

**Universidad Nacional de Costa Rica**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Escuela de Medicina Veterinaria**

**Análisis del perfil de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos a partir de heces de *Tapirus bairdii* de vida libre, y su relación con la actividad antropogénica, en zonas altas de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica**

**Modalidad: Tesis**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

**Autor: Jorge Enrique Rojas Jiménez**

**Tutor: Randall Arguedas Porras, MSc**

**Co-tutor: Elías Barquero Calvo, PhD**

**Lector: Paloma Alcázar García, Lic**

**Campus Benjamín Núñez, Heredia**

**2018**

## COMITÉ EVALUADOR



Rafael Vindas Bolaños, Lic.

Decano Facultad Ciencias de la Salud



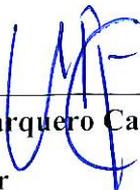
Laura S. Bouza Mora, MSc.

Subdirectora Escuela Medicina Veterinaria



Randall Arguedas Porras, MSc.

Tutor



Elías Barquero Calvo, PhD.

Co-tutor



Paloma Alcázar García, Lic.

Lector

Fecha: 2018

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Las palabras no son suficientes para agradecer a la larga lista de personas que influyeron en mi formación profesional y personal durante el transcurso de mi carrera. Le guardo enorme cariño y aprecio a todas estas personas, este trabajo se lo dedico a ustedes: a mi familia, Ma y Pa porque sin su enorme apoyo incondicional no estaría donde estoy, y por formar la persona que soy. A María, Dan, Apa y Mildred por ser pilares en mi vida. A Dani, Rober, Tista, Manú, Tía Vivi, Vivi, Macho, Mana, Rodri, Coralia y Lola les agradezco por meterme en el mundo de la vida silvestre, e influir para apasionarme por la conservación.

A Esteban por ser mi mentor, transmitirme esa pasión por las dantas y motivarme para ser el curador de las dantas. A Cris por tener esa energía incomparable y contagiarme con su espíritu conservacionista para proteger a las dantas. Al equipo Nāi Conservation, a Tapir Chocolates y a Bedrich Sutra, por ser el mejor equipo de conservación que puede existir, ahora son parte de mi familia, muchísimas experiencias estarán por venir.

A Elías, Randall y Paloma por ser guías durante este proceso, y transmitirme todo su conocimiento, no pude haber escogido mejor comité. A los Dres. Carlos Luna, Andrea Urbina, Marcela Suárez, Mauricio Jiménez y Pati Medici por ser guías y compañeros de investigación, gran parte de mi inspiración para realizar este trabajo se la debo a ustedes. Al personal de los laboratorios de Bacteriología y Patología Aviar por ser de excelente ayuda y compañía.

A los Dres. Juan J. Romero, Julio C. Rojas, Mario Baldi por toda su ayuda y colaboración durante la realización de este trabajo. A Santi, Bob, Mari y Merry por su apoyo incondicional, y por dejarme ser parte del mejor grupo de internado. A Sofi Herra por ser un ejemplo, motivarme para ser investigador y apasionarme por la vida silvestre. A Tati por su

apoyo incondicional y motivación. A todas esas personas, colegas, amigos de clase, amigos del Cerro, guardaparques, y todas aquellas que no pude incluir en la lista, todos forman parte de la culminación de este trabajo. Infinitas gracias.

## RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un problema global emergente, que actualmente está tomando importancia a nivel de salud humana y animal, relacionado con la agricultura, acuicultura e industria farmacéutica. Uno de los principales problemas es el uso indiscriminado de antibióticos, y la eventual diseminación de determinantes de resistencia en el medio ambiente, en los animales y en los seres humanos.

Los animales silvestres en raras ocasiones se ven expuestos a antibióticos, por lo que los niveles de resistencia a los antibióticos se esperarían que sean bajos. Sin embargo, ante un incremento en la interacción entre animales domésticos, humanos y animales silvestres, existe un riesgo de que la microbiota intestinal de todas las especies interactúen, lo que genera que los animales silvestres adquieran determinantes de resistencia.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en cepas comensales de *Escherichia coli* obtenidas a partir de heces de *Tapirus bairdii* de vida libre, de zonas altas de la Cordillera de Talamanca. Los aislamientos de *Escherichia coli* se realizaron con el medio selectivo y diferencial MacConkey. La identificación bioquímica y la determinación del perfil de sensibilidad a los antibióticos se efectuaron mediante el sistema automatizado Vitek 2 Compact (Biomeriux), en el cual se evaluaron nueve clases de antibióticos.

Los niveles de resistencia detectados en los 60 aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de dantas de vida libre fueron bajos. Se observó un 98% de aislamientos pansusceptibles, y un 2% resistente sólo al ácido nalidíxico.

Una de las muestras evaluadas que se colectó de una danta en cautiverio mostró un fenotipo multiresistente con resistencia a cefalotina, cefotaxime, cefepime, ampicilina y ampicilina/sulbactam, y presentó un fenotipo de betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

En este trabajo se evidencian los bajos niveles de resistencia antibiótica en *E. coli* de dantas de vida libre, lo que supone una baja presión selectiva de los antibióticos sobre esta bacteria; sin embargo, contrasta con el resultado obtenido en la danta de cautiverio, lo que podría deberse a la administración de antibióticos, un contacto más cercano de las dantas en cautiverio con las personas y otros animales, fuentes de agua contaminadas, y manipulación humana de alimentos principalmente.

Los resultados sugieren que la microbiota intestinal de las dantas (*T. bairdii*) de vida libre de la Cordillera de Talamanca se ha mantenido aislada de la presión selectiva de los antibióticos, posiblemente debido a una baja influencia de la actividad antropogénica a partir de las variables del paisaje, en el ambiente en el cual habitan. No obstante, como se evidencia en la danta de cautiverio con el perfil de multirresistencia, resulta relevante un manejo prudente y profesional de antibióticos en los sitios de cautiverio, así como en zonas alrededor de áreas protegidas.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance is an emerging global problem that encompasses human and animal health, also with agriculture, aquaculture and pharmaceutical industry. A main issue is an abusive and indiscriminant usage of antibiotics, in which dissemination of resistant bacteria throughout the environment, humans and animals occurs.

Wild animals, in rare occasions, are exposed to antibiotics, therefore antibiotic resistance levels in these animals are expected to be low. Nevertheless, as the interactions between humans, domestic and wild animals are increasing, there is a growing risk that intestinal microbiota from wild animals may acquire resistant bacteria or genes due to close contact with other animals and/or humans.

This study's main objective is to analyze the antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* isolates obtained from feces of free-ranging Baird's tapirs (*Tapirus bairdii*) in the highlands of the Cordillera de Talamanca. *Escherichia coli* isolates were recovered using the selective and differential media MacConkey. The biochemical identification and antibiotic resistant profiles were performed using the computerized system Vitek 2 Compact (Biomérieux), where nine classes of antibiotics were tested.

Resistance levels detected in *E. coli* isolates obtained from feces of free-ranging *T. bairdii* were very low. Ninety-eight percent were characterized by pan-susceptibility, and 2% were resistant to only nalidixic acid.

One of the isolates obtained from a captive tapir presented a multiresistant phenotype, with resistance to cefalotine, cefotaxime, cefepime, ampicillin and ampicillin/sulbactam. Additionally, an ESBL was identified in the same isolate.

This study demonstrates a very low antibiotic resistance of *E. coli* from free-ranging Baird's tapirs, and this supposes a low selective pressure against this commensal bacteria. In contrast with the isolate obtained from the captive tapir. This could be because captive tapirs are in closer contact with humans and other animals, antibiotic usage, polluted water sources, food manipulated by humans, among others, leading its intestinal microbiota to gain resistant genes.

Finally, the results suggest that the commensal microbiota of free-ranging Baird's tapirs (*T. bairdii*) of the Cordillera de Talamanca, remain secluded from antibiotic selective pressure, probably because of a low anthropogenic activity throughout landscape variables, in the habitat where they inhabit.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>COMITÉ EVALUADOR.....</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Estado de conservación.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Biología.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4. Resistencia antibacteriana .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.5. Resistencia antibacteriana en animales silvestres .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.6. Resistencia antibacteriana en dantas.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Justificación.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1. Importancia.....</b>	<b>15</b>

<b>1.3. Objetivos</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3.1. Objetivo general</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Área de estudio</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. Tipo de estudio</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3. Población a estudiar</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4. Recolecta de muestras fecales y almacenamiento</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5. Aislamiento de cepas de <i>E. coli</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2.6. Determinación del perfil de sensibilidad a los antibióticos</b> .....	<b>27</b>
<b>2.7. Análisis de las variables del paisaje</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8. Análisis de datos</b> .....	<b>28</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>63</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Crecimiento de las cepas control en el aseguramiento.....	
de la calidad en la elaboración de los medios con y sin antibiótico. ....	26
Cuadro 2. Perfil de sensibilidad a los antibióticos en 60 aislamientos.....	
de <i>E. coli</i> obtenidos a partir de heces de <i>T. bairdii</i> de vida libre. ....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de Costa Rica con el área de estudio.....	19
Figura 2. Área de estudio en el sector Macizo de la Muerte, Cordillera de Talamanca, Costa... Rica.....	20
Figura 3. Metodología utilizada para la detección de aislamientos resistentes aislados en..... heces de <i>T. bairdii</i> .....	25
Figura 4. Georeferenciación de los 60 aislamientos de <i>E. coli</i> obtenidos a partir de heces ..... de <i>T. bairdii</i> de vida libre.....	30
Figura 5. Georeferenciación y clasificación por colores de 60 aislamientos de <i>E. coli</i> ..... obtenidos a partir de heces de <i>T. bairdii</i> de vida libre a partir de su perfil de sensibilidad a ..... los antibióticos.....	32
Figura 6. Confirmación fenotípica de la presencia de BLEE por medio de la técnica de ..... difusión en disco (Kirby Bauer).....	33
Figura 7. Georeferenciación de las 63 muestras de heces de <i>T. bairdii</i> de vida libre ..... colectadas en el área de estudio, en relación con el área protegida y las variables del ..... paisaje.....	34
Figura 8. Georeferenciación de las 63 muestras de heces de <i>T. bairdii</i> de vida libre ..... colectadas en el área de estudio, en relación con el sitio de colecta y la cobertura forestal.....	36

## ABREVIATURAS

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres

GPS: Global Positioning System

IA: Iyok Ami

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

MC: Medicina de la Conservación

MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

PNC: Parque Nacional Corcovado

PNLQ: Parque Nacional Los Quetzales

PNTMM: Parque Nacional Tapantí Macizo de la Muerte

RBCV: Reserva Biológica Cerro Vueltas

RFLS: Reserva Forestal Los Santos

RFRM: Reserva Forestal Río Macho

RVSP: Refugio de Vida Silvestre el Páramo

SIG: Sistemas de Información Geográfica

OMS: Organización Mundial de la Salud

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El término Medicina de la Conservación (MC) se refiere a una ciencia creada para dirigir la crisis global que pone en peligro la biodiversidad, causando desbalances en la salud humana, animal y ambiental. Dentro de esta disciplina, se aplican diferentes herramientas para investigar componentes de la salud a través de un abordaje transdisciplinario, siendo una de ellas el uso de especies silvestres como “centinelas” del estado de salud de los ecosistemas (Aguirre et al. 2002).

En todo su rango de distribución, donde las dantas son una especie clave en la dispersión de semillas, y tienen un rol trascendental en el mantenimiento de su nicho ecológico, son consideradas como especie centinela del estado de preservación de su entorno, comportándose como una especie con potencial de vector, transmisora, portadora o sintomática de una variedad de agentes infecciosos (Hernández et al. 2005; Mangini et al. 2012).

#### 1.1.1. Estado de conservación

La danta o tapir es el mamífero terrestre más grande del Neotrópico. Clasificado en el Orden Perissodactyla, dentro del cual se encuentran los equinos y rinocerontes. En el género *Tapirus* existen cuatro especies: *Tapirus terrestris*, *Tapirus pinchaque*, *Tapirus indicus* y *Tapirus bairdii*, siendo el tapir centroamericano (*T. bairdii*) el segundo más grande luego del tapir del sudeste asiático (*T. indicus*), pesando entre 180-270 kg el macho, y 227-340 kg la hembra (Quse and Fernandes-Santos, 2014; García et al. 2016). A pesar de tener pocos

depredadores naturales, amenazas como la cacería, disminución del hábitat por actividades antropogénicas, y recientemente los atropellos, afectan negativamente a las poblaciones de *T. bairdii* en Costa Rica. Sobre este último punto, desde el 2010 se reportaron 23 atropellos de dantas en la Ruta Interamericana Sur 2 (García et al. 2016; Brenes-Mora, comunicación personal).

Actualmente, el tapir centroamericano está clasificado como una especie en peligro de extinción por la UICN, y se encuentra en el apéndice I de CITES (García et al. 2016). La población de *T. bairdii* se distribuye desde el sureste de México hasta el noroeste de Colombia. En toda su distribución los expertos estiman una población de menos de 6000 individuos (Castellanos et al. 2008; García et al. 2016).

En Costa Rica, las dantas se distribuyen desde el nivel del mar, hasta el páramo (~3000 msnm). Se conoce la presencia de poblaciones en distintas áreas protegidas como el Parque Nacional Guanacaste, Parque Nacional Volcán Tenorio, Parque Nacional Tortuguero, Parque Nacional Corcovado, Refugio Nacional de Vida Silvestre Maquenque, Refugio Nacional de Vida Silvestre Barra del Colorado, Parque Nacional Braulio Carrillo, Parque Nacional Chirripó y Cordillera de Talamanca por mencionar algunas (González-Maya et al. 2009; González-Maya et al. 2012). Sin embargo, estudios sobre la cantidad de individuos presentes en estas regiones son escasos, estimándose una población de 1000 a 1500 en todo el territorio nacional (García et al. 2016).

Por otro lado, cabe resaltar que la conectividad de las poblaciones entre las distintas áreas protegidas es poco estudiada hoy en día, en donde el corredor biológico Paso de la Danta y San Juan-La Selva son puntos clave para mantener poblaciones viables entre el Parque

Nacional Corcovado-Cordillera de Talamanca, y Parque Nacional Braulio Carrillo-Refugio Nacional de Vida Silvestre Maquenque respectivamente (Chassot et al. 2005; González-Maya et al. 2012). Asimismo, la densidad poblacional reportada de *T. bairdii* más alta en toda su distribución por km<sup>2</sup> corresponde a la Cordillera de Talamanca, en la frontera entre Costa Rica y Panamá (4,4 individuos/km<sup>2</sup>) (Schank et al. 2017).

### 1.1.2. Biología

En cuanto al comportamiento, las dantas generalmente tienen hábitos crepusculares o nocturnos. Generalmente, son animales solitarios con excepción de las hembras con cría, además de machos y hembras en época reproductiva (Foerster and Vaughan, 2002; Naranjo, 2009). Su esperanza de vida llega en promedio a los 25 años en vida libre, y 35 en cautiverio (Naranjo, 2009; Quse and Fernandes-Santos, 2014). Durante el día prefieren permanecer en cuerpos de agua, ya que los mismos facilitan su movilización para alimentarse y defecar, además de ser excelentes nadadoras (Foerster and Vaughan, 2002).

En cuanto a la dieta, las dantas se caracterizan por ser herbívoras. Se alimentan de frutos, cortezas, lianas; dedicando hasta un 90% del tiempo de su actividad al forrajeo (Naranjo 2009). Además, se conocen más de 120 especies de plantas que forman parte de su dieta (Foerster and Vaughan 2015). Su anatomía interna es análoga a la del caballo doméstico, siendo fermentadoras cecales y con un tubo digestivo monogástrico (Quse and Fernandes-Santos, 2014; Miller and Fowler 2015).

Su conducta de alimentación depende del sitio y de la época meteorológica del año. Por ejemplo, en el Parque Nacional Corcovado (PNC) se observaron dantas alimentándose de

frutos caídos, o bien deambulando cerca de árboles de zángano (*Licania platypus*), manzana de agua y mango en época lluviosa. Debido a lo anterior, también a sus hábitos alimenticios, y características anatómicas que le permiten la diseminación de grandes semillas, sumado a los senderos que hacen en el sotobosque por su tamaño, por ende permitiendo la germinación de semillas, además de funcionar como podadoras naturales, al alimentarse de brotes de plantas se les conoce como “las jardineras del bosque” (Janzen 1981; O’Farrill et al. 2013).

En lo que se refiere a los patrones de actividad de la especie, en el PNC se determinó la preferencia de las dantas por bosques secundarios durante la época seca, debido a la presencia de altas densidades de plantas de crecimiento rápido siendo más digeribles y palatables para las dantas en este tipo de bosque (Foerster and Vaughan 2015). En la época lluviosa prefieren bosques primarios por la presencia de altas cantidades de frutos. Sin embargo, recientemente se ha visto especímenes cada vez más acostumbrados a las personas, por lo que las dantas deambulan cerca de las estaciones del parque o asentamientos humanos (Cristina Aguilar-Ruiz, comunicación personal).

Por otro lado, en las zonas altas de la Cordillera de Talamanca se ha observado migración altitudinal de las dantas dependiendo de la disponibilidad de comida o bien de las temperaturas, en estas zonas su planta preferida es el bambú de montaña (*Chusquea* spp.), del mismo modo, cuando las temperaturas son muy frías en los meses de enero, febrero, marzo y abril los tapires prefieren descender a bosques húmedos de montaña (Naranjo and Vaughan 2000; Tobler et al. 2006; González-Maya et al. 2012). También, se ha visto el uso de letrinas en donde defecan distintos individuos; sin embargo, no se sabe con certeza la función de las

mismas, se cree que tiene que ver con la presencia de *Chusquea* spp. (Tobler, 2002; Esteban Brenes-Mora, comunicación personal).

Recientemente, se determinó que las poblaciones de danta en este sector montañoso se acercan y se acostumbran a los asentamientos humanos, siendo la Ruta Interamericana 2 sitio constante de avistamientos y atropellos de individuos, en donde la misma no funciona como barrera para la especie (Brenes-Mora, comunicación personal).

Con respecto a la salud de las dantas en Costa Rica, se han llevado a cabo varios estudios en las regiones del Parque Nacional Corcovado y zonas altas de Talamanca. En donde se han capturado individuos para colocarles radiocollares, y a la vez extraer muestras de sangre, heces, saliva, ectoparásitos, principalmente, con el fin de evaluar su estado de salud (Hernández et al. 2005). También, se han puesto en práctica diversos protocolos anestésicos a la hora de capturar a los individuos de la forma más segura. Además, se reportan estudios sobre la dieta, ecología y densidad poblacional en estas regiones (Naranjo and Vaughan 2000; González-Maya et al. 2009; González-Maya et al. 2012; Foerster and Vaughan 2015).

### 1.1.3. *Escherichia coli*

Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae incluye 46 géneros y 263 especies descubiertas hasta el momento. Algunas especies de esta familia tienen la capacidad de causar infecciones intestinales o extraintestinales en mamíferos de compañía y de producción, aves, reptiles, humanos y otras especies silvestres. Dentro de las Enterobacterias se encuentra el género *Escherichia* (Scott et al. 2013).

La especie *Escherichia coli* es la única especie que puede contener importantes elementos patogénicos para los humanos y animales (Scott et al. 2013). Las bacterias del género *Escherichia* son bacilos Gram negativos, aerobios facultativos, de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, y 1,0-3,0  $\mu\text{m}$  de largo. Están conformadas por una pared celular, la cual contiene una membrana externa e interna, periplasma, una capa delgada de peptidoglicán, lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa, también pueden expresar adhesinas y flagelos, por mencionar algunas estructuras (Scott et al. 2013).

Muchas *E. coli* son comensales del intestino grueso, ciego y colon; sin embargo, algunas se comportan como patógenos oportunistas o patógenos primarios mediante el uso de diversos factores de virulencia. Las *E. coli* patógenas, se dividen en cepas diarreagénicas (intestinales) o extraintestinales, siendo las primeras una causa importante de pérdidas económicas en la producción de lechones, terneros y corderos. Las cepas extraintestinales causan infecciones urinarias, umbilicales, sanguíneas, respiratorias, y cutáneas. Todas estas infecciones se han descrito en la mayoría de animales domésticos (Scott et al. 2013).

Las *E. coli* comensales por su lado, se consideran como excelentes indicadores de la resistencia antibacteriana, esto se debe entre otras cosas a que tienen una alta persistencia en el ambiente, en pasturas, y plantas de tratamiento de aguas (Blaiotta et al. 2016; Vivant et al. 2016).

Adicionalmente, *E. coli* forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal en múltiples animales, puede adquirir fácilmente mecanismos de resistencia mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o por transferencia horizontal de material genético ya sea dentro de una misma especie o una diferente (Mosquito et al. 2011). Todas estas

características hacen de esta especie un excelente candidato como indicador de la prevalencia de resistencia a los antibióticos.

#### 1.1.4. Resistencia antibacteriana

En términos generales, un antibiótico es un agente quimioterapéutico que inhibe o disminuye el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos o protozoarios. Por lo tanto, recientemente se dice que una sustancia antibiótica tiene actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasítica (Kümmerer 2009). Estos son esenciales para el tratamiento de infecciones en humanos y animales, por lo tanto, es una prioridad preservar su eficacia. De lo contrario, la ocurrencia de resistencia antibacteriana en bacterias patógenas y comensales afecta directamente al tratamiento de enfermedades infecciosas (Ogawa et al. 2011).

El uso prudente de los antibióticos consiste en establecer el agente bacteriano responsable de la infección, antes de prescribir el antibiótico, con el fin de disminuir el uso indiscriminado, excesivo y negligente de los mismos. Debido a que esto puede llevar a la presencia de residuos o metabolitos inclusive más tóxicos para los humanos en el ambiente (Kümmerer 2009; Martínez 2009). Por lo general, los animales silvestres no están expuestos a antibióticos en su ambiente (Radhouani et al. 2014). Sin embargo, según diversos autores las posibles fuentes de diseminación de bacterias resistentes al medio ambiente pueden provenir de origen natural de bacterias del suelo; industria farmacéutica; medicina humana y veterinaria; uso profiláctico y como promotores de crecimiento en animales de producción; y uso en agricultura (Allen et al. 2010).

Además, en cuerpos de agua por medio de la escorrentía proveniente de plantas de tratamientos de agua, agricultura, ganadería, avicultura, plantas de sacrificio, acuicultura y animales de acuario; los cuales pueden contribuir a un aumento en la concentración de residuos y metabolitos de antibióticos en aguas superficiales (Kümmerer 2009). Como consecuencia se puede presentar el desarrollo potencial de la resistencia a estos compuestos, que se ve mediada por mecanismos bioquímicos y fisiológicos bacterianos (Aarestrup 2005).

En este contexto, las bacterias despliegan tres fenotipos fundamentales: susceptibilidad, resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca es natural de todas las especies de bacterias, la cual se presenta por características estructurales y bioquímicas inherentes al microorganismo (Giguère et al. 2013). En cuanto a la resistencia adquirida, los principales mecanismos de resistencia antibacteriana adquiridos reportados en bacterias Gram negativas hacia distintas familias de antibióticos son: barreras impermeables, bombas de eflujo, mutaciones del sitio blanco e inactivación del antibiótico por enzimas (Allen et al. 2010; Giguère et al. 2013).

A estos mecanismos fisiológicos bacterianos, junto con los eventos y factores de adquisición de resistencia por una bacteria; por ejemplo, a través de la transferencia horizontal de genes, plásmidos o elementos genéticos móviles como integrones y transposones, ya sea en condiciones ambientales o en un hospedador, se le conocen como determinantes de resistencia (Martínez 2012). Sumado a esto, el vasto reservorio de estos determinantes de resistencia en la microbiota de ambientes naturales se le conoce como el resistoma (Giguère et al. 2013).

Tal y como se mencionó anteriormente, *E. coli* es una bacteria que puede adquirir altos niveles de resistencia a los antibióticos, y además tiene la capacidad de transferir dicha

resistencia a otras bacterias de otras especies (Scott et al. 2013). Asimismo, al ser importantes en términos de multiresistencia e infecciones nosocomiales en medicina humana y veterinaria, se considera que bacterias Gram-negativas como *E. coli*, son patógenos indicadores clave para darle seguimiento a la evolución de las bacterias multiresistentes tanto en el medio ambiente como en la vida silvestre (Poeta et al. 2009; Guenther et al. 2011).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son un grupo de antibióticos sumamente utilizados en medicina humana y veterinaria. La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos. Este anillo puede estar unido a otro y formar una estructura base, la cual puede asociarse con cadenas lineales y modificar las características del compuesto, dando lugar a los diferentes grupos de  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams e inhibidores de las betalactamasas) (Suárez and Gudiol 2009).

El principal mecanismo de resistencia hacia  $\beta$ -lactámicos corresponde a las betalactamasas. Estas son enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, produciendo derivados ácidos sin efecto bactericida; así el antibiótico no es capaz de unirse a las proteínas blanco, y por lo tanto ocurre la formación de la pared bacteriana (Papich and Riviere 2009). Actualmente, las enzimas betalactamasas se pueden clasificar de diferentes formas según su utilidad clínica por medio del sistema Ambler, dividiéndolas en cuatro clases moleculares: A, B, C y D. Dicha clasificación se basa en los sustratos que las enzimas hidrolizan, y según la inhibición de su actividad por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Además, las betalactamasas de espectro expandido (BLEE) se clasifican de acuerdo a su función y estructura en el Grupo 2, subgrupo 2be, de las Serin-betalactamasas, grupo perteneciente a la clase molecular A, y en donde la “e” denota

espectro extendido (Paterson and Bonomo 2005; Bush and Jacoby 2010). Recientemente, se ha reportado que las BLEE se han detectado en aislamientos de clínicas humanas, sin embargo, se ha visto un aumento en infecciones bacterianas en comunidades. Lo que indica que de alguna forma las BLEE están logrando transmitirse con éxito en el medio ambiente (Costa et al. 2006; Guenther et al. 2011).

#### 1.1.5. Resistencia antibacteriana en animales silvestres

En lo que se refiere a estudios en animales silvestres, dentro de los primeros donde se reportó el aislamiento de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos en animales silvestres, fue a inicios de la década de los 80's, realizado en palomas domésticas y ferales, cuervos, loras, pericos, y faisanes en Japón (Sato et al. 1978; Kanai et al. 1981). Seguidamente, cinco años después se reportó altos niveles de resistencia antibacteriana en babuinos que se alimentaban de desechos humanos en Suráfrica (Rolland et al. 1985). Posteriormente, los estudios dirigidos a describir la ocurrencia de resistencia antibacteriana en animales silvestres han aumentado considerablemente (Guenther et al. 2011).

Por su parte, en ungulados se reportan diversos estudios en saínos y venados principalmente. En la última década, se realizó un estudio en Portugal donde se detectaron saínos silvestres como reservorios de BLEE (Poeta et al. 2009). También, Costa y colaboradores (2015), y Dias y colaboradores (2016) en saínos y cérvidos silvestres obtuvieron un nivel alto de resistencia antibacteriana, inclusive encontraron cepas multirresistentes y BLEE, siendo los saínos reservorios de BLEE.

### 1.1.6. Resistencia antibacteriana en dantas

En la actualidad no existen trabajos publicados sobre la resistencia a los antibióticos en dantas de vida libre, y los estudios en dantas de cautiverio son escasos. Klimes y colaboradores (2013) elaboraron un reporte de necropsia en una danta suramericana (*Tapirus terrestris*), en un zoológico de la República Checa, en donde se aisló *E. coli* a partir de un pulmón, y en la cual se detectó la presencia del gen *bla* que codifica a la producción de beta-lactamasas de espectro-extendido CTX-M-15. El nombre CTX refleja una potente actividad para hidrolizar cefotaxima, y también con menor potencia a ceftazidima y cefepima (Paterson and Bonomo 2005). Klimes y colaboradores (2013) resaltan que el animal estaba en un mismo recinto con otros animales: capibaras, gansos, cisnes y ñandúes; obteniéndose muestras de los mismos y logrando aislar, de igual manera bacterias con el mismo genotipo en siete muestras de distintos individuos y especies. En este aislamiento se reportó resistencia a las sulfonamidas y a trimetropin-sulfametoxazole (Klimes et al. 2013).

Adicionalmente, Vargas y colaboradores (2010), en el zoológico de Barranquilla aislaron *E. coli* a partir de un hisopado rectal realizado en una danta suramericana (*T. terrestris*), en donde se detectó resistencia a ciprofloxacina, cefotaxima y ceftazidima. Consecuentemente, estos hallazgos sugieren que la diseminación de bacterias entéricas resistentes bajo condiciones de cautiverio, podría verse acentuada por una alta densidad de animales en un espacio reducido, permitiendo un contacto más frecuente con las excretas entre distintas especies; así como también a causa de un contacto más cercano con personas, ya sea durante la manipulación de los animales por parte de los cuidadores; elaboración de los alimentos de los mismos; limpieza de recintos, esorrentía de aguas contaminadas entre otras posibles causas.

También, estos resultados sugieren que la resistencia antibacteriana encontrada en las bacterias aisladas a partir de animales de cautiverio, representan un factor de riesgo para la salud de los mismos, debido a que se limitan las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones bacterianas por parte del médico veterinario (Vargas et al. 2010).

## **1.2. Justificación**

El aumento de bacterias multirresistentes comensales y patógenas, es una preocupación a nivel mundial, debido a que incrementan la mortalidad y morbilidad tanto de animales como de personas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2050 se estima que un 30% de las muertes de personas en EUA serán a causa de infecciones por bacterias multirresistentes (W.H.O. 2017). Asimismo, se observa un aumento en los costos de tratamientos antibacterianos tanto en humanos como en animales, y además se reduce la variedad de los antibióticos disponibles (Steele et al. 2005).

Por otro lado, *E. coli* coloniza el colon y ciego de los mamíferos, y constituye un reservorio de genes de resistencia antibacteriana. Estos genes de resistencia pueden jugar un papel epidemiológico en la diseminación de cepas resistentes al ambiente (Alonso et al. 2016). Asimismo, resulta necesario descifrar las fuerzas ecológicas que moldean la población de cepas comensales, con tal de entender la virulencia y resistencia antibacteriana de cepas patógenas (Tenaillon et al. 2010).

Se sabe que la presión selectiva en el hábitat de cepas comensales puede promover ya sea factores de virulencia o resistencia antibacteriana, de esta manera convirtiendo cepas comensales en reservorios de cepas resistentes (Gordon and Cowling 2003; Tenaillon et al.

2010). De este modo, el estudio de aislamientos comensales de *E. coli* se puede realizar con el fin de utilizar esta bacteria como un bioindicador de la resistencia antibacteriana de la microbiota intestinal, y así entender el patrón de diseminación de cepas resistentes en el hábitat de las dantas.

Según distintos autores (Österblad et al. 2001; Skurnik et al. 2006; Allen et al. 2010) existe una correlación fuerte entre la cantidad de bacterias resistentes aisladas en animales silvestres de vida libre, y la cercanía a la actividad antropogénica. Sin embargo, en áreas remotas y aparentemente bien preservadas de la influencia antropogénica, se han logrado aislar bacterias resistentes (Allen et al. 2010). Por lo tanto, para poder describir de una mejor manera el patrón de diseminación de determinantes de resistencia antibacteriana en el ambiente, es necesario recurrir a la medición de parámetros tales como: categoría de manejo del área de interés, índice de cobertura vegetal, densidad humana, sistemas de producción animal, cuerpos de agua, entre otros (Rolland et al. 1985; Poeta et al. 2009).

Asimismo, al haber información limitada donde se ejemplifica la diseminación de bacterias multirresistentes ambientales y patógenas en la vida silvestre en Costa Rica, específicamente en espacios naturales, surge la necesidad de evaluar la microbiota de la vida silvestre costarricense (Angulo, 2017; Elías Barquero-Calvo, comunicación personal; Mario Baldi-Salas, comunicación personal).

Por otro lado, respecto al ambiente de las dantas, en este caso la Cordillera de Talamanca fue designada por la UNESCO como Patrimonio de la Humanidad, así como las Turberas de Talamanca fueron categorizadas sitios Ramsar, debido a su alta cantidad de servicios ecosistémicos, como la visita de varias especies en peligro de extinción además de la

danta (*T. bairdii*) tales como tigrillo (*L. tigrinus*) y jaguar (*P. onca*); la presencia de casi el 90% del páramo centroamericano; plantas de uso medicinal; gran cantidad de recurso hídrico, entre otros (Ramsar Sites Information Service, 2002; González-Maya et al. 2012; Esteban Brenes-Mora, comunicación personal).

En este sentido, precisa determinar si realmente estos sitios preservados benefician o no la salud de las dantas, para lo cual, se puede contar con herramientas diagnósticas, tales como: hematología, bioquímica sérica, serología, y parasitología; complementadas con examinación física, con el fin de establecer la salud de los individuos o las poblaciones (Mangini et al. 2012). El aparecer de nuevas tecnologías y herramientas laboratoriales que facilitan el uso de muestras no invasivas, aplicables en trabajos con animales de vida silvestre, como los estudios de resistencia antibacteriana, podrían ser de utilidad para dar a conocer el estado de “salud” de la microbiota intestinal de las dantas (Medici et al. 2014; Quse and Fernandes-Santos 2014).

En el momento en que un animal silvestre adquiera bacterias resistentes, este tiene el potencial de funcionar ya sea como vector, reservorio o bioindicador de patógenos bacterianos resistentes, y de determinantes genéticos bacterianos resistentes en el medio ambiente. Además, la adquisición de cepas resistentes en animales silvestres representa un riesgo para la salud pública, por la transmisión via fecal-oral, o la inclusión de fómites de las mismas a cuerpos de agua, agricultura y ambientes asociados al humano (Carroll et al. 2015). En este caso, al haber carencia de estudios sobre resistencia antibacteriana en la Cordillera de Talamanca, precisa determinar la situación sobre este tema mediante bioindicadores o especies

centinelas (González-Maya et al. 2011; Angulo, 2017; Elías Barquero-Calvo, comunicación personal).

La danta por su lado, el hecho de ser el herbívoro terrestre más grande del Neotrópico; alimentarse de más de 120 especies de plantas, por ende, dispersar semillas; realizar migraciones altitudinales; tener una expectativa de vida de 25 años en vida libre; entre otras características, le permiten funcionar como especie centinela en términos de resistencia antibacteriana (Naranjo and Vaughan, 2000; Tobler et al. 2006; González-Maya et al. 2012; Foerster and Vaughan 2015; Furness et al. 2017).

A inicios del 2017 la OMS publicó una lista con las bacterias para las cuales urge la necesidad de nuevos antibióticos para su tratamiento en infecciones. En la misma, se ubica a las BLEE en la prioridad crítica número uno, en la tercera posición (W.H.O., 2017). Asimismo, diversos estudios realizados en vida silvestre y aguas residuales en todo el globo terrestre desde el Ártico hasta la Antártida, evidencian la presencia de BLEE. Esto demuestra su rápida diseminación en el medio ambiente, y su importancia en la salud pública (Sjölund et al. 2008; Guenther et al. 2011; Hernández et al. 2011).

### **1.2.1. Importancia**

Ante la necesidad de entender la complejidad de la diseminación de cepas bacterianas multirresistentes en la fauna silvestre, se sugiere alcanzar lo anterior a través de estudios espaciales y temporales de resistencia antibacteriana en diferentes hábitats con un alto y mediano grado de preservación, en diferentes especies silvestres, animales domésticos y humanos, para comprender el rol de la vida silvestre como vector, reservorio o bioindicador de

resistencia antibacteriana (Gilliver et al. 1999; Österblad et al. 2001; Guenther et al. 2011; Carroll et al. 2015).

Surge además, una necesidad urgente de adquirir más conocimiento en el impacto de bacterias Gram-negativas resistentes sobre la microbiota de animales silvestres, y las consecuencias para el medio ambiente como para la salud pública, tomando en cuenta el potencial zoonótico de *E. coli* y su abundancia en la naturaleza (Allen et al. 2010).

Finalmente, especies bioindicadoras como la danta, juegan un papel muy importante en mantener la integridad del hábitat y del ecosistema en el que habitan, entendiendo que el monitoreo del estado de salud de esta especie puede reflejar el estado de salud del ecosistema, al funcionar como especie centinela (Aguirre et al. 2002; González-Maya et al. 2011; Furness et al. 2017).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Analizar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos a partir de heces de *Tapirus bairdii* de vida libre, y relacionarlos con la actividad antropogénica, en zonas altas de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de *T. bairdii*, a diversas clases de antibióticos utilizados para el tratamiento de bacterias Gram negativas.
2. Evidenciar la presencia de cepas que expresen fenotipos de resistencia a betalactamasas de espectro extendido (BLEE).
3. Relacionar variables del paisaje con los perfiles de sensibilidad a los antibióticos obtenidos en aislamientos de *E. coli* recuperados a partir de heces de *T. bairdii*.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la región llamada Macizo de la Muerte, que se localiza en las provincias de Cartago y San José, en las zonas altas de la Cordillera de Talamanca. La administración de dicho sector está a cargo del Área de Conservación La Amistad-Pacífico (ACLA-P) y del Área de Conservación Central (ACC).

En esta área existen varias áreas protegidas, como el Parque Nacional Los Quetzales (PNLQ), la Reserva Forestal Los Santos (RFLS), y la Reserva Biológica Cerro Vueltas (RBCV), estas bajo la administración del ACC; mientras que la Reserva Forestal Río Macho (RFRM) y el Parque Nacional Tapántí Macizo de la Muerte (PNTMM), se encuentran bajo la administración de ACLA-P. Adicionalmente, se localizan otras tierras privadas bajo alguna categoría de protección, por ejemplo, fincas en pago por servicios ambientales y reservas privadas, en este caso Iyok Ami (IA) es una finca privada con uso agroecoturístico, y el Refugio de Vida Silvestre el Páramo (RVSP) es una reserva privada (Figura 1 y 2).

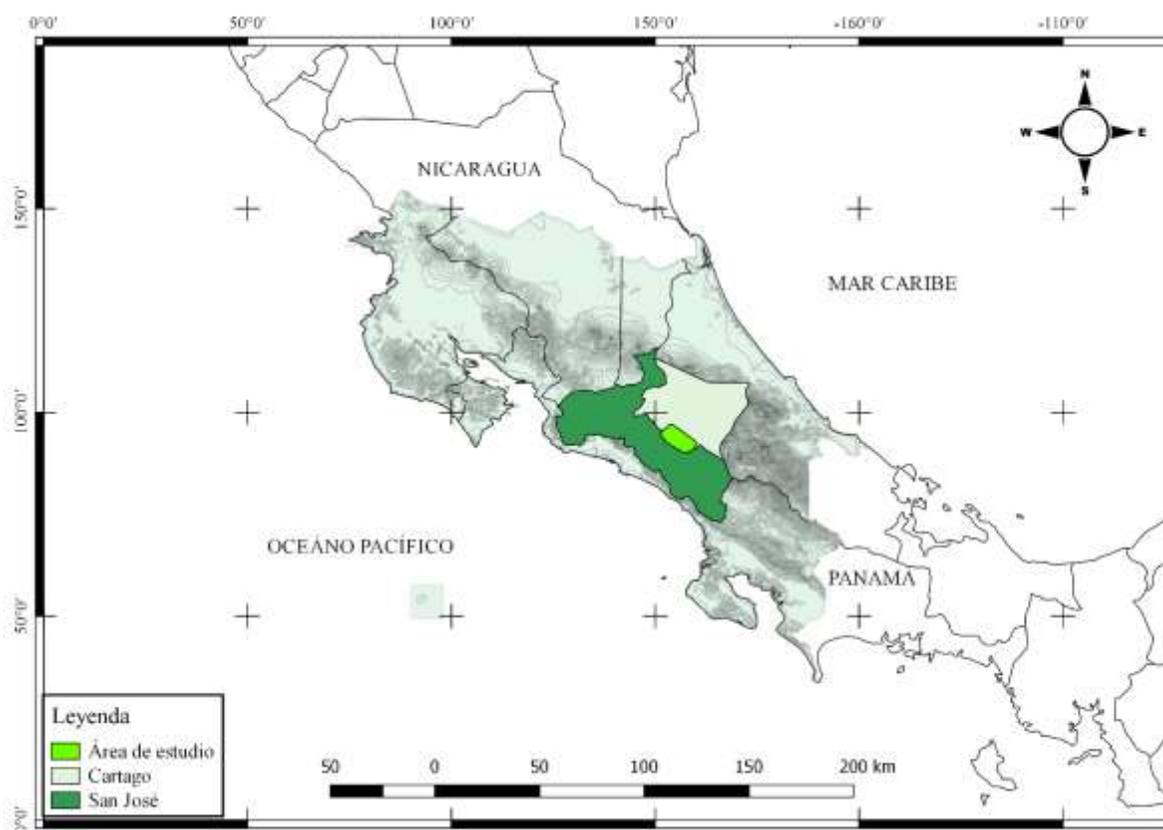


Figura 1. Mapa de Costa Rica con el área de estudio.

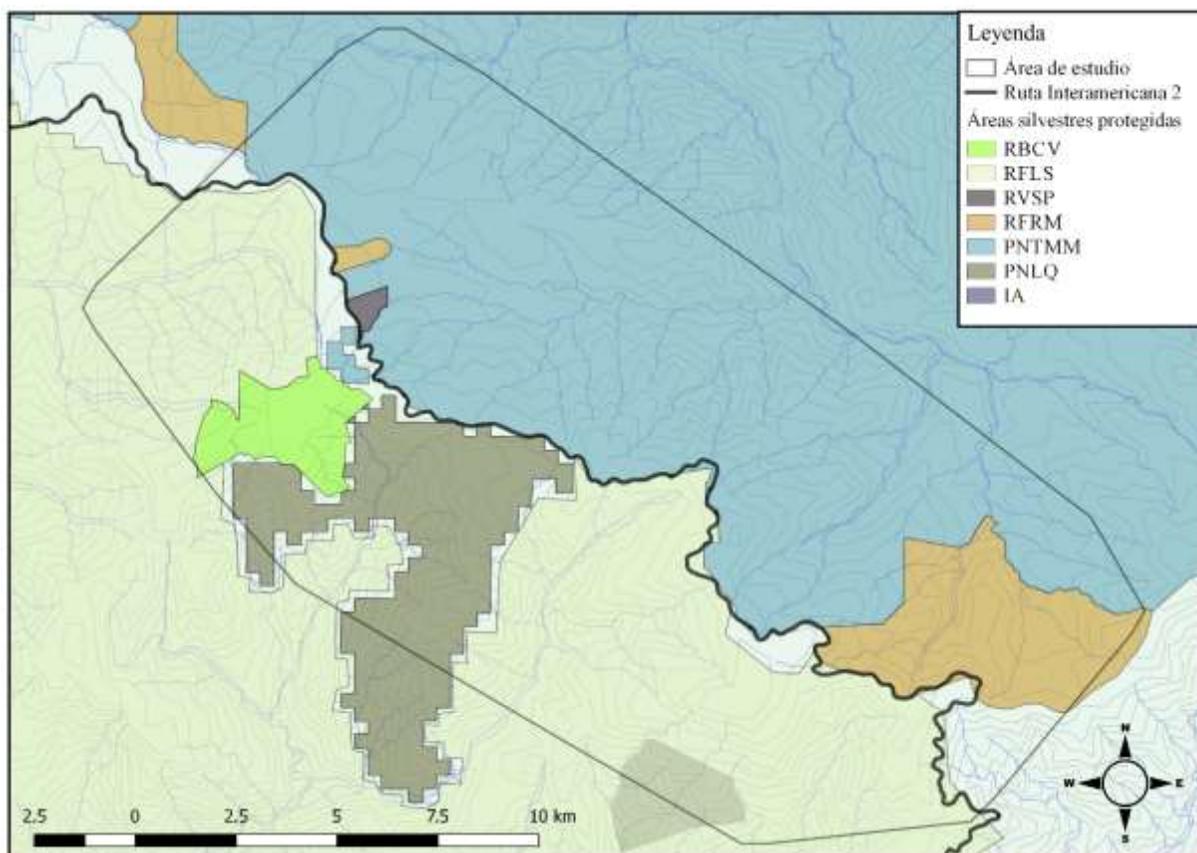


Figura 2. Área de estudio en el sector Macizo de la Muerte, Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Se indican las áreas protegidas: Reserva Biológica Cerro Vueltas (RBCV), Reserva Forestal Los Santos (RFLS), Refugio de Vida Silvestre el Páramo (RVSP), Reserva Forestal Río Macho (RFRM), Parque Nacional Tapantí Macizo de la Muerte (PNTMM), Parque Nacional Los Quetzales (PNLQ) e Iyok Ami (IA).

El estudio se realizó en un área de 291 km<sup>2</sup>, circundantes a la Ruta 2 Interamericana Sur, específicamente sobre 38 km de la carretera, en la cual convergen las áreas protegidas mencionadas anteriormente. Se delimitó un área de muestreo teniendo a la Ruta 2 Interamericana Sur como referencia, y los límites están ubicados a 4,5 km de distancia a cada lado de la carretera (Brenes-Mora, datos sin publicar).

## 2.2. Tipo de estudio

Se realizó un estudio transversal de tipo descriptivo, cuyo propósito fue determinar la presencia o ausencia de resistencia antibacteriana en aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de *T. bairdii* de vida libre en el área de estudio, y relacionar estos hallazgos con las variables del paisaje, es decir, con la actividad antropogénica.

## 2.3. Población a estudiar

Se seleccionó una población de *T. bairdii* que habita alrededor o dentro del área de estudio. Al no ser posible la identificación de los individuos, y no conocer la cantidad de los mismos, se realizó una búsqueda exhaustiva y oportunista. Adicional al estudio se muestrearon dos dantas adultas en cautiverio, un macho y una hembra. Ambos animales contaban con cuidado veterinario, nutricional y biológico; además de contar con acceso a un cuerpo de agua en cada sitio.

A la examinación externa, ambos animales presentaron una buena condición corporal, sin lesiones en la piel, en los ojos, ni en las pezuñas. Además, es importante resaltar que la hembra fue tratada con el antibiótico ceftiofur a una dosis de 5 mg/kg para 300 kg durante tres días, vía oral por un absceso submandibular un mes antes de tomar la muestra de heces, es decir, la muestra se colectó el 3 de marzo de 2017, y el tratamiento se realizó a inicios de febrero de 2017. Sin embargo, por cuestiones económicas, al tercer día se cambió a tratamiento tópico y se logró una recuperación de la lesión.

#### **2.4. Recolecta de muestras fecales y almacenamiento**

En los anexos se adjuntan las cartas y resoluciones sobre los permisos de ingreso a las áreas protegidas de interés, así como el permiso para la colecta de heces (Anexo 1; Anexo 2).

Se colectaron muestras de materia fecal, excluyendo aquellas que contuvieran principalmente tierra, barro, y hongos; y se evadió recolectar heces que estuvieran sumergidas en agua. Con este fin, se recogió del centro de la deposición, procurando no obtener de la superficie de la misma.

Se escogieron muestras que tuvieran un máximo de tres días de haber sido excretadas, siendo esto un método de exclusión meramente subjetivo, basado en la identificación de características organolépticas, o bien por experiencia del colector, lo que aseguró que se recolectaran muestras lo más frescas posibles. De este modo, si se observó al animal defecando, se recolectó la muestra inmediatamente. No se colectaron heces que estuvieran juntas, con la apariencia de que fueran de dos individuos diferentes, por frescura, tamaño del pellet entre otras características.

La recolección se realizó con guantes de nitrilo nuevos de forma aséptica. Las muestras del mismo individuo en caso de verlo defecando, se mezclaron y homogenizaron con tal de lograr una distribución uniforme. En las letrinas, en caso de encontrar distintas deposiciones, cada muestra se manejó de forma independiente. La cantidad que se recogió fue de 5-10g, por lo que no fue necesario recolectar toda la muestra.

La estrategia para recolectar las muestras en vida libre consistió en basarse en el comportamiento del animal, principalmente en los patrones de actividad, observaciones previas realizadas en campo y uso de hábitat de las dantas. Se siguieron los rastros de las

dantas como huellas, cortezas de árboles comidas y heces, y se tomó en cuenta el rango de movimiento de las dantas el cual consiste en un rango de 3 km de radio. Esencialmente se recolectaron heces encontradas en senderos de danta, o en letrinas (Foerster and Vaughan 2002).

La probabilidad de que por azar se recolectaran heces del mismo individuo no afecta de forma significativa el estudio, principalmente porque sólo una colonia se analizó por muestra, y un mismo animal puede contener múltiples serovariedades de *E. coli* distintos en su microbiota intestinal (Scott et al. 2013).

En lo referente a las dantas en cautiverio, al primer animal se le realizó un hisopado rectal luego de inmovilizarlo en el mismo sitio para el traslado de recinto; el hisopo se almacenó en un tubo estéril en condiciones de refrigeración para su posterior traslado al Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria, de la Universidad Nacional de Costa Rica, en Heredia. Mientras que al segundo animal, el personal que asistió colectó la deposición fecal a menos de diez minutos de haber sido excretada.

En cuanto al almacenamiento, las muestras se empacaron individualmente en una bolsa plástica nueva con cierre hermético de marca *Ziploc* con su debida identificación (Anexo 3), y fueron almacenadas en un refrigerador a 4°C. En el caso donde no se dispuso de inmediato de un refrigerador, las muestras se guardaron momentáneamente en una hielera por un máximo de 24 h, para su traslado al refrigerador más cercano, o al Laboratorio de Bacteriología (EMV).

Posteriormente, el punto de colecta se georeferenció mediante GPS. Se anotó en la libreta toda la información pertinente sobre la muestra: información anotada en la etiqueta,

ubicación con GPS del sitio de colecta, altitud, estimación de la cantidad de días desde que la muestra fue depositada por la danta; cantidad estimada de humedad presente en la muestra (poco, medio, alto). Asimismo, cada sitio de colecta se describió como letrina o no, sendero de danta o de personas, tipo de bosque, y otras características como puntos de referencia. Por último, se coordinó con el equipo del proyecto el traslado de la muestra al Laboratorio lo más pronto posible.

## **2.5. Aislamiento de cepas de *E. coli***

Se tomaron hisopados de cada muestra fecal, junto con el hisopado rectal de la danta de cautiverio, los cuales se cultivaron directamente en Agar MacConkey sin antibiótico (plato A) y en Agar MacConkey con cefotaxima (2 µg/mL) (plato B). En los casos donde se presentó el crecimiento de cepas sospechosas (colonias rosa, seca) en cualquiera de los medios, se seleccionó una colonia de cada plato para la posterior identificación. Estos medios se incubaron a 37°C por 24 horas (Figura 3). El uso de la cefotaxima tenía como objetivo promover la selección de bacterias con fenotipo BLEE.

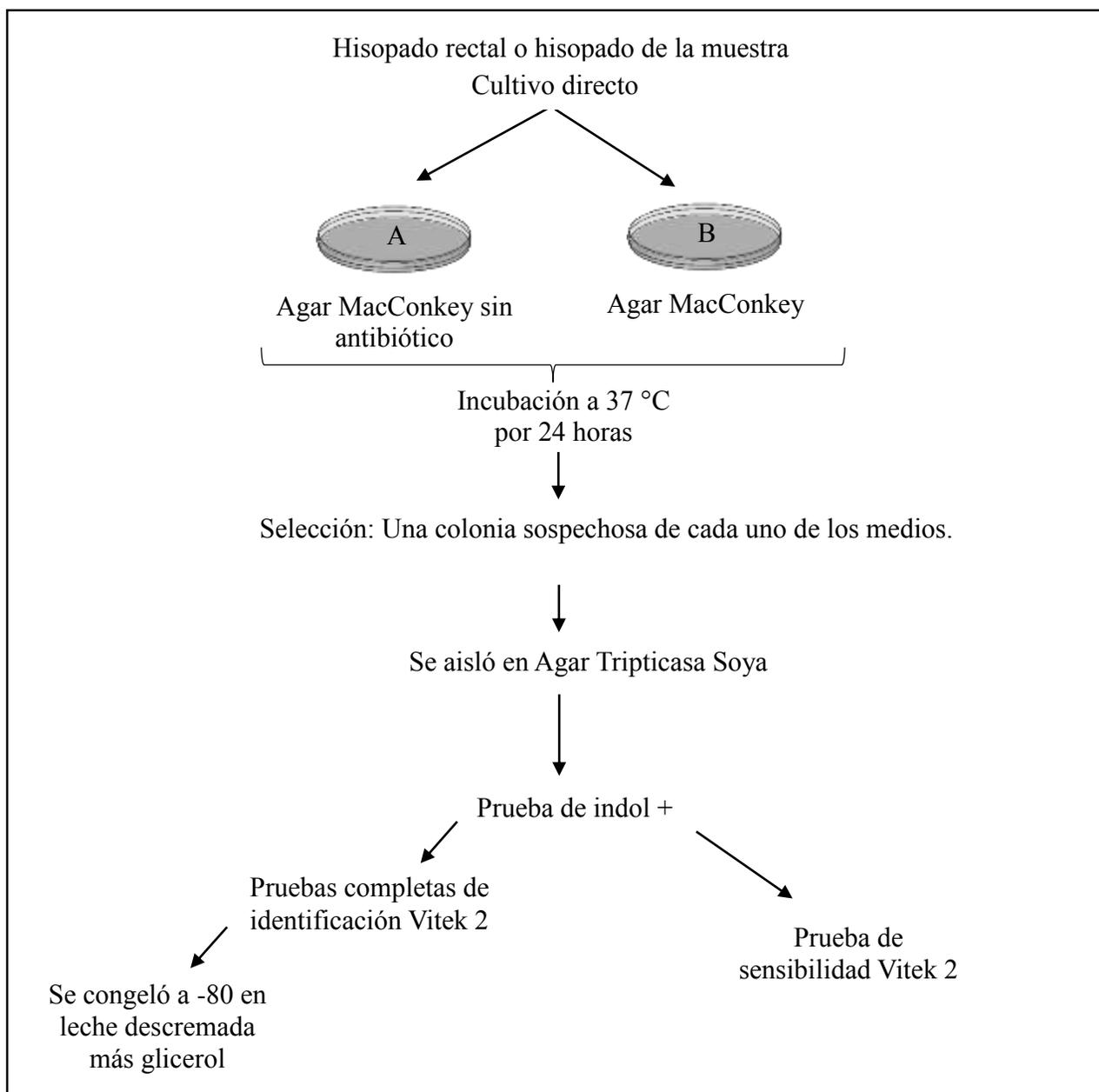


Figura 3. Metodología utilizada para la detección de aislamientos resistentes aislados en heces de *T. bairdii*.

Como control de calidad de los medios de cultivo, se utilizaron diferentes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Dichas cepas, se inocularon en una placa de cada lote producido por medio de la técnica de estría con la cepa especificada en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Crecimiento de las cepas control en el aseguramiento de la calidad en la elaboración de los medios con y sin antibiótico.

Cepa Control	Medio de cultivo	
	Agar MacConkey + Cefotaxima (2 µg/mL)	Agar MacConkey sin antibiótico
<i>Escherichia</i>		
<i>coli</i> ATCC 25922	NC	C
<i>Klebsiella</i>		
<i>pneumoniae</i> ATCC 700603	C	C

NC: No hay crecimiento, C: Si hay crecimiento

Para la identificación bioquímica de *E. coli* se realizó inicialmente una prueba de indol como análisis de tamizaje, de acuerdo con las condiciones previamente descritas (Rodríguez et al. 2005). Las cepas indol positivas se confirmaron bioquímicamente mediante la tarjeta GN utilizando el sistema automatizado Vitek 2 Compact (Biomeriux).

## **2.6. Determinación del perfil de sensibilidad a los antibióticos**

Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se realizaron mediante la tarjeta AST-N279 utilizando el sistema automatizado Vitek 2 Compact (Biomeriux). Las cepas que manifestaron un fenotipo BLEE se confirmaron mediante la técnica de doble difusión de Kirby Bauer según las indicaciones de la guía “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” M100S. 27ª Edición 2017. Brevemente, la bacteria se suspendió a una turbidez de 0.5 MacFarland, se colocó en un plato de Agar Mueller Hinton (MHA) en presencia de sensidiscos de cefotaxima o ceftazidima con y sin ácido clavulánico. Se debió de generar un halo de inhibición de 5 mm o más entre los sensidiscos de ácido clavulánico con respecto a los que no lo tenían para comprobar la presencia del fenotipo tipo BLEE. Una vez obtenidos los perfiles de sensibilidad y la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para cada aislamiento, proporcionadas por el Vitek 2, se calcularon los valores de MIC<sub>50</sub> y MIC<sub>90</sub>, que corresponde a la concentración más baja del antibiótico a la que se inhibieron el 50% y el 90% de los aislamientos (CLSI, 2017).

## **2.7. Análisis de las variables del paisaje**

Los perfiles de sensibilidad a los antibióticos que se determinaron previamente fueron dispuestos en mapas utilizando un software para SIG (QGIS 2.18.0.). Por medio de varias capas de Costa Rica (capa geográfica de Costa Rica, áreas de conservación SINAC, 2014; Áreas silvestres protegidas SINAC, 2014; Relieve 2008; Ríos 1:50000; Poblados 2014; y Red de caminos, 2014), y la base de datos de ubicación de fincas ganaderas manejada por el Servicio Nacional de Salud Animal, SENASA, en el 2014. Las variables del paisaje que se

tomaron en cuenta que pudieron afectar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en cada muestra fueron: categoría de manejo, distancia a poblados (km), distancia a fincas ganaderas (km), distancia a Ruta Interamericana 2 (km), y distancia a cuerpos de agua (km). Además de las variables medidas desde el análisis geográfico, se midieron otras variables en el campo que se consideraron que tuvieran una potencial influencia sobre los perfiles de sensibilidad a los antibióticos: cobertura forestal (SINAC 2008 y MAPCOBIO-JICA, 2017) y del sotobosque alrededor del sitio de colecta de cada muestra. Lo anterior debido a que estos factores pudieron influir en la exposición de las muestras a las condiciones ambientales, por lo tanto, la microbiota presente en la deposición se pudo haber visto afectada dependiendo de la vegetación presente en el sitio de colecta (Menke et al. 2015).

Con el fin de determinar la actividad antropogénica en el área de estudio, se evaluó la presencia de patrones espaciales en la ubicación de los perfiles de sensibilidad a los antibióticos con respecto a las variables del paisaje, o áreas intervenidas por el ser humano presentes o más cercanas al área de estudio, en este caso poblados, fincas ganaderas, Ruta Interamericana 2 y cuerpos de agua. Estas variables fueron seleccionadas considerando que son algunas vías potenciales de diseminación de determinantes de resistencia al ambiente (Kümmerer 2009; Allen et al. 2010).

## **2.8. Análisis de datos**

Los análisis de los perfiles de sensibilidad a los antibióticos se realizaron de forma descriptiva observando presencia y ausencia de resistencia a las distintas clases de antibióticos, y se representó gráficamente. Para determinar si existe una relación entre los

perfiles de sensibilidad a los antibióticos obtenidos y las variables del paisaje se hizo un análisis descriptivo de las muestras sobre mapas con las capas deseadas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Aislamiento de *E. coli*

En total se recolectaron 65 muestras de heces, 63 de vida libre y dos de cautiverio. No se presentó crecimiento de colonias de *E. coli* en cultivo en el agar MacConkey de tres muestras de vida libre (H039, H040, H044) colectadas en las cercanías del Cerro Asunción, a una altitud de 3154 msnm y 3170 msnm. Por lo tanto se obtuvo 63 aislamientos en total, 60 de vida libre y tres de cautiverio (se aislaron dos colonias con perfil distinto de un mismo animal) (Figura 4).

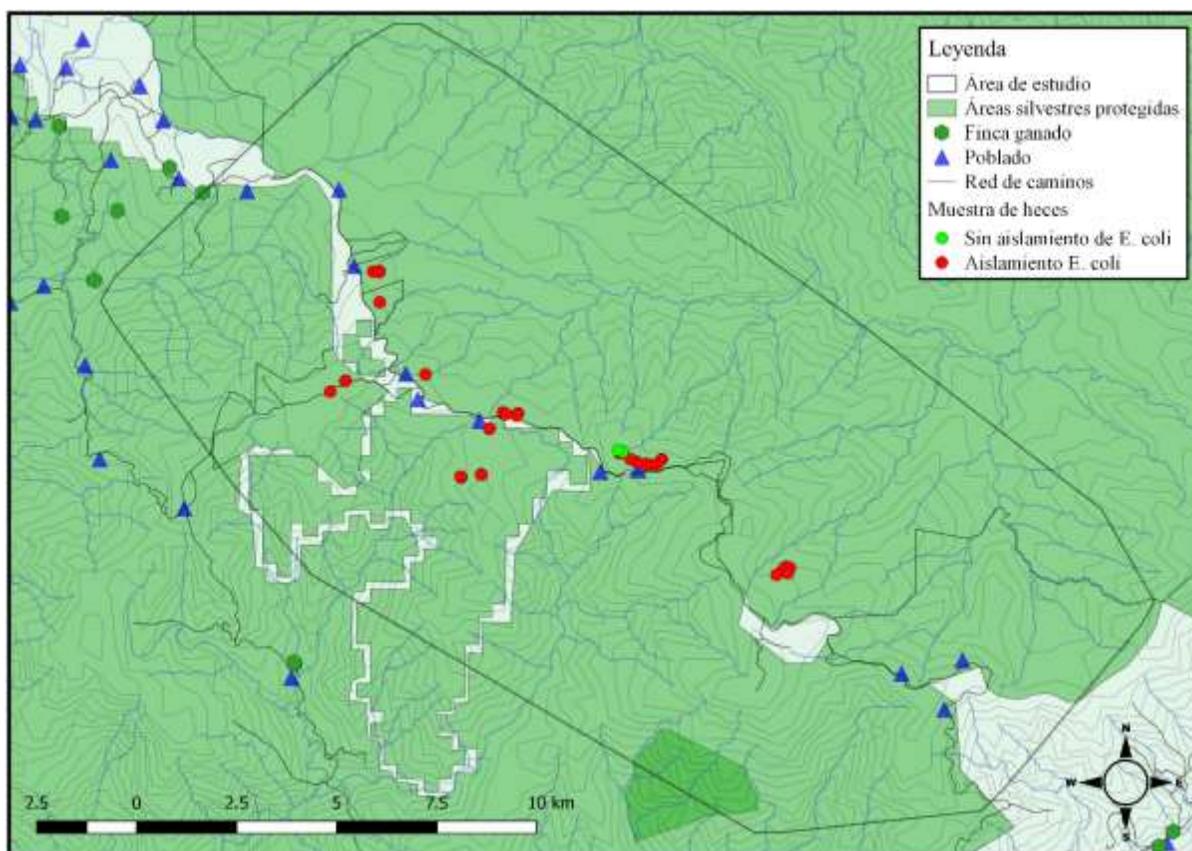


Figura 4. Georeferenciación de los 60 aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de *T. bairdii* de vida libre.

De todos los aislamientos obtenidos, de acuerdo con los análisis del sistema Vitek 2, se obtuvo en promedio para todos los aislamientos, un porcentaje de identidad bioquímica con la especie *Escherichia coli* de un 95%, con una desviación estándar de DE=2,67.

### 3.2. Perfil de sensibilidad a los antibióticos

Los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en las dantas de vida libre mostraron un 98% (58/60) de pansusceptibilidad, y un 2% de resistencia al ácido nalidíxico (1/60) (Cuadro 2, Figura 5). El resto de los antibióticos evaluados en los aislamientos de vida libre (amikacina, gentamicina, cefotaxime, ceftazidima, cefepime, cefalotina, ampicilina, piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, sulfa/trimetoprim, colistina y nitrofurantoina) mostraron un 100% de sensibilidad.

Cuadro 2. Perfil de sensibilidad a los antibióticos en 60 aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de *T. bairdii* de vida libre.

Perfil fenotípico	# clases resistentes/ # clases de Atb	# aislamientos	%
Ánx	1/9	1	2
Pansusceptible	0/9	59	98

Atb, antibiótico; Amk, Amikacina; Gen, Gentamicina; Cep, Cefalotina; Ctx, Cefotaxime; Ctz, Ceftazidime; Cpe, Cefepime; Amp, Ampicilina; Ptm, Piperacilina/Tazobactam; Ams, Ampicilina/Sulbactam; Ipm, Imipenem; Mpm, Meropenem; Cip, Ciprofloxacina; Ánx, Ácido nalidíxico; Stm, Sulfa Trimetoprim; Col, Colistina; Nfa, Nitrofurantoína

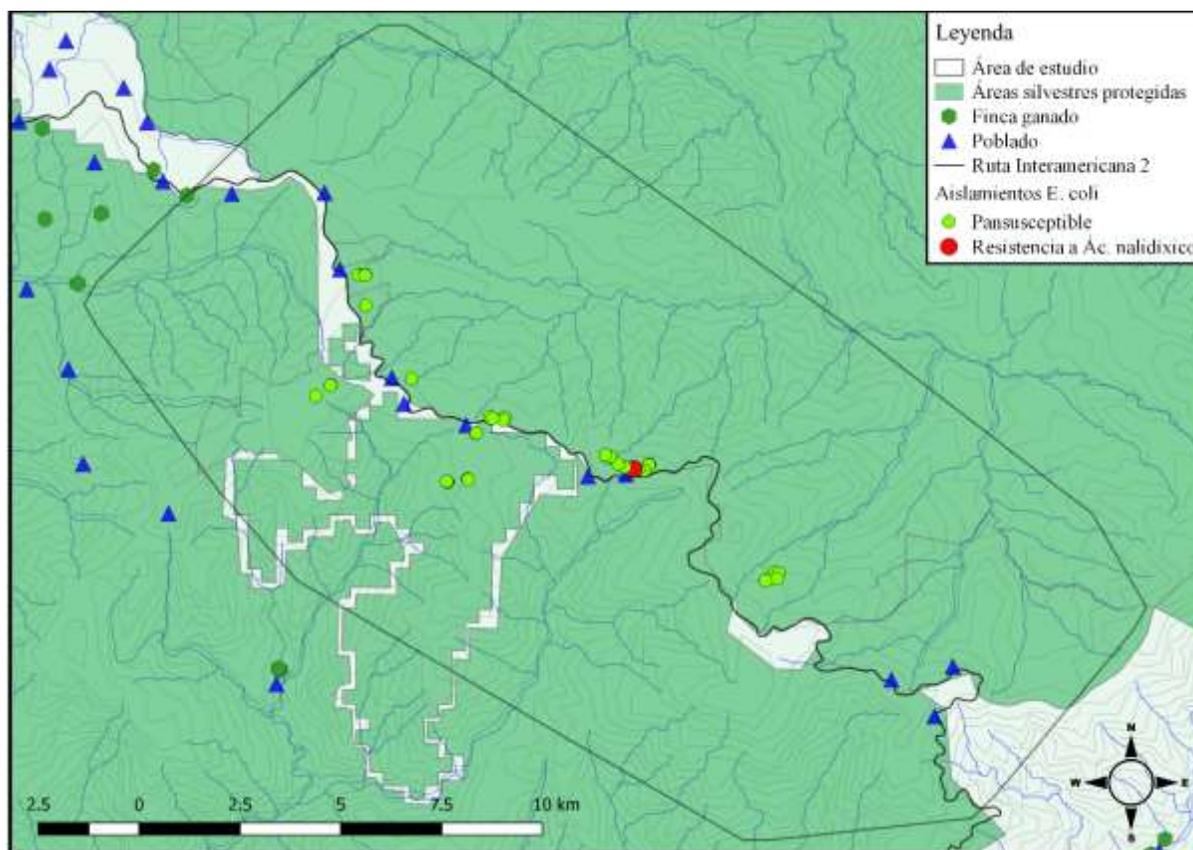


Figura 5. Georeferenciación y clasificación por colores de 60 aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de *T. bairdii* de vida libre a partir de su perfil de sensibilidad a los antibióticos.

En cuanto a los aislamientos obtenidos a partir de las dantas de cautiverio, uno de ellos mostró resistencia a la cefalotina, cefotaxime, cefepime, ampicilina y ampicilina/sulbactam. Al haber resistencia en tres clases diferentes de antibióticos, este aislamiento se clasificó como multirresistente. Este aislamiento multirresistente, mostró además una betalactamasa de espectro extendido (BLEE), el cual fue previamente reportado por el Vitek 2. Este fenotipo fue confirmado posteriormente mediante la técnica de difusión de disco (Kirby Bauer). El análisis del aislamiento mostró una diferencia de más de 5mm entre el halo de inhibición dado por el

disco de Cefotaxima/Ác. Clavulánico y el disco con Cefotaxima, con lo cual se confirma el fenotipo BLEE (CSLI, 2017) (Figura 6).

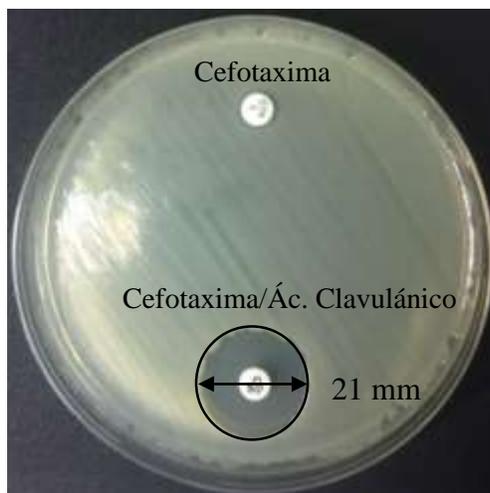


Figura 6. Confirmación fenotípica de la presencia de BLEE por medio de la técnica de difusión en disco (Kirby Bauer).

El otro aislamiento obtenido a partir del segundo animal de cautiverio, mostró el mismo perfil de sensibilidad que el obtenido en la mayoría de los aislamientos obtenidos de las dantas de vida libre, donde se mostró sensibilidad a todos los antibióticos evaluados.

### 3.3. Variables del paisaje

En el Parque Nacional Tapantí Macizo de la Muerte (PNTMM) se colectó el 60% (38/63) de las muestras de heces de danta, seguido por el Parque Nacional Los Quetzales (PNLQ) con un 25% (16/63), la finca privada con uso agroecoturístico Iyok Ami (IA) con un

9% (6/63), finalmente en la Reserva Biológica Cerro Vueltas (RBCV) se colectó el 5% (3/63) (Anexo 5, Figura 7).

La finca de ganado con menor distancia de donde se colectó alguna muestra se encontró a 4,6 km; mientras que el poblado más cercano estaba situado a 216 m del sitio de colecta, y la mayor distancia de un poblado fue de 4,3 km. La distancia más cercana a la carretera Ruta 2 Interamericana Sur con respecto al sitio de colecta de una muestra fue de 62 m, y la mayor distancia fue de 1,7 km (Figura 7).

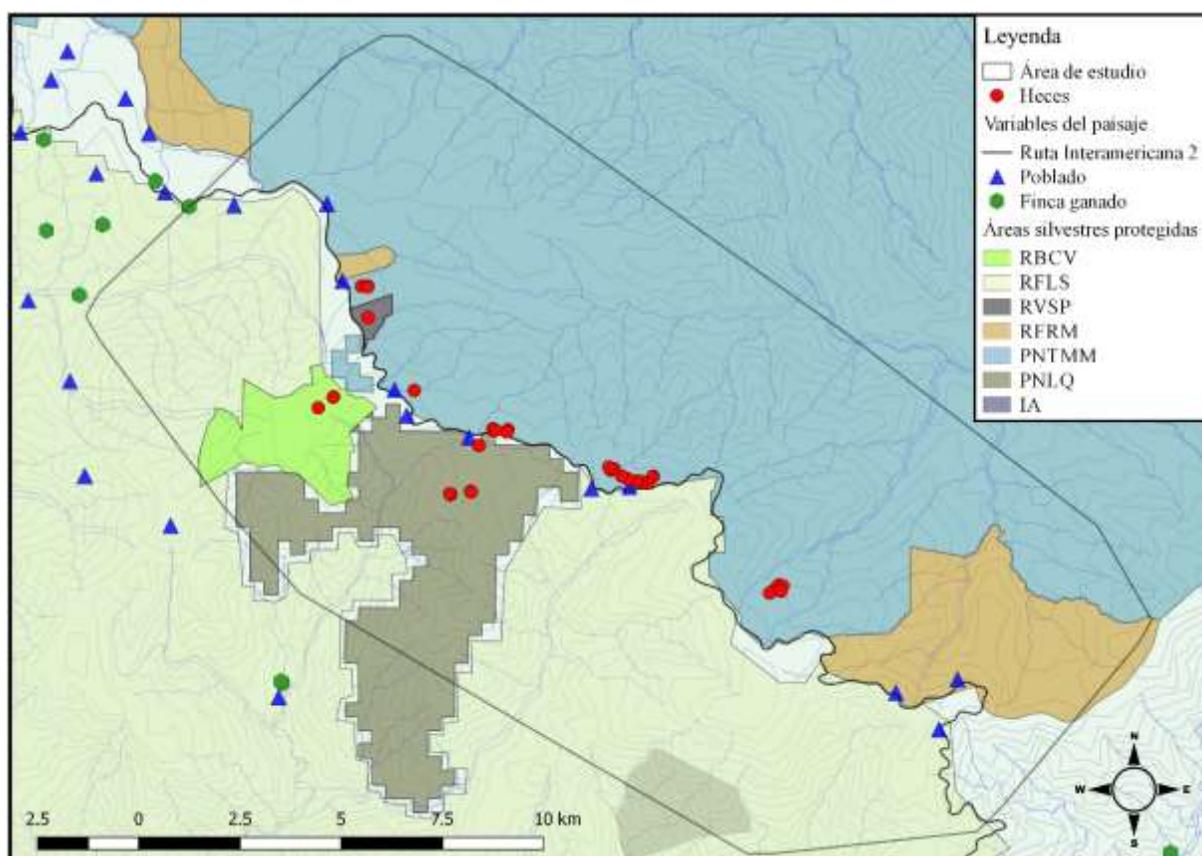


Figura 7. Georreferenciación de las 63 muestras de heces de *T. bairdii* de vida libre colectadas en el área de estudio, en relación con el área protegida y las variables del paisaje.

En relación con los sitios de colecta se muestrearon diez diferentes sitios, tomando en cuenta las características del paisaje como pendiente, elevación, cobertura vegetal, rango de movimiento de las dantas (3 km de radio), poblado, Ruta Interamericana 2 y finca de ganado; se muestrearon 19 diferentes letrinas.

De las 63 muestras encontradas en vida libre, el 84% (53/63) estaban situadas en letrinas, mientras que el 16% (10/63) de muestras restantes, no. Tres muestras colectadas en las cercanías del Cerro Asunción (H039-H040-H044) estaban localizadas a 3154 msnm (H039-H040) y 3170 msnm (H044), ésta última con la altitud máxima de las muestras colectadas.

Con respecto a la cobertura vegetal, un total de 23 muestras estaban situadas en páramo, correspondiente al 36% (23/63); el 7% (5/63) de las muestras se encontraron en bosque primario; y el restante 56% (35/63) de las muestras se encontraron en bosque secundario alterado (Figura 8).

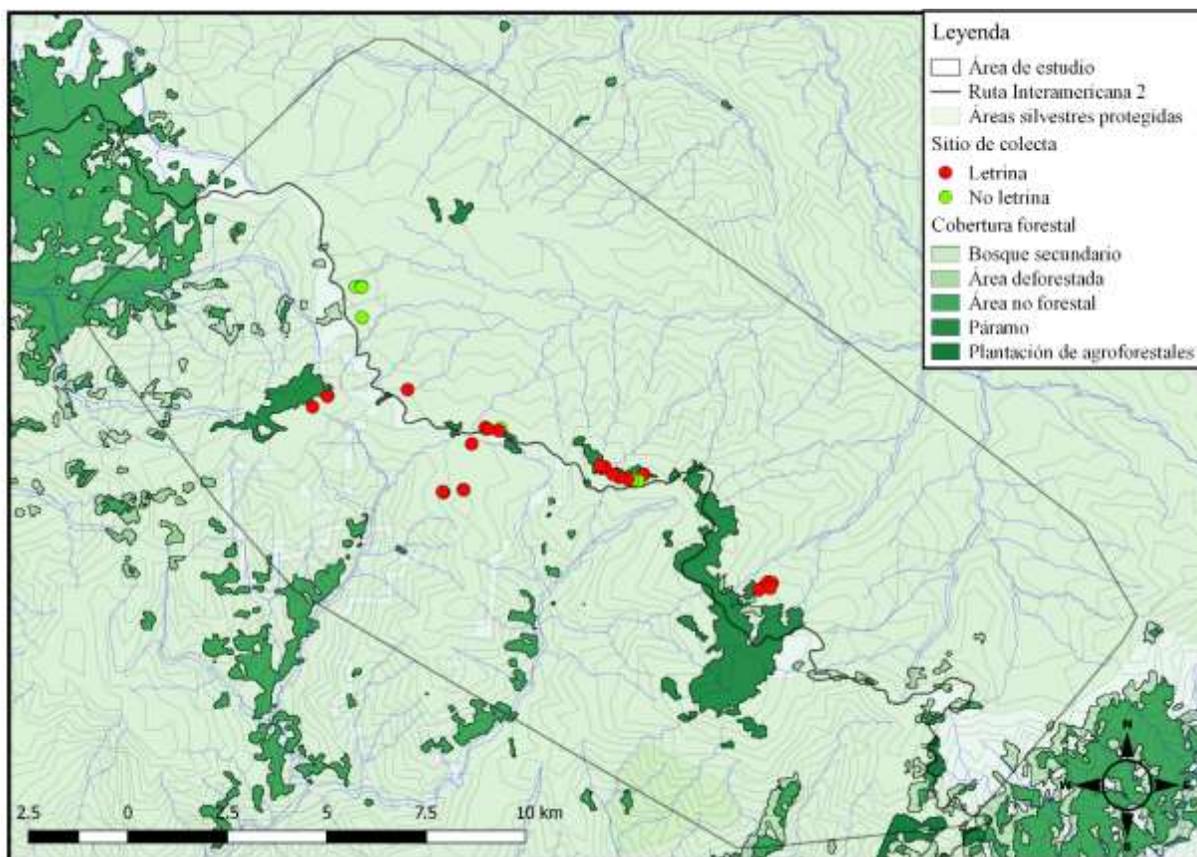


Figura 8. Georreferenciación de las 63 muestras de heces de *T. bairdii* de vida libre colectadas en el área de estudio, en relación con el sitio de colecta y la cobertura forestal.

En lo referente a características del sitio de colecta, el 46% (29/63) de las muestras se encontraron en senderos de danta. Un total de 20% (13/63) de las muestras se colectaron muy cerca de cuerpos de agua, nacientes, ríos, riachuelos o quebradas. Por último un 27% (17/63) de las muestras se encontraron cercanas a sitios con abundante *Chusquea* spp.

#### 4. DISCUSIÓN

Con respecto al aislamiento de *E. coli* a partir de las muestras de heces colectadas de *T. bairdii* de vida libre colectadas, cabe destacar que en las muestras H039, H040 y H044 no se logró aislar. Éstas muestras se recolectaron a una altitud de 3154 msnm (H039 y H040) y 3170 msnm (H044) (Figura 4). La ausencia de crecimiento se puede asociar a una alta cantidad de radiación ultravioleta presentada a una mayor altitud, sumado al tipo de vegetación que consiste en páramo (Figura 8), en donde hay poca sombra natural, como consiguiente se tiene una mayor exposición de las deposiciones a las condiciones naturales.

Lo anterior coincide con lo reportado por Menke y colaboradores (2015), los cuales sugieren un cambio en la composición del microbioma en heces por la exposición a condiciones naturales en un determinado lapso de tiempo, en donde el oxígeno y la radiación ultravioleta se consideraron los factores más relevantes, principalmente en el cambio de una población bacteriana anaerobia a una aerobia facultativa inclusive a los dos días de que el animal haya excretado la deposición. Por lo tanto, se sugiere que a una mayor altitud, y a una mayor exposición de las heces a la radiación ultravioleta en un determinado periodo de tiempo, hay una menor posibilidad de recuperar aislamientos bacterianos, en este caso de *E. coli*.

Los bajos niveles de resistencia a los antibióticos encontrados en los aislamientos obtenidos, difieren con respecto a otros estudios llevados a cabo en animales de vida silvestre, ya que en la mayoría se evidenció un alto grado de resistencia (Rolland et al; 1985; Costa et al. 2006; Rwego et al. 2008; Poeta et al. 2009; Guenther et al. 2011; Dias et al. 2015; Alonso et al. 2016; Giacobello et al. 2016; Rasmussen et al. 2017).

Una diferencia importante es que dichos estudios fueron llevados a cabo en su mayoría en áreas semiurbanas o en sitios donde la fauna silvestre está en contacto cercano con el ser humano y animales domésticos. Por ejemplo, Rolland y colaboradores (1985), muestrearon babuinos que se alimentaban de desechos humanos, mientras que Giacobello y colaboradores (2016) analizaron aislamientos de aves silvestres recibidas en un centro de rescate. En el presente estudio, se sugiere una baja actividad antropogénica en el área de estudio. Al estar ubicada la zona de estudio en la convergencia de seis áreas protegidas y reservas privadas, esto pudo tener un efecto positivo en los bajos niveles de resistencia detectados en las bacterias evaluadas en comparación con los otros estudios.

En África, se han estudiado chimpancés por Albrechtova y colaboradores (2014) y gorilas por Benvides y colaboradores (2012). En ambos estudios se aisló *E. coli* y se obtuvo niveles bajos de resistencia en los primates. En dos chimpancés se detectó resistencia a más de dos antibióticos, y en el mismo estudio se detectó la presencia de genes *ampC* los cuales se consideran una resistencia intrínseca (Jacoby 2009; Albrechtova et al. 2014).

Según varios autores (Skurnik et al. 2006; Österblad et al. 2001) se sugiere que los bajos niveles de resistencia antibacteriana se pueden encontrar en poblaciones de animales silvestres que no hayan sido expuestas a antibióticos, o en sitios de baja actividad antropogénica. También, Albrechtova y colaboradores (2014) sugieren que la evolución natural del resistoma haya tendido a la baja persistencia de mecanismos de resistencia, es decir, que en lugares con una baja actividad antropogénica como la Cordillera de Talamanca, la presión selectiva hacia la persistencia de genes de resistencia sobre la microbiota intestinal de *T. bairdii* sea muy baja. Esto se refleja no solo en los bajos niveles de resistencia

observados, sino también en la gran cantidad de aislamientos pansusceptibles detectados (59/60).

Se considera que la actividad antropogénica o la proximidad al ser humano, es la principal fuerza que determina la estructura genética poblacional de *E. coli* comensal, tanto general como relacionado a la resistencia antibacteriana. Es decir, puede ser un reflejo de la actividad antropogénica en términos de resistencia antibacteriana, en cuanto a los perfiles de sensibilidad a los antibióticos se refiere (Österblad et al. 2001; Tenailon et al. 2010; Carroll et al. 2015). En este sentido, se puede sugerir que los bajos niveles de resistencia detectados en los aislamientos de *E. coli* (solamente se detectó resistencia al ácido nalidíxico en un aislamiento) sumado a la gran cantidad de aislamientos pansusceptibles (59/60), se pueden deber a una baja actividad antropogénica presente en el ambiente de las dantas estudiadas.

Con respecto a la resistencia encontrada al ácido nalidíxico (1/60), se reporta resistencia de *E. coli* hacia las fluoroquinolonas mediada por plásmidos, en donde por medio de mutaciones cromosómicas, la resistencia es capaz de mantenerse a pesar de no haber presión antibiótica selectiva (Papich and Riviere, 2009).

La resistencia a las cefalosporinas (cefalotina, cefepima, ceftazidima y cefotaxima), detectada en el aislamiento multirresistente obtenido de la danta de cautiverio (H009-B), puede deberse a una adquisición mediada por plásmidos que confieren resistencia a las cefalosporinas de 3era generación (ceftazidima y cefotaxima) (Sayah et al. 2005). Del mismo modo, las bacterias Gram-negativas pueden adquirir resistencia a las cefalosporinas de primera generación por medio de la inhibición de la penetración y mediante la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas (Papich and Riviere, 2009). También puede darse la aparición de mutaciones

estables, es decir, las bacterias son capaces de mantener la mutación a pesar de estar en ausencia de una presión selectiva de genes de resistencia (Sayah et al. 2005). Luego, la CSLI (2017) establece que *E. coli* no tiene una resistencia intrínseca hacia los  $\beta$ -lactámicos, y se menciona la cefalotina como uno de los antibióticos de las cefalosporinas de primera generación, en este caso, la resistencia a las cefalosporinas obtenida, indica una resistencia adquirida.

Por lo tanto, considerando estos alcances, se sugiere buscar determinantes de resistencia en humanos y animales silvestres del mismo sitio de cautiverio, así como en muestras ambientales como en tierra y cuerpos de agua, con el objetivo de relacionar la influencia del ambiente en el resistoma de la danta (Radhouani et al. 2014). Además de realizar estudios sobre la dieta de la danta en el sitio de cautiverio, con el fin de determinar la presencia de *Cephalosporium acremonium* en algún alimento que pueda fermentar, generando así bacterias comensales resistentes a las cefalosporinas (Carlos Luna-Tortós, comunicación personal; Mario Baldi-Salas, comunicación personal).

De igual manera, tomando en cuenta que el animal había sido tratado con ceftiofur un mes antes del muestreo, pero por cuestiones económicas el tratamiento oral no se completó, es probable que se haya presentado una subdosificación o una MIC inferior a la necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano (Giguère et al. 2013; Karen Sibaja-Morales, comunicación personal); generándose de esta manera algún mecanismo de resistencia por medio del aumento en tasas de mutaciones, aumento en la variabilidad fenotípica o genotípica, influir en la formación del biofilm, y además se promueve la transferencia horizontal de genes con un

efecto de cascada en comunidades bacterianas a partir de pequeñas interacciones entre especies bacterianas (Andersson and Hughes 2014; Hiltunen et al. 2016).

En el mismo aislamiento, se demostró la presencia de enzimas hidrolíticas (betalactamasas) con un fenotipo BLEE. Se ha visto que las enzimas del grupo 2be, son capaces de hidrolizar penicilina y ampicilina, y en menor grado carbenicilina y cefalotina (Paterson and Bonomo, 2005). Cabe destacar que una misma bacteria puede contener diferentes tipos de BLEE, tales como CTX-M, SHV, y/o AmpC, lo que podría variar el fenotipo de resistencia observado (Paterson and Bonomo 2005; Jacoby 2009). Por lo tanto, resulta esencial utilizar herramientas computacionales como ACLAME y Phage\_Finder para la detección de plásmidos o elementos genéticos móviles, los cuales pueden identificar la fuente de un gen de resistencia particular en un genoma (Brinkac et al. 2017).

En cuanto a las variables del paisaje, en los cuatro sitios de muestreo al ser áreas protegidas, hay escasa cacería y deforestación, y además los recursos para las poblaciones de dantas son abundantes (González-Maya et al. 2009). De hecho, se ha visto una alta presencia y uso del hábitat de las mismas en función de la carretera Ruta 2 Interamericana Sur y sus alrededores (Esteban Brenes-Mora, comunicación personal). Asimismo, hay poca infraestructura vial en el área de estudio, consistiendo de caminos de lastre.

Con respecto a los poblados, consisten en pequeños caceríos, comercios y pequeños hoteles, los cuales en su mayoría se localizan a lo largo de la Ruta 2 Interamericana Sur. Tal como se muestra en la Figura 9, la mayoría de muestras se colectaron en las cercanías de la Ruta 2 Interamericana Sur. Luego, la finca de ganado más cercana al sitio de colecta de una muestra de heces de danta estaba situada a 4,6 km. Por lo tanto, en el área de estudio se

sugiere que existe una baja actividad humana, asociada principalmente a la Ruta 2 Interamericana Sur, lo que se refleja en los aislamientos pansusceptibles (20/60) (Figura 6).

Como se mencionó anteriormente, son pocos los estudios en los que se obtienen altos niveles de susceptibilidad o pansusceptibilidad en animales de vida libre (Österblad et al. 2001). Por ejemplo, Ishihara y colaboradores (2011) en Japón, aislaron *E. coli* de hisopados rectales en roedores; los perfiles de sensibilidad evidenciaron un alto grado de susceptibilidad, en donde sólo en un 3,7%, (3/81) de los aislamientos se detectó resistencia a algún antibiótico. En el Parque Nacional donde se capturaron los roedores de este estudio, específicamente donde se colocaron las trampas, existe muy poca afluencia de personas, por lo que este resultado se asoció a la poca influencia del ser humano en este ambiente. En dos (2/3) de los aislamientos resistentes obtenidos en este estudio se mostró resistencia solamente a la oxitetraciclina, lo cual se asoció a la resistencia encontrada a este mismo antibiótico en bacterias del ganado, ubicado a 1 km de distancia del sitio de captura. Ishihara y colaboradores (2011) evidencian un posible contacto entre la microbiota del ganado y de los roedores.

En el caso del presente estudio, esta variable del paisaje no parece jugar un papel determinante en la diseminación de bacterias resistentes hacia las dantas, principalmente por la distancia respecto a las heces de *T. bairdii* colectadas. No obstante, considerando el rango de movimiento de tres kilómetros de radio de las dantas, es importante considerar un estudio con tal de analizar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en bacterias del ganado, y en los suelos de las fincas cercanas al estudio, considerando la posibilidad de escorrentía (Foerster and Vaughan 2002; Kümmerer 2009; Hiltunen et al. 2016).

Debido a su comportamiento las dantas frecuentan cuerpos de agua (Foerster and Vaughan 2002; Tobler 2002; Tobler et al. 2006). De este modo, el 21% (13/63) de las muestras se colectaron muy cerca de ríos, riachuelos, nacientes o quebradas. Los cuerpos de agua en el área de estudio están preservados ya que se ubican en áreas protegidas, con alta cobertura forestal. Como consecuencia, al igual que el resto de las muestras, los niveles de resistencia encontrados en las muestras cercanas a los mismos fueron bajos, mostrando en 12 de estas, resistencia solamente a la cefalotina.

Según varios autores, la resistencia antibacteriana en cuerpos de agua se presenta por diversas causas; sin embargo, no se han realizado análisis de residuos o metabolitos derivados de cefalosporinas en cuerpos de agua (Kümmerer 2009; Vivant et al. 2016). Por lo tanto, se sugiere que la variable del paisaje de cuerpos de agua no parece generar una presión selectiva de determinantes de resistencia sobre la microbiota intestinal comensal de las dantas.

La similitud entre los perfiles de los animales silvestres se sugiere que se da por compartir el mismo ambiente, específicamente lugares de forrajeo (Benavides et al. 2012). En este caso, las dantas permanecen hasta un 90% del tiempo de su actividad en forrajeo (Naranjo 2009).

Estos sitios de forrajeo son compartidos con varios mamíferos en zonas altas de la Cordillera de Talamanca, tales como pequeños roedores (*Peromyscus* spp., *Heteromys* spp.), ardillas (*Sciurus* spp.), taltuzas (*Orthogeomys* spp.), puercoespín (*Sphiggurus mexicanus*), cabro de monte (*Mazama temama*), saínos (*Tayassu tajacu*), conejo (*Sylvilagus dicei*), tepezcuintle (*Cuniculus paca*), coyote (*Canis latrans*), tigrillo (*Leopardus tigrinus*),

manigordo (*Leopardus pardalis*), puma (*Puma concolor*) y jaguar (*Panthera onca*) (Wainwright 2007; Esteban Brenes-Mora, comunicación personal).

Por lo tanto, los resultados sugieren que en hábitats con una baja actividad humana en donde el contacto de fauna silvestre con humanos, y animales domésticos es nulo o escaso, la probabilidad de transmisión de cepas resistentes de *E. coli* entre animales silvestres, domésticos, y humanos, o entre distintas especies es baja. No obstante, resulta relevante estudiar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en otras especies silvestres en zonas altas de la Cordillera de Talamanca con el objetivo de comprobar esta hipótesis.

Es importante resaltar que se ha observado migración altitudinal de machos principalmente en época reproductiva, además resulta trascendental que la densidad conocida para *T. bairdii* en tierras altas es de 0,12 ind./km<sup>2</sup> en México y 2,93 ind./km<sup>2</sup> para Talamanca (Foerster and Vaughan 2002; González-Maya et al. 2009; González-Maya et al. 2012; Carbajal-Borjes et al. 2014). La importancia de lo anterior radica en que las diferentes muestras de heces colectadas pueden pertenecer a distintos o al mismo individuo; y que, dependiendo del sitio de colecta, puede haber diferencias en la presión selectiva de las variables del paisaje, por lo que, resulta esencial determinar la exposición individual de cada animal a la presión selectiva de cada variable del paisaje mediante estudios tipo caso control (Julio César Rojas, comunicación personal; Juan José Romero, comunicación personal).

Por último, es importante destacar algunas limitaciones que tiene el presente estudio: i. A la hora de encontrar una letrina, es muy difícil diferenciar entre deposiciones de distintos individuos, podría cometerse el error de colectar heces del mismo individuo. ii. En lo que se refiere al análisis de la exposición de las dantas a determinantes de resistencia, es difícil

determinar mediante una herramienta laboratorial que requiere la colecta de muestras no invasivas, la exposición individual de cada danta a cada una de las variables del paisaje, y por lo tanto a las posibles fuentes de diseminación de determinantes de resistencia. iii. Es difícil determinar con certeza si existe una relación entre el grado de resistencia con la actividad antropogénica, debido a que es difícil controlar la exposición a cada variable por medio de un análisis descriptivo o cualitativo de las variables del paisaje.

## 5. CONCLUSIONES

- 5.1. Los resultados del presente estudio indican que en sitios de baja actividad humana la probabilidad de transmisión de bacterias resistentes de *E. coli* entre animales silvestres, domésticos, y humanos, o entre distintas especies es baja, sin embargo, debido al incremento en la interacción antropogénica y la fauna silvestre por las amenazas existentes, estudios epidemiológicos de cepas resistentes son necesarios para la conservación de las dantas, así como para la salud pública.
- 5.2. Los antibióticos evaluados en los perfiles de sensibilidad en aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de *T. bairdii*, evidencian una alta susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos, reflejado en la gran cantidad de aislamientos pansusceptibles. Contrario al único aislamiento resistente al ácido nalidíxico.
- 5.3. Tal como se evidencia en este estudio, no se detectó un fenotipo BLEE en los aislamientos de *E. coli* de dantas de vida libre, lo que se evidencia en la cantidad de aislamientos pansusceptibles. Contrario a la danta de cautiverio, lo que indica que los animales bajo condiciones de cautiverio, están propensos a adquirir bacterias resistentes.
- 5.4. Los niveles de resistencia antibacteriana obtenidos a partir de heces de *T. bairdii* encontradas en el área de estudio fueron bajos, lo que sugiere que las variables del paisaje poblados, Ruta 2 Interamericana Sur, fincas de ganado y cuerpos de agua no parecen generar una presión selectiva de determinantes de resistencia para la microbiota intestinal

comensal de las dantas. Por lo tanto, es posible identificar una probable influencia de actividades antropogénicas sobre las áreas protegidas por medio de la determinación de la resistencia antibacteriana.

## 6. RECOMENDACIONES

- 6.1. Actualmente, existen pocos estudios en donde se comparen los perfiles de resistencia antibiótica de la microbiota comensal de animales domésticos, silvestres y humanos simultáneamente en un área geográfica en común. Por lo tanto, se sugiere realizar estudios paralelos comparativos para entender la ecología del patrón de la diseminación de bacterias resistentes en el área de estudio, es decir analizar los perfiles de resistencia a los antibióticos en variables del paisaje, tales como cuerpos de agua, aguas residuales, agricultura, acuicultura, fincas de producción animal, poblados, comercio, entre otras.
- 6.2. En las últimas dos décadas, se cree que cerca del 75% de las enfermedades emergentes en humanos se derivan de la vida silvestre, por lo que en muchas ocasiones la terapia antibiótica es la primera elección para tratar enfermedades infecciosas. Como consecuencia, urge tomar estrategias colectivas, multidisciplinarias, e inclusive legales con el fin de regular el uso abusivo e indiscriminado de antibióticos, con tal de disminuir la morbilidad y mortalidad por infecciones de bacterias multirresistentes.
- 6.3. Como sugerencias para estudios futuros con tal de solventar las limitaciones de este estudio, con el fin de comprender la ecología del patrón de la diseminación de determinantes de resistencia en el área de estudio, se sugiere realizar captura de las dantas, donde se coloquen radio collares a animales adultos, seguido por un estudio paralelo de genética de los mismos individuos, sumado a juveniles, con el objetivo de realizar el

estudio con una metodología tipo caso control, y así poder analizar la exposición individual a las variables del paisaje.

6.4. Se propone utilizar una herramienta laboratorial que permita la colecta de una muestra invasiva, la cual consiste en un hisopado rectal, con tal de analizar los genes de resistencia presentes en cada individuo, seguidamente determinar las frecuencias de resistencia en las poblaciones de los aislamientos bacterianos obtenidos (Österblad, 2001). Idealmente se debería de realizar un estudio en el cual se busquen determinantes de resistencia en muestras ambientales en el área de estudio, con el objetivo de relacionar la influencia del ambiente en el resistoma de la danta.

6.5. Se sugiere utilizar bases de datos de genes de resistencia como ResFam y CARD. Además, se recomienda utilizar herramientas computacionales como ACLAME y Phage\_Finder para la detección de plásmidos o elementos genéticos móviles, los cuales pueden identificar la fuente de un gen de resistencia particular en un genoma (Brinkac et al. 2017).

6.6. Por último, como especie centinela, la danta es un buen indicador de la exposición potencial de resistencia antibacteriana en el área de estudio por varias razones. Primero, al tener un rango relativamente pequeño de movimiento, al menos las hembras (3-4 km de diámetro), siendo los machos migratorios estacionales en época reproductiva; segundo, esta especie se distribuye en todo el rango altitudinal de Costa Rica, es decir su hábitat incluye gran parte de los ecosistemas terrestres presentes en el país; tercero, su variada

dieta herbívora les permite alimentarse de más de 120 especies de plantas; y cuarto, prefieren lugares asociados a cuerpos de agua (González-Maya et al. 2009; González-Maya et al. 2012; Foerster and Vaughan 2015). No obstante, se recomienda utilizar especies con un rango de movimiento menor y fáciles de capturar, con el fin de determinar individuos, sexo, y su estatus de salud, por ejemplo roedores (*Peromyscus* spp. y *Heteromys* spp.) y didélfidos (*Didelphis* spp.), con el fin de utilizarlos como especie centinela (Sayah et al. 2005; Furness et al. 2017; Rasmussen et al. 2017).

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F. (2005) Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Bas. Clin. Pharma. and Toxi.* 96:271-281
- Aguirre, A. A., Ostfeld, R. S., Tabor, G. M., House, C. and M. C., Pearl. 2002. *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice.* Oxford University Press. USA.
- Albrechtova, K., Papousek, I., De Nys, H., Pauly, M., Anoh, E., Mossoun, A., Dolejska, M., Masarikova, M., Metzger, S., Couacy-Hymann, E., Akoua-Koffi, C., Wittig, R., Klimes, J., Cizek, A., Leendertz, F. and I., Literak. 2014. Low rates of antimicrobial resistant Enterobacteriaceae in wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, Surrounded by villages with high prevalence of multiresistant ESBL-Producing *Escherichia coli* in people and domestic animals. *PLOS ONE.* 9: 1-19. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113548>
- Allen, H. K., J., Donato, H. H., Wang, K. A., Cloud-Hansen, J., Davies and J., Handelsman. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 251-259.
- Alonso, C., González, D., Tenorio, C., Ruiz, F. and C. Torres. 2016. Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from farmed red deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamase. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 45: 34-39.
- Andersson, D. I. and D., Hughes. 2014 Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465–478. (doi:10.1038/nrmicro3270).

- Angulo, A. S. 2017. Identificación de genes de resistencia a antimicrobianos en *Panthera onca* y *Puma concolor* y su relación con el grado de antropogenización en Costa Rica. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales. Universidad Nacional de Costa Rica. Heredia. Costa Rica.
- Benavides, J., Godreuil, S., Bodenham, R., Ratriarison, S., Devos, C., Petretto, M., Raymond, M. and P., Escobar-Páramo. 2012. No evidence for transmission of antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains from humans to wild western lowland gorillas in Lopé National Park, Gabon. *App. and Environm. Microb.* 78: 4281-4287.
- Berglund, B. 2015. Environmental dissemination of Antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Inf. Eco. Epi.* 5.
- Blaiotta, G., Di Cerbo, A., Murru, N., Coppola, R. and M., Aponte. 2016. Persistence of bacterial indicators and zoonotic pathogens in contaminated cattle wastes. *BMC. Microb.* 16: 87.
- Blanco, G. J., Lemus, J. A. and J. Grande. 2009. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environ. Res.* 109: 405-412.
- Brinkac, L., Voorhies, A., Gomez, A. and K., Nelson. 2017. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb. Ecol.* 1-8.
- Bush, K and Jacoby, G. 2010. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Ag. and Chemo.* 54:969–976.

- Carbajal-Borjes, J. C., Godínez-Gómez, O. and E., Mendoza. 2014. Density, abundance and activity patterns of the endangered *Tapirus bairdii* in one of its last strongholds in southern Mexico. *Trop. Cons. Sci.* 7: 100-114.
- Carrol, D., Wang, J., Fanning, S. and B., McMahon. 2015. Antimicrobial Resistance in Wildlife: Implications for Public Health. *Zoonoses Public Health.* 62: 534-542.
- Castellanos, A., Foerster, D. J., Lizcano, E., Naranjo, E., Cruz-Aldan, I., Lira-Torres, R., Samudio, S., Matola, J., Shipper and J. F. González-Maya. 2008. *Tapirus bairdii*. En IUCN 2012. IUCN Red list of threatened species. Version 2012.2. <http://iucnredlist.org> (Consulta: 3 enero, 2018).
- Chassot, O., Monge, G. and V., Jiménez. 2005. Hábitat potencial para la danta centroamericana (*Tapirus bairdii*) en el Corredor Biológico San Juan-La Selva, Costa Rica. Centro Científico Tropical.
- Costa, D., P., Poeta, Y., Saenz, L., Vinue, A. C., Coehlo, M., Matos, B., Rojo-Bezares, J., Rodrigues and C., Torres. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild mammals. *Micro. Drug. Resist.* 14: 71-77.
- Costa, D., P., Poeta, Y., Saenz, L., Vinue, A. C., Coehlo, B., Rojo-Bezares, A., Jouni, M., Zarazaga, J., Rodrigues and C., Torres. 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extenden-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 1311-1312.
- CLSI M100S. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 27a. ed.

- Dias, D., Torres, R., Kronvall, G., Fonseca, C., Mendo, S. and T., Caetano. 2015. Assessment of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates and screening of *Salmonella* spp. in wild ungulates from Portugal. *Resear. Microb.* 166: 584-593.
- Foerster, C. R. and C., Vaughan. 2002. Home Range, Habitat Use, and Activity of Baird's Tapir in Costa Rica. *Biotropica.* 34: 423-437.
- Foerster, C. R. and C., Vaughan. 2015. Diet and foraging behavior of a female Baird's tapir (*Tapirus bairdii*) in a Costa Rican lowland rainforest. *Cuaderno de Investigación UNED.* 7: 259-267.
- Furness, L., Campbell, A., Zhang, L., Gaze, W. and R., McDonald. 2017. Wild small mammals as sentinels for the environment transmission of antimicrobial resistance. *Environ. Resear.* 154: 28-34.
- García, M., Jordan, C., O'Farril, G., Poot, C., Meyer, N., Estrada, N., Leonardo, R., Naranjo, E., Simons, Á., Herrera, A., Urgilés, C., Schank, C., Boshoff, L. and Ruiz-Galeano, M. 2016. *Tapirus bairdii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T21471A45173340. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T21471A45173340.en>.
- Giacopello, C., Foti, M., Mascetti, A., Grosso, F., Ricciardi, D., Fisichella, V. and F., Lo Piccolo. 2016. Antimicrobial resistance patterns of Enterobacteriaceae in European wild birds species admitted in a wildlife rescue centre. *Vet. Ital.* 52: 139-144.
- Giguère, S., Prescott, J. and P., Dowling. 2013. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* 5a. ed. Wiley Blackwell. Iowa. USA.

- Gilliver, M. A., M., Bennet, M., Begon, S. M., Hazel and C. A., Hart. 1999. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nat.* 401: 233-234.
- González-Maya, J. F., J., Shipper, B., Polidoro, A., Hoepker, D. Z., Charry and J. L., Belant. 2012. Baird's tapir density in high elevation forests of the Talamanca region of Costa Rica. *Int. Zoo.* 381-388.
- González-Maya, J. F., Castaño-Uribe, C., Balaguera-Reina, S. A., Zárrate-Charry, D., Cepeda, A. A. and C. A., Jaramillo. 2011. La importancia de los felinos como especies clave en los procesos de planificación en Colombia: el plan de Conservación de los felinos para el caribe colombiano. *Boletín Oficial del Proyecto de Conservación de Aguas y Tierras ProCAT.* 3: 46-52.
- González-Maya, J. F., J., Shipper and K., Rojas-Jiménez. 2009. Elevational Distribution and Abundance of Baird's tapir (*Tapirus bairdii*) at Different Protection Areas in Talamanca Region of Costa Rica. *Tapir Conservation.* 18.
- Gordon, D. and A., Cowling. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microb.* 149: 3575-3586.
- Guenther, S., Ewers, C. and Wieler, L. H. 2011. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol.* 2: 246.
- Hernández, J., Stedt, J., Bonnedahl, J., Molin, Y., Drobni, M., Calisto, N., Gomez, C., Astorga, M., González, D., Waldenstrom, J., Blomwvist, M. and B., Olsen. 2011. Human-Associated Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase in the Antarctic. *App. and Environm. Microb.* 78: 2056-2058.

- Hernández, S. M., R., Aguilar, D., Leandro and C. R., Foerster. 2005. Health Evaluation of a Radiocollared Population of Free-Ranging Baird's Tapirs (*Tapirus bairdii*). Costa Rica. Zoo and Wild. Med. 36: 176-187.
- Hiltunen, T., Virta, M. and A. L., Laine. 2016. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. Phil. Trans. R. Soc. B. 372. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0039>.
- Ishihara, K., Kanamori, K., Asai, T., Kojima, A., Takahashi, T., Uneno, H., Muramatsu, Y. and Y., Tamura. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from wild mice in a forest of a Natural Park in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 1191-1193.
- Jacoby, G. 2009. AmpC  $\beta$ -lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22: 161-182.
- Janzen, D. H. 1981. Digestive seed predation by a Costa Rican Baird's tapir (*Tapirus bairdii*). Biotropica. 13: 59-63.
- Kanai, H., H, Hashimoto and S., Mitsuhashi. 1981. Drug resistance and conjugative-R-plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from wild birds (Japanese tree sparrows, green pheasants and bamboo partridges). Jpn. Poult. Sci. 18: 234-239.
- Klimes, J., M., Machalkova, M., Dolejska, A., Cizek, D., Janoszowska, P., Alexa, J., Albrechtova, Vojtech and I., Literak. 2013. *Escherichia coli* producing extended spectrum Beta-lactamase CTX-M-15 in a captive South American tapir (*Tapirus terrestris*). Zoo and Wild. Med. 44: 173-175

- Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I. *Chemosph.* 75: 417-434.
- Mangini, P. R., E. P., Medici and R. C., Fernandes-Santos. 2012. Tapir health and conservation medicine. *Int. Zoo.* 7: 331-345.
- Martínez, J. L. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front. Microb.* 3: 1-3.
- Martínez, J. L. 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276: 2521-2530.
- Martínez, J. L. 2009. Environment pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Poll.* 157: 2893-2902.
- Medici, E. P., Mangini, P. R. and R. C., Fernandes-Santos. 2014. Health Assessment of Wild Lowland Tapir (*Tapirus terrestris*) Populations in the Atlantic Forest and Pantanal Biomes, Brazil. *J. Wild. Dis.* 50: 817-828.
- Medici, E. P. and A. L., Desbiez. 2012. Population viability analysis: using a modeling tool to assess the viability of tapir populations in fragmented landscapes. 7: 356-372.
- Menke, S., Meier, M. and S., Sommer. 2015. Shifts in the gut microbiome observed in wildlife faecal samples exposed to natural weather conditions: lessons from time-series analyses using next-generation sequencing for application in field studies. *Methods Ecol Evol.* 6: 1080–1087.

- Miller, R. E. and M. E., Fowler. 2015. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*. Vol. 8. Elsevier-Saunders. USA.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. and T., Ochoa. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública*. 28: 648-656.
- Naranjo, E. and C., Vaughan. 2000. Ampliación del ámbito altitudinal del tapir centroamericano (*Tapirus bairdii*). *Biol. Trop.* 48: 724.
- Naranjo, E. 2009. Ecology and Conservation of Baird's tapir in Mexico. *Trop. Cons. Sci.* 2: 140-158.
- O'Farrill G., Galetti M. and A., Campos-Arceiz. 2013. Frugivory and seed dispersal by tapirs: an insight on their ecological role. *Integ. Zoology*. 8: 4-17.
- Ogawa, K., Yamaguchi, K., Suzuki, M., Tsubota, T., Ohya, K. and H., Fukushi. 2011. Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Japanese macaques (*Macaca Fuscata*) in rural Japan. *J. Wild. Dis.* 47: 261-270.
- Österblad, M., Norrdahl, K., Korpimäki, E. and P., Huovinen. 2001. Antibiotic resistance. How wild are wild mammals? *Nature*. 204: 37-38.
- Papich, M. and J., Riviere. 2009. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell. USA.
- Paterson, D. and R., Bonomo. 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 657-686.

- Poeta, P., H., Radhouani, L., Pinto, A., Martinho, V., Rego, R., Rodrigues, A., Goncalves, J., Rodrigues, V., Estepa, C., Torres and G., Igrejas. 2009. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Jou. Bas. Microbiol.* 49: 584-588.
- Quse, V. and R., Fernandes-Santos. 2014. Tapir Veterinary Manual. 2a ed. Tapir Specialist Group.
- QGIS Development Team, 2014. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correja, S. and G., Igrejas. 2014. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Front. Microb.* 5. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00023.
- Ramsar Sites Information Service, 2002. Ficha Técnica, Turberas de Talamanca. Ramsar Site.
- Rasmussen, C., Allender, M., Phillips, C., Byrd, J., Lloyd, T. and C., Maddox. 2017. Multidrug Resistance Patterns of Enteric Bacteria in Two Populations of Free-ranging Eastern Box Turtles (*Terrapena Carolina Carolina*). *J Zoo Wild Med.* 48: 708-715.
- Rodríguez, E., M., Gamboa, F., Hernández and J. García. 2005. Bacteriología general: principios y prácticas del laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 281-290.
- Rolland, R. M., G., Hausfater, B. Marshall and S. B., Levy. 1985. Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Appl. Environ. Microb.* 49: 791-794.

- Rwego, I. B., G., Isabirye-Basuta, T. R., Gillespie and T. L., Goldberg. 2008. Gastrointestinal bacteria transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conserv. Biol.* 22: 1600-1607.
- Sato, G., C., Oka, M., Asagi and N., Ishiguro. 1978. Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A* 241: 407-417.
- Sayah, R., Kaneene, J., Johnson, Y. and R., Miller. 2005. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Appl. Environ. Microb.* 71: 1394-1404.
- Schank, C., Cove, M., Kelly, M., Mendoza, E., O’Farrill, G., Reyna-Hurtado, R., Meyer, N., Jordan, C., González-Maya, J., Lizcano, D., Moreno, R., Dobbins, M., Montalvo, V., Sáenz-Bolaños, C., Carrillo, E., Estrada, N., Cruz, J., Sáenz, J., Spínola, M., Carver, A., Fort, J., Nielsen, C., Botello, F., Pozo, G., Rivero, M., Antonio de la Torre, J., Brenes-Mora, E., Godínez-Gómez, O., Wood, M., Gilbert, J. and J., Miller. 2017. Using a novel model approach to assess the distribution and conservation status of the endangered Baird’s tapir. *Diversity and Distributions.* 2017: 1-13.
- Scott, D. M., Kennedy, M. and M. M., Chengappa. 2013. *Veterinary Microbiology.* 3a. ed. Wiley-Blackwell. USA.
- Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., Kahlmeter, G. and B., Olsen. 2008. Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 70-72.

- Skurnik, D., R., Raymond, A., Andremont, C., Amorin, P., Rouquet, B., Picard and E., Denamur. 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 1215-1219.
- Steele, C. M., Brown R. N. and R. G., Botzler. 2005. Prevalence of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the pacific coast of California and Washington, USA. *J. Wild. Dis.* 41: 735-744.
- Suárez, C. and Gudiol, F. 2009. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 27:116-129.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. and E., Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 8: 207-217.
- Tobler, M. W. 2002. Habitat use and diet of Baird's tapir (*Tapirus bairdii*) in a montane cloud forest of the Cordillera de Talamanca, Costa Rica. *Biotropica.* 34: 468-474.
- Tobler, M., Naranjo, E. and I., Lira-Torres. 2006. Habitat preference feeding habits and conservation of Baird's tapir in Neotropical Montane oak forests. *Ecol. Stud.* 185: 347-359.
- Vargas, J., S., Máttar and S., Monsalve. 2010. Bacterias patógenas con alta resistencia a antibióticos: estudio sobre reservorios bacterianos en animales cautivos en el zoológico de Barranquilla. *Infectio.* 14: 6-19.

Vivant, A., Boutin, C., Prost-Boucle, S., Papias, S., Hartmann, A., Depret, G., Ziebal, C., Le Roux, S. and A., Pourcher. 2016. Free water surface constructed wetland limit the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in the natural environment. *Wat. Res.* 104: 178-188.

Wainwright, M. 2007. *The Mammals of Costa Rica: A Natural History and Field Guide*. Zona Tropical, Comstock Publishing Associates. Costa Rica.

World Health Organization. 2011. W.H.O Global Strategy for the Containment of Antimicrobial Resistance Executive Summary [en línea]. Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> (Consulta: 10 mar, 2017).

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1.



MINISTERIO DE AMBIENTE Y ENERGÍA  
SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN



LICENCIA DE COLECTA CIENTÍFICA / ACADÉMICA  
*SCIENTIFIC / ACADEMIC LICENSE TO COLLECT*  
(Pasaporte Científico / *Scientific Passport*)

N° SINAC-SE-022-2017



Apellidos / *Last name*: Rojas Jiménez

Nombre / *Name*: Jorge

N° de identificación / *Identification N°*: 113940870

Nacionalidad / *Nationality*: Costarricense

N° de pasaporte / *Passport N°*: SINAC-SE-22-2017

Universidad o centro de investigación / *University or research center*: Universidad de Nacional Heredia  
Costa

Rica

Nombre, dirección de correo electrónico y teléfono de persona a contactar en caso de emergencia /  
*Name, Email address and phone number of the person to be contacted in case of an emergency*: Elías  
Barquero Calvo

Nombre / *Name*: Dirección de correo electrónico / *E-mail*: [elias.barquero.calvo@una.cr](mailto:elias.barquero.calvo@una.cr) g

Teléfono: +1(506) 2562-4540

Título de la Investigación / *Research title*: "Análisis del perfil de sensibilidad a los antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas en heces de *Tapirus bairdii* de vida libre, en zonas altas de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica".

Área(s) de conservación donde se autoriza la colecta / *Authorized conservation areas to collect*:

**Área de Conservación Amistad Pacífico y Área de Conservación Pacífico Central** Período de vigencia de esta licencia de colecta / *Authorized period to collect*: Inicio / *Start*: 10-02-2017

Final: 09-02-2018

Descripción del tipo(s) y cantidad(es) de material autorizado(s) a coleccionar / *Description of the type(s) and amount(s) of authorized material(s) to collect*: 120 muestras de muestras fecales de *Tapirus bairdii*.

N° de resolución (permiso de investigación) / *Research permit N°*: **SINAC-SE-CUS-PI-R-021-2016**

Fecha de entrega del informe de colecta / *Date to deliver the collection report*: 09-05-2018

Nombre del funcionario (a) que autoriza / *Name of the officer who signs this license*: Lourdes Vargas Fallas

## 8.2. Anexo 2.

### **ACUERDO DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (ATM), ENTRE EL SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN (SINAC) Y JORGE ROJAS JIMENEZ**

Este acuerdo contempla la transferencia de material biológico obtenido mediante la investigación científica autorizada a través del permiso de investigación SINAC-SE-CUS-PI-R-021-2017 y la licencia de colecta científica número SINAC-SE-023-2017 a nombre de Jorge Rojas Jiménez , mayor, San Antonio de Desamparados, 25m suroeste de la Iglesia Católica, contiguo a nuevos apartamentos esquineros, casa a mano derecha de dos plantas, de madera color amarillo, emitido por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), y que involucra Áreas de Conservación: Amistad Pacífico y Pacífico Central , con propósitos de investigación científica básica y no comercial; otorgado por el Programa de Investigación, del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) del Ministerio del Ambiente, Energía de Costa Rica (MINAE).

#### CONSIDERANDO

PRIMERO. Que en el marco del artículo 15 de la Convención sobre Diversidad Biológica de las Naciones Unidas (Rio de Janeiro 1992) se reconoce que el País tiene derechos soberanos sobre todos sus recursos biológicos y genéticos y al amparo de la Ley de Conservación de Vida Silvestre (Ley No 7317 publicada en la Gaceta No 235, del 7 de diciembre de 1992) en sus artículos 17, 26 y 27 y en el artículo 82 de su reglamento; la Ley de Biodiversidad (Ley No 7788 publicada en la Gaceta No 101, del 27 de mayo de 1998) en su artículo 78 y su reglamento, se suscribe el presente Acuerdo de Transferencia de Material Biológico.

SEGUNDO. Que en el Manual de Procedimientos para realizar Investigación en Biodiversidad y Recursos Culturales en las Areas de Conservación, creado por el Comité Técnico de Investigación del SINAC (decreto ejecutivo N°32553-MINAE), establece en su artículo 8 inciso 3, que entre las funciones del Encargado de Investigación ésta el *Suscribir Acuerdos de Transferencia de Material (ATM), entre interesados y proveedores de los recursos biológicos, en forma obligatoria cuando se trate de permisos de exportación de material biológico o para uso local cuando el evaluador lo considere necesario según los objetivos del proyecto de investigación o los fines de la recolecta científica. Estos con el fin de atender mejor el registro y control por trasiego de material biológico.*

TERCERO. Que según la directriz SINAC-DE-293 del 21 de febrero del 2012, se establece como de acatamiento obligatorio el lineamiento: “*Que de conformidad con el Acuerdo 08-02-2010 (ratificado mediante el acuerdo 12-01-2011) del Comité Técnico de Investigación del SINAC se recuerda la obligatoriedad de adoptar la elaboración de Acuerdos de Transferencia de Material (ATM) en todos los permisos de investigación (otorgados según la Ley N°7317) que involucren la extracción de muestras (licencia de recolecta científica y cultural para fauna y flora silvestre) a ser enviadas fuera del país, lo anterior en cumplimiento del artículo 8 inciso 3 del Decreto Ejecutivo N° 32553-MINAE.*”

CUARTO. Que mediante la resolución de investigación científica No. SINAC-SE-CUS-PI-R-021-2017, que cuenta con el visto bueno de las Áreas de Conservación involucradas, se autorizó a, Jorge Rojas Jiménez de calidades supracitadas y respaldado por la Universidad Nacional, Heredia Costa Rica, para realizar la investigación titulada: “Análisis del perfil de sensibilidad a los antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas en heces de *Tapirus bairdii* de vida libre, en zonas altas de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica”

POR TANTO, con base en la normativa vigente y que la investigación autorizada requiere la exportación de muestras biológicas para su análisis, se establece el presente Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (ATM), bajo las siguientes cláusulas.

#### CLAUSULAS ACORDADAS

PRIMERA. El SINAC, como el ente administrador del recurso biológico, transfiere el material a Jorge Rojas Jiménez en calidad de investigador principal en adelante denominado EL INVESTIGADOR.

SEGUNDA. El INVESTIGADOR manifiesta que el recurso biológico será utilizado exclusivamente dentro del marco del proyecto de investigación básica titulada: “Análisis del perfil de sensibilidad a los antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas en heces de *Tapirus bairdii* de vida libre, en zonas altas de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica”, según la propuesta aprobada bajo el permiso N°: SINAC-SE-CUS-PI-R-021-2017.

TERCERA. Mediante este ATM, EL SINAC entrega a EL INVESTIGADOR los recursos biológicos recolectados a través del proyecto aprobado: 120 muestras de 30g de heces de *Tapirus Bairdii*

\_\_\_\_\_  
UL\_\_\_\_\_

CUARTA. EL INVESTIGADOR analizará, procesará y almacenará las muestras biológicas (Los especímenes vivos y las muestras de tejido) obtenidas en las Áreas de Conservación: Amistad Pacífico y Pacífico Central, se llevarán a el Institute of Evolutionary Ecology and Conservation, University of Ulm, Albert Einstein Alle, Ulm, Alemania, para análisis de composición fecal (contenido) y presencia de resistencia a antibióticos y analizar perfiles de sensibilidad a los antibióticos en cepas comensales de *Escherichia coli* aisladas en heces de *T. bairdii* de vida libre, en zonas altas de la Cordillera de Talamanca., Determinar los perfiles de sensibilidad antibacteriana en cepas de *Escherichia coli* aisladas en heces de *T. bairdii*, a diversas clases de antibióticos utilizados para el tratamiento de bacterias Gram negativas., Evidenciar la presencia de cepas que expresen fenotipos de resistencia a betalactamasas de espectro extendido (BLEE); la exportación se realizará previa obtención de permiso de exportación respectivo OFAU-SINAC y cualquier otro permiso necesario previsto en la legislación nacional.

QUINTA. Antes de la exportación de los especímenes, se requiere de parte de EL INVESTIGADOR la coordinación previa con el Museo Nacional y la Universidad de Costa Rica (Ley No. 4594 del 22 de julio de 1970) para la entrega de un individuo de cada una de las especies exportadas.

SEXTA. Este Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (ATM), no autoriza a EL INVESTIGADOR a utilizar los recursos biológicos para fines de acceso a la información genética o bioquímica de dichos recursos o para fines no indicados en el presente Acuerdo. Si así fuere se advierte a EL INVESTIGADOR que estará sujeto a las sanciones administrativas y penales descritas en la legislación nacional.

SÉTIMA. El SINAC, solicitará información del proyecto, cuando estén disponibles los resultados parciales o finales de la investigación; quedando a entera discreción de la Institución, incluir esta información en sus bases de datos, informes, presentaciones, incluyendo aquellos medios de uso público en general.

OCTAVA. EL INVESTIGADOR no podrá transferir a terceros interesados ajenos en forma directa al proyecto, las muestras obtenidas del material original, ni duplicados, sin la autorización del EL SINAC. En caso de existir un tercer interesado, éste está igualmente vinculado en los mismos términos establecidos en el presente acuerdo entre EL SINAC y EL INVESTIGADOR.

NOVENA. El recurso biológico no es objeto de protección de derechos de propiedad intelectual e industrial, de conformidad con el Artículo 78 de la Ley de Biodiversidad (Ley No 7788) de Costa Rica.

DÉCIMA. EL INVESTIGADOR dará el crédito respectivo en las publicaciones resultado de las investigaciones realizadas a partir del material biológico o de la información suministrada por el personal de las Áreas de Conservación involucradas.

DÉCIMA PRIMERA. Con base en los objetivos del Convenio de Diversidad Biológica (1994) y la Ley de Biodiversidad (1998), por medio de este ATM, se podrán acordar la distribución de beneficios derivados del uso de la biodiversidad, tales como: capacitación, transferencia de tecnología, información, investigaciones conjuntas, inversión en infraestructura y otros.

DÉCIMA SEGUNDA: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación se reserva el derecho de cancelar este Acuerdo de Transferencia de Material, sin responsabilidad alguna para el Estado, cuando se compruebe que se ha incumplido el mismo.

DÉCIMA TERCERA. EL INVESTIGADOR asume toda la responsabilidad de cumplir con las reglas y requisitos que sobre movimiento de material biológico estén vigentes en su país y en los países en tránsito por dónde deba pasar el material biológico.

DÉCIMA CUARTA. La sola tenencia de material biológico autorizado en la cláusula segunda implica la aceptación de todas las cláusulas del presente ATM.

DÉCIMA QUINTA Las noticias y comunicaciones que mantengan las partes referidas específicamente a este ATM podrán ser llevadas a cabo y registradas en forma escrita, por medio de facsímil, correo certificado y correo electrónico acompañado de confirmación electrónica escrita a las direcciones indicadas en la firma de este acuerdo.

DÉCIMA SEXTA. En caso de incumplimiento o controversias derivadas de este contrato, por alguna de las partes, las mismas se someterán a lo que estipula la normativa legal vigente en Costa Rica.

DÉCIMA SÉTIMA. Este acuerdo se rige por las Leyes de Costa Rica.

Leído lo anterior acordamos nuestro consentimiento en los términos indicados en este Acuerdo de Transferencia de Material Biológico y de conformidad con ello firmamos, en dos tantos igualmente válidos.

**8.3 Anexo 3.** Etiquetado de una muestra de heces de *T. bairdii*.

Fecha de colecta	
Código	H (heces) ###
Hora de colecta	
Sitio de recolecta	
Coordenadas	
Altitud	
Día aproximado de deposición	
Hora aproximada de deposición	
Colector	
Observaciones	

#### 8.4. Anexo 4.



1 de febrero de 2017

San José, Costa Rica

#### **MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TRABAJOS FINALES DE GRADUACIÓN**

*Nai Conservation* es un grupo de profesionales de distintas áreas trabajando en proyectos de investigación y conservación para entender y buscar opciones de mitigación a las amenazas que enfrentan las poblaciones de tapir (*Tapirus bairdii*) en Costa Rica. Este grupo es dirigido por mi persona, Esteban Brenes Mora, biólogo, costarricense, cédula 1 1317 0985, y tiene un proyecto sobre la ecología poblacional de la danta bajo la resolución SINAC-SECUS-R-1292016.

Ante el escenario crítico que se encuentra la biodiversidad mundial, es necesario que se realice investigación que genere información que pueda ser utilizada en la toma de decisiones. Para lograr esto, se debe fomentar y facilitar la colaboración entre distintas instituciones del Estado, grupos de investigación e investigadores particulares. Es por esto que nuestro grupo de investigación *Nai Conservation* pretende facilitar la participación de estudiantes universitarios como voluntarios, pasantes o tesarios.

Dentro de la colaboración acordada con el estudiante Jorge Enrique Rojas Jiménez, cédula 113940870, *Nai Conservation* proporcionará soporte logístico y financiero para que realice su tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria bajo el título: Análisis del perfil de sensibilidad a los antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas en heces de *Tapirus bairdii* de vida libre, en zonas altas de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Este soporte



## 8.5. Anexo 5.

Codigo	Tipo muestra	Sitio	Altitud (msnm)	Descripción del sitio	Resistencia PS: pansusceptible
H001	Heces	PNQ	2989	Chusquea, sendero Las Barajas	Cefalotina
H002	Heces	PNQ	2989	Chusquea, sendero Las Barajas	Cefalotina
H003	Heces	PNQ	2989	Chusquea, sendero Las Barajas	PS
H004	Heces	PNQ	2989	Chusquea, sendero danta, sendero Los Amigos	PS
H005	Heces	PNT	2667	Chusquea	Cefalotina
H006	Heces	IA	2774	Riachuelo	Cefalotina
H007	Heces	IA	2756	Riachuelo	Cefalotina
H008	Heces	PNQ	2989	Chusquea, cámara trampa, sendero Las Barajas	Cefalotina
H009-A	Heces	Zooave	Cautiverio, estanque	PS	Cefalotina, Cefepime, Cefotaxime, Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam
H009-B	Heces	Zooave			
H010	Heces	PNQ	2989	Letrina, chusquea, cámara trampa, sendero Las Barajas	Cefalotina
H011	Heces	PNQ	3016	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina
H012	Heces	PNQ	3016	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina
H013	Heces	PNQ	3016	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina
H014	Heces	PNQ	3016	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina
H015	Heces	PNQ	2979	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina
H016	Heces	PNQ	2979	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina
H017	Heces	PNQ	2979	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina
H018	Heces	PNQ	2977	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	Cefalotina

H019	Heces	PNQ	2977	Sendero Ojo de Agua, Sendero danta	PS
H020	Hisopado rectal	Simón Bolívar		Cautiverio	Cefalotina
H021	Heces	IA	2630	Sendero Catarata	Cefalotina
H022	Heces	IA	2750	Chusquea	Cefalotina
H023	Heces	IA	2733	Chusquea	PS
H024	Heces	IA	2715	Sendero abierto, no chusquea	PS
H025	Heces	PNT	3121	Letrina, turbera, antenas	Cefalotina
H026	Heces	PNT	3121	Letrina, turbera, antenas	PS
H027	Heces	PNT	3130	Letrina, turbera, antenas	PS
H028	Heces	PNT	3130	Letrina, turbera, antenas	PS
H029	Heces	PNT	3147	Camino, antenas	PS
H030	Heces	PNT	3152	Camino, antenas	Cefalotina
H031	Heces	PNT	3133	Cima, letrina, área abierta	Cefalotina
H032	Heces	PNT	3133	Cima, letrina, área abierta	Ác. Nalidíxico
H033	Heces	PNT	3138	Camino, letrina	Cefalotina
H034	Heces	PNT	3138	Camino, letrina	PS
H035	Heces	PNT	3151	Letrina, camino, páramo	PS
H036	Heces	PNT	3151	Letrina, camino, páramo	PS
H037	Heces	PNT	3165	Letrina, páramo	Cefalotina
H038	Heces	PNT	3154	Letrina, páramo	PS
H039	Heces	PNT	3154	Letrina, páramo	PS
H040	Heces	PNT	3154	Letrina, páramo	PS
H041	Heces	PNT	3170	Letrina, páramo	PS

H042	Heces	PNT	3170	Letrina, páramo	Cefalotina
H043	Heces	PNT	3170	Letrina, páramo	PS
H044	Heces	PNT	3170	Letrina, páramo	PS
H045	Heces	PNQ	2995	Letrina, chusquea, cámara trampa, sendero Las Barajas	Cefalotina
H046	Heces	PNT	2943	Chusquea	Cefalotina
H047	Heces	PNT	2945	Letrina, chusquea, sendero	Cefalotina
H048	Heces	PNT	2945	Letrina, chusquea, sendero	Cefalotina
H049	Heces	PNT	2945	Letrina, chusquea, sendero	Cefalotina
H050	Heces	PNT	2952	Sendero	Cefalotina
H051	Heces	PNT	2940	Letrina, chusquea	Cefalotina
H052	Heces	PNT	2943	Letrina, sendero	Cefalotina
H053	Heces	PNT	2943	Letrina, sendero	PS
H054	Heces	PNT	2943	Letrina, sendero	Cefalotina
H055	Heces	PNT	3178	Letrina, chusquea	Cefalotina
H056	Heces	PNT	3178	Letrina, chusquea	Cefalotina
H057	Heces	RBCV	3135	Sustrato seco, en letrina, páramo	Cefalotina
H058	Heces	RBCV	3134	Sustrato húmedo, en letrina, páramo	PS
H059	Heces	RBCV	3133	Parque bosque	Cefalotina
H060	Heces	PNT	2564	Tronco	PS
H061	Heces	PNT	3166	Sustrato seco. En letrina. Bosque primario	Cefalotina
H062	Heces	PNT	3129	Sustrato seco. En letrina. Bosque primario	PS
H063	Heces	PNT	3111	Sobre una quebrada. En letrina. Bosque primario	Cefalotina
H064	Heces	PNT	3148	Sustrato seco. En letrina. Bosque primario	Cefalotina

H065	Heces	PNT	3148	Sustrato seco. En letrina. Bosque primario	Cefalotina
------	-------	-----	------	--	------------