no nutriente con un tamiz de *Klebsiella* (no incubada con EDTA). Cortar una ranura por debajo del centro de cada placa para impedir la migración y colocar 10 µl de la dilución que se prueba en cada lado.
- 45 • Marcar cada sitio de inoculación con un rotulador negro.
- Incubar las placas a 30 °C.
- Verificar el crecimiento de *Acanthamoeba* por visualización directa de las placas usando un microscopio de luz ocular de aumento X10, empezando en cada sitio de inoculación.

50 **Tabla 10: Crecimiento de *Acanthamoeba* después de 24 horas de incubación con *Klebsiella* (previamente incubada con EDTA)**

Concentración de EDTA (mg/ml)	Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i>
0 (solución salina de Page)	+++
0 (solución salina de Page)	--
20 (solución salina de Page)	++
20 (solución salina de Page)	++
40 (solución salina de Page)	++

(continuación)

Concentración de EDTA (mg/ml)	Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i>
40 (solución salina de Page)	-
0 (solución salina fisiológica)	+++
0 (solución salina fisiológica)	+++
20 (solución salina fisiológica)	++
20 (solución salina fisiológica)	++
40 (solución salina fisiológica)	-
40 (solución salina fisiológica)	-

Tabla 11: Crecimiento de *Acanthamoeba* después de 48 horas de incubación con *Klebsiella* (previamente incubada con EDTA)

Concentración de EDTA (mg/ml)	Crecimiento de <i>Acanthamoeba</i>
0 (solución salina de Page)	+++
0 (solución salina de Page)	+++
20 (solución salina de Page)	+
20 (solución salina de Page)	-
40 (solución salina de Page)	-
40 (solución salina de Page)	-
0 (solución salina fisiológica)	+++
0 (solución salina fisiológica)	+++
20 (solución salina fisiológica)	-
20 (solución salina fisiológica)	-
40 (solución salina fisiológica)	-
40 (solución salina fisiológica)	-

5

Estos resultados demuestran que el crecimiento de *Acanthamoeba* se puede detener y las poblaciones de *Acanthamoeba* se pueden eliminar sustancialmente tratando las poblaciones bacterianas en las cuales se alimentan con composiciones de EDTA antisépticas de la presente invención. Las composiciones de EDTA antisépticas que tienen una concentración de EDTA tetrasódico de 20-40 mg/ml (2-4 % p/v) fueron efectivas. Esto corrobora la utilidad de las composiciones antisépticas de la presente invención para aplicaciones tales como soluciones de remojo para varios dispositivos e instrumentos médicos, incluyendo lentes de contacto y dispositivos dentales/ortodónticos/periodónticos, así como para otras aplicaciones tales como sistemas de almacenamiento y distribución de agua dulce y agua de mar, en unidades de calefacción, ventilación y aire acondicionado, humidificadores, unidades de diálisis, y similares.

10

15 Ejemplo 5

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si las composiciones de EDTA tetrasódico previenen la unión de, y adherencia a, tuberías de silicona de microorganismos. Si se puede prevenir la unión y adherencia a tuberías de silicona de microorganismos, se puede reducir la formación de biopelículas. El protocolo experimental usado y los resultados obtenidos se proporcionan a continuación.

20 Procedimiento:

- Llenar secciones de 1 cm de tuberías de silicona con cera fundida para sellar cada endolumen, endurecer a 4 °C.
- Colocar 4 secciones en 30 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control. Colocar 8 secciones en 30 ml de EDTA tetrasódico al 4 %.
- Después de 30 minutos, colocar las 4 secciones de la PBS y 4 de las secciones del EDTA tetrasódico al 4 % en recipientes limpios en un bloque caliente, y dejar secar.
- Transferir las 4 secciones restantes a 30 ml de PBS estéril para enjuagar, luego dejar secar con aire como antes.
- Una vez secas, colocar todas las 12 secciones en 10⁵ cfu/ml de organismos mezclados (durante la noche cultivos

25

de *Klebsiella pneumoniae* y CNS dejar crecer en caldo nutriente a 37 °C), incubar a 37 °C.

- Después de 30 minutos, eliminar 2 secciones de cada tipo y enjuagar en 2 X 30 ml de PBS estéril. Secar con aire como antes. Usar recipientes de lavados y secado separados para impedir cada tipo de contaminación.
 - Colocar cada sección en 1 ml de PBS en un tubo centrífugo, someter a sonicación en un baño de agua de sonicación durante 15 minutos.
- 5
- Depositar cada tubo, por duplicado, en el inoculador de placa automático, 50 µl en una dilución log.
 - Depositar duplicados de cada tubo diluido 1/10.
 - Incubar las placas a 37 °C durante la noche. Leer el recuento de colonias en un lector de placa automático ProtoCOL. Repetir después de 6 horas.
- 10 Los resultados para las secciones de catéter de control y tratadas con EDTA se muestran a continuación.

Tabla 12

Tipo de sección de catéter	Tiempo de incubación	Número de sección de catéter	Conteo de colonia en NEAT (cfu/ml)	Conteo de colonia en 1/10 (cfu/ml)
Control	30 min	1	240	0
			220	0
Control	30 min	2	280	1
			140	0
Control	6 horas	1	1480	0
			1120	0
Control	6 horas	2	5200	7800
			5467	5800
Secada con aire y EDTA	30 min	1	240	1333
			400	800
Secada con aire y EDTA	30 min	2	267	0
			720	0
Secada con aire y EDTA	6 horas	1	1280	16800
			1120	8800
Secada con aire y EDTA	6 horas	2	2240	21333
			2340	16000
Enjuagada con EDTA	30 min	1	267	0
			379	0
Enjuagada con EDTA	30 min	2	1040	0
			0	0
Enjuagada con EDTA	6 horas	1	1980	9600
			1740	12800
Enjuagada con EDTA	6 horas	2	3600	19000
			3660	8600

Los resultados para la solución EDTA pura resultaron ser más reproducibles, y estos, por lo tanto, se analizaron adicionalmente. Cuando las secciones se colocaron en 1 ml de solución, los recuentos por ml fueron iguales a recuentos por sección.

15

Tabla 13

Tipo de sección de catéter	Recuentos de colonias promedios después de 30 minutos (cfu/sección)	Recuentos de colonias promedios después de 6 horas (cfu/sección)
Control	880	3317
Secada con aire y EDTA	407	1745
Enjuagada con EDTA	421	2745

Tabla 14

Tipo de sección de catéter	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 30 minutos	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 6 horas
Secada con aire y EDTA	53,8 %	47,4 %
Enjuagada con EDTA	52,2 %	17,3 %

Repetido durante 24 horas con *Klebsiella* + CNS:

Tabla 15

Tipo de sección de catéter	Recuentos de colonias promedios después de 30 minutos (cfu/sección)	Recuentos de colonias promedios después de 6 horas (cfu/sección)	Recuentos de colonias promedios después de 24 horas (cfu/sección)
Control	377	9205	105806
Secada con aire y EDTA	273	3720	70370
Enjuagada con EDTA	474	9499	77051

5

Tabla 16

Tipo de sección de catéter	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 30 minutos	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 6 horas	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 24 horas
Secada con aire y EDTA	27,4 %	59,6 %	33,5 %
Enjuagada con EDTA	+25,7 %	+31,9 %	27,2 %
+ Indica incremento en promedio cfu/sección del control			

Resultados para *Pseudomonas aeruginosa*:

Tabla 17

Tipo de sección de catéter	Recuentos de colonias promedios después de 30 minutos (cfu/sección)	Recuento de colonias promedios después de 6 horas (cfu/sección)	Recuento de colonias promedios después de 24 horas (cfu/sección)
Control	6400	341994	1290000
Secada con aire y EDTA	4108	30000	474494
Enjuagada con EDTA	5200	153758	1150000

10

Tabla 18

Tipo de sección de catéter	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 30 minutos	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 6 horas	% de reducción promedio en cfu/sección del control después de 24 horas
Secada con aire y EDTA	35,8	91,2	63,2
Enjuagada con EDTA	18,8	55,0	10,9

Estos resultados demuestran al menos una reducción a corto plazo en poblaciones bacterianas tanto en secciones de catéter secadas por aire como enjuagadas.

5 Ejemplo 6

Valores de CBM alterados cuando EDTA tetrasódico se combina con etanol

Las soluciones que tienen un intervalo de concentraciones de EDTA tetrasódico (0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 y 8 mg/ml, p/v) se formularon con agua y etanol (para lograr las concentraciones de etanol finales de 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 y 40 % en agua) para probar la eficacia de soluciones de EDTA solo, soluciones de alcohol solo, y soluciones de EDTA/alcohol. Las soluciones madre concentradas de EDTA tetrasódico se prepararon en agua destilada y se añadió etanol a las soluciones madre acuosas concentradas para proporcionar la concentración de etanol apropiada.

Procedimiento:

- Cultivar un organismo en caldo nutriente durante la noche a 37 °C.
- Se usan soluciones madre de alcohol y EDTA tetrasódico para rellenar una configuración de rejilla en placas de 96 cavidades (una por cultivo), usando soluciones de EDTA que tienen 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 y 8 mg/ml de concentración de tetrasodio, p/v, en disolventes de alcohol isopropílico que contienen 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 y 40 % de alcohol, v/v, en agua.
- Cada cavidad contiene 150 µl de cada diluyente y 50 µl de organismo a 1×10^8 cfu/ml.
- En periodos de 5 minutos, 6 horas y 24 horas, cada cavidad se cultiva colocando una tapa de 96 pasadores sobre la placa (y en cada cavidad), luego se transfiere la tapa a una placa de 96 cavidades, que contiene 300 µl de caldo nutriente nuevo en cada cavidad. Incubar durante la noche a 37 °C. Incubar cada placa de inóculo a 37 °C durante el periodo de incubación.
- Registrar la turbiedad de cada cavidad después de 24 horas.

Los resultados para varios organismos se muestran a continuación.

Tabla 19

Organismo	CBM de EDTA tetrasódico (mg/ml)	CBM de alcohol (%)	CBM de EDTA tetrasódico (mg/ml) + alcohol (%)
<i>E. coli</i>	3	10	0,5 y 0,5
<i>Proteus sp.</i>	3	10	2 y 1
CNS(I)	8	10	2 y 1
<i>Klebsiella sp.</i>	8	10	1 y 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1	0,1	0,1 y 0,1
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	10	2 y 1
CNS(II)	8	10	0,5 y 0,5

Las soluciones de EDTA tetrasódico en agua fueron más efectivas en la aniquilación de microorganismos probados que en las soluciones de etanol (solo). La combinación EDTA tetrasódico en soluciones de alcohol aniquilaron los microorganismos probados a concentraciones más bajas. La solución de 2 mg/ml (0,2 p/v) de EDTA tetrasódico en 1 % de alcohol proporciona excelentes resultados y tiene un efecto bactericida sobre todos los organismos probados. Esta solución antiséptica es efectiva a concentraciones inferiores de EDTA tetrasódico y etanol que ya sea soluciones de EDTA tetrasódico en agua sola o etanol solo. Además, es económica, segura y cómoda de hacer y usar. Las

composiciones antisépticas de la presente invención para aplicación tópica comprenden así sales de EDTA en un disolvente acuoso mezclado y etanol.

Ejemplo 7

Solubilidad de EDTA tetrasódico en etanol y efecto sobre el pH

5 Se probó la solubilidad de EDTA tetrasódico en etanol, y se midió el pH de varias soluciones de tetrasodio en disolventes de alcohol.

Procedimiento;

- Se pesó EDTA tetra-sódico por duplicados a través del intervalo 10-100 mg en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se añadió 1 ml del 74 % de etanol a cada tubo y se sometió a vórtice durante 30 segundos.
- 10 • Al conjunto duplicado de EDTA tetrasódico pesado se añadieron 0,5 ml de agua destilada estéril y se mezcló por vórtice, seguido por 0,5 ml del 74 % de etanol.
- Cada uno de los tubos de EDTA tetrasódico se probó por pH donde se observó solubilidad.

15 Los resultados experimentales demostraron que el EDTA tetrasódico fue completamente insoluble en una solución del 74 % de etanol. Además, los resultados demostraron que, cuando se disolvió tetrasodio en agua destilada en concentraciones en el intervalo de 10 - 100 mg/ml, p/v, el EDTA tetrasódico permaneció en solución durante la adición de etanol. Una técnica preferida implica así solubilizar sal(es) de EDTA en una primera solución acuosa, y luego añadir etanol u otro disolvente en el cual las sal(es) de EDTA son menos solubles o insolubles. Preparadas de esta forma, se espera que las soluciones de sal de EDTA sean estables con el tiempo. Los valores de pH medidos para varias soluciones fueron como sigue:

74 % etanol, solo	pH 7,8
Agua	pH 7,1
+ 10 mg de EDTA tetrasódico	pH 9,0
+ 20 mg de EDTA tetrasódico	pH 10,8
+ 40 mg de EDTA tetrasódico	pH 11
+ 80 mg de EDTA tetrasódico	pH 11,15
+ 100 mg de EDTA tetrasódico	pH 11,25

20

Ejemplo 8

Efecto de autoclave a 121 °C en soluciones de EDTA tetrasódico

25 Se probó el efecto de autoclave en soluciones de EDTA tetrasódico para determinar si el autoclave podría usarse para esterilizar soluciones de EDTA tetrasódico antes de su uso. El procedimiento usado y los resultados se describen a continuación.

Procedimiento:

- Hacer duplicados de 0, 20, 80 y 100 mg/ml de EDTA tetrasódico en agua estéril y agar nutriente líquido y estéril a 50 °C.
- Dejar un conjunto a temperatura ambiente (no caliente) y someter a autoclave un conjunto (caliente).
- 30 • Al siguiente día, colocar todas las botellas de agar en una caldera de vapor para fundir durante 40 minutos

Medición de zonas de difusión:

- Con un taladracorchos, perforar dos orificios en 16 placas de agar de sangre fresca.
- Hacer una suspensión de 0,5 McFarland de CNS y esparcir usando un hisopo estéril sobre las placas para crear un tamiz.
- 35 • Pipetear 150 µl de cada una de las soluciones de tetrasodio en duplicados perforando orificios e incubar a 37 °C durante la noche.
- Al día siguiente, medir las zonas de difusión y registrar los resultados.

40 Los resultados, medidos en tamaños de zona (mm), se presentan a continuación. Los tamaños de zona de los controles se graficaron contra la concentración, para permitir la determinación de concentraciones de EDTA reales en las muestras de prueba, las cuales también se presentan a continuación. Estos resultados demuestran que el sometimiento a autoclave de composiciones de EDTA tetrasódico, tanto en agua estéril como en agar, no afecta materialmente la actividad antimicrobiana de las composiciones de EDTA tetrasódico.

Tabla 20: Tamaños de zona en mm

Concentración de EDTA mg/ml	EDTA en agua estéril (control)	EDTA en agua estéril de autoclave	EDTA en agar	EDTA en agar de autoclave
0	0	0	0	0
20	13,2	11,6	13,5	12,7
80	16,1	15,2	17,2	15,3
100	17,1	17,0	17,1	16,4

Tabla 21: Concentración real de EDTA

Concentración de EDTA inicial mg/ml	EDTA en agua estéril (control)	EDTA en agua estéril de autoclave	EDTA en agar	EDTA en agar de autoclave
0	0	0	0	0
20	20	16	26	19
80	80	60	101	62
100	100	98	100	83

5 Ejemplo 9

Efecto de sometimiento a autoclave a 121 °C en formulaciones diferentes de EDTA

Se probó el efecto de sometimiento a autoclave en diferentes formulaciones de soluciones de EDTA para determinar si el sometimiento a autoclave podría usarse para esterilizar varias soluciones de EDTA antes de su uso. El procedimiento usado y los resultados se describen a continuación.

10 Procedimiento:

Elaboración del agar

- Colocar 50 ml de solución de agar nutriente en botellas de vidrio estériles de 7 X 100 ml.
- No añadir polvo de EDTA a la primera botella (etiquetada con 0)
- Añadir 2000 mg de polvo de EDTA a la segunda botella (etiquetada con 40 mg/ml auto)
- 15 • Añadir 4000 mg de polvo de EDTA a la tercera botella (etiquetada con 80 mg/mg auto)
- Añadir 5000 mg de polvo de EDTA a la cuarta botella (etiquetada con 100 mg/ml auto)
- No añadir EDTA a las botellas cinco, seis y siete (pero etiquetarlas con 40, 80 y 100 mg/ml SIN autoclave), dejar a temperatura ambiente,
- 20 • Hacer esto para cada formulación de EDTA para probar, y someter a autoclave a todas las botellas, indicador auto, a 121 °C durante 20 minutos.
- Al siguiente día, colocar todas las botellas en un baño de vapor para fundir el agar para verter.
- Una vez fundido, dejar enfriar a 50 °C antes de añadir la cantidad apropiada de EDTA a las botellas etiquetadas SIN autoclave. Todas las botellas están ahora listas para probarse.

Medición de las zonas de difusión

- 25 • Usar un taladracorchos, perforar 2 orificios en 7 placas de agar de sangre fresca.
- Hacer una suspensión de 0,5 McFarland de CNS y esparcir usando un hisopo estéril sobre las placas para crear un tamiz.
- Pipetear 150 µl de cada botella en 2 "orificios perforados" separados e incubar a 37 °C durante la noche.
- Hacer para cada formulación de EDTA.
- 30 • Al siguiente día, medir las zonas de difusión y registrar resultados. Se usaron orificios duplicados y se realizaron 2 mediciones por zona.

Las soluciones de EDTA cúprico y férrico no produjeron ninguna zona. El efecto de calor en estas soluciones, por lo tanto, no puede medirse usando este procedimiento. Los tamaños de zona medidos para soluciones de EDTA diamónico, EDTA dipotásico y EDTA de magnesio se proporcionan a continuación. Los tamaños de zona de los controles (sin calor) se graficaron contra la concentración para permitir la determinación de concentraciones de EDTA reales en las muestras de prueba (calientes), y los resultados se proporcionan a continuación.

5

Tabla 21: Tamaños de zonas (mm)

Concentración de EDTA (mg/ml)	EDTA diamónico no caliente	EDTA diamónico caliente	EDTA dipotásico no caliente	EDTA dipotásico caliente	EDTA de magnesio no caliente	EDTA de magnesio caliente
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

Tabla 22: Valores reales de EDTA de autoclave

Concentración de EDTA mg/ml	EDTA di-amónico caliente	EDTA dipotásico caliente	EDTA de magnesio caliente
0	0	0	0
40	39	38	>140
80	80	71	>140
100	150	>140	>140

10 Los resultados demuestran que el sometimiento a autoclave no disminuyó la eficacia de la mayoría de composiciones de sal de EDTA. El sometimiento a autoclave de composiciones antisépticas de la presente invención se puede realizar, por lo tanto, tras la preparación para proporcionar composiciones antisépticas estériles.

Ejemplo 10

Valores de pH de sales de EDTA, cloruro de calcio y citrato de sodio

15 Se midieron los valores de pH de varias soluciones de sal de EDTA, cloruro de calcio y citrato de sodio, usando agua destilada como disolvente y a concentraciones específicas. Los resultados se muestran a continuación.

EDTA libre de ácido al 10 %	pH 4,7
EDTA diamónico al 10 %	pH 4,38
EDTA de calcio y sodio al 10 %	pH 6,68
EDTA di-potásico al 10 %	pH 4,5
EDTA de cobre al 10 %	pH 6,15
EDTA tetra-sódico al 10 %	pH 11,6

(continuación)

EDTA tetra-sódico al 2 %	pH 11
TS EDTA neutralizado de cloruro de calcio	pH 7,3
Cloruro de calcio, 1 molar	pH 3,8
Citrato de sodio al 50 %, 25 %	pH 8,5

Ejemplo 11

Confirmación de las propiedades anticoagulantes de soluciones de EDTA

5 Las propiedades anticoagulantes de soluciones de EDTA se verificaron usando el siguiente procedimiento.

Procedimiento:

- 100 µl de alícuotas de un intervalo de concentraciones (0,5-100 mg/ml) de soluciones de EDTA tetrasódico o disódico, ajustadas a un pH de 11,0-11,6, se colocaron en tubos tapados con plástico.
- 900 µ de sangre fresca de voluntarios sanos se añadieron a cada alícuota de solución de EDTA y se mezclaron ligeramente por inversión de los tubos de sangre a intervalos regulares.

10 Los resultados revelaron que los tubos de control que contienen sangre sin solución de EDTA tuvieron tiempos de coagulación de 10-23 minutos. Todos los tubos que contienen soluciones de EDTA disódico tuvieron tiempos de coagulación por encima de 5 días. Los tubos de EDTA tetrasódico que tienen una concentración mayor que 1 mg/ml tuvieron tiempos de coagulación por encima de 5 días. Los tubos de EDTA tetrasódico que tienen una concentración de 0,5 mg/ml coagularon en 28 minutos. Por lo tanto, el EDTA tetrasódico es efectivo como anticoagulante a

15 concentraciones por encima de 1 mg/ml (1 % p/v).

Ejemplo 12

Osmolaridad de suspensiones de sal de tetrasodio

20 Se probó la osmolaridad y lisis de glóbulos rojos de soluciones de EDTA tetrasódico en agua y solución salina fisiológica que tiene varias concentraciones usando técnicas de laboratorio estándar. La lisis de los glóbulos rojos se probó añadiendo 50 µl de sangre de EDTA en 2 ml de cada concentración de cada solución durante 2 horas. El intervalo de osmolaridad de plasma fue de 275-295 m/osmol.

Tabla 23

	Osmolaridad(m/osmol)	Lisis de glóbulos rojos
2 % EDTA tetrasódico en agua dest.	142	++
4 % EDTA tetrasódico en agua dest.	277	+
2 % EDTA tetrasódico en sol. salina fisiológica	219	+ /-
4 % EDTA tetrasódico en sol. salina fisiológica	588	-

25 Ejemplo 13

Eficacia de tres sales de EDTA en la disolución de cristales de orina artificial (COA)

Un problema con catéteres urinarios es que los cristales de orina tienden a acumularse en la superficie del catéter. El depósito de cristales de orina pueden promover la colonización microbiana y/o la formación de biopelículas, así como también reducir el flujo a través del catéter. Por lo tanto, podría ser deseable usar una composición desinfectante en

30 relación con catéteres urinarios que reduzca la formación de cristales de orina. Se probó la eficacia de tres soluciones de sal de EDTA en la disolución de cristales de orina artificial usando el procedimiento descrito a continuación.

Materiales:

- Orina artificial en recipiente universal de plástico de 25 ml con ureasa, incubada a 45 °C durante 7 días.
- Soluciones de EDTA diamónico, dipotásico y tetrasódico a 100 mg/ml.

35 Procedimiento:

- Centrifugar cristales de orina artificial a 4000 rpm durante 2 minutos.
- Decantar el sobrenadante y lavar los cristales en agua seguido de centrifugación.
- Resuspender los cristales a 1 ml en agua y alícuota de 200 µl en cuatro recipientes universales.

ES 2 565 511 T3

- Añadir 4 ml de solución de 100 mg/ml de cada sal de EDTA y agua como control a cada recipiente universal a temperatura ambiente.
- Después de 1, 2 y 3 horas, observar visualmente la disolución de cristales comparado con el control.

5 Los resultados se muestran a continuación. Todas las soluciones de sal de EDTA reducen el depósito de cristales de orina comparado con una solución acuosa. Por lo tanto, las soluciones de sal de EDTA son adecuadas para uso con catéteres urinarios.

Tabla 24

Solución	Depósito de cristales
Agua + COA	+++++
EDTA tetrasódico + COA	++
EDTA diamónico + COA	+
EDTA dipotásico + COA	+/-

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición antiséptica que comprende al menos una sal de ácido etilendiamin tetraacético (EDTA) en solución, en la que al menos una sal de EDTA comprende al menos un EDTA trisódico y tetrasódico a una concentración de al menos el 0,01 % (p/v) y menos del 15 % (p/v), en la que la composición antiséptica tiene un efecto antimicrobiano contra un amplio espectro de microbios, en la que la composición antiséptica tiene un pH de al menos 9,5, y en la que la composición antiséptica está empaquetada y en forma estéril no pirogénica.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición tiene un pH entre 10,5 y 11,5.
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos una sal de EDTA está presente a una concentración del 0,2 % p/v al 10,0 % p/v.
- 10 4. Composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que al menos una sal de EDTA está presente a una concentración del 0,2 % p/v al 6,0 % p/v.
5. Composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que al menos una sal de EDTA está presente a una concentración del 0,2 % p/v al 4,0 % p/v.
- 15 6. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la solución se selecciona del grupo que consiste en agua, solución salina, alcoholes y combinaciones de los mismos.
7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la solución es una combinación de agua y etanol.
8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la solución comprende etanol en una cantidad del 0,1 % al 10 % p/v.
- 20 9. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición posee actividad bactericida contra bacterias en formas planctónicas y en formas sésiles.
10. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición adicionalmente posee al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) actividad anticoagulante;
 - (b) actividad fungicida contra patógenos fúngicos;
 - 25 (c) actividad inhibidora contra infecciones por protozoos;
 - (d) actividad inhibidora contra infecciones amebianas.
11. Formulación de liberación con el tiempo de la composición de acuerdo con la reivindicación 1 que proporciona actividad antiséptica durante un periodo de tiempo prolongado.
- 30 12. Composición de enjuague por descarga que comprende al menos una sal de ácido etilendiamin tetraacético (EDTA) en solución, en la que al menos una sal de EDTA comprende al menos un EDTA trisódico y tetrasódico a una concentración de al menos el 0,01 % (p/v) y menor del 15 % (p/v), en la que la composición de enjuague por descarga tiene un pH de al menos 9,5, en la que la composición de enjuague por descarga está empaquetada y en forma estéril no pirogénica, y en la que la composición de enjuague por descarga es biocompatible para el uso en catéteres de acceso permanente, catéteres urinarios, tubos nasales y tubos de garganta.
- 35 13. Procedimiento no terapéutico para inhibir el crecimiento y proliferación de una población de al menos un microorganismo no deseable en una superficie o sobre o dentro de un objeto, que comprende poner en contacto la superficie u objeto con una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 40 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el microorganismo no deseable está seleccionado del grupo que consiste en: poblaciones microbianas, patógenos fúngicos, poblaciones protozoarias y poblaciones amebianas.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el microorganismo no deseable es *Acanthamoeba*.
- 45 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la superficie u objeto está seleccionado del grupo que consiste en: catéteres, conductos y tubos médicos, instrumentos médicos y veterinarios, lentes de contacto, dispositivos dentales, ortodónticos y periodontales, instalaciones de almacenamiento, distribución y tratamiento de agua; equipamiento industrial; y equipamiento de preparación y procesamiento de alimentos.
17. Procedimiento no terapéutico para inhibir el crecimiento y proliferación de una biopelícula, comprendiendo la puesta en contacto de la biopelícula con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
18. Cubierta para su uso en cicatrización de heridas, en la que la cubierta está impregnada con una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 50 19. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 que además incorpora un agente proteolítico.

FIGURA 1A

ID del organismo	EDTA dipotásico		EDTA diamónico		EDTA disódico		EDTA trisódico		EDTA tetrasódico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
S24 <i>Staph. epidermidis</i>	<0,5	8	<0,5	4	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
31 <i>Staph. epidermidis</i>	<0,5	8	<0,5	8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
301 <i>Staph. xyloso</i>	<0,5	6	<0,5	4	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	20
300 <i>Staph. capitis</i>	<0,5	10	<0,5	8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	10
J46 <i>Staph. lentus</i>	<0,5	10	<0,5	10	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
S24 <i>Staph. capitis</i>	<0,5	8	<0,5	10	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
R8 <i>Staph. simulans</i>	<0,5	8	<0,5	10	<0,5	1	<0,5	1,5	<0,5	1
72 <i>S. aureus</i>	1	6	1	6	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
R57 <i>S. aureus</i>	1	8	1	10	<0,5	10	<0,5	<0,5	<0,5	8
R13 <i>S. aureus</i>	1	6	1	15	<0,5	10	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
R30 <i>S. aureus</i>	1	8	1	15	<0,5	10	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
8 <i>S. aureus</i>	1	8	1	10	<0,5	<0,5	<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

FIGURA 1B

ID del organismo	EDTA dipotásico		EDTA diamónico		EDTA disódico		EDTA trisódico		EDTA tetrasódico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
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
R8VRE	<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	---	---	---	---	---	---

FIGURA 1C

ID del organismo	EDTA dipotásico		EDTA diamónico		EDTA disódico		EDTA trisódico		EDTA tetrasódico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
137 <i>E. coli</i>	1	15	4	>10	4	60	4	10	2	2
292 <i>Ent. cloacae</i>	4	15	4	>10	4	>100	20	20	6	15
190 <i>Ent. cloacae</i>	4	>15	4	>10	4	100	20	20	6	15
J22 <i>Ent. cloacae</i>	6	>15	<0,5	>10	6	>100	20	20	6	10
R4 <i>Steno. maltophilia</i>	<0,5	10	1	>10	---	---	---	---	---	---
B/C <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	>15	1	>10	---	---	---	---	---	---
J20 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	>15	1	>10	<0,5	50	4	20	2	4
J26 <i>Pseudomonas sp.</i>	1	15	<0,5	>10	<0,5	25	4	60	8	4
R75 <i>Coryne. amycolatum</i>	<0,5	<0,5	<0,5	1	NG	NG	NG	NG	<0,5	20
R23 <i>Coryne. striat/amy</i>	<0,5	<0,5	<0,5	1	NG	NG	NG	NG	<0,5	<0,5
177 <i>Acinetobacter baumannii</i>	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
J44 <i>Acinetobacter baumannii</i>	<0,5	60-70	<0,5	>10	<0,5	1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

FIGURA 1D

ID del organismo	EDTA dipotásico		EDTA diamónico		EDTA disódico		EDTA trisódico		EDTA tetrasódico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
R16 <i>Proteus mirabilis</i>	<0,5	>15,	<0,5	>10	<0,5	50	<0,5	40	<0,5	15
R81 <i>Proteus vulgaris</i>	1	>15	<0,5	>10	<0,5	15	<0,5	40	<0,5	8
R26 <i>Proteus mirabilis</i>	<0,5	15	<0,5	>10	<0,5	50	<0,5	60	1	15

FIGURA 2

ID del organismo	Tetrasodio CIM	Tetrasodio CBM	Dipotasio CIM	Dipotasio CBM	Diamonio CIM	Diamonio CBM
J96 <i>Candida albicans</i>	0,5	15	0,5	>100	0,5	>100
J92 <i>Candida albicans</i>	0,5	15	0,5	>100	0,5	>100
<i>Myc. Candida albicans</i>	0,5	0,5	0,5	>100	0,5	>100
198 <i>Candida lucifaniae</i>	0,5	6	0,5	>100	0,5	>100
<i>Myc. Candida tropicalis</i>	0,5	10	1	>100	1	100
<i>Myc. Candida Guilliermondii</i>	0,5	0,5	0,5	>100	0,5	>100
<i>Myc. Candida glabrata</i>	0,5	2	0,5	>100	0,5	90
<i>Myc. Candida parapsilosis</i>	0,5	8	0,5	>100	0,5	100
J96 <i>Candida glabrata</i>	0,5	8	0	100	0,5	>100

FIGURA 3A

ID del organismo	EDTA disódico cúprico		EDTA disódico de magnesio		EDTA sódico férrico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
S24 <i>Staph. epidermidis</i>	<0,5	<0,5	6	30	>20	>30
31 <i>Staph. epidermidis</i>	<0,5	<0,5	6	30	>20	>30
301 <i>Staph. xylosus</i>	<0,5	<0,5	2	>30	>20	>30
300 <i>Staph. capitis</i>	<0,5	<0,5	1,5	>30	>20	>30
J46 <i>Staph. lentus</i>	<0,5	<0,5	6	>30	>20	>30
S24 <i>Staph. capitis</i>	<0,5	<0,5	6	>30	>20	>30
R8 <i>Staph. simulans</i>	<0,5	<0,5	1,5	>30	>20	>30
72 <i>S. aureus</i>	<0,5	<0,5	>30	>30	>20	>30
R57 <i>S. aureus</i>	<0,5	<0,5	>30	>30	>20	>30
R13 <i>S. aureus</i>	<0,5	<0,5	>30	>30	>20	>30
R30 <i>S. aureus</i>	<0,5	<0,5	>30	>30	>20	>30
8 <i>S. aureus</i>	<0,5	<0,5	>30	>30	>20	>30
R64 MRSA	<0,5	<0,5	>30	>30	>20	>30
R51 MRS A	<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
J67MRSA	<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 <i>Enterococcus faecium</i>	<0,5	<0,5	1,5	>30	4	>30
S76 <i>Enterococcus faecalis</i>	<0,5	<0,5	>30	>30	4	>30
68 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>30	>30	>30	>30	>15	>15
R51 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>30	>30	>30	>30	15	>15

FIGURA 3B

ID del organismo	EDTA disódico cúprico		EDTA disódico de magnesio		EDTA sódico férrico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
128 <i>Klebsiella oxyfoca</i>	>30	>30	>30	>30	>15	>15
J7 <i>Klebsiella omitholytica</i>	>30	>30	>30	>30	15	>15
250 <i>E. coli</i>	>30	>30	>30	>30	15	>15
B/C <i>E. coli</i>	6	>30	>30	>30	>15	>15
137 <i>E. coli</i>	>30	>30	>30	>30	>15	>15
292 <i>Ent. cloacae</i>	>30	>30	>30	>30	>15	>15
190 <i>Ent. cloacae</i>	>30	>30	>30	>30	>15	>15
J22 <i>Ent. cloacae</i>	6	8	>30	>30	>15	>15
R4 <i>Steno. maltophilia</i>	6	>30	>30	>30	10	>15
B/C <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>30	>30	>30	>30	15	>15
J20 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>30	>30	>30	>30	15	>15
J26 <i>Pseudomonas sp.</i>	>30	>30,	>30	>30	15	>15
R75 <i>Coryne. amycolatum</i>	<0,5	<0,5	<0,5	4	10	10
R23 <i>Coryne. strait/amy</i>	<0,5	<0,5	<0,5	4	10	10
177 <i>Acinetobacter baumannii</i>	<0,5	<0,5,	<0,5	<0,5	6	10
J44 <i>Acinetobacter baumannii</i>	6	15	>30	>30	>15	>15
R16 <i>Proteus mirabilis</i>	6	>30	>30	>30	>15	>15
R81 <i>Proteus vulgaris</i>	>30	>30	>30	,30	>15	>15
R26 <i>Proteus mirabilis</i>	6	>30	>30	>30	>15	>15

FIGURA 4A

ID del organismo	EDTA disódico cúprico + tetrasódico		EDTA disódico cúprico + dipotásico		EDTA disódico cúprico + diamónico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
S24 <i>Staph. epidermidis</i>	0,25	2	0,25	15	0,5	20
31 <i>Staph. epidermidis</i>	0,25	8	0,25	20	0,5	20
301 <i>Staph. xylosum</i>	<0,1	>20	<0,1	>20	<0,1	20
300 <i>Staph. capitis</i>	<0,1	>20	<0,1	20	<0,1	20,
J46 <i>Staph. lentus</i>	0,25	6	0,25	15	0,5	20
S24 <i>Staph. capitis</i>	0,25	8	0,25	20	0,5	20
R8 <i>Staph. simulans</i>	0,25	>20	1	>20	1	20
72 <i>S. aureus</i>	<0,1	>20	<0,1	>20	<0,1	20
R57 <i>S. aureus</i>	<0,1	>20	<0,1	20	<0,1	20
R13 <i>S. aureus</i>	<0,1	>20	<0,1	20	<0,1	>20
R30 <i>S. aureus</i>	<0,1	15	<0,1	20	<0,1	>20
8 <i>S. aureus</i>	<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

FIGURA 4B

ID del organismo	EDTA disódico cúprico + tetrasódico		EDTA disódico cúprico + dipotásico		EDTA disódico cúprico + diamónico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
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
R8VRE	0,25	20	0,25	20	0,5	>20
Woods VRE	0,25	>20	<0,1	20	<0,1	>20
S77 <i>Enterococcus faecium</i>	0,5	>20	0,5	>20	1	>20
S76 <i>Enterococcus faecalis</i>	0,25	>20	<0,1	>20	<0,1	>20
68 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	>20	6	>20	2	>20
R51 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	>20	4	>20	2	>20
128 <i>Klebsiella oxytoca</i>	4	>20	2	>20	2	>20
J7 <i>Klebsiella ornitholytica</i>	6	>20	2	>20	2	>20
250 <i>E. coli</i>	6	15	2	>20	2	>20
B/C <i>E. coli</i>	6	1	2	>20	2	>20
137 <i>E. coli</i>	6	4	2	>20	2	>20
292 <i>Ent. cloacae</i>	20	>20	8	>20	8	>20

FIGURA 4C

ID del organismo	EDTA disódico cúprico + tetrasódico		EDTA disódico cúprico + dipotásico		EDTA disódico cúprico + diamónico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
190 <i>Ent. cloacae</i>	20	>20	8	>20	6	>20
J22 <i>Ent. cloacae</i>	20	>20	8	>20	6	>20
R4 <i>Steno. malfophilia</i>	6	10	1	>20	1	>20
B/C <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	10	2	>20	2	>20
J20 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	15	2	>20	2	>20
J26 <i>Pseudomonas sp.</i>	6	>20	2	>20	2	>20
R75 <i>Coryne. amycolatum</i>	<0,1	<0,1	0,25	0,25	0,25	0,25
R23 <i>Coryne. strait/amy</i>	6	10	1	>20	1	>20
177 <i>Acineto-bacter baumannii</i>	6	0,5	0,5	0,25	0,25	<0,1
J44 <i>A. baumannii</i>	6	>20	2	>20	1	>20
R16 <i>Proteus mirabilis</i>	6	>20	2	>20	1	>20
R81 <i>Proteus vulgaris</i>	6	>20	2	>20	2	>20
R26 <i>Proteus mirabilis</i>	6	>20	2	>20	1	>20

FIGURA 5A

ID del organismo	EDTA diamónico + tetrasódico		EDTA dipotásico + tetrasódico		EDTA dipotásico + diamónico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
S24 <i>Staph. epidermidis</i>	0,5	>20	1	20	0,5	>8
31 <i>Staph. epidermidis</i>	0,5	>20	1	6	0,5	>8
301 <i>Staph. xylosus</i>	0,5	>20	1	>20	0,5	>8
300 <i>Staph. capitis</i>	0,5	>20	1	>20	0,5	8
J46 <i>Staph. lentus</i>	0,5	>20	0,5	8	0,5	>8
S24 <i>Staph. capitis</i>	0,5	>20	0,5	8	0,5	>8
R8 <i>Staph. simulans</i>	0,5	>20	0,5	>20	0,5	>8
72 <i>S. aureus</i>	1'	>20	0,5	20	0,5	8
R57 <i>S. aureus</i>	1	>20	1	20	1	>8
R13 <i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0
R30 <i>S. aureus</i>	1	4	1	4	1	8
8 <i>S. aureus</i>	1	>20	1	20	1	8
R64 MRSA	1	>20	1	20	1	>8
R51 MRSA	1	>20	1	20	0,5	>8

FIGURA 5B

ID del organismo	EDTA diamónico + tetrasódico		EDTA dipotásico + tetrasódico		EDTA dipotásico + diamónico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
R92 MRSA	1	>20	1	>20	1	>8
S93 MRSA	1	>20	1	20	1	8
J67 MRSA	1	>20	1	>20	1	8
R8VRE	1	>20	1	>20	1	>8
Woods VRE	1	>20	1	>20	1	>8
S77 <i>Enterococcus faecium</i>	0,5	>20	1	>20	1	>8
S76 <i>Enterococcus faecalis</i>	1	>20	1	>20	1	>8
68 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>20	>20	>20	>20	10	>10
R51 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	>20	1	>20	1	>10
128 <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	>20	1	>20	1	>10
J7 <i>Klebsiella ornitholytica</i>	>20	>20	20	>20	10	>10
250 <i>E. coli</i>	>20	>20	20	>20	2	>10
B/C <i>E. coli</i>	1	0,5	1	1	0,5	>10
137 <i>E. coli</i>	4	>20	20	>20	1	>10
292 <i>Ent. cloacae</i>	8	>20	>20	>20	4	>10

FIGURA 5C

ID del organismo	EDTA diamónico + tetrasódico		EDTA dipotásico + tetrasódico		EDTA dipotásico + tetrasódico		EDTA dipotásico + diamónico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
190 <i>Ent. cloacae</i>	>20	>20	>20	>20	6	>10		
J22 <i>Ent. cloacae</i>	>20	>20	>20	>20	4	>10		
R4 <i>Steno. maltophilia</i>	1	>20	1	>20	0,5	>10		
B/C <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	>20	15	15	2	>10		
J20 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	>20	15	20	2	>10		
J26 <i>Pseudomonas sp.</i>	8	>20	20	>20	2	>10		
R75 <i>Coryne. amycolatum</i>	0,5	4	0,5	1	0,5	2		
R23 <i>Coryne. strait/amy</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		
177 <i>Acinetobacter baumannii</i>	4	8	1	>20	0,5	>10		
J44 <i>A. baumannii</i>	>20	>20	>20	>20	2	>10		
R16 <i>Proteus mirabilis</i>	1	>20	1	>20	0,5	>10		
R81 <i>Proteus vulgaris</i>	1	>20	1	>20	0,5	>10		
R26 <i>Proteus mirabilis</i>	>20	>20	>20	>20	2	>10		

FIGURA 6

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

FIGURA 7

ID del catéter	EDTA Conc. (mg/ml)	Recuento de colonias a las 0 horas (cfu/ml)	Recuento de colonias a las 3 horas (cfu/ml)	Recuento de colonias a las 6 horas (cfu/ml)	Recuento de colonias a las 24 horas (cfu/ml)	Organismos presentes
G	40	>100000	120000	6000	0	Cultivos gram-negativos y gram-positivos mezclados
H	40	>100000	80000	0	0	Cultivos gram-negativos y gram-positivos mezclados
I	40	200000	>500000	25000	0	CNS + <i>Coryneforms</i>
J	40	>500000	180000	0	0	CNS
K	40	>1000000	600000	500000	180000	
P	40	>500000	2500000	150000	54500	<i>Streptococcus sp.</i> , CNS y <i>Bacillus</i> gram-negativos
0	40	205000	650000	1000	5500	<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Streptococcus sp.</i>
R	40	5000	500	0	0	<i>Enterococcus sp.</i>
S	40	>500000	100000	30000	0	MRSA
T	40	137500	1000	0	0	CNS
U	40	>500000	182500	67500	13500	MRSA
V	40	700000	38500	37500	13000	CNS
w	40	>500000	0	0	0	CNS + <i>Streptococcus</i> del grupo D
X	40	>500000	20000	0	0	<i>Enterobacter cloacae</i>
z	40	>500000	0	0	0	CNS mezclado
A1	40	700000	37000	60000	0	CNS
B1	40	24000	0	0	0	MRSA

FIGURA 8

ID del catéter	EDTA Conc. (mg/ml)	Recuento de colonias a las 0 horas (cfu/ml)	Recuento de colonias a las 3 horas (cfu/ml)	Recuento de colonias a las 6 horas (cfu/ml)	Recuento de colonias a las 24 horas (cfu/ml)	Organismos presentes
A	100	10000000	0	0	0	CNS
B	100	10000000	100	200	0	CNS
C	50	10000000	0	0	0	Coliformes mezclados
D	20	>100000	250000	100000	0	Cultivos gram-negativos y gram-positivos mezclados
E	30	>100000	400000	360000	0	Cultivos gram-negativos y gram-positivos mezclados
F	30	300000	57000	2000	0	Cultivos gram-negativos y gram-positivos mezclados
L	60	600000	5000	4000	0	<i>Enterococcus sp.</i>
M	60	>500000	300000	17000	17000	<i>Proteus sp. y CNS</i>
O	50	500000	30000	130000	0	<i>Staphylococcus aureus</i>
N (arterial)	50	500000	10000	0	0	CNS
N (venoso)	50	300000	10000 (solo CNS)	60000 (solo CNS)	0	<i>Klebsiella pneumoniae + CNS</i>