

Artículo original

Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia

Krismay Anais Correa Rivas*, María Vanessa Bravo Torrealba, Ricardo Alonso Silva Alvarado, Marynes Montiel

Unidad de Investigación en Microbiología Ambiental (UIMA). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido 6 de enero de 2015; aceptado 11 de octubre de 2015

Resumen: *Pseudomonas aeruginosa* es parte de un grupo de bacterias ubicuas en el ambiente. Su elevado nivel de resistencia intrínseca a los antibióticos, unido a su capacidad para desarrollar nuevos mecanismos de resistencia, hacen de este patógeno oportunista uno de los más difíciles de tratar. El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad a antibióticos de *P. aeruginosa* aislada del agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia, así como la detección de enzimas de resistencia a antibióticos. Se analizaron 40 muestras. El aislamiento de *Pseudomonas* se realizó en caldo asparagina y agar cetrímide, con posterior identificación bioquímica. La susceptibilidad a antibióticos se determinó, según el método de difusión en disco y la producción de enzimas mediante la sinergia de discos. El 92,5% de las muestras presentaron *Pseudomonas*, lográndose aislar 22 cepas de *P. aeruginosa*. El mayor porcentaje de cepas resistentes fue ante aztreonam (36,4%), seguido por ceftazidima (22,7%), cefepime (13,6%) y tobramicina (4,5%). El 18% de las cepas resultaron positivas para la determinación de BLEE mediante disociación de betalactámicos, así mismo el 9% positivas para carbapenemasas y metalobetalactamasas.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, susceptibilidad a antibióticos, agua de consumo humano, Santa Rosa de Agua.

Antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water from Santa Rosa de Agua community, Maracaibo Zulia State

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is a group of ubiquitous bacteria found in the environment. Its high level of intrinsic antibiotic resistance, coupled with its ability to develop new mechanisms of resistance, make this opportunistic pathogen one of the most difficult to treat. The aim of this study was to evaluate the antibiotic susceptibility of *P. aeruginosa* isolated from drinking water from Santa Rosa de Agua community, Maracaibo, Zulia State, as well as the detection of antibiotic resistance enzymes. Forty isolates were analyzed using asparagine agar broth and cetrímide, with subsequent biochemical identification. Antibiotic susceptibility was determined by the disc diffusion method and enzyme production was studied by combined disc diffusion. Of the specimens studied 92.5% were positive for *Pseudomonas*, of which 22 isolates were *P. aeruginosa*. The highest percentage of resistant strains were to aztreonam (36.4%), followed by ceftazidime (22.7%), cefepime (13.6%) and tobramycin (4.5%). The determination for extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) was 18% positive and 9% positive for carbapenemases (KPC) and metallo-beta-lactamases (MBL).

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, susceptibility to antibiotics, drinking water, Santa Rosa de Agua.

* Correspondencia:
E-mail: krismay09@hotmail.com

Introducción

Pseudomonas es un género que pertenece a la familia Pseudomonaceae, la cual está integrada por una diversidad de especies que habitan en el suelo y aguas estancadas; algunas de ellas forman parte de la flora del intestino de varias especies de animales y del hombre [1].

La especie *P. aeruginosa* es encontrada, frecuentemente, en aguas naturales como lagos y ríos, en concentraciones que van desde 10/100mL hasta >1.000/100mL. Sin embargo, no es usual en aguas de consumo humano, donde generalmente se encuentra en un 2% o menos en las muestras analizadas. Su presencia en este tipo de agua, probablemente está relacionada con su habilidad de colonizar las biopelículas

que están presentes en los sistemas de distribución; además, es capaz de multiplicarse en un rango de substratos muy amplio, ya que puede proliferar gracias a la gran variedad de compuestos orgánicos que utilizan como fuentes de carbono y energía. Esta especie puede ocasionar graves y diversas patologías infecciosas, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos, ya sea del ambiente hospitalario o comunitario [2-4].

Recientemente, se ha demostrado que *P. aeruginosa* es uno de los contaminantes más comunes en las fuentes de agua potable y de consumo humano, ya que presentan requerimientos nutricionales muy bajos, teniendo como único limitante para proliferar la presencia de oxígeno [1]. En Venezuela, la Gaceta Oficial N° 36.395 en el artículo 8 establece que el ente responsable del sistema de abastecimiento de agua potable debe asegurar que ésta no contenga microorganismos transmisores o causantes de enfermedades, ni bacterias coliformes termoresistentes (coliformes fecales), siguiendo como criterio de evaluación de la calidad microbiológica la detección del grupo coliformes [5], sin incluir la detección de *P. aeruginosa* en los análisis microbiológicos para la calidad de agua de consumo humano [1]. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud indica que el agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro de agua satisfactorio (suficiente, inocuo y accesible), bien sea que esté destinada para consumo humano o higiene, indicando que no existe un límite inferior tolerable en cuanto a la presencia de microorganismos patógenos y considerando que el peligro más común y difundido, relativo al agua de consumo humano, es el de su contaminación microbiana [6].

Conociendo que la presencia de *P. aeruginosa* es innata en los espacios ambientales, tanto terrestres como acuáticos y que presenta gran importancia clínica, es alarmante y lamentable saber que en muchos países de Latinoamérica no se incluya, en la normativa de calidad de agua para consumo humano, la detección de *P. aeruginosa*, siendo Venezuela uno de ellos. La normativa venezolana incluye la detección de *P. aeruginosa* en el agua envasada, requiriéndose ausencia de este patógeno en 100 mL de muestra [7]. No obstante otros países, como Argentina, si incluyen su detección en el agua potable no envasada, requiriéndose su ausencia en 100 mL de muestra [8]. Asimismo, las normas oficiales para la calidad de agua en Uruguay, incluyen dentro de los aspectos microbiológicos la determinación de *P. aeruginosa*, expresando la prohibición de la distribución y consumo de aguas no potables [9].

El papel de *P. aeruginosa* como agente patógeno responsable de infecciones comunitarias y sobre todo nosocomiales, está plenamente reconocido; sin embargo, elegir antibióticos correctamente se convierte en un problema, debido a que posee una elevada resistencia natural a una gran variedad de antimicrobianos, además de una extraordinaria habilidad de adquirir y sintetizar nuevos mecanismos de resistencia [10]. Entre los factores que intervienen, en el mecanismo de resistencia natural de

P. aeruginosa, se encuentran la escasa permeabilidad de la membrana externa, la presencia de bombas de expulsión, la modificación del sitio de unión al antibiótico, la modificación de rutas metabólicas internas y la producción de enzimas como las betalactamasas, carbapenemasas y metalobetalactamasas [4].

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos y destruyen su sitio activo impidiendo su actividad [11]. Estas incluyen las carbapenemasas, que hidrolizan un mayor espectro de antibióticos, incluyendo los carbapenémicos (sumamente importantes en el tratamiento de infecciones por bacilos gramnegativos multirresistentes) [12], y las carbapenemasas de tipo metalobetalactamasas (MBL), las cuales producen resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo los carbapenemas [11].

Debido a la alta incidencia de este microorganismo en muestras de agua de consumo humano analizadas, el objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad a antibióticos de cepas de *P. aeruginosa* en el agua de consumo humano proveniente de la red hidrológica de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia, así como la detección de enzimas de resistencia a antibióticos en las cepas identificadas.

Materiales y métodos

Área de estudio: La comunidad de Santa Rosa de Agua está ubicada en la zona noreste del municipio Maracaibo (Venezuela), justo a orillas del lago, situada entre el Lago de Maracaibo, avenida el Milagro, barrio Santa Rosa de Tierra y barrio Puntica de Piedra, en la parroquia Coquivacoa [13]. Para el año 2010, según censos informales realizados por los consejos comunales, se totalizan unos 8.000 habitantes [14].

Captación de muestras: Las muestras se recolectaron en diferentes puntos, seleccionados de acuerdo a su importancia para la comunidad (Tabla 1). Se solicitó permiso de los habitantes de la zona, a través del Centro de Educación Popular de Santa Rosa de Agua (CEP), con la intervención de representantes de la comunidad. Para la toma de la muestra se utilizaron envases de vidrio estériles de un litro, los cuales se transportaron en hielo para su procesamiento, en un lapso no mayor a seis horas. Se determinó la presencia de cloro en las muestras de agua a través del método colorimétrico, encontrándose ausencia del mismo, por lo cual no se requirió la adición de tiosulfato de sodio (norma COVENIN N° 2614) [15].

Basado en la Gaceta Oficial Venezolana N° 36.395 [5], y de acuerdo al número de habitantes de la zona, se realizó un muestreo mensual durante 4 meses (marzo-junio 2013) en 10 sitios. Las características de los sitios de muestreo y la procedencia de las muestras se detallan en la tabla 1.

Determinación de P. aeruginosa: El aislamiento e identificación de *P. aeruginosa* se realizó a través de la

Tabla 1. Ubicación y caracterización de los sitios para la toma de muestras de agua de consumo humano en la comunidad Santa Rosa de Agua. 2014.

SITIO N°	UBICACIÓN	SISTEMA DE ADUCCIÓN	DESCRIPCIÓN DEL SITIO	OBSERVACIONES
SR1	Av. Principal	Red de distribución.	Ubicada en la zona de la av. principal.	Muestra de tanque de almacenamiento.
SR2	Zona de palafitos (El Coloso)	Red de distribución.	Desembocadura de aguas residuales del colector. Área de pescadores.	Muestra de tanque de almacenamiento.
SR3	Zona de palafitos (La Puntica)	Red de distribución.	Zona retirada del desagüe.	Muestra de tanque que se llena a través la tubería principal.
SR4	Zona Capitán Chico	Red de distribución.	Zona Capitán Chico. Al lado del Manglar.	Muestra del tanque. Alimenta 150 personas.
SR5	Centro Educativo Popular "Jesús Rosario Ortega"	Red de distribución.	Ubicada a un lado del centro médico dental y al centro recreativo.	Muestra del tanque de comedor. El agua de tubería posee un filtro.
SR6	E. B. N. "Dr. Jesús María Portillo".	Red de distribución.	Ubicada frente a la Plaza y conecta con la orilla del Lago.	Muestra de tanque. Funciona preescolar y primaria. Población: 900 niños.
SR7	Ambulatorio Urbano Santa Rosa de Agua	Red de distribución.	Modificación de la estructura.	Muestra de tanque de almacenamiento.
SR8	Preescolar "Negra Matea"	Red de distribución y tanque.	Av. Principal diagonal al CEP.	Muestra del grifo del comedor.
SR9	Mundo Perdido		Av. Eco del Zulia Cerca de manglares.	
SR10	Ayacucho	Red de distribución.	Cercanía a Caño Tirso o Rincón de Mangle. Callejón Ayacucho.	Muestra de tanque de almacenamiento

técnica del número más probable [16]. Se utilizó una serie de 10 tubos de caldo asparagina (Merck Millipore, US), doble concentrado, inoculados con 10 mL de muestra e incubados durante 24 a 48 horas. Posteriormente se observó, con la ayuda de una lámpara ultravioleta de onda larga, la presencia de un pigmento fluorescente verde. La presencia de *P. aeruginosa*, se confirmó en agar cetrimide (Difco BBL, México), con posterior identificación mediante pruebas bioquímicas (agar hierro triple azúcar, citrato y oxidasa) y la utilización del sistema de identificación rápida API® 20E (bioMérieux, Francia).

Determinación fenotípica de la susceptibilidad a antibióticos: Se investigó mediante el método de difusión en disco, de acuerdo a la metodología descrita por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios del 2013 (CLSI, por sus siglas en inglés) [17]. Los antibióticos probados fueron: ceftazidima (CAZ-30 µg), gentamicina (GM-10 µg), tobramicina (TM-10 µg), cefepime (FEP-30 µg), aztreonam (ATM-30 µg), piperacilina/tazobactam (TZP-100/10 µg), meropenem (MEM-10 µg), imipenem (IMP-10 µg), amikacina (AK-30 µg), EDTA y amoxicilina/ácido clavulánico (AMC-100/10 µg); estos últimos empleados exclusivamente para la detección fenotípica de enzimas de resistencia a antibióticos. Los discos de EDTA fueron preparados en el laboratorio, utilizando discos de papel

de filtro blanco Whatman número 2 de 6 mm de diámetro, los cuales fueron impregnados con 10 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0 [17]. Los demás antibióticos fueron adquiridos comercialmente.

Detección fenotípica de enzimas de resistencia a antibióticos: Se realizó mediante el método de sinergia de doble disco, siguiendo las recomendaciones descritas en el Manual de Procedimientos Operativos del Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, regido por las normas y sugerencias del CLSI, detectándose: a) Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) inhibidas por imipenem, utilizando discos de CAZ e IMP; b) BLEE inhibidas por ácido clavulánico, empleando discos de AMC, CAZ y FEP; c) BLEE mediante disociación de betalactámicos, según la disociación entre FEP y CAZ; d) Carbapenemasas, utilizando discos de MEM e IMP y e) Metalbetalactamasas, aplicando discos de EDTA, MEM e IMP [18].

Análisis estadístico: Para analizar los resultados obtenidos en esta investigación se aplicó una estadística descriptiva, utilizando el sistema computarizado Microsoft Excel 12.0; dichos resultados fueron expresados en porcentajes, tablas y figuras.

Resultados y discusión

Se estudiaron 40 muestras de agua de consumo humano para determinar la presencia de *P. aeruginosa* y sus patrones de susceptibilidad a antibióticos. *Pseudomonas* se detectó en el 92,5% (37/40) de las muestras analizadas; de ellas el 60% correspondió a *P. aeruginosa*, (22 cepas). El alto porcentaje de *Pseudomonas* en agua puede estar relacionado con la formación de biopelículas, al ser la mayoría de estas muestras procedentes de aguas almacenadas, producto de la intermitencia del suministro de la misma en esta población.

Estudios previos han reportado valores elevados de *P. aeruginosa* en muestras de agua, lo cual concuerda con lo reportado en este estudio. Iriarte y Gómez determinaron la calidad del agua potable para consumo humano en el estado Nueva Esparta (Venezuela), obteniendo 165 muestras del agua distribuida por cisterna y la almacenada por los residentes para usos domésticos, de las cuales el 46% resultaron positivas para la presencia de *P. aeruginosa* [19]. Posteriormente Rojas y col., determinaron la calidad microbiológica de 50 muestras de agua potable envasada, de las cuales el 17,4% de las muestras resultaron positivas para *P. aeruginosa* [20]. Por ello es necesario el seguimiento de este microorganismo en muestras de agua en Venezuela, a fin de evaluar su inclusión como indicador de contaminación microbiana en aguas de consumo humano.

El 72,7% (16/22) de las cepas de *P. aeruginosa* presentaron resistencia al menos a uno de los 9 antibióticos analizados, siendo resistentes ante ATM, CAZ, FEP, TM, y sensibles a GM, TZP, MEM, IMP, AK. Se encontraron variaciones en el porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos, la cual está representada en la figura 1. Flores *et al.* reportaron resistencia a antibióticos en el 68% de las cepas de *Pseudomonas* aisladas de agua de consumo procedente de un acuífero [21]. Estudios previos han demostrado la sobrevivencia de bacterias resistentes a antibióticos en los tratamientos de agua, considerando los sistemas de distribución como un reservorio para la diseminación de

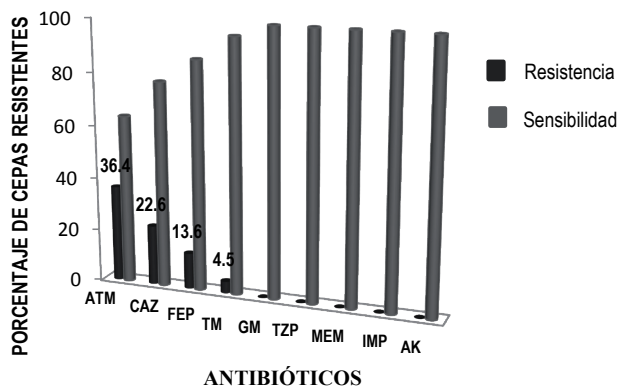


Figura 1. Porcentajes de sensibilidad y resistencia a antibióticos *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* aislada del agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, 2014. Aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), tobramicina (TM), gentamicina (GM), piperacilina tazobactam (TZP), meropenem (MEM), imipenem (IMP) y amikacina (AK).

patógenos oportunistas resistentes a antibióticos [22].

Una cepa presentó resistencia simultánea a dos antibióticos (Tabla 2). Ninguna cepa mostró resistencia intermedia a los antibióticos utilizados.

ATM fue el agente antimicrobiano al que *P. aeruginosa* mostró mayor resistencia, con un 36,4% de cepas resistentes. Es el único compuesto de interés del grupo de monobactámicos, mostrando una actividad potente y específica *in vitro* frente a un amplio espectro de patógenos aerobios gramnegativos, incluyendo *P. aeruginosa*. La acción bactericida de ATM se produce por la inhibición de la síntesis de la pared de la célula bacteriana [23]; sin embargo, *P. aeruginosa* tiene la habilidad de sintetizar betalactamasas [24], destruyendo el sitio activo del antibiótico [25].

Tabla 2. Patrones de resistencia a antibióticos y producción de BLEE, carbapenemasas y metalobetalactamasas en las 22 cepas de *P. aeruginosa* aisladas del agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo estado Zulia. 2014.

Cepa	Patrones de resistencia	BLEE inhibida por			CARB	MBL
		Blac	IMP	Ác. Cl.		
1	ATM,CAZ	-	-	-	-	-
2	ATM	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	CAZ	-	-	-	-	-
5	FEP	+	-	-	-	-
6	ATM	-	-	-	+	+
7	ATM	-	-	-	-	-
8	ATM	-	-	-	-	-
9	FEP	+	-	-	-	-
10	ATM	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	CAZ	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	CAZ	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	ATM	-	-	-	-	-
18	ATM	-	-	-	+	+
19	TM	-	-	-	-	-
20	CAZ	-	-	-	-	-
21	FEP	+	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-

ATM (aztreonam), CAZ (ceftazidima), FEP (cefepime), TM (tobramicina), BLEE: β -lactamasas de espectro extendido, Blac: BLEE inhibida por disociación de betalactámicos, IMP: BLEE inhibida por imipenem, Ác. Cl.: BLEE inhibida por ácido clavulánico, CARB: carbapenemasas, MBL: metalobetalactamasas.

P. aeruginosa también mostró resistencia frente a las cefalosporinas, con un 22% a CAZ y 13,6% a FEP. CAZ y FEP son cefalosporinas de tercera y cuarta generación, respectivamente; ambas son de amplio uso terapéutico, al ser inactivadas por muy pocas betalactamasas. La resistencia a este grupo de antibióticos está mediada por modificaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP) [10].

Un 4,5% de las cepas de *P. aeruginosa* fue resistente a la TM, el cual junto con la GM y la AK, son antibióticos aminoglucósidos de amplio espectro que actúan sobre las bacterias gramnegativas aerobias, incluyendo enterobacterias, *Pseudomonas* y *Haemophilus* [26]. El mecanismo de acción es a través del bloqueo de la síntesis protéica bacteriana [10].

La TZP es un fármaco compuesto por un betalactámico (PIP) y un inhibidor de betalactamasas (TZ). La presencia de TZ amplía el espectro antibiótico de la PIP haciéndola activa frente a bacterias productoras de betalactamasas normalmente resistentes a ella, como *P. aeruginosa* y *E. coli* [27]. El 100% de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas revelaron la eficacia del uso de los agentes antimicrobianos en combinación, lo cual podría estar asociado a la dificultad de producir mecanismos de resistencia cuando se emplea más de un antibiótico [28]. Finalmente, los antibióticos MEM e IMP demostraron fenotípicamente una excelente actividad ante el 100% de las cepas de *P. aeruginosa* analizadas. Ambos antibióticos son carbapenémicos, los cuales presentan una extraordinaria actividad antimicrobiana, inhibiendo la síntesis de la pared celular [10].

Al determinar la producción fenotípica de BLEE, carbapenemasas y metalobetalactamasas en las cepas de *P. aeruginosa* se observó que el 13,6% presentaron BLEE inhibidas por disociación de betalactámicos, mientras que el 9% presentó enzimas metalobetalactamasas (Figura 2).

Bonilla y col [18], afirmaron que además de las BLEE inhibidas por el ácido clavulánico e IMP, existen BLEE que muestran un patrón de disociación en cuanto a la jerarquía de los antibióticos betalactámicos. Un marcador muy

útil para este tipo de BLEE es la disociación entre FEP y CAZ. Cuando es resistente a FEP pero sensible a CAZ es productora de este tipo de BLEE [18], detectando con ello un 13,6% de cepas productora de este tipo de enzima; sin embargo las bombas de eflujo, las cuales son mecanismos de resistencia intrínseco de *P. aeruginosa*, también le podrían proporcionar este patrón de susceptibilidad, ya que le permite remover del espacio intracelular productos tóxicos, incluyendo antibióticos [29].

La detección fenotípica de carbapenemasas resultó negativa en el 100% de las cepas de *P. aeruginosa* identificadas; sin embargo, el 9% de las cepas fueron positivas para la detección de la enzima metalobetalactamasas; estas últimas son inhibidas por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA. Por ello, en las cepas de *P. aeruginosa* consideradas positivas se observó un efecto inhibitor del EDTA sobre la enzima, provocando un agrandamiento de la zona de inhibición del IMP y/o MEM adyacente al disco de EDTA [30], reiterando que a pesar de la sensibilidad encontrada fenotípicamente de manera individual para ambos antibióticos, se reportaron positivos para la determinación de carbapenemasas el 9% de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas.

Alarman los niveles de resistencia a antibióticos y presencia de enzimas de resistencia encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* identificadas, más aún cuando estas aguas son utilizadas por los pobladores en sus actividades domésticas.

Conclusiones

1. Se logró la cuantificación e identificación de *P. aeruginosa*, en el 60% de las muestras analizadas de la comunidad Santa Rosa de Agua, lo que indica que no perciben agua potable confiable para su uso y consumo.
2. El agua estudiada pudiera servir como vehículo para la diseminación de estas cepas, con altos niveles de resistencia, en la comunidad.
3. Es importante que las autoridades nacionales tomen en cuenta estos resultados y consideren la incorporación de este microorganismo para su detección en el agua potable no envasada.

Referencias

1. Ruiz, L. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antibióticos. Tesis. Facultad de Medicina: Universidad de Barcelona; 2007.
2. Mena K, Gerba C. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. Rev Environ Contam Toxicol. 2009; 201:71-115.
3. Villegas M, Prado I, Ortega M, Zhurbenko R. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* empleando el método del Número Más Probable. Rev Peru Epidemiol. 2010; 16:2-3.

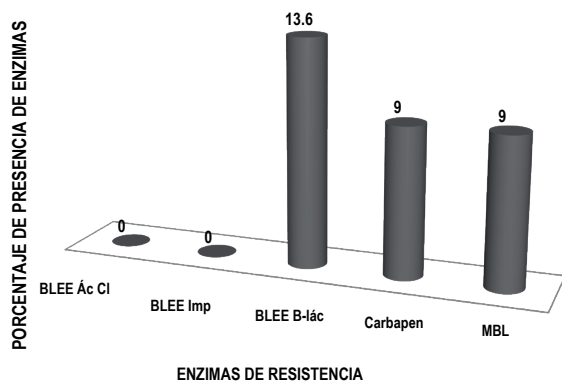


Figura 2. Porcentajes de la producción fenotípica de enzimas de resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa* aislada del agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, 2014. BLEE inhibidas por ácido clavulánico (BLEE Ác Cl), BLEE inhibidas por imipenem (BLEE Imp), BLEE inhibidas mediante disociación de betalactámicos (BLEE B-lác), carbapenemasas (Carbapen) y metalobetalactamasas (MBL).

4. Díaz J. Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemas en un hospital nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú; 2008.
5. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 36.395. "Normas Sanitarias de Calidad del Agua Potable". Caracas-Venezuela; 1998.
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Hojas de información microbiológicas / bacterias patógenas. Guías para la calidad del agua potable. Publicación Científica N° 675. 2006. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/22228198/Guias-Para-La-Calidad-Del-Agua-Potable-OMS>. Acceso 17 de diciembre 2012.
7. Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN N° 1431. Agua envasada potable. Requisitos. Caracas-Venezuela: Fondonorma; 1982.
8. Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental BVSDE, a. Normas oficiales para la calidad del agua Argentina. Disposiciones de la ley 18284, 2006. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/sde/ops-sde/bvsde.shtml>. Acceso 07 de octubre 2013.
9. Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental BVSDE, b. Normas oficiales para la calidad del agua Uruguay. Capítulo 25, 2006. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/sde/ops-sde/bvsde.shtml>. Acceso 07 de octubre 2013.
10. Perozo A, Castellano M. Pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Maracaibo: Monografía. Sociedad Venezolana de Microbiología capítulo Zulia; 2005.
11. Álvarez Á. Susceptibilidad antimicrobiana a betalactámicos y detección de betalactamasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas del Río Manzanares. Sucre-Venezuela. Tesis. Universidad de Oriente; 2011.
12. Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. Enferm Infecc Microbiol Clín. 2010; 28:19-28.
13. Iglesias Y. En Santa Rosa de Agua sobrevive el único bosque manglar de Maracaibo. Correo del Orinoco. 22 de octubre 2012. Disponible en: <http://www.correodelorinoco.gob.ve/regiones/santa-rosa-agua-sobrevive-unico-bosque-manglar-maracaibo/>. Acceso 17 de diciembre 2012.
14. Botero L, Montiel M, Ledo H, Romero M, Quintero W, García M. Evaluación de la calidad de las aguas de Santa Rosa de Agua, estado Zulia. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia. 1995; 18:368-76.
15. Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN N° 2614. Agua potable. Toma de muestras. Caracas-Venezuela: Fondonorma; 1994.
16. Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN N° 2986. Agua potable. Determinación de *Pseudomonas aeruginosa* por el método del número más probable. Caracas-Venezuela: Fondonorma; 1993.
17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
18. Bonilla X, Perozo A, Castellano M., Manual de Procedimientos Operativos del Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela: Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo; 2012.
19. Iriarte M, Gómez A. Potabilidad del agua de uso doméstico en el estado Nueva Esparta, Venezuela. Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel". 2008; 39:24-6.
20. Rojas T, Márquez E, Lugo R, Machado M, Vásquez Y, Fernández Y, Gil M. Bacilos gramnegativos no fermentadores en agua embotellada: susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelículas. Rev Soc Ven Microbiol. 2014; 34:64-9.
21. Flores R, Bodilis J, Alonso L, Buquet S, Feuilloley M, Dupont J, Pawlak B. Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. Sci Total Environ. 2014; 490:370-8.
22. Xi C, Zhang Y, Marrs C, Ye W, Simon C, Foxman B, Nriagu J. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. Appl Environ Microbiol. 2009; 75:5714-18.
23. Asociación Española de Pediatría AEP. Aztreonam. Madrid-España: Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría; 2013.
24. Coyle M, Cavalieri S, Harbeck R, McCarter Y, Ortez J, Rankin I, Sautter R, Sharp S, Spiegel C. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Seattle-Washington: American Society for Microbiology; 2005.
25. Gómez C, Leal A, Pérez M, Navarrete M. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. Rev Fac Med Universidad Nacional de Colombia. 2005; 53:27-34.
26. Asociación Española de Pediatría AEP. Cefepime. Madrid-España. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría; 2012.
27. Asociación Española de Pediatría (AEP). Piperacilina tazobactam. Madrid-España. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. 2012.
28. Martínez A, Pérez J, Pérez M. *Pseudomonas*. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo J, editores. Microbiología y Parasitología Médicas. Habana-Cuba: Editorial de Ciencias Médicas; 2008. p. 300-12.
29. Guevara A, Araque M, Sierra C. Mecanismo de resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa*. Impermeabilidad de membrana y bombas de eflujo. Rev Fac Far Venezuela. 2012; 54:21-7
30. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Enferm Infecc Microbiol Clín. 2011; 29:524-34.