

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a sun, and a cross. Above the shield are three golden crowns. The shield is flanked by two golden lions. The entire emblem is set against a blue background. The Latin motto "SIGILLUM UNIVERSITATIS CAROLINAE ACACIAE COACTEMALENSIS INTER CETERAS CONSPICUA" is inscribed around the perimeter of the seal.

ANÁLISIS DE CINCO DIFERENTES MICOTOXINAS EN MUESTRAS
DE ALIMENTOS TERMINADOS PARA AVES DE CORRAL,
REMITIDAS AL LABORATORIO DE ORNITOPATOLOGÍA Y
AVICULTURA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.
PERÍODO DE JULIO DE 2007 A JUNIO DE 2008.

LEONIDAS ANIBAL GÓMEZ GRIJALVA

GUATEMALA, JULIO DE 2009.

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

ANÁLISIS DE CINCO DIFERENTES MICOTOXINAS EN MUESTRAS
DE ALIMENTOS TERMINADOS PARA AVES DE CORRAL,
REMITIDAS AL LABORATORIO DE ORNITOPATOLOGÍA Y
AVICULTURA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.
PERÍODO DE JULIO DE 2007 A JUNIO DE 2008.

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETETINARIA Y ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA

POR

LEONIDAS ANIBAL GÓMEZ GRIJALVA

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

MÉDICO VETERINARIO

GUATEMALA, JULIO DE 2009.

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

DECANO: Med. Vet. LEONIDAS ÁVILA PALMA

SECRETARIO: Med. Vet. MARCO VINICIO GARCIA URBINA

VOCAL I: Med. Vet. YERI EDGARDO VÉLIZ PORRAS

VOCAL II: M.Sc., Med. Vet. FREDY ROLANDO GONZÁLEZ GUERRERO

VOCAL III: Med. Vet. Y Zoot. MARIO ANTONIO MOTTA GONZÁLEZ

VOCAL IV: Br. DAVID GRANADOS DIESELDORFF

VOCAL V: Br. LUIS GUILLERMO GUERRA BONE

ASESORES

M.Sc., M.V. CONSUELO BEATRIZ SANTIZO CIFUENTES

M.SP., M.V. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA

M.Sc., M.V. DENNIS SIGFRIED GUERRA CENTENO

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, PRESENTO A
CONSIDERACIÓN DE USTEDES EL TRABAJO DE TESIS TITULADO:

ANÁLISIS DE CINCO DIFERENTES MICOTOXINAS EN MUESTRAS
DE ALIMENTOS TERMINADOS PARA AVES DE CORRAL,
REMITIDAS AL LABORATORIO DE ORNITOPATOLOGÍA Y
AVICULTURA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.
PERÍODO DE JULIO DE 2007 A JUNIO DE 2008.

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

MÉDICO VETERINARIO

TESIS QUE DEDICO

- A DIOS** Por darme la vida, por su infinito amor, bendición, sabiduría y acompañamiento a lo largo de toda mi vida.
- A LA TIERRA** Por proveerme de hogar y sustento.
- A MIS BISABUELOS** Manuel López Zapeta (Q.E.P.D.) y Dorotea Matzar (Q.E.P.D.), por su legado, humanidad y ejemplo digno a seguir.
- ABUELOS (AS)** Por su legado, espíritu de lucha y ejemplo que Inculcaron.
- A MI PADRE Y MADRE** Leonidas Gómez López y Vicenta Grijalva López por darme la oportunidad y la confianza para continuar mis estudios universitarios. Por sus sabios consejos y fundamentalmente por el apoyo espiritual.
- A FRANCIS Y DORO** Por su decisivo respaldo, que me permitió y dio la libertad de recorrer con mayor facilidad este camino académico.
- A CÉSAR AUGUSTO** Por facilitar el inicio de mis estudios universitarios.
- A MIS HERMANOS** Cristina, Julio, Manuel, Angel, Óscar y Rodrigo, por el apoyo incondicional, la paciencia y comprensión que cada uno me ha brindado siempre.
- A MIS SOBRINAS (OS)** Amparo, Armenio, Sergio, Eder, Vicenta, Alondra y María Fernanda, por compartir conmigo momentos inolvidables. Todos junto a Jordan Joel, Emanuel Estuardo y Joshua Salvador porque son parte importante de mi vida.
- A MI ALMA MÁTER** La Universidad de San Carlos de Guatemala, por los conocimientos que obtuve y por los cinco años de apoyo becario.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi padre, madre, hermanos y hermanas.

A mi patria Guatemala.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A todo el personal administrativo y profesional de Sección Socioeconómica, especialmente a la Lic. Cruz Haydee Quiroa.

A mis asesores: M.Sc., M.V. Consuelo Beatriz Santizo Cifuentes, M.SP., M.V. Jaime Rolando Méndez Sosa y M.Sc., M.V. Dennis Sigfried Guerra Centeno.

A mis padrinos: Med. Vet. Manuel Eduardo Rodríguez Zea y Med. Vet. Lucrecia Emperatriz Motta.

Al personal técnico del Laboratorio de Ornitopatología y Avicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, especialmente a doña Chusita y Diego.

A la Médica Veterinaria Sunny Paola Morataya.

A mis catedráticos y catedráticas por todas las enseñanzas y experiencias académicas que me brindaron durante mi formación profesional.

A mis amigos y amigas: Alejandra Martínez, Ana Lucía Barrios, Ana Lucía de León, Ana Lucía Peña, David Sierra, Candy Reyes, Daniela Villatoro, Diana Ángel, Edgar Bailey, Eduardo Salguero, Esteban Fuentes, Gabriela Otzoy, Gerardo Toledo, Guillermo González, Héctor Morales, Juan José Chávez, Luis Gabriel Rosales Orellana, Marisol González Cárdenas, Manuel Mejía, Manuel Antonio Lepe López, Paola Vásquez, Roberto Bámaca Rios, Rodrigo Girón, Romeo Solórzano.

A mis compañeros, compañeras y a todas las personas que me apoyaron y acompañaron a lo largo de todos estos años de vida universitaria.

¡GRACIAS!.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	1
II. HIPÓTESIS.	2
III. OBJETIVOS.	3
3.1 General.	3
3.2 Específicos.	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA .	4
4.1 Generalidades de las micotoxinas.	4
4.2 Clasificación de las principales micotoxinas que afectan a aves de corral.	5
4.2.1 Aflatoxinas (AF).	5
4.2.1.1 Modo de acción.	5
4.2.1.2 Síntomas y lesiones en aves de corral.	6
4.2.2 Ocratoxinas (OT).	7
4.2.2.1 Modo de acción.	8
4.2.2.2 Síntomas y lesiones en aves.	8
4.2.3 Fumonisinias.	9
4.2.3.1 Modo de acción.	9
4.2.3.2 Síntomas y lesiones en aves de corral .	10
4.2.4 Tricotecenos (TCT).	11
4.2.4.1 Modo de acción.	11
4.2.4.2 Toxina T-2.	12
4.2.4.2.1 Síntomas y lesiones en aves de corral.	12
4.2.4.3 Deoxinivalenol, Vomitoxina ó DON.	13
4.2.4.3.1 Síntomas y lesiones en aves de corral.	13
4.3 Regulaciones de micotoxinas en alimentos para aves de corral y otros animales domésticos.	14
4.4 Procedimientos de muestreo..	14
4.5 Métodos de análisis.	15

4.5.1 Procesos químicos.	15
4.5.1.2 Ensayos inmunoenzimáticos.	16
4.6 Prevención y control.	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
5.1 Área de estudio.	17
5.2 Recursos humanos.	17
5.3 Materiales y equipo.	17
5.4 Métodos.	18
5.4.1 Toma y transporte de las muestras.	18
5.4.2 Recepción de las muestras y registro de datos.	18
5.4.3 Preparación de las muestras y extracción de micotoxinas	18
5.4.4 Ensayo.	19
5.5 Análisis estadístico.	19
5.5 Centros de referencia.	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	20
VII. CONCLUSIONES.	23
VIII. RECOMENDACIONES.	24
IX. RESUMEN.	25
X. BIBLIOGRAFÍA.	26
XI. ANEXOS.	30
XII. APÉNDICES	40

I. INTRODUCCIÓN.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos, que pueden contaminar alimentos terminados y materias primas como granos, harinas y subproductos. Su importancia radica en que afectan a los animales, reduciendo la conversión alimenticia, la producción y la reproducción. Pueden además, producir inmunosupresión e incrementar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y predisponer a enfermedades metabólicas y tóxicas. El humano también puede ser afectado por estas toxinas. Cuando hay más de un tipo de micotoxina presente en los alimentos, existe sinergismo entre algunas y sus efectos se pueden potencializar.

En Guatemala, como en otros países de Latinoamérica, las condiciones del transporte, procesamiento y almacenamiento de las materias primas, son inadecuadas. La humedad relativa y temperatura altas, favorecen el crecimiento de hongos. De acuerdo a la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), hasta un 25% de las cosechas de alimentos a nivel mundial está contaminado con algún tipo de micotoxinas. Para el año 2004, al menos 100 países tenían reglamentos específicos que regulaban los niveles máximos de algunas micotoxinas en los alimentos para consumo humano y/o en las raciones para animales. En Guatemala no existen estudios sobre los niveles de micotoxinas en alimentos terminados y en materias primas para la elaboración de raciones, destinados a la alimentación de los animales.

En este estudio generé información sobre los niveles de concentración de Ocratoxinas, Aflatoxinas, toxina T-2, Deoxinivalenol y Fumonisininas encontrados en muestras de alimentos terminados destinados a la alimentación de aves de corral, remitidas al Laboratorio de Ornitopatología y Avicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Período de julio de 2007 a junio de 2008.

II. HIPÓTESIS.

No hay diferencia entre los niveles de concentración encontrados y los niveles permitidos de cada una de las cinco micotoxinas presentes en las muestras de alimentos analizadas.

III. OBJETIVOS.

3.1 General

- Generar información sobre micotoxinas en muestras de alimentos terminados para aves de corral, analizadas en el Laboratorio de Ornitopatología y Avicultura.

3.2 Específicos

- Determinar las micotoxinas presentes en las muestras de alimentos analizadas en el período de julio de 2007 a junio de 2008.
- Determinar los niveles de concentración de micotoxinas presentes en las muestras de alimentos analizadas.
- Comparar los niveles de concentración encontrados de micotoxinas con valores de referencia de la FAO.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA.

4.1 Generalidades de las micotoxinas.

Son metabolitos tóxicos de bajo peso molecular y no poseen inmunogenicidad. Están presentes en materias primas y raciones utilizados en la alimentación de animales. Son producidos por hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* que crecen en gramíneas, granos, oleaginosas y frutos secos y pueden proliferar en cualquier etapa de la cadena alimenticia desde la siembra hasta el procesamiento y almacenamiento en todos los climas. Tienen efectos negativos agudos y/o crónicos sobre la salud de los animales y de los seres humanos. Pueden afectar varios órganos y sistemas, en particular el hígado, los riñones, la piel, el intestino, el sistema nervioso, sistema endocrino y sistema inmunitario (Denli y Pérez 2006, García 2002, Lucas s.f.).

Los factores que influyen en la contaminación y grado de infestación por las esporas son la humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno. También los insectos y ácaros (las heces son fuente de alimento para mohos), condiciones físicas del grano y/o la susceptibilidad. Los ácaros e insectos contribuyen como portadores de esporas y al deterioro de los granos por el daño físico y pérdida de nutrientes que genera su actividad (Sala et al. 2008).

Actualmente se han descrito alrededor de 400 micotoxinas y solo unas pocas reciben atención especial por su amenaza para la salud animal o humana. Las principales micotoxinas son: Aflatoxinas, Ocratoxinas, Tricotecenos, Fumonisinias, Zearalenona y alcaloides ergóticos (Denli y Pérez 2006). Las micotoxinas son químicamente estables, persisten largos períodos de tiempo aún en condiciones extremas y son relativamente estables al calor. La toxicidad debe estar basada sobre el sinergismo entre estas y sus efectos se potencializan aún si las concentraciones son mínimas de cada micotoxina presente en los alimentos (Kubena et al. 1997, Mallmann et al. 2007, Sala et al. 2008).

4.2 Clasificación de las principales micotoxinas que afectan a aves de corral.

4.2.1 Aflatoxinas (AF).

Las AF son producidas por *Aspergillus flavus* y *A. parassiticus*. Las AF fueron descubiertas en 1960, al provocar una enfermedad con alta mortalidad en pavos en Inglaterra que fue conocida como “Enfermedad X del pavo”. Las AF se pueden presentar en cualquier parte del mundo a temperaturas de 25°C y humedad relativa de 70% (Calvo s.f., García 2002, Denli y Pérez 2006).

La micotoxina que produce *A. flavus* es la Aflatoxina B₁ (AFB₁) y AFB₂. *A. parassiticus* produce AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. En los animales y el ser humano las Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se metabolizan a M₁ y M₂ que son los metabolitos que se pueden encontrar en la leche materna, orina y heces. El Aflatoxicol es un metabolito reductivo de la AFB₁ (García 2002, Peraica et al. 1999).

Las AF son químicamente una fusión a un anillo cumarínico de porciones de dihidrofuranos o tetrahidrofuranos con varios radicales. La letra B indica que emiten fluorescencia azul y la letra G indica que emiten fluorescencia verde amarillenta bajo la luz ultravioleta a 365 nm (Calnek 1995, García 2002).

La AFB₁ es la más tóxica y es producida en mayores cantidades que las demás AF. La manifestación de toxicosis, los efectos teratogénicos, mutagénicos, inmunosupresores y carcinogénicos dependen de la dosis, duración de exposición e índice del metabolismo a metabolitos menos tóxicos. El grado de toxicidad y carcinogenicidad sigue el orden B₁, B₂, G₁ y G₂ (Calvo s.f., Zaghini et al. 2005).

4.2.1.1 Modo de acción.

En el hígado, las moléculas de AF ingresan a los procesos metabólicos complejos como el citocromo P450-dependiente (procesos de desintoxicación o bioactivación). La AFB₁ es causa probable de inducción o inhibición de las

funciones de la oxigenasa en hígado, que pueden afectar el metabolismo hepático de substratos endógenos y exógenos (Zaghini et al. 2005).

Cuando el metabolito AFB₁ es activado y se une de forma covalente con el nitrógeno de la posición siete de guanina en las células diana, resultan transversiones de guanina a tiamina, reparación de lesiones en ADN, mutaciones y posteriormente formación de tumor. AFB₁ puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales (García 2002).

La AF se adhiere al DNA mitocondrial, deteriora la fosforilación oxidativa que es crítico para la síntesis de proteínas y el metabolismo de lípidos. La síntesis reducida de protrombina aumenta el riesgo de hemorragia, como los puntos hemorrágicos en la yema del huevo. La permeabilidad de tubos capilares puede aumentar por los cambios degenerativos inducidos por las toxinas (Shane 2006).

4.2.1.2 Síntomas y lesiones en aves de corral.

Los efectos de la exposición a AF en gallinas ponedoras son: reducción del tamaño de los huevos, reducción proporcional en el tamaño de las yemas, disminución de la producción y calidad del huevo con aumento de susceptibilidad a salmonella, candidiasis, y coccidiosis. En pollos de engorda se observan hemorragias subcutáneas (Shane 2006, Zaghini et al. 2005).

La toxicidad aguda se caracteriza clínicamente por depresión, anorexia, ictericia, hemorragias y muerte. El hígado es el órgano blanco principal y las lesiones histológicas incluyen vacuolación de célula hepática con infiltración grasa e hiperplasia del conducto biliar (Oliveira et al. 2002).

La aflatoxicosis crónica puede afectar la consistencia de la cáscara del huevo y disminuye el índice de conversión de la vitamina D3 (colecalciferol) a la

forma metabólica activa. Esto disminuye la eficacia de la absorción del calcio al reducir la actividad de la proteína que transporta el calcio en el intestino. Disminuye la absorción de carbohidratos y lípidos por reducción en la secreción de amilasa y lipasa pancreáticas. Los problemas clínicos asociados a los efectos indirectos de la inmunosupresión son: septicemia y peritonitis, pigmentación reducida de la yema del huevo y malformación de la cáscara (Shane 2006).

La Aflatoxicosis reduce los niveles de proteínas, lipoproteínas y carotenoides en el suero. Se observa palidez de patas y mucosas. Hay mala absorción de nutrientes y se observan partículas mal digeridas de alimento terminado en las heces, asociado a esteatorrea. Puede haber hasta diez veces el contenido de grasa en las heces de las aves (Mallmann 2007, Shane 2006).

4.2.2 Ocratoxinas (OT).

Producidas principalmente por *Penicillium viridicatum*, *P. cyclopium* y *Aspergillus ochraceous*. Son derivados del 3-4-dihidrometil-isocumarin unido con un enlace amido a un grupo amino de la l-b-fenilalanina y se designan A, B, C y D. La Ocratoxina A (OTA) es la más común, la más tóxica y relativamente estable. Las OT son neurotóxicas, nefrotóxicas, inmunotóxicas, carcinogénicas y teratogénicas. Tienen un efecto hemorrágico y congestivo. Alteran el metabolismo de los hidratos de carbono, provocando una acumulación de glucógeno en el hígado (García 2002, Denli y Pérez 2006, López et al. s.f.).

La producción óptima de OTA por *A. Ochraceus* es entre 20° C y 30° C, por *P. Viridicatum* es entre 5° C a 10° C. La OTA se acumula en los tejidos de los animales, presenta alta afinidad a proteínas plasmáticas y persiste mucho tiempo en el organismo. Las OT se absorben por difusión pasiva a través del intestino y por difusión activa en los riñones. Se adhieren a la fracción de la albúmina en la sangre e ingresan al reciclaje en la bilis, pasan a la secreción intestinal y

reabsorción por la circulación entero hepática. (García 2002, Kubena et al. 1997, López et al. s.f., Soriano 2007).

4.2.2.1 Modo de acción.

Reduce la síntesis de proteínas por inhibición competitiva de la fenilalanina-tARNPhe sintetasa, estimula la apoptosis celular e induce la síntesis de ADN no programada. Induce la formación de radicales hidroxilo y peroxidación lipídica. La OTA compite con la Phe en la unión con su correspondiente ARN de transferencia, reacción catalizada por la Phe tRNA sintetasa. Inhibe las dos reacciones catalizadas por la Phe-tRNA sintetasa: la activación de la Phe y su fijación sobre el tRNA (Duarte y Villamil 2006, García 2002, López et al. s.f.).

4.2.2.2 Síntomas y lesiones en aves de corral.

Las OT causan lesiones primarias en riñón, necrosis del tejido linfático, degeneración grasa del hígado y necrosis del tejido renal en aves de corral. Causan depleción y regresión celular de los órganos linfoides, perjudicando la inmunidad mediada por células. En riñones causan descenso en la osmolaridad urinaria, incremento de excreción de iones (Na, K, Ca, P) y aumento gradual de alcalosis. Se observa un descenso en el consumo de alimento y reducción de la conversión alimenticia (Blandon y Denli s.f., García 2002, Gentles et al. 1999).

La exposición crónica de pollos a OTA se asocia a disminución de la concentración de orina, disminución de filtración glomerular, disminución en la separación de fenol y reducción de la función del túbulo proximal. En aves se observó degeneración y alteraciones estructurales en epitelio tubular renal, con efectos más severos en túbulo proximal (Gentles et al. 1999).

Pollos alimentados con dietas contaminadas con Fumonisina B₁ (FB₁) y OTA, al final de la primera semana tuvieron pesos corporales más bajos que pollos alimentados con dieta control, aumentó la concentración de ácido úrico,

creatinina, la actividad de alanina aminotransferasa y se observó un aumento relativo del peso del corazón y riñones. El consumo de alimento se redujo en pollos alimentados con dietas contaminadas con FB₁ con o sin OTA. La conversión alimenticia disminuyó en pollos alimentados con dietas contaminadas con OTA con o sin FB₁ (Kubena et al. 1997)

La concentración de triglicéridos en suero aumentó y el nitrógeno disminuyó en pollos alimentados con dieta contaminada con OTA. Hubo una significativa interacción sinérgica entre FB₁ y OTA, se observó aumento de la actividad de alanina aminotransferasa en hígado, disminuyeron las concentraciones de proteína total, albúmina y colesterol (Gentles et al. 1999, Kubena et al. 1997).

4.2.3 Fumonisin (F).

Son producidas por *Alternaria*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* y otras especies cuando crecen en gramíneas y granos. Tienen importancia toxicológica las FB₁ y FB₂. Las FB₃, FB₄, FA₁ y FA₂ aparecen en concentraciones muy bajas y son menos tóxicas. Estas micotoxinas inhiben la síntesis de esfingolípidos (Mallmann 2007, Peraica et al. 1999).

Las FB₁ y FB₂ se han ligado al cáncer del esófago en humanos. En animales los principales síndromes que causan son: neurotóxicos (leucoencefalomalacia); nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral; hepatotóxicos y lesiones cardiacas. Los órganos afectados son: cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón (Gimeno y Martins 2003, Tran et al. 2005).

4.2.3.1 Modo de acción.

Las fumonisin son inhibidores competitivos de esfinganina N-aciltransferasa y de esfingosina N-aciltransferasa (ceramida sintetasa), estas son enzimas fundamentales en la biosíntesis de esfingolípidos. De esta forma, se puede alterar la concentración y proporción entre esfinganina y esfingosina, se

disminuye la biosíntesis de esfingosina y se acumula esfinganina. Las Fumonisinias pueden bloquear la biosíntesis de esfingolípidos complejos en células eucarióticas que son la base de formación de mensajeros secundarios, estos controlan procesos celulares como expresión genética, activación y desactivación de proteínas específicas (Lino et al. 2004).

4.2.3.2 Síntomas y lesiones en aves de corral.

En aves intoxicadas por Fumonisinias se observó disminución del consumo de alimento, reducción de ganancia de peso, aumento de mortalidad, diarrea, ascitis, hidropericarditis, palidez del miocardio, edema y congestión renal. En pavos ulceración de mucosa, aumento del peso relativo de hígado, riñones, proventrículo y molleja. La intoxicación con Fumonisinias puede monitorearse por parámetros sanguíneos observando la relación entre los niveles circulantes de esfingosina y esfinganina (Mallmann et al. 2007).

Alimentos contaminados con FB₁ a razón de 10, 30, 75, 300 y 525 ppm (partes por millón) suministrados a pollitos de 2 días de vida en periodos que oscilaron entre 6 y 21 días, provocaron una disminución de peso vivo y aumento de peso del hígado, bazo y bolsa de Fabricio, se observaron alteraciones en el sistema enzimático y parámetros hematológicos. En el suero sanguíneo variaron los niveles de esfinganina libre y la relación esfinganina/esfingosina. En gallinas, las concentraciones que provocaron diarreas y bajas de puesta fueron de 8 a 16 ppm en alimento terminado (Gimeno y Martins 2003, Mallmann 2007).

En la exposición subaguda, los altos niveles de FB₁ están asociados al aumento relativo del peso de órganos como hígado y riñones, a alteraciones en componentes del suero y alteraciones de actividades enzimáticas en pollos, pavos y patos de engorda. La toxicidad hepática y renal se observa en corderos, ratas, pollos, pavos y patos (Tran et al. 2005).

Pollitos de 1 día fueron intoxicados con 10 ppm de FB₁ en la ración durante 6 días. La FB₁ pudo causar la presencia de petequias, aumento del tiempo de coagulación sanguínea y disminución de la concentración de albúmina sérica. Niveles de 100 ppm causaron pérdidas del 12% al 21% en la ganancia de peso a los 21 días. Estas pérdidas a nivel de campo pueden ser mayores, porque en condiciones experimentales, el efecto de las micotoxinas en las aves de corral, es atenuado por la eliminación de factores estresantes (Mallmann et al. 2007).

4.2.4 Tricotecenos (TCT).

Producidos principalmente por *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. nivale*, *F. roseum*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. lateritium*, *F. rigidiusculum*, *F. epispheeria*, *F. equiseti*. Existen más de 45 tipos de TCT y los más importantes son: toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS), escirpentriol (STO), nivalenol, vomitoxina (DON), monoacetoxiscirpenol (MAS) y triacetoxiscirpenol (TAS) (Peraica et al. 1999, Soriano 2007).

Los TCT causan ulceración, quemaduras y necrosis de tejidos como la mucosa oral y epitelio gastrointestinal. Las toxinas T-2 y DAS son las más dañinas. La mayoría está formada por un núcleo tetracíclico con doble enlace en el C-9,10 y un anillo epoxi en C-12,13. Son inmunodepresivas, afectan al sistema digestivo, nervioso, circulatorio y la piel (Gimeno y Martins 2003, Soriano 2007).

4.2.4.1 Modo de acción.

A nivel celular, los TCT inhiben la síntesis proteica, inhiben la síntesis de ADN Y ARN por la unión de los TCT a la peptidil transferasa, ésta es parte integral de la subunidad 60S del ribosoma. Tienen efecto tóxico sobre la membrana celular, inducen apoptosis particularmente en tejidos linfático y hematopoyético, se observa degeneración y atrofia de medula ósea e inhibición del sistema inmune. La gravedad de las lesiones se incrementa con el tiempo de exposición a las micotoxinas (Duarte y Villamil 2006, Gimeno y Martins 2003, Soriano 2007).

4.2.4.2 Toxina T-2.

4.2.4.2.1 Síntomas y lesiones en aves de corral.

En gallinas ponedoras se observan lesiones orales, disminuye la ingesta de alimento, se reduce la producción de huevos y aumenta la deficiencia en la calidad de la cáscara. En pollos se observa atraso de crecimiento, emplume anormal, regresión de la bolsa de Fabricio y anemia (Gimeno y Martins 2003).

Una contaminación de 0,4 ppm de toxina T-2 en alimento, suministrado a pollos de engorde de 1 día de edad durante 49-63 días, provocó lesiones en mucosa oral y reducción de la ganancia de peso. Observaron los mismos signos con 1 ppm en alimento suministrado durante 21 días. Concentraciones de 4, 8 y 16 ppm durante 21 días en pollos de 1 día de vida provocaron, además de las lesiones antes mencionadas, alta mortalidad (observada al séptimo día) y aumentó la incidencia de hematomas en hígado. El peso del bazo y páncreas aumentó y el de la bolsa de Fabricio disminuyó con 8 y 16 ppm (Gimeno y Martins 2003).

En las lesiones orales se observó inflamación local y necrosis, formación de placas diftéricas de tipo caseoso en la comisura del pico, mucosa oral y lengua. Histológicamente se observó infiltración de leucocitos granulares e infección por bacterias tipo cocos (Gimeno y Martins 2003).

En intoxicaciones crónicas con toxina T-2 o DAS disminuye la ingesta y de reduce la ganancia de peso, se observa lesiones orales, necrosis de los tejidos linfoides, hematopoyético y mucosa oral. Puede haber trastornos nerviosos, emplume anormal y reducción del espesor de la cáscara de los huevos. En pavitos las lesiones orales se producen con 2 ppm en el alimento. En ponedoras, las lesiones orales se producen en el 50% de los lotes ó parvadas con 2 ppm de toxina T-2 en el alimento (Mallmann et al. 2007).

En pollos, la toxina T-2 presenta alta toxicidad a macrófagos, inhibiendo su capacidad fagocitaria e induce la formación de peróxidos a partir de lípidos, disminuyendo la concentración de vitamina E. Los pavos y gansos son más sensibles a la toxina T-2. En gansos la toxina T-2 puede ser letal si es superior a 3 ppm y a partir de 0,1 mg/kg de peso vivo, disminuye la producción de huevos. Los niveles de postura y eclosionabilidad disminuyen el 50% cuando se administran 300mg/Kg de peso de toxina T-2 (Mallmann et al 2007).

En concentraciones de 1 a 2 ppm de toxina T-2 en alimento para pollos, se observó una reducción significativa sobre el efecto de algunos coccidiostáticos ionóforos a causa de la inmunosupresión. La toxina T-2 puede reducir la dosis letal (LD50) de ionóforos en aves de corral (Gimeno y Martins 2008).

4.2.4.3 Deoxinivalenol, Vomitoxina o DON.

4.2.4.3.1 Síntomas y lesiones en aves de corral.

La relativa insensibilidad de DON en aves de corral, se observó con una LD50 de 140 mg/kg de peso corporal (dosis oral) en pollos de engorde. Pero, la concentración de hemoglobina, la cuenta de eritrocitos y el hematocrito fueron menores en pollos alimentados con granos contaminados con 18 mg/kg de DON durante 9 semanas. La toxicosis por DON presenta hipoxia crónica que puede reactivar la eritropoyesis. Sin embargo, puede ser ineficaz debido a la hemólisis de las células antes o después de llegar a la circulación sistémica. Se presenta hemoglobinemia y el cuadro de anemia puede empeorar porque la toxina T-2 y DON poseen actividad hemolítica (Swamy et al. 2002).

Las gallinas son más sensibles, alimentos contaminados con 0,350 a 0,700 ppm de DON durante diez semanas, provocaron disminución del peso del huevo y huevos en fáfara. Contaminaciones de 2.5 y 4.9 ppm por 10 semanas, afectaron significativamente el desarrollo y observaron pollos débiles con retraso en la formación ósea (Gimeno y Martins 2003).

4.3 Regulaciones de micotoxinas en alimentos para aves de corral y otros animales domésticos.

Al 31 de diciembre de 2003, 99 países establecen valores de referencia para los niveles permisibles de micotoxinas en las raciones destinadas a la alimentación de animales y en algunos alimentos para consumo humano. El laboratorio para análisis de alimentos y residuos (ARO) del instituto nacional para la salud pública y el medio ambiente de los Países Bajos, es comunitario de referencia para residuos de la Unión Europea (FAO 2004).

La Unión Europea (UE) solo tiene legislación para AFB₁ en alimentos para animales con una humedad de 12%. Establece límites máximos de 20 ppb para AFB₁ en todas las materias primas para alimentación animal, 20 ppb en alimentos completos y alimentos complementarios para cerdos, aves de corral, bovinos, ovinos y caprinos (excepto animales en lactancia y animales jóvenes), 5 ppb en alimentos completos para ganado lechero, 10 ppb en alimentos completos para borregos y terneros, 10 ppb para otros alimentos completos y 5 ppb para otros alimentos complementarios (Gimeno 2005).

La Unión Europea no incluye el sinergismo que puede haber entre micotoxinas y establece valores orientativos de AFB₁ DON, OTA, FB₁+FB₂ y ZEN, en piensos completos y complementarios para animales domésticos. La UE no establece valores orientativos de toxina T-2, HT-2 y DAS en productos destinados a la alimentación de aves de corral (Diario...2006).

4.4 Procedimientos de muestreo.

La distribución de la concentración de las micotoxinas es un factor importante a considerar cuando se adoptan criterios reglamentarios de muestreo para los productos. La distribución de micotoxinas puede ser muy heterogénea, la cantidad de granos, productos ó subproductos contaminados en un lote es habitualmente muy baja, pero el nivel de contaminación dentro del grano puede

ser muy alto. De no tener cuidado para obtener una muestra representativa, la concentración de micotoxinas puede estimarse erróneamente (FAO 2004).

Para mejorar la representatividad del resultado del análisis de micotoxinas, se puede obtener un muestreo con mayor peso de la muestra y mayor número de puntos de muestreo; un submuestreo con aumento del peso de la submuestra o por la reducción del tamaño de las partículas por la molienda; y análisis de un mayor número de muestras (Mallmann et al. 2007).

Cuidados básicos para permitir un muestreo eficiente: (Mallmann et al. s.f.).

- Recolección de una muestra representativa, siguiendo un plano de muestreo (Mallmann et al. s.f.).
- La muestra deberá ser recogida lo más cerca posible al sitio (comederos) en que el animal intoxicado consumió el alimento (Mallmann et al. s.f.).
- Identificación de las materias primas del alimento contaminado con micotoxinas (Mallmann et al. s.f.).

4.5 Métodos de análisis.

La Asociación Oficial Internacional de Químicos Analíticos (AOAC International) y el Comité Europeo de Normalización (CEN), cuentan con varios métodos normalizados para el análisis de micotoxinas. La AOAC ha validado 40 métodos para el análisis de micotoxinas (FAO 2004).

4.5.1 Procesos químicos.

Los más utilizados son la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). HPLC adaptado a la detección por espectrometría de masa (HPLC/MS) y la cromatografía de gases adaptada a la espectrometría de masa (GC/MS). Estas metodologías presentan resultados semejantes, con mayor especificidad y precisión (Lara, 2003; Mallmann et al. s.f.)

4.5.1.2 Ensayos inmunoenzimáticos.

El método de ELISA es una alternativa viable y altamente sensible, presenta menos problemas respecto al manejo y alteración de la muestra por eliminación y almacenamiento. Dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos: ELISA competitivo y no competitivo. Se puede utilizar ELISA para la clasificación y semicuantificación y se recomienda confirmar por HPLC ó por GC/MS (Gimeno y Martins 2008, González et al. s.f., Mallmann et al. 2007).

4.6 Prevención y control.

Debe iniciar desde la siembra hasta la cosecha de los cultivos, con adecuadas prácticas agronómicas y agrícolas para reducir el crecimiento de hongos. Reducir el daño físico a los granos durante la cosecha y en la post cosecha son importantes la limpieza, técnica adecuada de secado, eliminación de insectos y ácaros de los granos. Durante el almacenamiento de los granos se puede adicionar fungistáticos, controlar la humedad y temperatura dentro de los silos. Los sistemas de termometría son útiles en la aireación de silos (López et al. 1999, Sala et al. 2008).

En la elaboración de alimentos terminados, se puede adicionar fungistáticos (ácido propiónico), adsorbentes de micotoxinas (aluminosilicatos, glucomanano esterificado, amadeíta). Se puede adicionar metionina y cistina que forman en el hígado complejos conjugados con AFB₁ que se eliminan en heces y orina. Las materias primas contaminadas con micotoxinas, se pueden diluir o formular raciones para especies menos sensibles o no sensibles al efecto tóxico. Los animales pueden resistir mejor las micotoxicosis al reducir los factores que producen estrés. En micotoxicosis, se puede administrar a los animales, fármacos con efecto lipotrópico como cloruro de colina, inositol, metionina, vitamina B12, biotina o ácido fólico para movilizar las grasas y atenuar los problemas por esteatosis hepática (FAO 2004, Gimeno y Martins 2008, Sala et al. 2008).

V. MATERIALES Y METODOS.

5.1 Área de estudio.

Realicé este estudio en el Laboratorio de Ornitopatología y Avicultura (LOA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad Universitaria, zona 12.

5.2 Recursos humanos:

- Un estudiante tesista
- Tres Médicos Veterinarios asesores
- Personal técnico del LOA.

5.3 Materiales y equipo:

- 44 muestras de alimentos terminados para aves de corral remitidas al LOA.
- Autoclave.
- Balanza de 400 g.
- Refrigeradora.
- Probetas de 100, 250 y 500ml, beakers y erlenmeyers de 250 y 50 ml.
- Viales de 25 ml y jeringas de 3 ml estériles.
- Papel aluminio, papel manila y pita de maguey estériles.
- Bata blanca, guantes de examen clínico y mascarilla.
- Agua deionizada y metanol al 70%
- Filtros de papel Whatman número uno.
- Kits de ELISA en pocillos, específicos para el análisis de AF B₁+B₂+G₁+G₂, OT A+B, FB₁+FB₂+FB₃, toxina T-2 y DON.
- Papel toalla absorbente
- Lector de pocillos con filtros de 450 nanómetros (nm) y 630nm.
- Computadora y software.

5.4 Métodos.

5.4.1 Toma y transporte de las muestras.

Las muestras de alimentos terminados para aves de corral, fueron tomadas por personal de los diferentes establecimientos. En cada unidad de alimento terminado, seleccionaron 6 puntos al azar y en éstos obtuvieron una muestra de 454 gramos que fue depositada en una bolsa de papel kraft identificada. Cada muestra fue introducida en una bolsa plástica y ésta fue cerrada herméticamente. Las muestras fueron transportadas en una hielera a 5° C al LOA.

5.4.2 Recepción de las muestras y registro de datos.

La recepción de las muestras se realizó en el LOA en el período del 1 de julio de 2007 al 30 de junio de 2008. Se anotaron los datos que identificaban las muestras en el libro y las hojas para recepción de muestras del LOA y éstas se conservaron en refrigeración a 5° C previo a realizar el análisis de micotoxinas.

5.4.3 Preparación de las muestras y extracción de micotoxinas.

Para el análisis de cada micotoxina, pesé 20 gramos de cada muestra de alimento terminado con una balanza Kern® de 400g y los deposité dentro de erlenmeyers estériles. Agregué 100 ml de solución de extracción (metanol al 70%) en cada erlenmeyer, lo cerré con papel aluminio y papel manila estériles y lo agité durante tres minutos. Para colectar el extracto, dejé reposar durante 15 minutos la mezcla de cada erlenmeyer. Decanté el sobrenadante a través de un filtro de papel Whatman número uno que coloqué en forma de embudo en beakers y/o erlenmeyers estériles. De acuerdo al procedimiento del ELISA empleado, realicé las diluciones 1:10 para el análisis de toxina T-2, 1:20 para Fumonisinias y 1:4 para DON. Deposité el volumen de extracto y agua deionizada respectivamente con jeringas estériles de 3 ml en viales estériles de 25ml y realicé la mezcla (ver anexo 1, imagen 1 y 2).

5.4.4 Ensayo.

Para el análisis de cada micotoxina, mezclé 100 µl de extracto o dilución final con 200 µl de conjugado micotoxina-enzima, de esta, añadí 100 µl en los pocillos recubiertos con anticuerpos e incubé por 15 minutos a temperatura ambiente. Lavé cinco veces los pocillos con agua deionizada y sequé en papel absorbente. Agregué 100 µl de sustrato e incubé por cinco minutos a temperatura ambiente, agregué 100 µl de solución de parada y realicé la lectura de los pocillos con el lector de ELISA que tiene un filtro de absorbancia de 450 nm y un filtro de referencia de 630 nm. Registré la lectura de cada pocillo en las hojas de cálculo del software provisto con ELISA. Finalmente imprimí los resultados de cada micotoxina analizada en cada muestra de alimento terminado (ver anexo 1, imagen 3 y 4).

Observación: para el análisis de micotoxinas, no medí el porcentaje de humedad de las muestras.

5.5 Análisis estadístico.

Describí los resultados utilizando estadística descriptiva (Sokal y Rohlf 1995).

Para comparar los niveles de concentración observados de micotoxinas con los valores de referencia de la FAO, utilicé una prueba t de Student de una muestra con un nivel de confianza del 95% (Sokal y Rohlf 1995).

5.5 Centros de referencia.

- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Internet.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El 100% de las muestras estudiadas fue positivo a Aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂ (\bar{X} = 10.46 ppb), Ocratoxinas A+B (\bar{X} = 24.53 ppb), Fumonisinias B₁+B₂+B₃ (\bar{X} = 3.22 ppm), DON (\bar{X} = 4525.91 ppb) y toxina T-2 (\bar{X} = 127.37 ppb). Los niveles mínimos y máximos de concentración obtenidos de AFB₁+B₂+G₁+G₂ fueron 4.37 ppb y 14.92 ppb, de FB₁+FB₂+FB₃ fueron 0.55 ppm y 17.02 ppm, de OT A+B fueron 5.73 ppb y 127.72 ppb, de DON fueron 2271.70 ppb y 10650.11 ppb, de toxina T-2 fueron 10.22 ppb y 190.32 ppb respectivamente. Los niveles de concentración de cada micotoxina obtenidos en las muestras estudiadas, se detallan en las tablas 1 a 5 (ver anexo 2).

Los niveles de concentración de AFB₁+B₂+G₁+G₂ obtenidos en las muestras estudiadas, fueron menores a 20 ppb (valor de referencia FAO 2004), siendo esta diferencia significativa ($t = -18.58$, $gl = 43$, $P < 0.0001$). Los niveles de concentración de toxina T-2 obtenidos en las muestras estudiadas, fueron menores a 200 ppb (valor de referencia FAO 2004), siendo esta diferencia significativa ($t = -9.72$, $gl = 43$, $P < 0.0001$). Los niveles de concentración de DON obtenidos en las muestras estudiadas, fueron superiores a 1000 ppb (valor de referencia FAO 2004), siendo esta diferencia significativa ($t = 8.42$, $gl = 43$, $P < 0.0001$) (ver anexo 3).

Los niveles de concentración de DON, AFB₁+B₂+G₁+G₂, OT A+B, toxina T-2 y Fumonisinias B₁+B₂+B₃ obtenidos en este estudio, son superiores a los valores máximos de contaminación recomendados por Mallmann et al (2006) en alimentos terminados destinados a la alimentación de aves de producción. Los niveles de concentración obtenidos en las muestras estudiadas, pueden afectar la producción y reproducción de aves de corral, sus efectos se pueden potencializar porque puede haber sinergismo entre algunas micotoxinas.

Los niveles de concentración de AFB₁+B₂+G₁+G₂ y OT A+B obtenidos en este estudio, fueron superiores en época lluviosa. Esto puede deberse a condiciones favorables para el crecimiento fúngico y producción de micotoxinas por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, durante el almacenamiento de materias primas y alimentos terminados (ver anexo 4).

Los niveles de concentración de DON y FB₁+B₂+B₃ obtenidos en este estudio, fueron superiores en época seca. Posiblemente por una mala técnica de secado de los granos previo al almacenamiento. Las materias primas pudieron estar previamente contaminadas con micotoxinas. Esto debido a que el género *Fusarium* crece principalmente en el campo, requiere alta humedad y generalmente produce micotoxinas antes de la cosecha de los granos (Soriano 2007). Los niveles de concentración de toxina T-2 fueron similares en ambas épocas (ver anexo 4).

La presencia simultánea de diferentes micotoxinas y los niveles de concentración obtenidos en las muestras estudiadas, puede deberse a la infestación por hongos en los cultivos desde la siembra hasta la cosecha de los granos por malas prácticas agronómicas y agrícolas. También puede deberse a condiciones favorables para el crecimiento fúngico durante el almacenamiento, procesamiento y transporte de granos, harinas, subproductos y alimentos terminados.

Los factores que favorecen la infestación por hongos y posterior contaminación por micotoxinas en materias primas y alimentos terminados son la humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno. Otros factores son el daño físico del grano durante la cosecha, la susceptibilidad de las variedades o híbridos, la infestación por insectos y ácaros. La inadecuada limpieza, inadecuada técnica de secado y largo período de almacenamiento de los granos, también favorecen el crecimiento fúngico (FAO 2004, Sala et al. 2008, Soriano 2007).

El maíz que es utilizado como principal materia prima para la elaboración de alimentos terminados destinados a la alimentación de aves de corral y cerdos en Guatemala, ha sido almacenado durante varios años, se clasifica en el grado dos de calidad, no es apto para el consumo humano y el principal proveedor del grano es Estados Unidos de Norte América (Fuentes et al. 2005).

Berthiller et al. (2005, 2006) determinaron que DON y ZEN se unen a una sustancia más polar como la glucosa de los alimentos, formando micotoxinas conjugadas no detectables por métodos de análisis rutinarios. Se debe realizar el análisis de DON, DON-glucósidos, ZEN y ZEN-glucósidos respectivamente, en alimentos para consumo humano y animal.

En el diario oficial de la UE (2006), la comisión de las comunidades europeas recomienda que los estados miembros aumenten la vigilancia y el análisis simultáneo de DON, ZEN, OTA, Fumonisin B₁+B₂, toxinas T-2 y HT-2 en materias primas y alimentos terminados destinados a la alimentación de animales. La comisión considera que los datos sobre la presencia de toxinas T-2 y HT-2, en productos destinados a la alimentación animal, son por ahora muy limitados y no incluye DAS. La comisión recomienda a los estados miembros la vigilancia para que los fabricantes de piensos apliquen a las materias primas, los valores orientativos más bajos tomando en cuenta la sensibilidad de los animales.

En ningún país existe legislación sobre los niveles de concentración permisibles u orientativos que incluya el sinergismo entre micotoxinas. Guatemala no tiene legislación sobre prevención y control de micotoxinas en alimentos terminados destinados a la alimentación de animales domésticos. Esto repercute en la ausencia de un laboratorio nacional de referencia, ausencia de métodos de muestreo y diagnóstico oficial de micotoxinas.

CONCLUSIONES.

1. El 100% de las muestras analizadas fue positivo a AF B₁+B₂+G₁+G₂, OT A+B, Fumonisinias B₁+B₂+B₃, DON y toxina T-2.
2. Los niveles de concentración de AF B₁+B₂+G₁+G₂ y toxina T-2 encontrados en las muestras analizadas, fueron significativamente menores a los valores de referencia de la FAO.
3. Los niveles de concentración de DON encontrados en las muestras analizadas, fueron significativamente superiores al valor de referencia de la FAO.

VII. RECOMENDACIONES.

1. Realizar otros estudios sobre micotoxinas que pueden contaminar alimentos terminados destinados a la alimentación de aves de corral y otros animales domésticos y que pueden afectar su salud.
2. Evaluar la presentación de patologías específicas en aves de corral y otros animales domésticos, relacionadas y/o asociadas a las micotoxinas.
3. Estudiar el efecto de las micotoxinas sobre parámetros productivos en aves de corral y otros animales domésticos, a nivel de campo.
4. Hacer estudios para evaluar el efecto que pueden tener las micotoxinas sobre fármacos y biológicos que se utilizan para la prevención, control y tratamiento de enfermedades en aves de corral y otros animales domésticos.
5. Adicionar fungistáticos y/o adsorbentes de micotoxinas en alimentos terminados para aves de corral.

VIII. RESUMEN.

El propósito de este estudio fue generar información sobre niveles de concentración de Ocratoxinas, Aflatoxinas, toxina T-2, Deoxinivalenol y Fumonisinias encontrados en muestras de alimentos terminados destinados a la alimentación de aves de corral, remitidas al Laboratorio de Ornitopatología y Avicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Período de julio de 2007 a junio de 2008. Para el análisis de cada micotoxina, pesé 20g de cada muestra, obtuve el extracto con 100ml de metanol al 70%. De acuerdo al ELISA empleado, realicé las diluciones 1:10 para el análisis de toxina T-2, 1:20 para Fumonisinias y 1:4 para DON y desarrollé el enzimoimmunoanálisis en el Laboratorio de Ornitopatología y Avicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala. El 100% de las muestras analizadas fue positivo a AF B₁+B₂+G₁+G₂, OT A+B, Fumonisinias B₁+B₂+B₃, DON y toxina T-2. Los niveles de concentración encontrados de micotoxinas fueron superiores a los valores máximos de contaminación recomendados por otros autores. Este estudio aporta resultados útiles para implementar métodos de control de micotoxinas en alimentos terminados para aves de corral. Los resultados obtenidos pueden servir como referencia para otros estudios.

X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Blandon, J; Denli, M. s.f. La presencia de las micotoxinas en el pienso y su impacto en la producción avícola (en línea). Barcelona, ES. Consultado 23 feb. 2009. Disponible en <http://www.adiveter.com/ftp/articles/A2220607.pdf>.
2. Berthiller, F. et al. 2005. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by HPLC/MS (en línea). Consultado 9 mar. 2008. Disponible en <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf047798g?cookieSet=1>.
3. _____ et al. 2006. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana* (en línea). Consultado 9 mar. 2008. Disponible en <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=18316461>. Sólo resumen.
4. Calnek, B. et al. 1995. Enfermedades de las aves. Ed. A Lemus. Trad. J Mérito; AF Martínez. 9 ed. México. El Manual Moderno. 1094 p.
5. Calvo, M. s.f. Bioquímica de los alimentos: Toxinas fúngicas (en línea). Consultado 22 feb. 2009. Disponible en <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/micotoxinas.html>
6. Denli, M; Pérez, J. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención (en línea). Barcelona, ES. Consultado 18 nov. 2007. Disponible en http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/06CAP_I.pdf
7. Diario oficial de la Unión Europea. 2006. Recomendación de la comisión sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal (en línea). Consultado 23 feb. 2009. Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:ES:PD>
F
8. Duarte, S; Villamil, L. 2006. Micotoxinas en la salud pública (en línea). Bogotá, CO. Consultado 23 feb. 2009. Disponible <http://www.scielo.br/pdf/rsap/v8s1/v8s1a11.pdf>



9. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones (en línea). Consultado 21 oct. 2007. Disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499s/y5499s00.pdf>
10. Fuentes, M. et al 2005. Maíz para Guatemala (en línea). Guatemala. Consultado 23 mar. 2008. Disponible en http://www.pesacentroamerica.org/biblioteca/02_Maiz_para_%20Guatemala.pdf
11. García, J. 2002. Micotoxinas en rumiantes (en línea). Consultado 22 feb. 2009. Disponible en: <http://www.adiveter.com/ftp/articles/articulo633.pdf>
12. Gentles, A. et al. 1999. Toxicological Evaluations of Cyclopiazonic Acid and Ochratoxin A in Broilers (en línea). Texas, US. Consultado 25 mar. 2008. Disponible en <http://ps.fass.org/cgi/reprint/78/10/1380.pdf>
13. Gimeno, A; Martins, M. 2003. Fusariomicotoxicosis comparativa entre pollos, gallinas, cerdos, vacas lecheras y conejos (en línea). Consultado 26 mar. 2008. Disponible en http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=242
14. _____. 2005. La legislación de la Unión Europea y tolerancias para algunas micotoxinas en la alimentación (en línea). Consultado 22 feb. 2009. Disponible en http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?AREA=MYC&art=524
15. _____. 2008. Micotoxinas en pollos y gallinas: ¿habrá más riesgos de micotoxicosis con el uso de nuevas materias primas? (en línea). Consultado 28 feb. 2009. Disponible en <http://www.adiveter.com/ftp/articles/A1050908.pdf>
16. González, R. et al. s.f. Métodos basados en la unión Ag-Ac (en línea). s.l. Consultado 18 ene. 2008. Disponible en www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/temas_nuevos_pdf/tema17.pdf
17. Kubena, L. et al. 1997. Individual and combined effects of fumonisin B1 present in fusarium moniliforme culture material and Diacetoxyscirpenol or Ochratoxin A in turkey poults (en línea). Missouri, US. Consultado 25 mar. 2008. Disponible en <http://ps.fass.org/cgi/reprint/76/2/256>



18. Lara, J. 2003. Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal (en línea). Consultado 8 mar. 2008. Disponible en <http://www.miportal.net/lara/data/files/Art.%20Cientificos%20Javier%20Lara/micotoxinas%20i nocuidad%20clana.pdf>
19. Lino, C. et al. 2004. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos (en línea). Coimbra, PT. Consultado 23 feb. 2009. Disponible en http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2004/552_181_192.pdf
20. López, A. et al. s.f. Efectos tóxicos de la Ocratoxina A (en línea). Consultado 22 feb. 2009. Disponible en http://www.unav.es/bromatologia/toxicologia/documentos/art_OT_A_1.pdf
21. López, R. et al. 1999. Sistema integrado de gestión de micotoxinas (en línea). Texas, US. Consultado 25 feb. 2009. Disponible en <http://www.cepis.ops-oms.org/bvstox/e/fulltext/micotox9/micotox9.pdf>
22. Lucas, E. s.f. Aspectos generales de las micotoxinas: evaluación según el codex alimentarius (en línea). Consultado 14 oct. 2007. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/prior/comagric/codex/pdf/toxinas.pdf>
23. Mallmann et al. s.f. Control, monitoreo y manejo de micotoxinas en explotaciones avícolas (en línea). Trad. LG Luna. Santa María, BR. Consultado 23 feb. 2009. Disponible en http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_explotaciones.pdf
24. _____ et al. 2006. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas (en línea). Consultado 19 mar. 2009. Disponible en http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_criterios.pdf
25. _____ et al. 2007. Micotoxinas en ingredientes para alimento balanceado de aves (en línea). Porto Alegre, BR. Consultado 18 nov. 2007. Disponible en http://www.lamic.ufsm.br/papers/micotoxinas_en_ingredientes.pdf



26. Oliveira, C. et al. 2002. Effect of low levels of dietary Aflatoxin B1 on laying japanese quail (en línea). Sao Paulo, BR. Consultado 24 mar. 2008. Disponible en <http://ps.fass.org/cgi/reprint/81/7/976.pdf>
27. Peraica, M. et al. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans (en línea). Consultado 27 oct. 2007. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534900>
28. Perusia, O; Rodríguez, R. 2001. Micotoxicosis (en línea). Consultado 28 feb. 2009. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a13v12n2.pdf>
29. Sala, R. et al. 2008. Micotoxinas y su impacto en la producción porcina (en línea). Consultado 28 feb. 2009. Disponible en <http://www.albeitar.asisvet.com/bibliografias/112.pdf>
30. Shane, S. 2006. Mycotoxins impact egg production (en línea). s.l. Consultado 24 mar. 2008. Disponible en <http://www.w3.org/1999/xhtml>
31. Sokal, R; Rohlf, F. 1995. Biometry: the principles and practice of statistic in biological research. 3 Ed. New York, US. Freeman and Company. 887 p.
32. Soriano, J. 2007. Micotoxinas en alimentos. 1 ed. Madrid, ES. Díaz de Santos. 424 p.
33. Stanchi, N. et al. 2007. Microbiología veterinaria: Prueba de ELISA. Buenos Aires, AR. Inter-medica. 572 p.
34. Swamy, H. et al. 2002. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with fusarium mycotoxins on production and metabolism in broilers (en línea). Consultado 26 mar. 2009. Disponible en <http://ps.fass.org/cgi/reprint/81/7/966>
35. Tran, S. et al. 2005. Chronic effects of fumonisin B1 on ducks (en línea). Consultado 26 mar. 2008. Disponible en <http://ps.fass.org/cgi/reprint/84/1/22>
36. Zaghini, A. et al. 2005. Mannanoligosaccharides 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). Bologna, IT. Consultado 24 mar. 2008. Disponible en <http://ps.fass.org/cgi/reprint/84/6/825.pdf>



IX. ANEXOS.

Ánexo 1. Fotografías del procedimiento de enzimoimmunoanálisis realizado.

Imagen 1. Proceso de obtención del extracto. LOA 2008.



Imagen 2. Filtrado y dilución de extractos. LOA 2008.



Imagen 3. Desarrollo del enzimoimmunoanálisis. LOA 2008.



Imagen 4. Lectura de pocillos con filtros de 450nm y 630nm. Cálculo e impresión de resultados. LOA 2008.



Anexo 2. Tablas de resultados del análisis de micotoxinas con ELISA.

Tabla 1. Niveles de concentración de AFB₁+B₂+G₁+G₂ obtenidos en muestras de alimentos terminados para aves de corral. LOA 2008.

Fecha	No. de lote de test de ELISA	Número de muestra.	ppb
30/07/2007	110115-0601	1	14.14
		2	14.52
		3	14.52
		4	13.41
		5	13.41
		6	14.52
		7	14.14
		8	13.41
		9	14.92
		10	13.41
		11	12.73
		12	12.73
		13	13.07
		14	12.73
		15	12.73
		16	12.41
		17	12.11
		18	11.24
		19	10.97
		20	13.77
		21	8.12
		22	14.52
		23	13.77
26/10/2007	110115-0601	24	10.72
		25	11.53
		26	10.98
		27	9.31
		28	10.98
		29	12.42
17/01/2008	600630-0605	30	6.57
		31	6.85
		32	4.37
		33	6.85
		34	6.18
		35	5.93
		36	6.05
		37	6.18
29/05/2008	110331-0702	38	7.12
		39	7.43
		40	6.42
20/06/2008	110331-0702	41	6.16
		42	5.69
		43	5.37
		44	5.58
		Media aritmética	10.46
		Desviación estándar	3.407379691
		Moda	14.52
		Mediana	11.39

Tabla 2. Niveles de concentración de OT A+B obtenidos en muestras de alimentos terminados para aves de corral. LOA 2008.

Fecha	No. de lote del test de ELISA	Número de muestra.	ppb
30/07/2007	201215-0506	1	16.70
		2	19.66
		3	20.14
		4	18.75
		5	21.67
		6	22.77
		7	23.96
		8	19.66
		9	20.14
		10	20.14
		11	17.90
		12	19.66
		13	19.66
		14	18.75
		15	17.49
		16	14.91
		17	14.91
		18	17.09
		19	21.67
		20	21.14
		21	22.21
		22	22.21
		23	22.21
26/10/2007	201215-0506	24	23.36
		25	19.66
		26	18.32
		27	17.09
		28	15.25
		29	12.20
17/01/2008	200430-0702	30	6.99
		31	7.23
		32	7.71
		33	6.77
		34	7.23
		35	7.23
		36	5.73
		37	6.55
29/05/2008	200430-0702	38	13.70
		39	17.46
		40	16.74
20/06/2008	600630-0605	41	104.76
		42	98.08
		43	85.93
		44	127.72
		Media aritmética	24.53
		Desviación estándar	26.41008499
		Moda	19.66
		Mediana	18.75

Tabla 3. Niveles de concentración de toxina T-2 obtenidos en muestras de alimentos terminados para aves de corral. LOA 2008.

Fecha	No. de lote del test de ELISA	Número de muestra.	ppb
30/07/2007	600215-0602	1	154.09
		2	154.09
		3	139.02
		4	10.22
		5	39.11
		6	39.11
		7	54.21
		8	77.98
		9	62.96
		10	117.36
		11	165.17
		12	171.06
		13	159.52
		14	165.17
		15	165.17
		16	143.85
		17	154.09
		18	165.17
		19	190.32
		20	183.62
		21	165.17
		22	171.06
		23	177.21
26/10/2007	6002150602	24	109.71
		25	95.83
		26	109.71
		27	121.39
		28	52.15
		29	117.36
17/01/2008	600630-0605	30	161.20
		31	150.53
		32	127.26
		33	172.81
		34	150.53
		35	150.53
		36	97.76
		37	131.57
29/05/2008	600630-0605	38	40.25
		39	25.33
		40	91.82
20/06/2008	600630-0605	41	179.72
		42	161.82
		43	146.05
		44	186.24
		Media aritmética	127.37
		Desviación estándar	49.56420046
		Moda	165.17
		Mediana	148.29

Tabla 4. Niveles de concentración de DON obtenidos en muestras de alimentos terminados para aves de corral. LOA 2008.

Fecha	No. de lote del test de ELISA	Número de muestra	ppm	ppb
30/07/2007	400415-0603	1	2.33	2327.74
		2	2.33	2327.74
		3	2.39	2385.63
		4	2.33	2327.74
		5	2.71	2706.49
		6	2.78	2777.73
		7	2.71	2706.49
		8	2.85	2851.64
		9	2.57	2571.43
		10	2.22	2217.44
		11	2.78	2777.73
		12	3.01	3008.07
		13	2.71	2706.49
		14	2.33	2327.74
		15	2.27	2271.70
		16	2.57	2571.43
		17	2.64	2637.76
		18	2.78	2777.73
		19	2.64	2637.76
		20	2.93	2928.37
		21	2.85	2851.64
		22	2.57	2571.43
		23	2.27	2271.70
26/10/2007	400415-0603	24	6.95	6950.00
		25	7.07	7074.30
		26	7.64	7639.75
		27	8.01	8009.43
		28	7.14	7137.09
		29	7.60	7604.38
17/01/2008	401231-0613	30	10.65	10650.11
		31	9.52	9519.58
		32	10.16	10161.62
		33	9.71	9709.73
		34	9.16	9157.41
		35	9.29	9290.50
		36	6.70	6704.83
		37	7.74	7743.71
29/05/2008	401231-0613	38	3.46	3458.35
		39	3.27	3265.64
		40	3.09	3086.87
20/06/2008	401231-0613	41	3.89	3892.55
		42	2.69	2691.98
		43	3.09	3086.87
		44	2.77	2765.61
		Media aritmética		4525.91
		Desviación estándar		2779.1226
		Moda		2327.74
		Mediana		2851.64

Tabla 5. Niveles de concentración de Fumonisinias B₁+B₂+B₃ obtenidos en muestras de alimentos terminados para aves de corral. LOA 2008.

Fecha	No. de lote del test de ELISA	Número de muestra.	ppm
30/07/2007	300315-0601	1	1.54
		2	1.44
		3	1.44
		4	1.34
		5	1.34
		6	1.39
		7	1.25
		8	1.34
		9	1.21
		10	1.06
		11	1.65
		12	1.90
		13	1.59
		14	1.54
		15	1.71
		16	1.71
		17	1.65
		18	1.54
		19	1.90
		20	1.71
		21	1.34
		22	1.83
		23	1.77
26/10/2007	300315-0601	24	1.10
		25	1.10
		26	1.65
		27	0.93
		28	1.44
		29	1.54
17/01/2008	300715-0603	30	7.01
		31	7.48
		32	8.09
		33	7.91
		34	6.36
		35	7.56
		36	6.42
		37	6.02
29/05/2008	300715-0603	38	7.51
		39	6.72
		40	8.37
20/06/2008	300715-0603	41	17.02
		42	1.02
		43	0.74
		44	0.55
		Media aritmética	3.22
		Desviación estándar	3.34308829
		Moda	1.54
		Mediana	1.62

Anexo 3. Prueba de T.

Prueba de Hipótesis: No hay diferencia entre los niveles de concentración encontrados y los niveles permitidos de cada una de las cinco micotoxinas presentes en las muestras de alimentos estudiadas.

- **Prueba de T para Aflatoxinas totales.**

$$T = \frac{\bar{X} - \mu}{S / \sqrt{n}}$$

$$T = \frac{10.46 - 20}{3.407379691/6.63324958} \quad T = \frac{-9.60}{0.51368} \quad T = -18.69$$

Grados de libertad = 43

P < 0.0001

- **Prueba de T para toxina T-2.**

$$T = \frac{127.37 - 200}{49.56420046/6.63324958} \quad T = \frac{-72.63}{7.47208} \quad T = -9.72$$

Grados de libertad = 43

P < 0.0001

- **Prueba de T para DON.**

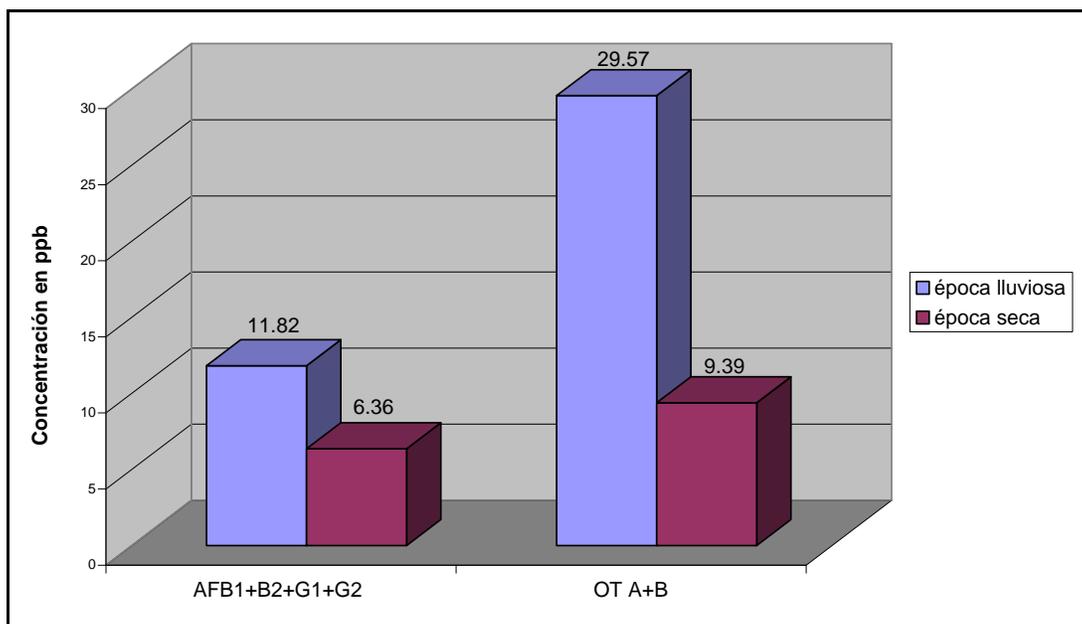
$$T = \frac{4525.91 - 1000}{2779.1226/6.63324958} \quad T = \frac{3525.91}{418.9685} \quad T = 8.42$$

Grados de libertad = 43

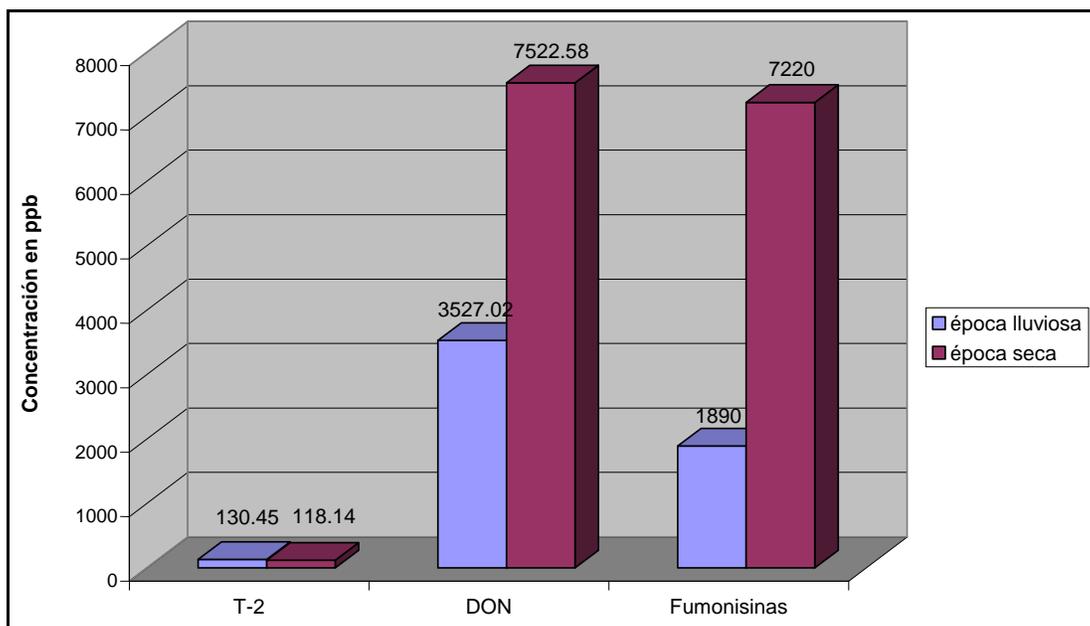
P < 0.0001

Anexo 4. Gráficas sobre los resultados obtenidos en este estudio.

Gráfica 1. Promedio de los niveles de concentración de micotoxinas obtenidos en este estudio en época lluviosa y época seca.



Gráfica 2. Promedio de los niveles de concentración de micotoxinas obtenidos en este estudio en época lluviosa y época seca.



X. APÉNDICES.

Tabla 1. Valores de referencia de micotoxinas en alimentos terminados para aves de corral, utilizados en este estudio (FAO, 2004).

Micotoxina	Sustrato	Límite máximo en µg/Kg (ppb).
AF B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	Todas las raciones.	20
Deoxinivalenol	Raciones completas.	1000
	Raciones completas para animales de granja jóvenes.	500
Toxina T-2	Raciones combinadas para ponedoras y pollos de engorde.	200

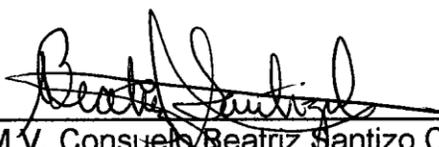
Tabla 2. Valores orientativos de otras micotoxinas en alimentos terminados para aves de corral (Diario, 2006).

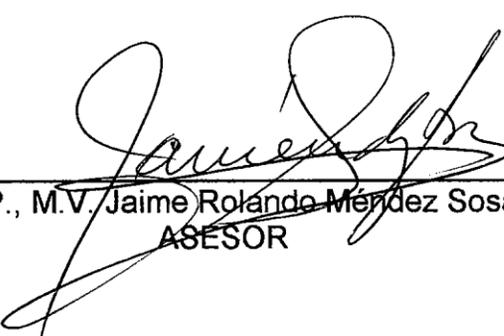
Micotoxina	Sustrato	mg/Kg (ppm) para piensos con humedad del 12%.
Ocratoxina A	Piensos complementarios y completos.	0.1
Fumonisinias B1+B2	Piensos complementarios y completos.	20

Tabla 3. Límites máximos de micotoxinas expresados en ppb, recomendados para aves de producción (Mallmann et al, 2006).

Etapa de producción.	AF	F	OTA	DON	HT2	T 2	ZEN	DAS
Pollos de engorde fase inicial	0	100	0	200	0	0	10	0
Pollos de engorde crecimiento	2	500	2	500	10	50	20	200
Pollos de engorde fase final	5	500	5	1000	10	50	20	200
Ponedoras comerciales	10	1000	5	1000	20	100	50	500
Reproductoras	10	1000	5	1000	20	100	50	500


P. Agr. Leonidas Anibal Gómez Grijalva


M.Sc., M.V. Consuelo Beatriz Santizo Cifuentes
ASESORA PRINCIPAL


M.SP., M.V. Jaime Rolando Méndez Sosa
ASESOR


M.Sc., M.V. Dennis Sigfried Guerra Centeno
ASESOR

IMPRIMASE:


Med. Vet. Leonidas Ávila Palma
DECANO

