



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 308 401**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05254945 .8**

(96) Fecha de presentación : **08.08.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1626094**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

(54) Título: **Método para cultivar microorganismos en presencia de fluoroquinolonas y aminoglicósidos.**

(30) Prioridad: **13.08.2004 US 601241 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(73) Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821, US

(72) Inventor/es: **Souza, Kathleen**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 308 401 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

Método para cultivar microorganismos en presencia de fluoroquinolonas y aminoglicósidos.

La presente invención se refiere a un método para recuperar microorganismos en presencia de antibióticos. Más particularmente, se refiere a un método para pruebas de biocarga y esterilidad de dichos antibióticos, utilizando un medio que también puede ser utilizado para monitorización medioambiental de microorganismos en las instalaciones de fabricación de antibióticos.

Antecedentes

Productos farmacéuticos, oftalmológicos y similares necesitan ser estériles para no comprometer o dañar al usuario. Éstos necesitan ser probados para asegurar que ningún microbio que esté presente esté en los niveles bajos aceptados o que no existen microbios antes de que el producto se administre.

Para la mayoría de los productos, polvos o líquidos, el proceso es el siguiente:

La muestra del líquido (o de un polvo disuelto en un líquido) es filtrada a través de un filtro microporoso que tiene un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para capturar cualquier microorganismo sobre su superficie.

Luego, el filtro es colocado sobre un medio de crecimiento como una placa de agar o en un medio tal que se aplica al filtro un caldo o medio de crecimiento o una almohadilla absorbente bajo el filtro y se incuba, tanto a temperatura ambiente como a temperaturas elevadas (98°F más o menos) durante un periodo de tiempo que permita crecer a cualquier microorganismo a un tamaño suficiente para ser enumerado y, si se desea, identificado.

La prueba para enumerar e identificar puede ser visual (simplemente contando el número de colonias que forman) o puede ser hecha alternativamente a través del uso de varios agentes para detectar la presencia de microbios y para proporcionar una señal (bio- o quimio-luminiscente, radiológica, colorimétrica y similares) que pueda ser vista por el ojo o a través de instrumentación.

Un tipo de producto que es difícil de probar son antibióticos seleccionados de fluoroquinolonas y aminoglicósidos.

Los antibióticos están diseñados para matar o inhibir bacterias y otros microorganismos. La prueba actual usa una serie de lavados para intentar eliminar todos los restos del antibiótico del filtro, de tal forma que no se inhibe el crecimiento de microbios. Este es un procedimiento largo y costoso y no siempre funciona. Lo que se necesita es una mejor metodología para pruebas de biocarga, esterilidad y medioambientales de antibióticos.

Somos conscientes del siguiente estado de la técnica.

HAROLD EDDLEMAN: "Media for Bacteria Stock Cultures" 23 Octubre 1999 (1999-10-23), páginas 1-8, el cual describe, en particular, un medio para muchas myxobacterias, que comprende sulfato de magnesio, agar, casitona y agua destilada.

BLANK J: "Enzymatic inactivation of residual gentamicin after membrane filtration". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. JAN 1983, vol. 45, n° 1, Enero 1983 (1983-01), páginas 319-320, el cual describe la inactivación de gentamicina residual sobre una membrana por modificación con dos enzimas diferentes.

LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: "Pharmakologie und Toxikologie" 2003, GEORG THIEME VERLAG STUTTGART-NEW YORK, D-70469, STUTTGART, describe que, de forma variable, la tetraciclina forma complejos con cationes divalentes, a través de la cual los complejos resultantes ya no funcionan como antibióticos.

ZIMELIS V M ET AL: "Activity of aminoglycoside antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: specificity and site of calcium and magnesium antagonism". JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 1973, vol. 127, n° 6, 1973, páginas 663-669, describe que añadiendo cationes divalentes a un medio de cultivo altera la acción microbiana contra *Pseudomonas aeruginosa*.

LOMAESTRO B M ET AL: "Quinolone-cation interactions: a review". DICP : THE ANNALS OF PHARMACOTHERAPY. NOV 1991, vol. 25, n° 11, Noviembre 1991(1991-11), páginas 1249-1258, describe que, *in vivo*, una clase de antibióticos quinolona puede formar quelatos y son inactivados por cationes como magnesio, aluminio, hierro, zinc y calcio.

RUSSELL A D: "ANTIBIOTICS TODAY PART 3 RESISTANCE AND CROSS RESISTANCE COMBINED ANTIBIOTIC THERAPY AND STERILITY TESTING OF ANTIBIOTICS" PHARMACEUTICAL JOURNAL, vol. 201, n° 5468, 1968, páginas 149-152, describe maneras de probar la esterilidad de antibióticos. Las estrategias implican la inactivación de los antibióticos por agentes inactivantes y lavado de antibióticos residuales. En la pág. 151: col2, líneas 4 a 12 se describe que Fe^{++} y Mg^{++} reaniman bacterias tratadas con tetraciclina, y se sugiere un método probar

la esterilidad de ciertos antibióticos, en el que se incluye una sal metálica apropiada en el medio en el cual es añadido un antibiótico.

RUSSELL A D; AHONKHANII; ROGERS D T: "Microbiological applications of the inactivation of antibiotics and other antimicrobial agents". THE JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, vol. 46, nº 2, Abril 1979, (1979-04), páginas 207-245, considera los posibles métodos de inactivación de muchos tipos de antibióticos y otros agentes antimicrobianos y la situación en la que dicha inactivación es necesaria.

Finalmente, somos conscientes de la publicación de la Patente internacional WO 01/59157 (Millipore Corporation) la cual describe la enseñanza de una prueba para la detección, enumeración e identificación de microorganismos en una muestra líquida. La prueba utiliza un filtro a través del cual se hace pasar una muestra líquida y sobre el cual se depositan los microorganismos incluidos en el líquido. Luego, se incuba en un medio de crecimiento y, a partir de entonces, se somete a una prueba de presencia-ausencia para organismos utilizando una prueba ATP/bioluminiscencia. Luego, la misma muestra y filtro se someten a un ensayo de sonda PNA para organismos marcados. Opcionalmente, las localizaciones de los organismos detectados por cada prueba pueden ser comparadas entre sí para determinar la posibilidad de falsos positivos y su eliminación de los resultados de la prueba.

Compendio de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar la existencia de microbios en presencia de un antibiótico, donde el antibiótico es seleccionado de fluoroquinolonas y aminoglicósidos, que comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contenga el antibiótico a ser probado, un soporte y un medio de crecimiento dentro de dicho soporte; colocar la muestra en contacto con el medio de crecimiento e incubar el medio durante un tiempo pre-seleccionado a una temperatura pre-seleccionada; y ver el medio para determinar la presencia de cualquier microorganismo. La invención se caracteriza porque el medio contiene uno o más constituyentes catiónicos seleccionados de cationes divalentes y trivalentes de magnesio, calcio, aluminio y hierro y dicho cationes tienen un intervalo de concentración de 0,1 M a 0,5 M.

La invención es particularmente aplicable donde el antibiótico es seleccionado de fluoroquinolonas y es particularmente eficaz donde el microbio es seleccionado de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Así, la presente invención proporciona un método de uso de un medio específico para pruebas de biocarga o esterilidad del ambiente de fabricación de fluoroquinolonas y aminoglicósidos. El medio contiene uno o más constituyentes de cationes divalentes o trivalentes de magnesio, calcio, aluminio y hierro en un intervalo de concentración de 0,1-0,5 M, que permiten el crecimiento de microorganismos incluso en presencia de fluoroquinolonas y aminoglicósidos residuales.

Preferiblemente, el método comprende filtrar la muestra de fluoroquinolonas y aminoglicósidos a través de un filtro que tiene un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para capturar los microorganismos sospechosos y luego, incubar ese filtro sobre o en un medio de crecimiento que contiene uno o más constituyentes de cationes divalentes y trivalentes de magnesio, calcio, aluminio y hierro en un intervalo de concentración de 0,1-0,5 M. Luego, el filtro o medio incubado es observado o probado para determinar la presencia y, si es así, el número y, de forma deseable, el tipo de microorganismos presentes.

Un método alternativo para pruebas de biocarga o esterilidad es inocular o sembrar directamente la muestra que comprende fluoroquinolonas o aminoglicósidos en o sobre el medio que contiene uno o más constituyentes de cationes divalentes o trivalentes de magnesio, calcio, aluminio y hierro en una concentración de 0,1 M-0,5 M. Otro método más es tirar aire en un filtro o directamente en o dentro de un medio que contiene uno o más cationes divalentes o trivalentes de magnesio, calcio, aluminio y hierro en una concentración de 0,1 M-0,5 M.

Descripción detallada

La presente invención hace uso de un medio de crecimiento que contiene uno o más constituyentes de cationes divalentes o trivalentes de magnesio, calcio, aluminio y hierro en una concentración de 0,1 M-0,5 M en su interior. La presencia de uno o más constituyentes de cationes divalentes o trivalentes permite a los microorganismos crecer incluso en presencia de fluoroquinolonas y aminoglicósidos residuales. Es útil para probar la biocarga o esterilidad de las fluoroquinolonas y aminoglicósidos, donde la presencia de antibióticos residuales inhiben el crecimiento de microorganismos y proporciona un resultado de falso positivo. También es útil para la monitorización medioambiental del aire en un ambiente de fabricación de antibióticos.

Cualquier constituyente de cationes divalentes o trivalentes se puede utilizar en la presente invención. Ejemplos preferidos incluyen, pero no se limitan a, magnesio, preferiblemente en forma de sulfato de magnesio y cloruro de magnesio; calcio, preferiblemente en forma de cloruro de calcio o citrato cálcico; sulfato de aluminio; y sulfato de hierro (ferroso).

La cantidad de catión divalente o trivalente presente en el medio será suficiente para superar la inhibición del antibiótico de tal forma que permita crecer a cualquier microorganismo presente. Generalmente, estará presente en una cantidad de 0,1 M a 0,5 M, preferiblemente de 0,2 M a 0,4 M y más preferiblemente aproximadamente 0,3 M.

ES 2 308 401 T3

El medio es típicamente en forma de gel, como medio basado en agar o en forma de líquido, como caldos. Los medios típicamente utilizados en estas pruebas son Caldo de Digestión de Caseína de Soja o Agar (SCDB o SCDA), Medio Líquido de Tioglicolato (FTM) y Agar Dextrosa Sabouraud (SDA). Otros medios que son útiles incluyen, pero no se limitan a, Caldo o Agar Mueller Hinton, Caldo o Agar Nutriente (el agar puede estar en cintas especiales o en una clásica placa Petri de agar).

Un método típico para probar los niveles de biocarga o esterilidad de los antibióticos es filtrar una muestra del antibiótico a través de un filtro que tiene un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para atrapar cualquier microorganismo y después incubar ese filtro en presencia de un medio de crecimiento para permitir crecer a los microorganismos a un tamaño apropiado para su detección.

Dichos filtros típicamente tienen un tamaño de poro de 0,45 micrómetros (micras) o menos; en algunos casos se prefiere un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 micrómetros a hasta 1,2 micrómetros. Los filtros pueden estar formados de cualquier material apropiado comúnmente usado para dichas aplicaciones, incluyendo, pero no limitado a, filtros basados en celulosa como celulosa regenerada, ésteres mixtos de celulosa, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, nitro celulosa y similares, PVDF, nailon, policarbonatos y polisulfonas como polisulfona, polietersulfona, poliarilsulfona y polifenilsulfona.

Dichos filtros están comercialmente disponibles por un número de proveedores. Filtros apropiados incluyen filtros de éster de celulosa mezclado S-Pak™ y filtros PVDF Durapore® disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets.

Los soportes para los filtros pueden simplemente ser un instrumento inoxidable como un embudo o puede ser un instrumento desechable, pre-esterilizado que contiene el filtro como un instrumento Steritest™, un instrumento MicroporeSure™, un instrumento Sterisure™, una unidad de filtro Milliflex™ o un instrumento Microfil® S, todos disponibles en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets.

Especialmente para pruebas de esterilidad, el uso de una prueba adjunta, como un instrumento Steritest™, le permite a uno dirigir toda la prueba (muestreo, filtración, adición de medio e incubación) en un sistema cerrado. Este diseño reduce dramáticamente el riesgo de contaminación espontánea y posteriores falsos positivos.

Un método típico para probar los niveles medioambientales de microbios en una instalación es filtrar una muestra de aire a través de un instrumento que tenga una cinta de medio sobre la cual se puedan colocar y retener los microbios y luego se incuban en ese medio para permitir crecer a los microorganismos a un tamaño apropiado para su detección. Uno de estos sistemas es conocido como sistema M Air T® disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets. También véase US 6.094.997 u 6.240.768. Otros métodos incluyen simplemente dejar abiertas las placas Petri, llenas con un medio seleccionado, en el medio ambiente a ser estudiado y permitir que los microbios caigan para acumularlos en la superficie del medio. Luego, las placas se incuban y visualizan. Puede haber otros métodos y pueden ser usados por aquellos expertos en la materia.

Generalmente, tras la aplicación al medio, la muestra es incubada durante un periodo de tiempo que permita algo de crecimiento de los microorganismos capturados, de tal forma que sean fácilmente detectables. Para métodos tradicionales, este tiempo puede oscilar desde un mínimo de 3 días para una monitorización de aire o muestra de biocarga a 14 días para la prueba de esterilidad. Generalmente, está entre 3-14 días, más generalmente entre aproximadamente 7 y 14 días. La muestra puede ser incubada a temperatura ambiente (alrededor de 20°C) hasta temperaturas mayores como alrededor de 54°C. El intervalo típico de temperatura es 20 a 35°C.

La prueba para la enumeración e identificación puede ser visual (simplemente contar el número de colonias que se forman) tanto a simple vista como a través de un microscopio u otro instrumento de aumento. De forma alternativa, puede ser más complejo y usar varios agentes para detectar la presencia de varios constituyentes microbianos tales como sondas para ADN o ARN, agentes para ATP; bioluminiscencia y otros agentes químicos/bioquímicos bien conocidos para indicar la presencia de estos constituyentes y/o instrumentos para detectar estos agentes que indican la existencia de y tipo de organismos presentes. Por ejemplo, un sistema bien conocido incubaba los microbios, los lisa y luego usa reactivos para detectar el ATP en su interior. La presencia del ATP es visualizado por una reacción de quimioluminiscencia de luciferina y luciferasa. Dicho sistema se vende como el sistema Microstar® disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets. También son conocidos en la materia otros sistemas basados en indicadores cromatográficos, indicadores fluorescentes, y similares.

Ejemplo 1

Inoculación directa

Los tubos de prueba que contienen medio SCDB en presencia o ausencia de catión magnesio o antibiótico ciprofloxacino se inocularon con 200 unidades formadoras de colonias (cfu) de *S. aureus* (ATCC 6538). La muestra A se usó con una muestra de ciprofloxacino (100 µg/ml) y no contenía constituyente catiónico divalente. B se usó con ciprofloxacino (100 µg/ml) y contenía catión de magnesio 0,5 M. C se usó con un control y contenía 0,5 M del mismo catión divalente que B. D se usó con un control y no contenía catión divalente.

ES 2 308 401 T3

Los resultados se muestran en la Tabla 1:

TABLA 1

Antibiótico	Microorganismo	Catión divalente añadido al caldo	Resultado
Ciprofloxacino*	<i>S. aureus</i>	Ninguno	No crecimiento
Ciprofloxacino	<i>S. aureus</i>	0,5 M	Crecimiento
Ninguno*	<i>S. aureus</i>	0,5 M	Crecimiento
Ninguno*	<i>S. aureus</i>	Ninguno	Crecimiento

* Ejemplo comparativo

Ejemplo 2

Filtrado

Una muestra de antibiótico ofloxacino (10 ml a 4 mg/ml) se filtró a través de dos de cuatro embudos Milliflex® que contienen una membrana Durapore®. Cada filtro de membrana se enjuagó con seis enjuagues de 100 ml de Líquido A USP, el último enjuague contenía aproximadamente de 20 a 60 cfu de *E. coli* (ATCC 8739). También se filtró un control de *E. coli* a través de un embudo Milliflex®. Luego, todas las membranas se colocaron sobre medio de cultivo (Agar de Digestión de Caseína de Soja) como muestras A, B, C y D. A se usó con una muestra de ofloxacino y no contenía constituyente catiónico divalente. B se usó con ofloxacino y contenía catión divalente 0,5 M (magnesio). C se usó con un control y contenía un 0,5% de catión divalente de B. D se usó con un control y no contenía catión divalente.

Los resultados se muestran en la Tabla 2:

TABLA 2

Antibiótico	Microorganismo	Catión divalente añadido al agar	Resultado
Ofloxacino*	<i>E. coli</i>	Ninguno	No crecimiento
Ofloxacino	<i>E. coli</i>	0,5 M	Crecimiento
Ninguno*	<i>E. coli</i>	0,5 M	Crecimiento
Ninguno*	<i>E. coli</i>	Ninguno	Crecimiento

* Ejemplo comparativo

Como se puede ver de los ejemplos, en presencia de los antibióticos, el crecimiento de los microorganismos fue inhibido, a menos que el medio contuviera un catión divalente. Esto permite que se de la prueba de biocarga o esterilidad de los antibióticos, mientras se limita o elimina el potencial de falsos negativos.

Ejemplo 3

Prueba de esterilidad

Una muestra de antibiótico ofloxacino (20 ml a 40 mg/ml) se filtró a través de dos de cuatro conjuntos de botes Steritest™ emparejados, cada uno de los cuales conteniendo una membrana Durapore®. Cada filtro de membrana se enjuagó con tres enjuagues de 100 ml de Líquido A USP, el último enjuague contenía aproximadamente 30 cfu de *B. Subtilis* (ATCC 6633). También se filtró a través de un instrumento Steritest un control de *B. Subtilis* en Líquido A USP. Se añadió medio de crecimiento (Agar de Digestión de Caseína de Soja) a, B, c y D a cada bote.

ES 2 308 401 T3

Los resultados se muestran en la Tabla 3:

Antibiótico	Microorganismo	Catión divalente añadido al caldo	Resultado
Ofloxacino*	<i>B subtilis</i>	Ninguno	No crecimiento
Ofloxacino	<i>B subtilis</i>	0,5 M	Crecimiento
Ninguno*	<i>B subtilis</i>	0,5 M	Crecimiento
Ninguno*	<i>B subtilis</i>	Ninguno	Crecimiento

* Ejemplo comparativo

Similares resultados se demostraron con ofloxacino con SCDB que contenía un catión divalente a concentraciones de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 M de catión de magnesio. Además, se demostraron resultados similares con dos fluoroquinolonas adicionales; moxifloxacino y ciprofloxacino con SCDB que contenía catión divalente (magnesio) a concentración de 0,3 M.

Ejemplo 4

Prueba de monitorización del aire

Un método de monitorizar aire en una planta de fabricación de antibióticos es impactar aire en una superficie de agar para coleccionar tanto microorganismos como antibiótico sobre la superficie de agar. Esta prueba se simuló extendiendo microorganismos sobre una superficie de agar que contenía cantidades variables de catión de magnesio y luego se colocaron discos que contenían antibióticos sobre la superficie de agar. Se midió la zona de inhibición alrededor de cada disco para dar una indicación de la capacidad del medio para neutralizar el efecto del antibiótico (el método seguido es similar a la prueba de susceptibilidad de disco usada en microbiología clínica).

S. aureus (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) o *E. coli* (ATCC 25922) se extendieron sobre la superficie de agar de SCDA que contenía 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M o 0,5 M de catión magnesio. Luego, los discos impregnados con una cantidad conocida de antibiótico se colocaron sobre las bacterias sobre la placa de agar. Las placas se incubaron y se midió la zona de inhibición de crecimiento bacteriano. Una disminución en esta zona de inhibición de crecimiento bacteriano demuestra el efecto protector del medio que contiene el catión. Los resultados de tres antibióticos, ofloxacino (una fluoroquinolona), estreptomycin (un aminoglicósido) y doxiciclina (una tetraciclina), se muestran en la Tabla 4.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 308 401 T3

TABLA 4

Antibiótico	Microorganismo	Zona de inhibición en mm					
		Catión al 0,0 M	Catión al 0,1 M	Catión al 0,2 M	Catión al 0,3 M	Catión al 0,4 M	Catión al 0,5 M
Ofloxacino (5 ug)	<i>S. aureus</i>	23	11	8	6	7	6
Ofloxacino (5 ug)	<i>P. aeruginosa</i>	20	6	6	6	6	6
Ofloxacino (5 ug)	<i>E. coli</i>	26	13	13	13	12	12
Estreptomycin (10 um)	<i>S. aureus</i>	17	12	Np	7	Np	8
Estreptomycin (10 um)	<i>P. aeruginosa</i>	11	6	Np	6	Np	6
Estreptomycin (10 um)	<i>E. coli</i>	14	12	Np	9	Np	6
Doxiciclina (30 um)*	<i>S. aureus</i>	25	13	Np	11	Np	13
Doxiciclina (30 um)*	<i>P. aeruginosa</i>	8	6	Np	6	Np	6
Doxiciclina (30 um)*	<i>E. coli</i>	18	6	Np	6	Np	6

Np: no representado * ejemplo comparativo

Resultados similares se observaron con otros ocho agentes de fluoroquinolona, ciprofloxacino, moxifloxacino, enoxacina, enrofloxacin, levofloxacino, norfloxacina y sparfloxacino.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para determinar la existencia de microbios en presencia de un antibiótico, donde el antibiótico es seleccionado de fluoroquinolonas y aminoglicósidos, que comprende las etapas de:

proporcionar una muestra que contiene el antibiótico a ser probado, un soporte y un medio de crecimiento dentro del soporte;

colocar la muestra en contacto con el medio de crecimiento e incubar el medio durante un tiempo pre-seleccionado a una temperatura pre-seleccionada.; y

visualizar el medio para determinar la presencia de cualquier microorganismo,

caracterizado por que el medio contiene uno o más constituyentes catiónicos seleccionados de cationes divalentes y trivalentes de magnesio, calcio, aluminio y hierro y la concentración de dichos cationes está en el intervalo de 0,1 M a 0,5 M.

2. El proceso de la reivindicación 1, que además comprende

a) proporcionar un filtro, filtrar la muestra a través del filtro y colocar el filtro sobre el medio de crecimiento antes de la incubación, o

b) proporcionar un filtro, filtrar la muestra a través del filtro y colocar el filtro sobre el medio de crecimiento antes de la incubación y donde el filtro tiene un tamaño de poro de 0,1 micrómetros a 1,2 micrómetros y está formado por un material seleccionado de celulosa regenerada, ésteres mixtos de celulosa, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, nitrocelulosa, PVDF, nailon, policarbonatos, polisulfonas, polietersulfonas, poliarilsulfonas y polifenilsulfonas.

3. El proceso de la reivindicación 1, donde

a) la muestra se selecciona de un líquido y un polvo disuelto en un líquido, o

b) la muestra es aire de un área de fabricación de fabricación de antibióticos, o

c) el filtro/medio son incubados durante un periodo de tiempo de aproximadamente 0 a 7 días a una temperatura de 20°C a 54°C, o

d) el filtro/medio son incubados durante un periodo de tiempo de 7 a 14 días a una temperatura de 20°C a 54°C, o

e) la visualización se selecciona de contaje visual de las unidades formadoras de colonia o detección por bio- o quimio- luminiscencia de la presencia de un constituyente microbiano, o

f) la visualización es por detección de un agente usado para indicar la presencia de un constituyente microbiano.

4. El proceso de la reivindicación 1 donde uno o más constituyentes catiónicos están en el intervalo de 0,2 M a 0,4 M.

5. El proceso de la reivindicación 1, donde el medio es en forma de un gel o líquido.

6. El proceso de la reivindicación 1, donde el antibiótico se selecciona de fluoroquinolonas.

7. El proceso de la reivindicación 1, donde los microbios se seleccionan de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.