

FLORA BACTERIANA DE LA CAVIDAD ORAL DEL MONO TITÍ (*SAIMIRI OERSTEDII*) Y SU PERFIL DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Carlos E. Rodríguez-Rodríguez¹, Evelyn Rodríguez-Cavallini¹, María del Mar Gamboa-Coronado¹, Silvia Jiménez-Cuadra¹, Ronald Sánchez-Porras² y Gustavo A. Gutiérrez-Espeleta³

¹Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

²Programa de Investigaciones del Bosque Premontano, Sede de Occidente, Universidad de Costa Rica.

³Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

Resumen

Se estudió la flora bacteriana y su patrón de sensibilidad antimicrobiana en la cavidad oral de 33 monos *Saimiri oerstedii*: 31 silvestres y 2 en cautiverio. Con torunda estéril se rasparon los dientes y la cavidad bucal de cada mono y se resuspendió en 2 mL de solución salina estéril (0.85%); se prepararon tubos de transporte para cultivos aerobios y anaerobios y una vez en el laboratorio, se inocularon placas de agar sangre que se incubaron en aerobiosis y anaerobiosis. Los aislamientos se identificaron con sistemas miniaturizados API® (20NE, Staph y 20A); las determinaciones de la sensibilidad a los antibióticos se realizaron con galerías ATB® (G5, Staph y ANA). Se aislaron 137 cepas bacterianas: 106 aerobias (77.4%) y 31 anaerobias (22.6%). El predominio fue de bacilos Gram negativos aerobios (100 cepas), siendo *Enterobacter* el género más frecuente (42%), seguido de *Burkholderia* y *Aeromonas* (27% c/u); los anaerobios más comunes fueron *Clostridium* (36%) y *Fusobacterium* (12%). Estos resultados revelan semejanzas y diferencias con respecto a la flora oral humana y la de otros monos costarricenses; la alta frecuencia de algunos géneros sugiere que son parte de la flora oral de monos y no contaminación secundaria de bacterias del suelo. El 90% de los bacilos Gram negativos aerobios fue resistente a cefalotina y el 89% a cefoxitina; altas tasas de resistencia se presentaron también ante otras drogas; solamente ceftriaxone y pefloxacina fueron efectivos contra todas las cepas analizadas; sólo dos cepas fueron sensibles a todos los antibióticos evaluados. El mayor porcentaje de resistencia en anaerobios ocurrió ante el metronidazole (26 a 35%) seguido por cefotetán (26%) y clindamicina (23%); el 39% de los aislamientos fue sensible a todos los antibióticos evaluados. La resistencia múltiple fue menor en los anaerobios (26%) que en los aerobios (77%). Este estudio contribuye al conocimiento y a la preservación del mono tití, especie amenazada, y muestra que pocas barreras son capaces de contener los genes de resistencia y sus hospederos bacterianos, aun en animales silvestres.

Palabras Clave: *Saimiri oerstedii*, Costa Rica, flora bacteriana oral, resistencia antimicrobiana

Abstract

The bacterial microflora present in the oral cavity of 33 squirrel monkeys (*Saimiri oerstedii*, 31 wild and 2 captive) and its antimicrobial sensibility was studied. A sterile swab was used to scratch the teeth and oral cavity of every monkey; each sample was resuspended in 2 mL sterile saline solution (0.85%). Transport tubes for aerobic and anaerobic cultures inoculated with these samples were sent to the laboratory. Each sample was inoculated in blood agar plates that were incubated in aerobic and anaerobic conditions. Isolates obtained were identified with API™ galleries (20NE, Staph and 20A) and the sensibility determinations were done using ATB galleries (-G5, -Staph and -ANA). A total of 137 strains were isolated: 106 aerobes (77.4%) and 31 anaerobes (22.6%). Gram negative bacilli were predominant, with *Enterobacter* the most frequent genus (42%), followed by *Burkholderia* and *Aeromonas* (27% each). The most frequent anaerobes were *Clostridium* (36%) and *Fusobacterium* (12%). These results show similarities and differences with the bacteria of the oral cavity of humans and of other Costa Rican monkeys. The high frequency of some genera suggests that they are part of the oral flora of the monkeys and not contaminants from the soil. Ninety percent of the Gram negative aerobe bacilli were resistant to cephalotin and 89% to cefoxitine. High resistance rates were obtained with other agents; only two strains were sensitive to every antibiotic tested. In anaerobes the higher antibiotic resistance was observed with metronidazole (26–35%), cefotetan (20%) and clindamycin (23%), 39% of the strains were sensitive to every antibiotic tested; multiple resistance was lower in the anaerobes (26%) than in the aerobes (77%). This study contributes to the knowledge and preservation of the squirrel monkey, a threatened species, and demonstrates that there are few barriers to the spread of resistant genes in bacteria, even in wild animals.

Key Words: *Saimiri oerstedii*, Costa Rica, antimicrobial resistance, oral bacterial flora

Introducción

El mono tití (*Saimiri oerstedii*) habita en los bosques de Costa Rica y Panamá (Wong, 1990), y es considerada una especie amenazada (IUCN, 2007). Otras especies del género se encuentran en América del Sur, en un área limitada por Colombia al oeste y la cuenca del Amazonas y las Guayanas al este (Wong, 1990). En Costa Rica existen dos subespecies de este género: *S. oerstedii oerstedii* y *S. oerstedii citrinellus*; ambas se consideran en peligro de extinción, principalmente por la pérdida de su hábitat, el desarrollo de infraestructura hotelera y por su captura y venta como mascotas (Carrillo *et al.*, 2000). *S. oerstedii* es el mono de menor tamaño de Costa Rica y se encuentra en bosques primarios, secundarios y en áreas cultivadas; los Parques Nacionales Manuel Antonio y Corcovado son los reservorios más importantes. Es de conducta arborícola y diurna y se alimenta durante las primeras horas de la mañana, principalmente de insectos (75–80% de la dieta) y frutas (Campbell *et al.*, 2003).

La cavidad oral de los animales, al igual que la de los humanos, es uno de los hábitats microbiológicos más complejos y heterogéneos. La flora bacteriana incluye tanto anaerobios estrictos como *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Actinomyces* sp. y aerobios facultativos como *Corynebacterium* sp., *Haemophilus* sp., *Moraxella* sp. y *Neisseria* sp. (Sorum y Sunde, 2001). Dicha flora indígena contiene genes de resistencia a antibióticos, incluso en individuos sin historia de exposición a antimicrobianos preparados comercialmente (Sorum y Sunde, 2001). Son necesarios nuevos estudios en la flora normal de animales para determinar si su resistencia está directamente relacionada con el dramático incremento en la resistencia de patógenos (Sorum y Sunde, 2001). Las escasas investigaciones relacionadas con la flora normal de monos se han llevado a cabo principalmente en el mono rhesus (*Macaca mulatta*) (Bowers *et al.*, 2002), mientras que en Costa Rica se efectuó un estudio relacionado con la flora oral de los monos congo (*Alouatta palliata*) y colorado (*Ateles geoffroyi*) (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). En el presente trabajo se describe la flora bacteriana de la cavidad oral de *S. oerstedii* así como su patrón de sensibilidad, para compararlos con los de otros monos de Costa Rica y establecer la posible influencia del hombre en la adquisición de resistencia antimicrobiana.

Métodos

Se estudiaron 33 muestras de la cavidad oral de monos de la especie *Saimiri oerstedii*; 31 monos se capturaron en estado silvestre de cuatro zonas de Costa Rica: Parque Nacional Manuel Antonio (09°23'N, 84°07'O), Parque Nacional Corcovado (08°28'N, 83°35'O), Isla Damas (09°30'N, 84°15'O) y Golfito (08°36'N, 83°04'O), utilizando una cerbatana para el lanzamiento de dardos (Pneudart, Inc.) que contenían cada uno 0.3–0.4 mL de Zolazepam, conocido comercialmente como Zoletil®. Las muestras de los dos monos restantes fueron obtenidas de individuos que

permanecían en cautiverio desde hace dos años en un zoológico. Con una torunda estéril se rasparon los dientes y la cavidad bucal de cada uno de los monos previamente sedados, y se resuspendió la muestra en un tubo con 2 mL de solución salina estéril (SSE). Asépticamente y con jeringa estéril se inoculó 0.5 mL de la suspensión en un tubo con medio carne cocida (CC) prerreducido. Durante el transporte hasta el laboratorio los tubos con la suspensión en SSE se mantuvieron en frío, mientras que los de CC se mantuvieron a temperatura ambiente. A cada uno de los tubos con SSE se les agregó 2 mL de caldo tripticasa soya (CTS) y se incubaron a 35°C por 24 horas; los tubos con CC prerreducidos se incubaron a 35°C por 48 horas. A partir de cada tubo con CTS se rayó una placa de agar sangre (AS) y se incubó a 35°C por 24 horas para el aislamiento de bacterias aerobias. A partir de cada tubo con CC prerreducido se rayó una placa de AS y se incubó a 35°C por 48 horas en jarra de anaerobiosis para el aislamiento de bacterias anaerobias. Se seleccionaron los diferentes morfotipos coloniales de cada placa, se les realizó tinción de Gram y se subcultivaron en placas de AS para obtener cultivos puros. Se determinó la tolerancia al oxígeno de cada cepa aislada a través de la inoculación de dos placas de AS, una incubada en atmósfera incrementada de CO₂ y otra en jarra de anaerobiosis (35°C por 48 horas). Se seleccionaron como bacterias anaerobias aquellas cuyo crecimiento fue exclusivo o mejor en condiciones de anaerobiosis.

A las cepas bacterianas aerobias se les realizaron pruebas de Gram, oxidasa y catalasa, con el objetivo de agrupar las bacterias como enterobacterias, bacilos Gram negativos no enterobacterias, estafilococos y estreptococos. Con base en los resultados se seleccionó la galería miniaturizada de pruebas bioquímicas apropiada para la identificación; se emplearon los sistemas API 20E®, API 20NE®, y API Staph®, mientras que para las bacterias anaerobias se utilizaron las galerías API 20A®. Las identificaciones se realizaron con el programa API-Plus®. Para determinar la sensibilidad a los antibióticos se emplearon galerías comerciales ATB® de acuerdo con el tipo de bacteria aerobia (ATB-G5 y ATB-Staph); en el caso de las bacterias anaerobias se utilizó el sistema ATB-ANA. Todas las galerías se incubaron y leyeron de acuerdo con las recomendaciones de la casa fabricante (bioMérieux®).

Resultados

A partir de 33 muestras de la cavidad oral de los monos tití se aislaron 137 cepas; 106 de bacterias aerobias (77.4%) y 31 de anaerobias (22.6%), lo que equivale a un promedio de 3.2 aerobios y 0.9 anaerobios por muestra. En las bacterias aerobias predominaron los bacilos Gram negativos (100 de 106 cepas aerobias), donde el género más frecuente fue *Enterobacter* (20 cepas), que se aisló del 42% de las muestras e incluyó las especies *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *E. sakazakii*. En frecuencia le siguieron los géneros *Burkholderia* (19 cepas) y *Aeromonas* (10 cepas), los cuales se aislaron del 27% de las muestras. Se identificaron cepas de otros 20 géneros de bacilos Gram negativos (Tabla 1). Las seis cepas de bacterias

aerobias Gram positivas fueron de los géneros *Staphylococcus* (tres cepas: *S. sciuri*, *S. xylosus* y *S. auricularis*) y *Bacillus* sp. (tres cepas). En las 31 bacterias anaerobias (Tabla 2) se identificaron 17 bacilos Gram positivos (géneros *Clostridium* y *Propionibacterium*), ocho bacilos Gram negativos (géneros *Fusobacterium*, *Bacteroides* y *Prevotella*), cuatro cocos Gram positivos (géneros *Gemella* y *Peptostreptococcus*) y dos cocos Gram negativos (género *Veillonella*). El género

anaerobio más comúnmente aislado fue *Clostridium* (16 cepas), a partir del 36% de las muestras, con representantes de las especies *C. bifermentans*, *C. clostridioforme*, *C. perfringens*, *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*.

Tabla 1. Bacilos Gram negativos aerobios aislados de la cavidad oral de 33 monos tití (*Saimiri oerstedii*) de Costa Rica.

Género	Total de cepas n = 100	Frecuencia de aislamiento (%) n = 33
<i>Enterobacter</i>	20	42
<i>Burkholderia</i>	19	27
<i>Aeromonas</i>	10	27
<i>Serratia</i>	8	18
<i>Klebsiella</i>	6	15
<i>Citrobacter</i>	6	12
<i>Pseudomonas</i>	4	12
<i>Acinetobacter</i>	3	9
<i>Chryseomonas</i>	3	9
<i>Vibrio</i>	3	9
<i>Brevundimonas</i>	2	6
<i>Morganella</i>	2	6
<i>Pantoea</i>	2	6
<i>Ralstonia</i>	2	6
<i>Flavimonas</i>	2	3
<i>Agrobacter</i>	1	3
<i>Alcaligenes</i>	1	3
<i>Chromobacterium</i>	1	3
<i>Khuyvera</i>	1	3
<i>Leclercia</i>	1	3
<i>Ochrobacter</i>	1	3
<i>Pasteurella</i>	1	3
<i>Stenotrophomonas</i>	1	3

Tabla 2. Bacterias anaerobias aisladas de la cavidad oral de 33 monos tití (*Saimiri oerstedii*) de Costa Rica.

Género	Total de cepas n = 31	Frecuencia de aislamiento (%) n = 33
<i>Clostridium</i>	16	36
<i>Fusobacterium</i>	4	12
<i>Bacteroides</i>	2	6
<i>Gemella</i>	2	6
<i>Peptostreptococcus</i>	2	6
<i>Prevotella</i>	2	6
<i>Veillonella</i>	2	6
<i>Propionibacterium</i>	1	3

En las pruebas de sensibilidad a los antibióticos (Fig. 1), el 90% de los bacilos Gram negativos fue resistente a la cefalotina y el 89% a la cefoxitina, cefalosporinas de primera y segunda generación respectivamente. Otras cefalosporinas presentaron menores porcentajes de resistencia microbiana: cefuroxima (69%, 2° generación), ceftazidima 1 mg·L⁻¹ (61%, 3° generación), cefepima (10%, 4° generación) y cefotaxima, ceftazidima 8–16 mg·L⁻¹ y ceftriaxone, todas de tercera generación, con porcentajes inferiores al 10%. Altas tasas de resistencia se presentaron también ante amoxicilina, tobramicina y amoxicilina + ácido clavulánico (Fig. 1). Ocho de los antimicrobianos demostraron porcentajes de resistencia de 10–40%, mientras que nueve estuvieron por debajo del 10%, dentro de los cuales solamente ceftriaxone y pefloxacina fueron efectivos contra todas las cepas analizadas. Por su parte, las tres cepas de *Staphylococcus* fueron resistentes a penicilina, cefalotina, ampicilina + sulbactam, eritromicina, clindamicina, nitrofurantoína, rifampicina, vancomicina y teicoplanina.

En las cepas anaerobias también se presentó resistencia a varios antibióticos (Fig. 2); el mayor porcentaje de resistencia ocurrió ante el metronidazole, 26 a 35% según su concentración, seguido por cefotetán (26%), clindamicina (23%) y penicilina (19%). Se presentó un bajo porcentaje de resistencia ante antibióticos como amoxicilina, cefoxitina, ticarcilina y amoxicilina + ácido clavulánico (4/8 mg·L⁻¹). De las 16 concentraciones de antibióticos evaluadas, seis (37.5%) fueron efectivas contra todas las cepas identificadas: amoxicilina + ácido clavulánico (16/2 mg·L⁻¹), cloranfenicol, imipenem, piperacilina, piperacilina + tazobactam y ticarcilina + ácido clavulánico.

Se presentaron casos de cepas multirresistentes tanto en bacterias aerobias como anaerobias. De los bacilos Gram negativos aerobios, el 3% fue resistente a 16–19 antibióticos, el 3% a 13–15, el 13% a 10–12, el 21% a 7–9, el 37% a 4–6, el 21% a 1–3, y sólo dos cepas fueron sensibles a todos los antibióticos evaluados. La multirresistencia del género *Staphylococcus* fue alta, ya que las tres cepas fueron resistentes a entre 10 y 12 de los 15 antibióticos evaluados; la pefloxacina, ciprofloxacina y tetraciclina fueron los únicos antibióticos efectivos contra todas las cepas. En el caso de las bacterias anaerobias, la resistencia múltiple fue menor pues el 35% fue resistente sólo a uno ó dos antimicrobianos, el 10% presentó resistencia a 3–4 y el 16% a 5–7 antibióticos, mientras que el 39% fue sensible a todos los antibióticos evaluados.

Discusión

Actualmente es escaso el conocimiento disponible sobre la flora bacteriana oral de monos y en particular de la

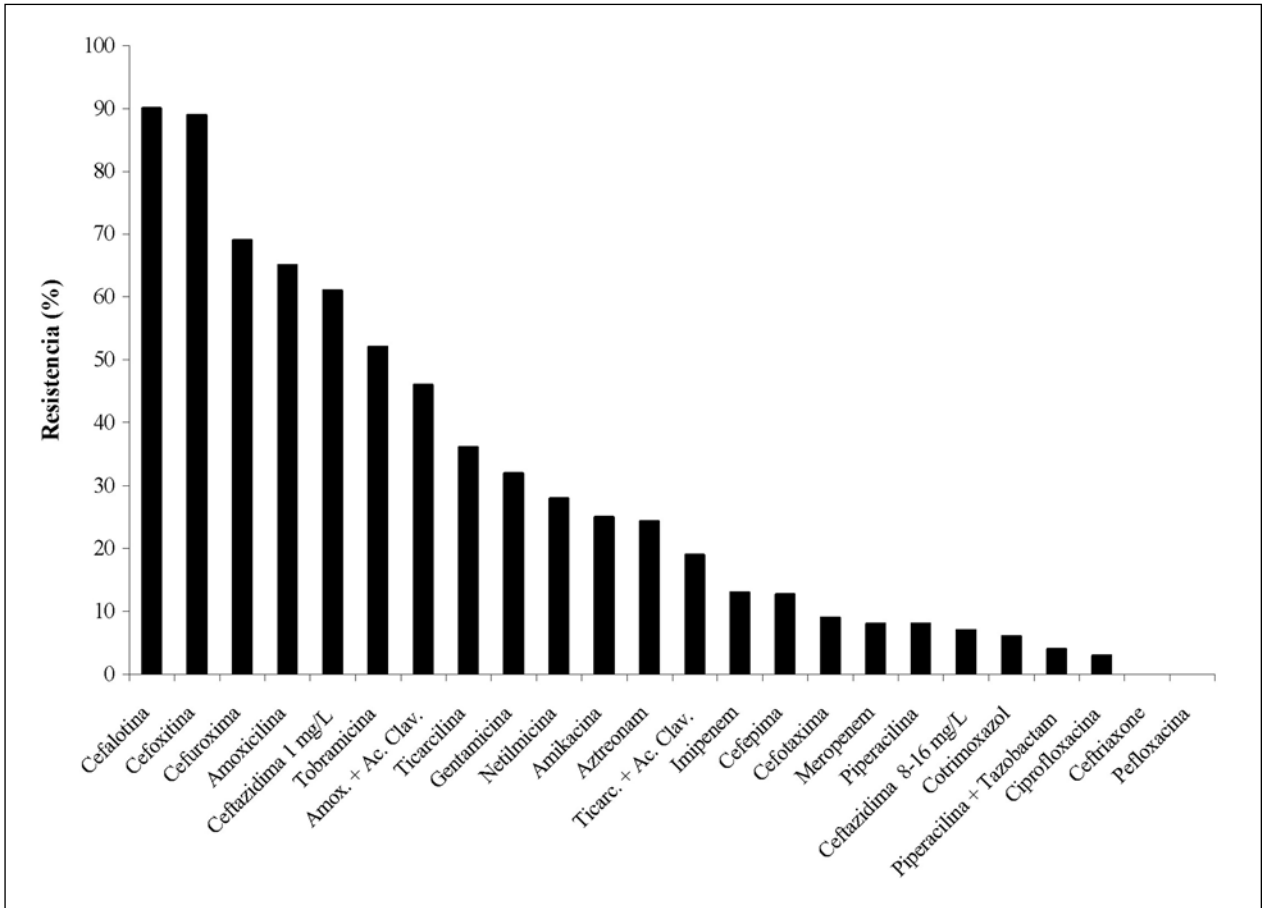


Figura 1. Resistencia antimicrobiana de 100 bacilos Gram negativos aerobios aislados de la cavidad oral de 33 monos titi (*Saimiri oerstedii*) de Costa Rica.

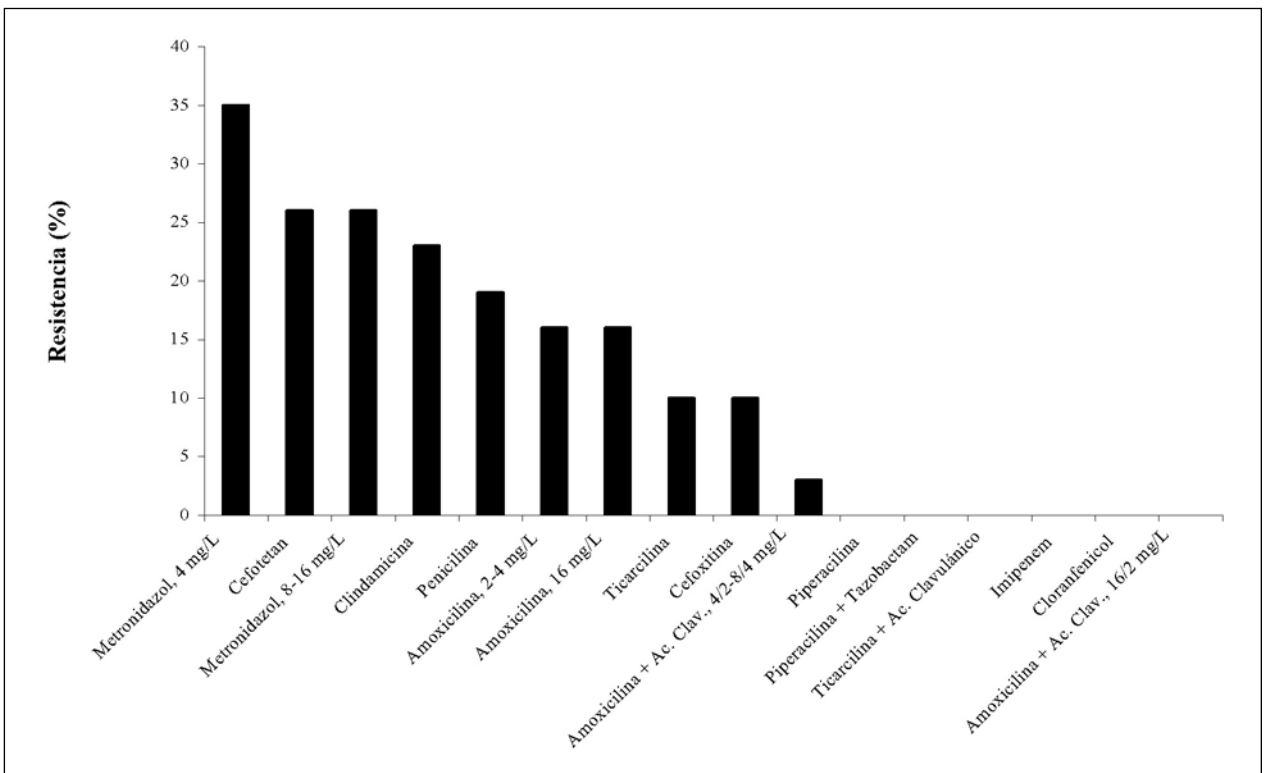


Figura 2. Resistencia antimicrobiana de 31 bacterias anaerobias aisladas de la cavidad oral de 33 monos titi (*Saimiri oerstedii*) de Costa Rica.

especie *Saimiri oerstedii*. Investigaciones previas en Costa Rica fueron realizadas en *Alouatta palliata* (mono congo) y *Ateles geoffroyi* (mono colorado) (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004), por lo que el presente estudio permite realizar comparaciones entre la flora oral de diferentes especies de monos, así como comparaciones con la flora humana.

Se logró aislar un promedio de 4.1 cepas por muestra, sin embargo se encontró mayor cantidad de aerobios (3.2 por muestra) que de anaerobios (0.9 por muestra), a diferencia de los patrones esperados en la cavidad oral humana, donde la proporción favorece a las bacterias anaerobias. Este resultado pudo deberse a factores relacionados con las dificultades de la toma de muestras para anaerobios y el transporte de las mismas al laboratorio. Para tomar la muestra se empleó una torunda que se suspendió en solución salina y posteriormente dicha suspensión se inóculo en tubos prerreducidos, es decir con atmósfera libre de oxígeno; los anaerobios más sensibles pudieron haber perdido su viabilidad durante dicho procedimiento. Como los muestreos fueron realizados en zonas alejadas, debió transcurrir un tiempo prolongado (generalmente de 24 a 48 horas) antes de que las muestras fueran procesadas en el laboratorio. Durante el transporte los tubos en anaerobiosis debieron mantenerse a temperatura ambiente, con el objetivo de disminuir la solubilidad del oxígeno en el medio, que aumenta al bajar la temperatura; es por esto que no se transportaron en refrigeración como las muestras para aerobios. Dicha práctica pudo perjudicar la viabilidad de las especies de anaerobios con ámbitos estrechos de temperatura permisivos para el crecimiento, cercanos a las condiciones de la cavidad oral de los monos. Tales inconvenientes pudieron provocar la disminución en la recuperación de cepas de bacterias anaerobias.

Flora aerobia

El género más frecuentemente aislado fue *Enterobacter*, que está descrito como uno de los predominantes en la cavidad oral humana (Isenberg y D'Amato, 1995) y que fue también descrito como el más abundante en la cavidad bucal de los monos congo y colorado (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). Otras enterobacterias encontradas fueron *Serratia*, *Klebsiella* y *Citrobacter* con frecuencias de aislamiento entre el 12% y el 18%; si bien todas han sido aisladas de la cavidad bucal de los monos congo y colorado (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004), *Serratia* no se ha descrito como habitante de la flora oral humana, sino que está asociada a superficies de plantas, suelo, semillas y agua (Grimont y Grimont, 2005), lo que podría explicar su presencia en el mono tití.

El segundo género de aerobios más frecuentemente aislado fue *Burkholderia* (todas las cepas identificadas como *B. cepacia*), no descrito como habitante común de la boca humana ni encontrado en los monos congo y colorado. Esta bacteria se ha aislado de suelo, plantas, superficie de animales, rizosfera y aguas (Coenye y Vandamme, 2003; Ramette *et al.*, 2005). *Aeromonas* fue el tercer género aerobio en abundancia y aunque no se asocia a la boca humana, sí se ha

informado en bajas frecuencias en monos congo y colorado (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004) y se ha aislado principalmente de fuentes de agua y aguas negras (Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* estuvieron presentes, respectivamente, en el 12% y 9% de las muestras y han sido aislados de otros monos (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004), pero no se consideran flora normal de la cavidad oral humana. Ambos incluyen muchas especies ubicuas, aisladas de suelos, ríos, plantas y animales, entre otros (Juni, 2005; Palleroni, 2005).

Chryseomonas fue aislado en un 9% de las muestras y aunque su presencia en el ambiente es dudosa, este género es aparentemente saprófito o comensal de humanos y algunos animales de sangre caliente (Palleroni, 2005). Con igual frecuencia se aisló *Vibrio*, siendo todas las cepas identificadas como *V. parahaemolyticus*; esta especie se encuentra en ambientes acuáticos, pero parece estar limitada a estuarios o áreas costeras debido a su requerimiento de 1–8% de NaCl. Se asocia a animales marinos (Carnahan y Andrews, 2000), por lo que su aparición en el mono podría estar asociada a hábitos alimenticios o de consumo de agua, tomando en cuenta que los sitios de muestreo están localizados cerca de zonas marítimas. Este género ha sido descrito como parte de la microbiota subgingival de la especie *Saimiri sciureus* (Beem *et al.*, 1991).

En cuanto a los cocos Gram positivos aerobios, los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* son los más frecuentes en la cavidad oral humana (Isenberg y D'Amato, 1995) y se han descrito en el 6% y el 2%, respectivamente, de la microbiota subgingival de otras especies de monos ardilla (Beem *et al.*, 1991), además de que *Staphylococcus* se ha aislado hasta en un 67% de los monos congo y colorado (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). En este estudio, sin embargo, se aislaron sólo tres cepas de cocos Gram positivos, pertenecientes todas al género *Staphylococcus*; los estreptococos no pudieron ser detectados probablemente debido a que son un género nutricional y fisiológicamente más exigente. Adicionalmente, se aislaron tres cepas de *Bacillus* sp., género que constituye hasta el 12% de la flora subgingival de otros monos ardilla (Beem *et al.*, 1991).

Otros géneros menos frecuentes en estos monos y no descritos como pertenecientes a la cavidad oral humana fueron *Brevundimonas*, *Morganella*, *Pantoea*, *Ralstonia* y *Flavimonas* (6% cada uno) y *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Ochrobacter*, *Pasteurella* y *Stenotrophomonas* (3% cada uno). De éstos, sólo *Chromobacterium* fue aislado previamente de los monos congo y colorado, también con baja frecuencia (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). *Brevundimonas*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Flavimonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Kluyvera*, *Leclercia* y *Stenotrophomonas* se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, en suelos y aguas, lo que podría explicar su aparición en el mono tití, mientras que *Morganella*, *Flavimonas*, *Alcaligenes* y *Pasteurella* son considerados comensales de mamíferos, entre otros vertebrados

(Busse y Auling, 2005; Janda y Abbott, 2005; Mutters *et al.*, 2005; Palleroni, 2005).

Flora anaerobia

Las bacterias anaerobias más usuales en la cavidad oral del hombre son *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella* (Isenberg y D'Amato, 1995). De ellos *Fusobacterium* fue el más frecuentemente aislado en el mono tití (12% de las muestras), seguido por *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella* (6% cada uno). Estudios anteriores en monos informan de frecuencias que van desde el 4% al 50% para estos organismos (Clark *et al.*, 1988; Beem *et al.*, 1991; Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). *B. gingivalis* y *B. intermedius* han sido encontrados como posibles patógenos de enfermedad periodontal, lo que podría correlacionar con el aislamiento de *Bacteroides* en *S. oerstedii* (Clark *et al.*, 1988). Debido a que no se encontraron *Actinomyces* ni *Eubacterium* siguiendo el mismo protocolo de muestreo, es posible que no estén presentes en *S. oerstedii*, aunque sí se han aislado de otros monos de Costa Rica. Con respecto a *Gemella*, su hábitat natural no ha sido completamente establecido, sin embargo su aparición en un 6% de las muestras, así como en la cavidad oral de otros monos (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004), podría sugerir que constituye parte de la flora normal del tracto respiratorio superior de estos animales. Con una frecuencia menor se aisló *Propionibacterium* (3%), género encontrado principalmente en derivados lácteos y en la piel humana (Holt *et al.*, 2000).

El género de anaerobios más frecuente fue *Clostridium*, aislado del 36% de las muestras. Dicho género también se describió como el anaerobio más abundante en los monos congo y colorado (48%: Gamboa-Coronado *et al.*, 2004), aunque en otras especies de mono ardilla se señala como constituyente de sólo el 0.5% de la flora subgingival (Beem *et al.*, 1991). A pesar de que en los humanos no se consideran flora indígena oral, los clostridios son habitantes normales del suelo y todas las especies identificadas (*C. bif fermentans*, *C. clostridiiforme*, *C. perfringens*, *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*) se han logrado aislar de suelos de Costa Rica con frecuencias que van del 21% al 50% (Rodríguez *et al.*, 1993; Gamboa *et al.*, 2005), lo que explica la posibilidad de que estas bacterias se ubiquen en la cavidad bucal de los monos, a partir de la ingesta de alimentos y agua contaminados con esporas de clostridios. Sin embargo, su alta frecuencia sugiere que este género podría ser verdaderamente parte de la flora normal de la boca de los monos.

Resistencia antimicrobiana en bacterias aerobias

Gran parte de las cepas bacterianas aisladas presentaron resistencia antimicrobiana ante varios agentes quimioterapéuticos, donde sobresale la alta resistencia de los bacilos Gram negativos aerobios y de los cocos Gram positivos. Para el primer grupo, un 90% de las cepas fue resistente a cefalotina, cefalosporina de primera generación, mientras que un 89% a cefoxitina y un 69% a cefuroxima, cefalosporinas de segunda generación. Este resultado es similar al

obtenido para las cepas aisladas de otros monos de Costa Rica, donde la mayor resistencia dentro de las cefalosporinas se presentó para la cefalotina, aunque en menor porcentaje (63%: Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). La menor resistencia a la cefepima (12.7%) era de esperar, debido a que es una cefalosporina de cuarta generación, con el mayor espectro de actividad de las cefalosporinas disponibles actualmente (Gomis *et al.*, 1998). La cefepima es más estable y menos afín ante las beta lactamasas, por lo que el hallazgo de bacterias de la flora normal de los monos (particularmente cepas de *Enterobacter*, típicamente sensibles) (Gomis *et al.*, 1998) resistentes a esta droga es preocupante, dado que su uso es muy limitado al ambiente hospitalario. Por su parte, el 65% de las cepas de bacilos Gram negativos presentó resistencia a amoxicilina, similar a las cepas de los monos congo y colorado (71%: Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). Dicho resultado correlaciona con el hecho de que la amoxicilina es uno de los antibióticos más empleados en el sistema de salud del país, debido a su bajo precio y su amplio espectro.

Los resultados muestran una importante resistencia de los bacilos Gram negativos ante los aminoglicósidos: tobramicina (52%), gentamicina (32%), netilmicina (28%) y amikacina (25%). La menor resistencia a la amikacina puede explicarse debido a que por diferencias estructurales, este antibiótico no es inactivado por las enzimas intracelulares comunes que inactivan gentamicina y tobramicina (González y Spencer, 1998). A pesar de esto, la resistencia es mayor en las cepas aisladas del mono tití, si se le compara con los patrones de otros monos de Costa Rica, donde dichos antimicrobianos fueron efectivos contra todos los bacilos Gram negativos aislados (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). La resistencia de bacilos Gram negativos aerobios aislados de animales ha sido descrita previamente; estudios han demostrado la presencia de cepas de *Escherichia coli* en mandriles salvajes con niveles de resistencia menores que los presentados por cepas provenientes de humanos contemporáneos, pero similares a los de cepas obtenidas en la era previa a los antibióticos (Routman *et al.*, 1985). Por otro lado, se ha encontrado que bacterias entéricas aisladas de mandriles en contacto con el ser humano presentan niveles significativamente mayores de resistencia, en comparación con las cepas de mandriles sin contacto con el hombre (Rolland *et al.*, 1985); ambos hallazgos favorecen la hipótesis de que el amplio uso de antimicrobianos por parte del ser humano ha promovido la distribución de los genes de resistencia entre las bacterias.

Los cocos Gram positivos aerobios, correspondientes todos al género *Staphylococcus*, presentaron una multiresistencia importante ante los antibióticos evaluados. Las tres cepas fueron resistentes a nueve de las 15 concentraciones de antimicrobianos probadas (60%): penicilina, cefalotina, ampicilina + sulbactam, eritromicina, clindamicina, nitrofurantoína, rifampicina, vancomicina y teicoplanina. Solamente la pefloxacina, ciprofloxacina y tetraciclina fueron efectivas contra todos los aislamientos. Estos resultados

son alarmantes si se comparan con los obtenidos para los monos congo y colorado de Costa Rica, donde el 67% de los antibióticos fueron efectivos contra las 21 cepas de cocos Gram positivos aislados (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). La resistencia creciente a antibióticos por parte de los estafilococos se conoce desde hace varios años. La vancomicina todavía se considera como el mejor antimicrobiano disponible para el tratamiento de infecciones por estafilococos resistentes a las penicilinas que no son inhibidas por las penicilinasas; sin embargo, ya se reporta una resistencia incipiente a este fármaco por parte de los estafilococos (Nodarse, 2001), como se observa en este estudio (todas las cepas resistentes) y en caso de aumentar representaría una verdadera catástrofe en la quimioterapia.

Resistencia antimicrobiana en bacterias anaerobias

La resistencia antibacteriana que presentaron las bacterias anaerobias fue considerablemente menor con respecto a la de las otras bacterias. El mayor porcentaje de resistencia se presentó ante metronidazole (35%), al igual que ocurrió en otros monos del país (49%: Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). Además de presentar excelente actividad ante *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* sp. y *Clostridium perfringens* (Chow, 2000), este agente es utilizado también para el tratamiento de infecciones por protozoarios, por lo que su difundida aplicación ha favorecido la aparición de cepas resistentes aisladas de animales y del ser humano (Diniz *et al.*, 2000). La resistencia se presentó en el 52.4% de los anaerobios Gram positivos y abarcó todos los géneros, mientras que la droga fue efectiva contra todos los Gram negativos. Este hallazgo es similar al 3% de resistencia en Gram negativos y el 53.6% en Gram positivos encontrado por Boyanova y colaboradores (2000) en aislamientos de muestras clínicas, pero contrasta con el 44% de resistencia presentado por Gram negativos en el caso de los monos congo y colorado (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004).

La clindamicina es un antibiótico muy útil para el tratamiento de anaerobios y su amplio uso favorece la aparición de cepas resistentes, principalmente por la alteración no enzimática del sitio de acción (Falagas y Siakavellas, 2000). Así por ejemplo, se han observado recientemente porcentajes de resistencia entre 5 y 15% para *Bacteroides fragilis* y entre 15 y 30% para otros miembros del grupo *B. fragilis*, organismos para los cuales se ha considerado típicamente este agente como una excelente opción de tratamiento (Lorber, 1995; Falagas y Siakavellas, 2000). En el presente estudio se obtuvo un 23% de resistencia a clindamicina (29% en Gram positivos y 10% en Gram negativos, incluyendo una cepa de *Bacteroides distasonis*) y es similar al 28% mostrado por los anaerobios de otros monos de Costa Rica. Estos resultados son preocupantes, si se consideraba que de los aislamientos clínicos, menos del 10% de los Gram negativos y el 19.6% de los Gram positivos son resistentes (Engelkirk *et al.*, 1992) y más aún si se compara con la ausencia de resistencia obtenida para clindamicina en cepas aisladas de saliva humana (Stark *et al.*, 1993). De las cefalosporinas, la cefoxitina es probablemente la más efectiva

(Murdoch, 1998), lo que concuerda con los hallazgos en el mono tití; sin embargo, hubo una mayor resistencia que la obtenida para las cepas de los monos congo y colorado (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). Los informes relacionados con el incremento continuo en la resistencia ante estas cefalosporinas por parte de algunos grupos de anaerobios (Behra-Mielliet *et al.*, 2003) refuerza la importancia de la búsqueda de nuevas estrategias para combatirlos.

La resistencia de los anaerobios a las penicilinas fue de 19% para la penicilina y 16% para la amoxicilina; sin embargo, como era de esperar de acuerdo con su mecanismo de acción, fue mayor en Gram negativos (30% penicilina; 20% amoxicilina) que en Gram positivos (14% para ambos antibióticos). La resistencia informada para las cepas de otros monos de Costa Rica es mayor para penicilina (31%) y menor para amoxicilina (10%) (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). Numerosos estudios revelan un aumento creciente en la resistencia a penicilina por parte de varios grupos de anaerobios: *Clostridium* (Engelkirk *et al.*, 1992), *Bacteroides* (Engelkirk *et al.*, 1992) y *Prevotella* (Hecht, 1999), mientras que otros como *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus* y *Gemella* tienden a ser susceptibles (Murdoch, 1998; Hecht, 1999). En el caso de la ticarcilina se obtuvo una resistencia del 10%, mayor que la descrita para los monos congo y colorado (2%: Gamboa-Coronado *et al.*, 2004); sin embargo, la susceptibilidad aumentó hasta el 100% al probar este antibiótico conjuntamente con ácido clavulánico como inhibidor de beta lactamasas.

Multirresistencia

Dentro de todos los grupos bacterianos estudiados se presentó multirresistencia, principalmente en los bacilos Gram negativos aerobios y en los estafilococos, y en menor medida en los anaerobios. Sobresale el hecho de que un 6% de los bacilos Gram negativos aerobios fueron resistentes a 13 o más de las 24 concentraciones de antibióticos evaluadas, mientras que las tres cepas de *Staphylococcus* fueron resistentes a 10 o hasta 12 de los 16 agentes probados. En los anaerobios la resistencia múltiple es apreciablemente menor, ya que 39% de las cepas fueron sensibles a las 16 concentraciones de antimicrobianos, el 35% fue resistente a uno ó dos, mientras que sólo el 26% mostró resistencia desde tres hasta siete agentes; sin embargo, dicho hallazgo no deja de ser alarmante, pues tradicionalmente se ha creído que la resistencia múltiple no es un problema común en anaerobios (Gamboa-Coronado *et al.*, 2004). Las sustancias antimicrobianas pueden estar presentes de manera natural en suelos, ya que constituyen un mecanismo utilizado por los microorganismos en sus hábitat naturales; la resistencia contra estos agentes juega un papel importante en la dinámica poblacional de estos ambientes (Kümmerer, 2004). Por otro lado existe la resistencia intrínseca hacia ciertos agentes, debido a la fisiología natural de algunos microorganismos (Kümmerer, 2004). Estos factores permiten concluir que no es de extrañar la presencia de ciertos niveles de resistencia en los organismos aislados de la cavidad oral de *S. oerstedii*; sin embargo, estos niveles son altos y similares

a los encontrados en poblaciones humanas, lo que sugiere la influencia de una presión selectiva generada por el uso excesivo de antibióticos. Millones de kilogramos de agentes antimicrobianos son usados cada año en la profilaxis y tratamiento de personas, animales y en agricultura, favoreciendo la generación de resistencia al eliminar cepas susceptibles y seleccionar las resistentes (Levy y Marshall, 2004).

Los ambientes naturales no están libres de contaminación con antibióticos; se han encontrado en efluentes de centros médicos, aguas municipales, tanques de aireación, tanques de digestión anaerobia, aguas superficiales, sedimentos y suelo (Kümmerer, 2003, 2004). Muchos de los compuestos utilizados en medicina son sólo parcialmente metabolizados por los pacientes y son descargados en los efluentes hospitalarios o en las aguas de desecho municipales si se utilizan en casa (Kümmerer, 2004), mismo destino que tienen muchos de los antibióticos descartados por vencimiento (Hartmann *et al.*, 1999; Kümmerer, 2003). Así, estos compuestos terminan en el ambiente, principalmente en el compartimento acuoso, donde se encuentran cada vez con mayor frecuencia (Levy y Marshall, 2004) y eventualmente podrían ingresar en la cadena alimentaria. Los antimicrobianos son también utilizados para el tratamiento de enfermedades en criaderos de peces, donde son adicionados directamente al agua (Kümmerer, 2004), mientras que otros son utilizados con fines veterinarios o como promotores de crecimiento, por lo que al ser excretados terminan siendo redistribuidos como abono (Kümmerer, 2003).

En Costa Rica actualmente los hospitales no cuentan con sistemas de tratamiento de aguas residuales y el país carece de la legislación adecuada para la regulación del uso de antibióticos en agricultura y ganadería (Tzoc *et al.*, 2002). Se cree que la exposición de las bacterias a estas concentraciones antimicrobianas subterapéuticas, incrementa la velocidad de selección de cepas resistentes (Kümmerer, 2003), lo que aunado a la transferencia de determinantes genéticos de resistencia presentes en el ambiente, podría explicar en parte los patrones de resistencia encontrados en los monos tití, aunque estos tengan poco contacto directo con el ser humano. Este estudio contribuye al conocimiento y al mismo tiempo a la preservación del mono tití, animal en peligro de extinción, y muestra que pocas barreras son capaces de contener los genes de resistencia y sus hospederos bacterianos en nuestro mundo estrechamente relacionado.

Agradecimientos

Queremos agradecer al Dr. Misael Chinchilla por su apoyo logístico en la investigación. Este trabajo fue realizado gracias al soporte económico de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Referencias

Beem, J.E., Hurley, C.G., Magnusson, I., McArthur, W.P. y Clark, W.B. 1991. Subgingival microbiota in squirrel

- monkeys with naturally occurring periodontal diseases. *Infect. Immun.* 59: 4034–4041.
- Behra-Mielliet, J., Calvet, L., Mory, F., Muller, C., Chomarar, M., Bézian, M.C., Bland, S., Juvenin, M.E., Fosse, T., Goldstein, F., Jaulhac, B. y Dubreuil, L. 2003. Antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacilli: Lessons from a French multicentric survey. *Anaerobe* 9: 105–111.
- Bowers, L., Purcell, J., Plauché, G., Denoel, P., Lovet, Y. y Philipp, M. 2002. Assessment of the nasopharyngeal bacterial flora of rhesus macaques: *Moraxella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, and other genera. *J. Clin. Microb.* 40: 4340–4342.
- 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.
- Busse, H.J. y Auling, G. 2005. Genus I. *Alcaligenes*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición, Vol. 2, D.J. Brenner; N.R. Krieg y J.T. Staley (eds.), pp.653–658. Springer, USA.
- Campbell, N., Clow, D., Crane, A. y MacDonald, A. 2003. "Squirrel Monkeys". En: Southern Kings Consolidated School (<<http://www.edu.pe.ca/southernkings/sqmonkey.htm>>).
- Carnahan, A.M. y Andrews, G. 2000. *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Campylobacter* species. En: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2ª Edición, C.R. Mahon and G. Manuselis (ed.), pp.515–538. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Carrillo, E., Wong, G. y Sáenz, J.C. 2000. *Mamíferos de Costa Rica*. INBio, Heredia.
- Chow, A.W. 2000. Anaerobic infections: Management of anaerobic infections. En: *Infectious Disease, V Anaerobic Infections*, ACP Medicine Online, D.C. Dale and D.D. Federman (eds.). WebMD Inc., New York.
- CITES. 2003. "*Saimiri oerstedii*". En: Base de datos de especies de la CITES <<http://www.cites.org/esp/resources/species.html>>. Consultado el 20 de octubre de 2007.
- Clark, W.B., Magnusson, I., Abee, C., Collins, B., Beem, J.E. y McArthur, W.P. 1988. Natural occurrence of black-pigmented *Bacteroides* species in the gingival crevice of the squirrel monkey. *Infect. Immun.* 56: 2392–2399.
- Coenye, T. y Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5: 719–729.
- Diniz, C.G., Santos, S.G., Pestana, A.C.N.R., Farias, L.M. y Carvalho, M.A.R. 2000. Chromosomal breakage in the *B. fragilis* group induced by metronidazole treatment. *Anaerobe* 6: 149–153.
- Engelkirk, P.G., Engelkirk, J.D. y Dowell, V.R. 1992. *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology, Susceptibility Testing*. Star Publishing Co., Belmont.
- Falagas, M.E. y Siakavellas, E. 2000. *Bacteroides*, *Prevotella* and *Porphyromonas* species: A review of antibiotic resistance and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents* 15: 1–9.

- Gamboa-Coronado, M.M., Rodríguez-Cavallini, E., Rojas-Contreras, G., Sánchez-Porras, R. y Gutiérrez-Espeleta, G. 2004. Flora bacterial oral y su perfil de sensibilidad a antibióticos en monos de Costa Rica (*Alouatta palliata* y *Ateles geoffroyi*). *Neotrop. Primates* 12(1): 24–30.
- Gamboa, M.M., Rodríguez, E. y Vargas, P. 2005. Diversity of mesophilic clostridia in Costa Rican soils. *Anaerobe* 11: 322–326.
- Gomis, M., Barberán, J., Ferrández, A. y Sánchez, B. 1998. Cefepima en el paciente neutropénico febril. *Rev. Esp. Quimioterap.* 11: 12–16.
- González, L. S. y Spencer, J.P. 1998. Aminoglycosides: a practical review. *Am. Fam. Physician.* 58: 1811–1820.
- Grimont, F. y Grimont, P.A. D. 2005. Genus XXXIV. *Serratia*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición, Vol. 2, D.J. Brenner, N.R. Krieg y J.T. Staley (eds.), pp.799–811. Springer, New York.
- Hartmann, A., Golet, E.M. y Gartiser, S. 1999. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospitals' waste waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 115–119.
- Hecht, D.W. 1999. Susceptibility testing of anaerobic bacteria. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 7ª Edición, P.R. Murray (ed.), pp.1555–1565. ASM Press, Washington, DC.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9ª Edición. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Isenberg, H.D. y D'Amato, R.F. 1995. Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 6ª Edición, P.R. Murray (ed.), pp.5–18. ASM Press, Washington, DC.
- IUCN. 2007. *2007 IUCN Red List of Threatened Species*. <<http://www.iucnredlist.org>>. Consultado el 20 de octubre de 2007.
- Janda, J.M. y Abbott, S.L. 2005. Genus XXI. *Morganella*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición, Vol. 2, D.J. Brenner; N.R. Krieg and J.T. Staley (eds.), pp.707–709. Springer, New York.
- Juni, E. 2005. Genus II. *Acinetobacter*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición, Vol. 2, D.J. Brenner, N.R. Krieg y J.T. Staley (eds.), pp. 425–437. Springer, New York.
- Kümmerer, K. 2004. Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 311–320.
- Kümmerer, K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 5–7.
- Kümmerer, K. 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids, and disinfectants into wastewater by hospitals, in relation to other sources — a review. *Chemosphere* 45: 957–69.
- Levy, S.B. y Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med. Suppl.* 10: 122–129.
- Lorber, B. 1995. *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species (and other medically important anaerobic gram-negative bacilli). En: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4ª Edición, G.L. Mandell, J.E. Bennett y R. Dolin (eds.), pp.2195–2204. Churchill Livingstone, New York.
- Martin-Carnahan, A. y Joseph, S.W. 2005. Genus I. *Aeromonas*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición, Vol. 2, D.J. Brenner, N.R. Krieg y J.T. Staley (eds.), pp.557–578. Springer, New York.
- Murdoch, D.A. 1998. Gram-positive anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 81–120.
- Mutters, R., Christensen, H. y Bisgaard, M. 2005. Genus I. *Pasteurella*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición, Vol. 2, D.J. Brenner, N.R. Krieg y J.T. Staley (eds.), pp.857–866. Springer, New York.
- Nodarse, R. 2001. Estafilococos multirresistentes: uso del disco de oxacilín como marcador de resistencia a antibióticos. *Rev. Cub. Med. Mil.* 30: 7–10.
- Palleroni, N. 2005. Genus I. *Pseudomonas*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª Edición, Vol. 2, D.J. Brenner, N.R. Krieg y J.T. Staley (eds.), pp.323–379. Springer, New York.
- Ramette, A., LiPuma, J.J. y Tiedje, J.M. 2005. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1193–1201.
- 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., Hausfater, G., Marshall, B. y Levy, S.B. 1985. Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: Increasing 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.
- Sorum, H. y Sunde, M. 2001. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet. Res.* 32: 3–4.
- Stark, C.A., Edlund, C., Sjostedt, S., Kristensen, G. y Nord, C.E. 1993. Antimicrobial resistance in human oral and intestinal anaerobic microfloras. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1665–1669.
- Tzoc, E., Arias, M.L. y Valiente, C. 2004. Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. *Rev. Biomed.* 15: 165–172.
- Wong, G. 1990. Uso del hábitat, estimación de la composición y densidad poblacional del mono tití (*Saimiri oerstedii citrinellus*) en la zona de Manuel Antonio. Quepos, Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad Nacional, Programa Regional en Manejo de Vida Silvestre para Mesoamérica y el Caribe.