

PROPUESTA DE UN PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE HECES DE PERRO

González-Ortiz, G.¹, Adelantado, C.², Gómez de Segura, A.¹, Hervera, M.¹, Arosemena, E.L., Calvo, MA.² y Baucells, MD.¹

¹Servei de Nutrició i Benestar Animal (SNI BA). Departament de Ciència Animal i dels Aliments. ²Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. Facultat de Veterinària. Edifici V, 08193, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) Barcelona gemma.gonzalez@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los estudios de la microbiota intestinal realizados en perros suelen utilizar metodologías de recogida de heces poco estandarizadas (Simpson et al., 2002; Baillon, et al., 2004). Los protocolos de recogida de muestras varían en función del objetivo de los ensayos que se realizan, como el estudio de la microbiota habitual, la detección de patógenos en heces o la determinación del efecto de un prebiótico, probiótico o simbiótico en la población microbiana intestinal, entre otros. En muchas ocasiones, el procesado y el análisis microbiológico de las heces se retrasa por diferentes causas como la distancia entre la perrera y el laboratorio o la dificultad de recogida cuando se trabaja con un gran número de animales.

Con este trabajo pretendemos establecer un protocolo de recogida de heces para el estudio de la microbiota fecal en perros. Nuestros objetivos fueron evaluar la repetibilidad en la determinación de la microbiota fecal habitual, en una misma muestra, entre días de muestreo y analizar el efecto de la conservación en frío sobre dichas determinaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron dos pruebas experimentales. En la primera prueba, se emplearon 5 perros Beagle adultos y sanos. Los animales se alojaron en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de alimentación y manejo. Durante dos días consecutivos, se recogieron heces inmediatamente después de la defecación voluntaria de los animales. Las muestras se remitieron al laboratorio de microbiología para el estudio de la microbiota fecal habitual: *Enterobacteriaceae* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y Bacterias ácido lácticas (BAL). Las muestras fecales se dividieron en dos alícuotas. Una alícuota se analizó de inmediato tras la recepción y la segunda se mantuvo 24 h a 4° C antes de ser analizada.

En la segunda prueba experimental se incluyeron 4 de los perros utilizados en la primera prueba. Se recogieron heces frescas durante tres días consecutivos. Las muestras se dividieron en varias alícuotas con el fin de someterlas a diferentes condiciones de procesado y refrigeración. Se estudió la repetibilidad de la microbiota en la misma porción de heces previa homogenización de la muestra. Del día 1 y 2 de recogida, se separó materia fecal que se mantuvo a 4° C durante 24 h. Una de las alícuotas del día 1 se refrigeró durante 48 h. De cada animal se realizó una mezcla de heces frescas del día 2 y heces refrigeradas del día 1 (*pool* 0+24). Similarmente, se constituyó un "pool" de los tres días de recogida mezclando heces frescas del día 3, heces refrigeradas 24 h del día 2 y heces refrigeradas 48 h del primer día de muestreo (*pool* 0+24+48).

Se utilizó microbiología tradicional para cuantificar los diferentes grupos de bacterias que forman parte de la microbiota habitual de las heces de los animales. Los medios de cultivo empleados fueron agar MacConkey en el caso de las Enterobacterias, agar TSN (triptona sulfito neomicina) para el recuento de *Clostridium perfringens* y agar MRS (Man Rogosa y Sharpe) para BAL.

Los datos obtenidos se han analizado mediante un test ANOVA con el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico SAS (SAS, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera prueba, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales ($P < 0.01$), pero no entre los dos días de recogida de las muestras de los grupos microbiológicos analizados. El recuento medio por gramo de heces frescas fue de $5,87 \pm 0,49$ log UFC/g para *Enterobacteriaceae* spp, $5,86 \pm 0,50$ log UFC/g para *Escherichia coli*, $3,75 \pm 0,16$ log UFC/g para *C. perfringens* y $9,04 \pm 0,13$ log UFC/g para BAL. En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos bacterianos de las heces frescas y refrigeradas aunque en el segundo día del estudio se observaron recuentos de hasta un 15 % superiores ($P = 0.06$) de *C. perfringens* tras la conservación en refrigeración (4° C).

En la segunda prueba no se observaron diferencias en los grupos microbiológicos a estudio entre alícuotas obtenidas a partir de la misma porción de heces. En las heces frescas, no se apreciaron diferencias significativas entre días excepto para las BAL ($P < 0.05$). En las muestras recogidas el día 2 se observaron recuentos de BAL un orden por debajo que en las muestras del día 1 ($9,22$ log UFC/g día 1; $8,18$ log UFC/g, día 2 y $8,89$ log UFC/g día 3). La refrigeración de las muestras no modificó la microbiota de las mismas, los datos se presentan en la tabla 1. Cabría destacar que, únicamente en el primer día de muestreo, hubo un incremento de *C. perfringens* en las heces refrigeradas en comparación con las heces frescas ($P < 0,01$), al igual se observó en la primera prueba. Esta variación en los recuentos, supondría una limitación la conservación de las heces en refrigeración (4° C). En las muestras refrigeradas durante 48 h, los recuentos de BAL se modificaron de forma significativa respecto los valores obtenidos a las 24 h y a las heces frescas ($P < 0,001$ y $P < 0,05$ respectivamente) (Figura 1). El “pool 0+24”, no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos microbianos analizados respecto a las heces frescas del primer día, segundo día y las heces conservadas del primer día. Finalmente, el “pool” de tres días, 0+24+48, tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los recuentos microbianos realizados en comparación con las otras condiciones de procesado de las heces. Cuando no tenemos en cuenta los recuentos obtenidos a partir de las alícuotas refrigeradas 48 h, no se observan diferencias estadísticas entre las muestras sometidas a diferentes formas de conservación y procesado ($P = 0,0029$).

Dada la repetibilidad intramuestra podemos concluir que no es necesaria la duplicidad de las determinaciones sobre una misma muestra bien homogenizada. En cuanto a los días de recogida, la variabilidad observada en los recuentos de BAL sugiere la necesidad de realizar más de una recogida por periodo de muestreo. La posibilidad de refrigerar las muestras supone una gran ventaja a la hora de establecer protocolos de trabajo con animales, en los que la recogida es tras la defecación voluntaria y, puede demorarse en el tiempo, aunque los resultados obtenidos en los recuentos de *C. perfringens* suponen una posible limitación a la refrigeración y, por tanto al “pool” que reduciría, a una única siembra, la analítica de las muestras.

Tabla 1. Recuentos de los grupos microbiológicos analizados en la segunda prueba (log UFC/g de heces): Heces frescas (F) vs. Heces refrigeradas 24h. (R)

	Día 1				Día 2			
	F	R	Error st	p-Valor	F	R	Error st	p-Valor
<i>Enterobacteriaceae</i> spp	6.02	7.05	0.516	n.s	6.26	5.97	0.32	n.s
<i>Escherichia coli</i>	5.73	6.76	0.53	n.s	6.04	5.84	0.25	n.s
<i>Clostridium perfringens</i>	3.85	4.81	0.089	0.0018	4.13	3.61	0.358	n.s
BAL	9.225	8.47	0.376	n.s	8.188	8.005	0.162	n.s

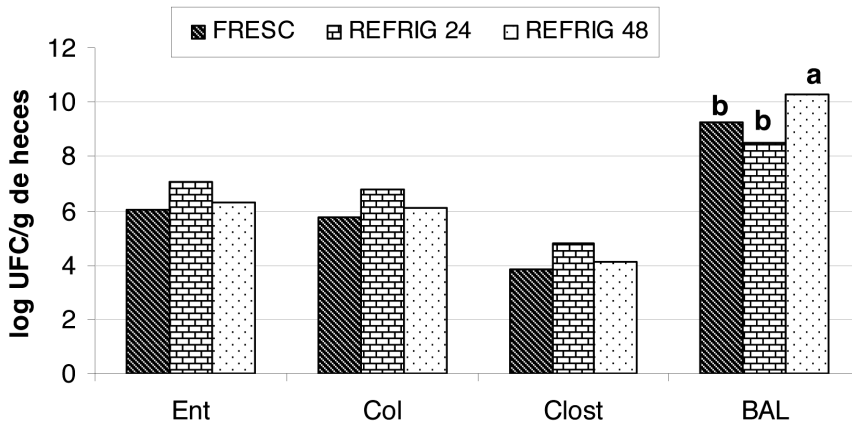


Figura 1. Efecto de la conservación en frío durante 24 h y 48 h. sobre el recuento microbiano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baillon ML, Marshall-Jones Z, F.Butterwick R., 2004. AJVR. 65(3):338-34
- Simpson J.M, Martineau B, Jones W.E, Ballam J.M, Mackie R.I. 2002. Microbial ecology 44:186-197

PROTOCOL PROPOSAL FOR SAMPLES COLLECTION FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF DOG FECES

ABSTRACT: Some trials which include canine digestive microbiology studies do not have a standardized methodology about faeces collection. The aim of these studies was to make a standardized collection protocol to study the common microbiota in dog faeces. Study goals were to study the repeatability in the same sample, to determine the repeatability between days and to analyze the cold storage effect on the usual microbiota. The repeatability within the faeces was confirmed on the microbiota. Only variations between days on Lactic Acid Bacteria counts were detected. No differences were found in the microbiota (*Enterobacteriaceae* spp, *Escherichia coli* and Lactic Acid Bacteria) between fresh samples and refrigerated faeces. However, we observed an increase in the counts of *Clostridium perfringens* when the samples were kept refrigerated in different days in the two different studies. Thus, this effect could restrict the preservation of the faecal sample in the fridge until its analysis. More than one sample by sampling period may be considered in order to minimise the microbiota variation.

Keywords: microbiota, dogs, faeces, storage