UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 POR EL MÉTODO DE ELISA EN QUESO SECO Y OREADO QUE SE EXPENDE EN (5) MERCADOS MUNICIPALES DE LA CIUDAD CAPITAL

SONIA ARGENTINA ARAGÓN GONZÁLEZ

Médica Veterinaria

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2014

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

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 POR EL MÉTODO DE ELISA EN QUESO SECO Y OREADO QUE SE EXPENDE EN (5) MERCADOS MUNICIPALES DE LA CIUDAD CAPITAL

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

SONIA ARGENTINA ARAGÓN GONZÁLEZ

Al Conferírsele el título profesional de

Médica Veterinaria

En el grado de Licenciada

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2014

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

DECANO:	M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	Lic. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	M.Sc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Juan René Cifuentes López

ASESORES

M.V. LUIS ALFONSO MORALES RODRÍGUEZ
M.A. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA
M.A. CONSUELO BEATRIZ SANTIZO CIFUENTES

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 POR EL MÉTODO DE ELISA EN QUESO SECO Y OREADO QUE SE EXPENDE EN (5) MERCADOS MUNICIPALES DE LA CIUDAD CAPITAL

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÉDICA VETERINARIA

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:	Por darme la fuerza cada día y permitirme cumplir mi meta.
A MIS PADRES:	Victor Manuel Aragón Narváez y Damaris González Zavala
A MIS HERMANOS:	Kenia Damaris, Victor Manuel, Alma Lucia
A MI FAMILIA:	Abuelos, tías, primas, primos y sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por darme sabiduría y entendimiento para terminar mi carrera y ser Veterinaria.

A MIS PADRES: Por creer en mí, por sus sabios consejos, por el apoyo incondicional que me han dado cada día.

A MI HERMANOS: Por su cariño y paciencia.

A MIS MASCOTAS: Por enseñarme que no hacen falta las palabras para expresar lo que sienten.

A MI FAMILIA: Por su cariño y apoyo que me han brindado.

A MIS AMIGOS: Por todos los momentos compartidos y con experiencias inolvidables.

AL HOSPITAL FMVZ: Por darme la oportunidad de crecer como profesional, sus enseñanzas y aportes a mi carrera.

A MIS CLIENTES: Por brindarme su confianza, apoyo y dejarme realizar mi trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN…… 1

II. OBJETIVOS…… 2

2.1 Objetivo General…… 2

2.2 Objetivo Específicos…… 2

III. REVISIÓN DE LITERATURA…… 3

3.1 Aflatoxinas…… 3

3.1.1 Estructura química…… 3

3.1.2 Biotransformación…… 3

3.1.3 Patogenia…… 4

3.1.4 Relación entre la cantidad de AFB1 ingerida y la concentración de AFM1 en la leche…… 6

3.1.5 Distribución de AFM1 en algunos derivados…… 7

3.1.6 Toxicología y efectos biológicos en el humano…… 8

3.1.7 Legislación en la Unión Europea (UE) para aflatoxina M1... 9

3.1.7.1 Legislación en Estados Unidos de América para aflatoxina M1…… 10

3.1.8 Estabilidad de la aflatoxina M1…… 10

3.1.9 Métodos de análisis de aflatoxina M1 en leche y derivados 11

3.1.9.1 Procedimientos analíticos…… 11

3.1.9.2 Métodos…… 12

3.1.10 Control de las aflatoxinas…… 12

3.1.11 Antecedentes de contaminaciones con AFM1 en leche y derivados en algunos de Europa…… 13

3.2 Quesos…… 14

IV. MATERIALES Y MÉTODOS…… 17

4.1 Materiales…… 17

4.2 Recursos humanos…… 17

4.3 Recursos de laboratorio……... 17
4.3.1 Materiales que incluye el kit…… 17
4.3.2 Materiales y equipo de laboratorio……..…….. 18
4.3.2.1 Materiales para el procedimiento de la prueba……. 18
4.4 Recursos biológicos…… 19
4.5 Recursos de campo…… 19
4.6 Localización y descripción…… 19
4.7 Metodología……..... 19
4.8 Diseño del estudio…… 20
4.9 Descripción del estudio..…… 20
4.9.1 Procedimiento……...……...……. 20
4.9.2 Principios de la prueba……..... 21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ……..…… 22
VI. CONCLUSIONES…… 28
VII. RECOMENDACIONES…… 29
VIII. RESUMEN…… 30
SUMMARY…… 32
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…… 33
X. ANEXOS…… 35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.1
Características del queso…….16

Cuadro No. 2
Mercado Central…….22

Cuadro No. 3
Mercado La Presidenta……..…23

Cuadro No. 4
Mercado Sur 2……24

Cuadro No. 5
Mercado San Martín……..25

Cuadro No. 6
Mercado La Parroquia…….25

Cuadro No. 7
Promedio de los resultados obtenidos por el método de ELISA en 4 muestreos de 5 mercados municipales de la ciudad capital……..26

Cuadro No. 8
Número de muestras por mercado…….27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1
Gráfica de los resultados obtenidos por el método ELISA en PPT……27

I. INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas al igual que otras micotoxinas son metabolitos secundarios generalmente tóxicos producidos por algunas especies fúngicas, son producidas esencialmente por tres especies de hongos *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus,* y escasamente *Aspergillus nomius.*

Las aflatoxinas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales (esencialmente, en el maíz, trigo y arroz), las vacas lecheras al consumir alimentos contaminados con AFB1, son absorbidas vía gastrointestinal, luego dentro del sistema portal es llevada al hígado donde sufre una biotransformación, producto del metabolismo, generando la denominada AFM1 donde es excretada en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuye de forma sistémica y se va a la leche contaminándola.

Cuando la leche contaminada con aflatoxina M1 es utilizada como materia prima para la elaboración de quesos durante el proceso de coagulación aumenta su afinidad por la caseína, lo que conlleva a que la AFM1 se distribuya un 40-60% más en quesos que en la leche, estos productos son de importante aporte en la nutrición humana por lo que cobra importancia la calidad higiénica e inocuidad para la elaboración de los mismos ya que el consumo de alimentos contaminados con aflatoxina M1, constituye un riesgo para la salud humana debido a su carácter toxico, mutagénico y cancerígeno, por dicha razón la presencia de aflatoxina M1 en alimentos son monitoreadas constantemente, y son estrictos los limites establecidos en diversos países como en la Unión Europea para seguridad de la alimentaria de la población.

II. OBJETIVOS

2.1 General

Contribuir al conocimiento de los niveles de aflatoxinas en quesos madurados seco y oreado que se expenden en mercados municipales de la ciudad de Guatemala.

2.2 Específicos

Determinación de la presencia de aflatoxina M1 en queso seco tipo seco y oreado que se expenden en mercados municipales destinados para el consumo humano.

Cuantificar por el método de ELISA los niveles de la aflatoxina M1 en queso seco y oreado.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas pueden ser producidas por especies de *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus,* y escasamente *Aspergillus nomius* que contaminan las plantas y productos vegetales. *Aspergillus flavus* sólo produce aflatoxinas B1 mientras que las otras dos especies producen tanto las aflatoxinas B1, B2 así como G1, G2, designadas con estas letras según su posición y su color en los cromatogramas de capa fina examinados con luz ultravioleta. La designación de B, proviene de la fluorescencia azul (Blue) bajo exposición a la luz-UV, mientras que la designación de G, se refiere a la fluorescencia de color verde amarillo (green) de las estructuras relevantes bajo luz - UV. La aflatoxina B1 es la más activa desde el punto de vista biológico. La aflatoxina M1 es uno de los metabolitos hidrolixados de la aflatoxinas B_1 que se encuentra en la leche y en la orina, tiene aproximadamente la quinta parte del poder tóxico de la aflatoxina B1. (1, 5,6)

3.1.1 Estructura química

La aflatoxina M1 es el derivado 4-hidroxi de la aflatoxina B_1 y se secreta en la leche de los mamíferos que consumen aflatoxina B1. La aflatoxina M1 tiene una masa molecular relativa de 328 Da y tiene la fórmula molecular $C_{17} H_{12} O_{7}$. (1)

3.1.2 Biotransformación

La aflatoxina M1 es generalmente considerada como una desintoxicación subproducto de la aflatoxina B1, este metabolito está también presente en la leche de las mujeres en lactancia que comen alimentos que contienen la aflatoxina B1 se ha demostrado que existen dos estereoisómeros-endo y exo-epóxidos, siendo este último el que reacciona en forma de ADN, y una situación similar se puede aplicar a la aflatoxina M1. (1,7)

3.1.3 Patogenia

Las aflatoxinas se encuentran en el suelo y crecen rápidamente sobre materia orgánica. Sus colonias en cultivos son generalmente amarillas, verde amarillo, amarillo-marrones, o verdes; granulares, aterciopeladas, o algodonosas; y tienen una saliente periférica blanca y un margen distintivo. (6)

Aspergillus flavus al crecer en el maíz produce las aflatoxinas B_1 y B_2. El sustrato es un factor importante en la producción de aflatoxinas. Las fuentes naturales de aflatoxinas importantes son el maíz, la semilla de algodón, los cacahuates, ciertas variedades de nueces y otras semillas oleaginosas que se emplean para la alimentación del ganado lechero.(5)

Las aflatoxinas a menudo afectan los cultivos en el campo antes de la cosecha. La contaminación post cosecha puede ocurrir si las condiciones que favorecen la producción de aflatoxinas incluyen un contenido de humedad superior al 15 %, temperatura próxima a los 20-25°C y ventilación adecuada. La pérdida de integridad de los granos (esto es su rotura, su molienda o los daños producidos por los insectos o roedores) facilitan el crecimiento de hongos y la elaboración de toxinas. (5,6)

El alimento con el que se alimenta al ganado puede estar contaminado o enmohecido por proliferación de hongos del género *Aspergillus* que producen la aflatoxina B1 (AFB1). Al ingerir las vacas lecheras estos alimentos o raciones contaminadas con aflatoxina B1 es absorbida vía tracto gastrointestinal, dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde sufre una biotransformación, producto del metabolismo animal, generando la denominada aflatoxina M1. Una porción de aflatoxina es activada y fijada en los tejidos hepáticos. (5)

Algunos metabolitos conjugados de la aflatoxina B1 solubles en agua son

excretados dentro de la bilis y van a las heces. Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la aflatoxina B1 y metabolitos no conjugados de ésta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. (5)

La aflatoxina M1 se acumula en los tejidos del animal y un porcentaje es eliminado a través de los líquidos biológicos como la leche y orina, dentro de las 12 a 24 horas de ingestión del alimento contaminado o enmohecido con el hongo que produce la aflatoxina B1. La aflatoxina M1 es uno de esos derivados metabólicos que llega a la leche contaminándola. (8)

Los principales efectos biológicos de las aflatoxinas son, la inhibición de la formación de proteínas, la alteración de la función y de la integridad del hígado, la carcinogénesis y la anulación de la capacidad para desarrollar respuestas inmunes. La aflatoxina se une al ADN e impide la formación del ARN independiente del ADN. Mediante este mecanismo reduce la formación de proteínas por obstaculizar el proceso de la traducción. Se cree que esta obstaculización, de la formación de proteínas a nivel celular, es la base de gran parte de la actividad biológica de las aflatoxinas. En la toxicidad aguda la necrosis de células hepáticas es notable en la zona central de los lóbulos hepáticos junto con la necrosis peri portal, la fibrosis y la hiperplasia del conducto biliar. En los casos de toxicidad más crónica, son importantes las modificaciones de las grasas en el interior de las células hepáticas. El aumento de la actividad de las enzimas del suero es indicativo de la necrosis de las células hepáticas y la reducción de la función hepática por las aflatoxinas. Con menores dosis de aflatoxinas, se observan trastornos de coagulación de la sangre, hemorragias en las serosas y en las mucosas, ictericia y disminución del índice del crecimiento. (5)

Además de las repercusiones económicas debidas a las muertes súbitas en terneros intoxicados de forma crónica, existe una considerable baja del índice del

crecimiento, este es uno de los primeros síntomas de la aflatoxicosis y es posible que se dé sin presentar otros síntomas. (5)

Otra repercusión importante de la intoxicación por aflatoxinas es su influencia sobre la capacidad de respuesta inmune. En los animales tratados con aflatoxinas se puede poner de manifiesto el deterioro de la inmunidad adquirida en los animales afectados, disminución de las respuestas inmunes mediadas por células, disminución del complemento y actividades fagocíticas. Se ha comprobado que los efectos inmunosupresores de la aflatoxina alcanzan al feto no nacido. (5)

3.1.4 Relación entre la cantidad de AFB1 ingerida y la concentración de AFM1 en la leche

La AFM1 es el metabolito hidrolixado de la AFB1, se encuentra en la leche y derivados de la leche obtenidos de ganado lechero que ingirió un alimento contaminado con AFB1. Los residuos de AFM1 en la leche se pueden encontrar a las 6-24 horas de que una vaca haya ingerido un alimento contaminado con AFB1. (8)

En las vacas lecheras la relación entre la concentración de AFB1 (ppb) partes por billón (microgramos/ Kg) en la ración final y la de AFM1 (microgramos /litro) excretada en la leche podría ser de 300:1, sin embargo esta relación es muy aproximada ya que el rango oscila entre 34:1 a 1600:1 (8)

Con una ingestión de AFB1 correspondiente a 2-60 miligramos/ vaca/día, los residuos de AFM1 en la leche cruda puede oscilar entre 1 a 50 microgramos/ Litro. El nivel de residuos de AFM1/día (mg) en la leche cruda podría ser aproximadamente 2.2%. Esto representaría raciones finales contaminadas desde 57 hasta 1714 ppb (partes por billón) de AFB1 para consumos de 35 kg de ración/ vaca/

día. La vaca puede ya transformar AFB1 en AFM1 dentro de las 12-24 horas de ingestión del alimento contaminado. (8)

La concentración de AFB1 en la leche variará según la raza de la vaca, según la concentración de AFB1 en la ración, según la duración del consumo del alimento contaminado y según el estado de salud del animal. (8)

3.1.5 Distribución de la AFM1 en algunos derivados lácteos

Para la elaboración de quesos, la leche que se use debe ser de alta calidad, debe tenerse en cuenta como punto fundamental, la obtención de la caseína junto con los demás sólidos de la leche, separados del volumen de agua de la misma. Esto se logra coagulando la leche y luego separando el agua o suero, colándolo a presión. La cuajada o requesón, deberá hacerse bastante firme para que soporte la presión y el colado. Esta firmeza se logra agregando cuajo en extracto a la leche cuando principia a agriarse, calentado el cuajo en el suero despues que la leche se agrie o mediante la combinación de ambos métodos. (8)

La distribución de la AFM1 en algunos alimentos elaborados con leche contaminada es aproximadamente la siguiente: 40-60% en quesos, en la nata y < 2% en la mantequilla. Visto que la AFM1 es muy soluble en agua, no se comprende como la mayor parte va al queso y no al suero, la asociación de la AFM1 con la caseína, cuando esta precipita puede ser una explicación razonable para ello. (8)

La presencia de aflatoxina M1 en quesos es más compleja debido a la diversidad de procesos de fabricación y conservación. La aflatoxina M1 se une sobre todo a la parte hidrofóbica de la caseína, de modo que el cuajo del queso contiene más aflatoxina M1 que el suero. La unión de la aflatoxina M1 a la caseína se traduce en una concentración mas alta en el queso respecto a la leche

de la cual se elabora, este factor varía en función de la tecnología empleada y de la cantidad de agua eliminada durante el proceso utilizado. En quesos suaves el factor de desarrollo de la AFM1 es de 2.5-3.3 veces y en quesos maduros es de 3.9-5.8 veces durante el proceso de maduración. Por lo tanto las aflatoxinas permanecen estables en el queso y no se inactivan durante el almacenamiento y no se disminuyen tras 6 meses de maduración. En general puede esperarse que el queso contenga de 3.5 a 5 veces más aflatoxina M1 que el nivel presente en la leche que se elaboró. Todo lo anterior constituye un problema muy serio para la inocuidad. (8, 11, 13,14).

3.1.6 Toxicología y efectos biológicos en el humano

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas en los humanos son:

a) La biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina.

b) Los sinergismos entre ellas.

c) La cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido.

d) La continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado.

e) El peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste.

f) La edad del individuo. (8)

Así pues, los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal. Ellos pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación. En los niños el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar una mayor susceptibilidad a las micotoxinas que afectan al sistema nervioso central. (8)

Las aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. El principal síndrome que producen es el hepatotóxico, pudiendo también provocar problemas renales. (8)

Las aflatoxinas son inmunosupresoras ya que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica (los anticuerpos son proteínas) interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma; la absorción de los aminoácidos se ve alterada y su retención hepática aumenta. (8)

La conjugación de todos los factores antes mencionados y que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas hace que el análisis de riesgo respecto a los problemas de salud en humanos (hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, cancerígenos en inmunosupresivos) que pueden ser causados por la ingestión de esos metabolitos tóxicos, sea complejo y la mayor parte de las veces difícil de entender y correlacionar. Por otro lado la situación es aún más complicada ya que la interpretación de los datos epidemiológicos que puedan estar relacionados con una micotoxina, debemos también tener en cuenta la posible influencia de otros factores de riesgo como, el estado nutricional del individuo, las infecciones endémicas y la ingestión de otras sustancias toxicas. (8)

3.1.7 Legislación en la Unión Europea (UE) para Aflatoxina M1

La aflatoxina M1 es clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer (IARC) como clase 2B, la cual incluye a las sustancias carcinogénicas para los humanos. Por lo que su presencia en leche y derivados constituye un riesgo para la salud. (7)

Para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de AFM1 es de 0,05 microgramos/Litro o Kg (0.05 ppb). (7)

No hay legislación ni para los quesos ni para la mantequilla; sin embargo, en algunos países de Europa como Holanda y Austria, la concentración máxima permitida de AFM1 es, respectivamente, de 0,200 y 0,250 ppb para quesos, y de 0,02 y 0,02 ppb para mantequilla. (8)

3.1.7.1 Legislación en Estados Unidos de América para Aflatoxina M1

El FDA (Food and Drug Administration), entidad reguladora en USA, establece que la concentración máxima permitida de AFM1 en leche entera, semidescremada y descremada es de 0,5 ppb. (8)

Esta norma ha sido también adoptada por algunos países de la América Latina, entre ellos los que forman parte de Mercosur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay). (8)

Vemos pues, que el nivel de contaminación máximo permitido en USA y otros países del continente americano es 10 veces superior al permitido por la Unión Europea. (8)

Debido a su capacidad cancerígena, la vigilancia de residuos de aflatoxina en la leche y otros alimentos para el consumo humano es una tarea continua. (8)

3.1.8. Estabilidad de la Aflatoxina M1

Las aflatoxinas son altamente resistentes al calor y no se eliminan de los alimentos, ni con las prácticas ordinarias de cocción, ni con la pasteurización. Sin embargo, son relativamente inestables cuando se exponen a la luz y particularmente a la radiación ultravioleta. La AFM1 es soluble en cloroformo. Pueden ser químicamente degradadas con agentes oxidantes, álcalis, peróxido de hidrógeno y

con amoníaco. Pueden ser totalmente destruidas sometiéndolas al autoclave en presencia de amoníaco o por tratamiento con hipoclorito. (10, 8,13)

La AFM1 es, en general, estable en algunos quesos, yogures, leche pasteurizada, leche desnatada o entera y helados. En procesos de pasteurización a 63ºC durante 30 minutos, pasteurización a 77ºC durante 16 segundos, calentamientos a 64-100ºC durante 15-20 minutos, calentamientos directos durante 3-4 horas y en algunos procesos de pasteurización y esterilización, la concentración de contaminación original de la leche cruda permanece prácticamente inalterada. (10, 8,13)

3.1.9 Métodos de análisis de Aflatoxina M1 en leche y derivados.

Para el análisis de rutina de aflatoxinas en muestras contaminadas se puede utilizar:

3.1.9.1 Procedimientos Analíticos:

Técnica HPLC fluorescencia (cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia) permite la identificación y cuantificación de cada aflatoxina. Esta técnica se emplea también como confirmación de la técnica ELISA cuando el resultado obtenido sea positivo. (4)

Cromatografía en capa fina (TLC Thin Layer Chromatography): utilizando patrones internos y externos. La cromatografía se examina con luz ultravioleta de gran longitud de onda para manchas de fluorescencia azul o verde que coinciden en cuanto a su color y localización con los patrones externos e internos. Es posible su valoración tanto cualitativa como cuantitativa. (4)

3.1.9.2 Métodos

Sin embargo, también pueden utilizarse métodos como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedara inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato especifico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de espectrofotómetro o un colorímetro. Existen otros que detectan antígenos que se han fijado a la placa de un anticuerpo anti aflatoxina M1 y sobre los sitios de unión de este se dará una competencia ante el antígeno de la muestra y el conjugado enzimático así pues a mayor concentración de AFM1 menor la cantidad de conjugado enzimático fijado por lo que el color será inversamente proporcional a la concentración de la toxina. (4, 5,15)

3.1.10 Control de las Aflatoxinas

El control de los problemas con aflatoxinas se basa principalmente en la adecuada atención y buenas prácticas de cosecha, buenas condiciones de almacenamiento de productos sensibles. (6)

En condiciones optimas, el aumento de las aflatoxinas tiene lugar en un plazo de horas. Por esta razón se recomienda la desecación rápida del producto hasta que su porcentaje de humedad descienda por debajo del 14 porciento o el empleo de adsorbentes para impedir el crecimiento de hongos en los productos de elevado contenido de humedad. (6)

Es fundamental almacenar los productos sensibles en depósitos con condiciones adecuadas de temperatura, aeración y humedad. La existencia de concentraciones de aflatoxina posiblemente peligrosas en las cosechas del campo durante determinadas épocas del año, parece inevitable se pueden reducir al mínimo sembrando variedades resistentes a las aflatoxinas, mediante el empleo apropiado de insecticidas, y reduciendo al mínimo el estrés debido al tiempo atmosférico siempre que sea posible.(6)

Un tratamiento para la descontaminación de aflatoxinas es la adición de adsorbentes químicos, tales como aluminiosilicato hidratado de calcio y sodio (HSCAS) a la dieta de animales. HSCAS posee la capacidad de atar y de inmovilizar firmemente las aflatoxinas en el aparato gastrointestinal de animales, dando por resultado una reducción importante en biodisponibilidad de la aflatoxina. (5, 6)

3.1.11 Antecedentes de contaminaciones con AFM1 en leche y derivados en algunos países de Europa

En Portugal en 1981 fueron analizadas 74 muestras de leche cruda, 39% fueron positivas en AFM1 en concentraciones comprendidas entre 0.06 y 0.065 ppb, y alguna muestra con 0.180 ppb. Los autores indican que en leches comerciales pasteurizadas y UHT (ultra high temperatura-treated) fueron encontrados rangos de contaminación semejantes, aunque el número de muestras analizadas fue menor. (8)

En Italia durante los años 1991 y 1994 fueron analizadas 223 muestras de quesos (Grana Padano), de las cuales 91% estaban contaminados con AFM1 en concentraciones comprendidas entre 0.005 y 0.100 ppb, y solo el 6.7% presentaba rangos de contaminación entre 0.100 y 0.250 ppb. En 1995, fueron analizadas 159 muestras de leche líquida, 97 de leche en polvo para niños y 114 de yogur. La

leche líquida presentaba rangos de contaminación con AFM1 de < 0.001 a 0.108 ppb, media de 0.0102 ppb (el 86%). En la leche en polvo los rangos fueron de < 0.001 a 0,103 ppb, media de 0,0218 ppb (el 84%), y en los yogures las contaminaciones fueron entre < 0,001 y 0,496 ppb, media de 0,018 ppb.(8)

En Italia durante 1996 fueron analizadas 161 muestras de leche líquida, 92 de leche en polvo para niños y 120 de yogur. La leche líquida presentaba contaminaciones con AFM1 entre < 0.001 y 0.0235 ppb, media de 0,0063 ppb (el 78%). En la leche en polvo los rangos fueron de < 0.001 a 0.0796 ppb, media de 0.0322 ppb (el 53%), y en los yogures las contaminaciones se situaron entre < 0.001 y 0,0321 ppb, media de 0,009 ppb (el 61%) (8)

En Alemania durante 1996 fueron analizadas 284 muestras de leche líquida con niveles de AFM1 inferiores a 0,01 ppb. En Holanda durante 1994, unas 15 muestras de derivados de leche presentaron contaminaciones inferiores a 0.02 ppb y 19 muestras de alimentos para niños a base de leche estaban contaminadas con AFM1 entre 0,02 y 0,06 ppb. (8)

En cuanto a quesos, estudios efectuados en Francia e Italia desde los años 1991 a 1995 reflejaron contaminaciones entre < 0.005 y 0.25 ppb en un total de 311 muestras analizadas; sin embargo, el mayor porcentaje (65%) presentaba contaminaciones entre 0.005 y 0.10 ppb. (8)

Desde 1996 en algunos países de Europa como Francia, Italia, Alemania, Holanda y Portugal los niveles de contaminación con AFM1, oscilaron entre < 0.001 y 0.060 ppb para leche líquida comercial; < 0.001 y 0.080 ppb para leche en polvo; < 0.001 y 0.098 ppb para yogures y < 0,005-0,500 para quesos. (8)

3.2 Quesos

El queso es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y se-

paración de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos. (3)

Quesos madurados: dentro de esta categoría se encuentran la mayor parte de los quesos. Se distinguen de los quesos frescos porque sufren de forma progresiva y durante un tiempo más o menos largo, complejas transformaciones bioquímicas. En el curso de la maduración, los componentes de la cuajada fresca se transforman en distintos productos más solubles. Es precisamente la naturaleza de estos nuevos productos, su diversidad y sus proporciones relativas, lo que hace que cada queso tenga su sabor típico además de un aroma, aspecto, textura y consistencia característica y diferente de las demás variedades. (3)

Por lo tanto se puede decir que cada tipo de queso es el resultado de un proceso de maduración dirigido, modificado y combinado de los distintos parámetros que intervienen en los mecanismos madurativos de los que se pueden obtener centenares de quesos distintos. (3)

Para este estudio se utilizaron 2 tipos de quesos madurados ya que para su elaboración se utiliza leche sin pasteurizar además es más probable encontrar aflatoxina M1 que en quesos frescos por el proceso de maduración y por el tiempo que pasa en temperatura y humedad ambiente antes de su consumo por lo que es más probable encontrar la presencia de aflatoxinas.

El queso seco y oreado son quesos madurados fabricados artesanalmente en Guatemala. En los que para su elaboración se utiliza leche semidescremada, el proceso para ambos quesos es el mismo, sus características son: [1]

[1] Aspuac, F. 2014. Guatemala, lechería de la granja experimental, FMVZ. USAC: (comunicación personal)

Cuadro No. 1. Características del queso seco y oreado.

CARACTERÍSTICAS	SECO (10 LBS DE MASA DE QUESO)	OREADO (10 LBS DE MASA DE QUESO)
Cantidad de sal	1 libra de sal	6 onz de sal
Tiempo de maduración	1 mes	1 semana
Humedad	5%	15%
Acidez	10%	5%

Fuente: Elaboración propia

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.2 Recursos humanos

- Estudiante investigadora
- 3 Asesores

4.3 Recursos de laboratorio

Kit de ELISA de laboratorios Romers ®

4.3.1 Materiales que incluye el kit

- 96 microplacas (sellado en una bolsa de papel de aluminio)
- 6 ampollas de 1,5 ml de cada aflatoxina estándar (0, 5, 10, 30, 50 y 100 pg/ml) listos para usar
- 1 frasco de 6 ml de aflatoxinas conjugado listo para usar
- 1 frasco de 11 ml de solución de sustrato listo para usar
- 1 frasco de 11 ml de solución de parada listo para usar
- 1 frasco de 60 ml de muestra diluyente (PBS-BSA) listo para usar
- 1 frasco de 60 ml de búfer con 10 X de concentrado de lavado. Debe diluirse a 1 + 9 con agua destilada. En caso de precipitaciones de cristal cuando las condiciones de almacenamiento es fría, el concentrado de debe ser calentado a 37 ° C durante 15 minutos antes de dilución

- 2 piezas de láminas de plásticos para cubrir las tiras en la bolsa de plástico de incubación
- Bolsa plástica para almacenar tiras de microplacas no utilizadas

4.3.2 Materiales y equipo de laboratorio

- Refrigeradora
- Balanza
- Cilindro graduado 100ml
- Agitador magnético
- Centrífuga
- Sistema de evaporación
- Solvente metanol, diclorometano, y hexano
- Agua destilada

4.3.2.1 Materiales para el procedimiento de la prueba

- Pipetas multicanal
- Pipetas de un solo canal con capacidad de pipetear 50, 100, 500 y 1000 ul
- Cronómetro
- Botella de lavado
- Toallas de papel

4.4 Recursos biológicos

- 84 muestras de queso seco y oreado que se expenden en los 5 mercados municipales en estudio.

4.5 Recursos de campo

- Cuaderno
- Lapicero
- Hielera
- Hielo
- Masking tape
- Marcador
- Bolsas Ziploc ®
- Vehículo de transporte

4.6 Metodología

4.7 Localización y descripción

El proyecto se realizó en 5 mercados municipales de la capital (Mercado San Martín de Porres, Mercado Central, Mercado La Parroquia, Mercado La Presidenta y Mercado Sur 2) muestreando un total de 11 queserías de dichos mercados obteniéndose una muestra de 4 onzas de queso seco y 4 onzas de tipo oreado en cada uno de los expendios de queso.

4.8 Diseño del estudio

El estudio descriptivo longitudinal se realizó de la siguiente manera:

Se realizaron 4 muestreos semanales por conveniencia. Cada muestreo se realizó en un intervalo de tiempo de una semana entre cada uno, muestreando las 11 queserías de los 5 mercados cada semana.

Hasta completar las 84 muestras en las 4 semanas.

4.9 Descripción del estudio

Cada semana se compraron 4 onzas de cada tipo de queso (seco y oreado) en los 11 expendios de los 5 en estudio.

Se identificó cada una de las muestras en donde fue comprada, tipo de queso y la fecha correspondiente.

Se transportaron en hielo hacia el laboratorio de avicultura de la FMVZ.

En el laboratorio se refrigeraron las muestras hasta completar los cuatro muestreos.

Se analizó a cada una de las muestras por medio de ELISA que es una prueba directa y cuantitativa que determina la presencia de aflatoxina M1 para el uso en leche y subproductos de leche.

4.9.1 Procedimiento:

Pesar 2 gramos de la muestra de queso, y en un frasco adicioné 40ml de diclorometano.

Mezclar por 30 minutos centrifugando a 260rpm a temperatura ambiente.

Tomar 5 ml de la muestra y evaporar a 60°C bajo una corriente de nitrógeno o usando un sistema de evaporación. Re-disolver el residuo en una mezcla de 0.5ml PBS, 0.5 ml de metanol y 1.0 ml de hexano.

Tomar 0.4ml en la etapa de aqueous/metanolico y diluir con 0.6 microlitros de la muestra diluida.

La muestra está lista para el kit de ELISA.

4.9.2 Principios de la prueba

Es una prueba directa ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). La superficie de los microtubos está recubiertos por los anticuerpos de la aflatoxina M1. Los estándares se añaden a los microtubos en donde la aflatoxina M1 se liga a la pared de los microtubos recubiertos con anticuerpos de la aflatoxina M1. Después 60 minutos de incubación a temperatura ambiente los microtubos se lavan con la solución diluida de lavado para eliminar materiales sueltos. Se agrega el conjugado de la aflatoxina y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los micro tubos se lavan para eliminar conjugado suelto. Tras el paso de lavado, la solución de sustrato es añadida y se incuba durante 40 minutos, el resultado es el desarrollo de un color azul. Se detiene el desarrollo de color mediante la adición de una solución de parada. Y el color azul, a continuación, cambia a amarillo. Los microtubos con el color amarillo resultante se miden ópticamente mediante un lector de micro-placas con filtro de absorbancia óptica de azul de 450nm. La prueba trae estándares con controles negativos y positivos que van de 0 ppt a 100 partes por trillón (ppt)

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los siguientes cuadros se presentan los resultados de las 84 muestras de lectura en ELISA partes por trillón (PPT)

Cuadro No. 2. MERCADO CENTRAL

NO. MUESTRA	TIPO DE QUESO	FECHA	RESULTADO ELISA PPT
1	SECO	07/05/2012	1.220
2	SECO	07/05/2012	1.403
3	SECO	14/05/2012	1.364
4	SECO	14/05/2012	1.252
5	SECO	21/05/2012	1.340
6	SECO	21/05/2012	1.314
7	SECO	28/05/2012	1.165
8	SECO	28/05/2012	1.385
9	OREADO	07/05/2012	1.241
10	OREADO	07/05/2012	1.342
11	OREADO	14/05/2012	1.378
12	OREADO	14/05/2012	1.233
13	OREADO	21/05/2012	1.252
14	OREADO	21/05/2012	1.305
15	OREADO	28/05/2012	1.214
16	OREADO	28/05/2012	1.283

Fuente: Elaboración propia

Cuadro No. 3. MERCADO LA PRESIDENTA

NO. MUESTRA	TIPO DE QUESO	FECHA	RESULTADO ELISA PPT
17	SECO	07/05/2012	1.012
18	SECO	07/05/2012	1.034
19	SECO	14/05/2012	1.053
20	SECO	14/05/2012	0.970
21	SECO	21/05/2012	1.169
22	SECO	21/05/2012	1.322
23	SECO	28/05/2012	1.305
24	SECO	28/05/2012	1.235
25	OREADO	07/05/2012	1.223
26	OREADO	07/05/2012	1.207
27	OREADO	14/05/2012	1.223
28	OREADO	14/05/2012	1.271
29	OREADO	21/05/2012	1.242
30	OREADO	21/05/2012	1.259
31	OREADO	28/05/2012	1.239
32	OREADO	28/05/2012	1.170

Fuente: Elaboración propia

Cuadro No 4. MERCADO SUR 2

NO. MUESTRA	TIPO DE QUESO	FECHA	RESULTADO ELISA PPT
33	SECO	07/05/2012	1.270
34	SECO	07/05/2012	1.248
35	SECO	07/05/2012	1.095
36	SECO	14/05/2012	1.103
37	SECO	14/05/2012	1.340
38	SECO	14/05/2012	1.355
39	SECO	21/05/2012	1.185
40	SECO	21/05/2012	1.194
41	SECO	21/05/2012	1.169
42	SECO	28/05/2012	1.188
43	SECO	28/05/2012	1.218
44	SECO	28/05/2012	1.276
45	OREADO	07/05/2012	1.145
46	OREADO	07/05/2012	1.204
47	OREADO	07/05/2012	1.173
48	OREADO	14/05/2012	1.217
49	OREADO	14/05/2012	1.316
50	OREADO	14/05/2012	1.238
51	OREADO	21/05/2012	1.104
52	OREADO	21/05/2012	1.107
53	OREADO	21/05/2012	1.230
54	OREADO	28/05/2012	1.164
55	OREADO	28/05/2012	1.124
56	OREADO	28/05/2012	1.130

Fuente: Elaboración propia

Cuadro No. 5. MERCADO SAN MARTIN

NO. MUESTRA	TIPO DE QUESO	FECHA	RESULTADO ELISA PPT
57	SECO	07/05/2012	1.043
58	SECO	14/05/2012	1.286
59	SECO	21/05/2012	1.175
60	SECO	28/05/2012	1.147
61	OREADO	07/05/2012	1.256
62	OREADO	14/05/2012	1.091
63	OREADO	21/05/2012	1.115
64	OREADO	28/05/2012	1.144

Fuente: Elaboración propia

Cuadro No. 6. MERCADO LA PARROQUIA

NO. MUESTRA	TIPO DE QUESO	FECHA	RESULTADO ELISA PPT
65	SECO	07/05/2012	1.166
66	SECO	07/05/2012	1.030
67	SECO	07/05/2012	1.086
68	SECO	14/05/2012	1.127
69	SECO	14/05/2012	1.170
70	SECO	14/05/2012	0.053
71	SECO	21/05/2012	0.956
72	SECO	21/05/2012	1.227
73	SECO	21/05/2012	1.200
74	SECO	28/05/2012	1.024
75	OREADO	07/05/2012	0.768
76	OREADO	07/05/2012	0.898
77	OREADO	07/05/2012	1.124
78	OREADO	14/05/2012	1.155
79	OREADO	14/05/2012	0.954
80	OREADO	14/05/2012	1.153
81	OREADO	21/05/2012	0.980
82	OREADO	21/05/2012	0.997
83	OREADO	21/05/2012	1.044
84	OREADO	28/05/2012	1.096

Fuente: Elaboración propia

El objetivo del estudio fue determinar por medio del método de elisa la presencia de aflatoxina M1 en muestras de queso seco y oreado que se expenden en 5 mercados municipales de la ciudad capital, se realizaron 4 muestreos para obtener una muestra significativa y para ver si había diferencia en los resultados de las muestras de cada semana: con los resultados del análisis de cada tipo de queso se determinó la presencia de la aflatoxina M1 en los quesos y se obtuvo de los resultados el promedio de cada uno de los quesos.

Cuadro No. 7. Promedio de los resultados obtenidos de aflatoxina M1 por el método de ELISA en queso seco y oreado de 4 muestreos en 5 mercados municipales de la ciudad capital.

TIPO DE QUESO	No. DE MUESTRAS	PROMEDIO AFLATOXINA M1 (PPT)) [a]	PROMEDIO AFLATOXINA M1 (PPB) [b]
SECO	42	1.164	0.001164
OREADO	42	1.167	0.001167

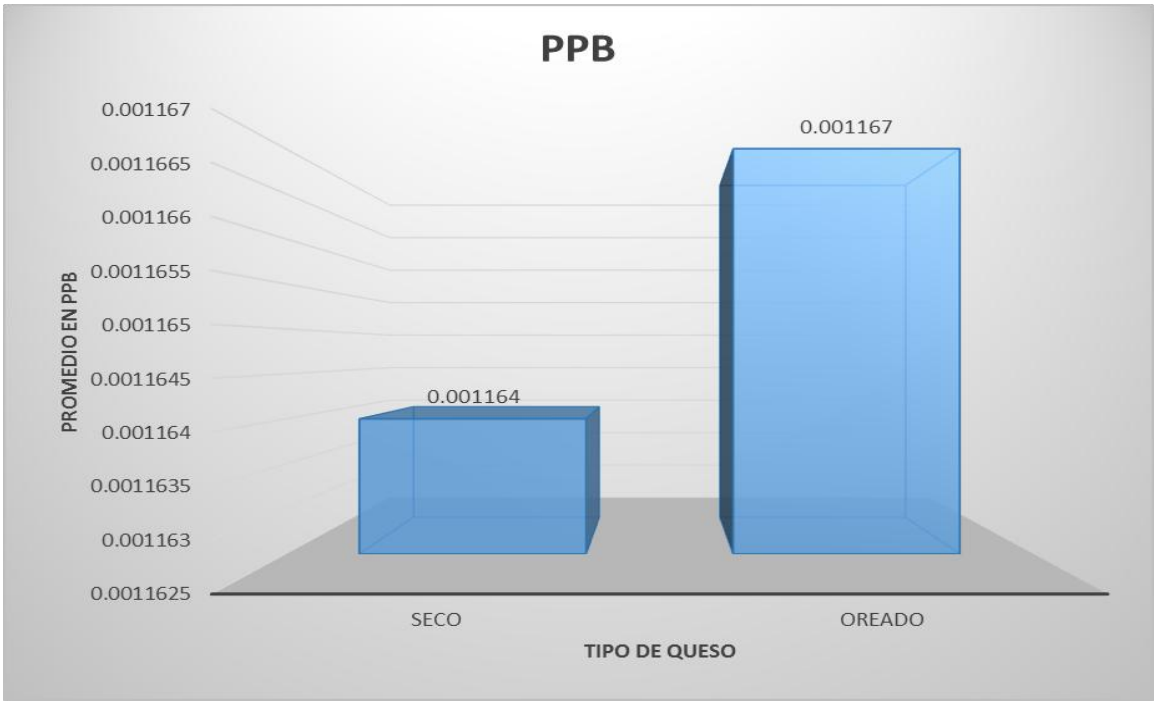
Fuente: Elaboración propia

a. PPT: partes por trillón

b: PPB: partes por billón

Con los resultados obtenidos en todas las muestras se pudo determinar la presencia de aflatoxina M1 en quesos secos y oreados que se expenden en mercados municipales de la ciudad de Guatemala, al analizar los promedios del queso seco y oreado se observó que no hubo diferencia significativa entre ambos quesos y a pesar de haber encontrado la presencia de la aflatoxina en estos no representan un riesgo para el consumidor ya que los niveles están por debajo de los estándares establecidos en países europeos como Holanda y Austria donde la concentración máxima permitida de AFM1 es de 0.200 – 0.250 ppb para quesos.(7)

Figura.1 Gráfica de los resultados obtenidos por el método de ELISA en PPB.



Fuente: Elaboración propia

Cuadro No. 8. Número de muestras por mercado

MERCADO	No. MUESTRAS QUESO TIPO SECO	No. MUESTRAS QUESO TIPO OREADO	TOTAL
CENTRAL	8	8	16
LA PRESIDENTA	8	8	16
SAN MARTIN	4	4	8
LA PARROQUIA	10	10	20
SUR 2	12	12	24
Total	42	42	84

Fuente: Elaboración propia

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de aflatoxina M1 en queso seco y oreado en los 5 mercados municipales de la ciudad de Guatemala por el método de ELISA.

- Se cuantificó la presencia de la aflatoxina M1 en queso seco en un promedio de (0.001164 ppb) y oreado (0.001167 ppb) no encontrando diferencia significativa de la cantidad de aflatoxina M1 entre ambos.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios en diferentes zonas geográficas del país para ampliar el panorama actual de la presencia de la aflatoxina M1 en subproductos lácteos destinados al consumo humano, tomando medidas preventivas y de control para el bienestar de la población debido a su importancia en salud pública.

- Divulgar la situación de las aflatoxinas en subproductos lácteos y de los riesgos que representan para la salud humana.

- Que las autoridades competentes incluyan en las Normas COGUANOR de Guatemala los límites mínimos y máximos de las aflatoxinas en leche y derivados lácteos.

VIII. RESUMEN

Las aflatoxinas al igual que otras micotoxinas son metabolitos secundarios generalmente tóxicos, son producidas esencialmente por tres especies de *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus,* y escasamente *Aspergillus nomius.*

Siendo la leche la materia prima para la elaboración de quesos la presencia de la aflatoxina M1 en quesos es más compleja debido a la diversidad de procesos que lleva su elaboración, maduración y la estabilidad de estas en el queso.

El fin del estudio fue determinar por medio del método de Elisa la presencia de aflatoxina M1 en muestras de queso seco y oreado que se expenden en 5 mercados Municipales de la ciudad capital; con los resultados del análisis de cada tipo de queso se determinó la presencia de la aflatoxina M1 en los quesos y se obtuvo de los resultados el promedio de cada uno de los quesos.

La inocuidad de la leche se ve afectada, por el forraje del que se alimenta el ganado. Este puede evidenciar proliferación de hongos del género *Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus* que producen la aflatoxina B1 (AFB1). Al ingerir las vacas lecheras estos alimentos o raciones contaminadas con AFB1 en el organismo del animal estas sufren una biotransformación, producto del metabolismo animal, generando la denominada AFM1. La Aflatoxina M1 es el metabolito hidrolizado de aflatoxina B1 acumulada en los hígados de los animales, el cual es posteriormente excretado a través de la orina y la leche.

Se muestrearon dos tipos de queso seco y oreado obteniendo 42 muestras de cada tipo de queso obteniendo un promedio de (1.164 ppt – 0.001164 ppb) para queso seco y (1.167 ppt-0.001167 ppb) para el oreado.

Al analizar los promedios del queso seco y oreado se observó que no hubo diferencia significativa; sin embargo la concentración está por debajo del límite establecido en quesos por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer (IARC) establecido en algunos países de Europa como Holanda y Austria, la concentración máxima permitida de AFM1 es de 0,200- 0,250 ppb para quesos (7).

SUMMARY

Aflatoxins as other mycotoxins produced by certain fungal species generally toxic secondary metabolites, are essentially by three species of *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomiurs* rare.

Being the raw material milk for cheese making the presence of aflatoxin M1 in cheese is more complex due to diversity of processes that leads its development, maturation and stability of these in the cheese.

The purpose of the study was to determine the presence through the Elisa method of aflatoxin M1 in samples of dry cheese and aired chesse that is sold on 5 municipal markets in the capital city; with the results of the analysis of each type of cheese was determined the presence of aflatoxin the results and obtained the average of each of the cheeses.

The safety of milk is affected by forage fed cattle. This may show proliferation of fungi of genus Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus produced aflatatoxin B1 (AFB1).By eating these foods diaty cow rations contaminated with AFB1or in the body of the animal these undergo biotransformation product of animal metabolism, generating the so-called AFM1. Aflatoxin M1 metabolite es hydrolyzed Aflatoxin B1 accumulated in the livers of animals, which is then excreted via urine and milk.

Two types of cheese were sampled dry cheese and aired cheese obtaining 42 samples of each type of cheese obtaining by averaging (1.164 ppt-0.001162 ppb) for dry cheese (1.1167ppt-0.00167 ppb) for aired cheese.

When analyzing he averages of dry cheese and aired it was observed that no significant difference; however the concentration is below the limit set by the in-

ternational agency for cancer research (IARC) established in some European countries like Netherlands and Austria, the maximum allowable concentration of AFM1 is 0,200-0,250 ppb for cheeses (7)

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aflatoxina M1 (en línea). Consultado 10 nov. de 2010.Disponible en http://translate.google.es/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm&ei=t-XQTOLPGcWblgf-x-nhDA&sa=X&oitranslate&ct=result&resnum=14&ved=CEoQ7gEwDQ&prev=/search%3Fq%3DAFLATOXINA%2BM1%26hl%3Des%26prmd%3Di

2. Aflatoxina (en línea). Consultado 10 nov. 2010. Disponible en http://es.wikipedia.org/wiki/Aflatoxina

3. Amiot J.1991. Ciencia y tecnología de la leche, principios y aplicaciones. España, Editorial Acribia. Pag. 283

4. Análisis de micotoxinas en los alimentos (en línea) Consultado 07 mar. 2011. Disponible en http://www.ainia.es/web/acerca-de-ainia/credencialeseditacines-enac/-/articulos/y2cJ/content/acreditacion-enac:-analisis-de-micotoxinas-en-los-alimentos

5. Biberstein Ernest, Chung Zee Yuan. 1990. Tratado de Microbiología Veterinaría. Ramis Verges Manuel 1ed. España, Editorial Acribia. Págs. 398-400.

6. Cornejo J; Villarroel O. Antecedentes Generales sobre las Aflatoxinas y otras Micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el Diseño de Prácticas Correctas de Cultivo y Elaboración de Nueces. Chile. (en línea) Consultado el 09 mar. 2011. Disponible en http:// www.red salud.gov.cl/portal/url/ítem/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf.

7. Díaz, G, 2007. Aflatoxina M1: Un Carcinógeno en la Leche. Laboratorio Médico Veterinario LMV Ltda. (En línea). Consultado 3 nov. 2010. Disponible en http://lmvltda.com/index.php?section=21

8. Gimeno, A. 2005. Aflatoxina m1 en la leche. Riesgos para la salud pública, prevención y control. (en línea) Consultado 10 nov. 2010. Disponible en http:

//www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/aflatoxina-leche-riesgos-salud-t372/p0.htm

9. Montaño, V. 2007. Estudio toxicológico de presencia de Aflatoxina m1 en leche bovina recolectada del municipio de Achacachi. Revista boliviana de química (en línea) consultado 3 nov. 2010. Disponible en www.scielo. org.bo/pdf/rbq/v24n1/v24n1a16.pdf

10. Packer Merchant.1980. Bacteriología y Virología Veterinarias. 3ed. España, Editorial Acribia. Págs. 580-581.

11. Robinson R.K. 1987. Microbiología Lactológica. Sanz Bernabé, Ordoñez Juan Antonio. España, Editorial Acribia. Vol.II. Pág. 214.

12. Scott R; Robinson R. K; Wilkey. 1998. Fabricación del Queso. Barrado Andres Marcos. 2 ed. España, Editorial Acribia. Cap.20

13. Soriano del Castillo José Miguel. 2007. Micotoxinas en alimentos Ediciones Díaz Santos (en línea). Consultado 12 nov. 2010. Disponible en http://books.google.es/books?id=wgRVcFvk--IC&pg=PA185&lpg=PA185&dq=AFLATOXINA+M1&source=bl&ots=IQ4-X_8rG1&sig=ps52IyNtRg0CHkjldult&dat4Q1ghTJQ&hl=es&ei=G_rQTK_cGISKlwfUm8SqDA&sa=X&oi=book_resct=result&resnum=5&ved=0CDQQ6AEwBDge#

14. Técnica Elisa (en línea) Consultado 09 mar. 2011. Disponible en http://www.slideshare.net/dicoello/metodo-de-elisa-y-microelisa.

15. Urban G; Pérez J; Martinez, Diaz G; Castro R,Vega S, Gutierrez R; Escobar R, 2009. Niveles de Aflatoxina m1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. La Habana Cuba, Revista Salud Animal (en línea) Consultado 12 nov. 2010. Disponible en http//scielo.sld.cu.php? ?pid=S0253-570X2009000200007&script=sci_arttext

X. ANEXOS

ANEXO I

TABULACION DE DATOS

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FECHA_____ PROTOCOLO#_____

PESO: _____ TIPO DE QUESO _____

No MUESTRA	MERCADO	RESULTADO DE ELISA/ PPT

PPT: partes por trillón