

## CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL DE OVINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Haemonchus contortus*

GRAZIELLA MARTINS GUIMARÃES<sup>1</sup>; JEFERSON VIDART RAMOS<sup>2</sup>; FABIO PEREIRA  
LEIVAS LEITE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [graziella.guimaraes@ufpel.edu.br](mailto:graziella.guimaraes@ufpel.edu.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jeff\\_dt@outlook.com](mailto:jeff_dt@outlook.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fleivasleite@gmail.com](mailto:fleivasleite@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O microbioma pode ser definido como uma comunidade microbiana complexa que varia em seus nichos ocupados, composição de espécies e influência de ambientes hospedeiros (MAFUNA et al., 2021). O microbioma existente no trato gastrointestinal (TGI) tem um papel de destaque em todo o funcionamento do metabolismo, desde digestão e nutrição até imunidade (KREISINGER et al., 2015). A relação entre microbioma do hospedeiro com nematoides causadores de infecções gastrointestinais (NGI) vem sendo estudada nos últimos anos. As patologias gastrointestinais ocasionadas por helmintos da espécie *H. contortus* provocam enormes prejuízos aos ovinocultores, levando à queda de lucratividade e, por conseguinte, representam um importante entrave na criação de ovinos (MAIERLE et al., 2021), isso porque a infecção por *H. contortus*, modula o microbioma no hospedeiro e essa relação entre microbioma e hospedeiro impacta a saúde do animal (SINNATHAMBY et al., 2018).

Paralelamente a isto, os produtores rurais deparam-se com graves infecções resultantes da resistência dos parasitos aos anti-helmínticos, fato agravado pelo uso indiscriminado e não controlado dos antimicrobianos (GIBSON et al., 2021). Por isso, métodos terapêuticos alternativos são procurados para amenizar o impacto das infecções, sendo que a utilização de animais resistentes, o controle biológico, a seleção genética e a rotação de pastagens e espécies são os meios mais utilizados atualmente (CEZAR et al., 2008). Ademais, a utilização de microrganismos probióticos vem sendo investigada como opção ao tratamento e prevenção de Infecções por Nematoides Gastrintestinais (NGI), com o objetivo de contornar a problemática da resistência a anti-helmínticos (BAUTISTA-GARFIAS et al., 2001). Com o objetivo de fornecer subsídios para que novos métodos sejam investigados para se tornarem alternativas de tratamento frente à resistência aos anti-helmínticos, o presente estudo visa a caracterização da microbiota gastrointestinal de ovinos infectados naturalmente por *H. contortus*.

### 2. METODOLOGIA

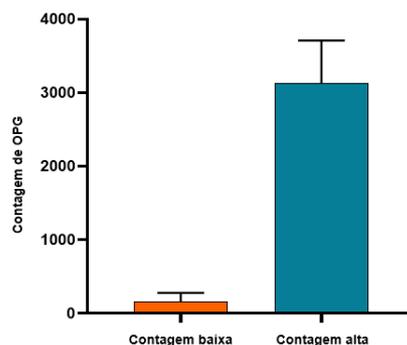
O grupo experimental foi selecionado a partir de um rebanho de 20 ovinos da raça Corriedale localizados no sul do Rio Grande do Sul (latitude 31°51'51" sul e na longitude 52°49'24" oeste). Os animais foram mantidos a pasto, com manejo realizado em condições semelhantes e monitorados pelo período de um ano, durante o qual foram realizadas contagens de ovos por grama de fezes (OPG) pela técnica McMaster (GORDON E WHITLOCK, 1939) e teste FAMACHA® (MALAN et al., 1992) para triagem dos animais saudáveis e infectados. Após o processo de fenotipagem, os ovinos foram escolhidos de acordo com sua suscetibilidade e resistência e divididos em dois grupos, sendo um formado por 10 animais sensíveis (Alta OPG) aos NGI e outro composto por 10 animais resistentes (Baixa OPG). O

nematódeo *H. contortus* foi identificado por meio da técnica de coprocultura (ROBERTS et al., 1950).

As amostras de fezes coletadas semanalmente foram acondicionadas em frascos estéreis a -70 °C até a extração do DNA. O DNA foi isolado das fezes com a utilização do kit de extração (QiAmp DNA Stool Mini Kit) e usado para a produção de bibliotecas de 16SrRNA (região V4). As bibliotecas foram encaminhadas para Sequenciamento de Nova Geração (NGS) em plataforma Illumina MiSeq na ESALQ/USP usando o protocolo de sequenciamento paired-end (2X300bp). As sequências de 16SrRNA obtidas foram analisadas usando Linguagem R. Nele, o processo de controle da qualidade das sequências e classificação taxonômica é baseado no banco SILVA SSU 138 U. Na mesma ferramenta foram feitas análises de diversidade e riqueza das amostras de metataxômica. A comparação das microbiotas foi realizada com o uso dos pacotes Phyloseq e Vegan (MCMURDIE, 2013; DIXON, 2003). A partir desses resultados, puderam ser identificados os microrganismos mais prevalentes nos grupos de animais resistentes e sensíveis aos NGI.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de ovos por gramas de fezes (OPG) realizada permitiu separar os animais em grupo suscetível e resistentes ao *H. contortus* (Figura 1) e as amostras dos dois extremos foram armazenadas em glicerol a -70°C para extração de DNA e análise de metataxômica.



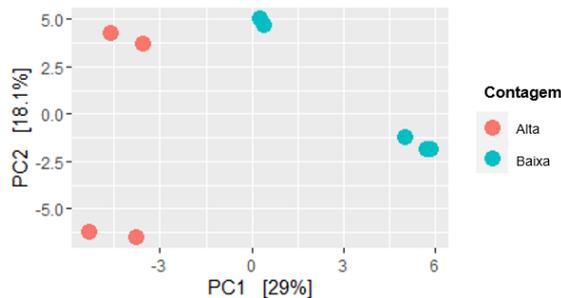
**Figura 1.** Contagem de ovos de *Haemonchus contortus* nas fezes (OPG) de ovinos infectados. Foi realizado o teste de Welch's para avaliar significância estatística entre os grupos (valor de  $p = 0.0002$ ).

O índice de diversidade alfa, o qual mede a discrepância entre diversidade regional e diversidade alfa média, foi inferido pelo método de Shannon e de Simpson e não encontrando significância estatística entre as amostras.

	Shannon	
	Contagem baixa	Contagem alta
<b>Média</b>	6,63	6,51
<b>SD</b>	0,07	0,06
	Simpson	
	Contagem baixa	Contagem alta
<b>Média</b>	0,998	0,998
<b>SD</b>	0,000	0,000

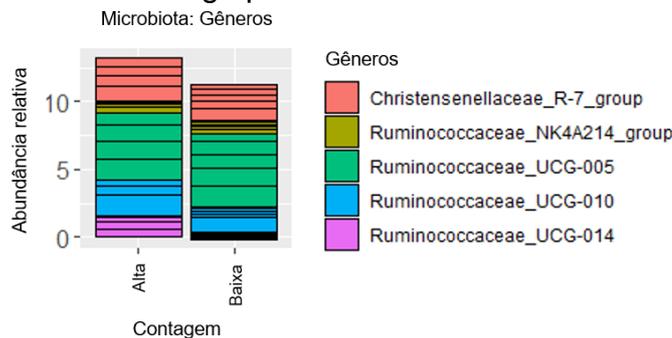
**Tabela 1.** Índices de diversidade alfa de Shannon e de Simpson para a contagem alta e baixa.

O índice de diversidade beta, que avalia a variação das espécies que estão presentes em determinada área analisando a diferença entre as comunidades, foi inferido pelo método de PERMANOVA a partir da matriz de Aitchson. A normalização dos dados foi realizada por CLR.



**Figura 2.** Índice de diversidade beta de contagem alta (suscetíveis) e contagem baixa (resistentes). A diversidade beta apresentou significância entre os grupos, com valor de  $p = 0.009$ .

Os gêneros mais abundantes foram analisados e, a partir disso, foi possível observar que o gênero *Ruminococcaceae*, que é uma bactéria fibrolítica (Zhang et al., 2018) está presente em ambos os grupos, mas especificamente *Ruminococcaceae* UCG-014 consta apenas na microbiota dos ovinos suscetíveis. Esse resultado corrobora com os dados observados por Zeng et al. (2017), Tanca et al. (2017) e Zhang et al. (2018), os quais mostraram que os gêneros predominantes aos NGI são dependentes não só da dieta e condições ambientais, como também da carga parasitária.



**Figura 4.** Comparação da composição da microbiota de ovinos com alta e baixa contagem de OPG.

#### 4. CONCLUSÕES

É possível concluir que os animais suscetíveis aos NGI têm a presença de *Ruminococcaceae* UCG-014 na composição de sua microbiota, enquanto os ovinos resistentes não possuem essa espécie em sua microbiota. Portanto, isso denota uma alteração da composição da microbiota dos animais suscetíveis aos NGI, o que sugere que a modulação dos microrganismos no trato intestinal poderia trazer benefícios aos ovinos, conferindo maior resistência aos *H. contortus*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Ciência rural*, v. 38, n. 7, p. 2083–2091, 2008.

- DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of vegetation science: official organ of the International Association for Vegetation Science*, v. 14, n. 6, p. 927–930, 2003.
- GIBSON, S. B. et al. The *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus* beta-tubulin genes cannot substitute for loss of the *Saccharomyces cerevisiae* beta-tubulin gene. **microPublication biology**, v. 2021, 2021.
- GORDON, H. McL.; WHITLOCK, H. V. A new technique four counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Science Industry Research**, v.12, n.1, p. 50-52, 1939.
- KREISINGER, J. et al. Interactions between multiple helminths and the gut microbiota in wild rodents. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1675, p. 20140295, 2015.
- MAIERLE, C. L. et al. 366 impact of *Haemonchus contortus* on feed intake in Katahdin sheep selected for parasite resistance. **Journal of animal science**, v. 99, n. Supplement\_3, p. 201–201, 2021.
- MAFUNA, T. et al. Bacterial profiling of *Haemonchus contortus* gut microbiome infecting Dohne Merino sheep in South Africa. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 5905, 2021.
- MALAN, F.S.; VAN WYK, J.A. The packed cell volume and color of the conjunctivae as aids for monitoring *Haemonchus contortus* infestations in sheep. In: **Biennial national veterinary congress**, v. 1, p. 139. Grahamstown: South African Veterinary Association, 1992.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.
- ROBERTS, F. H. S. et al. Methods for egg counts and larval cultures for Strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, 1: 95-102, 1950.
- SINNATHAMBY, G. et al. The bacterial community associated with the sheep gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. **PloS one**, v. 13, n. 2, p. e0192164, 2018.
- SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Linfócitos T CD4+CD25+ e a regulação do sistema imunológico: perspectivas para o entendimento fisiopatológico da sepse. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 24, n. 3, p. 294–301, 2012.
- TANCA, A. et al. Diversity and functions of the sheep faecal microbiota: a multi-omic characterization. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 541–554, 2017.
- VAN WYK, J. A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, Mar. 2013.
- WANG, J. et al. Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 30, n. 1, p. 100–110, 2017.
- ZENG, Y. et al. Microbial community compositions in the gastrointestinal tract of Chinese Mongolian sheep using Illumina MiSeq sequencing revealed high microbial diversity. **AMB express**, v. 7, n. 1, p. 75, 2017.
- ZHANG, F. et al. *Caenorhabditis elegans* as a Model for Microbiome Research. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 485, 2017.