

## SA 29 Evaluación preliminar del efecto de la administración del antihelmíntico ricobendazol en el microbioma de heces de bovinos mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S ARN

Rovira P.<sup>1\*</sup> y Lorenzo P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Uruguay).

\*E-mail: provira@inia.org.uy

*Preliminary evaluation of the effects of anthelmintic administration on the fecal microbiome of cattle using a 16S ribosomal RNA sequencing approach*

### Introducción

La interacción entre parásitos y la comunidad bacteriana (microbioma) en el tracto gastrointestinal de bovinos es perturbada por los tratamientos antihelmínticos (Daniels *et al.*, 2020). El objetivo del trabajo fue utilizar la técnica de secuenciación parcial del gen 16S rARN para estudiar el efecto de la exposición a ricobendazol en el microbioma de heces de novillos con niveles contrastantes de conteos de huevos de nematodos gastrointestinales por gramo de materia fecal (hpg). La hipótesis fue que la exposición a ricobendazol produce alteraciones significativas en la composición y funcionalidad del microbioma, independientemente del nivel de hpg.

### Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en INIA Treinta y Tres (Uruguay), y consistió en evaluar los cambios en el microbioma fecal de 10 novillos (249±19 kg) con baja (<100 hpg, n=5) y alta (840±207 hpg, n=5) carga parasitaria tratados con una dosis única de 3,75 mg/kg de ricobendazol (RICOVERM 15 g, König, Argentina) de acuerdo con la posología indicada en el producto.

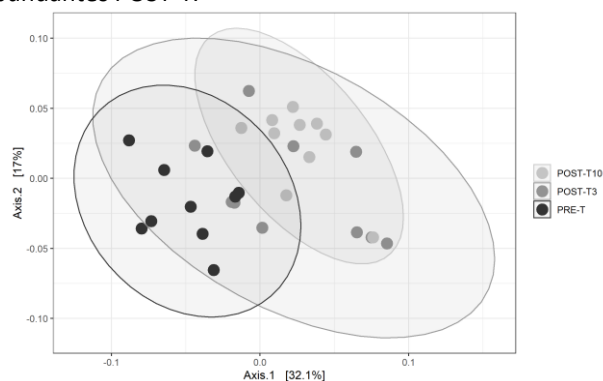
Se tomaron muestras fecales del recto de cada animal pre-tratamiento (PRE-T) en el día 0, y post-tratamiento (POST-T) a los 3 y 10 días (T3 y T10, respectivamente). Se extrajo el ADN de cada muestra (QIAmp DNA Mini kit, QIAGEN) y se envió a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para amplificar y secuenciar la región V3-V4 del gen 16S rARN en una plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, USA).

Las secuencias fueron asignadas taxonómicamente utilizando la base de datos SILVA (Quast *et al.*, 2013) mediante el programa DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Los contrastes estadísticos ( $P < 0,05$ ) fueron realizados entre los grupos bajo y alto hpg, y entre las 3 fechas de muestreo (0, 3, y 10 días) siendo el animal la unidad experimental. Diferencias en diversidad alfa (índice Chao1) y beta (distancias UniFrac) fueron evaluadas utilizando el paquete Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013). La abundancia diferencial de géneros fue identificada mediante el paquete DESeq2 (Love *et al.*, 2014) y la funcionalidad del microbioma fue predicha por PICRUSt2 (Douglas *et al.*, 2020).

### Resultados y Discusión

El tratamiento con ricobendazol redujo los conteos de huevos por debajo de 100 hpg en todos los animales post-tratamiento. La riqueza de variantes microbianas (diversidad alfa) fue superior ( $P < 0,05$ ) POST-T10 (870±40) comparado con PRE-T (791±58). El análisis de componentes principales (diversidad beta) demostró diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los microbiomas PRE-T y post-tratamiento (POST-T) (Figura 1). Los tratamientos POST-T3 y POST-T10 ( $P < 0,10$ ) tendieron a presentar microbiomas diferentes, sugiriendo cambios al menos hasta 10 días luego de la administración de ricobendazol. La riqueza y diversidad de los microbiomas no fueron afectados ( $P > 0,05$ ) por el nivel de hpg PRE-T.

Se identificaron 165 géneros bacterianos, 20 de los cuales (12%) fueron diferentes ( $P < 0,05$ ) comparando el microbioma PRE-T y POST-T. Considerando los géneros más abundantes, *Alistipes* y *Ruminococcaceae* UCG-010 fueron enriquecidos POST-T; mientras que *Christensenellaceae* RC-7, y *Ruminococcaceae* UCG-013 y UCG-014 fueron menos abundantes POST-T.



**Figura 1.** Análisis de componentes principales para evaluar la similitud de los microbiomas según día del muestreo en base a distancias UniFrac ponderadas. PRE-T: pre-tratamiento (8 ml RICOVERM 15 g); POST-T3 y POST-T10: 3 y 10 días luego de tratamiento, respectivamente.

Se identificaron 370 funciones metabólicas distintas, 130 de las cuales (35%) fueron diferentes ( $P < 0,05$ ) comparando las muestras PRE-T y POST-T. Las funciones asociadas a la biosíntesis de nucleósidos/nucleótidos, y de cofactores y vitaminas fueron las más afectadas luego de la exposición a ricobendazol.

Los resultados presentados son los primeros en reportar alteraciones en el microbioma (disbiosis) asociado al uso de antihelmínticos en vacunos, complementando información ya generada en otras especies (Kunz *et al.*, 2019).

### Conclusiones

Se concluye que la exposición a ricobendazol generó cambios significativos en la diversidad, composición, y funcionalidad del microbioma en heces de novillos hasta 10 días post-tratamiento, independientemente del nivel de hpg PRE-T. Dicha "reorganización" de microbioma puede contribuir a la mejora productiva de los animales que generalmente se observa POST-T, aunque se requieren estudios abarcando más animales y de más largo plazo para evaluar si el microbioma retorna a su composición original.

### Bibliografía

- Callahan BJ, McMurdie PJ (2016). *Nat. Methods* 13: 581-583.  
 Daniel SP, Leng J (2020). *Anim. Microbiome* 2: 38.  
 Quast C, Pruesse E (2013). *Nucleic Acids Res.* 41: D590-D596.  
 Douglas GM, Maffei VJ (2020). *Nat. Biotechnol.* 38: 685-688.  
 Kunz IG (2019). *J. Equine Vet. Sci.* 77: 98-106.  
 Love MI, Huber W (2014). *Genome Biol.* 15: 550.  
 McMurdie PJ y Holmes S (2013). *PLoS ONE* 8: 61217.