

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Tarso Costa de Mattos

Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de enterococos isolados de amostras nasais de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) selvagens

Porto Alegre

2019

Tarso Costa de Mattos

Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de enterococos isolados de amostras nasais de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) selvagens

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Manuscrito formatado segundo as regras editoriais da revista *Frontiers in Microbiology*.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

**Porto Alegre
2019**

Tarso Costa de Mattos

**Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de enterococos
isolados de amostras nasais de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) selvagens**

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Prof^a. Dra. Mercedes Passos Geimba

Ma. Tiela Trapp Grassotti

**Porto Alegre
2019**

Agradecimentos

À Prof. Ana Paula Guedes Frazzon, pela amizade e parceria desde os tempos de monitoria, pelo seu acolhimento no laboratório, pela paciência e disponibilidade na orientação e tudo que me ensinou durante o trabalho de conclusão.

À minha coorientadora Letícia da Fontoura Xavier Costa e a integrante da banca Tielia Trapp Grassotti, pela ajuda e esclarecimento de todas as dúvidas que tive durante o semestre, tanto no laboratório quanto na parte escrita do trabalho de conclusão.

À Prof. Mercedes Passos Geimba, por aceitar o convite para banca examinadora, bem como por sua presença agradável e divertida durante a monitoria, pela amizade e acolhimento no departamento.

Aos meus pais, Rogério e Leila Mattos, por serem os pilares que sustentaram todo meu processo de vida, por sua paciência, compreensão e amor imensuráveis, e por serem as pessoas que mais admiro nesta existência, sem vocês nada disso seria possível.

À minha irmã Letícia Mattos e ao meu cunhado Ronaldo Laux, por serem pessoas com as quais sempre posso contar, pela afeição e pela presença na minha vida, amo vocês.

Aos meus amigos e colegas de curso Amanda, Ana Paula, Andressa, Filipe, Marcos e Monique, por sua parceria e amizade, e todos os momentos felizes que compartilhamos, bem como toda ajuda que disponibilizaram, que nossa amizade dure para toda a vida.

Aos meus amigos de infância Erick, Luiz Gustavo e Saulo, por me acompanharem por todo este processo e pelo apoio que me deram, e pela compreensão durante o curso, vocês são insubstituíveis.

Às técnicas do laboratório 224, Ana Carolina, Giovana e Taiane, por seu carinho, paciência, receptividade e convivência sincera e agradabilíssima durante o período de monitoria e trabalho de conclusão, que nossa amizade perdure.

À todos integrantes do laboratório 222C, que me acolheram e me ajudaram durante todo o processo prático do trabalho de conclusão.

Muito Obrigado!

“We gaze continually at the world and it grows dull in our perceptions. Yet seen from another’s vantage point, as if new, it may still take our breath away. [...] for you are life, rarer than a quark and unpredictable beyond the dreams of Heisenberg.”

Alan Moore, na *Graphic novel* “Watchmen”, 1986.

Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de enterococos isolados de amostras nasais de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) selvagens

Tarso Costa de Mattos¹, Letícia da Fontoura Xavier Costa¹, Aline Alves Scarpellini Campos², Paulo Guilherme Carniel Wagner³, Ana Paula Guedes Frazzon¹,

¹Laboratório 222C, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

² Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS), Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 5400, 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, IBAMA, Brasil

Correspondência:

Tarso Costa de Mattos
tarsomattos@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Enterococcus*, *Sapajus nigritus*, macacos-prego, resistência, multirresistência, antibióticos.

Resumo

Enterococos estão presentes no solo, água e plantas, assim como fazem parte da microbiota de diversos animais, tais como primatas. Estes possuem um parentesco próximo com seres humanos, além de corriqueiramente dividirem habitat com os mesmos. Estudos de perfis de resistência de bactérias comensais como enterococos, principalmente de amostras nasais, são raríssimos. Neste estudo foram avaliados enterococos isolados de 14 amostras de suabes nasais de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) selvagens quanto ao seu perfil de resistência. Estas amostras foram coletadas nos municípios de Maracajá e Passo de Torres, em Santa Catarina. Os isolados foram identificados por Maldi-Tof e testados para a sensibilidade frente a 11 antimicrobianos diferentes pelo método de disco-difusão. Foram obtidos 26 enterococos de oito amostras de suabes nasais de macacos, três provenientes de macacos de Maracajá e cinco de Passo de Torres. As espécies identificadas foram *E. faecalis* (50%) e *E. casseliflavus* (50%). Dos 26 isolados, 25 apresentaram susceptibilidade reduzida a pelo menos um fármaco testado, sendo que as bactérias apresentaram maiores frequências de susceptibilidade reduzida a eritromicina (84,6%) e a rifampicina (61%). Em amostras provenientes de macacos de Maracajá foi possível identificar isolados de *E. faecalis* (n=3) e *E. casseliflavus* (n=2) com perfil de resistência a múltiplos fármacos (RMF). Como conclusão, foi possível isolar enterococos de amostras e observar isolados com perfil de susceptibilidade reduzida. As presenças de isolados com susceptibilidade reduzida podem ser atribuídas ao resistoma ambiental, bem como a interação dos macacos com seres humanos e a permanência de antibióticos no ambiente.

1 Introdução

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, compreendendo aproximadamente 103.870 espécies animais diferentes e a maior diversidade de primatas, em torno de 140 táxons, incluindo o bugio, o macaco-prego, o sagui e o mico (Sociedade Brasileira de Primatologia, 2018). *Sapajus nigritus* (macaco-prego ou macaco-prego preto) fazem parte da família Cebidae,

47 caracterizada como macacos-prego robustos com adornos ou tufos na cabeça (Rylands *et al.*, 2011).
48 Os macacos-prego são animais de tamanho médio, pesam de 2,5 kg até 5 kg, e apresentam
49 dimorfismo sexual. Segundo Rodrigues (2013), é o gênero reconhecido como um dos maiores
50 onívoros entre os primatas neotropicais, possuindo uma dieta altamente adaptativa, o que acaba os
51 levando para o contato direto com uma gama diversa de micro-organismos. É uma espécie endêmica
52 do Brasil, possuindo ampla distribuição no território entre o Estado de Minas Gerais até o Rio
53 Grande do Sul (Martins *et al.*, 2012). Por apresentar tolerância à mudança de habitat, e ter a
54 capacidade de permanecer em meio urbano, a espécie conseqüentemente entra em contato com
55 humanos (Martins *et al.*, 2012).

56 Estudos tem mostrado que a proximidade de animais selvagens com a atividade humana
57 aumenta o número de bactérias resistentes nos animais selvagens. Allen *et al.*, 2010, observou que
58 amostras provenientes de animais selvagens que viviam perto de resíduos ou água agrícola
59 abrigavam mais bactérias resistentes aos antibióticos do que as amostras de animais que viviam em
60 ambiente menos impactado. A contaminação do ambiente desempenha um papel importante na
61 seleção e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos (Singer *et al.* 2016). Fluidos
62 biológicos, como urina e fezes, contaminados com antimicrobianos ou bactérias resistentes são
63 importantes fontes para a disseminação da resistência no ambiente (Baquero *et al.* 2008; Gothwal
64 e Shashidhar, 2014). Resíduos líquidos ou esgotos também são fontes de introdução de bactérias
65 resistentes no meio ambiente. Além disso, bactérias resistentes já foram isoladas em animais
66 silvestres recuperados de diferentes nichos (Santos *et al.* 2013; Smith *et al.* 2014, Santestevan *et al.*
67 2015, Bondarczuk *et al.* 2016, Prichula *et al.* 2016, Furness *et al.* 2017, Bengtsson-Palme *et al.*
68 2018). Recentemente foram encontradas cepas de enterococos resistentes em isolados de suabes
69 retais de macacos-prego (*S. nigritus*) do sul do Brasil (Grassotti *et al.* 2018).

70 O gênero *Enterococcus* é composto por bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas,
71 comensais dos tratos gastrointestinais, oral e nasal de humanos e animais, além de serem
72 amplamente distribuídos no solo, água, plantas e alimentos. Sua onipresença reflete sua capacidade
73 de tolerar faixas de pH e temperaturas, bem como variações de salinidade (Lebreton *et al.* 2014).
74 Muitas espécies deste gênero são intrinsecamente resistentes a muitos agentes antimicrobianos
75 comumente usados contra cocos Gram-positivos, tais como cefalosporinas, ácido nalidíxico e
76 baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina (lincosamidas) (Lebreton *et al.* 2014).

77 Os enterococos tem se tornado um dos patógenos hospitalares mais importantes das últimas
78 décadas (Gilmore *et al.* 2013). A sua relevância clínica baseada não somente na sua crescente
79 prevalência nos últimos anos, mas também no elevado índice de cepas resistentes aos antibióticos
80 tais como vancomicina e rifampicina. Enterococos resistentes a antibióticos já foram isolados de
81 fontes diferentes, incluindo animais selvagens (Riboldi *et al.* 2009, Cassenego *et al.* 2011, Poeta *et al.*
82 2005, Barros *et al.* 2011, Jackson *et al.* 2009; Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016).
83 Dados epidemiológicos sugerem que os enterococos são importantes reservatórios de genes de
84 resistência aos antimicrobianos, que podem ser transmitidos de outras espécies bacterianas,
85 incluindo patógenos (Eaton e Gasson, 2001).

86 O gênero compreende mais de 50 espécies, sendo as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E.*
87 *hirae*, *E. cecorum* e *E. durans*, frequentemente encontradas nos tratos gastrointestinais dos animais
88 (Poeta *et al.* 2005, Lebreton *et al.* 2014, Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016). A distribuição
89 das espécies, bem como as diferenças nas proporções em cada nicho, pode variar de acordo com as
90 características individuais de cada animal (idade, sexo), habitat (variações sazonais, dieta) e
91 localização geográfica (Lebreton *et al.* 2014). Até o momento, existem poucos estudos avaliando a
92 presença de enterococos em amostras nasais. Jackson *et al.* (2009) demonstrou a presença de *E.*

93 *faecalis* e *E. faecium* em amostras nasais de cães e gatos domésticos. Se tratando de animais
94 selvagens, não existem estudos avaliando enterococos nestes animais, provavelmente devido aos
95 hábitos migratórios de algumas espécies e à dificuldade em obter amostras. Desta forma, o objetivo
96 deste trabalho foi isolar e avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos
97 isolados de amostras de suabes nasais de macacos-prego selvagens (*S. nigritus*) coletados em Santa
98 Catarina, Brasil, e correlacionar os resultados com a sobreposição de habitat desses animais com
99 humanos.

100 2 Materiais e métodos

101 2.1 Coleta das amostras

102 Catorze amostras de suabes nasais foram coletadas em maio de 2018 de macacos-prego
103 selvagens. Os animais foram capturados no Parque Ecológico Maracajá, município de Maracajá
104 (latitude 28°50'48" sul, longitude 49°27'10" oeste) e no Morro dos Macacos, município de Passo de
105 Torres (latitude 29°20'06" sul, longitude 49°43'22" oeste), ambos em Santa Catarina, Brasil (Tabela
106 1). Para captura dos animais nessas localidades, foram utilizadas armadilhas do tipo Tomahawk,
107 e, após a captura, os macacos foram anestesiados com doses intramusculares de Xilazina (20
108 mg/mL) e Cetamina (100 mg/mL), pelos médicos veterinários do IBAMA. Todas as amostras
109 nasais foram coletadas e mantidas em meio Stuart (Kasvi, Paraná, Brasil) e transportados para o
110 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da
111 Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

112 Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Instituto Brasileiro de Meio
113 Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e do Instituto Chico Mendes de conservação
114 da biodiversidade (ICMBio). O protocolo foi aprovado pelo sistema de autorização de informação
115 em biodiversidade (SISBIO) número 56640.

116 2.2 Isolamento e identificação de espécies de enterococos

117 Os suabes foram transferidos para tubos contendo água peptonada tamponada (Himedia,
118 Mumbai, Índia), e incubados por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, 1 mL foi
119 transferido para 9 mL de caldo azida dextrose e incubadas por mais 24 horas a 35°C. De cada
120 diluição, inoculou-se 100 µl em placas de ágar com infusão de cérebro e coração (Himedia,
121 Mumbai, Índia) suplementadas com NaCl a 6,5% (Santestevan *et al.* 2015, Prichula *et al.* 2016).
122 Colônias bacterianas que apresentaram a morfologia colonial característica do gênero
123 *Enterococcus*, com colônias puntiformes, circulares, cremosas foram selecionadas de cada amostra.
124 Isolados selecionados foram inoculados em placas de ágar bile esculina (Acumedia), e incubados
125 durante 24 horas em temperatura de 35°C. Critérios fenotípicos, como tamanho / volume, forma,
126 cor, coloração de Gram, produção de catalase e hidrólise da esculina foram empregados para a
127 identificação presuntiva do gênero. Os isolados que resultaram em catalase negativo e cocos Gram
128 positivos foram semeados para placas de ágar BHI (Signa-Aldrich) e incubados durante 48 horas
129 na temperatura de 35°C. As colônias selecionadas foram armazenadas de acordo com Cody *et al.*
130 (2008), onde foram mantidas em criotubos com 1 mL de solução 10% de glicerol e 10% de leite
131 desnatado, a -20°C. Para a identificação das espécies, os preservados foram repassados para ágar
132 BHI (Signa-Aldrich) por método de esgotamento e incubados por cerca de 24 horas a 35°C. Em
133 seguida, estes isolados foram submetidos ao equipamento do MALDI-TOF.

134 2.3 Avaliação de susceptibilidade aos antibióticos

135 Todas os isolados identificados como enterococos foram submetidos ao teste de
136 antibiograma por disco-difusão. Para tanto, colônias isoladas foram transferidas para tubos com

137 solução salina com concentração de 0,85%. Com auxílio de um suabe, as suspensões bacterianas
138 com turbidez 0,5 escala Mac Farland (equivalente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram espalhadas em meio
139 ágar Mueller Hinton (Himedia), com altura de 0,5 cm para melhor difusão dos antibióticos. Sobre
140 a suspensão foram distribuídos discos contendo antibióticos e as placas foram mantidas em estufa
141 durante 24 horas a 35°C. Os antibióticos utilizados foram: ampicilina (AMP 10 µg), ciprofloxacina
142 (CIP 5 µg), cloranfenicol (CLO 30 µg), eritromicina (ERI 15 µg), estreptomicina (EST 300 µg),
143 gentamicina (GEN 120 µg), nitrofurantoina (NIT 300 µg), norfloxacina (NOR 10 µg), rifampicina
144 (RIF 5 µg), tetraciclina (TET 30 µg) e vancomicina (VAN 30 µg), conforme recomendado pelo
145 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Após um período de incubação, os halos
146 de inibição de crescimento bacteriano observados tiveram seus diâmetros medidos em milímetros,
147 e foram comparados com os valores disponíveis na tabela padrão para interpretação de halos de
148 inibição (CLSI, 2018). Os isolados resistentes a três ou mais antibióticos não relacionados foram
149 consideradas resistentes a múltiplos fármacos (RMF). Isolados intermediárias e resistentes foram
150 consideradas em uma única categoria e classificadas como resistentes aos antibióticos.

151 3 Resultados

152 3.1 Frequência de espécies de enterococos nas amostras

153 Foram obtidos 26 isolados do gênero *Enterococcus* de oito dos catorze (57,1%) suabes
154 nasais de macacos-prego selvagens. Destas 26 cepas, treze (50%) foram identificadas como *E.*
155 *faecalis* e treze (50%) como *E. casseliflavus* (tabela 2). As amostras provenientes de macacos de
156 Maracajá apresentaram mais *E. faecalis* (66,7%) do que as de Passo de Torres (35,7%), sendo o
157 oposto para *E. casseliflavus*, onde 33,3% das cepas eram provenientes das amostras de suabes
158 nasais de animais capturados em Maracajá e 64,3% de animais de Passo de Torres.

159 3.2 Perfil de susceptibilidade das cepas

160 Os resultados do perfil de suscetibilidade das espécies de *Enterococcus* isoladas estão
161 apresentados na tabela 3. Do total de isolados, vinte e cinco (96,1%) apresentaram perfil de
162 susceptibilidade reduzida a pelo menos um antimicrobiano. Uma elevada frequência de isolados
163 apresentou susceptibilidade reduzida a eritromicina (84,6%), seguida por rifampicina (61,5%),
164 norfloxacina (26,9%) e ciprofloxacina (26,9%). Somente um enterococos (número 31.2) isolado de
165 uma amostra de Maracajá foi suscetível a todos os antimicrobianos testados. Em relação ao local
166 de coleta das amostras, os isolados de *E. faecalis* provenientes de suabes nasais dos macacos de
167 Maracajá apresentaram maiores frequências de susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina (25%) e
168 eritromicina (87,5%) do que os isolados de *E. casseliflavus*, que apresentaram maior frequências
169 em relação à norfloxacina (50%) e rifampicina (100%). Todos os *E. faecalis* isolados dos macacos
170 de Passo de Torres apresentaram susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina e eritromicina, com
171 80% desses também sendo com susceptibilidade reduzida a norfloxacina, enquanto os isolados de
172 *E. casseliflavus* apresentaram esse perfil também para eritromicina (77,7%) e à rifampicina
173 (88,8%).

174 Analisando os dados apresentados na tabela 3, percebemos o perfil de RMF em algumas
175 bactérias, as quais foram analisadas conforme Magiorakos *et al.* (2012). Três *E. faecalis* e dois *E.*
176 *casseliflavus* apresentaram RMF, sendo todos estes provenientes das amostras 29 e 32, ambas de
177 macacos de Maracajá. As classes de antimicrobianos as quais as bactérias apresentaram RMF foram
178 as fluoroquinolonas/macrolídeos/rifampicinas.

180 Até o momento, não existem trabalhos que investigaram a distribuição de enterococos em
181 amostras de suabes nasais de macacos-prego (*S. nigritus*), o único estudo que existe avaliando a
182 distribuição do gênero em amostras nasais em animais foi realizado com cães e gatos domésticos
183 (Jackson *et al.*, 2008). Estudos com seres humanos demonstram a presença de enterococos com
184 perfis de resistência nas vias aéreas (Yameen *et al.* 2013). Diferente do que foi observado por
185 Grassotti *et al.* (2018), onde foi detectada uma elevada frequência de diferentes espécies de
186 enterococos (*E. faecalis*, *E. hirae*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. avium*,
187 *E. gallinarum*) em amostras de fezes/suabes retais de macacos-pregos selvagens, nas amostras
188 nasais de macacos-pregos selvagens foram observadas somente a presença das espécies *E. faecalis*
189 e *E. casseliflavus*. Jackson *et al.* (2008), avaliando amostras de suabes orais, retais, nasais de cães
190 e gatos, também verificou pouca variabilidade nas espécies de enterococos isolados de amostras de
191 suabes nasais de cães e gatos, quando comparados com amostras do trato gastrointestinal, visto que
192 identificaram apenas as espécies *E. faecalis* e *E. hirae* nas amostras de cães e *E. faecium* e *E. hirae*
193 nas amostras de gatos.

194 A presença do gênero nas vias nasais dos macacos pode estar associada ao hábito que os
195 macacos têm de inserir seus dedos nas narinas e na boca dos outros macacos por períodos de tempo
196 prolongados, conhecido do inglês de *handsniffing* (Perry, 2011). Este comportamento poderia ser a
197 explicação de *E. faecalis* e *E. casseliflavus* estarem colonizando as vias nasais, já que estas espécies
198 são frequentemente isoladas de folhas, frutas e solo (Abriouel, 2008), superfícies onde as mãos do
199 macaco estão diretamente em contato, pois coletam alimento do solo.

200 Das catorze amostras de suabes nasais testadas, em cinco (35,7%) não foi possível isolar
201 enterococos. Este resultado pode ser explicado devido ao fato de que presença de enterococos nas
202 vias aéreas e orais é muito menos abundante do que no trato gastrointestinal (Gilmore *et al.* 2013).
203 Estes resultados também corroboram com Jackson *et al.* (2008), onde das 276 amostras de suabes
204 nasais de cães e gatos avaliadas obtiveram uma baixa frequência de amostras positivas para
205 enterococos.

206 A maioria dos isolados demonstrou resistência a pelo menos um antibiótico, sendo a maioria
207 com susceptibilidade reduzida à eritromicina. *E. faecalis* e *E. casseliflavus* com susceptibilidade
208 reduzida a eritromicina já foram encontrados em cepas isoladas de porcos europeus (Jackson *et al.*
209 2004), bem como em suabes nasais de cães e gatos domésticos (Jackson *et al.* 2008). Por exemplo,
210 na espécie *Sparus aurata*, peixe de alto valor comercial, foram encontradas cepas de enterococos
211 altamente resistentes a eritromicina, chegando a 58,7% de resistência (Barros *et al.* 2011). Os
212 isolados identificados no presente estudo também apresentaram susceptibilidade reduzida a
213 fluoroquiolonas e principalmente a rifampicina, assim como demonstrado por Enne *et al.* (2004),
214 onde foram encontradas cepas de mutantes espontâneas resistentes a rifampicina em porcos. A
215 resistência a rifampicina já foi constatada também em animais marinhos, como aves, mamíferos e
216 tartarugas (Prichula *et al.*, 2016). Em Grassotti *et al.* (2018), altos níveis de isolados com
217 susceptibilidade reduzida a eritromicina e rifampicina também foram encontrados em fezes e suabes
218 retais de macacos-prego selvagens, e Costa (2018) encontrou o mesmo padrão ao estudar guano de
219 morcegos selvagens. Susceptibilidade reduzida a eritromicina e rifampicina pode estar ligada tanto
220 a mutação espontânea e resistência intrínseca (Mundy *et al.* 2000), quanto a pressão seletiva devido
221 a exposição desses antimicrobianos ao ambiente. Os locais onde ocorreram as coletas (Morro do
222 Macacos e Parque Ecológico Maracajá, Santa Catarina) são bastante visitados por turistas, e o efeito
223 destes humanos neste ambiente pode ser fonte de micro-organismos resistentes, que podem entrar

224 em contato com os macacos. Nenhum isolado com susceptibilidade reduzida a ampicilina,
225 cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, nitrofurantoina e tetraciclina foi encontrado.

226 Cinco isolados, três *E. faecalis* e duas *E. casseliflavus*, apresentaram RMF, todas de uma
227 amostra de Maracajá. Por estes isolados serem provenientes de um parque ecológico, é possível que
228 o transito de turistas esteja impactando as microbiotas locais. Essa mesma multiresistência foi
229 constatada em Grassotti et al. (2018) e Jackson et al. (2008), onde a espécie *E. faecalis* foi a qual
230 apresentou o maior nível de RMF. A multiresistência apresentada pelos isolados também pode ser
231 explicada pela a troca de material genético por plasmídeos e troca cromossômica, assim como a
232 resistência intrínseca apresentada pelo gênero enterococos (Mundy et al. 2000).

233 Como a espécie *Sapajus nigritus* é muito comum no sul do país (Martins et al., 2012), com
234 grande frequência divide habitat com seres humanos. Os pontos de coleta deste trabalho apresentam
235 municípios com áreas urbanas cercadas por fragmentos e trilhas florestais, o que leva ao contato
236 com estes macacos e algumas vezes ao conflito com os mesmos (Rocha, 2013). Uma vez que estes
237 animais não apresentam histórico de uso de antibióticos, a presença de cepas resistentes pode ter
238 duas origens: a contaminação do ambiente, antibióticos podem ficar por anos presentes no solo após
239 contaminação (Kemper, 2008); e a outra o resistoma ambiental, visto que o próprio ambiente pode
240 funcionar com reservatório para genes de resistência (Dantas, 2008). Sendo animais selvagens e
241 reservatórios de diversas bactérias possivelmente patogênicas (Zaniolo et al. 2018), o convívio com
242 estes macacos pode gerar disseminação destas cepas resistentes para humanos. Tan et al. (2018)
243 corrobora essa hipótese de disseminação, onde amostras de suabes nasais de fazendeiros
244 apresentaram cepas de *E. faecalis* similares as isoladas de porcos com os quais eles manipulavam.
245 Por este motivo é necessário ter conhecimento atualizado sobre a microbiota destes animais e seus
246 respectivos padrões de resistência, uma vez que nas localidades estudadas turistas tem contato
247 direto com estes macacos.

248 5 Referências

249 Abriouel, H., Omar, N. B., Molinos, A. C., López, R. L., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P.,
250 Ortega, E., Cañamero, M. M., Galvez, A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity and
251 incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw
252 fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food*
253 *Microbiology*, 123(1-2), 38–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067

254 Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010).
255 Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews*
256 *Microbiology*, 8(4), 251–259. doi:10.1038/nrmicro2312

257 Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance.
258 *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266–278. doi:10.1038/nrmicro2761

259 Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water
260 environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265.
261 doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006

262 Barros, J., Igrejas, G., Andrade, M., Radhouani, H., López, M., Torres, C., & Poeta, P. (2011).
263 Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistant enterococci. A potential bioindicator
264 of marine contamination? *Marine Pollution Bulletin*, 62(6), 1245–1248.
265 doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.021

- 266 Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2017). Environmental factors
267 influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*,
268 42(1). doi:10.1093/femsre/fux053
- 269 Bondarczuk, K., Markowicz, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). The urgent need for risk
270 assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environment*
271 *International*, 87, 49–55. doi:10.1016/j.envint.2015.11.011
- 272 Cody W.L., Wilson J.W., Hendrixon D.R., McIver K.S., Hagman K.E., Ott C.M., Nickerson
273 C.A., Schurr M.J. 2008 . Skim milk enhances the preservation of thawed - 80°C bacterial
274 stocks. *J. Microbiology Methods* . 75(1): 135 – 138.
- 275 Cassanego, A. P. V., Ellwanger, J., d’Azevedo, P. A., Ribeiro, A. M. L., Frazzon, J., Frazzon, A.
276 P. G. (2013). Virulence and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates from cloacal swabs
277 of broilers infected with *Eimeria* spp. *Pesquisa veterinária brasileira*, 33-12.
278 doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200007
- 279 Costa, L. F. X. (2018). Caracterização de *Enterococcus* sp. provenientes de amostras de fezes de
280 morcegos *Tadarida brasiliensis*. (Dissertação de mestrado). (Porto Alegre, Brasil): Universidade
281 Federal do Rio Grande do Sul
- 282 Courvalin, P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*,
283 42(1), 25-34.
- 284 Dantas, G., Sommer, M. O., Oluwasegun, R. D., Church, G. M. (2008). Bacteria Subsisting on
285 Antibiotics. *Science*, 100-3. doi: 10.1126/science.1155157
- 286 Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants
287 and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and*
288 *Environmental Microbiology*, 67(4), 1628–1635. doi:10.1128/aem.67.4.1628-1635.2001
- 289 Enne, V. I. (2004). Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of*
290 *Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 203–207. doi:10.1093/jac/dkh044
- 291 Furness, L. E., Campbell, A., Zhang, L., Gaze, W. H., & McDonald, R. A. (2017). Wild small
292 mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance.
293 *Environmental Research*, 154, 28–34. doi:10.1016/j.envres.2016.12.014
- 294 Gilmore, M. S., Lebreton, F., & van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut
295 commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current*
296 *Opinion in Microbiology*, 16(1), 10–16. doi:10.1016/j.mib.2013.01.006
- 297 Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2014). Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *CLEAN*
298 - Soil, Air, Water, 43(4), 479–489. doi:10.1002/clen.201300989
- 299 Grassotti, T. T., (2018) *Enterococcus* sp. isolados de fezes de macacos-prego (*Sapajus nigritus*)
300 (Goldfuss, 1809) coletadas em remanescentes de mata-atlântica e cativheiro, no estado do Rio
301 Grande do Sul. (Dissertação de mestrado). (Porto Alegre, Brasil): Universidade Federal do Rio
302 Grande do Sul
- 303 Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.
304 J., Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance.
305 *The Lancet*, 387(10014), 176–187. doi:10.1016/s0140-6736(15)00473-0

- 306 Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Barrett, J. B., & Ladely, S. R. (2004). Effects of Tylosin Use
307 on Erythromycin Resistance in Enterococci Isolated from Swine. *Applied and Environmental*
308 *Microbiology*, 70(7), 4205–4210. doi:10.1128/aem.70.7.4205-4210.2004
- 309 Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Davis, J. A., Barrett, J. B., & Frye, J. G. (2009). Prevalence,
310 species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the
311 United States. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1269–1278. doi:10.1111/j.1365-
312 2672.2009.04310.x
- 313 Jensen, L.B., Atrens, P., Dons, L., Jones, R.N., (1998). Molecular analysis of Tn1546 in
314 *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. *Journal of Clinical Microbiology* 36,
315 437–442.
- 316 Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological*
317 *Indicators*, 8(1), 1–13. doi:10.1016/j.ecolind.2007.06.002
- 318 Lebreton, F., Willems, R. J. L., Gilmore, M. S., (2014). *Enterococcus* diversity, origins in nature,
319 and gut colonization. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*.
320 Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary
- 321 Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth,
322 S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Lijequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J.,
323 Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant,
324 extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for
325 interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3),
326 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- 327 Mallon, D. J. P., Corkill, J. E., Hazel, S. M., Wilson, J. S., French, N. P., Bennett, M., & Hart, C.
328 A. (2002). Excretion of Vancomycin-Resistant Enterococci by Wild Mammals. *Emerging*
329 *Infectious Diseases*, 8(6), 636–638. doi:10.3201/eid0806.010247
- 330 Martins, W. P., Miranda, J. M. D., Alfaro, J. W. L., Alonso, A. C., Ludwig, G., Martins, J. N.
331 (2012). Avaliação do Risco de Extinção de *Sapajus nigritus nigritus* (Goldfuss, 1809) no Brasil.
332 Ministério do Meio Ambiente. Presente no seguinte URL:
333 [http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7277-mamiferos-sapajus-](http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7277-mamiferos-sapajus-nigritus-nigritus-macaco-prego)
334 [nigritus-nigritus-macaco-prego](http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7277-mamiferos-sapajus-nigritus-nigritus-macaco-prego) (Acessado em 20 de junho, 2019)
- 335 Mundy, L. M., Sahm, D. F., & Gilmore, M. (2000). Relationships between Enterococcal Virulence
336 and Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 513–522.
- 337 Murray, B. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 46-
338 65
- 339 Perry, S. (2011). Social traditions and social learning in capuchin monkeys (*Cebus*). *Philosophical*
340 *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1567), 988–996.
341 doi:10.1098/rstb.2010.0317
- 342 Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., & Torres, C. (2006). Antimicrobial resistance and the
343 mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal.
344 *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(2), 131–137.
345 doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.018
- 346 Poeta, P., Costa, D., Saenz, Y., Klibi, N., Ruiz-Larrea, F., Rodrigues, J., & Torres, C. (2005).
347 Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of

- 348 Wild Animals in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(9), 396–402.
349 doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00881.x
- 350 Prichula, J., Pereira, R. I., Wachholz, G. R., Cardoso, L. A., Tolfo, N. C. C., Santestevan, N. A.,
351 Medeiros, A. W., Tavares, M., Frazzon, J., d’Azevedo, P. A., Frazzon, A. P. G. (2016). Resistance
352 to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in
353 the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 51–57.
354 doi:10.1016/j.marpolbul.2016.02.071
- 355 Primatas. Sociedade Brasileira de Primatologia, 2019. Disponível em:
356 <<https://www.sbprimatologia.org.br/os-primatas/>>. Acesso em: 20 de jun. de 2019.
- 357 Rodrigues, K. C. (2013) Padrão de atividades, comportamento alimentar, exploração de habitat e
358 área de vida de um grupo de *Sapajus Flavius* (Schreber, 1774) (Primates, Cebidae) em um
359 fragmento de floresta atlântica, Paraíba, Brasil. (Dissertação de mestrado). (Rio Tinto, Brasil):
360 Universidade Federal da Paraíba
- 361 Rocha, L. C. (2013) Percepções e atitudes de moradores rurais em relação ao macaco-prego,
362 *Sapajus nigritus* (Goldfuss, 1809), na área de influência de uma usina hidrelétrica no Rio Grande
363 do Sul. (Dissertação de mestrado). (Santa Maria, Brasil): Universidade Federal de Santa Maria
- 364 Riboldi, G. P., Frazzon, J., Azevdo, P. A., Frazzon, A. P. G. (2009): Antimicrobial resistance profile
365 of *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40,
366 125–128
- 367 Rouff, K. L., De La Maza, L., Murtagh, M. J., Spargo, J. D., Ferraro, M. J. (1990). Species Identities
368 of *Enterococci* Isolated from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 435-437
- 369 Rylands, A. B., Mittermeier, R. A., & Silva, J. S. (2011). Neotropical primates: taxonomy and
370 recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook*, 46(1), 11–24.
371 doi:10.1111/j.1748-1090.2011.00152.x
- 372 Santestevan, N. A., de Angelis Zvoboda, D., Prichula, J., Pereira, R. I., Wachholz, G. R., Cardoso,
373 L. A., Moura, T. M., Medeiros, A. W., Amorin, D. B., Tavares, M., d’Azevedo, P. A., Franco, A.
374 C., Frazzon, J., Frazzon, A. P. G. (2015). Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles
375 of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and
376 *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World Journal of Microbiology and*
377 *Biotechnology*, 31(12), 1935–1946. doi:10.1007/s11274-015-1938-7
- 378 Santos, T., Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Micael, J., Rodrigues, T., Resende, R., Gonçalves,
379 A., Marinho, C., Gonçalves, D., Cunha, R., Poeta, P. (2013). Dissemination of antibiotic resistant
380 *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*, 24, 25–
381 31. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.09.004
- 382 Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016). Review of Antimicrobial Resistance in the
383 Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7.
384 doi:10.3389/fmicb.2016.01728
- 385 Smith, R. A., M’ikanatha, N. M., & Read, A. F. (2014). Antibiotic Resistance: A Primer and Call
386 to Action. *Health Communication*, 30(3), 309–314. doi:10.1080/10410236.2014.943634
- 387 Sood, S., Malhotra, M., Das, B. K., Kapil, A. (2008). Enterococcal infections & antimicrobial
388 resistance. *Indian Journal of Medical Research*, 128, 111-121.

- 389 Tan, S. C., Chong, C. W., Teh, C. S. J., Ooi, P. T., Thong, K. L. (2018). Occurrence of virulent
 390 multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the pigs, farmers and farm
 391 environments in Malaysia. PubMed, 30123701. doi: 10.7717/peerj.5353
- 392 Yameen, M. A., Iram, S., Mannan, A., Khan, S. A., & Akhtar, N. (2013). Nasal and perirectal
 393 colonization of vancomycin sensitive and resistant enterococci in patients of paediatrics ICU
 394 (PICU) of tertiary health care facilities. BMC Infectious Diseases, 13(1). doi:10.1186/1471-2334-
 395 13-156
- 396 Zaniolo, M. M., Oliveira, A. F., Tramontin, R. S., Santos, I. C., Delai, R. M., Pereira, U. P., Pachaly,
 397 E. M. V., Pachaly, J. R., Martins, L. A., Gonçalves, D. D. (2018). Identification of enterobacteria
 398 in free-living nonhuman primates in an urban park in the northern Region of the State of Paraná,
 399 Brazil. Semina: Ciências Agrárias. 39. doi: 10.5433/1679-0359.2018v39n3p1115
- 400 Weinstein, M. P., Patel, J. B., Campeau, S., Eliopoulos, G. M., Galas, M. F., Humphries, R. M.,
 401 Jenkins, S. G., Lewis II, J. S., Limbago, B., Mathers, A. J., Mazzulli, T., Patel, R., Richer, S. S.,
 402 Satlin, M., Swenson, J. M., Zimmer, B. L. (2018). Performance Standards For Antimicrobial
 403 Susceptibility Testing. CSLI, M100, 28.

404 Tabelas

405 Tabela 1: Dados sobre os animais empregados no presente estudo.

Número da Amostra (Nasal)	Sexo/idade	Local de coleta	Data da coleta
29	Macho jovem	P.E.M.	15/05/2018
30	Fêmea jovem	P.E.M.	15/05/2018
31	Fêmea adulta	P.E.M.	15/05/2018
32	Macho adulto	P.E.M.	15/05/2018
33	Fêmea jovem	M.M.A.	16/05/2018
34	Macho adulto	M.M.A.	16/05/2018
35	Macho adulto	M.M.A.	16/05/2018
36	Macho jovem	M.M.A.	16/05/2018
37	Fêmea jovem	M.M.A.	16/05/2018
38	Macho jovem	M.M.A.	16/05/2018
39	Fêmea jovem	M.M.A.	16/05/2018
40	Fêmea adulta	M.M.A.	16/05/2018
41	Fêmea jovem	M.M.A.	16/05/2018
42	Macho jovem	M.M.A.	16/05/2018

406 **P.E.M.:** Parque Ecológico Maracajá, Maracajá, Santa Catarina. **M.M.A.:** Morro dos Macacos, Passo de Torres, Santa
 407 Catarina

408 Tabela 2: Número de isolados de cada espécie de enterococos por local de coleta.

Espécie	Número (%) de enterococos isolados		
	Maracajá	Passo de Torres	Total (%)
<i>E. faecalis</i>	8 (66,7)	5 (35,7)	13 (50,0)
<i>E. casseliflavus</i>	4 (33,3)	9 (64,3)	13 (50,0)
Total	12 (100)	14 (100)	26 (100)

409 Tabela 3: Número (%) de cepas com susceptibilidade reduzida isoladas de suabes nasais de
410 macacos-prego selvagens.

	Espécie (N ^o)	Número (%) de isolados não susceptíveis aos antimicrobianos				RMF**
		CIP*	ERI*	NOR*	RIF*	
Maracajá	<i>E. faecalis</i> (8)	2(25,0)	7(87,5)	1(12,5)	4(50,0)	3(37,5)
	<i>E. casseliflavus</i> (4)	0	3(75,0)	2(50,0)	4(100)	2(50,0)
Subtotal (12)		2(16,6)	10(83,3)	3(25,0)	8(66,6)	5(41,6)
Passo de Torres	<i>E. faecalis</i> (5)	5(100)	5(100)	4(80,0)	0	0
	<i>E. casseliflavus</i> (9)	0	7(77,7)	0	8(88,8)	0
Subtotal (14)		5(35,7)	12(85,7)	4(28,6)	8(57,1)	0
Total (26)		7(26,9)	22(84,6)	7(26,9)	16(61,5)	5(19,2)

*antibióticos: CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, NOR: norfloxacina, RIF: rifampicina, RMF: resistência a múltiplos fármacos.

411 Tabela Suplementar: Tamanho dos halos de inibição em milímetros (mm) por isolado bacteriano.
 412 AMP 10µg; CIP 5µg; CLO 30µg; ERI 15µg; EST 300µg; GEN 120µg; NIT 300µg; NOR 10µg;
 413 RIF 5µg; TET 30µg; VAN 30µg. *: Resistente intermediário; **: Resistente.

Isolado	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	NIT	NOR	RIF	TET	VAN
29.1	23	23	21	17*	14	20	19	18	19*	27	18
29.2	29	18*	21	15*	17	17	22	17	12**	21	16*
29.3	26	19*	25	18*	19	20	23	18	15**	24	19
29.4	28	21	22	16*	14	16	21	16*	14**	23	18
31.1	28	24	25	20*	19	19	19	20	25	29	18
31.2	28	24	24	23	14	19	20	19	26	26	17
31.3	29	23	25	20*	15	20	21	19	25	30	18
31.4	26	23	24	16*	13	18	20	20	21	27	17
32.2	25	23	24	20*	17	16	22	17	17*	26	18
32.4	25	23	25	21*	20	21	23	16*	16**	27	20
32.5	24	21	24	20*	18	20	22	16*	13**	26	18
32.6	26	23	27	23	21	21	24	17	19*	27	20
33.1	27	19*	24	18*	17	21	22	16*	25	23	19
33.2	26	17*	21	16*	17	18	20	16*	24	22	19
33.3	30	18*	24	17*	16	17	20	15*	21	23	17
33.4	26	20*	22	21*	20	22	24	18	21	25	24
33.5	28	20*	26	20*	19	22	25	16*	22	23	21
35.1	30	26	27	20*	20	22	23	20	16**	30	20
35.2	30	25	25	19*	20	24	24	21	15**	31	21
35.3	34	27	26	23	21	22	21	20	14**	34	20
35.5	31	23	27	20*	21	23	21	20	17*	35	20
39.3	29	24	28	29	23	23	25	21	19*	29	20
41.6	29	25	25	20*	22	23	23	20	12**	32	21
41.7	28	25	21	20*	21	21	24	19	15**	31	20
41.8	27	23	25	20*	20	21	21	18	12**	26	19
42.11	30	29	30	22*	23	23	24	21	32	30	22

Article Title

414 First Author¹, Second Author^{2*}, Third Author^{1,2}

415 ¹Laboratory X, Institute X, Department X, Organization X, City X, State XX (only USA, Canada and
416 Australia), Country

417 ²Laboratory X, Institute X, Department X, Organization X, City X, State XX (only USA, Canada and
418 Australia), Country

419 * Correspondence:

420 Corresponding Author

421 email@uni.edu

422 Keywords: keyword₁, keyword₂, keyword₃, keyword₄, keyword₅. (Min.5-Max. 8)

423 Abstract

424 For full guidelines please refer to Author Guidelines

425 As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work
426 clearly accessible to a broad readership. References should not be cited in the abstract. Leave the Abstract
427 empty if your article does not require one, please see the Summary Table for full details.

428 1 Introduction

429 For **Original Research Articles**, **Clinical Trial Articles**, and **Technology Reports** the introduction
430 should be succinct, with no subheadings. For **Case Reports** the Introduction should include symptoms at
431 presentation, physical exams and lab results.

432 2 Article types

433 For requirements for a specific article type please refer to the Article Types on any Frontiers journal page.
434 Please also refer to Author Guidelines for further information on how to organize your manuscript in the
435 required sections or their equivalents for your field¹.

436 3 Manuscript Formatting

437 3.1 Headings

438 You may insert up to 5 heading levels into your manuscript as can be seen in “Styles” tab of this template.
439 These formatting styles are meant as a guide, as long as the heading levels are clear, Frontiers style will be
440 applied during typesetting.

441 3.2 Equations

442 The equations should be inserted in editable format from the equation editor.

¹ For Original Research articles, please note that the Material and Methods section can be placed in any of the following ways: before Results, before Discussion or after Discussion.

4434
4
3

$$f(x) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{n\pi x}{L} + b_n \sin \frac{n\pi x}{L} \right)$$

3.3 Figures

4444
4
4

445 Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the
446 manuscript. Figures will then be automatically embedded at the bottom of the submitted manuscript.
447 Kindly ensure that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order. Figures must be of
448 sufficient resolution for publication (see here for examples and minimum requirements). Figures which are
449 not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process. Figure legends
450 should be placed at the end of the manuscript. Please see [here](#) for full Figure guidelines

451451

3.3.1 Permission to reuse and Copyright

452 Figures, tables, and images will be published under a Creative Commons CC-BY licence and
453 permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-
454 published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility
455 of the authors to acquire the licenses, to follow any citation instructions requested by third-party
456 rights holders, and cover any supplementary charges.

3.4 Tables

459 Tables should be inserted at the end of the manuscript. Tables must be provided in an editable format e.g.,
460 Word, Excel. Tables provided as jpeg/tiff files will **not be accepted**. Please note that very large tables
461 (covering several pages) cannot be included in the final PDF for reasons of space. **These tables will be**
462 **published as Supplementary Material on the online article page at the time of acceptance. The**
463 **author will be notified during the typesetting of the final article if this is the case.**

4 Nomenclature

4.1 Resource Identification Initiative

466 To take part in the Resource Identification Initiative, please use the corresponding catalog number and
467 RRID in your current manuscript.

4.2 Life Science Identifiers

469 Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in
470 the manuscript before the keywords with the following format:

471 urn:lsid:<Authority>:<Namespace>:<ObjectID>[:<Version>]

472 For more information on LSIDs please see Inclusion of Zoological Nomenclature section of the guidelines.

5 Additional Requirements

474 For additional requirements for specific article types and further information please refer to Author
475 Guidelines.

6 Conflict of Interest

477 All financial, commercial or other relationships that might be perceived by the academic community as
478 representing a potential conflict of interest must be disclosed. If no such relationship exists, authors will be
479 asked to confirm the following statement:

480 *The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial*
481 *relationships that could be construed as a potential conflict of interest.*

482 **7 Author Contributions**

483 The Author Contributions section is mandatory for all articles, including articles by sole authors. If an
484 appropriate statement is not provided on submission, a standard one will be inserted during the production
485 process. The Author Contributions statement must describe the contributions of individual authors referred
486 to by their initials and, in doing so, all authors agree to be accountable for the content of the work. Please
487 see [here](#) for full authorship criteria.

488 **8 Funding**

489 Details of all funding sources should be provided, including grant numbers if applicable. Please ensure to
490 add all necessary funding information, as after publication this is no longer possible.

491 **9 Acknowledgments**

492 This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that
493 aided the efforts of the authors.

494 **10 Reference styles**

495 The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear,
496 Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

497 **10.1 Science, Engineering and Humanities and Social Sciences references**

498 **For articles submitted in the domains of Science, Engineering or Humanities and Social Sciences**
499 **please apply Author-Year system for in-text citations.** For Humanities and Social Sciences articles
500 please include page numbers in the in-text citations

501 For more examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer
502 to the Chicago Manual of Style.

503 **10.2 Health, Physics and Mathematics references**

504 **For articles submitted in the domain of Health or the journals Frontiers in Physics and Frontiers in**
505 **Applied Mathematics and Statistics please apply the Vancouver system for in-text citations.**

506 In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic
507 numerals in the parenthesis [square parenthesis for Physics and Mathematics].

508 For more examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer
509 to Citing Medicine.

510 **11 Supplementary Material**

511 Supplementary Material should be uploaded separately on submission, if there are Supplementary Figures,
512 please include the caption in the same file as the figure. Supplementary Material templates can be found in
513 the Frontiers Word Templates file.

514 Please see the Supplementary Material section of the Author guidelines for details on the different file
515 types accepted.

516 **1 Data Availability Statement**

517 The datasets [GENERATED/ANALYZED] for this study can be found in the [NAME OF REPOSITORY]
518 [LINK]. Please see the Data Availability section of the Author guidelines for more details.