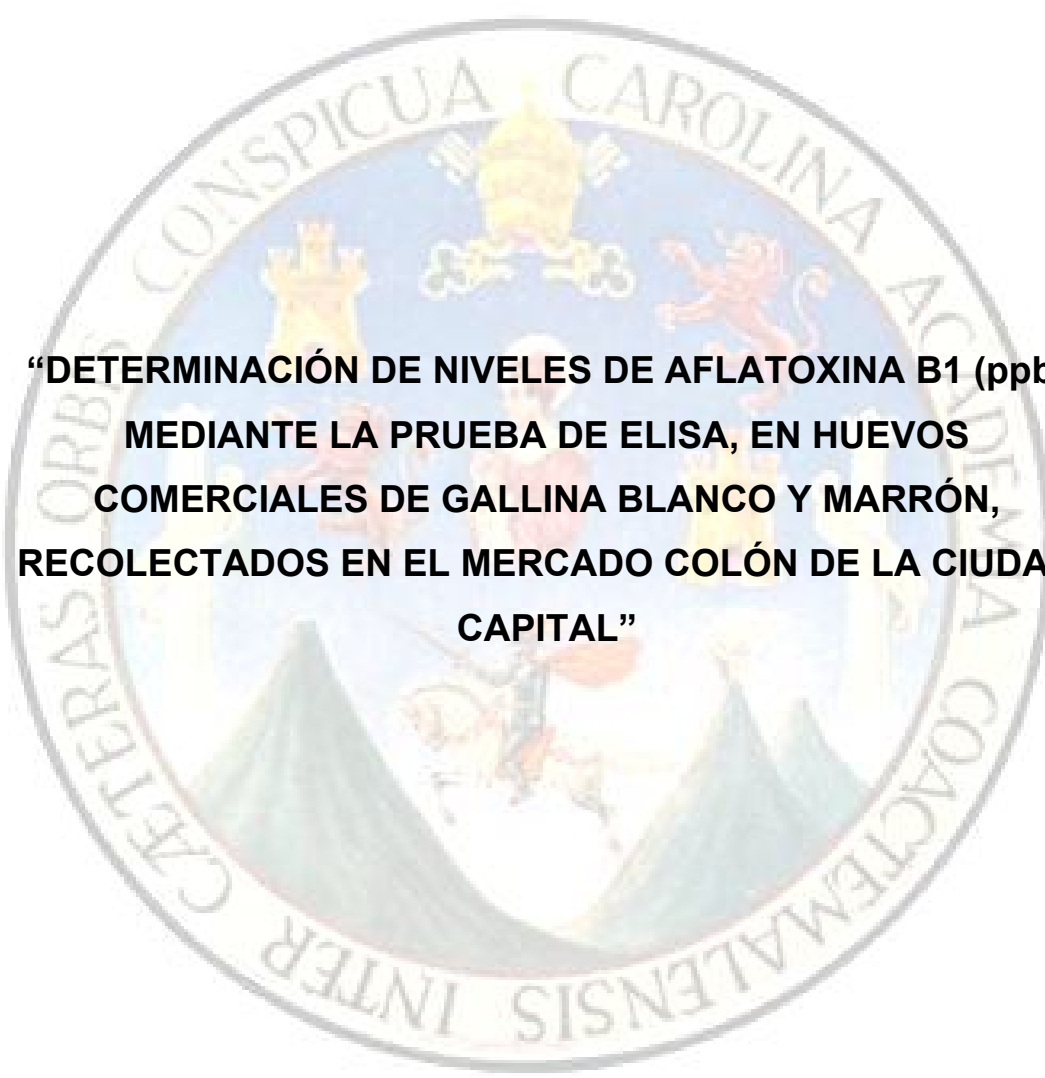


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**“DETERMINACIÓN DE NIVELES DE AFLATOXINA B1 (ppb)  
MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA, EN HUEVOS  
COMERCIALES DE GALLINA BLANCO Y MARRÓN,  
RECOLECTADOS EN EL MERCADO COLÓN DE LA CIUDAD  
CAPITAL”**

**ROBERTO PABLO BÁMACA RÍOS**  
**GUATEMALA, OCTUBRE DE 2009**

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

**“DETERMINACIÓN DE NIVELES DE AFLATOXINA B1 (ppb)  
MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA, EN HUEVOS COMERCIALES  
DE GALLINA BLANCO Y MARRÓN, RECOLECTADOS EN EL  
MERCADO COLÓN DE LA CIUDAD CAPITAL”**

**TESIS**

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**POR**

**ROBERTO PABLO BÁMACA RÍOS**

**AL COFERIRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MÉDICO VETERINARIO**

**GUATEMALA, OCTUBRE DE 2009**

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

<b>DECANO:</b>	Med. Vet. Leonidas Ávila Palma
<b>SECRETARIO:</b>	Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina
<b>VOCAL I:</b>	Med. Vet. Yeri Edgardo Véliz Porras
<b>VOCAL II:</b>	MSc. MV Fredy Rolando González Guerrero
<b>VOCAL III:</b>	Med Vet. Y Zoot. Mario Antonio Motta González
<b>VOCAL IV:</b>	Br. Set Leví Samayoa López
<b>VOCAL V:</b>	Br. Luís Alberto Villeda Lanuza

**ASESORES:**

M.Sc. MV. Consuelo Beatriz Santizo Cifuentes  
M.S.P. MV. Jaime Rolando Méndez Sosa  
M.Sc. MV. Lucrecia Motta Rodriguez

**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 TRABAJO  
TITULADO

**“DETERMINACIÓN DE NIVELES DE AFLATOXINA B1 (ppb)  
MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA, EN HUEVOS COMERCIALES  
DE GALLINA BLANCO Y MARRÓN, RECOLECTADOS EN EL  
MERCADO COLÓN DE LA CIUDAD CAPITAL”**

QUE FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

PREVIO A OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE

**MÉDICO VETERINARIO**

## **ACTO QUE DEDICO A**

- **JESUCRISTO, el único Mesías. EMANUEL, mi Dios, amigo, salvador personal y de la humanidad. Éste título es tuyo, no mío.**
- Lic. David Roberto Bámaca Morales, por ser mi padre, mi familia, amigo, tutor, mentor, consejero, ayuda y respaldo (Cristo te ama; si lo dudaste alguna vez.... te dije que lo iba a lograr).
- María Argentina Ríos López de Bámaca, por ser mi madre, mi guía, por que me presentaste a Jesús, y me apoyaste en mi trayectoria musical.
- Dr. David Javier Bámaca Ríos, por ayudarme, tenerme paciencia y explicarme tantas lecciones de ciencia. No se me olvida que me preparaste y enseñaste tantas cosas de ajedrez. Ahora ya no nos desvelamos juntos jugándolo, pero nos develamos separados recordándonos de ello, y aplicando las defensas: siciliana, india de rey, inglesa y francesa, enfrentándonos a la vida.
- Al amor de mi vida Urmelia Rita Irene Castillo Aguilar (gracias por tu amor y apoyo) y muy apreciable familia: Don Napoleón Castillo, Doña Ofelia Aguilar, Narda y Diana Castillo.
- Róchale Alejandro Camargo Prado, amigo, maestro de canto, guitarra y hermano.
- A mi segunda familia de ANAVI: Licda. Peggy Contreras, Dr. Edgar Bailey, Dr. Manuel Hoffman, Cristóbal López, Juventino Alvarado, Camelia Mendoza, Marta Morales, Wendy Ayala y muy especialmente Doña Carmen Guillén.

- Mis tutores que me han acogido como alumno y amigo: Dra. Beatriz Santizo, Dr. Yeri Véliz, Dr. Jaime Méndez, Dra. Lucrecia Motta, Dr. Max Chang.
- Grupo Daze: Jorge de León, Pablo Fuentes, Javier Martinez y Ted Portillo; por que hicimos las mejores canciones que el Rock ha conocido, y por los innumerables conciertos, vivencias y éxitos en la radio.
- Mis amigos de la colonia “Villas del Rosario”: Dr. Luis Alejandro de León, Luis Colindres, Renato Colindres, Max Rosemberg, Edder Juarez, Daniel Juarez, Mario Hernandez, Lester, Yuri, Ramón, Pablo y David (que travesuras las que hacíamos). Amigos y amigas de las manzanas A, B, C, y G.
- Mis amigos inseparables que compartieron conmigo en la “U” y no me dejaron tirar la toalla en los momentos más difíciles: Eduardo Tobar, Edgar Bailey, Romeo Grajeda, Lic. Juan Carlos Jerónimo, Cecilia Marcos, Ana Albizuris, Erica Pérez, Luis Fernando Sapón, Cristóbal Chamalé, Héctor Heredia, Dr. Manuel Lepe, Dr. Leonidas Gómez, Rudy Hernández, Dr. Samuel Mérida, Gabriela Otzoy, Walda Pineda, Gabriela Ayala, Nadeshda Bustamante (Q.E.P.D.).
- Mis amigos muy especiales: Juan José Chávez, Raúl Díaz, Dra. Vivian López, Jeannette Mena, Dra. Idania García, Candy Reyes de Jonson, Griselda Herrera, Ramón Arguello, Julio Castillo.
- A mis cuates del colegio: Jorge Paz, Edner Rosales, Cristian Galicia, Gerardo Alvarado, Pablo Liu, Carlos Aguirre.
- Mi mascota Nieves Lenchipoch, por aceptarme tal y como soy.

## **AGRADECIMIENTOS**

- JESUCRISTO, DIOS PADRE Y DIOS ESPÍRITU.
- A mi familia materna y paterna.
- ASOCIACIÓN NACIONAL DE AVICULTORES.
- Hospital Veterinario Ávila: Dr. Edie Ávila, Dr. Roberto Mérida, y personal en general (gracias por su paciencia Dr. Ávila, sus enseñanzas, sus consejos, por compartir su experiencia conmigo).
- MAGA-UNR-Protección Agropecuaria: Ing. Carlos Argueta, Dr. José Moreno, Lic. David Girón, Ing. Eduardo Taracena, y Héctor García.
- MAGA-UNR: Dr. Aksel Bonilla, Dr. David Orellana, Dr. Nery Sandoval y Dra. Sandra Gomar.
- Personal de OIRSA (COMBEX): Principalmente Dr. Edgar Hernández, Ing. Julio Cabrera e Ing. Javier Ortiz.
- Delicarnes S.A.: Dr. Alfredo Gálvez, Marvin, Guili y Chepe.
- Comunidad “San José El Asintal” (especialmente a Don Luis Martínez y Don Jonatan Chan), gracias por que han compartido todas sus vivencias conmigo, y hemos cosechado una gran amistad que perdurará por años, ustedes me han enseñado que no hay que decaer ante las circunstancias, simplemente hay que ser feliz y abrirse paso en la vida.
- Pastores: Sergio Enríquez y Cash Luna, por enseñarme como llevar mi amistad con Dios.

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS	
3.1 General	4
3.2 Específicos	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Generalidades del huevo	
4.1.1 Partes del huevo no embrionado	5
4.1.1.1 La cáscara	5
4.1.1.2 La clara o albúmen	6
4.1.1.3 La yema	6
4.2 Micotoxicosis	7
4.2.1 Origen	7
4.2.2 Factores en la producción de micotoxinas	7
4.2.3 Trinomio Causa-Efecto-Respuesta de las Micotoxinas. (Efectos Individuales y combinados)	7
4.2.4 Signos de micotoxicosis	10
4.2.5 Aflatoxicosis	10
4.2.6 Producción de aflatoxina	11
4.2.7 Metabolismo y residuos.	11
4.2.8 Signos clínicos de la aflatoxicosis	12
4.2.9 Aflatoxina B1	13
4.2.9.1 Principales interacciones de la aflatoxina B1	14
4.2.9.2 Patogénesis y lesiones de la aflatoxicosis B1 en aves, y alteraciones en el huevo	14
4.2.9.3 Epidemiología moderna	16

4.2.9.4 El papel actual de la aflatoxina B1 en el hígado humano	17
4.2.9.5 Diagnóstico de aflatoxicosis B1 en aves	18
4.2.10 Diagnósticos de micotoxinas en alimentos	18
4.2.10.1 Análisis de micotoxinas: Métodos, validaciones y controles de calidad	19
4.2.10.1.1 Métodos de screening	20
4.2.10.1.2 Métodos oficiales	21
4.2.10.1.3 Métodos de investigación	22
4.2.10.2 Algunos de los métodos más utilizados para el análisis de micotoxinas	
4.2.10.2.1 Cromatografía líquida	23
4.2.10.2.2 Espectrometría de masa	24
4.2.10.2.3 Ensayos inmunoenzimáticos	26
4.2.10.2.3.1 Fundamento de la prueba de ELISA	28
4.2.10.2.3.2 Metodología general	28
4.2.10.2.3.3 Fijación del Antígeno a la fase sólida	29
4.2.10.2.3.4 Reacción con anticuerpo	29
4.2.10.2.3.5 Adición del conjugado enzimático: (haptenos marcados, Ac)	30
4.2.10.2.3.6 Adición del sustrato	
4.2.11 Tratamiento de micotoxicosis en general	30
4.2.12 Prevención y control de micotoxinas	31
4.2.12.1 Estrategias para prevenir la contaminación por micotoxinas	32
4.2.12.2 Estrategias posteriores a la cosecha en nuestro medio	32

4.2.12.3 Almacenamiento adecuado de los ingredientes	33
4.2.12.4 El peletizado del alimento	33
4.2.12.5 Adsorbentes	34
4.2.13 Efecto de las micotoxinas en la economía	34
4.2.13.1 Normativa regulatoria de las micotoxinas en los piensos y alimentos.	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Recursos humanos	36
5.2 Recursos institucionales y comerciales	36
5.3 Materiales y equipo	36
5.4 Metodología	37
5.4.1 Lugar, selección y procesamiento de muestras	37
5.4.2 Procesamiento de la muestra	38
5.4.3 Procedimiento del test de ELISA	38
5.4.4 Lectura de la muestra	39
5.4.5 Interpretación de resultados	39
5.4.6 Análisis estadístico	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
A. Discusión	44
VII. CONCLUSIONES	45
VIII. RECOMENDACIONES	46
IX. RESUMEN	47
X. BIBLIOGRAFÍA	48
XI. ANEXOS	54

## I. INTRODUCCIÓN

La avicultura es una actividad de gran importancia mundial, sin duda alguna la demanda de sus productos está ligada a la dependencia cultural de los consumidores, y precios accesibles del producto final; es por esto que los programas de sanidad avícola forman una parte importante de la salud pública. En el caso particular de Guatemala la avicultura supera los tres mil millones de quetzales en inversión, con un crecimiento anual de cien millones de quetzales <sup>(26)</sup>.

La temática de las micotoxinas es trascendente, ya que éstas se encuentran a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la germinación de las semillas hasta el producto terminado, y pueden ser transmitidas por vía vertical hacia el huevo <sup>(1)</sup>, el cual es uno de los alimentos cotidiano por su bajo costo y alto contenido en proteína. En Guatemala el consumo per capita es de 144 huevos al año <sup>(20)</sup>, y este factor nos podría ayudar a relacionar la prevalencia media de las micotoxinas por el alto consumo del huevo y sobre todo su expendio en los mercados cantonales.

Para el humano una de las micotoxinas más patógenas es la aflatoxina B1, la cual provoca carcinoma hepatocelular y mutaciones <sup>(6)</sup>, y es por esto que surge la necesidad de conocer si los niveles de ésta, se encuentran dentro de los márgenes establecidos en huevos del mercado local. Es importante mencionar que el carcinoma hepatocelular es muy agresivo y aún no existe un tratamiento totalmente eficaz, y su incidencia es alta en países en vías de desarrollo, la cual puede ser disminuida con el consumo de alimentos con niveles aceptables de aflatoxina B1 <sup>(9)</sup>.

Para prevenir la enfermedad actualmente se utilizan: el peletizado, combinaciones de agentes antimicóticos, y micotoxinas antagonistas, sin embargo los adsorbentes han sido la alternativa más efectiva <sup>(5)</sup>. El diagnóstico en aves se ha orientado a través de lesiones a la necropsia, estadística, y variaciones en hojas de registros <sup>(6)</sup>.

El presente estudio generará información de los niveles de aflatoxina B1 en huevos del mercado Colón (ubicado en la zona 1 de la ciudad capital de Guatemala), por medio de la técnica de ELISA, la cual ha sido adaptada en otros países con buenos resultados frente a métodos como cromatografía líquida y espectrometría de masa <sup>(6)</sup>, para resaltar la importancia de la aflatoxicosis en la salud pública de Guatemala.

## **II. HIPÓTESIS**

- Los valores obtenidos para aflatoxina B1 en los huevos muestreados, son mayores al parámetro establecido por la FDA (Food and Drug Administration), al ser analizados por la técnica de ELISA.

### **III. OBJETIVOS**

#### *3.1 Objetivo general:*

- Generar información sobre la detección de aflatoxina B1 en huevo de consumo humano de Guatemala, mediante la prueba de ELISA.

#### *3.2 Objetivos específicos:*

- Registrar los resultados obtenidos (ppb), de la lectura óptica realizada por espectrofotometría (para la prueba de ELISA), en una muestra de huevos destinados al consumo humano, recolectados en el mercado Colón de la ciudad capital.
- Determinar si los niveles de aflatoxina B1 obtenidos por la prueba de ELISA, se encuentran dentro de los parámetros permitidos por la FDA (Food and Drug Administration) en huevos recolectados en el mercado Colón de la ciudad capital.
- Determinar si existe diferencia estadística entre los niveles obtenidos (ppb), para los huevos con cáscara blanca y marrón.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Generalidades del huevo

El huevo es uno de los alimentos más importantes en la alimentación mundial, debido a su bajo costo ya que se puede consumir en todas las edades, además es un alimento con cantidades altas de proteínas fáciles de digerir y de alto valor biológico. Una gallina pone un huevo cada 25 horas aproximadamente, el óvulo, que es la yema, se desprende del ovario y en su caminar al exterior a través del oviducto va rodeándose de envolturas (clara y cáscara) especialmente diseñadas para su protección <sup>(13)</sup>.

Un huevo de 60 grs. está compuesto aproximadamente de la siguiente manera: Agua (45.1 grs.), proteínas (7.6 grs. ó 13%), carbohidratos (0.4 grs.), lípidos (7.2 grs. ó 12%), ácidos saturados (2 grs.), ácidos monoinsaturados (2.9 grs.), ácidos poliinsaturados (1.1 grs.), colesterol (246 mg.), calcio (33.7 mg.), magnesio (7.2 mg.), hierro (1.3 mg), zinc (1.2 mg), ácido fólico (30.7 µg.), vitamina B12 (1.2 µg.), vitamina A (136 µg.), vitamina D3 (1.1 µg.), y vitamina E (1.2 µg.) <sup>(13)</sup>.

#### 4.1.1 Partes del huevo no embrionado:

##### 4.1.1.1 La cáscara.

La cáscara constituye el 10% de su peso, y tiene poros que permiten el intercambio gaseoso, es permeable al agua y su color depende de la estirpe de la gallina, la cáscara marrón es más resistente sin que haya diferencias de calidad nutricional entre ambos <sup>(27)</sup>.

La cáscara contiene las membranas testáceas, que son estructuras proteicas que rodean la clara y en un extremo forman la cámara de aire, cuanto mayor sea ésta más viejo es el huevo. Está constituida en su mayor parte por una matriz cálcica con un entramado en cuya composición están presentes pequeñas

cantidades de proteínas y mucopolisacáridos que rodean a un componente mineral en el que el calcio es el elemento más abundante y de mayor importancia (27).

En dicha matriz se encuentran concentraciones menores de sodio, magnesio, zinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro. El color de la cáscara depende de la concentración de unos pigmentos denominados porfirinas depositados en la matriz cálcica, además de la edad de la gallina (mientras más vieja sea, será más claro el huevo) (27).

#### **4.1.1.2 La clara o albúmen.**

La clara representa el 30% del peso del huevo y está formada sobre todo por proteínas (entre un 12 y 13%), la ovoalbúmina es la más abundante y es considerada como la proteína patrón por su correcta proporción de aminoácidos esenciales, además de la avidina que es una proteína sensible al calor<sup>(10)</sup>. Sujetando la yema para que quede centrada se encuentran unos engrosamientos del albumen denominados chalazas, con forma de filamentos enrollados, que van desde la yema hasta los dos polos opuestos del huevo <sup>(15)</sup>. Está compuesta básicamente por agua (88%). En la clara se encuentran algo más de la mitad de las proteínas del huevo y ningún lípido. Las vitaminas B12 y niacina están en mayor cantidad en la clara que en la yema (27).

#### **4.1.1.3 La yema.**

Su contenido de agua alcanza sólo el 50% de su peso. Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña de vitaminas liposolubles, minerales y carotenos. Las vitaminas y los carotenos (pigmentos obtenidos por la alimentación) forman parte del 1% de los lípidos de la yema, en la que se concentra la mayor parte de biotina, ácido pantoténico y vitaminas B1 y B6 (27).

Es rica en lípidos predominando los ácidos grasos saturados y el colesterol (unos 250-360 mg por unidad de 50-60 g), tiene también proteínas, fósforo y hierro <sup>(13)</sup>.

## **4.2 Micotoxicosis**

### **4.2.1 Origen.**

Es una intoxicación originada por el consumo de un metabolito micótico tóxico <sup>(4)</sup>. Éstos metabolitos (llamados también micotoxinas) son químicos complejos y tóxicos para los animales y el hombre, resultantes del metabolismo secundario de hongos, eliminados a sustancias circundantes <sup>(1)</sup>.

Para la producción de micotoxinas en grano se requiere crecimiento fungal, pero ese crecimiento puede o no producir daños visibles. La prevalencia de la enfermedad es constante ya que los hongos pueden infectar y crecer en el grano antes de cosecharse, durante el almacenamiento o después de su inclusión en alimentos finalizados <sup>(15)</sup>.

### **4.2.2 Factores en la producción de micotoxinas.**

Existen miles de micotoxinas químicamente distintas. La cepa del hongo, su temperatura, humedad, sustrato del grano y grado de estrés en la planta huésped determinan las toxinas producidas y sus cantidades. A menudo las cepas fungales individuales sintetizan más de una micotoxina, las cuales actúan de manera sinérgica. Por tanto, las micotoxicosis que se presentan de modo natural pueden ocurrir con sólo un décimo de las cantidades requeridas para producir intoxicaciones en el laboratorio con sustancias químicas individuales puras <sup>(15)</sup>.

### **4.2.3 Trinomio Causa-Efecto-Respuesta de las micotoxinas. (Efectos individuales y combinados)**

El trinomio causa-efecto-respuesta en una manera integral puede definirse como la acción de un agente causal sobre los sistemas biológicos que da lugar a

un efecto que se expresa a través de una respuesta ó manifestaciones visibles y/ó medibles. La aplicación del principio causa-efecto-respuesta a la micotoxicosis en la avicultura está dado por: la presencia del agente causal representado por una o varias micotoxinas, la generación de los efectos causados por ésta ó éstas en órganos y tejidos de los distintos sistemas biológicos y por las manifestaciones exhibidas por las aves a consecuencia de dichos efectos <sup>(14)</sup>.

- **Efectos Individuales:** Los estudios de los efectos individuales de las micotoxinas se han realizado sobre la base de entender sus distintos mecanismos de acción, efectos ocasionados y la ó las respuestas posibles a esperar. La mayoría de los estudios con micotoxinas en aves han sido enfocados sobre la base de los efectos ocasionados por cada una de las micotoxinas de particular interés en avicultura y dentro de las cuales los mayores esfuerzos de investigación se han hecho con aflatoxina. Cabe destacar que un solo mecanismo de acción puede dar lugar a varios efectos y a su vez éstos pueden expresarse a través de distintas manifestaciones siendo las aflatoxinas un ejemplo tangible de ello en las aves <sup>(14)</sup>.
- **Efectos Combinados:** En la naturaleza la presencia de hongos y micotoxinas como contaminantes naturales de insumos vegetales se da en una forma asociada y en este sentido los efectos esperados debido a la presencia de dos o más micotoxinas se producen bajo los principios de interacción conocidos como aditividad, sinergismo y antagonismo <sup>(14)</sup>.
  - **Aditividad:** La aditividad entre micotoxinas se define como el efecto combinado resultante de la acción de dos ó más micotoxinas en los organismos el cual es igual a la suma del efecto individual de cada micotoxina. Se ha visto un efecto aditivo entre aflatoxina y deoxinivalenol en pollos de engorde, teniendo su efecto en: pesos encontrados para proventrículo, glucosa en sangre y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa. Además se describe interacción aditiva en pollos que recibieron aflatoxina y ácido ciclopiazónico en

forma combinada en la dieta. Dicho efecto se hace manifiesto en peso vivo a la primera semana de vida y en albúmina sanguínea <sup>(14)</sup>.

- **Sinergismo:** El sinergismo entre micotoxinas es definido como el efecto combinado resultante de la acción de dos ó más micotoxinas en los organismos el cual es superior a la suma del efecto individual de cada micotoxina, teniendo como resultado final una condición única en los animales afectados. Un ejemplo de sinergismo entre micotoxinas en pollos de engorde ha sido observado por la combinación de aflatoxina y ochratoxina A, al igual que la aflatoxina y la toxina T-2. El efecto sinérgico de aflatoxina y ochratoxina A se expresa a través de una disminución del peso vivo y un incremento de la mortalidad. La administración simultánea de ambas micotoxinas ocasiona un efecto diferente a aquel observado por la presencia individual de cada una de ellas. Así, sus impactos biológicos individuales se manifiestan principalmente en hígado (aflatoxina) y riñones (ochratoxinas) y sin embargo su administración simultánea causa un proceso de nefropatía como efecto primario de interacción, y deposición de grasa en el hígado como efecto secundario. Por otra parte, la combinación aflatoxina y T-2 muestra un efecto sinérgico, manifestado a través de una disminución del peso corporal, incremento de los pesos relativos de riñón, molleja y corazón y disminución del volumen corpuscular medio y de los niveles de potasio sanguíneo <sup>(14)</sup>.
- **Antagonismo:** La interacción antagónica entre micotoxinas se define como el efecto combinado resultante de la acción de dos ó más micotoxinas el cual es inferior a la suma del efecto individual de cada micotoxina. Puede señalarse en términos generales que micotoxinas interfieren entre sí en sus acciones ó una interfiere con la otra por acción química <sup>(14)</sup>.

#### 4.2.4 Signos de micotoxicosis.

Las aves jóvenes son más sensibles a la aflatoxina que las adultas. Asimismo, existen grandes diferencias entre especies, pues los patos son 10 veces más sensibles que los pollos, y los pavos están en un lugar intermedio entre los dos. La aflatoxicosis, ochratoxicosis, y micotoxicosis por tricocenteno son las micotoxicosis más frecuentes en la avicultura comercial a nivel mundial <sup>(15)</sup>.

Las micotoxinas tienen afinidad por diferentes tejidos provocando muchos signos, sin embargo las principales manifestaciones se observan en la ganancia de peso, eficiencia alimentaría, pigmentación, producción de huevo, y rendimiento reproductivo <sup>(4)</sup>.

#### 4.2.5 Aflatoxicosis.

La aflatoxina es la micotoxina con mayor importancia económica y prevalencia que puede ser consumida por las aves. Se encuentra en el maíz, los cacahuates, la semilla de algodón, el mijo, el sorgo y otros granos alimenticios <sup>(15)</sup>.

Son muy tóxicas y carcinógenas, son producidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, y *Penicillium puberulum*, son sensibles a los agentes oxidantes como el hipoclorito (blanqueador comercial) <sup>(4)</sup>.

Las aflatoxinas fueron descubiertas en el Reino Unido en 1960 a partir de un lote de harina de cacao contaminada por el hongo *Aspergillus flavus* tras haber causado la muerte de centenares de aves (patos) que utilizaron esta harina como pienso. Existen cuatro tipos de aflatoxina: B1, B2, G1 y G2, nombres que derivan de la fluorescencia azul (“blue”, azul en inglés) o verde (“green” en inglés) observadas cuando estas toxinas son expuestas a la radiación ultravioleta. Químicamente las aflatoxinas hacen parte de una clase de compuestos denominados cumarinas y las cuatro toxinas tienen estructuras bastante semejantes <sup>(22)</sup>.

#### 4.2.6 Producción de aflatoxina.

*A. flavus* y *A. parasiticus* son ubicuos en el ambiente, contienen cepas toxigénicas y no toxigénicas y producen aflatoxina en condiciones cálidas (30-35 °C, incluso 27°C), con elevada humedad (0.90 a 0.99 de actividad de agua, sin embargo se ha reportado producción con un 7% de humedad). Por tanto, es más probable que se presente contaminación por aflatoxinas en granos en crecimiento o manejados en los trópicos y sub trópicos. El manejo o almacenamiento de granos en estas condiciones también puede estimular la producción. Por otro lado, el estrés de las plantas debido a insectos, las sequías, la nutrición deficiente o el retraso en la cosecha aumenta la producción de aflatoxina <sup>(15)</sup>.

La aflatoxina que se presenta naturalmente contiene las aflatoxinas B1, B2, G1, y G2, aunque la B1 es la que generalmente se encuentra en concentraciones más elevadas y la más tóxica. La aflatoxina es estable una vez que se ha formado el grano, y no se degrada durante la molienda normal y el almacenamiento <sup>(15)</sup>.

#### 4.2.7 Metabolismo y residuos.

Dietas contaminadas con aflatoxinas constituyen una fuente de esta toxina para los humanos. En aves, los metabolitos de las aflatoxinas B1 y B2 alcanzan sus máximas concentraciones en la molleja, hígado, riñones, pero se eliminan de los mismos en cuatro días, sin embargo tiene un efecto acumulativo en los órganos reproductores transfiriéndose así hacia los huevos (tanto en la yema como en la albúmina) y la progenie incubada (el saco vitelino y el hígado) en pollos, pavos y patos <sup>(4)</sup>.

Últimas investigaciones indican que el riesgo de traspaso de Aflatoxinas al contenido del huevo, es latente cuando las aves consumen dicha micotoxina durante 10 días. Muchos de los datos concuerdan que la proporción del consumo de Aflatoxina B1 y su traspaso al huevo es de 500 a 1 ppb en gallinas ponedoras (pudiendo variar según estirpe). Se piensa que la distribución de dicha Aflatoxina, es mayor en órganos corporales que en el huevo, sin embargo por ser un órgano

de alta regeneración, es probable que la deposición de la micotoxina sea más elevada en el aparato reproductor de la gallina, y es probable que ésta sea una razón, por la cual la micotoxina aparece con más frecuencia, junto con la Ocratoxina A y Toxina T2. El traspaso de Aflatoxina B1 al huevo, es mayor si la gallina consume pequeñas cantidades durante un período largo de tiempo, y no una alta dosis en un corto tiempo <sup>(23)</sup>.

Dentro del huevo, la Aflatoxina B1 permanece particularmente estable inclusive durante la cocción o bien 20 minutos en agua hirviendo; en pocas palabras el proceso térmico no es suficiente para la detoxificación del huevo, refiriéndonos en particular a ésta micotoxina. Sin embargo otros residuos de Aflatoxina B1 como la Aflatoxina B2-alfa, Aflatoxicol, y Aflatoxina M1 se mantienen estables dentro del huevo desde las 8 horas post-ovulación hasta 14 horas post-oviposición. La concentración de la aflatoxina B1 en la clara del huevo tiende a disminuir a las 48 horas mientras que en la yema y el cascarón tiende a incrementarse <sup>(27)</sup>. Por ésta razón, se considera un almacenamiento aceptable de la Aflatoxina B1 a -4° C, sin embargo no así el almacenamiento de muestras que son para analizar residuos de Aflatoxina B1, o bien analizar directamente otras Aflatoxinas (requerirían un almacenamiento de -20° C) <sup>(10)</sup>.

#### **4.2.8 Signos clínicos de la aflatoxicosis.**

En animales se observa signología por ingestión de alimentos que tienen niveles encima de 50 ppb <sup>(8)</sup>, la hepatotoxicidad es el efecto primario en todos los animales <sup>(6)</sup>. Por lo general, la aflatoxicosis no induce mortalidad de manera directa aunque las concentraciones altas (> 10 ppm) pueden ser mortales <sup>(1)</sup>. Los signos más comunes son: depresión, anorexia, pérdida de peso, afección gastrointestinal, hemorragias, lesiones hepáticas (higado graso, necrosis y apoptosis), y edema pulmonar <sup>(7)</sup>.

Los efectos económicos más importantes de aflatoxicosis en aves en crecimiento son la disminución en el crecimiento y reducción del índice de conversión de alimentos (> 1 ppm). También se produce una marcada reducción

en la resistencia a infecciones (ya que las aflatoxinas causan atrofia de la bolsa de Fabricio, el timo y el bazo <sup>(6)</sup>), siendo el ave más susceptible a salmonelosis, coccidiosis, enfermedad infecciosa de la bolsa y candidiasis, que resultan en un aumento en los decomisos durante el procesamiento ( $> 0.5$  ppm) <sup>(7)</sup>. La aflatoxicosis en las aves también puede ocasionar alteraciones en la pigmentación normal (por inhibición del transporte y el depósito del pigmento en varios puntos metabólicos <sup>(6)</sup>) y aumento en magulladoras ( $> 0.5$  ppm). En las gallinas adultas intoxicadas disminuye la producción de huevo (ya que reduce la síntesis y transporte de los precursores de la yema en el hígado <sup>(6)</sup>), así como su incubabilidad ( $> 2$  ppm) <sup>(15)</sup>.

En los machos reproductores adultos, se reduce el peso testicular y las cuentas espermáticas. Además, disminuye la fertilidad de la inseminación de gallinas con semen de machos afectados, según informan algunos estudios, aunque según otros, no hay reducciones importantes <sup>(15)</sup>.

Incluye además el aumento de la mortalidad debido a estrés por calor (reproductoras de engorda); pérdida de la producción de huevo (Leghorns); anemia, decomiso de hígados, parálisis, claudicación y signos nerviosos <sup>(15)</sup>.

La aflatoxicosis puede influir en la efectividad de los fármacos en las aves, por la alteración de la vida media plasmática; por ejemplo, en aves, las concentraciones plasmáticas de clortetraciclina son más bajas al disminuir la fijación del medicamento a las proteínas plasmáticas <sup>(4)</sup>.

La aflatoxina es carcinogénica, hepatotóxica, teratogénica, mutagénica e inmunotóxica, afectando principalmente monogástricos <sup>(4)</sup>.

#### **4.2.9 Aflatoxina B1**

Fuente: *Aspegillus flavus* principalmente.

Sinónimos: 2,3,6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -tetrahydro-4-methoxycyclopenta[c]furo[2',3':4,5]furo[2,3 - h]chromene-1,11-dione.

Descripción: es una micotoxina hepatotóxica y hepatocarcinogénica, tiene propiedades mutagénicas, teratogénicas y causa severas inmunosupresiones en animales.

Información de solubilidad: Puede ser soluble en DCM, DMSO, o metanol <sup>(10)</sup>.

La aflatoxina B1 es la más importante de las aflatoxinas, además de ser la más tóxica y de ser consumida en mayores cantidades que las demás. Sus efectos varían respecto a la especie, los efectos dependen de la dosis consumida, metabolismo del animal y tiempo de exposición <sup>(28)</sup>.

#### **4.2.9.1 Principales interacciones de la aflatoxina B1.**

Posee interacción de sinergismo principalmente con ocratoxina A, y micotoxina T-2, su relación de adición se da con deoxinivalenol, ACP, DAS, y moniliformina, con la DAS puede tener un efecto menor que aditivo y de antagonismo <sup>(26)</sup>.

#### **4.2.9.2 Patogénesis y lesiones de la aflatoxicosis B1 en aves, y alteraciones en el huevo.**

Después de la ingestión, la aflatoxina B1 sufre la biotransformación a numerosos metabolitos altamente reactivos con diversos efectos negativos en el metabolismo. Los metabolitos se fijan al DNA y RNA, reducen la síntesis de proteínas, disminuyen la inmunidad celular y en menor grado la humoral. Estas alteraciones metabólicas conducen al agrandamiento de hígado, riñones, y bazo, así como disminución de la bolsa de Fabricio, del timo y de los testículos. Con una exposición aguda a dosis elevadas se acumula la grasa en forma de vacuolas claras en el citoplasma de los hepatocitos de manera que depende del tiempo y la dosis; los resultados son hígados amarillos, friables y evidentemente agrandados. Con una exposición continua se presenta hiperplasia epitelial biliar intrahepática y hematopoyesis extramedular, esta última en respuesta a una anemia inducida por

toxina. Aumentan las hemorragias petequiales o las magulladuras posteriores a traumas, debido a que disminuye la síntesis del factor de coagulación y hay mayor fragilidad capilar. Por último, algunas cantidades considerables de aflatoxina se excretan rápidamente por la bilis y la orina <sup>(15)</sup>.

El mecanismo principalmente descrito es la fijación al DNA tanto nuclear como mitocondrial y es un modelo hepatocarcinógeno para mecanismos de inicio de tumoración en el hígado. La aflatoxicosis crónica origina neoplasias en muchas especies, por lo general en hígado, en vesícula biliar, páncreas, aparato urinario y hueso <sup>(4)</sup>.

La aflatoxina B1 interfiere en el metabolismo de los lípidos, influyendo así en la deposición de sustancias pigmentarias en la yema. Además produce caída en la postura, con mayor susceptibilidad (por parte del huevo) a contaminarse con salmonela, coccidias, y candidiasis, además de afectar seriamente la calidad del huevo. Los niveles de aflatoxina B1 en el huevo se ven afectados en experimentos en laboratorios, dando resultados contrastantes que indican que la infección natural de las micotoxinas en los granos resultan en una cantidad de micotoxinas en el huevo, no así en alimentos contaminados en laboratorio <sup>(30)</sup>.

Entre las variables de calidad del huevo que se mencionan por el consumo de aflatoxina B1 por parte de las aves de postura son: variaciones en el peso de huevos, porcentajes de sólidos en la yema, clara y cáscara <sup>(29)</sup>.

La presencia de aflatoxina B1 en el alimento de las aves puede causar además la presencia de coágulos o gotas de sangre en el albumen o saco vitelino o puede tener el resultado de contenido sanguinolento en todo el contenido del huevo. Todo esto se da por una hemorragia durante el momento de ovulación, todo esto se da en el infundíbulo y oviducto <sup>(21)</sup>.

#### 4.2.9.3 Epidemiología moderna.

La aflatoxina requiere de un alto nivel de protección para la Salud Pública, ya que tiene una prevalencia elevada y es muy tóxica. *A. Flavus* se encuentra adaptado a las partes superiores de las hojas de las plantas, principalmente en climas tropicales y subtropicales. La toxina es aguda para varias especies animales, sus isótopos 8-9 inducen daño hepatocelular, siendo los animales menos afectados los bovinos, ya que las aflatoxinas se degradan por la flora ruminal y el paso en preestómagos. Existen leyes en Europa que especifican que la cantidad aceptada en algunos lugares sería de 20 µg/Kg (20ppb), después de ser 200 µg/Kg, esto debido a la severidad comprobada de dicha micotoxina, las leyes de aceptación de niveles de aflatoxina B1, no están sometidas a ningún cuestionamiento, y bajo ley, no estarán bajo análisis para aumentar los niveles permitidos <sup>(8)</sup>.

La situación en algunos países ha tenido períodos alarmantes, como en Inglaterra y España. En el primer país preocupa en especial la presencia de la aflatoxina B1, que en un 5% de las muestras analizadas de productos terminados para consumo humano, mostró niveles superiores a los admitidos. Al retirar producto sospechoso las autoridades sanitarias publicaron que los niveles de aflatoxinas por debajo de 2-4 microgramos no causan ningún deterioro al organismo <sup>(11)</sup>.

Por otra parte en España, el RD 475/1983 fija unos valores límite de 10 µg/kg para la suma de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y 5 µg/kg para la aflatoxina B1 sola. En otros países se han fijado contenidos máximos de aflatoxina B1 en leche y otros productos lácteos, oscilando las tolerancias entre 0,05 y 0,5 µg/kg <sup>(11)</sup>.

Alrededor del mundo se consideran sospechosos productos que contienen aflatoxina M1, ya que aparece como constante un nivel alto de aflatoxina B1 sumado a su presencia. Estadísticamente resalta la relación entre la presencia de aflatoxina B1 y aflatoxina M1 en producto animal de consumo humano, la segunda

aunque no es tan tóxica, nos da un indicio de los animales que podrían estar transmitiendo grandes cantidades de aflatoxina B1 en subproductos de origen animal <sup>(8)</sup>.

#### **4.2.9.4 El papel actual de la aflatoxina B1 en el hígado humano.**

La aflatoxina está entre los más potentes carcinógenos conocidos para el humano produciendo mutaciones, ya que uno de sus metabolitos activados posee la capacidad de unirse covalentemente a la guanina de ADN en la posición N-7, además ésta reacción puede ser importante en el inicio del cáncer <sup>(1)</sup>.

El cáncer hepático primario aunque no está entre las primeras causas de muerte por cáncer a nivel mundial, es una neoplasia es muy agresiva y poco se logra para mejorar a los pacientes con los métodos terapéuticos actuales. <sup>(1)</sup>

Estudios epidemiológicos realizados en Asia y África han asociado la incidencia de cáncer primario del hígado con el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas <sup>(1)</sup>.

Una serie de investigaciones epidemiológicas y de laboratorio han establecido una asociación entre hepatitis B crónica y el carcinoma hepatocelular (el cual es el principal daño de la aflatoxina B1 en el humano). La relación entre estas 2 enfermedades ha sido argumentada por la presencia del ADN viral en células hepáticas tumorales, siendo 300 veces superior al riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma por un portador crónico del virus de la hepatitis B que un no portador <sup>(9)</sup>. El cáncer de hígado es el quinto tumor por incidencia en el mundo. El número estimado anual de muertes en el mundo es de 427.000, y es en los países en vías de desarrollo donde las tasas de incidencia son dos y tres veces más abundantes. El mecanismo celular y molecular por el que aflatoxinas y virus de la hepatitis B pueden interaccionar todavía no se ha definido, pero un mecanismo posible, identificado ya en ratones transgénicos con el virus de la hepatitis B es que la lesión crónica del hígado altera la expresión del agente carcinógeno específico que metabolizan las enzimas <sup>(11)</sup>.

En base a muchos estudios como el anterior, se induce que la aflatoxicosis B1 es más frecuente en personas que han padecido hepatitis tipo B, luego en una menor proporción las personas que han padecido cirrosis y hepatitis C, la mayoría de estudios se han realizado analizando orina por ELISA, para identificación de aflatoxina B1 en humanos. En años anteriores se utilizó la cromatografía de líquidos (HPLC), sin embargo en la actualidad, la prueba de ELISA ha demostrado ser más sensible en residuos corporales en humanos. Se ha comprobado también que la detección de aductos de ADN (AFB1-N7-Gua; aflatoxina B1 adherente a la Guanina) en orina, muestran la exposición crónica y la tasa de recuperación del ADN de aflatoxinas fijadas años atrás <sup>(1)</sup>.

Expertos relacionan la reducción del cáncer de hígado a escala mundial con un mayor control de la contaminación de los alimentos por aflatoxinas, especialmente la B1. Los estudios científicos que correlacionan aflatoxinas y hepatocarcinoma son más abundantes con modelos animales que en clínica humana, por lo que hacen falta más investigaciones. La toxicosis aguda o necrosis hepática son trastornos graves que pueden diezmar en sólo 48 horas a grupos de población centrada casi exclusivamente al consumo masivo de estos alimentos contaminados con el carcinógeno <sup>(11)</sup>.

#### **4.2.9.5 Diagnóstico de aflatoxicosis B1 en aves.**

En los registros se observan variantes en disminución en consumo de alimento, disminución de la producción, color de piel, calidad de la cáscara de huevo, baja fertilidad, y bajo porcentaje de eclosión <sup>(7)</sup>.

Se realizan pruebas de aislamiento, la identificación y la cuantificación de las toxinas específicas. Las técnicas de análisis para las micotoxinas incluyen cromatografía (de capa delgada, de gas, líquida), espectrometría de masa, tecnología con base en anticuerpos monoclonales, y prueba de ELISA <sup>(4)</sup>.

Si se sospecha de alguna micotoxicosis, es deseable una evaluación diagnóstica completa además de analizar el alimento. Las muestras y los

ingredientes del alimento, se deben coleccionar de manera correcta y enviarse con rapidez para un análisis de laboratorio <sup>(4)</sup>.

Las muestras deben coleccionarse de diferentes sitios: almacenamiento de ingredientes, la manufactura y el transporte de alimento, silos de alimento y alimentadores dentro de las casetas. Se deben coleccionar muestras de 500 g. y enviarse en contenedores separados; resultan adecuadas las bolsas limpias de papel y marcadas apropiadamente <sup>(4)</sup>.

#### **4.2.10 Diagnósticos de micotoxinas en alimentos.**

##### **4.2.10.1 Análisis de micotoxinas: Métodos, validaciones, y controles de calidad:**

Un esquema analítico para micotoxinas comprende los siguientes pasos <sup>(17)</sup>:

- Toma de muestras
- Preparación de la muestra
- Extracción
- Clean-up
- Análisis (separación + determinación)

La toma y preparación de la muestra son procedimientos comunes a todas las técnicas disponibles para el análisis de micotoxinas, y comprenden las etapas más críticas del procedimiento, esto se debe a que la mayor fuente de error (88%) está comprendida en la etapa de la toma de muestras. La extracción es el paso donde se extrae la micotoxina de interés desde la matriz alimenticia en la que se encuentra como contaminante, con un solvente adecuado. La elección del solvente depende de la micotoxina a extraer y del método de clean-up, separación y determinación a utilizar <sup>(17)</sup>.

En algunos métodos se omite el paso de clean-up, especialmente en aquellos métodos cuantitativos, sobre todo basados en inmunoensayos (ELISA), pero cuando se trata de otros métodos cuantitativos, sobre todo basados en

cromatografía, se hace necesario separar las micotoxinas de otros componentes co-extraídos, y para ello se utilizan diferentes sistemas de clean-up, como ser partición líquido, separación de fase sólida, inmunoafinidad, entre otros <sup>(17)</sup>.

Los métodos de análisis de micotoxinas son variados, y se presentan muchas alternativas para un mismo grupo de toxinas y matrices; a fin de evaluar cada método, se agruparon en tres categorías analíticas <sup>(17)</sup>:

- Métodos de screening
- Métodos oficiales validados
- Métodos de investigación

#### **4.2.10.1.1 Métodos de screening**

Llamados también “métodos rápidos”. Su desarrollo ocurre en un tiempo mucho menor que los tradicionales métodos analíticos, pueden llevarse a cabo en un ambiente de laboratorio (análisis a campo) y con personal poco entrenado, incluso la inversión inicial es baja. Se realiza a nivel de materias primas, es una especie de control de micotoxinas durante un proceso determinado para la producción de alimentos o raciones. Varias organizaciones (entre ellas la FDA), has establecido criterios para evaluar métodos rápidos disponibles como kits comerciales. Incluso se publican listas que describen kits comerciales probados por estas instituciones y sobre todo, en que matrices analizadas cumplen los criterios establecidos. Dentro de los métodos de screening más utilizados para el análisis de micotoxinas, se encuentran: tiras reactivas, pocillos, tubos, tarjetas <sup>(17)</sup>.

Cuando se va a utilizar cualquier método analítico para determinar micotoxinas, y esto incluye a los métodos rápidos, se debe asegurar la calidad del método que se está utilizando para detectar una micotoxina o grupo de micotoxinas en una matriz determinada, a fin de que el resultado obtenido esté lo más cerca posible del “valor verdadero” de la contaminación. Dentro del plan de Aseguramiento de calidad, el control de calidades uno de los elementos más importantes que permite monitorear que un procedimiento está en el camino

correcto. Las formas más importantes para llevar a cabo este control de calidad es utilizando materiales de referencia y participando de pruebas inter e intralaboratorios <sup>(17)</sup>.

Otro punto muy importante, es utilizar técnicas validadas, la validación de una técnica proviene de un estudio interlaboratorio o incluso intralaboratorio, que se llevaron a cabo para definir parámetros de exactitud y precisión de un método en una matriz determinada <sup>(17)</sup>.

Los kits comerciales habitualmente informan en que productos pueden utilizarse, pero además la información que tiene que tenerse en cuenta a fin de utilizarlos en una matriz determinada, es para qué matrices está validado el kit, y es primordial seguir las instrucciones del fabricante al seleccionar los productos a analizar, por que es muy frecuente, sobre todo en las pruebas con base ELISA, la aparición de falsos positivos cuando se analizan algunos productos. De todas maneras, los resultados positivos que se encuentren cercanos al límite de aceptación/rechazo según las especificaciones para micotoxinas, deben confirmarse con otro método, y en éste caso un método de referencia, validado para la toxina y matriz en cuestión <sup>(17)</sup>.

#### **4.2.10.1.2 Métodos oficiales**

Los métodos oficiales son aquellos métodos que han sido validado en rondas interlaboratorios, en las cuales se definen las características de desempeño, como ser reproducibilidad, repetibilidad, límites de detección y límites de cuantificación. Éstos métodos habitualmente están avalados por organismos <sup>(17)</sup>.

Estos métodos se utilizan para el arbitraje entre partes o para la confirmación y validación de otros métodos no oficiales. Usualmente éstos métodos se basan en el equipamiento habitual con el que se cuenta en un laboratorio analítico, y para el caso de micotoxinas, esto es Cromatografía líquida, gaseosa e incluso de capa delgada. Las consideraciones en cuanto al seguimiento

de la calidad son las mismas planteadas en el párrafo anterior. Los métodos cromatográficos son más versátiles para analizar un mayor número de matrices, ya que variando la extracción y el clean-up, prácticamente se puede analizar de todo, siempre y cuando se tengan en cuenta los valores de recuperación. Incluso hay menos tendencia a obtener falsos positivos como en el caso de los test de base inmunológica <sup>(17)</sup>.

#### **4.2.10.1.3 Métodos de investigación**

Los métodos utilizados en el ámbito de investigación, están a la vanguardia de todos los métodos, utilizan la última tecnología en equipamiento, y habitualmente fueron utilizados en un principio para dilucidar las estructuras de nuevas micotoxinas <sup>(17)</sup>.

Dentro de estos métodos, el más utilizado en la actualidad es el de la Cromatografía Líquida acoplada a Espectrómetros de Masa (LC-MS) <sup>(17)</sup>.

Estos métodos no requieren pruebas interlaboratorios para comprobar su desempeño, es suficiente de métodos para asegurar la calidad de los mismos. A medida que son más utilizados estos métodos, se irán fomentando pruebas interlaboratorios, y pueden llegar a conformar la lista de métodos oficiales <sup>(17)</sup>.

Este estudio pertenece a los métodos de investigación interlaboratorio, teniendo datos de un estudio anterior y con una metodología precisa que interviene en el papel del control de la aplicación de la prueba tal y como se describe en la metodología <sup>(17)</sup>.

#### **4.2.10.2 Algunos de los métodos más utilizados para el análisis de micotoxinas:**

Dentro de los métodos más utilizados actualmente para alimento terminado se encuentran los siguientes <sup>(5)</sup>:

#### 4.2.10.2.1 Cromatografía líquida.

Utilizada muchas veces con la espectrometría de masa. Es un método analítico por el cual se puede detectar la presencia de numerosos compuestos mediante la identificación de “picos” en función de su separación en un tiempo de retención. Para ello se ha de proceder al análisis de la muestra, mediante homogeneización, someterla a un ataque con disolvente orgánico, purificación y posterior concentración, obteniendo así un residuo que será llevado a un vial de cromatografía para proceder a la identificación de sustancias en el Cromatógrafo (24).

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas basadas en el principio de adsorción (no confundir con absorción) selectiva cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla y en algunos casos identificar estos si es que no se conoce su composición (24).

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido (24).

Los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto (25).

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según cómo esté dispuesta la fase estacionaria (25):

- Cromatografía plana. La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son:

- Cromatografía en papel
- Cromatografía en capa fina
- Cromatografía en columna. La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen:
  - Cromatografía de líquidos
  - Cromatografía de gases
  - Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía de gases es útil para gases o para compuestos relativamente volátiles, lo que incluye a numerosos compuestos orgánicos. Dentro de la cromatografía líquida destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad. Una serie eluotrópica, es un rango de sustancia de diferentes polaridades que actúan como fase móvil y que permiten observar un mejor desplazamiento sobre una fase estacionaria <sup>(25)</sup>.

#### **4.2.10.2.2 Espectrometría de masa.**

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos moles) de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico (electron ionization EI), algunas de las moléculas ionizadas del analito “explotan” en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como se “huella química” para caracterizar el analito <sup>(22)</sup>.

Hoy en día, esta técnica continúa teniendo los mismos fundamentos que en su origen, aunque el espectrómetro de hoy en día poco tenga que ver con su predecesor. La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa <sup>(22)</sup>.

El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas <sup>(24)</sup> :

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

Esta técnica ofrece numerosas ventajas frente a las técnicas espectrofotométricas ya que <sup>(25)</sup>:

- Los límites de detección que son, para muchos elementos, tres órdenes de magnitud más sensibles frente a los métodos ópticos.
- Espectros notablemente más sencillos, generalmente únicos y con frecuencia fácilmente interpretables.
- Capacidad para medir relaciones isotópicas atómicas.

En cambio, también tienen una serie de desventajas que no podemos obviar como <sup>(22)</sup> :

- El coste del instrumento es de dos a tres veces el de los instrumentos ópticos atómicos.
- La deriva del instrumento puede ser del orden del 5 o 10%/hora.
- Contiene unas determinadas interferencias.

Con la espectrometría de masas somos capaces de proporcionar información acerca de <sup>(25)</sup> :

- La composición elemental de las muestras: de esta se encarga la espectrometría de masas atómico.
- De la composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas.
- De la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas.
- De la estructura y composición de superficies sólidas.
- De las relaciones isotópicas de átomos en las muestras.

#### **4.2.10.2.3 Ensayos inmunoenzimáticos.**

Para aflatoxinas se han validado pruebas en granos principalmente, además de esto se han realizado validaciones de aflatoxina M1 en leche, leche en polvo, queso, yogurt, y otros productos lácteos. En el huevo todavía no se ha validado mundialmente alguna prueba inmunoenzimática, sin embargo existen validaciones internacionales privadas para detectar y dictaminar ciertos niveles aproximados y detectados en alimentos como: miel, leche, huevo, carne, embutidos, tejido, suero, plasma y orina, todos éstos están protegidos como propiedades intelectuales, por lo que tener acceso a las metodologías específicas es muy difícil. Las organizaciones que se mencionan en dichas validaciones son: CEN, FGIS, AOAC <sup>(25)</sup>.

Además de esto existen estudios realizados por Romers lab, en donde se relata en las conclusiones que utilizando el test de aflatoxinas totales no se pudo emitir una validación para la aplicación del test en la matriz huevo, debido a que la lectura de las aflatoxinas en huevo era menor a una partícula por billón, debido a que los huevos utilizados fueron provenientes de aves que ingirieron muy pocas cantidades de aflatoxina B1<sub>(16)</sub>, Entre algunos estudios se menciona también la suplementación de aflatoxina B1 y mannanoligosacáridos a gallinas ponedoras, con el fin de evaluar sus efectos en la calidad del huevo <sup>(28)</sup>.

En un estudio realizado en Italia, se relata que utilizaron análisis de la yema de huevo seco (guardada a -20 grados celsius), para determinar niveles de aflatoxina M1 por el test de ELISA (Ridascreen AFM1), uno de los objetivos de esa investigación era la comparación con la técnica de aislación en la matriz (en éste caso huevo), y validar la prueba de Elisa para la determinación de AFM1 en huevo. El procedimiento que se utilizó fue así: se añadieron dos gramos de yema seca y congelada a 40 ml. de diclorometano homogenizado con Ultra-Turrax. De ésta muestra se evaporaron 10 milímetros, y lo que quedó se disolvió con 0.5 ml. de metanol, 0.5 ml. de PBS, y 1 ml. de n-heptano. Después se centrifugó a 3,000 RPM por 15 minutos, se descartó el sobrenadante, y 100 microlítrros de la solución se utilizaron tal como lo describe el kit mencionado con anterioridad. Los resultados se leyeron a 450 nanómetros, entre las conclusiones del trabajo se menciona que la aflatoxina M1 por el método indicado tuvo una pobre presencia en la yema de huevo <sup>(28)</sup>.

Entre estudios actuales que mencionan la utilización del test de ELISA en huevo podemos mencionar muchos estudios (incluyendo su validación posterior) del test de ELISA para detectar Influenza Aviar en yema de huevo <sup>(2)</sup>.

Los inmunoensayos ligados a enzimas están tomando un rol cada vez más importante en los laboratorios de investigación, porque brindan una alternativa viable, altamente sensible, y además presenta menos problemas respecto al manejo y alteración de la muestra por eliminación y almacenamiento, además ha sido adaptada a muchos sustratos para diagnóstico. Por su objetividad, facilidad de automatización y posibilidad de trabajar con un gran número de muestras, los ensayos inmunoenzimáticos vienen reemplazando parcialmente a una variedad de técnicas en el laboratorio como son inmunofluorescencia y aglutinación. Como en el inmunoensayo ligado a enzimas, el antígeno o el anticuerpo está adsorbido a una fase sólida, este ensayo también es denominado Ensayo inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) <sup>(12)</sup>. Actualmente se han adaptado kits de ELISA a matrices como Líquido Cefaloraquídeo, orina, saliva, heces, y otros sustratos <sup>(3)</sup>.

#### 4.2.10.2.3.1 Fundamento de la prueba de ELISA.

La prueba de ELISA se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, uno de los cuales debe ser de reactividad conocida. El color se genera por la interacción de un sustrato cromogénico y una enzima que ha sido acoplada al anticuerpo detector. Si por ejemplo debe medirse el anticuerpo, se coloca el antígeno en la fase sólida (puede ser al revés), como una capa de captura. Después de la reacción del antígeno con el anticuerpo (suero o muestra), la capa de detección puede ser un reactivo antiinmunoglobulina clase específica (IgM o IgG) para detectar respuesta de anticuerpos clase específicos <sup>(18)</sup>.

Dentro de los parámetros fisicoquímicos que intervienen en la unión del antígeno con el anticuerpo tenemos: <sup>(18)</sup>

- Fuerzas de Van der Waals producidas por el movimiento de átomos en la superficie de las moléculas generado por un cambio eléctrico. Son fuerzas débiles presentes cuando la proximidad del Ag y el Ac es grande.
- Fuerzas electrostáticas originadas por la fuerza de atracción entre moléculas de carga iónica opuesta, como sucede con los grupos  $\text{NH}_3^+$  que reaccionan ávidamente con el grupo  $\text{COOH}^-$ .
- Uniones por puentes de hidrógeno son de carga energética baja entre átomos electropositivos de hidrógeno y átomos electronegativos de oxígeno o nitrógeno.

#### 4.2.10.2.3.2 Metodología general.

Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos: competitivos y no competitivos <sup>(18)</sup>.

- **ELISA Competitivo (o indirecto):** En este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno. Habrá ausencia de color en una muestra

positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra <sup>(18)</sup>.

**ELISA no competitivo (o directo):** Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida. Si una muestra es positiva se formará el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color. Dentro de los no competitivos tenemos, los directos que detectan antígenos y los indirectos que detectan anticuerpos <sup>(18)</sup>.

#### **4.2.10.2.3.3 Fijación del Antígeno a la fase sólida.**

La reacción inmunológica tiene lugar en la fase sólida, ésta puede ser de plástico, vidrio o nitrocelulosa. Actualmente los más usados son los de plástico, dentro de éstos los de poliestireno gammairradiados y los de cloruro de polivinilo porque tienen mayor capacidad para formar enlaces estables que los de poliestireno no tratados <sup>(18)</sup>.

El antígeno diluido en buffer es adherido a la fase sólida por enlaces electrostáticos entre los sitios activos del plástico y regiones de la proteína responsables de esta interacción. El buffer puede ser carbonato a pH 9.6 o buffer fosfato salino (PBS 1X ) a pH 7.4 <sup>(18)</sup>.

La estabilidad de los enlaces electrostáticos, el tiempo de incubación y la temperatura son factores importantes a tener en cuenta para evitar pérdidas de las proteínas y que pueden afectar la sensibilidad del ensayo <sup>(18)</sup>.

#### **4.2.10.2.3.4 Reacción con anticuerpo.**

La reacción del antígeno con el anticuerpo se debe realizar en condiciones similares a las fisiológicas, pH 7.4 temperatura de 37°C y concentración salina

equivalente a 0.15M de NaCl. Estas condiciones pueden variar dentro de un rango razonable sin afectar la reacción. El tiempo puede variar entre 1 a 3 horas <sup>(18)</sup>.

Moléculas no específicas en solución pueden adherirse a la fase sólida afectando el resultado final del ensayo, para disminuir este riesgo se suele agregar al medio de reacción un exceso (0.1% a 1%) de una proteína inerte para que compita eficientemente por los sitios de unión inespecíficos en la fase sólida. Esta proteína puede ser seroalbúmina bovina, caseína, suero entero, gelatina u otros <sup>(18)</sup>.

También es necesario añadir al medio “tween” 20 para evitar uniones inespecíficas de macromolécula. Por este motivo es agregado en los tampones de dilución y de lavado <sup>(18)</sup>.

#### **4.2.10.2.3.5 Adición del conjugado enzimático: (haptenos marcados, Ac).**

El conjugado enzimático se prepara por unión covalente de una enzima con el anticuerpo; esta enzima puede ser peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP), fosfatasa alcalina (Alcaline Phosphatase, AP) o beta-galactosidasa. Los criterios a tomar en cuenta en la selección de la enzima apropiada son su toxicidad, estabilidad, disponibilidad, viabilidad de conjugarla eficazmente con el anticuerpo elegido, sensibilidad y precio. Las condiciones de reacción entre el conjugado y el complejo formado por la unión antígeno-anticuerpo son similares a las descritas en la etapa anterior <sup>(18)</sup>.

#### **4.2.10.2.3.6 Adición del sustrato:**

La elección del sustrato va de acuerdo con el tipo de enzima presente en el conjugado. El sistema AP hidroliza al p-nitrofenil fosfato o p-nitrofenol generando un producto soluble de color amarillo. El sistema HRP reduce al sustrato peróxido de hidrógeno produciendo oxígeno que oxida a otros compuestos cromógenos tales como: <sup>(18)</sup>

- Tetrametilbenzidina (TMB), cuya oxidación genera un producto de color azul oscuro.
- o-phenylene diamine (OPD), que es oxidado a un producto coloreado que varía del naranja al pardo oscuro.
- Ácido azino-(3-etil)-benzo-sulfónico (ABTS), cuya oxidación genera un producto que va del verde al azul.

La intensidad del color desarrollado es de acuerdo con la cantidad de enzima presente en la reacción. La lectura se realiza en un espectrofotómetro a 405 nanómetros <sup>(18)</sup>

#### **4.2.11 Tratamiento de micotoxicosis en general**

Se debe retirar el alimento tóxico y reemplazarlo con aquél no adulterado. Algunas micotoxinas aumentan los requerimientos de vitaminas, minerales traza (el selenio en particular), proteínas, lípidos y éstos se pueden compensar mediante la formulación del alimento y el tratamiento con base en agua. El aumento de la proteína cruda y la suplementación con vitaminas pueden inhibir los efectos de las aflatoxinas <sup>(4)</sup>.

#### **4.2.12 Prevención y control de micotoxinas**

Los efectos de las micotoxinas en la salud y en el rendimiento de las aves y la permanencia de las mismas y sus metabolitos en los productos alimenticios de origen animal son también elementos esenciales de información para el control <sup>(4)</sup>.

La prevención y el control de micotoxinas en la cadena de producción avícola requiere la consideración de todos los factores que influyen en la formación de las mismas en el campo y durante el almacenamiento de las materias primas, sin embargo son inevitables valores medios mas altos bajo condiciones climáticas desfavorables <sup>(6)</sup>.

La reducción de micotoxinas en ingredientes destinados a alimentación animal se dividen en dos partes: La adopción de buenas prácticas agrícolas y del procesamiento de los productos; y la adopción de los protocolos de elaboración de puntos críticos y control de riesgos. Esto minimizaría el riesgo de contaminación a lo largo del proceso productivo y permitiría reconocer lotes afectados y productos contaminados <sup>(7)</sup>.

#### **4.2.12.1 Estrategias para prevenir la contaminación por micotoxinas.**

Implican el control de la síntesis de la toxina y el metabolismo de los hongos en el campo. El método ideal sería el manejo adecuado de los cultivos, sin embargo como es difícil por que no se puede controlar la temperatura y humedad, existen dos estrategias <sup>(7)</sup>:

- **Estrategia agronómica:** Consiste en reducir el estrés sufrido por las plantas, control de insectos, eliminación de residuos vegetales y la rotación de terrenos, la utilización de agentes antifúngicos, y el desarrollo de plantas resistentes a la contaminación fúngica.
- **Estrategias posteriores a la cosecha:** Implican el control medioambiental de conservación: contenido de agua, presión de O<sub>2</sub> y temperatura, control de plagas (insectos y roedores), separar granos partidos y cosechas dañadas antes de su almacenaje, y utilizar agentes antifúngicos como el ácido propiónico y zeolitas).

#### **4.2.12.2 Estrategias posteriores a la cosecha en nuestro medio.**

La prevención se centra en la adquisición de piensos libres de micotoxinas y la aplicación de prácticas de formulación de alimento y de manejo que eviten el crecimiento de mohos y la formación de micotoxinas <sup>(7)</sup>.

La detoxificación son los tratamientos posteriores a la cosecha dirigidos a eliminar o reducir los efectos tóxicos de las toxinas sobre los animales. Pueden ser físicas, químicas y microbiológicas, para destruir, modificar o adsorber las

micotoxinas. Se ha utilizado la amonización y nixtamalización. Otros agentes son los agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, ozono), o algunos ácidos o álcalis. Sin embargo estas aproximaciones son caras y no efectivas en su totalidad para eliminar las micotoxinas. La amonización puede alcanzar un costo aproximado del 5 al 20% del valor del ingrediente. La descontaminación biológica mediante la utilización de microorganismo es otra de las estrategias utilizadas. Algunas bacterias lácticas o levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos poseen estructuras de pares con capacidad para adherir micotoxinas (7).

Algunos métodos físicos utilizados son la inactivación de las micotoxinas con elevadas temperaturas, rayos UV y X, o las irradiaciones del microondas. Otros métodos que pueden resultar efectivos son la limpieza de las semilla, su fraccionamiento mediante cribados y la extrusión, sin embargo, la mayoría de éstas técnicas son poco prácticas, no eficientes en su totalidad o pueden disminuir el contenido en nutrientes de los alimentos (7).

En la actualidad la utilización de adsorbentes de micotoxinas en el contenido digestivo es el método considerado de elección en la protección de los animales frente al consumo de ingredientes contaminados. Los sustratos más utilizados son los aluminosilicatos (zeolitas naturales, montmorillonita), seguido por el carbón activo o diferentes polímeros especiales. La eficacia de éstos depende de la estructura química del adsorbente y la toxina (7).

**4.2.12.3 Almacenamiento adecuado de los ingredientes:** La ventilación adecuada de las casetas con el fin de reducir la humedad relativa, elimina la humedad necesaria para el crecimiento de los hongos y la formación de toxinas en los alimentadores (4).

**4.2.12.4 El peletizado del alimento:** tiene entre sus ventajas: la destrucción de las esporas fungales y disminuye la carga de hongos; también, la combinación de granulado y un agente antimicótico tiene efectividad adicional (6). Hay que tomar en cuenta que muchas micotoxinas son estables durante la molienda y el

almacenamiento del alimento, de tal modo que pueden estar presentes en el grano después de que los hongos que las producen han muerto <sup>(15)</sup>.

**4.2.12.5 Adsorbentes:** pueden formar parte de un método integrado. Las zeolitas, compuestos que contienen sílice y que se utilizan como agentes para evitar el endurecimiento y como apoyo para la calidad del cascarón, son aditivos para alimentos prácticos y económicos que pueden reducir los efectos de ciertas micotoxinas, en especial de las Aflatoxinas. El aluminosilicato de calcio sódico hidratado, fija la aflatoxina B1 en el aparato digestivo, tal vez por secuestro, y reduce la toxicidad para los pollos. La arcilla de bentonita también aminora la aflatoxicosis <sup>(4)</sup>.

#### **4.2.13 Efecto de las micotoxinas en la economía.**

El efecto es considerable en la cadena alimentaria, ya que tiene efectos sobre la producción de los animales, provoca pérdidas en las cosechas, y representan inversiones en los programas de control y prevención. Las pérdidas en los Estados Unidos debido a aflatoxinas, fumonisinas, y tricótesenos son de 932 millones de dólares cada año, y el costo de las medidas de control y regulación de las micotoxinas en éste mismo país haciende a los 466 millones de dólares anuales <sup>(7)</sup>.

##### **4.2.13.1 Normativa regulatoria de las micotoxinas en los piensos y alimentos.**

En base a los riesgos que las micotoxinas tienen sobre la salud humana, diferentes organismos internacionales como la OMS, The Food and Drug Administration (FDA) y la Food and agriculture Organization (FAO), han establecido los límites permitidos de micotoxinas en los piensos y los alimentos. Por otra parte, una comisión conjunta entre la FAO y la OMS se han reunido regularmente desde 1956 en su Comité de Expertos en Aditivos Alimentario (JECFA) con objetivo de evaluar la presencia y riesgos de los aditivos alimentarios, contaminantes, compuestos tóxicos naturales y residuos de la industria Veterinaria en alimentos <sup>(7)</sup>.

El establecimiento de niveles de tolerancia aceptables internacionalmente es importante, y facilita el comercio y la adopción de medidas comunes entre países. Los primeros límites fueron fijados en los años 60 para las aflatoxinas. A finales del 2003, aproximadamente 100 países habían establecido límites específicos de micotoxinas en los alimentos e ingredientes para la alimentación animal. Los parámetros que son considerados en la adopción de éstos niveles son las fuentes y propiedades toxicológicas de la micotoxinas, los efectos sobre la salud humana, y la salud y productividad animal, o el riesgo de provocar residuos en los productos de origen animal. Otros factores a tomar en cuenta son la información recogida sobre datos toxicológicos, consumo de alimentos, incidencia y concentración de micotoxinas en los ingredientes, y las metodologías más utilizadas; así como las implicaciones económicas más importantes para un comercio internacional seguro de cereales y otros alimentos <sup>(7)</sup>.

**Niveles de actuación propuestos por la FDA para la presencia de aflatoxinas  
en los alimentos (FDA, 2000)**

<b>Niveles Max. (ppb)</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Especies</b>
0.5 (AFM1)	Leche	Humanos
20	<u><b>Todos excepto leche</b></u>	Humanos
<u><b>20</b></u>	Todos	Todas
Excepciones		
100	Maíz	Vacuno reproductor, cerdas y
200	Maíz	ponedoras.
300	Maíz	Engorde de cerdos (>45 Kg.)
300	Semilla de algodón	Engorde de terneros
		Todas las especies

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Recursos humanos:**

- 1 Estudiante tesista
- 3 Asesores de tesis
- 1 Técnico de laboratorio de Ornitopatología y Avicultura.

### **5.2 Recursos institucionales y comerciales:**

- Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

### **5.3 Materiales y equipo:**

- Huevos (96)
- Material para recolección de huevos (bolsas y canastos).
- Transporte
- Autoclave
- Beakers de 100 ml.
- Probeta de 100 ml.
- Jeringas de 2 y 5 ml.
- Tubos de 5 ml.
- Tubos de cristal con tapón de rosca.
- Tijeras curvas y rectas
- Mechero
- Agitador
- Centrífuga
- Mascarilla
- Solución PBS (bufferada)

- Papel mayordomo
- Guantes de latex
- 1 Test Kit ELISA AgraQuant ® de Romer Labs, para Aflatoxinas totales (con capacidad para identificar aflatoxinas B1, B2, G1 y G2; con afinidad del 100, 76, 70 y 42% respectivamente).
- 1 botella de 12.5 ml de conjugado de aflatoxinas totales
- 1 botella de 7.5 ml de solución de sustrato
- 1 botella de 7.5 ml de solución stop
- Pipeta multicanal de 8 vías y pipeta monocal capaces de dispensar 100µl y 200µl con puntas
- Puntas desechables
- EQOLE1300: Timer
- COKAD1150: Botella de lavado o piseta
- Papel toalla absorbente
- 3 canoas para reactivos para pipeta multicanal de 8 vías
- Lector de pocillos con filtros de 450nm y 630nm
- Computadora y software

## **5.4 Metodología:**

### **5.4.1 Lugar, selección y procesamiento de muestras:**

Recolecté los huevos en el mercado Colón, ubicado en la 7 Calle y 13 Avenida de la zona 1 de la ciudad capital de Guatemala; usando un muestreo por conveniencia, recolectando 1 huevo de cada color en cada expendio, haciendo un muestreo semanal de los ocho expendios, a lo largo de 4 semanas; para evitar perder el número de muestras (por si se quebraban) recolecté 8 huevos más al azar, 4 blancos y 4 marrón, haciendo un total de 24 huevos semanalmente, realizando la prueba solamente a 16. Al finalizar obtuve 96 huevos, de los cuales realicé la prueba a 64 (32 blancos y 32 marrón) al finalizar las cuatro semanas.

El procesamiento de la muestra se realizó en su totalidad en el laboratorio de Patología Aviar, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en donde se procesaron las muestras, en las cuatro semanas correspondientes, y se realizó la prueba a los 64 huevos una semana después del último muestreo.

**5.4.2 Procesamiento de la muestra:** El método es basado en la extracción de muestras de yema de huevo, para otros kits. Cada grupo de muestras fue procesado el fin de semana después de su respectiva recolección, de la siguiente manera:

Primero desinfecté la cáscara de huevo con alcohol, para evitar posibles contaminaciones. Abrí los huevos con tijeras, teniendo al lado un mechero de gas para mantener un ambiente estéril cada vez que abría los huevos. Coloqué el contenido del huevo (yema y clara) en un beacker, y posteriormente obtuve más de 2 ml de un batido de yema y clara con ayuda de una jeringuilla de 3 ml, colocándolo en recipientes estériles (debidamente identificados) para someterlo a congelación (-4 °C).

De la manera anterior pude almacenar las muestras y así continuar con la siguiente parte del procesamiento (del total de las muestras) una semana después del último muestreo, de la siguiente manera:

Las muestras (64) se descongelaron a temperatura ambiente. Mezclé 2 ml de muestra y les añadí 2 ml de PBS, en un tubo de 5 ml. Agité las muestras y después las centrifugué a 2600 rpm por 10 minutos, y extraje el sobrenadante por decantación para continuar con el procedimiento de ELISA inmediatamente <sup>(23)</sup>.

**5.4.3 Procedimiento del test de ELISA:** Utilicé 16 pocillos para grupo de muestras, más 5 pocillos (con diferentes niveles en ppb de aflatoxinas) para control, en total se utilizaron 69 pocillos, sin diluciones.

Primero coloqué 200  $\mu\text{L}$  de conjugado dentro de cada pocillo, y luego añadí 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra en los mismos, para cada muestra utilicé puntas nuevas para evitar contaminación. Mezclé cada pocillo utilizando una micropipeta multicanal, pipeteando y liberando la mezcla 3 veces, colocando 100  $\mu\text{L}$  en un pocillo cubierto con anticuerpos. La muestra incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Después de éste tiempo vacié el contenido de los pocillos para luego lavarlos con agua destilada, ésta acción se repitió 5 veces. Extendí papel mayordomo, y golpeé sobre éste la tira de pocillos para eliminar la mayor cantidad de agua.

Pipetí 100  $\mu\text{L}$  del sustrato dentro de cada pocillo, y luego dejé incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Después pipetí 100  $\mu\text{L}$  de solución “stop” o de frenado dentro de cada pocillo.

Antes de la lectura eliminé las burbujas de aire para evitar errores en los resultados analíticos.

**5.4.4 Lectura de la muestra:** Obtuve los datos por medio de un lector de pocillos, utilizando un filtro de 450 nm y un filtro de referencia de 630 nm. Registré los valores de densidades ópticas (OD) leídos para cada pocillo.

**5.4.5 Interpretación de resultados:** Utilicé la lectura de densidad óptica, aplicándola a una tabla estandarizada para obtener los resultados totales en partículas por billón. Los resultados fueron utilizados para construir una tabla de datos donde se realizó el análisis estadístico.

**5.4.6 Análisis estadístico:** Utilicé estadística descriptiva. Resumí la información estimando promedios de los niveles de aflatoxina B1 presentes en las muestras de huevos. Para el análisis realicé la prueba de hipótesis para una media de población, comparado contra el parámetro establecido por la FDA (menor a 20 partículas por billón). Utilicé la prueba de hipótesis para diferencias de medias para comparar los valores de aflatoxina B1 entre los huevos de cáscara blanca y marrón.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio constituyó la aplicación del método de ELISA directo, para registrar valores de aflatoxina B1 (ppb) en el contenido de 32 huevos de color blanco y 32 de color marrón. El 100% de las muestras se encontraron dentro de los parámetros establecidos por la FDA (20 ppb), además de estar dentro del rango de detección de la prueba.

Después de haber realizado el procedimiento de selección y procesamiento de muestra, lectura óptica (450 nm), e ingreso de los datos de la lectura óptica a un software de laboratorios Romer Labs®, destinado a obtener las partículas por billón a partir de los datos obtenidos por espectrofotometría, se obtuvieron los siguientes resultados incluyendo los respectivos controles:

### PRIMER MUESTREO

No. muestra	D.O.	ppb
Huevo Blanco	1	0.55
	2	0.56
	3	0.55
	4	0.6
	5	0.58
	6	0.83
	7	1.07
	8	0.75
Huevo marrón	9	0.79
	10	0.53
	11	0.56
	12	0.64
	13	0.64
	14	0.58
	15	0.59
	16	0.88

### SEGUNDO MUESTREO

No. muestra	D.O.	ppb
Huevo Blanco	17	0.86
	18	0.62
	19	0.66
	20	1.19
	21	0.53
	22	0.56
	23	0.62
	24	0.55
Huevo marrón	25	0.54
	26	0.6
	27	0.73
	28	0.92
	29	0.85
	30	0.8
	31	0.88
	32	0.86

En donde D.O. = Densidad óptica y ppb = Partes por billón

## TERCER MUESTREO

No. muestra	D.O.	ppb
Huevo Blanco	33	0.51
	34	0.58
	35	0.62
	36	0.52
	37	0.6
	38	0.52
	39	0.58
	40	0.75
Huevo marrón	41	0.57
	42	1.03
	43	0.85
	44	0.91
	45	0.51
	46	0.55
	47	0.58
	48	0.68

## CUARTO MUESTREO

No. muestra	D.O.	ppb
Huevo Blanco	49	0.62
	50	0.57
	51	0.71
	52	0.92
	53	0.71
	54	0.94
	55	0.87
	56	1.22
Huevo marrón	57	0.58
	58	0.5
	59	0.51
	60	0.6
	61	0.55
	62	0.52
	63	0.62
	64	0.62

En donde D.O. = Densidad óptica y ppb = Partes por billón

**NOTA:** Puede observar la tabla original obtenida directamente de la hoja especial incluyendo la curva de calibración y respectivos controles en las tablas adjuntas en los anexos.

Para los datos en ppb, se realizaron análisis de medias y demás estadística descriptiva para la interpretación de los mismos. Los promedios y medianas sugieren que los huevos con cáscara marrón obtuvieron levemente resultados más elevados que los huevos con cáscara blanca (sin embargo hay que tomar en cuenta el test estadístico que se aplicó más adelante), y el total de la distribución obtuvo resultados inferiores a las 20 ppb (límite FDA).

	MEDIA (PROMEDIO)	MEDIANA
HUEVOS CON CÁSCARA BLANCA	14.41	15.43
HUEVOS CON CÁSCARA MARRÓN	14.72	15.67
MUESTRA TOTAL	14.49	15.43

La comparación de la desviación estándar y la varianza, indican sin lugar a dudas que existe más variación en los datos obtenidos de la lectura de las muestras del huevo blanco, siendo así, el huevo marrón más constante en los resultados obtenidos por la técnica de ELISA. El coeficiente de variación (además de sustentar lo anterior), muestra que los datos fueron obtenidos de una manera constante para ambas distribuciones separadamente y de manera conjunta.

	BLANCO	MARRÓN	TOTAL
<b>D.E.</b>	3.29	2.94	3.1
<b>VARIANZA</b>	10.81	8.65	9.6
<b>MODA</b>	15.43	16.42	16.42
<b>C.V.</b>	0.22	0.19	0.21
<b>Dato máximo</b>	18.42	18.74	18.74
<b>Dato mínimo</b>	6.99	8.9	6.99

La prueba de hipótesis se utilizó para comparar los datos de todas las muestras y las muestras de huevo blanco y marrón separadamente contra los datos permisibles de aflatoxina B1 (20 ppb) en residuos alimentarios establecidos por la FDA. En el estudio, se realizó el ejercicio de la prueba de hipótesis para una media de población, para observar si los datos (niveles obtenidos para el huevo blanco o marrón), se encuentran cerca del parámetro FDA, aunque a simple vista se observó que todos los datos son menores al mismo.

#### **Para diferencia de medias y parámetro FDA:**

	VALOR t
<b>ENTRE HUEVOS BLANCOS Y FDA</b>	-9.63
<b>ENTRE HUEVOS MARRÓN Y FDA</b>	-10.35
<b>TOTAL DE MUESTRAS</b>	- 13.77

Con los datos arrojados por la prueba de hipótesis (entre medias y parámetros no provenientes de distribuciones), podemos inferir que los valores arrojados por todas las muestras son evidentemente diferentes (por debajo) que los parámetros establecidos por la FDA; dentro de toda la distribución, fueron los resultados de los huevos marrón los que más se alejaron al límite FDA (son los

que obtuvieron valores más elevados). Por otra parte, no existe diferencia estadística (al 95 y 99% de confianza) entre los datos obtenidos para las muestras de huevo blanco y las de huevo marrón.

**Para diferencia de medias:**

	<b>VALOR Z</b>
<b>ENTRE EL HUEVO BLANCO Y MARRÓN</b>	- 0.4

Para los datos obtenidos en el estudio se acepta que no existe diferencia estadística entre los resultados obtenidos para el huevo blanco y el marrón respectivamente; y además si existe una diferencia altamente significativa (95 y 99 % de confianza), entre los valores de la distribución total, distribuciones para datos de huevos blanco y marrón respectivamente, y el parámetro establecido por la FDA (20 ppb), siendo todos los datos menores al parámetro establecido.

## A. Discusión

El 100% de los resultados se encontraron dentro del parámetro establecido por la FDA (20 ppb). Los resultados obtenidos con la prueba de ELISA con el kit de AgraQuant® total aflatoxin (4-40 ppb) ELISA test kit, se encontraron dentro del rango de detección de la muestra.

Para determinar aflatoxina B1 se utilizó el kit Agraquant® para Aflatoxinas totales, con un rango de 4 a 40 ppb. Es importante mencionar que es un kit que posee una afinidad del 100% por la aflatoxina B1, y puede dar una reacción cruzada con las aflatoxinas B2, G1 y G2; en un 76, 70 y 42% respectivamente. Sin embargo, según la literatura consultada es la aflatoxina B1 la que tiene efectividad en su traspaso hacia el contenido del huevo de gallina <sup>(12, 13, 24)</sup>, teniendo competencia únicamente con la aflatoxina B2, la cual es necesario su consumo durante 90 días en cantidades sumamente elevadas para observar un traspaso de cantidades significativas al huevo <sup>(31)</sup>.

Los promedios y medianas sugieren que los huevos con cáscara marrón obtuvieron levemente resultados más elevados que los huevos con cáscara blanca, aunque ésta diferencia no es significativa estadísticamente.

Los resultados de las pruebas de hipótesis, rechazan que los valores obtenidos para la distribución de huevos blancos y marrón sean diferentes, y además sustenta que los valores obtenidos son menores a 20 ppb que dictamina la FDA (Food and drug administration) sobre la presencia de aflatoxina B1 en alimentos de origen animal, destinados al consumo humano.

## **VII. CONCLUSIONES**

1. El 100% de las muestras procesadas se encuentran dentro del parámetro establecido por la FDA (Food and Drug Administration); los niveles de aflatoxina B1 obtenidos por medio de la prueba de ELISA para los 64 huevos analizados (32 blancos y 32 marrón), fueron menores a 20 ppb.
2. No existe diferencia altamente significativa, entre las distribuciones de huevo blanco y marrón.
3. Se rechazó la hipótesis del presente estudio, ya que existe diferencia altamente significativa entre los valores de la distribución y el parámetro establecido por la FDA para aflatoxina B1 en el huevo; los datos obtenidos por la prueba de ELISA muestran que se encuentran por debajo de las 20 ppb.
4. Además de lo anterior, existe diferencia altamente significativa entre los valores obtenidos para ambas distribuciones de manera separada (huevo blanco y marrón) y el parámetro de la FDA, encontrándose ambas por debajo de las 20 ppb.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Es de vital importancia desde el punto de vista de Salud Pública, que se determinen los niveles de aflatoxina B1 en subproductos animales como la leche, quesos y carnes, ya que dichos productos son destinados al consumo humano y los niveles bajos de ésta micotoxina pueden agravar cuadros principalmente de hepatitis, cirrosis y originar carcinoma hepatocelular en humanos.
2. Utilizar algunas herramientas para prevenir la transmisión de micotoxinas a diversos alimentos de origen animal, como el uso de secuestrantes y adsorbentes de micotoxinas en el alimento de las aves así como el correcto manejo del mismo a nivel de la granja.
3. Realizar un estudio que compare resultados de aflatoxina B1 por el método de ELISA y cromatografía líquida, para observar la precisión y exactitud de ambas pruebas y determinar si la prueba de ELISA puede ser estandarizada para obtener resultados más exactos que aporten datos de interés a la industria alimentaria nacional, de una manera más económica.
4. En base a los recientes resultados obtenidos en estudios de tesis sobre micotoxinas en Guatemala, se resalta la importancia de establecer una normativa para regular los niveles aceptables de las mismas en nuestro país.
5. Se recomienda continuar con los estudios de aflatoxina B1 en el huevo por medio del método de ELISA, para su correspondiente validación.

## IX. RESUMEN

Las micotoxinas son contaminantes causantes de diversas patologías en humanos y animales, y son productos muy difundidos a lo largo de todo el mundo; sin embargo, en países en vías de desarrollo como el nuestro, no se le ha prestado la atención debida a ésta problemática. Para despertar el interés de profesionales y estudiantes, se ha realizado la presente tesis, resaltando la importancia de la aflatoxina B1 como contaminante natural y causante-agravante de muchas patologías en el humano.

En el presente trabajo se utilizó el método de ELISA, para detectar niveles de aflatoxina B1 en el contenido de huevos con cáscara blanca y marrón, y así generar información sobre la aplicación de la prueba en nuestro medio, además de analizar los resultados obtenidos ante los parámetros de la FDA (Food and Drug Administration).

En el mercado Colón de la zona 1 capitalina, se realizaron 4 muestreos con intervalo de 7 días, obteniendo al final 96 huevos. Se procesó el contenido de 32 huevos de cada color, y se utilizó un método de ELISA directo para obtener resultados por medio de espectrofotometría. Los resultados obtenidos comprendieron entre los rangos de 6.99 y 18.74 ppb, los cuales se encuentran dentro del límite de detección de la prueba (de 4 a 40 ppb) y debajo del límite establecido por la FDA (20 ppb). La estadística descriptiva mostró que los datos obtenidos no presentaron gran variación y se encuentran dispersos de manera constante ante las medias de cada distribución; además de esto la prueba de hipótesis mostró que no existía diferencia altamente significativa entre los datos obtenidos para los huevos blancos y marrón.

Los resultados anteriores indican que no hay que descartar ELISA como un método diagnóstico para aflatoxina B1 en el huevo, siendo un trabajo documentado que obtuvo valores dentro del rango de detección del kit (4-40 ppb). Es de mucha importancia estandarizar la prueba por medio de la comparación ante resultados obtenidos por la técnica de cromatografía líquida.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez, M; Carvajal, M. 2000. Aductos-ADN-Aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado (en línea). Revista Cubana Oncol 2000;16(1):35-9. La Habana, CU. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Consultado 17 sept. 2007. Disponible en [www.bvs.sld.cu/revistas/onc/vol16\\_1\\_00/onc07100.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/onc/vol16_1_00/onc07100.htm)
2. Beck, J; Swayne, E; Davison, A; Casavant, B; Gutierrez, C. 2006. Validation of Egg Yolk Antibody Testing as a Method to Determine Influenza Status in White Leghorn Hens (en línea). ASoutheast Poultry Research Laboratory, USDA-ARS. New Bolton Center. Athens, GA. Consultado 11 oct. 2008. Disponible en <http://www.google.com.gt/search?hl=es&q=Validation+of+Egg+Yolk+Antibody+Testing+as+a+Method+to+Determine+Influenza+Status+in+White+Leghorn+Hens&btnG=Buscar&lr=>
3. Bouchard, M. 2006. ELISA (en línea). Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes. Lima, PE. Consultado 10 mar. 2008. Disponible en [http://www.web.ula.ve/medicina/webidic/docs/clases/practica\\_mmbouchard.pdf](http://www.web.ula.ve/medicina/webidic/docs/clases/practica_mmbouchard.pdf)
4. Burt, D. 2005. Aplicaciones de la biotecnología en la industria avícola (en línea). World's Poultry Science Journal 58. Edinburg, UK. Consultado 12 ago. 2007. Disponible en [http://www.wpsa.com/downloads/2002\\_spanish.pdf](http://www.wpsa.com/downloads/2002_spanish.pdf)
5. Consuma Seguridad S.A. 2006. La aflatoxina B1 para la alimentación (en línea). Consuma Seguridad S.A. Madrid, ES. Consultado 10 mar. 2008. Disponible en [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006000600010&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000600010&lng=en&nrm=iso)

6. Dänicke, S. 2006. Prevención y control de micotoxinas en la cadena de producción de las aves: una visión Europea (en línea). Bundesallee 50, D-38116. Federal Agricultural Research Centre, Braunschweig (FAL), Institute of Animal Nutrition. Braunschweig, DE. Consultado 19 sept. 2007. Disponible en [http://www.wpsa.com/downloads/2002\\_spanish.pdf](http://www.wpsa.com/downloads/2002_spanish.pdf)
7. Denli, M; Pérez, JF. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención (en línea). Departamento de Ciencia Animal i dels aliments. Facultat de Veterinaria. Barcelona, ES. Consultado 10 oct. 2007. Disponible en [http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/06CAP\\_I.pdf](http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/06CAP_I.pdf)
8. EFSA (European Food Safety Authority). 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed (en línea). Parma, IT. EFSA (European food safety authority). Disponible en [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific\\_Opinion/opinion\\_contam\\_02\\_summary\\_en1,0.pdf](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/opinion_contam_02_summary_en1,0.pdf)
9. Eonat's, C; Cruz, M. 2007. Estandarización de la prueba de Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el virus de fiebre Phlebotomus (en línea). Lima, PE. Consultado 10 nov. 2007. Disponible en [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Salud/Cruz\\_M\\_C/generalidades.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Salud/Cruz_M_C/generalidades.htm).
10. Fermentek biotechnology. 2005. Aflatoxin B1: Co-occurrence of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid in sour lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during post-harvest pathogenesis by Aspergillus flavus (en línea). Mycopathologia. 2005 Apr;159(3):407-11. Jammu, IND. Department of Botany, University of Jammu. Consultado 20 de ago. 2007. Disponible en <http://fermentek.com/07-aflatoxin.htm>.
11. Fundación EROSKI. 2004. Aflatoxinas y frutos secos (en línea). Publicado por CONSUMER.es. Madrid, ESP. Consultado 10 dic. 2007. Disponible en

- <http://www.consumaseguridad.com/sociedad-y-consumo/2004/08 /17/13973 .php>
12. García, C. 2008. Análisis de Aflatoxinas y Ochratoxina A en alimentos y evaluación de la ingesta poblacional (en línea). Servei de Publicacions. Universitat de València. Valencia, ES. Consultado 15 mar. 2009. Disponible en [http://www.tdr.cesca.es/TDX-0223109-125542/index\\_cs.html](http://www.tdr.cesca.es/TDX-0223109-125542/index_cs.html)
  13. García, E; García, J. Egg quality: Chemical residues in respect to food safety (en línea). Institut de recerca I Tecnologia Agroalimentaries. Monells, ES. Consultado 18 feb. 2009. Disponible en [www.recercat.net/bitstream/2072/4544/1/Egg+quality+-+Chemical+residues+in+respect+to+food+safety.ppt](http://www.recercat.net/bitstream/2072/4544/1/Egg+quality+-+Chemical+residues+in+respect+to+food+safety.ppt)
  14. Gimeno, A. 2008. Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control (en línea). Engormix. Distrito Federal, MX. Consultado 8 mar. 2008. disponible en [http://www.engormix.com/aflatoxina\\_m1\\_leche\\_riesgos\\_s\\_articulos\\_372\\_MYC.htm](http://www.engormix.com/aflatoxina_m1_leche_riesgos_s_articulos_372_MYC.htm)
  15. Grupo EresMas. 2000. Composición del huevo (en línea). Distrito federal, MX. Publicado por Saludalia.com. Consultado 3 jun. 2007. Disponible en [http://www.saludalia.com/Saludalia/web\\_saludalia/vivir\\_sano/doc/nutricion/doc/huevo.htm](http://www.saludalia.com/Saludalia/web_saludalia/vivir_sano/doc/nutricion/doc/huevo.htm)
  16. Jaramillo, M. 2007. Aditividad, sinergismo y antagonismo entre micotoxinas y sus efectos en pollos de engorde (en línea). Caracas, VE. Engormix. Consultado 4 abr. 2007. Disponible en [http://www.engormix.com/aditividad\\_sinergismo\\_antagonismo\\_entre\\_s\\_articulos\\_972\\_AVG.htm](http://www.engormix.com/aditividad_sinergismo_antagonismo_entre_s_articulos_972_AVG.htm)
  17. Jordan, F; Pattison, M. 1998. Enfermedades de las aves: Micotoxiosis. Editorial Manual Moderno. 4 ed. Trad. A Martinez Haro. Distrito Federal, MX. 522 p.
  18. Knass, P. 2008. Análisis de Aflatoxina B1 en huevo realizado por Romer Labs (en línea). Romer Labs, Technical Advisor department, Latin America.

- Tulln, AS. Consultado 24 mar. 2008. Disponible en [http://www.engormix.com/S\\_panel/panel\\_login\\_full.asp?redir=mail.asp](http://www.engormix.com/S_panel/panel_login_full.asp?redir=mail.asp)
19. Knass, P; Gutscher, G. 2007. Análisis de micotoxinas: métodos, validaciones y controles de calidad. Romer Labs Diagnostic GMBH. Romer Labs. Technopark 1- 3430. Tulln, AS. 3 p.
  20. Marazona, R; Bugella, G. 2007. Métodos Basados en la unión Ag-Ac (en línea). Madrid, ES. Consultado 16 may. 2007. Disponible en [http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas\\_nuevos\\_pdf/tema17.pdf](http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas_nuevos_pdf/tema17.pdf)
  21. Merino, R; Quintana, J; Gutierrez, L. 2003. Uso del ensayo ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de influenza aviar en yema de huevo y establecer el estado de infección/vacunación en gallinas de postura (en línea). Selecciones Veterinarias No. 2-3-03. UNAM. Distrito Federal, MX. Consultado 10 mar. 2008. Disponible en: <http://132.248.62.51/sv/sv/2005/noviembre/ave200511a1.html>
  22. Pérez, J; Pratt, L. 2000. Análisis de sostenibilidad de la industria avícola en Guatemala (en línea). CNE 723. Guatemala, GT. Consultado 3 oct. 2006. Disponible en <http://www.incae.edu/ES/clacds/nuestras-investigaciones/pdf/cen723.pdf>
  23. Simon M. 2006. Mycotoxins impact egg production (en línea). Consultado 20 mar. 2008. Disponible en: [www.wattpoultry.com/EggIndustry/Article.aspx?id=7450](http://www.wattpoultry.com/EggIndustry/Article.aspx?id=7450)
  24. Stubblefield, R; Shotwell, O. 1991. Transmission and Distribution of Aflatoxin in contaminated Beef Liver and Other Tissues (en línea). USDA (United States Department of Agriculture). Illinois, US. Consultado 18 ene. 2009. Disponible en [www.springerlink.com/index/J4KQ5570R7NU8157.pdf](http://www.springerlink.com/index/J4KQ5570R7NU8157.pdf)
  25. Terra Nova, Industria y Comercio S.A. 2002. Informaciones técnica: Aflatoxinas (en línea). Terra Nova, Industria y Comercio S.A. Rio de Janeiro,

- BR. Consultado 20 mar. 2008. Disponible en:  
<http://www.proumih2.com.br/es/infotec.asp>
26. USAL (Universidad de Salamanca). 2007. Obtención de yema de huevos para pruebas serológicas (en línea). USAL. Salamanca, ES. Consultado 10 mar. 2008. Disponible en:  
[http://biologia.usal.es/sitioweb/Alumnos/Practicas\\_empresas/MemoriasParaWeb/AquimisaSeroloResiduis05\\_Rebeca.pdf](http://biologia.usal.es/sitioweb/Alumnos/Practicas_empresas/MemoriasParaWeb/AquimisaSeroloResiduis05_Rebeca.pdf).
27. Valdéz, M. 2007. Diagnóstico en alimentos, la realidad en la industria (en línea). UNAM. Distrito Federal, MX. Consultado 4 mar. 2008. Disponible en:  
[www.cuautitlan.unam.mx/.../CD%20Definitivo/Marisol%20Vald%20Garc%20Da/Diagn%20F3stico%20en%20alimentos.pdf](http://www.cuautitlan.unam.mx/.../CD%20Definitivo/Marisol%20Vald%20Garc%20Da/Diagn%20F3stico%20en%20alimentos.pdf)
28. Vivas, F. 2005. Intoxicaciones en avicultura: micotoxicosis (en línea). Medellín, CL. Publicado por la Universidad de Antioquia. Consultado 20 nov. 2007. Disponible en <http://kogi.udea.edu.co/talleres/ClinicaA/Trabajos%20clinica/Grupo%201/INTOXICACIONES%20EN%20AVICULTURA.doc>
29. Whotan, S. 2007. Formación, estructura y composición del huevo (en línea). Madrid, ES. phpBB group. Consultado 23 oct. 2007. Disponible en <http://www.cocinavino.com/ensusalsa/reportajes/formacion.html>.
30. Zaghini, A; Martelli, G; Roncada, P; Simioli, M; Rizzi, L. 2006. ENVIRONMENT, WELL-BEING, AND BEHAVIOR: Mannan oligosaccharides and Aflatoxin B1 in Feed for Laying Hens: Effects on Egg Quality, Aflatoxins B1 and M1 Residues in Eggs, and Aflatoxin B1 Levels in Liver (en línea). Dipartimento di Sanita` Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, and †Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali, Universita` degli Studi di Bologna. Bologna, IT. Consultado 20 mar. 2008. Disponible en:  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15971517](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15971517)

31. Wolzak, A; Pearson, A; Coleman, T. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens (en línea). Michigan State University. Michigan, US. Consultado 20 feb. 2009. Disponible en [www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=19861313302](http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=19861313302)

# **XI. ANEXOS**

## Prueba de hipótesis:

### Obtención del valor Z:

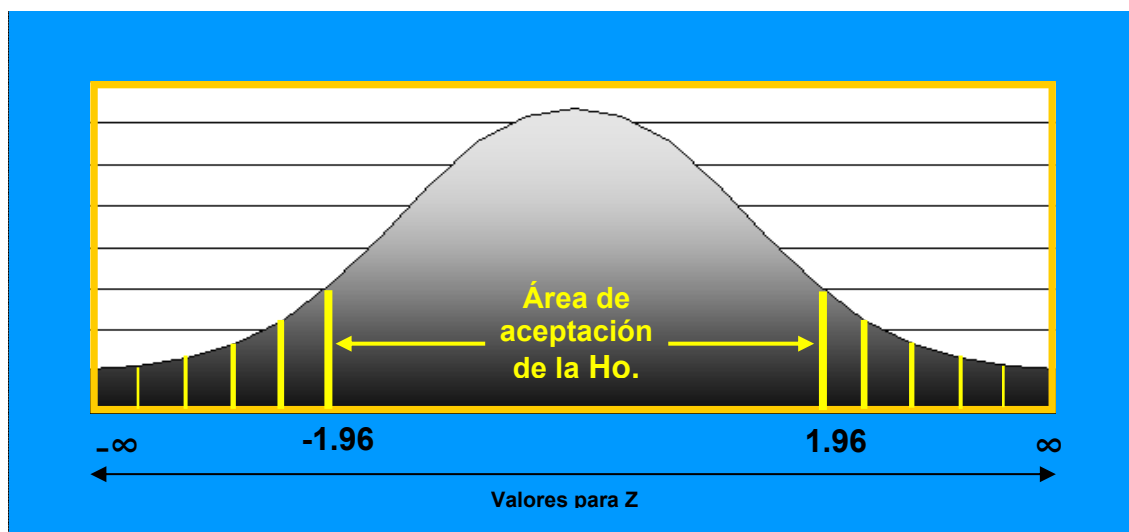
1. Para dos medias de población (entre huevo blanco y marrón):

$$Z = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

2. Para una media de población y valor sin distribución (entre una distribución ya sea de huevo blanco, marrón o en conjunto y el parámetro de la FDA): el valor Z es sustituido por un valor  $t$ , el cual se utiliza de igual forma que Z en la tabla:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \text{Límite FDA}}{\sigma_1 / \sqrt{n}}$$

**Area de Aceptación o negación de la Hipótesis nula:** Según el valor Z o  $t$ .



Obtención del valor Z (entre las medias de huevo blanco y huevo marrón):

$$Z = \frac{14.41 - 14.72}{\sqrt{\frac{10.82}{32} + \frac{8.64}{32}}} = \frac{-0.31}{0.77} = -0.4$$

**R/ Acepta Ho, no existe diferencia entre ambas distribuciones.**

Obtención del valor t (entre medias y parámetro FDA):

*Entre el huevo blanco y FDA:*

$$t = \frac{14.41 - 20}{3.29 / \sqrt{32}} = \frac{-5.59}{0.58} = -9.63$$

*Entre el huevo marrón y FDA:*

$$t = \frac{14.72 - 20}{2.94 / \sqrt{32}} = \frac{-5.28}{0.51} = -10.35$$

*Total de la distribución y FDA:*

$$t = \frac{14.49 - 20}{3.1 / \sqrt{60}} = \frac{-5.51}{0.4} = -13.77$$

**R/ Rechaza todas las Ho. Los niveles de las distribuciones separadas y en conjunto son menores a las 20 ppb.**

Imagen 1: Procesamiento de la muestra.



Imagen 2: Adición de la solución “stop”.



Imagen 3: Materiales utilizados durante el procesamiento de la muestra.



Imagen 5: Obtención de las densidades ópticas.



## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad Mes	Febrero 08	Marzo 08	Junio 08	Julio 08	Agosto 08	Marzo 09	Observaciones
1. elaboración del anteproyecto	X						
2. Presentación Seminario I		X					
3. Recolección de muestras			X				
4. Procesamiento de las muestras			X	X			
5. Análisis de los resultados					X		
6. Discusión de resultados					X		
7. Presentación de Seminario II						X	