

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**"EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE
MICOTOXINAS EN ALIMENTOS TERMINADOS Y
MATERIAS PRIMAS PARA LA ALIMENTACIÓN DE
ANIMALES. (FLUORESCENCIA Y ELISA)"**

FRANCISCO JAVIER MOSCOSO FERNANDEZ

GUATEMALA, MARZO DE 2001

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**"EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE
MICOTOXINAS EN ALIMENTOS TERMINADOS Y
MATERIAS PRIMAS PARA LA ALIMENTACIÓN DE
ANIMALES. (FLUORESCENCIA Y ELISA)"**

TESIS

Presentada a la Honorable Junta Directiva de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

POR

FRANCISCO JAVIER MOSCOSO FERNANDEZ

AL CONFERIRSELE EL GRADO ACADEMICO DE

MEDICO VETERINARIO

GUATEMALA, MARZO 2001

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO:	Lic. Rodolfo Chang
SECRETARIO:	Lic. Robin Ibarra
VOCAL PRIMERO:	Lic. Carlos Saavedra
VOCAL SEGUNDO:	Dr. MV. Fredy Gonzales
VOCAL TERCERO:	Lic. Eduardo Spiegel
VOCAL CUARTO:	Br. Dina Reyna
VOCAL QUINTO:	Br. Valeska Moss

ASESORES

Dra. MV. Lucero Serrano
Dr. MV. José Mariano Carrera
Licda. Ligia Franco de Alvarado

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento a lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a consideración de ustedes el presente trabajo de tesis titulado:

"EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS TERMINADOS Y MATERIAS PRIMAS PARA LA ALIMENTACIÓN DE ANIMALES. (FLUORESCENCIA Y ELISA)"

COMO REQUISITO PREVIO A OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE

MEDICO VETERINARIO

TESIS QUE DEDICO

AL SEÑOR DE ESQUIPULAS

Apoyo y Fortaleza en todo momento.

A MIS PADRES

Francisco Javier Moscoso O.
Orfilia Arellí Fernández Escobar

A MIS HERMANOS

Marisol
Maricela
Fabiola
Rony

A MIS SOBRINAS

Lucia Marisol
Estefani Rubí

A MIS ABUELOS

Soledad Osorio vda. de Moscoso
María Rubí Escobar (Q.D.E.P.)
J. Antonio Fernández (Q.D.E.P.)
Teodoro A. Moscoso (Q.D.E.P.)

A MIS TIOS Y PRIMOS

En general

A LA FAMILIA

De la Parra Motta y
Motta Gil

EN ESPECIAL A

Katthya Yolanda Morales Ureña
y a toda su familia

ACTO QUE DEDICO

A GUATEMALA

Mi patria querida

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

EN ESPECIAL A MIS ASESORES:

Dra. Lucero Serrano

Dr. José Mariano Carrera

Licda. Ligia Franco de Alvarado

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento muy sincero para todas aquellas personas que colaboraron directa o indirectamente con la realización del presente trabajo, al personal de FRISA, especialmente al personal de el laboratorio GRAGUA S.A. por el apoyo desinteresado que me dieron durante la realización de esta investigación.

GRACIAS A TODOS.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCION.....	1
II. HIPOTESIS.....	4
III. OBJETIVOS.....	5
3.1 General.....	5
3.2 Específicos.....	5
IV. REVISION DE LITERATURA	
4.1 ALIMENTACION ANIMAL	6
4.2. ALTERACIONES QUE PUEDEN SUFRIR LOS ALIMENTOS.....	9
4.2.1 Principales causas de deterioro de las materias primas agrícolas.....	10
4.2.1.1 Alteraciones Biológicas.....	12
4.2.1.2 Alteraciones Físicas.....	12
4.2.1.3 Alteraciones Bioquímicas.....	12
4.2.1.4 Alteraciones Químicas.....	13
4.3. LOS HONGOS Y SU EFECTO SOBRE LOS ALIMENTOS.....	13
4.4. MICOTOXINAS.....	14
4.4.1 Micotoxinas y su impacto económico.....	15
4.4.2 Importancia de los hongos y las micotoxinas en producción animal.....	15
4.4.3 Efecto del tipo, tiempo y condiciones de almacenaje sobre la incidencia de hongos.....	16
4.4.4 Tipos de micotoxinas que afectan a los animales.....	17
4.4.5 Aflatoxinas.....	20
4.4.6 Ochratoxinas.....	22
4.4.7 Fumonisinias.....	24
4.5 METODOS DE DETECCION DE MICOTOXINAS.....	26
4.5.1 Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de micotoxinas.....	26
4.5.1.1 Rindascreen®fast Aflatoxin.....	26
4.5.1.2 Rindascreen®fast Ochratoxin.....	27
4.5.1.3 Rindascreen®fast Fumonisin	28
4.5.2 Método cuantitativo para la detección de micotoxinas por columnas de luminiscencia (VICAM).....	29
4.5.2.1 Aflatest VICAM.....	29
4.5.2.2 Ochratest VICAM.....	31
4.5.2.3 Fumonitest VICAM.....	32
V. MATERIALES Y METODOS.....	34
5.1 Metodología por ELISA.....	35
5.1.1 Aflatoxinas.....	35
5.1.2 Fumonisinias.....	40
5.1.3 Ochratoxinas.....	40

5.2 Metodología por Fluorescencia (VICAM).....	41
5.2.1 Aflatoxinas.....	41
5.2.2 Fumonisinias.....	43
5.2.3 Ochratoxinas.....	46
5.3 Diseño estadístico.....	48
5.3.1 Tamaño de la muestra.....	48
5.3.2 Interpretación.....	48
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	50
6.1 Resultados de chi cuadrado en Aflatoxinas.....	50
6.1.1 En producto terminado.....	50
6.1.2 En materias primas.....	50
6.2 Resultados de chi cuadrado en Ochratoxinas.....	51
6.2.1 En producto terminado.....	51
6.2.2 En materias primas.....	51
6.3 Resultados de chi cuadrado en Fumonisinias.....	52
6.3.1 En producto terminado.....	52
6.3.2 En materias primas.....	52
6.4 Discusión de los resultados de Aflatoxinas.....	53
6.5 Discusión de los resultados de Ochratoxinas.....	54
6.6 Discusión de los resultados de Fumonisinias.....	55
VII. CONCLUSIONES.....	56
VIII. RECOMENDACIONES.....	57
IX. RESUMEN.....	58
X. BIBLIOGRAFIA.....	61
XI. ANEXOS.....	65

INDICE DE TABLAS

Tabla No.		Pág.
1	Resultados obtenidos en el análisis de las muestras	66
2	Resultados de Aflatoxinas obtenidos	67
3	Resultados de Ochratoxinas obtenidos	68
4	Resultados de Fumonisinias obtenidos	69
5	Comparación de ambos métodos en base a varios parámetros	70
6	Valores de chi cuadrado a los niveles de confianza de 0.05 y 0.01.....	71

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No.		Pág.
1	Resultados comparativos de Aflatoxinas.....	72
2	Resultados comparativos de Ochratoxinas.....	73
3	Resultados comparativos de Fumonisina.....	74

I. INTRODUCCION

La alimentación es uno de los factores más importantes en lo que respecta al éxito o al fracaso de una explotación pecuaria. Y a esos resultados se llega por una doble vía: la económica y aquella que se refiere a la calidad de los alimentos.

Cuando el coste de la alimentación es elevado, el margen de ganancias puede bajar y en estos casos es donde se puede caer en la tentación de utilizar materias primas o alimentos de mala calidad para disminuir los costes, lo que resulta en un mal ahorro ya que generalmente esto es observado en el pobre resultado obtenido en los animales en los que dicho alimento se usa.

Pero si partimos de que alimento es toda aquella sustancia que sirve para nutrir, significa suministrar a algún ser lo necesario para su manutención y subsistencia. Por lo que los alimentos o las materias primas con que se preparan dichos alimentos deben estar libres de toda sustancia que pueda producir daño al organismo del animal que se esta alimentando.

Existen en el medio una serie de compuestos que al estar presentes en los alimentos o sus materias primas causan daños en los animales, pero uno de los más comunes e importantes son las micotoxinas las cuales no son más que metabolitos derivados de los hongos, con diverso modo de acción, los cuales son extremadamente tóxicos y se pueden

encontrar una variedad de tipos (aflatoxinas, fumonisinas, ochratoxinas, etc.) en una diversidad de substratos como granos, cereales y concentrados (raciones balanceadas) capaces de causar daños a la salud tanto de los animales como del humano, causando pérdidas económicas al productor y hasta la muerte de los animales.

El impacto de las micotoxinas en las explotaciones pecuarias es común ya que los países de América Latina principalmente, al ser importadores netos de granos, son susceptibles de recibir granos con mayor cantidad de toxinas no aceptados por aquellos países que tienen regulaciones sobre los niveles existentes.

Aunque en muchos casos las exportaciones de granos van acompañadas con certificados de análisis acreditados emitidos por entidades conocidas mundialmente las cuales proporcionen resultados que se encuentran dentro de los niveles tolerados de micotoxinas por el país exportador, pero los niveles de micotoxinas que se encuentran en el lugar de origen, pueden ser diferentes al nivel que tengan a su arribo al lugar de destino. Además puede ser que el nivel de origen reportado no corresponda con los niveles tolerados en el país de destino por las diferentes condiciones de producción existentes.

Un factor de suma importancia para el adecuado control de niveles de micotoxinas, es el muestreo en la recepción de granos y del alimento terminado almacenados por mucho tiempo o mal almacenados para luego someter dichas muestras a pruebas para la determinación y detección de micotoxinas. Para esta detección existen diversidad de

pruebas, pero en el presente trabajo se hará una comparación de las diferentes propiedades de dos métodos de determinación de micotoxinas, los cuales son el Método por ELISA (Inmunoensayo Enzimático) y el Método de Fluorescencia (VICAM), con la finalidad de determinar cual es el más adecuado y eficaz desde varios puntos de vista para su uso como prueba de rutina en un laboratorio de análisis, tomando en cuenta las diferentes ventajas y desventajas entre uno y otro. Este estudio podrá realizarse a través de someter un número determinado de muestras de alimentos y materias primas a ambos métodos, al finalizar dicho estudio se podrá concluir cual es el método más adecuado para la detección de micotoxinas en alimentos para animales así como materias primas utilizadas en la elaboración de dichos alimentos.

II. HIPOTESIS

El Método de ELISA (Inmunoensayo Enzimático R-biopharm®) para la detección de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados para animales, proporciona resultados más exactos y confiables que el método fluorométrico (VICAM).

III. OBJETIVOS

3.1 General:

Comprobar la eficacia y exactitud de la detección de micotoxinas a través de los métodos de ELISA y fluorescencia (VICAM), para determinar cuál es el más adecuado para su uso rutinario en el laboratorio.

3.2 Específicos:

2. Realizar pruebas de confrontación de materia primas y alimentos terminados con ambos métodos de detección de micotoxinas, para verificar cada una de las propiedades que tienen ambos métodos (ELISA y VICAM).

2. Encontrar el método que a través de los resultados que proporcione pueda garantizar con exactitud los niveles de micotoxinas presentes en los alimentos y materias primas.

IV. REVISION DE LITERATURA

4.1. LA ALIMENTACION ANIMAL

La alimentación constituye la parte más importante de la cría de animales.(5,6).

Con el objeto de comprender la alimentación racional, el nutricionista debe conocer los distintos componentes de los alimentos y el papel que desempeñan en el organismo y debe tener una idea de la composición de los muchos alimentos de que dispondrá para hacer el mejor uso de ellos. Nunca debe de subestimar la importancia de la palatabilidad.(5,6)

Como se sabe es un tema muy poco tratado y muy extenso, a pesar de que en él radica el éxito o el fracaso de las explotaciones pecuarias. (22).

Esto se debe principalmente a lo complejo que resulta entender la composición adecuada que debe tener un alimento para cada tipo de animal y la forma correcta en que se debe administrar. (22).

De los párrafos anteriores se desprende que el éxito de una explotación pecuaria depende en buen grado de que la alimentación que se administre debe ser lo menos cara posible y lo más completa y equilibrada, libre de contaminantes que en determinado momento podrían dañar la salud animal.(5,6,22).

El aspecto de los costos podría quedar resuelto por medio de muchas maneras: como por ejemplo, adquiriendo el alimento a precio de mayoristas, produciendo parte de lo que se consume en el criadero, adquiriendo la materia prima y realizando en el propio establecimiento los alimentos, pero con cualquiera de estas formas se corre el peligro que al disminuir los costos se pierda la calidad de los alimentos que ingerirán los animales, produciendo en ellos una serie de daños que van desde deficiencias hasta problemas causados por el mal manejo o elección que le damos a nuestra materia prima o alimento terminado (22).

Antes de entrar de lleno al tema que nos ocupa es razonable comenzar a definir lo más claramente posible algunos términos que son necesarios saber para entender mejor el presente trabajo:

Llámase alimento a toda substancias que sirve para nutrir, es decir suministrar al ser lo necesario para su manutención y subsistencia. Nutrir y alimentar son, términos equivalentes, como lo son también nutrición, alimentación y nutrimento. Estos últimos están representando una acción que tiene por objeto, mediante la asimilación, el aumento y la conservación del ser vivo.(5,6,22).

Cuando un alimento está formado por elementos de distinta naturaleza se dice que es COMPUESTO; cuando lo forma un solo elemento, se le denomina SIMPLE.(22).

Desde el punto de vista de su dinámica, los alimentos compuestos están formados por elementos nutritivos de diferente naturaleza que son llamados ENERGETICOS (cuando después de asimilados el organismo los utiliza para producir), PLASTICOS (cuando intervienen en la formación de tejidos), PROTECTORES (cuando su presencia o transformación rige procesos metabólicos, sin producir calor apreciable ni formación directa de tejidos). (22).

El término NUTRIENTE propio de los Zootécnicos, se refiere a un tipo determinado de alimento simple cuyas particularidades son las de cumplir una importante función biológica, directa o indirecta, catalítica o no, pero siempre sin valor energético ni como formador directo de tejidos. Los alimentos protectores podrían ser un ejemplo de nutrientes, como así también el agua y los antibióticos que se incorporan a veces a las raciones etc.(5,6,22).

Los términos ALIMENTO BALANCEADO Y ALIMENTO COMPLETO, aunque lo parezca, no son sinónimos. Hay quienes interpretan que existe una diferencia que estriba en que los primeros son artificiales (fabricados por el hombre mezclando distintas clases de ingredientes), mientras que los segundos son de origen natural (por ejemplo, un vegetal que contiene, todos los elementos necesarios)(5,6,22).

La verdad es que un alimento balanceado es siempre completo, mientras que un

completo puede no ser balanceado. O dicho de otra manera: en los primeros la variedad, la calidad y cantidad de los ingredientes que intervienen es, la estrictamente necesaria, mientras que en los segundos puede existir variedad y calidad, pero no en la cantidad necesaria.(22).

Una ración puede ser perjudicial tanto porque posea una cantidad deficiente o excesiva de uno u otro elemento nutritivo, como que algunos de sus ingredientes no cumpla con las normas de calidad que se deben exigir en un ingrediente que se use para elaborar una ración, y en el caso de los alimentos para animales uno de los principales responsables de la mala calidad de las materias primas son los hongos (mohos) que al estar presentes en cantidades elevadas pueden producir micotoxinas que al ser consumidos por los animales pueden causarle serios daños. (22)

4.2. ALTERACIONES QUE PUEDEN SUFRIR LOS ALIMENTOS

Partiendo que en Guatemala los granos constituyen del 40% al 60% de los alimentos balanceados de la dieta animal utilizados en granjas, es muy importante que estos sean, microbiológica, sanitaria y nutricionalmente de calidad. Frecuentemente se detecta un alto contenido de hongos y por consiguiente micotoxinas tanto en los granos importados, como en los nacionales, siendo estos perjudiciales para las explotaciones pecuarias, se hace necesario la implementación de medidas para evitar la contaminación de hongos en los granos almacenados así como también de encontrar un buen medio de detección en los alimentos que ya están afectados para que no sean utilizados en la elaboración de alimentos. (2,29).

En Guatemala como en la mayoría de países de América Latina, la producción agrícola se ve gravemente afectada por la forma del manejo y conservación de los productos agrícolas durante la cosecha y almacenamiento.(2,3,9,22,26,30).

Las alteraciones más comunes en la post-cosecha se pueden clasificar en forma general en dos categorías:

1-Factores abióticos; incluyen las alteraciones físicas y operacionales como: humedad, temperatura, transporte y almacenamiento.

2-Factores Bióticos o Biológicos; agrupan los agentes que ocasionan daños como insectos, hongos, aves y roedores.

Sin embargo, como la anterior es una clasificación muy amplia, se verá más adelante otra en forma detallada, la cual es de uso frecuente y al mismo tiempo cumple los fines de esta investigación.(2,3,9,22,26,30).

4.2.1 Principales causas de deterioro de las materias primas agrícolas:

El concepto de deterioro generalmente significa los "Cambios indeseables" en los productos agrícolas. Es necesario clasificar el tipo y magnitud de las alteraciones para entender mejor el deterioro.(2,3,9,10,26,31,34)

A fin de facilitar su estudio y comprensión, las alteraciones se clasifican de la siguiente manera:

	Microorganismos
Biológicas	Insectos
	Roedores
	Aves
	Humedad
Físicas	Temperatura
Condiciones de	Daños por producto
Manejo y cosecha	Químicos
	Raspones
	Heridas

Alteraciones

	Respiración
Bioquímicas	Transpiración
	Maduración
	Enzimáticas
Químicas	Nutritivas
	Sensorial

En la práctica, las alteraciones no se dan en forma aislada, de manera que la variación de sólo una de éstas, afecta o condiciona la acción de las otras.(2,3,9,10,26,31,34).

4.2.1.1. Alteraciones Biológicas:

Los microorganismos que alteran los alimentos se clasifican en bacterias, HONGOS y levaduras. El deterioro de granos y semillas es ocasionado principalmente por hongos en el periodo post-cosecha.(2,3,9,10,26,31,34).

4.2.1.2. Alteraciones Físicas:

Recuérdese que las semillas machacadas o partidas no se conservan bien, especialmente si están expuestas a una atmósfera húmeda y son propensas al enmohecimiento debido a cambios por fermentaciones. Mientras el grano está completo e intacto continúa siendo esencialmente una entidad viviente. Cuando se muele, tritura, etc. se le mata y al igual que ocurre en todos los organismos muertos, comienzan los procesos de deterioro y descomposición.

(2,3,9,26,31,34).

4.2.1.3.Alteraciones Bioquímicas:

Las principales reacciones bioquímicas que intervienen en el deterioro de los productos agrícolas son la respiración y el proceso de maduración.

La respiración es el proceso mediante el cual las plantas convierten los elementos primarios que absorben del suelo en energía, para realizar sus funciones vitales.

(2,3,9,10,31,34).

Por otro lado aunque el proceso de maduración es un proceso importante para generar productos de excelente calidad, esta puede generar cambios indeseables cuando el punto óptimo es sobrepasado. (9,10,26,31,34).

4.2.1.4.Alteraciones Químicas:

Las alteraciones químicas de los productos agrícolas se producen básicamente por las sustancias químicas que produce la misma planta; estas sustancias químicas son las hormonas vegetales, también la caramelización de los azúcares y liberación de enzimas que deterioran los vegetales.

(2,3,9,10,31,34).

4.3. LOS HONGOS Y SU EFECTO SOBRE LOS ALIMENTOS

Los hongos han sido considerados tradicionalmente como "Semejantes a las Plantas". Muchas especies crecen por extensión continua y formando estructuras ramificadas semejantes a yemas. Son inmóviles y sus paredes celulares son muy semejantes en espesor, composición química y estructura ultramicroscópica a las plantas. Crecen como células únicas (Levaduras) o como colonias filamentosas multicelulares (mohos). Debido a su abundante distribución en el aire, sus esporas son frecuentemente molestos contaminantes (1,2,8,13,16,17,32).

Los hongos de almacén se caracterizan por no presentar una invasión importante antes de la cosecha, las esporas siempre están presentes donde se maneja y almacena el

producto. Se desarrollan en productos con un contenido de humedad mínima de 13 a 13.5% o en humedad relativa de equilibrio entre 68 y 90%. Los principales hongos corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, entre algunos otros. (1,2,3,13,16,32).

4.4. MICOTOXINAS

Los tóxicos producidos por los mohos han sido conocidos desde hace muchos años, pero solo en las últimas décadas han adquirido verdadera importancia al irse comprendiendo su acción patógena en los organismos y sus muchas veces graves efectos en la economía.

En la actualidad la amenaza de las micotoxinas para la salud de los animales es constante, sobre todo en países que, como Guatemala, las condiciones ambientales son ideales para el crecimiento de los mohos en los alimentos. (3,4,7,12,19,20,38).

Las micotoxinas son metabolitos producidos por hongos, los cuales crecen en productos agrícolas (cereales y leguminosas) sometidos a condiciones adversas durante el cultivo, manejo y almacenamiento. La mayoría de las toxinas se encuentran presentes en los cereales, y un aumento de ellas o de alguna en especial puede ser nocivo para todos los organismos. (3,4,7,12,19,20,38).

Pueden dañar la salud humana, causan pérdidas económicas para el productor y mortalidad en los animales. (3,4,7,19,29).

Posiblemente las toxinas más conocidas son las aflatoxina, producidas por los hongos del género ***Aspergillus*** y ***Penicillium***, los cuales se pueden producir desde el cultivo de los cereales por efecto de el almacenamiento inadecuado (humedad del grano

arriba de 14%) y la alta incidencia de grano quebrado. (3,7,19,20,38).

Estos son factores que favorecen la formación de aflatoxinas. Para dicha formación es necesaria la presencia de minerales (zinc, magnesio, hierro, molibdeno), carbohidratos (glucosa y sucrosa) y fuentes de nitrógeno. (3,4,7,12,19,20,36).

Otro grupo de toxinas que causan problema, especialmente en el maíz, son aquellas producidas por los hongos del grupo **Fusarium**; las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, crecen como saprófitos sobre vegetales muertos o como parásitos en plantas vivas. (3,4,12,19,20).

4.4.1 Micotoxinas y su impacto económico:

Se estima que alrededor de el 25 % de las cosechas a nivel mundial son afectadas anualmente por los hongos, causando además de la pérdida total de una gran cantidad de el producto, reducción de la capacidad nutritiva de los alimentos que no fueron afectados en su totalidad.(24,27,28,33).

Otro impacto económico importante es la susceptibilidad marcada que le producen los hongos a las cosechas para ser afectadas por otro tipo de infecciones. (24,27,28,33),

4.4.2 Importancia de los hongos y las micotoxinas en producción animal:

En un principio, las observaciones al respecto se concentraron en el producto almacenado, pues las dos especies productoras de toxinas, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se consideraban hongos de almacenamiento. Los principales factores que afectan el desarrollo de toxinas en el almacenamiento son: humedad, temperatura,

concentración de oxígeno y sustrato. Sin embargo la presencia de hongos de almacenamiento en el campo se ha demostrado que los mismos factores ambientales que afectan a los hongos en condiciones de almacenamiento, afectan en diversos grados los procesos de infección/contaminación en el campo. (4,7,8,13,20,38).

Los alimentos que son microbiológicamente estables tienen normalmente un bajo contenido de humedad (10-12%), y por ende, no están sujetos a la degradación. Tan pronto como la humedad empieza a aumentar en los alimentos, se inicia el crecimiento de hongos seguido por el de levaduras y bacterias. Las causas principales de descomposición de los alimentos son: (18)

1. La humedad y la resequedad
2. La alta temperatura
3. El crecimiento y la actividad de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos).La humedad y la resequedad. (4,7,8,13,18,20,38).

4.4.3 Efecto del tipo, tiempo y condiciones de almacenaje sobre la incidencia de hongos:

El daño mecánico hecho al grano de maíz lo hace mucho más vulnerable a la invasión de hongos de almacenamiento incluyendo *Aspergillus flavus*. Bajo cualquier condición ambiental se contaminan con mayor facilidad los granos dañados (quebrados),

que los granos enteros. Las grietas y rupturas en los granos de maíz son causadas principalmente por la cosechadora y el equipo de manejo, así como también cuando el grano es horadado por insectos y éstos causan el rompimiento del pericarpio (2,3,10,26,30,32,34,)

4.4.4 Tipos de micotoxinas que afectan a los animales:

Hasta la fecha se han reconocido más de 300 micotoxinas, las cuales ejercen efectos muy diversos sobre los animales, los efectos se pueden resumir en:

1. Reducción en la absorción y/o el aprovechamiento de nutrientes
2. Trastornos reproductivos
3. Disminución del consumo de alimento
4. Reducción de la inmunocompetencia (1,4,6,7,8,12,15,25,29,34).

Pero dentro de las mas reconocidas podemos mencionar las siguientes:

AFECCION	TOXINAS (cuando se conocen)	HONGOS
Aflatoxicosis	Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>
Diplodiosis	Desconocida	<i>Diplodia zeae</i>

Ergotismo	Alcaloides del Cornezuelo	<i>Claviceps purpurea</i>
Estrogenismo y Vulvovaginitis	Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>
Eccema Facial	Esporidesminas	<i>Pithomyces chartarum</i>
Leucoencefalomalacia	Fumonisina B1	<i>Fusarium moniliforme</i>
Envenenamiento por Maíz mohoso	Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>
Nefrosis mohosa	Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Lupinosis micotóxica	Fomopsinas	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Ocratoxicosis	Ocratoxina y Citrinina	<i>Aspergillus ochraceus</i>

Síndrome Hemorrágico en Aves de corral	Aflatoxinas y Rubratoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus clavatus</i> y <i>Penicillium purpurogenum</i>
Edema, Enfisema Pulmonar	4-Ipomeanol	<i>Fusarium solani</i>
Baboseo	Eslaframina	<i>Rhizoctonia leguminicola</i>
Envenenamiento Por trébol dulce	Dicumarol	<i>Penicillium mucor</i>
Síndrome de Ataxia temblorosa	Penitremos, verrulógeno y Aflatremos	<i>Penicillium crustosum</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
Fusariotoxicosis	Vomitoxina y T-2	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium nivale</i>

Existen otras micotoxinas más que causan una infinidad de enfermedades, pero por cuestiones de la presente investigación solamente se van a describir brevemente las siguientes tres:

Aflatoxinas

Fumonisinias

Ocratoxinas (1,4,6,7,8,12,15,25,29,34).

4.4.5 Aflatoxinas:

Las aflatoxinas son diversos metabolitos, señalados como Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1, producidos por diversos géneros y especies de mohos, entre las cuales se señala de manera especial *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. (4,15,17,19,20,21,24,25,26,31,32,35,36).

Las aflatoxinas se producen a temperaturas que están entre 25 y 35 grados centígrados. (> 70 grados Fahrenheit - 23 grados Centígrados) y su máxima producción, en relación a la Aflatoxina B, se realiza entre los 28 y 30 grados centígrados.(4,15,17,21,25,26,31,32,36).

Cosechas afectadas:

Maíz, sorgo, nueces, algodón, entre otros granos.

Tipo de Hongo:

Aspergillus flavus y *Aspergillus parasiticus*

Efecto:

Carcinógenos, inmunosupresión y pérdida del apetito.

Animales Afectados:

Vacas lecheras sobre todo, cerdos, aves y humanos

Clima:

Calor (mayores a 70 grados Fahrenheit o 23 grados Centígrados), humedad mayor a 14%. (4,15,17,19,20,21,24,31,32,38).

Efectos patológicos de la aflatoxina:

Hepatotoxicidad (atrofia del hígado)

Hiperplasia del conducto biliar

Hemorragias en intestino y riñón

Carcinoma (tumores de hígado). (4,7,15,17,19,20,25,31,32,36).

Efecto de Aflatoxina en aves:

Reduce la tasa de crecimiento

Causa inmunosupresión, reduciendo la capacidad de defensa contra infecciones de tipo oportunista.

Causa el Síndrome del Hígado graso

Reduce la postura de huevos

Puede causar la muerte. (4,7,15,17,19,20,25,31,32,38).

Efecto de Aflatoxina en cerdos:

Induce una baja tasa de crecimiento

Causa inmunosupresión: Reduce la capacidad de defensa contra infecciones oportunistas. (4,7,15,17,19,20,25,31,32,36).

Aflatoxina: Niveles permitidos

20 ppb: Humanos, aves en crecimiento, pollos de engorde, aves reproductoras, ganado inmaduro y vacas lecheras

100 ppb: Cerdos y Ganado de carne de finalización. (7,8,9,12).

4.4.6 Ochratoxinas:

Las ochratoxinas son sustancias tóxicas, derivadas de las Dihidroxycumarinas, que fueron inicialmente aisladas de cepas de *Aspergillus ochraceus*. También puede producirla el hongo *Penicillium viridicatum*. (4,12,17,19,20,21,25,34).

Los primeros casos naturales de Ocratoxicosis datan de 1969. Niveles mayores de 200 ppb, producen toxicidad renal en los cerdos. Las ochratoxinas pueden ser producidas en cualquier grano de cereal, legumbres y semillas de oleaginosas. (4,12,17,19,20,25)

Se conoce que los efectos nefrotóxicos de la Ocratoxina A, pueden agravarse por la presencia en el alimento de otras micotoxinas de acción similar como la citrinina y el ácido oxálico. (4,12,17,19,20,25,34).

Cosechas afectadas:

Maíz, sorgo y cebada.

Tipos de Hongo:

Aspergillus ochraceus y *Penicillium viridicatum*.

Efectos:

Causa cáncer e inmunosupresión

Animales afectados:

Cerdos y Aves

Clima:

Temperaturas mayores de 70 grados Fahrenheit ó 23 grados Centígrados y
humedad mayor 14%

Niveles de advertencia:

20 ppb. (4,12,17,19,20,34).

Ochratoxina: Efectos patológicos en aves

Reduce el consumo de alimentos

Causa inmunosupresión: Mayor susceptibilidad a Infecciones por

Salmonella sp.

Causa malformación de las cáscaras del huevo

Reduce la postura de huevos

Reduce la incubabilidad de los huevos fértiles. (4,12,17,19,20,21,34).

Ocratoxinas: Efectos patológicos en cerdos

Causa inmunosupresión: Reduce la capacidad de defensa
contra infecciones oportunistas

Causa necrosis de la piel

Reduce la eficacia de los antibióticos

Causa hemorragias

Induce piaras de tamaño pequeño

Causa letargo (modorra)

Causa degeneración tubular a nivel renal. (4,12,17,19,20,21,34).

4.4.7 Fumonisinias:

Esta micotoxina no es más que la responsable de una enfermedad del SNC que afecta a los caballos, mulas y asnos. Ocurre esporádicamente en América del Norte y de Sur, Sur Africa, Europa y la China. Se asocia con la alimentación con maíz mohoso, normalmente durante un período de varias semanas. El hongo causante es el *Fusarium moniliforme* y la toxina responsable la Fuminisina B1. (7,12,17,25,34).

Se ha comunicado que la misma toxina causa epidemias agudas de enfermedad en cerdos, normalmente adultos, caracterizadas por edema pulmonar e hidrotórax. (7,12,17,25,34).

Cosechas Afectadas:

Maíz y sorgo

Tipos de hongo:

Fusarium moliniforme y *Fusarium proliferatum*.

Efectos patológicos que causa:

Cáncer del estómago, edemas pulmonares, leucoencefalomalacia equina (ELEM) y la muerte.

Bajo peso en aves.

Animales afectados:

Caballos, cerdos y humanos

Clima:

Temperaturas menores de 70 grados Fahrenheit/ 23 grados Centígrados y una humedad mayor de 18 %.

Nivel de Advertencia:

5 ppm.(7,11,12,17,25,34).

4.5. METODOS DE DETECCION DE MICOTOXINAS

- ❑ Cromatografía de capa fina (TLC)
- ❑ Cromatografía de gases líquida (GLC)
- ❑ Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)
- ❑ Espectroscopía de masa
- ❑ Columnas de luminisencia (VICAM)
- ❑ Inmunoensayos enzimáticos (ELISA). (14,17,23,29,31,35,36,38).

Por situaciones de la presente investigación se describirán únicamente la metodología de detección de micotoxinas por ELISA y por las columnas de luminisencia o fluorescencia (VICAM). (14,17,23,29,31,35,36,38).

4.5.1 Inmunoensayo Enzimático para el Análisis Cuantitativo de Micotoxinas:

4.5.1.1 Rindascreen® fast aflatoxin:

Generalidades:

Este es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxinas en cereales y alimentos para animales (raciones balanceadas). Este test ha sido válido con maíz, trigo, cebada, avena, maní. (17,23,31,36)

Fundamento del Test:

El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos de oveja anti-aflatoxina IgG de conejo. Se añade anticuerpo anti-aflatoxina, conjugado aflatoxina-enzima, estándares de aflatoxina (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de oveja inmovilizados. El conjugado aflatoxina-enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado. El substrato/cromógeno es añadido a los pocillos, a través de los anticuerpos convierte el cromógeno incoloro en una sustancia azul. La adición de un reactivo para detener la reacción provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición es hecha fotométricamente a 450 nm. La absorción es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina en la muestra (17,23,31,36).

Sensibilidad:

El límite medio de detección fue encontrado a concentraciones < 1.7 ppb. (17,23,31,36).

4.5.1.2 Rindascreen® fast ochratoxin :

Generalidades:

Este es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de ochratoxina A en cereales y alimentos para animales (raciones balanceadas). (17,23,31,36).

Con RINDASCREEN® FAST Ochratoxin se puede detectar Ochratoxina A en cereales y alimentos balanceados para animales rápidamente y con gran exactitud. (17,23,31,36).

Fundamento del Test:

El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. El fundamento es el mismo para Aflatest variando únicamente los anticuerpos que para Ochratest son de cabra contra anti-ochratoxina A IgA de ratón.(17,23,31,36).

Sensibilidad:

El límite medio de detección es de 5 ug/kg (5 ppb). Esta es la concentración de Ochratoxina A que es significativamente diferente al estándar cero. (17,23,31,36).

4.5.1.3 Rindascreen® fast fumonisin:

Generalidades:

Este es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de Fumonisina en cereales y alimentos para animales (raciones balanceadas). (17,23,31,36).

Con RINDASCREEN® FAST Fumonisin se puede detectar Fumonisina en cereales y alimentos balanceados para animales rápidamente y con gran exactitud. (17,23,31,36).

Fundamento del Test:

El test se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. El fundamento es el mismo para Aflatest variando únicamente los anticuerpos que son anti-fumonisina IgG de conejo. (17,23,31,36).

Sensibilidad:

El límite medio de detección es de 100 ug/kg (0.1 ppm). Esta es la concentración de Fumonisina que es significativamente diferente al estándar cero. (17,23,31,36).

4.5.2 Método Cuantitativo para la Detección de Micotoxinas por Columnas de Luminisencia (VICAM)

4.5.2.1 Aflatest VICAM®:

Este es un método cuantitativo para la detección de Aflatoxinas, en muchos productos. (14,,35,36,37,38).

Con la biotecnología VICAM avanzada es posible la medición de muchas de las aflatoxinas importantes (Incluyendo AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y AFM1) sin el uso de solventes tóxicos como cloroformo o clorhidrato de metileno. (14,35,36,37,38).

Esta es una prueba usada en una extensa variedad de lugares o granjas de procesamientos de alimentos y laboratorios de control de calidad, con rapidez, facilidad de interpretación y altamente exacto en el análisis de las aflatoxinas, garantizando la calidad de la materia prima para los alimentos. (14,35,36,37,38).

Principio:

La aflatoxina es una toxina natural de hongos del grupo 1 y se ha mostrado que es carcinógena en el humano además de causar pérdidas económicas en los animales debido a enfermedades y a la disminución de la eficiencia productiva y reproductiva. AFLATEST® es un método cuantitativo, rápido, seguro, simple, y sumamente exacto para la medición de aflatoxinas en muchos productos. (14,35,36,37,38).

Las pruebas son preparadas a través de una toma de muestra del alimento a analizar luego de obtener una solución de extracto que será mezclada y filtrada son aplicados a la columna de AFLATEST ® que contiene anticuerpos específicos contra aflatoxinas, por lo que si la muestra contiene aflatoxinas éstas quedarán ligadas a la columna, y el resultado se observará al lavar la columna con metanol obteniendo la solución en un tubo de ensayo para luego medir la cantidad de aflatoxina en un fluorómetro. (14,35,36,37,38).

Los métodos de AFLATEST ® varían en la cantidad de muestra que pasa a través de la columna, sin embargo cuanto menos es la muestra la columna experimenta

ampliamente y la evaluación esta completa rápidamente. Por lo general los métodos de 0.2 gramos tienen un rango de evaluación amplio y son rápidos, pero el método de 1 gramo es más rápido pero los límites de detección son más bajos aunque ambos son exactos. (14,35,36,37,38).

AFLATEST ® esta aprobado por la AOAC para la detección de residuos de aflatoxinas en granos y productos hechos de granos.

El kit de AFLATEST ® está aprobado para la detección de aflatoxinas en cereales molidos, arroz, maíz, y mezclas de soya entre otros, pero puede dar falsos positivos cuando se analizan muestras no aprobadas para su uso o mezclas de varios ingredientes. (14,35,36,37,38).

4.5.2.2 Ochratest VICAM ®:

Es un método cuantitativo para la detección de ochratoxinas en una gran variedad de productos, es un método simple y seguro que puede ser interpretado en 10 minutos excluyendo el modo de preparación y puede ser afectado por la humedad y el calor. (14,35,36,37,38).

Principio:

Ochratoxina es una toxina producida por el hongo *Aspergillus ochraceus* y algunas otras producidas por especies de *Penicillium fungi*. (14,35,36,37,38).

Ochratoxina es conocida por causar daños al riñón y la disminución de la producción de huevos en las aves además de ser inmunosupresor y carcinógeno potencialmente. (14,35,36,37,38).

Las pruebas son preparadas a través de una toma de muestra del alimento a analizar luego de obtener una solución de extracto que será mezclada y filtrada son aplicados a la columna de OCHRATEST[®] que contiene anticuerpos específicos contra ochratoxinas, por lo que si la muestra contiene ochratoxinas éstas quedarán ligadas a la columna, y el resultado se observará al lavar la columna con metanol obteniendo la solución en un tubo de ensayo para luego medir la cantidad de ochratoxina en un fluorómetro. (14,35,36,37,38).

4.5.2.3 Fumonitest VICAM[®]:

Es un método cuantitativo para la detección de fumonisinas B1, B2 y B3 en varios productos. (14,35,36,37). FUMONITEST[®] puede ser usado por cualquiera que necesite rapidez, facilidad de desempeño y mucha exactitud para el análisis de fumonisina, y así asegurar la calidad de la materia prima para la elaboración de alimentos. (14,35,36,37,).

Este método puede utilizarse en varios lugares con altos índices de control de calidad ya que puede actuar en menos de 15 minutos excluyendo la preparación de la muestra y no requiere de cuidados especiales. (14,35,37,38).

Principio:

La Fumonisina es una toxina producida por el hongo *Fusarium moniliforme*, el cual tiene como hábitat universal y frecuente el maíz. (14,35,36,37,38).

Fumonisina B1, B2 y B3 están presentes en muchas evaluaciones de muestras de maíz con una totalidad de una parte por millón. Es frecuentemente la causa de leucoencefalomalacia equina, enfisema y edema pulmonar en caballos y responsable del cáncer del estómago en humano. (14,35,36,37,38).

Las pruebas son preparadas a través de una toma de muestra del alimento a analizar luego de obtener una solución de extracto que será mezclada y filtrada son aplicados a la columna de FUMONITEST® que contiene anticuerpos específicos contra fumonisina, por lo que si la muestra contiene fumonisinas estas quedarán ligadas a la columna, y el resultado se observará al lavar la columna con metanol obteniendo la solución en un tubo de ensayo para luego medir la cantidad de fumonisinas en un fluorómetro. (14,35,36,37,38).

V. MATERIALES Y METODOS

En la presente investigación se realizó una comparación de el método de detección de micotoxinas por ELISA vrs. El método de fluorescencia de VICAM por lo que se sometieron 15 muestras de alimentos terminados y /o materias primas para elaboración de los mismos a análisis de detección de Aflatoxinas, Ochratoxinas y Fumonisinias por ambos métodos y luego se compararon los resultados obtenidos utilizando varios criterios como:

- Exactitud
 - Tiempo para la obtención de resultados
 - Costo por muestra
 - Equipo que se necesita
 - Tipo de muestra a la que se le puede aplicar.
- Recursos Humanos:
- i- Estudiante
 - ii- Personal de Laboratorio Gragua S.A. (Laboratorio privado).
 - iii- Personal del Departamento de Avicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Recursos Materiales y Metodología:

5.1 METODOLOGIA POR ELISA

5.1.1 Aflatoxinas:

Método: (Inmunoensayo Enzimático para el análisis cuantitativo de aflatoxinas,

R-biopharm, Ridascreen-fast)

- Reactivos:

- Agua destilada
- Solución de metanol al 70% (mezclar 70 ml de metanol al 100% con 30 ml. de agua destilada)

-Equipo y Materiales:

-Equipo:

- Espectrofotómetro Elx-800 Biotek Instruments Inc.
- Licuadora
- Micropipetas de 50, 100 y 1.0 microlitros.

-Materiales y Cristalería:

- Probeta graduada de 100 ml. de plástico o de vidrio
- Embudo de filtrado
- Beaker de 150 ml. plástico o de vidrio
- Papel filtro Whatman No. 1

-Determinación de las muestras:

- Extracción de las muestras:

PASOS:

- 1.Moler la muestra en una licuadora y mezclarla bien
- 2.Pesar 5 gr. de la muestra molida en un recipiente apropiado y agregar 25 ml. de metanol al 70% (*).
- 3.Agitar vigorosamente durante 3 minutos (a mano o con el agitador Vortex)
- 4.Filtrar el extracto a través de un papel filtro Whatman No. 1

- Dilución del extracto:

- 5.Diluir 1 ml del filtrado con 1 ml. de agua destilada
- 6.Utilizar 50 microlitros de la dilución anterior para el análisis.

(*) la cantidad de la muestra puede ser aumentarse siempre y cuando el volumen del solvente (mezcla metanol/agua) se aumente respetando el

factor de dilución dado.

- Procedimiento -Método de ELISA-

PASOS

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de ser utilizados (18-30 grados Centígrados).

2. Abrir el empaque de aluminio y extraer los pocillos a utilizar, junto con el marco.

3. Colocar los pocillos en el marco porta-pocillos para los estándares y para las muestras analizar, marcar la posición de los estándares y de las muestras.

4. Los pocillos no utilizados colocar en la bolsa bien cerrada, junto al desecante.

5. Agregar 50 microlitros de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes.

6. Utilizar una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.

7. Agregar 50 microlitros de conjugado (tapón de color rojo) en los pocillos correspondientes.
8. Agregar 50 microlitros de anticuerpo de anti-aflatoxina (tapón de color negro) en cada pocillo.
9. Mezclar cuidadosamente e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-30 grados Centígrados)
10. Vaciar los pocillos y luego golpear enérgicamente 3 veces consecutivas el marco porta-pocillos sobre un papel absorbente limpio, para asegurar la eliminación completa de restos líquidos.
11. Lavar los pocillos con agua destilada utilizando una pipeta multicanal o una botella de lavado y vaciar nuevamente los pocillos de la forma ya indicada. Repetir este paso dos veces más.
12. Agregar dos gotas o 100 microlitros de sustrato/cromógeno en cada pocillo (gotero blanco).
13. Mezclar cuidadosamente e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (18-30 grados centígrados) en la oscuridad.

14. Agregar dos gotas o 100 microlitros de solución stop en cada pocillo (gotero amarillo)

15. Mezclar bien y medir en el transcurso de la media hora siguiente, la absorción a 450 nm. En el espectrofotómetro.

16. Imprimir las absorbancias de los estándares y las muestras leídas.

- Resultados:

PASOS

1. Abrir el programa r-biopharm para análisis de micotoxinas.
2. Abrir File.
3. Introducir los datos para aflatoxinas.
4. Introducir manualmente las absorbancias de los estándares y muestras.
5. Salvar todos los datos introducidos.
6. Observar los resultados obtenidos de la curva estándar y las muestras.
7. Imprimir los resultados.

5.1.2 Fumonisinias:

Método: Inmunoensayo Enzimático para el análisis cuantitativo de fumonisinias, R-Biopharm, Rindascreen-fast.

La metodología utilizada en la detección de Fumonisinias es muy similar a la descrita anteriormente en la detección de Aflatoxinas salvo dos excepciones por lo que únicamente se enumerarán a continuación:

-En el punto 3.2 que se refiere a la Dilución del extracto se diluye para Fumonisina 1 ml del filtrado con 6 ml. de agua destilada y no 1 ml. de filtrado con 1 ml. de agua destilada que fue descrita en el procedimiento de determinación de Aflatoxinas.

-En el punto 8 de el numeral 3.3 la excepción es que el anticuerpo que se utiliza es lógicamente el de Fumonisina (tapón rojo) y no el de Aflatoxina que se describe en ese numeral. Además en ese mismo numeral pero en el punto 15 la excepción es que la lectura en el espectrofotómetro puede ser durante la siguiente media hora y no en los siguientes 10 minutos como se describía para Aflatoxinas.

5.1.3 Ochratoxinas:

Método: (Inmunoensayo Enzimático para el análisis cuantitativo de ochratoxinas, R-

Biopharm, Ridascreen-fast)

La metodología utilizada en la detección de Ochratoxinas es muy similar a la descrita anteriormente en la detección de Aflatoxinas salvo dos excepciones por lo que únicamente se enumerarán a continuación las excepciones:

- A- En el punto 7 del numeral 3.3 se agregan 50 microlitros de conjugado Ochratoxina A-enzima (tapón rojo) en los pocillos correspondientes y no se toma en cuenta lo que se describe en este punto descrito para la detección de Aflatoxinas.
- B- En el punto 8 del numeral 3.3 se usa anticuerpos de Ochratoxinas A (tapón negro) en cada pocillo.

5.2 METODOLOGIA POR FLUORESCENCIA (VICAM)

5.2.1 Aflatoxinas:

Extracción de la muestra:

- 50 gr. de muestra más 5 gr. de cloruro de sodio más 100 ml de Metanol al 80%, licuarlo por 1 minuto, (si absorbe mucho agregar 100 ml. más de metanol al 80% y el resultado final multiplicarlo por 2).
- Filtrar a través del papel filtro aflautado

Dilución del extracto:

- Tomar 10 ml del filtrado y mezclar con 40 ml de agua destilada.
- Filtrar la mezcla anterior a través de un filtro de fibra de vidrio.

Nota: cuidar que el papel filtro este del lado correcto, (liso abajo y Arrugado arriba).

Cromatografía de afinidad:

- Se coloca la columna en la parte inferior de la jeringa y se pasa 10 ml. de muestra a través de la columna. Colocar bajo la columna un Beacker para descartar.
- Luego que terminó de pasar la muestra, lavar dos veces con agua destilada.
- Quitar la cubeta y agregar 1 ml. de revelador diluído para aflatest al filtrado de la cubeta.
- Antes de leer la muestra leer un blanco el cual consiste en leer una mezcla de 1 ml. de revelador diluido más 1 ml. de metanol HPLC, esta mezcla debe leer "0", si en caso esta muestra no lee "0" se procede a hacer lecturas sólo con el metanol, agua y el revelador, para detectar que reactivo esta dando lectura.
- Leer en el fluorómetro, tener cuidado de limpiar la cubeta con papel cebolla antes de colocarla, medir la fluorescencia en el fluorómetro calibrado y leer la concentración de Aflatoxinas después de 60 segundos.

Calibración del Fluorómetro:

Ampolla roja	22	PPB
Ampolla verde	-1	PPB
Ampolla amarilla	11	PPB

Calibrar el Fluorómetro con estándares de calibración para aflatoxinas para una lectura en 60 segundos.

Preparacion de reactivos:

- Metanol al 80%
80 ml. de metanol grado reactivo
20 ml. de agua destilada.
- Revelador diluído:
1 ml. de revelador original
9 ml. de agua destilada

5.2.2 Fumonisinás:

El proceso de Extracción de la Muestra es el mismo usado en la detección de

Aflatoxina por lo que no se describirá nuevamente.

Dilución del extracto:

- Tomar 10 ml del filtrado y mezclar con 40 ml de PBS/0.1% tween-20 Buffer de lavado.
- Filtrar: El extracto diluido a través de un filtro de papel de microfibra de vidrio de 1.0 Milimicra.

Nota: cuidar que el papel filtro este del lado correcto, (liso abajo y Arrugado arriba).

Cromatografía de afinidad:

- Se coloca la columna en la parte inferior de la jeringa y se pasa 10 ml. de muestra a través de la columna. Colocar bajo la columna un Beacker para descartar.
- Luego que terminó de pasar la muestra, lavar con 10 ml de PBS 0.1% Tween-20 Buffer de lavado.
- Lavar nuevamente con 10 ml. PBS.
- Lavar por tercera vez la columna con agua destilada.
- Colocar la cubeta para hacer la lectura y deje pasar 1 ml. de Metanol HPLC a través de la columna.

- Añadir 1 ml. de mezcla de revelador A y B a la cubeta.
- Siempre antes de leer las muestras debe chequear las lecturas de la mezcla de reveladores y de metanol debe leer "0".
- Colocar la cubeta en el fluorómetro y lea la concentración de Fumonisinás después de 4 minutos con el Fluorómetro previamente.

Calibración del Fluorómetro:

Calibrar el Fluorómetro para leer en 240 segundos (4 minutos).

Ampolla roja	6.0	PPM
Ampolla verde	- 0.5	PPM
Ampolla amarilla	2.9	PPM

Preparación de reactivos:

- Metanol al 80%
 - 80 ml. de Metanol
 - 20 ml. de agua

- Mezcla de Revelador A y B:
20 microlitros de revelador B más 15 ml. de Revelador A (Esta mezcla sólo dura 5 días preparada, mezclar bien)
- Solución de lavado
Mezclar 100 ml. de solución concentrada de PBS 0.1% Tween-20 con 900 ml. de agua destilada (esta solución preparada dura 1 mes).

PARA 5 MUESTRAS:

Mezclar 8 microlitros de revelador B más 6 ml. de Revelador A.

NOTA:

Los microlitros se miden con la pipeta multicanal USA Scientific.

5.2.3 Ochratoxinas:

Los puntos que describen la extracción de la muestra, la preparación de los reactivos y la dilución del extracto son exactamente iguales a los descritos en la detección de Aflatoxinas por el método de VICAM.

Cromatografía de afinidad:

- Se coloca la columna en la parte inferior de la jeringa y se pasa 10 ml. de muestra a través de la columna. Colocar bajo la columna un Beacker para descartar.
- Luego que terminó de pasar la muestra, lavar con solución Buffer para Ochratoxinas (10 ml) y luego con 10 ml. de agua destilada.
- Quitar el beacker de descarte y colocar la cubeta.
- Pasar a través de la columna 1.5 ml de la solución de eluir de Ochratoxinas y recibirlo en la cubeta.
- Antes de leer la muestra leer un blanco el cual consiste en leer la solución de Eluir de Ochratoxinas, la solución debe leer "0".
- Limpiar la cubeta y colocarla en el fluorómetro calibrado, registrando la lectura de la muestra a los 60 segundos.

Calibración del Fluorómetro:

Ampolla roja	36	PPB
Ampolla verde	-3	PPB
Ampolla amarilla	18	PPB

5.3 DISEÑO ESTADISTICO

5.3.1 Tamaño de la muestra:

El tamaño de la muestra para la presente investigación se definió por el método de muestreo no aleatorio por accidente, el cual se basa en muestrear lo que es más conveniente para el investigador, es decir en este método se incluyen las muestras que el investigador crea conveniente para su estudio, y en este caso se escogieron las muestras que llegaron al laboratorio para análisis de micotoxinas durante los meses de Julio, Agosto y Septiembre del 2000 en un número no mayor de 15 muestras y que no se incluyeran muestras o materiales repetidos. Por lo que al final se obtuvieron 15 muestras de las cuales 7 son alimentos terminados (concentrados) y 8 materias primas para la elaboración de alimentos terminados (granos y harinas). A cada muestra se le realizó análisis de Aflatoxinas, Ochratoxinas y Fumonisinias por ambos métodos (ELISA y Fluorescencia) dando un total de 90 análisis de micotoxinas en la investigación.

El costo aproximado de la investigación es de Q 10,800.00 lo cual justifica claramente la imposibilidad de trabajar con una muestra más grande.

5.3.2 Interpretación:

Luego de analizadas las muestras se colocaron los resultados en tablas en las cuales se comparan los resultados obtenidos para cada micotoxina (Fumonisina, Aflatoxina y

Ochratoxina) por cada uno de los métodos (ELISA y Fluorescencia), para observar las diferencias que existen entre los resultados de cada método. Luego se analizaron los resultados obtenidos por medio de una prueba no paramétrica de tablas de contingencia de 2xn (chi cuadrado).

La presente investigación se realizó en el laboratorio de una empresa privada y consistió en tomar 7 muestras de alimentos terminados y 8 muestras de materias primas para elaboración de éstos, y someter cada una de las muestras al análisis de Aflatoxinas, Ochratoxinas y Fumonisinias tanto por el método de Fluorescencia (VICAM) como por el método de ELISA, obteniendo al final de la investigación 90 resultados (Tabla 1).

Los resultados de cada una de las micotoxinas se interpretaron por separado con la finalidad de discutir por aparte lo sucedido con cada una de ellas, en cada uno de los métodos obteniendo lo siguiente:

6.4 Discusión de los resultados de Aflatoxinas (tabla 2):

Se dividieron las muestras en dos grupos, uno que incluía a todas los alimentos terminados y el otro a todas las materias primas por tener diferentes límites máximos para su aceptación.

Al obtenerse los resultados se pudo observar que en ambos grupos el valor dado por chi cuadrado fue de cero (0), lo cual es un indicativo de que los resultados obtenidos en ambos casos no exceden los valores máximos permitidos para su uso en la alimentación animal, por lo que en este caso no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos (VICAM y ELISA), debiéndose entonces rechazar la hipótesis en este caso "específico de Aflatoxinas", en base a lo anterior no existen elementos necesarios para decir que el método de ELISA proporciona resultados más confiables y exactos que el método de VICAM.

6.5 Discusión de los resultados de Ochratoxinas (tabla 3):

Al igual que en el caso anterior se realizó también la división de grupos por la razón ya descrita y los resultados de chi cuadrado obtenida fueron de 7.77 para el caso del grupo de productos terminados y 2.28 para el grupo de las materias primas, y según el procedimiento de chi cuadrado estos resultados deben compararse con los datos que se obtienen en la tabla de valores de chi cuadrado (tabla 6) con niveles de confianza 0.05 , lo cual se realizó y se observó que el resultado de la tabla era de 3.841 por lo que el grupo de productos terminados excede claramente a este número lo cual es un indicativo de que entre ambos métodos de análisis (ELISA y VICAM) existe una diferencia significativa para este caso de Ochratoxinas. Sin embargo al hacer un análisis profundo de esta situación se pudo determinar que los resultados de las muestras 5, 6, 7, 8, 13, 14 y 15 nos dan valores que exceden el límite de Ochratoxinas aceptado para su uso en la alimentación animal por el método de VICAM, mientras que el método de ELISA da cero (0) en estas mismas muestras, por lo que se revisó toda la literatura sobre el tema, determinando que el método de VICAM puede proporcionar resultados falsos positivos por la acción de algunos ingredientes del alimento, como la melaza o cuando se analizan materias primas no aprobados para su uso tales como las harinas de pescado, y en este caso esa fue la razón de la diferencia tan grande entre ambos métodos de análisis por lo que en esta situación se determina que el método de ELISA nos proporciona valores más exactos y confiables que el método de VICAM.

6.3 Discusión de los resultados de Fumonisinias:

Al observar de la misma forma los resultados de chi cuadrado para esta micotoxina en ambos casos fue de cero (0) no observándose mayor diferencia en los análisis por ambos métodos, por lo tanto no existen elementos de peso para poder inclinarse sobre las ventajas de uno u otro método.

VII. CONCLUSIONES

- 1- El método de ELISA nos proporciona datos más confiables y exactos en comparación con el método de VICAM para análisis de micotoxinas tanto en alimentos terminados como en materias primas usadas para la elaboración de alimentos para animales.
- 2- El tiempo total utilizado para la obtención de resultados de niveles de micotoxinas en las muestras es mucho menor por el método de ELISA que el utilizado por la metodología de VICAM.
- 3- La metodología de VICAM es muy propensa a sufrir interferencias por algunos componentes o ingredientes de las muestras a analizar proporcionando valores falsos cuando se utiliza en materiales en los que no ha sido aprobada.
- 4- ELISA da fiabilidad en los resultados que proporciona porque utiliza una curva de estándares puros elaborados a base de la micotoxina que se analiza.
- 5- VICAM proporciona resultados exactos cuando se utiliza en productos que son específicos para esta metodología.
- 6- ELISA proporciona menos costo económico por muestra analizada.

VIII. RECOMENDACIONES

- 1- Utilizar el método de ELISA como metodología rutinaria para análisis de micotoxinas en materias primas y concentrados a nivel de laboratorio.

- 2- Utilizar la metodología de VICAM cuando se desee analizar muestras de materias primas que estén aprobadas para esta metodología.

- 3- Realizar de forma rutinaria análisis de micotoxinas en todas aquellas materias primas que serán utilizadas para la elaboración de alimentos para el consumo animal y así evitar patologías causadas por los hongos y sus micotoxinas cuando son ingeridos dichos alimentos.

- 4- Evitar el almacenamiento prolongado de materias primas, principalmente granos que serán usados como ingredientes para la elaboración de alimentos para animales.

IX. RESUMEN

Se realizó el análisis de tres tipos de micotoxinas (Aflatoxinas, Ochratoxinas y Fumonisinias) en 7 muestras de productos terminados y en 8 de materias primas para la elaboración de alimentos para su uso en animales. El análisis se hizo por dos métodos diferentes para la detección de micotoxinas como lo son ELISA y VICAM, con la finalidad de determinar cual de ellos nos proporciona resultados más exactos y confiables cuando se analizan diferentes tipos de materias primas o productos terminados destinados para la alimentación animal.

Luego de realizar los análisis de las tres micotoxinas por ambos métodos se pudo determinar que para el caso de Aflatoxinas y Fumonisinias no se observó una diferencia significativa para poder concluir que alguna de las dos metodologías nos proporciona resultados más exactos o confiables en los análisis de dichas micotoxinas, ya que al observar los valores de chi cuadrado para ambos casos es cero, por lo que para estos dos casos específicos no se pudo dar por aprobada la hipótesis "El método de ELISA para la detección de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados para animales, proporciona resultados más exactos y confiables que el método de VICAM".

Por otro lado al observar los resultados obtenidos en los análisis de Ochratoxinas por ambos métodos se pudo observar que existe una diferencia significativa entre ambos métodos debido a que el valor de chi cuadrado para alimentos terminados fue de 7.77 y para materias primas de 2.28, y luego de seguir el procedimiento de chi cuadrado se pudo

observar que el resultado de chi cuadrado para los alimentos terminados claramente excede al valor de chi cuadrado para niveles de confianza de 0.05 y es de 3.841 lo cual nos indica de que existe una diferencia significativa entre ambos métodos (ELISA y VICAM), y al hacer un análisis profundo de el porque de la diferencia entre ambos métodos se pudo determinar que se debe principalmente a que las muestras 5, 6, 7, 8, 13, 14 y 15 nos proporcionaron resultados falsos positivos debido a que la literatura de VICAM indica que los resultados pueden ser afectados por algunos ingredientes de los alimentos terminados tales como la melaza o por materias primas como las harinas de pescado, y esto es justo lo que sucedió en estos casos ya que las muestras 5, 6, 7, 8 y 13 poseen en su fórmula la melaza como uno de sus ingredientes mientras que las muestras 14 y 15 son harinas de pescado, por lo que al final si se pudo concluir que para este caso la metodología de ELISA para el análisis de micotoxinas proporciona resultados más exactos y confiables que el método de VICAM.

De acuerdo a los resultados descritos con anterioridad se concluye que la metodología de ELISA además de proporcionar resultados más confiables y exactos cuando se analizan micotoxinas en materias primas y alimentos terminados usados en animales, también proporciona resultados en menor tiempo y a un menor costo que la metodología de VICAM.

Por lo anterior se recomienda que se utilice la metodología de ELISA como un método rutinario para el análisis de micotoxinas, mientras que la metodología de VICAM

se puede utilizar sin ningún problema en aquellas materias primas o productos terminados que están aprobados para ser analizados por este método específico.

X. BIBLIOGRAFIA

1. ANGSUBHAKORN, S. 2000. Mycotoxins an human health risks an overview. China, p. 1-4.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
2. ARAYA CHAVES, B., CASCANTE PRADA, M. 1995. Manejo post-cosecha de productos agrícolas. San José, C. R. UNED. p. 59-65, 123-145, 161-173.
3. BAKR, M.A. 2000. Status of research on detection and control of mycotoxins in food grains in Bangladesh. Bangladesh Agril. Res. Institute. Bangladesh, p. 1-2.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>.
4. BARRERA, M. 1996. Micotoxinas en la producción animal. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Guatemala). 12(1):45-47.
5. CASTELLANOS ECHEVERRIA, A. F. 1982. Aves de corral. 2 ed. México, Trillas. p. 61-72. (Manuales para la educación agropecuaria).
6. CUNHA, T.J. 1960. Alimentación del cerdo. Trad. por Eduardo Zorita Tomillo. Zaragoza, Esp., Acribia. p. 1-14.
7. GENTER, M.B. *et al.* 2000. Effects of mycotoxins on poultry health and productivity. EUA., NC. Cooperative Extensión Service. p. 1-2.
<http://gaston.ces.State.nc.us/Staff/mycopoultry.html>
8. -----, 2000. Effects of mycotoxins on swine health and productivity. EUA., NC. Cooperative Extensión Service. p. 1-2.
<http://gaston.ces.State.nc.us/Staff/mycoswine.html>
9. -----, 2000. Mycotoxins and animal health. EUA., NC. Cooperative Extensión Service. p. 1-2.
<http://gaston.ces.State.nc.us/Staff/mycohealth.html>
- 10.-----, 1998. Mycotoxin sampling, testing, and test kits. EUA., NC. Cooperative Extension Service. p. 1-3.
<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/bot135/lect11.htm>

11. GOYAL, R.K. 2000. Prevention and control of mycotoxins in foodgrains in India. India, Indian Grain Storage Institute. 11 p.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
12. HAGAN, A.T. 1997. Mycotoxin safety. EUA., p. 1-9.
<http://members.tripod.it/RITIENI/mycosafe>.
13. HOCKING, A.D. 2000. Common mycotoxigenic species of fusarium. EUA., 11 p.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
14. JACOBSEN, B.J. et al. 2000. Mycotoxins and mycotoxicoses. Alabama, University Alabama. 40 p.
<http://www.aces.edu/department/grains/ANR767.htm>
15. JARAMILLO, M. 2000. Interacciones micotoxinas-nutrientes. Hallazgos relevantes. Venezuela, Venezuela Avícola. p. 1-2.
<http://www.PPca.com.ve/e29p10.htm>
16. KARUNYABANIJ, S. 2000. Plastic minicolumn for aflatoxin detection. Thailand, University of Thailand. 23 p.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
17. KNIGHT, G.D. 1997. Vitale therapeutic journal. EUA., 38 p.
<http://www.highfibres.com/-galemt/vtejrnt1.htm>
18. KUIPES-GOODMAN, T. 2000. Previniendo la contaminación con micotoxinas. Alimentación, Nutrición y Agricultura No. 231999. Washington, EUA. 13 p.
<http://www.fao.org/es/ESN/fina23-5/FNA23-5.htm>
19. LUXSANAKOSES, S. 2000. Mycotoxicosis in animals. Washington, EUA. 17 p.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
20. MORA BRAUTIGAN, I. 1991. Nutrición animal. San José, C.R., UNED. p. 24-29.
21. NOOMHORM, A., CARDONA T.D. 2000. Drying and chemical treatment of grain to prevent mycotoxin contamination during storage. Washington, EUA. 22 p.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>.

22. PITT, J.L. 2000. An introduction to mycotoxins. Washington, EUA. 4 p.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
- 23.----- . 2000. Toxigenic aspergillus and penicillium species. Washington, EUA. 7 p.
<http://www.fao.org/impho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>.
24. PLOT, A.F. 1978. Alimentación avícola. Buenos Aires, Arg., Albatros. P. 61-72.
25. SIRIACHA, P. 2000. Bright greenish-yellow fluorescence test for aflatoxin estimation. Washington, EUA. p. 1-2.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>.
26. SMALLEY, E.B. 2000. Identification of mycotoxin producing fungi and conditions leading to aflatoxin contamination of stored foodgrains. Washington, EUA. 5 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
27. SUTTAJIT, M. 2000. Prevention and control of micotoxins. Washington, EUA. 8 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>.
28. TANBOON, P. 2000. Control of aflatoxin in maize. Washington, EUA. 7 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
29. TANGTHIRASUNAN, T. 2000. Mycotoxin economic aspect. Washington, EUA. 11 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>
30. TARVER, F. 1999. Mycotoxin toxicity reduced by adsorbent. Broiler Industry (USA). p. 36-40.
31. VARGAS SALVATIERRA, M.M. 1999. Comparación del efecto del inhibidor de hongos líquido y sólido a base de ácido propiónico en maíz almacenado. Tesis Lic. Zoot. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 24 p.
32. WARE, G.M. 2000. Inspection, sampling and analysis of maize and groundnuts for aflatoxin. Washington, EUA. 2 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>.

33. WILSON, D.M. 2000. Aflatoxin analytical methods for groundnuts. Washington, EUA. 5 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>

34. WRIGHT, V.F. 2000. Assessment of insect infestation in stored maize and their relationship to *Aspergillus flavus* contamination. Washington, EUA. 9 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>

35. ----- . 2000. Our history. VICAM. Florida, EUA., 2 p.
<http://www.vicam.com/vicamg2k/history.html>

36. ----- . 2000. Our products. VICAM. Florida, EUA., 15 p.
<http://www.vicam.com/vicamg2k/products.html>

37. ----- . 2000. Overview of analytical methods for mycotoxin contamination in maize and peanuts. Washington, EUA., 10 p.
<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E04.htm>

38. ----- . 2000. The history. VICAM. Florida, EUA., 1 p.
<http://www.vicam.com/vicamg2k/thehistory.html>

XI. ANEXOS

NIVELES DE MICOTOXINAS REGULADOS POR FDA

AFLATOXINA PARA ANIMALES PEQUEÑOS:

**20 PPB en materias primas
5 PPB en producto terminado**

**20 PPB: ANIMALES PEQUEÑOS
HUMANOS
AVES EN CRECIMIENTO
POLLOS DE ENGORDE
AVES REPRODUCTORAS
GANADO INMADURO Y
VACAS LECHERAS**

5 PPB: EN ALIMENTOS TERMINADOS PARA AVES

**100 PPB:GANADO ADULTO
CERDOS DE PRODUCCIÓN Y AVES PONEDORAS**

200 PPB:CERDOS Y GANADO DE CARNE DE FINALIZACION

REGULACION DE AFLATOXINAS SEGÚN CANADA

15 PPB

NIVEL DE ADVERTENCIA PARA AFLATOXINAS EN ALIMENTACIÓN ANIMAL.

REGULACION DE AFLATOXINA SEGÚN LA UNION EUROPEA

10 PPB

NIVEL ACEPTADO PARA AFLATOXINA EN ALIMENTACIÓN DE ANIMALES PEQUEÑOS.

REGULACION DE OCHRATOXINAS SEGÚN LA UNION EUROPEA

4 PPB

NIVEL ACEPTADO PARA OCHRATOXINA EN ALIMENTACIÓN DE ANIMALES PEQUEÑOS.

**REGULACION DE AFLATOXINA
SEGÚN LA MERCOSUR**

20 PPB

Br. Francisco Javier Moscoso Fernández

Dra. MV. Lucero Serrano
ASESORA PRINCIPAL

Licda. Ligia Franco de Alvarado
ASESORA

Dr. MV. José Mariano Carrera
ASESOR

Imprimase: _____
Lic. Rodolfo Chang
DECANO

Br. Katthya Yolanda Morales Ureña

Dr. M.V. Manuel Eduardo Rodríguez Zea
ASESOR PRINCIPAL

Dra. M.V. Mónica Boburg
ASESORA

Dr. MV. Willson Valdez
ASESOR

Imprimase: _____
Lic. Rodolfo Chang
DECANO

