

La profundización en el conocimiento biológico sobre *A. baeri* se plantea como una necesidad para el desarrollo de alternativas de control contra este díptero, el cual podría constituir un agente causal de miasis frecuente en las poblaciones de monos aulladores de países tropicales.

Agradecimientos: Los autores desean agradecer a la Vicerrectoría de Investigación por el soporte económico al proyecto VI 111-A1-015.

Olger Calderón-Arguedas, Adriana Troyo, Mayra E. Solano, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica, **Ronald Sánchez**, Departamento de Biología, Sede de Occidente, UCR, Alajuela, Costa Rica, **Misael Chinchilla**, CIET, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología (UCR) y Laboratorio de Investigación, Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Andrés Vesalio Guzmán", San José, Costa Rica y **Gustavo A. Gutiérrez-Espeleta**, Escuela de Biología, UCR, San José, Costa Rica. E-mail: <olgerc@cariari.ucr.ac.cr>.

Referencias

- Baron, R., Colwell, D. y Milton, K. 1996. Antibody immunoglobulin (IgG) response to *Alouattamyia baeri* (Diptera: Cuterebridae) parasitism of howler monkeys, *Alouatta palliata*, in Panama. *J. Med. Entomol.* 33: 946-951.
- Catts, E. P. 1982. Biology of New World bot flies: Cuterebridae. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 313-338.
- Colwell, D. y Milton, K. 1998. Development of *Alouattamyia baeri* (Diptera: Oestridae) from howler monkeys (Primates: Cebidae) on Barro Colorado Island, Panama. *J. Med. Entomol.* 35: 674-680.
- Daniel, W. 1988. Pruebas de hipótesis. En: *Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud*, pp. 221-282. Editorial Limusa, México, DF.
- Fraiha, H., Chaves, L., Borges, I. y de Freitas, R. 1984. Miiases humanas da Amazonia. III. Miiase pulmonar por *Alouattamyia baeri* (Shannon & Greene, 1926) (Diptera, Cuterebridae). *Sep. Rev. Fund. Sesp.* 29: 63-68.
- Guimarães, J. 1971. Notes on the hosts of Neotropical Cuterebrini (Diptera, Cuterebridae), with new records from Brazil. *Pap. Avulsos Zool.* 25: 89-94.
- Guimarães, J. y Coimbra, C. 1982. Miasa humana por *Alouattamyia baeri* (Shannon & Greene) (Diptera, Cuterebridae). *Rev. Bras. Zool.* 1: 35-39.
- Margolis, L., Esch, W., Holmes, J., Kuris, A. y Shad, G. 1982. The use of ecological terms in parasitology. *J. Parasitol.* 68: 131-133.
- Milton, K. 1996. Effects of bot fly (*Alouattamyia baeri*) parasitism on a free-ranging howler monkey (*Alouatta palliata*) population in Panamá. *J. Zool., Lond.* 239: 39-63.
- Shannon, R. y Greene, C. 1926. A bot-fly parasitic in monkeys. *Zoopathologica* 1: 285-290.
- Troyo, A., Solano, M., Calderón-Arguedas, O., Chinchilla, M., Sánchez, R. y Gutiérrez-Espeleta, G. A. 2002. Fur

mite, *Listrocarpus alouattae* Fain (Acari: Atopomelidae), from *Alouatta palliata* Gray (Primates: Cebidae) in Costa Rica. *Int. J. Acarol.* 28: 251-255.

Zeledón, R., Jiménez, R. y Brenes, R. 1957. *Cuterebra baeri* Shannon y Greene, 1926, en el mono aullador de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 5: 129-134.

FLORA BACTERIAL ORAL Y SU PERFIL DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN MONOS DE COSTA RICA (*ALOUATTA PALLIATA* Y *ATELES GEOFFROYI*)

María del Mar Gamboa-Coronado

Evelyn Rodríguez-Cavallini, Galia Rojas-Contreras

Ronald Sánchez-Porras, Gustavo Gutiérrez-Espeleta

Introducción

Costa Rica es considerada como la región de mayor diversidad biológica en Centro América; en 51 000 km² tiene al menos de 500 000 diferentes especies (Reid *et al.*, 1994) y entre los mamíferos presentes, se identifican cuatro especies de monos distribuidas por todo el país, dos de las cuales son *Alouatta palliata*, conocido como congo, y *Ateles geoffroyi*, o mono colorado. Los *A. palliata* se encuentran distribuidos en todo el país; son arborícolas, aunque en ocasiones se ven obligados a cruzar áreas abiertas sobre suelo para alimentarse de árboles aislados y ocasionalmente, cuando el recurso alimenticio es escaso, migran del parche boscoso hacia los cafetales (Sánchez, 1991). En Costa Rica, *A. geoffroyi* es considerada en peligro de extinción, debido a la deforestación y a la caza para aprovechar su carne. Los individuos de esta especie se encuentran en todo el país y se les conoce por su especialización extrema a la forma de vida arborea; son principalmente frugívoros, alimentándose muy selectivamente en el bosque maduro, en alturas de moderadas a extremas (Elizondo, 1999).

Con el tiempo los monos han aumentado su contacto con los humanos, ya sea por la siembra de café dentro de zonas boscosas o por la eliminación de árboles (Sánchez, 1991), lo que ha afectado su comportamiento y hábitos alimenticios (Vergeest, 1992) y por ende, posiblemente su flora bacteriana normal. En el ser humano, las bacterias aerobias y anaerobias constituyen los componentes principales de la microflora que coloniza las superficies mucosas y la piel; las bacterias anaerobias superan en número a las bacterias aerobias, pudiéndose encontrar una relación de 10:1 en la cavidad oral (Engelkirk y Duben-Engelkirk, 2000). Se conoce poco acerca de la flora bacteriana normal de los monos, incluyendo la oral, ya que la mayoría de estudios se enfocan principalmente en su biología, comportamiento, hábitat y alimentación. En este trabajo se pretende describir la flora bacteriana (aerobia y anaerobia) de la cavidad oral de monos de las especies *A. palliata* y *A. geoffroyi* y determinar su patrón de sensibilidad a los antibióticos. Esto con el propósito de evaluar el riesgo potencial de contraer alguna enfermedad por la cercanía humana con los monos y tratar de establecer si la interacción del hombre en ambientes pro-

prios de estos animales ha influenciado dicho patrón de sensibilidad antimicrobiana.

Métodos

Se estudiaron 27 muestras de la cavidad oral de monos de las especies *A. palliata* y *A. geoffroyi* en las regiones de Costa Rica de: Chomes (10° 02' 35" N, 84° 54' 50" O), Limón (09° 59' 34" N, 83° 01' 51" O), San Ramón (10° 05' 05" N, 84° 28' 48" O), Cahuita (09° 44' 06" N, 82° 48' 39" O) y Palo Verde (10° 20' 47" N, 85° 20' 44" O); sólo estas dos últimas constituyen hábitat continuo, a partir de los cuales se analizaron 13 muestras.

Con una torunda estéril, se raspó los dientes y la cavidad de la boca del mono (previamente sedado) y se resuspendió en un tubo con 2 ml de solución salina (SS) estéril. Con jeringa y a través del tapón de hule, se inoculó 0.5 ml de la suspensión en un tubo con medio de carne cocida (CC) prerreducido, que se mantuvo a temperatura ambiente antes de ser procesado en el laboratorio; los tubos con el resto de la suspensión en SS se mantuvieron en frío. A cada una de las suspensiones, se les agregó 2 ml de caldo tripticasa soya (CTS) y se incubaron a 35°C por 24 hr; los tubos con medio de CC prerreducidos se incubaron a 35°C por 48 hr. A partir de cada tubo de CTS, se rayaron placas de agar sangre (AS), chocolate, MacConkey y manitol sal, que se incubaron a 35°C por 24 hr para el aislamiento de bacterias aerobias. A partir de cada tubo con medio de CC prerreducido, para el aislamiento de bacterias anaerobias, se rayó una placa de AS que se incubó en anaerobiosis a 35°C por 48 hr. Se seleccionaron los diferentes morfotipos coloniales en cada placa, anotando sus características, se les hizo tinción de Gram y se rayaron en AS para obtener cultivos puros. Se determinó la tolerancia al oxígeno de cada morfotipo colonial (incubación en atmósfera incrementada de CO₂ y en jarra de anaerobiosis) y se seleccionaron como bacterias anaerobias aquellas cuyo crecimiento fue exclusivo o mejor bajo condiciones anaerobias.

A las bacterias aerobias se les realizaron pruebas de Gram, oxidasa y catalasa y con base en ello, se escogió la correspondiente galería miniaturizada de pruebas bioquímicas (API®); las bacterias anaerobias se inocularon en Rapid ID 32A o API 20A. Todas las galerías se incubaron y se leyeron de acuerdo con las recomendaciones de la casa fabricante y se identificaron utilizando el programa API-Plus®. Se realizaron pruebas adicionales, según el caso, cuando la identificación no fue precisa. Para determinar la sensibilidad a los antibióticos se utilizaron galerías comerciales (ATB®), de acuerdo con el tipo de bacteria aerobia: ATB G-5, ATB-Staph y ATB-Strep; para bacterias anaerobias se usó ATB-ANA y se siguieron las recomendaciones de la casa fabricante.

Resultados

A partir de las 27 muestras de la cavidad oral de los monos, se aislaron 109 cepas de bacterias (promedio de cuatro cepas por muestra); 56 eran de monos de hábitat continuo y

53 de monos en fragmentos de bosque, cerca de poblaciones humanas. No se encontraron diferencias en las especies bacterianas aisladas en ambos hábitats ni en los patrones de resistencia antimicrobiana. De las 109 cepas, 70 correspondieron a bacterias aerobias (64%) y 39 a bacterias anaerobias (36%), lo que equivale a 2.6 aerobios y 1.4 anaerobios por muestra. Respecto a las bacterias aerobias, predominaron los bacilos Gram negativos (49 de las 70 cepas), siendo *Enterobacter* el género más frecuente, ya que se aisló en el 67% de las muestras (Cuadro 1) e incluyó las especies de *E. agglomerans*, *E. cloacae* y *E. amnigenus*. Fue posible aislar otros 10 géneros de bacilos Gram negativos aerobios, cuya frecuencia en las muestras varió del 26% (*Escherichia*) al 4% (*Achromobacter* y *Chryseomonas*, Cuadro 1). Se aislaron 21 cepas de cocos Gram positivos aerobios, siendo *Staphylococcus* el género más frecuente (en 67% de las muestras) e incluyó las especies de *S. aureus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. sciuri* y *S. simulans*; otros géneros aislados fueron *Streptococcus*, *Aerococcus* y *Leuconostoc* con una frecuencia de 4% cada uno.

Referente a las bacterias anaerobias, se aislaron 39 cepas: 17 bacilos Gram positivos, 12 bacilos Gram negativos, 6 cocos Gram negativos y 4 cocos Gram positivos. *Clostridium*, el género más frecuente, se encontró en el 48% de las muestras (Cuadro 2), correspondiendo a las especies de *C. beijerinckii*, *C. bifementans*, *C. cadaveris*, *C. clostridioforme*, *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. sordellii* y *C. sporogenes*. Otros siete géneros de bacterias anaerobias también estuvieron presentes, con una frecuencia que varió desde un 26% (*Bacteroides*) al 4% (*Actinomyces* y *Peptostreptococcus*, Cuadro 2).

Con respecto a las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, el 71% de los bacilos Gram negativos aerobios fue resistente a la amoxicilina y el 45% a la amoxicilina más ácido clavulánico. El 63% fue resistente a cefalotina, cefalosporina de primera generación, pero sólo el 8, 4 y 4% a cefotaxime, ceftriaxone y ceftazidime (8-16 mg/L), respectivamente, cefalosporinas de tercera generación (Figura 1); hubo resistencia moderada a otros antibióticos como ticarcilina, ceftazidime (1 mg/L), cotrimoxazol y aztreonam (Figura 1). Ocho de los 18 antibióticos (44%) evaluados fueron efectivos contra todas las cepas aisladas (piperacilina, piperacilina + tazobactam, imipenem, tobramicina, amikacina, gentamicina, netilmicina y ciprofloxacina). Las cepas de *Staphylococcus* mostraron una menor resistencia, pues 10 de los 15 antibióticos probados (67%) fueron efectivos contra todas las cepas aisladas (cefalotina, gentamicina, netilmicina, clindamicina, ciprofloxacina, tetraciclina, nitrofurantoina, rifampicina, vancomicina y teicoplanina). Sin embargo, el 89% de los aislamientos fue resistente a penicilina G y el 28% a ampicilina más sulbactam, 11% a eritromicina y 6% a cotrimoxazol y a pefloxacina. Las únicas cepas de *Streptococcus* y *Aerococcus* aisladas fueron resistentes, entre otros, a ciprofloxacina, quinolona de amplio espectro y de uso relativamente reciente.

En cuanto a las cepas anaerobias, la resistencia a varios antibióticos también fue manifiesta, siendo el mayor porcentaje

Cuadro 1. Bacilos Gram negativos aerobios aislados de la cavidad oral de 27 monos (*Alouatta palliata* y *Ateles geoffroyi*).

Género	Total de cepas n=49	Frecuencia (%) n=27
<i>Enterobacter</i>	18	67
<i>Escherichia</i>	7	26
<i>Klebsiella</i>	5	19
<i>Acinetobacter</i>	5	19
<i>Serratia</i>	3	11
<i>Pseudomonas</i>	3	11
<i>Citrobacter</i>	2	7
<i>Chromobacterium</i>	2	7
<i>Aeromonas</i>	2	7
<i>Achromobacter</i>	1	4
<i>Chryseomonas</i>	1	4

Cuadro 2. Bacterias anaerobias aisladas de la cavidad oral de 27 monos (*Alouatta palliata* y *Ateles geoffroyi*).

Género	Total de cepas n=39	Frecuencia (%) n=27
<i>Clostridium</i>	13	48
<i>Bacteroides</i>	7	26
<i>Veillonella</i>	6	22
<i>Prevotella</i>	5	19
<i>Gemella</i>	3	11
<i>Eubacterium</i>	3	11
<i>Actinomyces</i>	1	4
<i>Peptostreptococcus</i>	1	4

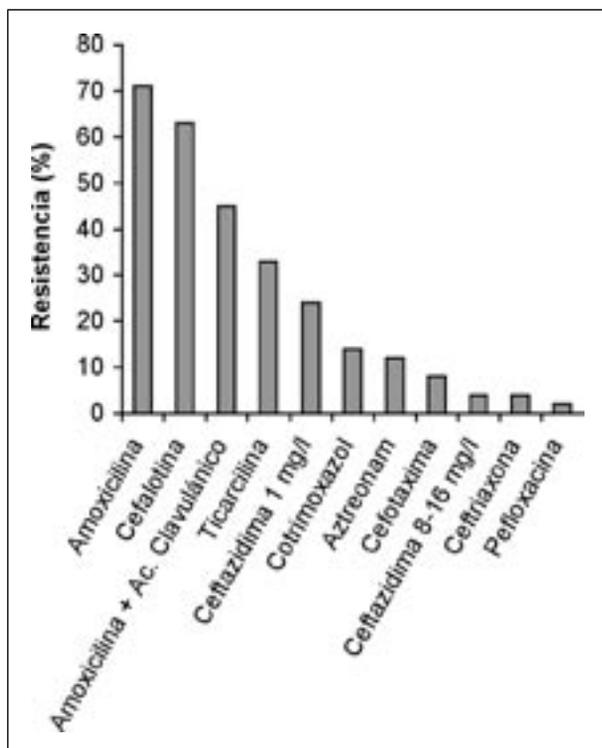


Figura 1. Resistencia a los antimicrobianos de 49 bacilos Gram negativos aerobios aislados de la cavidad oral de 27 monos (*Alouatta palliata* y *Ateles geoffroyi*).

de resistencia hacia el metronidazole, de un 49 a 44% según su concentración, seguido por la penicilina, la clindamicina y cloranfenicol (31, 28 y 26%, respectivamente); hubo un bajo porcentaje de resistencia a antibióticos como amoxicilina, cefotetan, imipenem y ticarcilina (Figura 2). Cinco de los 15 antibióticos evaluados (33%) fueron efectivos contra todas las cepas aisladas (amoxicilina + ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina + tazobactam, cefoxitina, ticarcilina + ácido clavulánico).

La presencia de cepas multirresistentes (resistencia a dos o más antimicrobianos) se dio tanto en las bacterias aerobias como en las anaerobias. De las bacterias aerobias, el 80% de las cepas mostró resistencia múltiple, desde resistencia a dos (25%) hasta resistencia a nueve antibióticos (4%), aunque la mayoría (41%) fue resistente a tres o cuatro antibióticos y un 10% a cinco o seis. La resistencia múltiple en las cepas de *Staphylococcus* fue menor, pues sólo un bajo porcentaje (6%) fue resistente a tres antibióticos y 33% a dos; la mayoría (61%) mostró resistencia solamente a uno o a ninguno de los antibióticos evaluados. En las cepas anaerobias la resistencia múltiple fue moderada, el 49% mostró multirresistencia: 20% a dos antimicrobianos, 11% a tres o cuatro y 18% a cinco o seis.

Discusión

El conocimiento actual sobre la flora bacteriana oral de monos es muy escaso y este estudio permite señalar resultados interesantes que revelan semejanzas y diferencias con la flora bacteriana humana. Aunque se logró el aislamiento de cuatro cepas diferentes por muestra de cavidad oral de monos, se encontró mayor cantidad de bacterias aerobias (2.6 por muestra) que de anaerobias (1.4 por muestra),

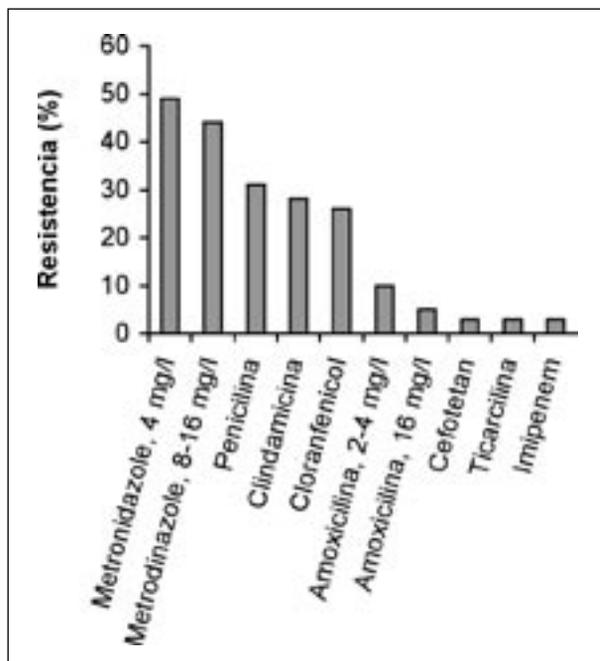


Figura 2. Resistencia a los antimicrobianos de 39 bacterias anaerobias aisladas de la cavidad oral de 27 monos (*Alouatta palliata* y *Ateles geoffroyi*).

contrario a lo que es de esperar en la cavidad oral humana. Esto pudo ser el resultado de varios aspectos, desde problemas metodológicos inevitables a la hora de tomar la muestra para anaerobios en el campo, hasta dificultades para su transporte al laboratorio. En este sentido, para recoger el material, optamos por utilizar una torunda que se resuspendió rápidamente en solución salina y se inoculó con aguja, en un tubo con atmósfera libre de oxígeno; aquellos anaerobios muy sensibles al oxígeno podrían haber muerto antes de ser inoculados en el medio prerreducido. Dado que el muestreo se realizó en zonas alejadas al laboratorio, debió transcurrir entre 24 y 48 hr antes de que las muestras fueran procesadas en el laboratorio. Como la solubilidad del oxígeno aumenta en refrigeración, los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente, temperatura que puede haber favorecido sólo a unas pocas especies, perjudicando aquellas cuyo ámbito de temperatura óptima de crecimiento fuera más estrecho y muy cercano a los 37° C. Estos inconvenientes no se presentan con las bacterias aerobias, que se conservaron en la solución salina mantenida en hielo hasta su procesamiento en el laboratorio.

No fue posible demostrar la influencia de poblaciones humanas adyacentes a las áreas de muestreo, dado que los géneros bacterianos que se aislaron de monos provenientes de hábitat continuos y de fragmentos de bosque fueron similares. Lo mismo se observó con los patrones de resistencia y multirresistencia antimicrobiana. Sin embargo, esta observación debería corroborarse ampliando el número de animales estudiados, pues 13 de una zona y 14 de la otra podrían ser insuficientes.

Los géneros de *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* están descritos entre los más frecuentes de la cavidad oral humana (Isenberg y D'Amato, 1995) y fueron las bacterias aerobias Gram negativas predominantes en este estudio (Cuadro 1). Los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* son los Gram positivos más frecuentes en la cavidad oral humana (Isenberg y D'Amato, 1995); en este estudio se encontró un predominio de *Staphylococcus*, quizá debido a condiciones metodológicas que pueden haber permitido su sobrecrecimiento, ya que es un género nutricional y fisiológicamente menos exigente que *Streptococcus*.

Se encontraron algunas especies aerobias que no están descritas como habitantes normales de la flora oral humana, como *Acinetobacter*, quinto género en frecuencia entre los aerobios, y *Serratia*, presente en el 11% de las muestras; sin embargo, están descritas como frecuentes en suelos y aguas (Grimont y Grimont, 1984; Juni, 1984), por lo que fácilmente se explica su aislamiento de la cavidad oral de los monos. El género *Pseudomonas*, también presente en el 11% de las muestras, incluye muchas especies ubicuas, que se han aislado de aguas de ríos, suelos y plantas, entre otros, así como de animales (Palleroni, 1984).

Otros géneros menos frecuentes en este estudio y no descritos como pertenecientes a la cavidad oral humana fueron *Citrobacter*, *Chromobacterium* y *Aeromonas* (7% cada uno)

y *Achromobacter* y *Leuconostoc* (4% cada uno). Estos se encuentran presentes en suelos, aguas, plantas, alimentos e incluso algunos se mencionan como habitantes comunes del ambiente en países tropicales (Popoff, 1984; Sakazadi, 1984; Sneath, 1984; Garvie, 1986). La literatura científica no refiere el hábitat natural de *Chryseomonas* y *Aerococcus*, pero señala algunos casos de importancia clínica veterinaria y humana (Evans, 1986; Hall, 2000); su hallazgo en los monos parece indicar que es parte de la flora normal o que se encuentra en suelos, aguas o plantas, tal y como los otros géneros. Debido a que *Aerococcus* requiere de varios factores de crecimiento para su óptimo desarrollo (ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina, purinas y algunos aminoácidos; Evans, 1986) podría ser que su frecuencia en la cavidad oral de los monos fuera mayor que la encontrada en este estudio (4%).

Por otra parte, dentro del grupo de los aerobios, no se aislaron los géneros *Corynebacterium* y *Lactobacillus*, descritos como habitantes de la cavidad oral humana (Isenberg y D'Amato, 1995). Podría ser que estén ausentes en la cavidad oral de monos o bien, que no se hayan aislado por la exigencia nutricional de ambos géneros, ya que requieren aminoácidos específicos, purinas y pirimidinas, vitaminas, entre otros (Collin y Cummins, 1986; Kandler y Weiss, 1986). Aunque *Moraxella* también es habitante usual de la boca de humanos (Isenberg y D'Amato, 1995), desconocemos las razones por las cuales no se aisló en este estudio; sin embargo, en animales sólo se han aislado unas pocas especies (Bovre, 1984).

Los géneros de bacterias anaerobias usuales en la cavidad oral humana incluyen *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella* y bacilos Gram positivos no esporulados: *Actinomyces* y *Eubacterium* (Isenberg y D'Amato, 1995; Engelkirk y Duben-Engelkirk, 2000). De ellos, en este estudio se aislaron con mayor frecuencia *Bacteroides*, *Veillonella* y *Prevotella* y en menor grado *Eubacterium*, *Actinomyces* y *Peptostreptococcus* (Cuadro 2). Respecto a *Gemella*, que se aisló en un 11% de las muestras, no está claro su hábitat natural, pero algunos estudios sugieren que se encuentra en la cavidad orofaríngea humana (Engelkirk y Duben-Engelkirk, 2000); el hallazgo en la boca de los monos parece apoyar esta posibilidad. Otro habitante de la cavidad oral humana, *Fusobacterium*, no se aisló en este estudio, aunque es sabido que sólo unas pocas especies (*F. necrophorum* y *F. naviforme*; Moore *et al.*, 1984) se han aislado con frecuencia.

Por otro lado, el género de anaerobios más frecuente en esta investigación fue *Clostridium*, presente en el 48% de las muestras (Cuadro 2). Aunque este género no está descrito como habitante usual de la boca del hombre (Engelkirk y Duben-Engelkirk, 2000), es fácil explicar que una bacteria frecuente en suelos, como lo es *Clostridium*, pueda llegar hasta la boca de los monos, a través de la ingestión de plantas o aguas contaminadas con las esporas de estas bacterias. Todas las especies que se encontraron – *C. beijerinckii*, *C. bifermentans*, *C. cadaveris*, *C. clostridioforme*,

C. histolyticum, *C. septicum*, *C. sordellii* y *C. sporogenes* – han sido aisladas de suelos costarricenses en una frecuencia que varió desde un 50 hasta un 5% (Rodríguez *et al.*, 1993; Gamboa *et al.*, en prep.).

Muchas de las cepas bacterianas aisladas de los monos presentaron resistencia antimicrobiana y algunos de estos resultados podrían ser alarmantes, principalmente para los bacilos Gram negativos aerobios: 71% de las cepas resistentes a amoxicilina y 63% a cefalotina (Figura 1). Ya ha sido descrito que bacilos Gram negativos aislados de animales salvajes presentan resistencia a antibióticos, a pesar de que no estén en contacto con humanos. Routman *et al.* (1985) encontraron que un 10.7% de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de mandriles africanos no asociados con humanos eran resistentes al menos a un antibiótico. Por otra parte, Rolland *et al.* (1985) encontraron que el 47.5% y el 36% de los coliformes aislados de dos poblaciones de mandriles sin contacto frecuente con humanos presentaban resistencia antimicrobiana, mientras que cuando había contacto con el hombre, el 94.1% de las cepas de esos animales eran resistentes. Estudios con roedores silvestres no expuestos a antibióticos han demostrado que la mayoría de los coliformes eran resistentes a varios antibióticos (Gilliver *et al.*, 1999).

Los cocos Gram positivos, que en su mayoría fueron del género *Staphylococcus*, mostraron una menor resistencia, pues 10 de los 15 antibióticos probados (67%) fueron efectivos contra todas las cepas aisladas. Sin embargo, el 89% fue resistente a la penicilina G y el 28% a la ampicilina más sulbactam. El amplio uso de penicilina en el tratamiento de infecciones humanas, además del uso en elevadas concentraciones en ganadería y agricultura, pudo contribuir a generar esta alta resistencia, debida no sólo a la producción de beta lactamasas, sino a otros mecanismos, pues el 28% de las cepas aún continúan comportándose como resistentes con el empleo de sulbactam, inhibidor de dicha enzima.

Numerosos estudios han demostrado que la resistencia antibacteriana en los anaerobios ocurre en diversos géneros (Engelkirk y Duben-Engelkirk, 2000), no sólo por mutación sino además por transmisión horizontal entre microorganismos de suelos y aguas (Shoemaker *et al.*, 2001). En este estudio, las cepas anaerobias también mostraron resistencia hacia varios de los antibióticos probados, siendo mayor hacia el metronidazole (49%, Figura 1), medicamento antiprotozoario que además ha demostrado ser efectivo contra infecciones por bacterias anaerobias. Sin embargo, debido a su amplio uso, han surgido cepas resistentes tanto de animales como de humanos (Diniz *et al.*, 2000). Un 44% de las bacterias Gram negativas y un 43% de las Gram positivas fueron resistentes, acorde con el patrón que se ha venido observando, pero contrario a Boyanova y colaboradores (2000) quienes encontraron sólo un 3% de cepas Gram negativas resistentes a este agente. En general, la resistencia de todas las cepas anaerobias hacia la penicilina fue de 31% (Figura 2), aunque ésta fue mayor en Gram negativas (39%) que en Gram positivas (24%), lo que es esperable de

acuerdo con su mecanismo de acción y su amplio uso. La resistencia a la penicilina en algunos grupos de anaerobios ha ido aumentando, así el 16-26% de *Clostridium* (Engelkirk *et al.*, 1992), el 50% de *Prevotella* (Hecht, 1999) y el 65% de *Bacteroides* (Engelkirk *et al.*, 1992) son resistentes a este antibiótico, especialmente por la producción de beta lactamasas. Otros grupos, como bacilos Gram positivos no esporulados y *Peptostreptococcus*, continúan siendo altamente sensibles (Hecht, 1999).

El 28% de las cepas aisladas fueron resistentes hacia la clindamicina (Figura 2), lo cual es preocupante dado que este antibiótico es ampliamente utilizado para el tratamiento de infecciones clínicas por anaerobios. Aunque Boyanova y colaboradores (2000) informan que ninguna bacteria Gram negativa anaerobia es resistente a clindamicina, Engelkirk y colaboradores (1992) informan que menos del 10% de los Gram negativos y el 19.6% de los Gram positivos son resistentes. Otros estudios confirman esta observación: un 6% de bacilos Gram positivos no esporulados y un 16% de *Peptostreptococcus* son resistentes a la clindamicina (Rodloff *et al.*, 1999). En nuestro estudio tres de los bacilos Gram negativos fueron resistentes a este antibiótico, lo que acentúa aún más la preocupación de que cepas difíciles de tratar provenientes de animales silvestres, puedan llegar a causar infecciones clínicas en humanos.

Al analizar los datos de resistencia múltiple, se observó que cepas de todos los grupos bacterianos la presentaron; aún así la mayoría de las bacterias fueron resistentes sólo a dos, tres o cuatro antibióticos y pocas a más de cuatro. Con respecto a los Gram negativos aerobios se pudo notar que el 80% de las cepas mostró resistencia múltiple, que incluyó desde resistencia sólo a dos antibióticos hasta nueve; la mayoría de las cepas (41%) fue resistente sólo a tres o cuatro. Por el contrario, sólo el 39% de los estafilococos mostró resistencia múltiple y además las cepas fueron resistentes a un máximo de tres antibióticos. La multiresistencia en bacterias anaerobias fue intermedia entre estos dos grupos, pues el 49% de las cepas de bacterias anaerobias mostró multiresistencia, encontrándose cepas resistentes hasta seis drogas. Estos resultados son alarmantes, pues tradicionalmente se ha creído que la resistencia múltiple no es un problema común en bacterias anaerobias.

El uso indiscriminado de antibióticos no sólo en medicina humana, sino también en la agricultura y ganadería, facilita el desarrollo de resistencia a los antibióticos (Sosa, 2000; Thompson y Kla, 2000); los aerosoles pueden desplazarse grandes distancias y alcanzar árboles o plantas que sirven de alimento a animales silvestres como los monos. Son bien conocidas las limitaciones de los entes reguladores en América Latina y el Caribe respecto al uso de medicamentos (Fefer, 2000); Costa Rica no es la excepción y no cuenta con legislación que controle el uso no médico de los antibióticos, por lo que suponemos que en nuestro medio las cepas bacterianas de los animales están sometidos a una presión de selección que favorece el desarrollo y persistencia de resistencia. El agua también puede ser un vehículo facilitador de

la resistencia, pues se han encontrado genes bacterianos de resistencia en aguas subterráneas cercanas a sitios donde se usan antibióticos en la crianza de cerdos como promotores de crecimiento. Algunos de los sitios de muestreo de este estudio estuvieron cerca de criaderos de cerdos de este tipo, lo que contribuye a explicar el frecuente aislamiento de cepas resistentes. Además, actualmente en Costa Rica ninguno de los hospitales del sector público cuenta con sistemas de tratamiento de aguas residuales, las cuales son vertidas directamente en el alcantarillado sanitario o en cuerpos de aguas superficiales; en ambos casos, estas aguas llegarán a afluentes mayores sin ningún tratamiento (Tzoc, 2002). Aunque regularmente los monos no bajan a tomar agua a los ríos, otros animales que conviven con ellos sí lo hacen, lo que puede contribuir a extender el fenómeno de la resistencia antimicrobiana; los resultados de esta investigación apoyan esta hipótesis.

Este estudio constituye el primer informe sobre la flora bacteriana oral de monos en Costa Rica y es una contribución importante para el conocimiento y preservación de estos animales. Además, es una evidencia de que el uso indiscriminado de antimicrobianos y el desarrollo de resistencia no se limita a la clínica humana, sino que compromete todo su entorno.

Agradecimientos: Agradecemos a Pablo Vargas y Martín Quesada por su valiosa ayuda técnica y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo económico.

María del Mar Gamboa-Coronado, Evelyn Rodríguez-Cavallini, Galia Rojas-Contreras, Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, **Ronald Sánchez-Porras,** Programa de Investigaciones del Bosque Premontano (PIBP), Sede de Occidente, Universidad de Costa Rica y **Gustavo Gutiérrez-Espeleta,** Escuela de Biología e Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica. *Correspondencia:* Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, Centro América.

Referencias

- Bovre, K. 1984. Genus II. *Moraxella*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.296-303. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Boyanova, L., Petrov, D., Osmanliev, D., Mitov, I., Usunova, I., Minchev, T., Goranov, E., Plochev, M. y Dimitrov, J. 2000. Anaerobic bacteriology in 75 cases of thoracic empyema in Sofia, Bulgaria. *Anaerobe* 6: 81-85.
- Collin, M. D. y Cummins, C. S. 1986. Genus *Corynebacterium*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, P. H. A. Sneath (ed.), pp.1266-1276. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Diniz, C. G., Santos, S. G., Pestana, C. N., Farias, L. M. y Carvalho, M. A. 2000. Chromosomal breakage in the *Bacteroides fragilis* group induced by metronidazole treatment. *Anaerobe* 6: 149-53.
- Elizondo, L. 1999. "*Ateles geoffroyi*". En: Unidades básicas de infomación del INBio (<<http://darnis.inbio.ac.cr/ubis/>>).
- Engelkirk, P. G. y Duben-Engelkirk, J. 2000. Anaerobes of clinical importance. En: *Diagnostic Microbiology*, 2^{nda} edición, C. R. Mahon y G. Manuselis (eds.), pp.565-622. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Engelkirk, P. G., Engelkirk, J. D. y Dowell, V. R. 1992. *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology, Susceptibility Testing*. Star Publishing Co., Belmont.
- Evans, J. B. 1986. Genus *Aerococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, P. H. A. Sneath (ed.), p. 1080. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Fefer, E. 2000. Uso racional de medicamentos: Políticas, reglamentación y normas regionales. En: *Resistencia Antimicrobiana en las Américas: Magnitud del Problema y su Contención*, R. Salvatierra-González y Y. Benguigui, (eds.), pp.211-219. Organización Pan-Americano del Salud, Washington, DC.
- Garvie, E. I. 1986. Genus *Leuconostoc*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, P. H. Sneath (ed.), pp.1071-1075. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Gilliver, M. A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S. M. y Hart, C. A. 1999. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature, Lond.* 401: 233.
- Grimont, P. A. y Grimont, F. 1984. Genus VIII. *Serratia*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.477-486. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hall, G. S. 2000. Nonfermenting Gram-negative bacilli and miscellaneous Gram-negative rods. En: *Diagnostic Microbiology* 2^{nda} edición, C. R. Mahon y G. Manuselis (eds.), pp.539-563. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Hecht, D. W. 1999. Susceptibility testing of anaerobic bacteria. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 7^a edición, P. R. Murray (ed.), pp.1555-1562. ASM Press, Washington DC.
- Isenberg, H. D. y D'Amato, R. F. 1995. Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 6^a edición, P. R. Murray (ed.), pp.5-18. ASM Press, Washington, DC.
- Juni, E. 1984. Genus III. *Acinetobacter*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.303-307. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kandler, O. y Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2., P. H. Sneath (ed.), pp.1209-1234. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Moore, W. E., Holdeman, L. V. y Kelley, R. W. 1984. Genus II. *Fusobacterium*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.631-637. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.141-199. Williams & Wilkins, Baltimore.

- Popoff, M. 1984. Genus III. *Aeromonas*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.545-548. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Reid, W., Laird, S., Meyer, C., Gámez, R., Sittenfeld, A., Janzen, D., Gollin, M. y Juma, C. 1994. *La Prospección de la Biodiversidad*. Editorial INBio, San José.
- Rodloff, A. C., Hillier, S. L. y Moncla, B. J. 1999. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 7ª edición, P. R. Murray (ed.), pp.672-689. ASM Press, Washington, DC.
- Rodríguez, E., Gamboa, M. M. y Fernández, B. 1993. Clostridios mesófilos en suelos de la Meseta Central de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 41: 365-369.
- Rolland, R. M., Hausfater, G., Marshall, B. y Levy, S. B. 1985. Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: Increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 791-794.
- Routman, E., Miller, R. D., Phillips-Conroy, J. y Hartl, D. L. 1985. Antibiotic resistance and population structure in *Escherichia coli* from free-ranging African yellow baboons. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 749-754.
- Sakazaki, R. 1984. Genus IV. *Citrobacter*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.458-461. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Sánchez, R. 1991. Utilización del hábitat, comportamiento y dieta del mono congo (*Alouatta palliata*) en un bosque premontano húmedo. Tesis de maestría, Universidad Nacional, Costa Rica.
- Shoemaker, N. B., Vlamakis, H., Hayes, K. y Salyers, A. A. 2001. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 561-568.
- Sneath, P. H. A. 1984. Genus *Chromobacterium*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), pp.580-582. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Sosa, A. 2000. La Alianza para el uso prudente de los antibióticos. Resistencia a los antibióticos en América Latina. En: *Resistencia Antimicrobiana en las Américas: Magnitud del Problema y su Contención*, R. Salvatierra-González y Y. Benguigui (eds.), pp.258-260. Organización Pan-Americano del Salud, Washington, DC.
- Thompson, S. R. y Kla, J. M. 2000. Uso veterinario de antimicrobianos en la producción pecuaria en América del Norte, América Latina y el Caribe. En: *Resistencia Antimicrobiana en las Américas: Magnitud del Problema y su Contención*, R. Salvatierra-González y Y. Benguigui (eds.), pp.261-267. Organización Pan-Americano del Salud, Washington, DC.
- Tzoc, E. 2002. Influencia de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. en el cuerpo receptor. Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Vergeest, F. 1992. The influence of tourism on the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*) in Cabo Blanco, Costa Rica. Report 3031, Wageningen Agricultural University, Wageningen.

NEWS

ADDITIONAL RECORDS OF PRIMATES IN THE SERRA DOS ÓRGÃOS NATIONAL PARK

In early 2003, I reported on the primates of the Serra dos Órgãos National Park (Cunha, 2003). Here I record some further observations I have made in the park on muriquis (*Brachyteles arachnoides*), capuchin monkeys (*Cebus nigritus*), and the buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*).

At 07:30 on 19 September, 2003, I saw a group of at least 16 adults and subadults of *Brachyteles arachnoides* (not including infants carried by females) crossing the same valley where I observed three individuals in August 2003 (Cunha, 2003). The valley ranges from 1600 m to 1800 m a.s.l., and is thus the highest altitude recorded for the species (see Grelle, 2000). Garcia and Andrade Filho (2002) saw muriquis walking along a rocky outcrop in the park, and indicated that it was in the high-altitude grassland (*campos de altitude*) above 2000 m, although they were unable to be precise. Rocky outcrops as they described are common from 700 m to above 2200 m, and they may have been mistaken. The group I observed would appear to be what Garcia and Andrade Filho (2002) reported as two separate groups of 6 and 9 individuals. When their field team made its survey, the group may have been temporarily divided; it is the only one recorded to date in the park. Researchers from the IPÊ – Instituto de Pesquisas Ecológicas (<<http://www.ipe.org.br>>) are studying this group. According to local residents, another group of muriquis may exist in the region of Vargem Grande, in or near the recently created Três Picos State Park (see Table 1 in Cunha, 2003). Every effort should be made to locate this group and establish if they are connected with the Serra dos Órgãos group. I suspect they are not, due to the BR-116 highway which runs between these two almost contiguous protected areas.

At 10:20 on 8 February, 2004, I observed a group of at least five *Callithrix aurita*, including one juvenile, around a small cultivated plot near the park's administrative headquarters (22°27'04" S, 42°59'03" W; 950 m a.s.l.). The marmosets had a reddish-chestnut coloration on their backs, as described by Auricchio (1995). I noted the pre-auricular white tufts in only one individual. *C. aurita* is naturally rare throughout its range, as noted even by Schirch (1931) more than 70 years ago. Its occurrence in the park is significant, and implies that it may occur in other protected areas in the Serra dos Órgãos. *C. penicillata* has been seen in the park (Cunha, 2003), and *C. jacchus* also occurs in the region. Given their potential to hybridize (see Coimbra-Filho *et al.*, 1993), more detailed studies should be conducted to know if and how the buffy-tufted-ear marmosets, which are listed as Vulnerable (Bergallo *et al.*, 2000; Rylands and Chiarello, 2003) are ecologically and/or genetically threatened by their introduced congeners.