

EFEITO DE DIFERENTES CARGAS PARASITÁRIAS NOS FILOS BACTERIA- NOS DE OVINOS INFECTADOS NATURALMENTE POR *HAEMONCHUS CON- TORTUS*

JEFERSON VIDART RAMOS¹; VERÔNICA ROCHA MERCHED²; ; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹Universidade Federal de Pelotas – jeff_dt@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – veronicamerched@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabio_leite@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Haemonchus contortus é o principal parasito de pequenos ruminantes de regiões tropicais e subtropicais. Por ser um nematódeo prolífico e hematófago, sua ocorrência pode causar anemias severas em animais altamente parasitados, levando em muitos casos ao óbito do animal. Acometendo principalmente cordeiros e ovelhas prenhas, cada parasito pode sugar entre 0,05 mL a 0,08 mL de sangue por dia (BESIER et al., 2016). *H. contortus* está adaptado a diversas zonas climáticas, tendo seu desenvolvimento favorecido em locais quentes e úmidos (FLAY; HILL; MUGUIRO, 2022). As condições ótimas para o desenvolvimento das larvas se dão em temperaturas que variam de 22 °C a 26 °C e umidade próxima de 100% (FLAY; HILL; MUGUIRO, 2022).

Por habitar o Trato Gastrointestinal (TDI) do hospedeiro, *H. contortus* mantém uma relação próxima com a microbiota presente nesse ambiente (SINNATHAMBY et al., 2018). Diversos fatores podem influenciar na composição das comunidades microbianas, entre eles a raça, condições de manejo ou nutrição (ELLISON et al., 2017; MCLOUGHLIN et al., 2020; YIN et al., 2021). Diferentes autores buscaram estabelecer a relação entre a microbiota presente no TDI e diferentes fenótipos de resistência às cargas parasitárias no mesmo rebanho (CORTÉS et al., 2020; DE AGÜERO et al., 2022; MAMUN et al., 2020; PAZ et al., 2022; WATKINS et al., 2021). Ovinos com diferentes cargas parasitárias tendem a apresentar significâncias na diversidade microbiana ao longo do TDI (PAZ et al., 2022). Além disso, é constatado que animais com baixa carga parasitária demonstram maior diversidade microbiana (MAMUN 2020), sugerindo que a presença do parasito pode desencadear graus diferentes de disbiose, associada muitas vezes ao filo Proteobacteria (SHIN; WHON; BAE, 2015).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a predominância dos filos presentes em ovinos com diferentes cargas parasitárias de *H. contortus* usando o sequenciamento do amplicon 16S rRNA.

2. METODOLOGIA

Vinte animais da raça Corriedale com idade aproximada de 20 meses foram monitorados durante o período de dez meses, com amostras fecais coletadas mensalmente para avaliação da carga parasitária. A técnica de Gordon e Whitlock modificada (1939) foi aplicada para contagem de ovos por gramas de fezes. Para agrupar os animais com fenótipos de baixa e alta contagem foi empregado o teste de Welch's no software GraphPad Prism 9. A identificação e estimativa da

predominância de *H. contortus* presentes nas amostras foram realizadas por meio da técnica de coprocultura (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950).

Posteriormente, quatro animais situados nos extremos das contagens foram selecionados para caracterização da microbiota. Amostras fecais foram enviadas para amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA para avaliar o perfil microbiano individual. As regiões V3-V4 foram amplificadas e a preparação das bibliotecas seguiu protocolo da empresa Neoprospecta Microbiome Technologies (Brasil). Os amplicons foram sequenciados em paired-end (2X300 bp) com MiSeq Reagent Kit V3 R (600 ciclos) em plataforma MiSeq Sequencing System (Illumina, Brasil).

A análise dos dados brutos de sequenciamento foi conduzida em linguagem R (<http://www.R-project.org/>) e as etapas de filtragem, modelagem de erro paramétrico e remoção de sequências químéricas foram realizadas no pacote dada2 (CALLAHAN et al., 2015). A tabela de ASVs foi criada e atribuída taxonomicamente a partir do banco de dados SILVA SSU 138 (QUAST et al., 2012). A normalização dos dados se deu por centered log-ratio (clr) e a significância estatística dos filos entre os grupos foi inferida por teste de Wilcoxon para dados não-paramétricos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Usando o teste de Welch's nos resultados obtidos por contagens de OPGs, os animais foram divididos nos grupos baixa contagem (BC) e alta contagem (AC). Para os animais AC foram encontrados valores de $3.125 \pm 583,2$, enquanto os animais BC apresentaram valores de $110 \pm 28,5$.

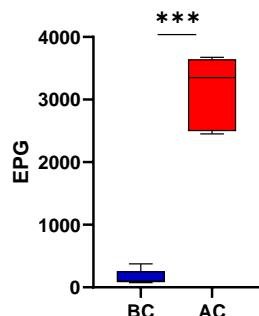


Figura 1. Contagem de OPG. Os dados representam as médias de OPGs dos grupos Baixa Contagem (BC) e Alta contagem (AC) durante o período estudado (10 meses) avaliadas pelo teste de Welch's. Asteriscos (***) indica significância estatística entre os grupos.

A partir do teste de Wilcoxon para dados não-paramétricos, foram encontrados dez filos com significância estatística entre os grupos (tabela 1).

Tabela 1. Filos bacterianos no TGI de ovinos naturalmente infectados por *H. contortus*

Filo	AC	BC	Valor de p
Chloroflexi	-	+	0,016
Cyanobacteria	+	-	0,00079
Elusimicrobia	+	-	0,0092
Fibrobacteres	+	-	0,00046

Firmicutes	+	-	2e-10
Kiritimatiellaeota	-	+	0,00042
Patescibacteria	-	+	0,0035
Proteobacteria	+	-	0,00021
Synergistetes	-	+	0,0086
Tenericutes	+	-	0,019

Tabela 1. Resultados do teste de Wilcoxon para BC e AC a nível de filos. + indica aumento para o grupo, enquanto – indica redução em relação ao grupo oposto.

O presente estudo buscou identificar a predominância de diferentes filos em ovinos com cargas parasitárias distintas. A predominância de *H. contortus* foi estimada em 80% dos parasitos, de *Ostertagia* (14%) e *Trichostrongylus* spp (6%). Dez filos apresentaram diferenças estatística entre os grupos, sugerindo que a composição da microbiota bacteriana gastrintestinal interfere na infecção parasitária.

Wang 2016 identificaram os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria como os mais abundantes ao longo do TGI, resultado também encontrado em nosso estudo. Embora a predominância dos três filos seja observada, diferentes raças podem apresentar composições relações diferentes entre Firmicutes e Bacteroidetes (CHOLEWIŃSKA et al., 2020).

MAMUN 2020 associaram o aumento de Firmicutes à baixa carga parasitária, porém nossos resultados demonstraram uma redução do filo em animais BC. Filos que podem causar disbiose, como Cyanobacteria e Proteobacteria estão reduzidos em BC, o que corrobora estudos anteriores (CHOLEWIŃSKA et al., 2020).

4. CONCLUSÕES

A presença de diferentes filos entre os animais com cargas parasitárias distintas, AC e BC, pode auxiliar na compreensão da interação de *Haemonchus contortus* e a microbiota gastrintestinal do hospedeiro. Nossos achados são promissores como uma ferramenta inovadora no controle desse nematódeo tão importante para a ovinocultura mundial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BESIER, R. B. et al. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. Em: **Advances in Parasitology**. Elsevier, 2016. v. 93p. 95–143.
- CALLAHAN, B. J. et al. **DADA2: High resolution sample inference from amplicon data.** Bioinformatics, 6 ago. 2015. Disponível em: <<http://biorexiv.org/lookup/doi/10.1101/024034>>. Acesso em: 11 jul. 2022.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, ago. 2012.
- CHOLEWIŃSKA, P. et al. Evaluation of Changes in the Levels of Firmicutes and Bacteroidetes Phyla of Sheep Feces Depending on the Breed. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1901, 16 out. 2020.

- CORTÉS, A. et al. Infection with the sheep gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta* increases luminal pathobionts. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 60, dez. 2020.
- DE AGÜERO, V. C. G. et al. **Microbial community in resistant and susceptible Churra sheep infected by *Teladorsagia circumcincta***. [s.l.] In Review, 13 jun. 2022. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-1670936/v1>>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- ELLISON, M. J. et al. Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. **Small Ruminant Research**, v. 156, p. 12–19, nov. 2017.
- FLAY, K. J.; HILL, F. I.; MUGUIRO, D. H. A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. **Animals**, v. 12, n. 10, p. 1238, 11 maio 2022.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J Counc Sci Ind Res**, v. 12, n. 1, p. 50–52, 1939.
- MAMUN, MD. A. A. et al. Variation in gut bacterial composition is associated with *Haemonchus contortus* parasite infection of sheep. **Animal Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 3, dez. 2020.
- MCLOUGHLIN, S. et al. Rumen Microbiome Composition Is Altered in Sheep Divergent in Feed Efficiency. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1981, 25 ago. 2020.
- PAZ, E. A. et al. Bacterial communities in the gastrointestinal tract segments of helminth-resistant and helminth-susceptible sheep. **Animal Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 23, dez. 2022.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.
- ROBERTS, F.; O'SULLIVAN, P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99–102, 1950.
- SHIN, N.-R.; WHON, T. W.; BAE, J.-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496–503, set. 2015.
- SINNATHAMBY, G. et al. The bacterial community associated with the sheep gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192164, 8 fev. 2018.
- VAN DIJK, J.; MORGAN, E. R. The influence of water on the migration of infective trichostrongyloid larvae onto grass. **Parasitology**, v. 138, n. 6, p. 780–788, maio 2011.
- WANG, Y. et al. Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 408, dez. 2020.
- WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 9 out. 2009.
- WATKINS, C. et al. Interactions between *Teladorsagia circumcincta* Infections and Microbial Composition of Sheep with or without Successful Monepantel Treatment—A Preliminary Study. **Ruminants**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 28 jul. 2021.
- YIN, X. et al. Age-Related Changes in the Ruminal Microbiota and Their Relationship With Rumen Fermentation in Lambs. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 679135, 20 set. 2021.