



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**TESIS
PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y *ASPERGILLUS FLAVUS* EN
ALIMENTOS SECOS COMERCIALES PARA PERROS EN
AGUASCALIENTES, MÉXICO**

**PRESENTA
M. en C. LIZBETH MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**TUTOR
DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES**

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL
DRA. ALMA LILIÁN GUERRERO BARRERA
DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN**

Aguascalientes, Ags., 01 de marzo de 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que como **Miembros del Comité Tutorial** designado de la estudiante **LIZBETH MARTÍNEZ MARTÍNEZ**, con ID 35165, hemos revisado su tesis titulada: **PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y ASPERGILLUS FLAVUS EN ALIMENTOS SECOS COMERCIALES PARA PERROS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO** y que después de que las correcciones se han incorporado apropiadamente, consideramos en que es un trabajo propio, innovador, relevante e inédito. Por lo que, con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia y del Artículo 35, Apartado IX, del Reglamento General de Posgrado de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, nos permitimos emitir nuestro **VOTO APROBATORIO**, por medio del cual damos nuestro consentimiento para que ella pueda imprimir la versión final del documento y que pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 01 de marzo de 2023

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Tutor de tesis

Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera
Asesor de tesis

Dr. Teódulo Quezada Tristán
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 28-mar-23

NOMBRE: LIZBETH MARTÍNEZ MARTÍNEZ **ID** 35165

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD TRADICIONAL **LGAC (del posgrado):** BIOINGENIERÍA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

TIPO DE TRABAJO: Tesis Trabajo práctico

TÍTULO: PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y ASPERGILLUS FLAVUS EN ALIMENTOS SECOS COMERCIALES PARA PERROS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

Impacta sobre Agentes Tóxicos y Procesos Contaminantes, así como en Sistemas Socioecológicos

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:


DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:


DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:


DR. JUAN JAUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:


M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

ARTÍCULO NÚMERO UNO PUBLICADO (Anexo A)



Review

Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review

Lizbeth Martinez-Martinez ¹, Arturo G. Valdivia-Flores ^{1,*}, Alma Lilian Guerrero-Barrera ², Teóduło Quezada-Tristán ¹, Erika Janet Rangel-Muñoz ¹ and Raúl Ortiz-Martinez ¹

¹ Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20131, Mexico; lizbeth.martinez@edu.uaa.mx (L.M.-M.); teodulo.quezada@edu.uaa.mx (T.Q.-T.); janet.rangel@edu.uaa.mx (E.J.R.-M.); raul.ortiz@edu.uaa.mx (R.O.-M.)

² Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20130, Mexico; alguerre@correo.uaa.mx

* Correspondence: avaldiv@ccoma.uaa.mx; Tel: +52-449-910-8101

Abstract: Since its first patent (1897), commercial dry feed (CDF) for dogs has diversified its formulation to meet the nutritional needs of different breeds, age, or special conditions and establish a foundation for integration of these pets into urban lifestyles. The risk of aflatoxicosis in dogs has increased because the ingredients used to formulate CDF have also proliferated, making it difficult to ensure the quality required of each to achieve the safety of the entire CDF. This review contains a description of the fungi and aflatoxins detected in CDF and the ingredients commonly used for their formulation. The mechanisms of action and pathogenic effects of aflatoxins are outlined; as well as the clinical findings, and macroscopic and microscopic lesions found in aflatoxicosis in dogs. In addition, alternatives for diagnosis, treatment, and control of aflatoxins (AF) in CDF are analyzed, such as biomarkers of effect, improvement of blood coagulation, rate of elimination of AF, control of secondary infection, protection of gastric mucosa, reduction of oxidative stress, use of chemo-protectors, sequestrants, grain-free CDF, biocontrol, and maximum permitted limits, are also included.

Keywords: *Aspergillus flavus*; aflatoxicosis; biomarkers; blood coagulation; hepatic diseases

Key Contribution: This review study highlights the extensive presence of *Aspergillus flavus* and its aflatoxins (AF) in commercial dry food (CDF) for dogs; unfortunately, information on mycotoxins in dogs is scarce and scattered. Various agro-industrial by-products used as ingredients of CDF show high levels of AF, which reveals the exposure of dogs to AF in their diet, causing clinically observable damage from low doses (60 µg/kg). Treatment and control strategies for contamination due to AF in CDF are also outlined. Therefore, this study serves as the foundation for the knowledge of the risk that dogs integrated into urban life have, in which the CDF contaminated by AF is ingested until all the feed contained within each bag is finished, suggesting an urgent need for quality control mechanisms.



Citation: Martínez-Martínez, L.; Valdivia-Flores, A.G.; Guerrero-Barrera, A.L.; Quezada-Tristán, T.; Rangel-Muñoz, E.J.; Ortiz-Martínez, R. Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review. *Toxins* 2021, 13, 65. <https://doi.org/10.3390/toxins13010065>

Received: 16 December 2020

Accepted: 12 January 2021

Published: 15 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Commercial dry feed (CDF) for dogs was first patented in 1860 by James Spratt, but it was not until 1957 that it started to be sold commercially. The diversity in the CDF formula increases due to the rise in the knowledge of the nutritional needs of dogs depending on their breeds, ages, and activities carried out. Another aspect that drives the supply of CDF is the increasing availability of agro-industrial ingredients of diverse bromatological composition, which guides the diversification of suitable feed formulas for dogs with differences in their digestive needs, nutrient profiles, and metabolism [1]. Another aspect that drives the demand for CDF is the integration of the dog into the urban lifestyle, as



toxins

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF PUBLICATION



Certificate of publication for the article titled:

Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review

Authored by:

Lizbeth Martínez-Martínez; Arturo G. Valdivia-Flores; Alma Lilian Guerrero-Barrera;
Teóduo Quezada-Tristán; Erika Janet Rangel-Muñoz; Raúl Ortiz-Martínez

Published in:

Toxins 2021, Volume 13, Issue 1, 65



Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, January 2021

ARTÍCULO NÚMERO DOS ENVIADO (Anexo B)

Estatus: En revisión

TU SISTEMA DE CORREO INSTITUCIONAL :: [RMCP] Envío recibido https://correoweb.uaa.mx/?_task=mail&_safe=0&_uid=104585&_mbo...

Asunto [RMCP] Envío recibido
De MVZ. Arturo García Fraustro
 <cienciaspecuarias@inifap.gob.mx>
Destinatario Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores <avaldiv@correo.uaa.mx>
Fecha 2023-01-17 12:29



Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores:

Hemos recibido y agradecemos el envío de su manuscrito 6397:
 "Contaminación de alimento comercial seco para perro por *Aspergillus flavus*
 y aflatoxinas en el centro de México" a la Revista Mexicana de Ciencias
 Pecuarias. A través del sistema de gestión de revistas online usted podrá
 seguir su progreso del proceso editorial identificándose en el sitio web de
 la revista:

URL del manuscrito:
<https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/author/submission/6397>
 Nombre de usuario/o: avaldiv

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as a
cienciaspecuarias@inifap.gob.mx. Gracias por tener en cuenta nuestra revista
 para difundir su trabajo.

MVZ. Arturo García Fraustro
 Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias
<https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx>

AGRADECIMIENTOS

Se externa un agradecimiento para la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero y el acceso a laboratorios con equipos especializados para el desarrollo y conclusión del proyecto doctoral. También al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el periodo de estudio 2020- 2022.

Un agradecimiento a mi tutor, el Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores por el apoyo que me brindó para la elaboración del proyecto; desde la concepción de la idea, la ejecución, el análisis y la redacción del documento de tesis durante los tres años del Doctorado. Además, se extiende el agradecimiento a los miembros del comité tutorial integrado por la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera y el Dr. Teódulo Quezada Tristán por su invaluable apoyo y asesoría profesional para atender cada duda.

Especial agradecimiento merece el interés mostrado al Dr. Marcelo Lisandro Signorini Porchietto por la oportunidad que me otorgó para realizar la estancia internacional en el Área de Salud Animal del Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (CONICET-INTA), Rafaela- Santa Fe, Argentina.

Se otorga un agradecimiento a la Dra. Erika Janet Rangel Muñoz y a la Dra. Karla Isela Arroyo Zúñiga por la asesoría brindada para la realización de las técnicas analíticas.

Así mismo, a la M en C. María Fernanda Álvarez Días y a la M en C. Estrella Hernández García se les hace un reconocimiento y agradecimiento por su apoyo técnico y sus aportaciones para realizar este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A Dios y a mi madre Elvia por cuidarme, ser mi guía y mi luz para continuar en el trayecto de mi vida.

Dedico el trabajo de tesis a mi padre, el Sr. Benito y a mis hermanas Beatriz y a Gabriela. “Gracias por motivarme en cada momento, dándome sus consejos que me impulsan a querer seguir adelante para cumplir mis objetivos. Agradezco su apoyo incondicional, comprensión y ánimo que siempre me han otorgado”.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL 8

ÍNDICE DE CUADROS 12

ÍNDICE DE FIGURAS 13

ACRÓNIMOS 14

RESUMEN 17

ABSTRACT 18

INTRODUCCIÓN 19

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 20

 1.1. JUSTIFICACIÓN 20

2 ANTECEDENTES 22

 2.1. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES 22

 2.1.1. Energía 23

 2.1.2. Agua 23

 2.1.3. Carbohidratos..... 24

 2.1.4. Grasas 24

 2.1.5. Proteínas..... 25

 2.2. CLASIFICACIÓN DE ACUERDO CON LA FORMA DE PRODUCCIÓN EN ALIMENTO PARA PERROS 25

 2.2.1. Alimento seco..... 25

 2.2.2. Alimento semihúmedo..... 27

 2.2.3. Alimento húmedo 28

 2.3. CLASIFICACIÓN DE ACUERDO CON EL PROPÓSITO DE LA DIETA EN ALIMENTOS PARA PERROS 29

 2.3.1. Alimento con propósito específico 29

 2.3.2. Alimento todo propósito..... 29

 2.3.3. Alimentos terapéuticos de uso veterinario 29

 2.4. CLASIFICACIÓN COMERCIAL DE ALIMENTOS PARA PERROS 30

 2.4.1. Alimentos básicos o populares y económicos 30

 2.4.2. Alimentos Premium y Super Premium 31

 2.5. ALIMENTACIÓN DURANTE LAS ETAPAS DE LA VIDA 32

 2.5.1. Gestación y lactación 32

 2.5.2. Neonatos..... 34

2.5.3.	Perros en crecimiento	34
2.5.4.	Perros adultos en mantenimiento	36
2.5.5.	Perros adultos de alto rendimiento	36
2.5.6.	Perros gerontes.....	36
2.6.	<i>ASPERGILLUS FLAVUS</i>	38
2.6.1.	Clasificación taxonómica.....	38
2.6.2.	Características morfológicas	38
2.6.3.	Características óptimas para el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i>	40
2.6.4.	Genoma de <i>Aspergillus flavus</i>	40
2.7.	PRESENCIA DE <i>ASPERGILLUS</i> SPP. Y OTRA MICROBIOTA FÚNGICA EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO.....	41
2.8.	AFLATOXINAS	43
2.8.1.	Aflatoxinas y sus productos de biotransformación.....	44
2.8.2.	Hallazgos clínicos en la aflatoxicosis en perros.....	45
2.9.	CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO PARA PERROS	46
2.10.	MICOTOXINAS	48
2.10.1.	Zearalenona.....	48
2.10.2.	Fumonisina	49
2.10.3.	Ocratoxina.....	49
2.10.4.	Deoxinivalenol.....	50
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
3.1.	HIPÓTESIS.....	51
3.2.	OBJETIVO GENERAL.....	51
3.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3.3.1.	Obtener una muestra representativa de la oferta de alimentos comerciales secos para perros expendidos en Aguascalientes.....	51
3.3.2.	Aislar e identificar la microbiota fúngica en los alimentos comerciales secos para perros.....	51
3.3.3.	Cuantificar la concentración de micotoxinas presentes en los alimentos mediante ELISA indirecta.	51
3.3.4.	Determinar la capacidad aflatoxigénica de <i>Aspergillus flavus</i> en vapores de amonio en agar-coco y HPLC.	51

3.3.5.	Realizar análisis molecular para <i>Aspergillus flavus</i>	51
3.3.6.	Evaluar la asociación de la presencia de aflatoxinas con los ingredientes con que se elaboraron los alimentos.....	51
4	MATERIALES Y MÉTODOS	52
4.1.	CARACTERÍSTICAS DE MUESTREO	52
4.1.1.	Cálculo del tamaño de la muestra	52
4.2.	MANEJO DE LAS MUESTRAS.....	53
4.3.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> Y OTRA FLORA FÚNGICA	54
4.3.1.	Técnica de vaciado en placa por dilución	54
4.3.2.	Identificación de la estructura morfológica mediante la preparación de tinción azul de algodón con lactofenol.....	54
4.4.	CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS	54
4.4.1.	Cuantificación de aflatoxinas en el alimento comercial seco por el método de ELISA indirecta	54
4.5.	DETECCIÓN DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> ..	55
4.5.1.	Detección cualitativa de la capacidad aflatoxigénica de <i>Aspergillus flavus</i> por el método de vapores de amonio	55
4.5.2.	Detección cualitativa de la capacidad aflatoxigénica de <i>Aspergillus flavus</i> por el método de cromatografía en capa fina	55
4.5.3.	Cuantificación de aflatoxinas en <i>Aspergillus flavus</i> por el método de Cromatografía líquida de alta eficacia	55
4.6.	ANÁLISIS MOLECULAR PARA <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i>	55
4.7.	CUANTIFICACIÓN DE ZEARALENONA, FUMONISINA, OCRATOXINA Y DEOXINIVALENOL EN ALIMENTO COMERCIAL SECO	55
4.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
5	RESULTADOS.....	57
5.1.	IDENTIFICACIÓN DE <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> Y OTRA MICROFLORA FÚNGICA ...	57
5.2.	EVALUACIÓN DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO POR EL MÉTODO DE ELISA INDIRECTA.....	58
5.2.1.	Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de aflatoxinas	59
5.2.2.	Asociación entre los cereales en el alimento comercial seco y la concentración de aflatoxinas	59

5.3.	DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> POR EL MÉTODO DE VAPORES DE AMONIO	61
5.4.	DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> POR EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	62
5.5.	CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> POR EL MÉTODO DE HPLC	63
5.6.	ANÁLISIS MOLECULAR PARA <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i>	63
5.7.	EVALUACIÓN DE ZEARALENONA EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO POR EL MÉTODO DE ELISA INDIRECTA.....	64
5.7.1.	Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de zearalenona	65
5.7.2.	Asociación entre los cereales en el alimento comercial seco y la concentración de zearalenona	66
5.8.	EVALUACIÓN DE FUMONISINA, OCRATOXINA Y DEOXINIVALENOL.....	67
5.8.1.	Fumonisina	67
5.8.2.	Ocratoxina.....	68
5.8.3.	Deoxinivalenol.....	69
6	DISCUSIÓN	71
6.1.	AISLAMIENTO FÚNGICO	71
6.2.	CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS	71
6.2.1.	Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de aflatoxinas	71
6.2.2.	Asociación entre los ingredientes y la concentración de aflatoxinas	72
6.3.	CUANTIFICACIÓN DE ZEARALENONA	74
6.3.1.	Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de zearalenona	74
6.3.2.	Asociación entre los ingredientes y la concentración de zearalenona	74
7	CONCLUSIÓN	76
8	GLOSARIO	77
9	REFERENCIAS.....	80
10	ANEXOS	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus flavus</i>	38
Cuadro 2. Microflora fúngica detectada en alimento comercial seco para perro	42
Cuadro 3. Intoxicación aguda en perros por ingestión de aflatoxinas en alimento comercial seco para perro.....	45
Cuadro 4. Presencia de aflatoxinas en alimento comercial seco para perro	47
Cuadro 5. Características del alimento comercial seco para perro comercializados en el centro de México.....	53
Cuadro 6. Asociación entre el análisis bromatológico del alimento comercial seco para perro y la concentración de aflatoxinas	59
Cuadro 7. Asociación entre la concentración de aflatoxinas y la inclusión de cereales en alimento comercial seco para perro	60
Cuadro 8. Asociación entre la concentración de aflatoxinas y la inclusión de subproductos de origen animal en alimento comercial seco para perro.....	60
Cuadro 9. Asociación entre la inclusión de fungicidas y agentes secuestrantes con la concentración de aflatoxinas en el alimento comercial seco para perro.....	61
Cuadro 10. Comparación entre la concentración de aflatoxinas en las colonias de <i>A. Flavus</i> del alimento comercial seco	63
Cuadro 11. Asociación entre el análisis bromatológico del alimento comercial seco para perro y la concentración de zearalenona	65
Cuadro 12. Asociación entre la concentración de zearalenona y la inclusión de cereales en alimento comercial seco para perro.....	66
Cuadro 13. Asociación entre la concentración de zearalenona y la inclusión de subproductos de origen animal en alimento comercial seco para perro.....	67
Cuadro 14. Asociación entre la inclusión de oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas y tubérculos en el alimento comercial seco y la concentración de zearalenona.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características macroscópicas de *A. flavus* en agar coco. 39

Figura 2. Tamaño de muestra para estimar una proporción..... 52

Figura 3. Aislados monospóricos. Imagen propia 57

Figura 4. Frecuencia de la concentración de aflatoxinas (AFs) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. (MPL máximo permissible level) LMP, Límite máximo permisible: América (20 µg/kg); Unión Europea (5.0 µg/kg)..... 58

Figura 5. *Aspergillus flavus* en medio agar coco..... 62

Figura 6. Placa de sílica gel vista en transluminador 62

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen de la región de espaciadores internos de la transcripción (ITS) (Panel A), Calmodulina (Panel B) y aflR (Panel C)..... 64

Figura 8. Frecuencia de la concentración de zearalenona (ZEA) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. (MPL máximo permissible level) LMP, Límite máximo permisible: Unión Europea (200 µg/kg) 65

Figura 9. Frecuencia de la concentración de fumonisina (FUM) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. 68

Figura 10. Frecuencia de la concentración de ocratoxina (OTA) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. 69

Figura 11. Frecuencia de la concentración de deoxinivalenol (DON) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. 70

Figura 12. Curva estándar para aflatoxinas totales 143

Figura 13. Curva estándar para zearalenona..... 149

Figura 14. Curva estándar para fumonisina 150

Figura 15. Curva estándar para ocratoxina 151

Figura 16. Curva estándar para deoxinivalenol..... 153

ACRÓNIMOS

AAFCO	Association of American Feed Control Officials	GSH	Glutación reducido
Abs	Absorbancia	GST	Glutación S-transferasa
ACS	Alimento comercial seco	HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ADN	Ácido desoxirribonucleico	HPLC-FL	Fluorescence high performance liquid chromatography
AE	Alimento estándar	HSCAS	Aluminosilicato hidratado de calcio sódico
AFB₁	Aflatoxina B ₁	ITS	Internal transcribed spacer
AFB₂	Aflatoxina B ₂	Kcal	Kilocaloría
AFBO	8,9-epóxido-AFB ₁	Kd	Kilodalton
AF-FAPy	AF formaminopirimidina	Kg	Kilogramo
AFG₁	Aflatoxina G ₁	L	Litro
AFG₂	Aflatoxina G ₂	LC-MS	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
AFL	Aflatoxicol	LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
afIR	Gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas	LMP	Límite máximo permisible
AFM₁	Aflatoxina M ₁	mg	Miligramo
AFM₂	Aflatoxina M ₂	min	Minuto
AFP₁	Aflatoxina P ₁	mL	Mililitro
AFP₂	Aflatoxina P ₂	mm	Milímetro

AFQ₁	Aflatoxina Q ₁	MS	Materia seca
AFQ₂	Aflatoxina Q ₂	mV	Milivolt
AFs	Aflatoxinas	N	Número de observaciones
ALP	Fosfatasa alcalina	Nm	Nanómetro
ALT	Alanina aminotransferasa	NRC	Nutrient requirements of dogs and cats
ANOVA	Analysis of variance	n-3 FA	Ácidos grasos omega-3
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas	OTA	Ocratoxina
AP	Alimento premium	OTα	ocratoxina α
aPTT	Tiempo de tromboplastina parcial activada	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico	pH	Potencial de hidrógeno
ASP	Alimento super premium	PLC-MS/MS	Ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
AST	Aspartato aminotransferasa	PT	Tiempo de protrombina
CCl₄	Tetracloruro de carbono	p/v	Peso sobre volumen
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno	Q₄	Rango intercuartílico superior
CID	Coagulación intravascular diseminada	RM	Razón de momios
CYP₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀	rpm	Revoluciones por minuto
DHA	Ácido docosahexaenoico	S	Segundo
dL	Decilitro	SPE	Extracción en fase sólida
DL₅₀	Dosis letal media	TCTC	Tricotecenos

DON	Deoxinivalenol	TLC	Cromatografía en capa fina
D3G	DON-3-glucósido	TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
EB	Energía bruta	UFC	Unidades formadoras de colonias
EE	Error estándar	UGT	Glucuronosiltransferasa
ED	Energía digestible	UHPLC-Q-Orbitrap HRMS	Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry
EFSA	European Food Safety Authority	α-ZEA	α- zearalenol
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	β-ZEA	β-zearalenol
ELN	Extracto libre de nitrógeno	μg	Microgramo
EM	Energía metabolizable	μL	Microlitro
EPA	Ácido eicosapentaenoico	mm	Micrómetro
et al.,	Y colaboradores	μmol	Micromol
FAO	Food and Agriculture Organization	°C	Grados Celsius
FB₁	Fumonisina B ₁	4-OH-OTA	4-hidroxi-ocratoxina A
FUM	Fumonisina	10-OH-OTA	10- hidroxiocratoxina A
FVII:C	Factor de coagulación VII	χ²	Chi-cuadrada
g	Gramo	ZEA	Zearalenona

RESUMEN

El alimento comercial seco (ACS) para perro es una ración integral completamente mezclada y troquelada con calor y presión para darle forma de croqueta. El ACS está formulado con diversos ingredientes y subproductos agroindustriales de origen agrícola y pecuario. Se ha demostrado que la contaminación por *Aspergillus flavus* y por aflatoxinas (AFs) en los alimentos es un problema global que causa daños a la salud humana y animal. El objetivo fue evaluar la presencia de microflora fúngica y la contaminación por AFs en el ACS. Se seleccionó una muestra aleatoria (n=77) de ACS comercializado en Aguascalientes, México. Las muestras fueron procesadas y cultivadas por diluciones seriadas, obteniendo aislados monospóricos, los cuales se caracterizaron morfológica, toxigénica (HPLC) y molecularmente (PCR). La concentración de AFs en ACS se cuantificó por HPLC. En el 48.0% de ACS se observó crecimiento fúngico y 8.0% superaron el límite máximo permisible (LMP=10⁶ UFC/g). Se encontraron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Alternaria* y *Fusarium* (69.4, 12.9, 9.4, 4.7, 1.7 y 1.1%, respectivamente). Todas las muestras de ACS mostraron contaminación por AFs (14.8±0.3 µg/kg) y el 11.8% excedió el LMP (20.0µg/kg) sugerido por la normatividad; la contaminación se asoció significativamente ($p<0.05$) con algunos ingredientes empleados, humedad del ACS e inclusión de fungicidas y secuestrantes. Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de elaboración del ACS no elimina completamente la contaminación por hongos ni por las AFs presentes en los ingredientes empleados para su formulación; en consecuencia, se trasladan al producto terminado poniendo en riesgo la salud de los perros y la eficacia de la cadena alimenticia.

ABSTRACT

Commercial dry feed (CDF) for dog is a whole feed ration, completely mixed and die-cut with heat and pressure to give it a croquette shape. ACS is formulated with various ingredients and agro-industrial by-products of vegetable and livestock origin. *Aspergillus flavus* and aflatoxin (AFs) contamination in food has been shown to be a global problem causing damage to human and animal health. The objective was to evaluate the presence of fungal microflora and AFs contamination in CDF. A random sample (n=77) of CDF marketed in Aguascalientes, central Mexico, was selected. The samples were processed and cultured by serial dilutions (rose bengal+chloramphenicol and Czapeck), obtaining monosporic isolates, which were characterized morphologically, toxigenically (HPLC) and molecularly (PCR). The concentration of AFs in CDF was quantified by HPLC. Fungal growth was observed in 48.0% of CDF samples and 8.0% exceeded the maximum permissible level (MPL=10⁶ CFU/g). The genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Alternaria* and *Fusarium* were found (69.4, 12.9, 9.4, 4.7, 1.7 and 1.1%, respectively). All CDF samples showed AFs contamination (14.8±0.3 µg/kg) and 11.8% exceeded the MPL (20.0µg/kg) suggested by the regulations; contamination was significantly associated ($p<0.05$) with some ingredients used, relative humidity of the ACS and inclusion of fungicides and sequestrants. The results obtained suggest that the ACS manufacturing process does not eliminate fungal contamination or AFs present in the ingredients used for its formulation; consequently, they are transferred to the finished product, putting the health of the dogs and the efficiency of the food chain at risk.

INTRODUCCIÓN

El ACS para perros fue patentado por primera vez en 1860 por James Spratt, pero no fue hasta 1957 que comenzó a venderse comercialmente. La diversidad en la fórmula del alimento comercial seco (ACS) crece debido al aumento en el conocimiento de las necesidades nutricionales de perros en función de sus razas, edades y actividades que realizan. Otro aspecto que impulsa la oferta del ACS es la creciente disponibilidad de ingredientes agroindustriales de diversa composición bromatológica, que orientan la diversificación de fórmulas de alimentación adecuadas para perros con diferencias en sus perfiles de nutrientes y metabolismo (Case, Daristotle, Hayek y Raasch, 2011). Otro aspecto que impulsa la demanda de ACS es la integración del perro en el estilo de vida urbano, así como el fortalecimiento del vínculo humano-mascota en el que los dueños de perros dan igual prioridad a la alimentación saludable de sus mascotas, así como a la propia (Schleicher, Cash y Freeman, 2019).

La oferta de ACS incluye derivados secos de todo tipo de carnes y viseras de pollo, res, cerdo y otras especies; incluso se incorporan carne de codorniz, faisán y avestruz en la elaboración de estos alimentos (Rojas *et al.*, 2011). El ACS también agrega varios cereales, tales como maíz, arroz, trigo, cebada y sorgo por su bajo costo y aceptable valor nutricional; además de esto, no afecta la palatabilidad y digestibilidad de los nutrientes, aunque la calidad e inocuidad de los cereales a veces es objetable (Tegzes, 2019). Estos ingredientes se utilizan ampliamente como fuente de energía, así como también como un aporte de algunas vitaminas, minerales, fibras y grasas (Beloshapka *et al.*, 2016). Además, se incorporan ingredientes proteicos de soja y pasta de soja, así como algunos ingredientes ricos en fibra como alfalfa y avena (Yathavamoorthi *et al.*, 2020).

Los productos pueden estar contaminados con hongos *Aspergillus* spp. u otra microbiota fúngica y aflatoxinas. La contaminación ocurre en varias etapas de la producción de ingredientes, como la floración, cosecha, procesamiento o almacenamiento de cereales, así como de residuos metabólicos en productos cárnicos, lácteos y de huevo (Ott, Appleton, Shi y Mellata, 2020; Fuentes *et al.*, 2018; Alsayyah, *et al.*, 2019).

La contaminación por hongos *Aspergillus flavus* y aflatoxinas; así como la presencia de otras micotoxinas son un factor importante porque reduce el valor nutricional del sustrato y produce una gran variedad de efectos tóxicos.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los países, los alimentos para perros y otras mascotas están regulados por los Límites Máximos Permisibles (LMP) de contaminación por micotoxinas de alimentos para animales de granja y alimento para el humano, pero en México y la mayoría de las naciones no existe una legislación específica para estas especies (Macías-Montes *et al.*, 2020).

Aunque la información sobre la presencia de *Aspergillus* spp. y otra microflora fúngica en varios ingredientes de alimentos humanos es extensa, los estudios de esta contaminación en ACS son escasos.

Las aflatoxinas y otras micotoxinas producen efectos adversos para la salud de manera aguda o a largo plazo (Macías-Montes *et al.*, 2020) y los signos clínicos dependen del tipo y concentración de micotoxina, duración de la exposición, especie, sexo, edad y salud del animal (Pinotti *et al.*, 2016; Alassane-Kpembi *et al.*, 2013).

1.1. JUSTIFICACIÓN

Los perros han aumentado su importancia social, alcanzando a ser integrantes de una de cada ocho familias en México (INEGI, 2014). En México, el cuidado y crianza de los perros se basa en una gran oferta de diversos alimentos comerciales secos, usualmente llamados croquetas (PROFECO, 2016). Los fabricantes aprovechan una gran variedad de ingredientes y subproductos de la agroindustria para formular preparaciones que cubran las necesidades nutricionales específicas para algunas razas, edad o condición de perro.

La presencia de *Aspergillus* spp. u otra microbiota fúngica en cereales u otros ingredientes de piensos para perros incorporados en las formulaciones de ACS deteriora la calidad y afecta la seguridad de todo el pienso (Aquino y Correa, 2011). Los cereales y otros ingredientes son sustratos adecuados para el crecimiento de la microflora fúngica, tanto en la etapa previa a la cosecha y en almacenamiento (Bennett, Klich 2003).

La contaminación con microbiota fúngica y micotoxinas en los alimentos representa un grave problema de salud para los perros, así como también representa una afectación para la industria de alimentos, debido a que la contaminación es una falla en la calidad del producto y puede tener efectos serios en la empresa; por lo que la inocuidad es también una responsabilidad del fabricante (Fuentes *et al.*, 2018). A pesar de su importancia, en nuestro conocimiento, es

escasa la información que existe acerca de la contaminación por *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en el ACS para perros.



2 ANTECEDENTES

A mediados del siglo XIX, los alimentos para perros no eran preparados comercialmente, pero en 1860, James Spratt produjo y vendió el primer alimento comercial para esta especie. En 1957, se vendió por primera vez alimento seco para mascotas y a medida que se fue adquiriendo conocimiento acerca de las diferentes necesidades de nutrientes en los perros y los gatos, se empezó a formular alimentos para cada una de estas especies (Case *et al.*, 2011).

La diversidad en la fórmula de ACS ha crecido debido al aumento en el conocimiento de las necesidades nutricionales de perros en función de sus razas, edades y actividades que realizan. Otro aspecto que impulsa la oferta del ACS es la creciente disponibilidad de ingredientes agroindustriales de diversa composición bromatológica, que orientan la diversificación de fórmulas de alimentación adecuadas para perros con diferencias en sus perfiles de nutrientes y metabolismo (Case *et al.*, 2011).

La oferta de ACS incluye derivados secos de todo tipo de carnes y viseras, así como subproductos de origen animal para la elaboración de estos alimentos (Rojas *et al.*, 2011). Estos productos y subproductos de origen animal se añaden al pienso para perros como una fuente importante de proteínas y grasas. El ACS también agrega varios cereales, tales como maíz, arroz, trigo, cebada y sorgo por su bajo costo y aceptable valor nutricional. Estos ingredientes se utilizan ampliamente como fuente de energía, así como también como un aporte de algunas vitaminas, minerales, fibras y grasas (Beloshapka, Buff, Fahey y Swanson, 2016). En algunas formulaciones las semillas de calabaza, la chía, la quinua e incluso algunas legumbres como las lentejas se incluyen entre los ingredientes debido a su alto contenido en proteínas y minerales (Herrera *et al.*, 2019; Hacıbekiroğlu y Kolak, 2013; Nazir *et al.*, 2019).

2.1. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Para mantener un estado de salud óptimo, los perros deben consumir una dieta que aporte los nutrientes esenciales en cantidad y proporción adecuada. Los objetivos principales de la alimentación en los animales de compañía consisten en mantenerlos saludables, lograr un correcto crecimiento, ser un apoyo esencial en la gestación y la lactación y mantener un correcto rendimiento del animal, por lo que, una nutrición correcta a lo largo de la vida favorece el bienestar, la vitalidad y la longevidad del animal (Case *et al.*, 2011).

Los nutrientes son componentes de la dieta con una función específica dentro del organismo que contribuyen al crecimiento, la conservación de los tejidos y una salud óptima.

Además de la energía, los animales precisan seis tipos principales de nutrientes: agua, hidratos de carbono, proteínas, grasas, minerales y vitaminas (Case *et al.*, 2011).

2.1.1. Energía

La energía no es un nutriente sino una propiedad de los lípidos, carbohidratos y proteínas por lo cual resulta ser necesaria para mantener el metabolismo del organismo durante el crecimiento, mantenimiento, reproducción, lactación y la actividad física del animal (NRC 2006).

La energía no posee masa ni dimensión medibles pero el organismo transforma la energía química contenida en los alimentos en calor. La energía química de los alimentos se expresa en calorías o kilocalorías (kcal). Una caloría es la energía calorífica necesaria para elevar la temperatura de 1g de agua de 14.5-15.5°C. Dado que la caloría es una unidad muy pequeña, no resulta práctica en la ciencia de la nutrición animal. De ahí que la unidad más empleada sea kcal, equivalente a 1000 calorías (Case *et al.*, 2011).

La energía química total del alimento se denomina energía bruta (EB). Los animales no pueden utilizar toda la EB de un alimento ya que parte de esta se pierde durante la digestión y la asimilación. La energía digestible (ED) es la cantidad de energía disponible para su absorción a través de la mucosa intestinal. La energía metabolizable (EM) es la cantidad de energía que llega finalmente a los tejidos del organismo y se define como la energía requerida para mantener la homeostasis en un animal. La EM puede subdividirse en la termogénesis inducida por la dieta la cual es la energía que se utiliza por el organismo para digerir, absorber y asimilar los nutrientes; y la energía neta es la que el animal aplica para mantener los tejidos corporales y para realizar acciones productivas, como la actividad física, el crecimiento, la gestación y la lactación (Case *et al.*, 2011).

Los animales pueden regular su ingesta energética en función de sus necesidades calóricas diarias. Si tienen acceso a una dieta equilibrada y moderadamente palatable, la mayoría de los perros consumirán alimento suficiente para cubrir sus necesidades energéticas diarias, sin superarlas (Case *et al.*, 2011).

2.1.2. Agua

El agua es un elemento básico de la digestión normal de los alimentos ya que es necesaria para la hidrólisis, es decir la fragmentación de moléculas grandes por otras más pequeñas por la adición de agua. Este medio acuoso facilita la interacción de los componentes alimenticios con las enzimas digestivas (Case *et al.*, 2011).

Las necesidades de agua pueden satisfacerse mediante una combinación de agua consumida voluntariamente (agua libre), agua como componente de los alimentos (agua

combinada) o agua producida endógenamente durante el metabolismo de nutrientes que contienen energía (agua metabólica) (NRC, 2006).

La cantidad de agua que existe en la comida depende del tipo de dieta. Los piensos secos sólo contienen un 7% de agua, pero algunas comidas enlatadas pueden llegar a contener un 84% (Case *et al.*, 2011).

2.1.3. Carbohidratos

Los perros necesitan glucosa. Esta necesidad se puede cubrir mediante síntesis endógena o a partir de los carbohidratos de la dieta. El perro puede cubrir sus requerimientos metabólicos de glucosa mediante las vías gluconeogénicas a lo largo de su vida juvenil y adulta, siempre que disponga de grasa y proteínas suficientes en la dieta (Case *et al.*, 2011). Las vías gluconeogénicas hepáticas y renales producen glucosa a partir del ácido propiónico, ácido láctico, glicerol y algunos aminoácidos para ser liberada a la sangre, que la transporta a todos los tejidos del organismo (Case *et al.*, 2011). La mayoría de los alimentos comercializados incluyen al menos niveles moderados de carbohidratos. Por lo general, los alimentos secos son los que más cantidad contienen. Los piensos secos comercializados pueden contener un 30-60% de carbohidratos, y los alimentos enlatados entre el 0 y el 30% (Case *et al.*, 2011).

Los cuatro grupos de carbohidratos, desde una perspectiva funcional, son absorbibles (monosacáridos), digeribles (disacáridos, ciertos oligosacáridos y polisacáridos no estructurales), fermentables (lactosa, ciertos oligosacáridos, fibra dietética y almidón resistente) y no fermentables (ciertas fibras dietéticas) (NRC, 2006).

2.1.4. Grasas

Las grasas son un componente importante de las dietas en los animales de compañía debido a que proporcionan una fuente concentrada de energía. Todos los ácidos grasos cumplen funciones estructurales y su grado de insaturación proporciona propiedades específicas a las membranas celulares. Varios ácidos grasos poliinsaturados sirven como precursores de prostaglandinas y otros eicosanoides, que son potentes reguladores fisiológicos de las funciones celulares. Las grasas dietéticas generalmente mejoran la palatabilidad y agregan una textura aceptable a los alimentos. También sirven como portadores de vitaminas liposolubles y por lo tanto proporcionan sustratos importantes para los procesos celulares durante todas las etapas de la vida (NRC, 2006).

Las grasas pertenecen a un grupo más amplio de compuestos conocidos como lípidos que pueden estar basados en glicerol o no basados en glicerol. Los lípidos a base de glicerol incluyen lípidos simples como los triacilgliceroles hidrófobos (triglicéridos) y los lípidos compuestos que

son más polares (fosfolípidos y glicolípidos). El colesterol y sus ésteres de ácidos grasos son lípidos no basados en glicerol, y esta categoría incluye ceras, cerebrósidos, terpenos, esfingomielinas y varios esteroides (NRC, 2006).

2.1.5. Proteínas

Las proteínas son moléculas que contiene carbono, hidrógeno y oxígeno. La unidad básica de las proteínas son los aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos para formar largas cadenas proteicas. El tamaño de las proteínas puede clasificarse en simples y complejas. Una vez iniciada la hidrólisis, las proteínas simples sólo producen aminoácidos o derivados. Las proteínas complejas o conjugadas están formadas por una proteína simple, combinada con una molécula no proteica (Case *et al.*, 2011).

Las proteínas presentes en el organismo no están estáticas, sino sometidas a una continua degradación y síntesis. Aunque la tasa de recambio varía según los tejidos, todas las moléculas proteicas del organismo acaban por ser catabolizadas y sustituidas. Durante el crecimiento y la reproducción es necesario un aporte adicional de proteínas para crear nuevos tejidos (Case *et al.*, 2011).

Surgen 22 alfa- aminoácidos en las cadenas proteicas. El término *alfa* indica la unión del grupo amino (NH₂) con el primer carbono (alfa-) de la molécula. De estos 22 alfa-aminoácidos, los perros pueden sintetizar 12 en cantidad suficiente para cubrir sus necesidades de crecimiento, actividad y mantenimiento. A estos aminoácidos se les conoce como no esenciales y pueden obtenerse a partir de la dieta o ser sintetizados por el organismo. Los 10 aminoácidos restantes no pueden sintetizarse al ritmo necesario para cubrir las necesidades. Se trata de los aminoácidos esenciales y deben aportarse con la dieta del animal (Case *et al.*, 2011)

2.2. CLASIFICACIÓN DE ACUERDO CON LA FORMA DE PRODUCCIÓN EN ALIMENTO PARA PERROS

Se han desarrollado diversas formas para la producción de alimento para perros. Una de las clasificaciones más utilizadas de los alimentos comerciales divide a los productos según el método de procesamiento, los métodos de conservación y el contenido de humedad. Esta categoría se les denomina alimento seco, húmedo y semihúmedo.

2.2.1. Alimento seco

La mayoría de los alimentos secos para perros disponibles comercialmente se fabrican utilizando tecnología de cocción por extrusión. Los ingredientes comúnmente empleados incluyen granos

de cereales, subproductos de carnes bovinas, cerdos y aves o pescado, entre otras, y suplementos vitamínicos y minerales. La densidad calórica de los alimentos secos para mascotas oscila habitualmente entre 3,000 y 4,500 kcal de energía metabolizable (EM)/ kg, o 2,870 y 4,400 kcal/kg en materia seca (MS) (Case *et al.*, 2011).

La tecnología de cocción por extrusión se caracteriza por un proceso de alta temperatura y corto tiempo donde la mezcla de ingredientes en forma de pasta se expone a una presión y temperatura alta (80-200°C) durante un período de tiempo relativamente corto (10-270 segundos). Después de la cocción suele pulverizarse sobre las croquetas una capa de grasa u otro mejorador de la palatabilidad (proceso denominado revestimiento). El secado con aire caliente reduce el contenido total de humedad del producto al 10% o menos. Las características beneficiosas de un tratamiento térmico como la extrusión incluyen lograr una forma física deseada, inactivación de factores anti nutricionales, aumento de la vida útil (Lankhorst *et al.*, 2007).

El proceso de cocción del alimento extruido, mejoran la digestibilidad de los carbohidratos complejos presentes en el producto y mejora la palatabilidad del alimento (Murray, 2001).

Los efectos indeseables al aplicar la cocción por extrusión pueden ser pérdidas de vitaminas (por ejemplo, vitaminas A, E, tiamina), oxidación de lípidos, destrucción y la reducción en la disponibilidad de aminoácidos; no obstante, la mayoría de los fabricantes añaden cantidades compensadoras de estos nutrientes al formular la ración (Case *et al.*, 2011).

2.2.1.1 Efectos de la extrusión sobre el almidón

Los ingredientes principales para la mayoría de los alimentos de croquetas estándar para perros son los granos de cereales, que pueden representar más del 40% de la formulación.

El endospermo de los cereales es principalmente almidón, organizado en gránulos de capas concéntricas de formaciones semicristalinas o amorfas (Svihus, Uhlen y Harstad, 2005). Cuando se extruye con un bajo contenido de humedad, los gránulos de almidón se transforman parcialmente mediante la aplicación de calor (pérdida de estructura cristalina) y cizallamiento (fragmentación granular) que conduce a la formación de una fase homogénea, llamada fusión de almidón o gelatinización (Svihus, Uhlen y Harstad, 2005).

El almidón es importante para una extrusión adecuada, ya que ayuda a generar viscosidad, transferencia de energía mecánica del tornillo a la masa, velocidad de expansión adecuada de la croqueta, formación de la estructura celular y nitidez de la croqueta (Crane, Griffin y Messent, 2000).

2.2.1.2 Efectos de la extrusión sobre los lípidos.

El valor nutricional de los lípidos puede verse afectado durante la extrusión como resultado de la hidrogenación, isomerización, polimerización y oxidación de lípidos. La oxidación de lípidos es un desafío importante para la conservación de alimentos para mascotas. La tasa de oxidación se ve afectada por muchos factores, como el tipo de grasa, el contenido de grasa, el contenido de humedad y el grado de expansión donde la insaturación en las grasas aumenta el desafío de preservación (Deffenbaugh, 2007).

2.2.1.3 Efectos de la extrusión sobre las proteínas

Los efectos de la extrusión sobre el componente proteico pueden ser beneficiosos o perjudiciales para las características físicas y nutricionales de la mezcla de alimentos. El tratamiento térmico durante la cocción por extrusión puede inactivar factores nutricionalmente activos basados en proteínas al destruir la integridad de su estructura y, por lo tanto, evitar sus funciones (Alonso, Aguirre y Marzo, 2000).

La desnaturalización leve de las proteínas puede hacerlas más susceptibles a las enzimas digestivas y, por lo tanto, mejorar la digestibilidad de estas proteínas (Hendriks y Sritharan, 2002).

2.2.1.4 Efectos de la extrusión sobre las vitaminas

Varias vitaminas son sensibles a los tratamientos físicos y químicos. La estabilidad de la vitamina depende de la estructura química de la vitamina en cuestión y puede disminuir debido a la exposición al calor, la luz, el oxígeno, la humedad y los minerales. Las vitaminas difieren mucho en la estructura y composición química, su estabilidad durante la extrusión es variable (Singh, Gamlath y Wakeling, 2007).

2.2.1.5 Efectos de la extrusión en la palatabilidad de la dieta de las mascotas

En la producción de alimentos para mascotas, la palatabilidad es un factor clave en la selección de una dieta por parte del perro. Esto puede estar influenciado por una serie de factores, como la composición de nutrientes de los alimentos y las condiciones de procesamiento. La pérdida de palatabilidad puede ser causada por factores de riesgo como el crecimiento microbiano, la oxidación, los cambios en el aroma y la textura (Deffenbaugh, 2007).

2.2.2. Alimento semihúmedo

Los alimentos semihúmedos para mascotas contienen 15-30% de agua e incluyen tejido animal fresco o congelado, granos de cereales, grasas y azúcares simples como ingredientes principales (Case *et al.*, 2011).

Varios métodos de conservación son usados para prevenir la contaminación y la descomposición de los alimentos semihúmedos y permitir así una larga vida útil. La inclusión de

humectantes como sal, azúcares simples, glicerol o jarabe de maíz reduce la actividad del agua del alimento, lo que impide el desarrollo de microorganismos contaminantes (Carter y Fontana, 2008). Otros conservantes como el sorbato de potasio, impide el crecimiento de levaduras y hongos. Pequeñas cantidades de ácidos orgánicos pueden también ser incluidos para disminuir el pH de los productos e inhibir el crecimiento bacteriano.

El contenido de EM de los alimentos semihúmedos oscila habitualmente entre 3,000 y 4,000 kcal/kg de MS. Los alimentos semihúmedos contienen entre el 20% y el 28% de proteínas y entre el 8% y el 14% de grasa, sobre una base de MS. La proporción de carbohidratos en los alimentos semihúmedos es similar a aquella de los alimentos secos. Sin embargo, una diferencia importante es que los carbohidratos de los alimentos semihúmedos están en su totalidad bajo la forma de azúcares simples con una proporción relativamente pequeña presente como almidón (Case *et al.*, 2011).

Los alimentos semihúmedos pueden adquirirse en diversas formas y texturas que suelen simular diferentes tipos de productos cárnicos como carne molida, empanadas de carne o trozos de carne. Esta forma de alimento no precisa de refrigeración antes de su apertura y tiene una duración relativamente prolongada.

2.2.3. Alimento húmedo

Existen dos tipos principales de alimentos enlatados para mascotas: los completos-equilibrados y los que constituyen un suplemento dietético. Los alimentos completos y equilibrados pueden contener una mezcla de ingredientes como carnes, subproductos de ave o pescado, cereales, proteína vegetal texturizada, así como vitaminas y minerales adicionados para hacer que la ración sea nutricionalmente completa. El segundo tipo de alimento contiene los mismos tipos de carne, pero sin vitaminas ni minerales adicionados; por lo que no están formulados para proporcionar una nutrición completa. En general los alimentos húmedos son más palatables y digestibles que muchos de los alimentos secos, y una mayor proporción de su MS corresponde a proteína y grasa.

Cuando se hace la medición sobre una base de MS, el contenido calórico de los alimentos húmedos varía, por lo general, entre 3,500 y 5000 kcal/kg. El contenido de grasa de los alimentos húmedos varía entre 20% y 32% y los niveles de proteína suelen estar entre 28% y 50% (Case *et al.*, 2011).

La humedad máxima permitida en los alimentos para mascotas es del 78%, o igual a la humedad natural de los ingredientes empleados; por lo que, en promedio los alimentos húmedos contienen alrededor del 75% de humedad (Bradshaw, 2006).

La mayoría de los productos húmedos contienen una proporción relativamente pequeña de carbohidratos digeribles, en comparación con otros tipos de alimentos para mascotas.

2.3. CLASIFICACIÓN DE ACUERDO CON EL PROPÓSITO DE LA DIETA EN ALIMENTOS PARA PERROS

2.3.1. Alimento con propósito específico

Son aquellos alimentos que proporcionan un perfil nutricional especializado para una aplicación alimentaria particular. Los alimentos con propósitos específicos pueden dividirse de acuerdo con las etapas de la vida y a las necesidades especiales (Crane, Griffin y Messent, 2000). Los primeros, son productos desarrollados para proveer una nutrición adecuada para perros durante los diferentes estadios de vida (perros en crecimiento, para hembras durante la gestación y la lactancia y perros de edad avanzada), estilos de vida (dietas de alto rendimiento para perros de trabajo, adultos en mantenimiento) (Case *et al.*, 2011).

Los productos especiales proporcionan nutrición específica para las necesidades individuales de las mascotas (Crane, Griffin y Messent, 2000). Estos productos contienen ingredientes funcionales o nutrientes que proveen beneficios específicos para la salud. Algunos ejemplos de se incluyen alimentos que contienen agentes protectores para la articulación para los perros de razas grandes y alimentos que están formulados para dar soporte a la salud inmune y estado corporal apropiado en pacientes gerontes. También existen productos para diferentes tamaños de raza (Case *et al.*, 2011).

2.3.2. Alimento todo propósito

Estas dietas deben proporcionar los nutrientes adecuados para cubrir los requerimientos nutricionales en todas las etapas de vida del perro, incluyendo la de mayor demanda, como son crecimiento y lactancia (Crane, Griffin y Messent, 2000).

2.3.3. Alimentos terapéuticos de uso veterinario

Corresponden a aquellos alimentos que tienen perfiles nutricionales particulares que presentan una sinergia terapéutica con las modalidades médicas para una amplia variedad de enfermedades.

Estos alimentos por lo general tienen un propósito específico y deberían ser utilizados únicamente bajo supervisión profesional. También se les conoce como dietas prescripción (Crane, Griffin y Messent, 2000).

2.4. CLASIFICACIÓN COMERCIAL DE ALIMENTOS PARA PERROS

Además de clasificar a los alimentos por su la variabilidad de formas de producción, aporte nutricional y por el propósito de la dieta, también pueden ser clasificados por su calidad global (el tipo de ingredientes que son incluidos, la disponibilidad y el costo del alimento).

Esta clasificación no se encuentra definida de manera oficial, pero es utilizada en el ámbito comercial especialmente ligada al marketing de los alimentos para mascotas. Además, está íntimamente relacionada con el precio del producto en el mercado, justificado en parte por su calidad nutritiva que viene determinada por los ingredientes utilizados, la densidad energética, el contenido y calidad de la proteína, el contenido en determinados nutrientes específicos de carácter funcional, el proceso de fabricación, la palatabilidad y la calidad fecal.

Dentro de esta clasificación se incluyen los alimentos básicos/económicos, premium y super premium (Case *et al.*, 2011).

2.4.1. Alimentos básicos o populares y económicos

Los alimentos básicos o también denominados “populares” se comercializan a nivel nacional o regional. Las compañías que producen estos alimentos ponen una importante cantidad de dinero en propaganda, lo que da por resultado la identificación del nombre de sus productos entre los consumidores. Las 3 principales estrategias de comercialización usadas para vender estos productos son: la palatabilidad, el aspecto del producto que atraiga la percepción de los propietarios como si fuese un alimento saludable y su precio. Los productos básicos tienden a tener una menor digestibilidad que los alimentos premium y super premium y una mayor digestibilidad que las marcas económicas (Case *et al.*, 2011).

Estos productos cubren los requerimientos nutricionales indispensables, incluyen vitaminas, minerales y está enfocado principalmente en satisfacer el apetito del perro. Pueden producir heces abundantes y menos firmes. Son considerados como un producto de mantenimiento. Los ingredientes, la palatabilidad y la digestibilidad pueden variar significativamente debido a que a la mayoría son producidos usando formulaciones variables, lo que significa que los ingredientes incluidos en una marca en particular pueden variar de lote en lote dependiendo de la disponibilidad del ingrediente y del costo para la compañía elaboradora.

Cuando se usan formulaciones variables, el análisis de garantía no cambia, pero la fuente y la calidad de los ingredientes puede ser alterada sin aviso. Esta modificación puede provocar una calidad y una digestibilidad inestable del producto y pueden causar malestar gastrointestinal en el perro (PROFECO, 2016).

Los alimentos económicos son aquellos alimentos que están formulados con base al menor costo y sus precios son bajos que los de otras marcas comparables. Este tipo de alimentos incluyen marcas genéricas (sin etiqueta) y algunas marcas privadas de alimento (Case *et al.*, 2011).

Los productos genéricos representan alimentos de bajo costo, de mala calidad y no llevan ninguna marca. Algunos de los productos genéricos no están formulados para ser nutricionalmente completos. Se ha demostrado que los productos genéricos tienen una digestibilidad significativamente baja y una menor disponibilidad de nutrientes en comparación con los alimentos básicos y premium. Los ingredientes de mala calidad y un bajo contenido de grasa pueden conducir a una baja palatabilidad lo que lleva a la reducción de la aceptación de estos alimentos por algunos perros.

Los problemas con la calidad del ingrediente; el balance y la disponibilidad de los nutrientes; la falta de certeza de evaluaciones adecuadas, así como los controles de calidad hacen que este tipo de productos sean una mala elección para los propietarios cuando eligen un alimento comercial para sus mascotas (Case *et al.*, 2011).

Los alimentos para mascotas de marcas privadas son productos que llevan el nombre de la cadena de tiendas y de mayoristas que los venden. Algunos de estos productos son producidos sobre la base del menor costo mientras que otros son producidos para reflejar la filosofía del cuidado de mascotas de la tienda o el punto de venta que los patrocina. Debido a que algunos de estos productos son producidos por algunas compañías que hacen alimentos genéricos pueden ser similares en calidad a los alimentos genéricos. Además, los alimentos de marcas privadas tienen a menudo enunciados comparables con el de los alimentos premium, aunque son vendidos a un precio menor. Como en cualquier industria, se comercializan productos “clonados” que pueden imitar el nombre, el empaquetamiento, el color de la bolsa y/o el listado de ingredientes de un producto premium (Case *et al.*, 2011).

2.4.2. Alimentos Premium y Super Premium

La mayoría de las marcas premium y super premium de alimentos para mascotas son producidas usando formulaciones fijas. Esto significa que las compañías no cambian la composición de los ingredientes de lote en lote según la disponibilidad del ingrediente o de su precio en el mercado.

Además, las compañías que elaboran estos productos realizan investigaciones y estudios de alimentación para asegurarse el estado saludable de sus alimentos y para convalidar el uso de nuevos ingredientes y formulaciones.

Estos estudios confirman a los propietarios que el alimento ha sido adecuadamente evaluado y se basa en los principios de nutrición normal. Los alimentos premium y super premium suelen tener un mayor costo, con base a su peso, que las marcas básicas debido a la alta calidad de sus ingredientes y por el nivel de evaluaciones e investigaciones que son realizadas sobre estos productos. Sin embargo, debido a que estos alimentos suelen tener alta digestibilidad y densidad nutricional, se pueden administrar pequeñas cantidades y el costo por comida es en general comparable con los de muchos alimentos básicos (Case *et al.*, 2011).

2.5. ALIMENTACIÓN DURANTE LAS ETAPAS DE LA VIDA

2.5.1. Gestación y lactación

Las hembras deben ingerir un alimento de gran calidad y digestibilidad adecuado para la gestación y la lactación. Los alimentos que se pueden utilizar son dietas formuladas para estas etapas, las dietas de rendimiento o las dietas para cachorros y deben ser alimentadas con este alimento durante la gestación, lactación y destete (Case *et al.*, 2011).

Durante la lactación es un reto metabólico para la hembra. La mayoría de las dietas formuladas para el mantenimiento de los adultos no suministran una suficiente riqueza de nutrientes para esta fase (Case *et al.*, 2011). Una dieta altamente digestible y rica en nutrientes se debe alimentar a perras lactantes, independientemente del tamaño de la camada. Se recomiendan los alimentos premium para mascotas porque estos alimentos están formulados para proporcionar niveles óptimos de energía; por ejemplo, las dietas formuladas especialmente para los animales con gran actividad física o que se encuentran en situaciones de estrés fisiológico.

La cantidad de energía necesaria para cumplir con estas exigencias múltiples depende de la ingesta normal de energía de la perra. La perra no requiere suplementos vitamínicos o minerales adicionales si hay un equilibrio o dieta balanceada adecuada para la gestación, la lactancia y destete.

Para la correcta producción láctea también es importante que exista un consumo de agua suficiente durante la lactancia debido a que la leche es 78% de agua (Lepine, 1997).

Los requerimientos de proteína durante los primeros 2 tercios de la gestación son los mismos que para el mantenimiento de perros adultos jóvenes, y no aumentan sustancialmente. Al ingresar al tercer tercio de la gestación, los requerimientos de proteínas aumentan de 40% a 70% por encima del mantenimiento (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000). La cantidad recomendada de proteína cruda para los alimentos durante la gestación y la lactancia oscila entre

el 20% de materia seca (MS) y el 22% de materia seca (MS) (AAFCO, 2007). Debido a que pocas proteínas son 100% digeribles, las cantidades dietéticas recomendadas de proteínas que se encuentran en las dietas alimentadas durante la gestación y la lactancia estarían entre 25% y 35% de MS.

Las grasas proporcionan una mayor energía en comparación con las proteínas o los carbohidratos, así como también proporcionan ácidos grasos esenciales y ayudan a la absorción de las vitaminas liposolubles. Se ha demostrado que el aumento de la ingesta de grasas mejora la eficiencia alimentaria durante la lactancia ya que el aumento por parte de la hembra puede aumentar el contenido de grasa del calostro y debido a que los cachorros tienen reservas de energía bajas, esto puede aumentar la energía disponible a través del calostro (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000).

El nivel mínimo recomendado de grasa que se encuentra en los alimentos para la gestación tardía en la lactancia es 8.0% MS (AAFCO, 2007) y 8.5% MS. Recordando que las recomendaciones de NRC y AAFCO son mínimas, los niveles recomendados para las perras con menos de cuatro cachorros serían al menos 20% de grasa cruda MS (Wortinger y Burns, 2015). Para los perros de razas gigantes, la recomendación también sería un 20% de grasa cruda MS, pudiendo necesitar niveles altos para cumplir con los requisitos de energía para aquellos perros con camadas grandes (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000).

Las dietas sin carbohidratos en hembras gestantes pueden generar pérdida de peso, disminución de la ingesta de alimentos, posible riesgo de muerte fetal y disminución de la supervivencia neonatal. Cuando se usan grasas para la producción de energía, el riesgo de cetosis aumenta durante la gestación. Una dieta que proporciona aproximadamente el 20% de la energía de los carbohidratos solubles (es decir, almidones y glucógeno) es suficiente para prevenir los efectos negativos de una dieta libre de carbohidratos, sin embargo, alimentos ingeridos durante la lactancia deben contener al menos un 23% de MS de carbohidratos digeribles (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000).

Para la mayoría de las razas de perros, los requerimientos de calcio y fósforo son los mismos para los primeros dos tercios de la gestación que para adultos en mantenimiento (Ca:P proporción 1:1 a 1.5:1). Debido al rápido crecimiento del esqueleto fetal durante las últimas semanas de la gestación, los requerimientos de calcio y fósforo aumentan en un 60% (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000).

El nivel de calcio recomendado es 1–1.7% de MS, niveles de fósforo de 0.7–1.3% de MS con una relación calcio-fósforo de 1.1: 1 a 2:1. Estos niveles se aplican también a perros de raza grande y gigante (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000).

2.5.2. Neonatos

El período neonatal de la vida de un perro se considera en las primeras dos semanas de su vida (Case *et al.*, 2011).

El calostro es la leche producida por la madre durante las primeras 24 a 72 horas después del parto. El calostro proporciona nutrientes, agua, factores de crecimiento, enzimas digestivas e inmunoglobulinas maternas (anticuerpos) (Buffington, Holloway y Abood, 2004). La mayoría de las inmunoglobulinas y otros factores transmitidos a través del calostro están en forma de proteínas grandes. Una vez que se absorben a través de la barrera intestinal, confieren inmunidad pasiva al recién nacido (Case *et al.*, 2011). La capacidad del recién nacido para absorber estas proteínas grandes a través de la barrera intestinal se pierde después de las primeras 24 a 72 horas.

La principal diferencia entre el calostro y la leche está en el contenido de agua y la composición de nutrientes (Buffington, Holloway y Abood, 2004). Las concentraciones de lactosa que se encuentran en el calostro también son más bajas que las que se encuentran en la leche, con niveles más altos de proteínas y grasas. Debido a su inmadurez, los recién nacidos no desarrollan reservas adecuadas de glucógeno hasta después de los primeros días de lactancia (Delaney y Fascetti, 2012). Esta falta de reservas de glucógeno significa que necesitan amamantar o alimentarse con frecuencia cada 2 horas durante la primera semana de vida.

2.5.3. Perros en crecimiento

Debido a la amplia variedad de tamaños en esta especie, el crecimiento en las primeras etapas de la vida es muy rápido y en general, la mayoría de las razas de perros alcanzarán el 50% de su peso adulto entre los 5 y 6 meses de edad (LeGrand-Defretin y Munday, 1995).

La mayoría de los perros de raza pequeña habrán alcanzado su tamaño adulto en ocho a 12 meses de edad, los perros de raza mediana en 12 a 18 meses y los perros de raza grande y gigante alcanzarán su tamaño de madurez hasta los 18-24 meses de edad.

Después de amamantar, el crecimiento posterior al destete es el período más exigente desde el punto de vista nutricional en la vida de un perro. Con perros de raza grande y gigante, la longitud y la velocidad de su crecimiento determinan una demanda nutricional aún mayor.

Los requerimientos de proteínas para los cachorros en crecimiento son más altos que los de los perros adultos, esto se debe a que el cachorro no solo tiene necesidades de mantenimiento normales, sino que también necesita proteínas para construir nuevo tejido asociado con el crecimiento. Los alimentos para cachorros en crecimiento deben contener niveles ligeramente más altos de proteína que aquellos alimentos para el mantenimiento de perros adultos (Case *et al.*, 2011). El nivel mínimo de proteína que se encuentra en las dietas de los cachorros debe ser del 22% de la EM, con niveles óptimos entre el 25% y el 29%. El tipo de proteína incluida en la dieta debe ser de alta calidad para garantizar que todos los aminoácidos esenciales se entreguen al cuerpo para su uso en el crecimiento y el desarrollo (Case *et al.*, 2011).

La densidad energética es muy importante para el crecimiento de los cachorros. Si se les alimenta con alimentos de baja calidad, baja densidad energética y baja digestibilidad, deben consumir grandes cantidades para satisfacer sus necesidades energéticas (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000), incluso un alimento barato puede costar más que un alimento de mayor calidad ya que gran parte de él no será utilizado por el organismo y en cambio se desechará en las heces.

Las dietas para perros en crecimiento deben contener las cantidades óptimas de calcio y fósforo. Los perfiles nutricionales elaborados por la AAFCO recomiendan para estos animales un 1% y 0.8% en materia seca de calcio y fósforo, respectivamente (AAFCO, 2007).

Dado que las grasas contienen más del doble de la densidad calórica de proteínas y carbohidratos, se recomienda una dieta baja en grasas para cachorros de raza gigante.

Se debe mantener una condición corporal de 2-3/ 5 para limitar la ingesta de energía para mantener estos parámetros físicos, esto reducirá la ingesta de alimentos, la producción fecal, la obesidad y el riesgo de enfermedad esquelética.

Un nivel mínimo de proteína en la dieta depende de la digestibilidad, el perfil de aminoácidos y la biodisponibilidad y, como mínimo, debe cumplir con las recomendaciones AAFCO para el crecimiento.

Los perros jóvenes de razas grandes alimentados con una dieta alta en calcio generan un aumento significativo en la incidencia de enfermedad esquelética del desarrollo (Richardson, 1999). Los cachorros de razas grandes no deben consumir una dieta de mantenimiento para adultos en un corto periodo de tiempo, debido a la diferencia en la densidad de energía entre una dieta para cachorros y adultos; el cachorro realmente consumiría más calcio en una dieta para adultos porque necesitaría comer más para satisfacer sus necesidades de energía; por lo que, en ninguna circunstancia estos cachorros deberían recibir suplementos de calcio.

2.5.4. Perros adultos en mantenimiento

Los perros que han alcanzado el tamaño de un adulto maduro sin presencia de gestación, lactación, sometido a ejercicio intenso, se definen como en estado de mantenimiento (Case *et al.*, 2011).

Los perros adultos sanos tienen requerimientos de nutrientes relativamente bajos en comparación con aquellos perros en etapas reproductivas. Sin embargo, se les debe dar un alimento de alta calidad que se haya formulado para ellos y que mediante pruebas de alimentación a largo plazo se haya demostrado su adecuación a la fase de mantenimiento. Aunque la comida puede ser húmeda, semihúmeda o seca, esta última es preferible para esta etapa de la vida. En general los productos húmedos y semihúmedos contienen un mayor contenido calórico expresados en materia seca que pueden contribuir a la aparición de obesidad sino se regula cuidadosamente la ingesta.

2.5.5. Perros adultos de alto rendimiento

Los perros trabajan con el ser humano en un gran número de actividades diferentes debido a que son utilizados para caza, pastoreo, guarda y protección, detección de drogas, entre otros; por lo cual los perros de trabajo requerirán mayores necesidades energéticas que los perros adultos de mantenimiento (Case *et al.*, 2011).

El entrenamiento de perros de alto rendimiento incrementa las necesidades proteicas de los animales. Este aumento se debe al incremento de la síntesis proteica (anabolismo) y degradación de la proteína (catabolismo).

Debe administrarse concentraciones óptimas de proteína sin llegar a administrar cantidades superiores a la que el animal necesita ya que puede llegar hacer perjudicial.

Por lo que, la dieta debe administrarse grasa y carbohidratos en cantidad suficiente para que la proteína se utilice para la síntesis de tejido y no como fuente de energía (Case *et al.*, 2011).

La grasa de la dieta es un componente importante de la alimentación de los perros de trabajo, ya que es una fuente de energía fácil para el tejido muscular, además de afectar a la digestibilidad y densidad energética utilizando como fuente de energía grasa de alta calidad. Por lo tanto, además de requerir un alto contenido de grasa como fuente de energía, la dieta debe ser de alta digestibilidad para controlar el volumen ingerido en cada comida (Case *et al.*, 2011).

2.5.6. Perros gerontes

El envejecimiento es definido como un proceso biológico complejo que resulta en la reducción progresiva de la capacidad de un individuo para mantener la homeostasis bajo tensiones

ambientales fisiológicas y externas, lo que disminuye la viabilidad de los individuos y aumenta su vulnerabilidad a la enfermedad y finalmente la muerte (Delaney y Fascetti, 2012).

En general, los perros pueden dividirse en cuatro categorías en función de su tamaño, considerando que los perros de razas pequeñas envejecen a edades más tardías que los perros de raza grande. Existen diferencias de raza y tamaño en las que los perros se consideran gerontes. Los perros de razas mixtas tienden a vivir más que las razas puras de un tamaño similar (Delaney y Fascetti, 2012).

Los objetivos nutricionales de los perros gerontes, consisten en ralentizar o prevenir la progresión de los cambios metabólicos asociados con la edad, minimizar los signos clínicos de la vejez, mejorar su calidad de vida y si fuera posible, aumentar su esperanza de vida.

Los requerimientos nutricionales para perros de edad avanzada son los mismos para perros jóvenes. Puede haber cambios en el volumen consumido para mantener su peso corporal, así como algunos ajustes necesarios en la forma en que se proporcionan estos nutrientes en la dieta (Delaney y Fascetti, 2012). No hay evidencia de que las "dietas geriátricas" sean necesarias si el animal está sano y consume una cantidad suficiente de una dieta de buena calidad para mantener el peso y la masa corporal (Buffington, Holloway y Abood, 2004).

La proteína de la dieta no debe reducirse en perros mayores aparentemente sanos. Se necesita una ingesta adecuada de proteínas y energía para mantener la masa corporal magra, la síntesis de proteínas y la función inmune (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000). Un beneficio adicional para mantener una concentración moderada de proteínas en los alimentos para los animales mayores es un aumento en la palatabilidad, que puede ayudar a mantener una ingesta calórica adecuada (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000).

Las grasas proporcionan energía, ácidos grasos esenciales y actúan como portadores de vitaminas liposolubles y mejoran la palatabilidad de los alimentos. Las grasas incluidas en los alimentos para animales de mayor edad deben ser altamente digeribles y contener altos niveles de ácidos grasos esenciales.

La suplementación de alimentos con antioxidantes para apoyar la función inmune se ha vuelto comercialmente popular. La implicación es que los suplementos retrasarán el proceso de envejecimiento y reducirán la probabilidad de desarrollo de enfermedades (Delaney y Fascetti, 2012) como los ácidos grasos omega-3 y el betacaroteno, han demostrado mejorar el sistema inmunológico.

La fibra dietética puede promover la salud gastrointestinal al ayudar a la motilidad normal y proporcionar combustible metabólico para los colonocitos a través de la producción del butirato

de ácido graso. No todas las fibras dietéticas actúan de la misma manera en los intestinos, algunas son altamente digeribles como la lactulosa ocasionando diarrea, otras permiten que las bacterias del colon produzcan butirato como la pulpa de remolacha o no son digeribles y actúan como agentes de carga (celulosa) (Gross, Debraekeleer y Zicker, 2000).

Si hay una enfermedad crónica que requiere cambios de nutrientes específicos, como diabetes, enfermedad renal, artritis u obesidad, el animal debe recibir una dieta adecuada para el manejo de ese trastorno.

2.6. ASPERGILLUS FLAVUS

2.6.1. Clasificación taxonómica

Aspergillus flavus es un microorganismo oportunista cuyo hábitat natural es el suelo. Este hongo se comporta como saprofito ya que contribuye a los procesos de descomposición de materia orgánica (Ehrlich y Cotty, 2004).

Pertenece al género *Aspergillus* y a la sección *flavi* (Cuadro 1) es el hongo de mayor importancia económica debido a que puede causar enfermedades en cultivos importantes como el maíz y de producir aflatoxinas (Hedayati *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Aspergillus flavus*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>
Sección	Flavi
Especie	<i>Flavus</i>

(Klich, 2007)

2.6.2. Características morfológicas

Las características macroscópicas, son de textura lanosa-aterciopelada, con un diámetro de 65 a 70 mm y de 2 a 3 mm profundidad. El color de la colonia es amarillo a verde o marrón y el micelio de color blanco de textura delgada (Figura1A). Cuando hay exudado, es incoloro o de color marrón; el reverso de la colonia puede ser incoloro o de color dorado a marrón rojizo (Hedayati *et al.*, 2007; Klich, 2007).

Las características microscópicas del hongo presentan conidióforos de longitud variable que contienen esporas o conidios unicelulares globosos (Barnett y Hunter, 1998); una estípita y

ensanchamiento claviforme formando una vesícula, así como fiálides en el ápice (uniseriado) o métulas y fiálides (biseriados) en toda la superficie (Figura 1B).

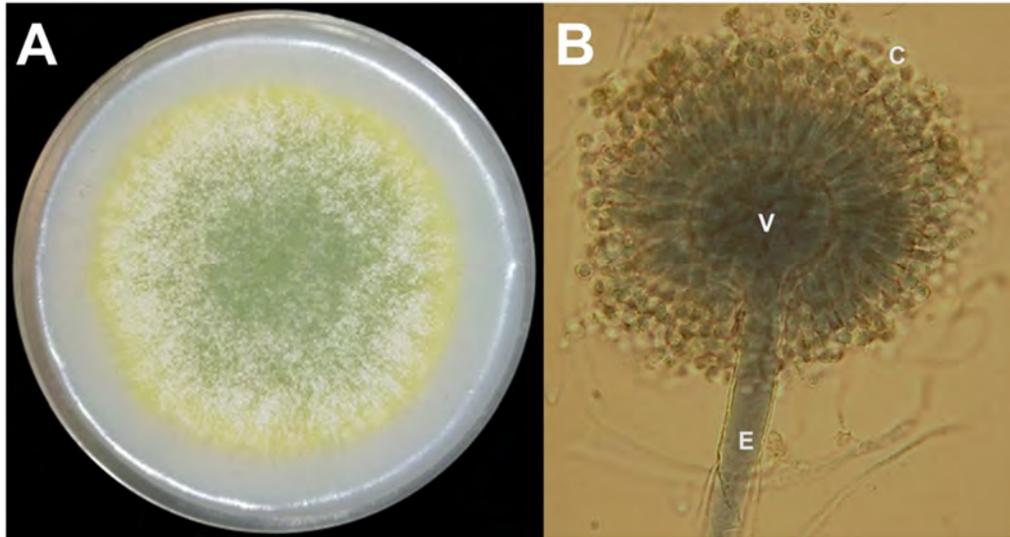


Figura 1A. Características macroscópicas de *A. flavus* en agar coco.

Imagen propia

Figura 1B. Características microscópicas de *A. flavus*. C: Conidio; V: Vesícula; E: Estípite.
Imagen original tomada con objetivo de 40x

A. flavus, tienen un estípite de textura rugosa con una longitud de 400 a 800 μ m. A nivel superior del estípite, presenta un ensanchamiento claviforme formando una vesícula esférica o elongada con un diámetro de 20-45 μ m. Se observan conidióforos que pueden ser uniseriados (fiálides) o biseriados (métulas y fiálides) cubriendo toda la vesícula. Las fiálides alcanzan un tamaño entre 7 a 12 x 3 a 4 μ m y las métulas entre 8 a 10 x 5 a 7 μ m. Los conidióforos son de longitud variable que contienen esporas o conidios de forma globosa a elipsoidales con un diámetro entre 3 a 6 μ m (Hedayati *et al.*, 2007). La pared conidial está compuesta por quitina, β - (1,3) - glucano, α - (1,3) -glucano, melanina e hidrofobina (Erwig y Gow, 2016).

A. flavus está presente como micelio en tejidos vegetales y como conidios o esclerocios en el suelo. Los esclerocios sobreviven en condiciones ambientales severas y pueden germinar para originar micelios y posteriormente formar conidios (esporas asexuales) (Amaike y Keller, 2011); por lo cual el hongo es una especie asexual ya que se reproduce por esporas asexuales y esclerocios.

El ciclo reproductivo asexual se divide en dos fases: crecimiento y desarrollo. La fase de crecimiento involucra la germinación del conidio y la formación de hifas que forman el micelio. Una vez que los recursos nutricionales comienzan a ser limitados, las hifas detienen el

crecimiento micelial y comienzan el desarrollo asexual (conidiación) formando estructuras complejas llamadas conidióforos que llevan múltiples cadenas de conidios (Wu *et al.*, 2017). Los genes *brlA* *abaA* y *wetA* intervienen en la expresión génica de la conidiación y determinan el desarrollo de los conidióforos y la maduración de las esporas (Mirabito, Adams y Timberlake, 1989).

El gen *WetA* es indispensable para la viabilidad de las esporas, la integridad de la pared celular de las hifas y los conidios, así como para la tolerancia al estrés. Por lo tanto, el gen *WetA* afecta tanto la tasa de crecimiento como la tasa de ramificación de *A. flavus* (Wu *et al.*, 2017).

Se ha secuenciado el genoma de *A. flavus* (cepa NRRL3357) y se determinó su tamaño de aproximadamente 36.8 Mb, con ocho cromosomas y alrededor de 12,604 genes (Yu *et al.*, 2011). Las regiones diana de ADN más utilizadas para identificar especies de *Aspergillus* son las del complejo de ADNr, principalmente las regiones espaciadoras internas transcritas 1 y 2 (ITS1 e ITS2) y las regiones variables en el extremo 5' del gen de ARNr 28S. Los genes conservados como los de la β -tubulina, la calmodulina y la topoisomerasa II también se pueden utilizar para estudios taxonómicos dentro del grupo *A. flavus*. Sin embargo, la especie del grupo *A. flavus* es difícil de diferenciar incluso genéticamente. *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* y *A. sojae* han demostrado tener altos grados de parentesco con el ADN y un tamaño de genoma similar (Yu *et al.*, 2011).

2.6.3. Características óptimas para el crecimiento de *Aspergillus flavus*

A. flavus, es un microorganismo oportunista cuyo hábitat natural es el suelo, se reproduce mediante conidios asexuales (Diener, 1987).

Estos hongos se comportan como saprofitos debido a que contribuyen a los procesos de descomposición de materia orgánica (Ehrlich y Cotty, 2004). Sus condiciones óptimas para el desarrollo son: temperatura de 25-37°C; humedad relativa de 88-95%, actividad de agua (*aw*) de 0.99 y un sustrato rico en carbono y nitrógeno (Varga, Frisvad, y Samson, 2011).

La capacidad de *A. flavus* para sobrevivir en condiciones adversas le permite competir con otros organismos por el sustrato en el suelo o en la planta (Bhatnagar, Cleveland y Payne, 2000). El hongo tiene la capacidad de producir estructuras resistentes conocidas como esclerocios. Los esclerocios germinan para producir hifas adicionales o producen conidios (esporas asexuales), que pueden dispersarse aún en el suelo y el aire (Hedayati *et al.*, 2007).

2.6.4. Genoma de *Aspergillus flavus*

Las especies del género *Aspergillus* fueron de los primeros en ser estudiados por métodos genómicos (Bennett y Arnold 2001). Se ha reportado que el genoma nuclear de *Aspergillus flavus*,

presenta un tamaño de aproximadamente 37 Mbp en ocho cromosomas, que codifican más de 12,000 genes funcionales (Amaike y Keller, 2011).

En los hongos, el ADN se encuentra localizado en el genoma nuclear y mitocondrial, sin embargo, las regiones más usadas en hongos son las que codifican para el ADN nuclear ribosomal (ADNr) (Zuluaga, Buriticá, Martín-Montoya, 2008).

Se han probado varias regiones de complejos de ADNr y genes de aflatoxinas estructurales para su uso como marcadores moleculares. Algunos de estos estudios se basan en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de la secuenciación para el análisis de variabilidad (Rodríguez, *et al.*, 2007). Las regiones diana de ADN más utilizadas para discriminar especies de *Aspergillus* son las del complejo de ADNr, principalmente las regiones espaciadoras internas transcritas 1 y 2 (ITS1 e ITS2) (Rodríguez *et al.*, 2007). Los genes universales de β -tubulina, calmodulina y topoisomerasa II se han utilizado en la identificación de especies de hongos (Rodríguez, 2007). Se han identificado y estudiado varios genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas como *aflR* y *aflS* (*aflJ*) (Cleveland *et al.*, 2009). Se han revelado numerosas categorías de genes que codifican enzimas que posiblemente estén implicadas, directa o indirectamente, en la producción de aflatoxinas u otros metabolitos secundarios (Cleveland *et al.*, 2009).

2.7. PRESENCIA DE *ASPERGILLUS* SPP. Y OTRA MICROBIOTA FÚNGICA EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO

Los cereales generalmente se integran en los alimentos para perros, especialmente maíz, sorgo, arroz, trigo, avena, cebada y mijo; son una buena fuente de carbohidratos, fibra, proteínas, grasas, minerales y vitaminas (Macías-Montes *et al.*, 2020; Peterson, 2001). Sin embargo, los cereales presentan un riesgo importante para la salud de los perros porque son vulnerables a la contaminación por *A. flavus* y otra microbiota fúngica tanto en el campo como en el almacenamiento (Wan, Chen y Rao, 2020; Xu *et al.*, 2018; Kamala *et al.*, 2015). En algunas formulaciones del ACS para perros, las semillas de calabaza, la chía, la quinua e incluso algunas legumbres como las lentejas se incluyen entre los ingredientes debido a su alto contenido en proteínas y minerales, sin embargo, estos ingredientes también pueden estar contaminados con *A. flavus* (Herrera *et al.*, 2019; Hacibekiroğlu y Kolak, 2013; Nazir *et al.*, 2019).

Las frutas en el ACS se utilizan como fuente natural de fibra; la papaya es una de las principales frutas que se incluyen, sin embargo, puede tener *A. flavus* en la postcosecha, lo que tiene efectos en su valor nutricional (Bagwan, 2011). Los arándanos se utilizan como

antioxidantes, aunque hay informes de contaminación por *A. flavus*. La naranja y el coco son otros ingredientes que se incluyen en algunos alimentos para perros, pero también pueden estar contaminado por microflora fúngica productora de micotoxinas (Drusch y Ragab, 2003; AboDaham *et al.*, 2020; Granados, Redondo y Jaikel, 2018).

Algunos estudios informan que los hongos contaminantes más frecuentes presentes en el ACS para perros son *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp (Cuadro 2). Varios de los géneros y especies aislados e identificados son micotoxigénicos, lo que produce un riesgo para la salud en los perros (Bueno, Silva y Oliver, 2001; Witaszak *et al.*, 2019; Błajet-Kosicka *et al.*, 2014). La mayoría de las muestras incluidas en cada estudio estaban contaminadas por *Aspergillus* spp. y por algún otro tipo de microbiota fúngica toxigénica.

Aunque la información sobre la presencia de *Aspergillus* spp. y otra microflora fúngica en varios ingredientes de alimentos humanos es extensa, los estudios de esta contaminación en ACS son escasos, a pesar de estar elaborados con ingredientes similares. Además, estos informes se refieren a la contaminación del alimento completo, pero no se han reportado resultados de microflora toxigénica en los ingredientes de ACS (Witaszak *et al.*, 2019; Błajet-Kosicka *et al.*, 2014; Saito y Machida, 1999; Singh y Chuturgoon, 2017; Hołda, 2017).

Cuadro 2. Microflora fúngica detectada en alimento comercial seco para perro

País	Muestras (n)	Hongos identificados	Muestras positivas (%)	Referencia
Argentina	12	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Mucor globosus</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>M. racemosus</i> , <i>Rhizopus</i> spp.	100	(Bueno, Silva, Oliver, 2001)
Brasil	180	<i>A. flavus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. flavipes</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	100	(Campos <i>et al.</i> , 2009)
Brasil	34	<i>Absidia</i> spp., <i>Aureobasidium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Chrysonilia</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Emericella</i> spp., <i>Eurotium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Geotrichum</i> spp., <i>Monascus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Olyptrichum</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Phoma</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Scapulariopsis</i> spp., <i>Syncephalostrum</i> spp., <i>Tilletiopsis</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Wallemia</i> spp., levaduras	74	(Copetti, Santurio, Cavalheiro, Alves y Ferreiro, 2009)

Brasil	60	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.	53	(Girio, Filho, Junior, Amaral y Girio, 2012)
Polonia	25	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	52	(Błajet-Kosicka, Kosicki, Twarużek y Grajewski, 2014)
Polonia	20	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.	25	(Hołda, Wiczuk, Haćszymańczuk y Głogowski, 2017)
Polonia	25	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>F. verticillioides</i> ., <i>F. proliferatum</i>	100	(Gallo, Solfrizzo, Epifani, Panzarini y Perrone, 2015)
Portugal	20	<i>A. niger</i> , <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	100	(Martins, Martins y Bernardo, 2003)
Sur África	20	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>Penicillium</i> spp.	100	(Singh y Chuturgoon, 2017)
Reino Unido	5	<i>Absidia</i> spp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Eurotium</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Syncephalastrum</i> spp., <i>Wallemia</i> spp., levaduras	100	(Scudamore, 2005)
Venezuela	4	<i>Acremonium charticola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>F. poae</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> .	94	(Muñoz, Rodríguez, Mota y Suarez, 2015)

2.8. AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos; pueden localizarse en el micelio de los hongos y en las esporas, o ser excretadas como exotoxinas que se liberan en el medio donde crece el hongo (Soriano y Burdaspal, 2007); su producción depende de diferentes factores ambientales en el campo, durante el almacenamiento, así como también la presencia de sustratos que apoyen el crecimiento y la producción de aflatoxinas por hongos aflatoxigénicos (Wilson y Payne, 1994).

En forma natural se han encontrado más de 18 tipos distintos de aflatoxinas (AFs) (Fisher y Henk, 2012), las cuales son derivadas de la difuranocumarina producidas por vía policétida en cepas de *Aspergillus flavus* (Bennett y Klich, 2003).

Aspergillus flavus produce AFB₁, AFB₂ y ácido ciclopiazónico; su peso molecular varía de 312 a 350 Kd (Fisher y Henk, 2012) y químicamente son cumarinas que contienen anillos de bifurano y configuración tipo lactona (IARC, 1993).

2.8.1. Aflatoxinas y sus productos de biotransformación

Las AFs son compuestos de difuranocumarina producidos como metabolitos secundarios de hongos del género *Aspergillus spp.* Siguiendo una ruta de policétidos; *A. flavus* es la principal especie de hongo involucrada en la producción de AF (Alshannaq y Yu, 2017; Bueno, Silva y Oliver, 2001; Campos *et al.*, 2009). Cuatro AFs presentes de forma natural en productos agrícolas se describen (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂); otras formas de AF se derivan del proceso metabólico de estas formas primarias dentro del cuerpo humano o animal (Klich, 2007). Las AFs no se destruyen por ebullición ni confieren, color, aroma, o sabor a ingredientes contaminados, por lo que generalmente pasan desapercibidos tanto para el dueño como para el perro (Aquino y Correa, 2011). Cuando los perros ingieren ACS elaborado con ingredientes contaminados con AFs, las micotoxinas se absorben en el duodeno y se unen a la albúmina plasmática y proceden a ser transportado a través del torrente sanguíneo (Tessari *et al.*, 2010).

En diversos tejidos, especialmente en el hígado y los riñones, las AFs son biotransformadas y bioactivadas por isoenzimas del sistema oxidasa de función múltiple o citocromos (CYP₄₅₀), dando lugar a formas electrofílicas altamente activas denominadas 8,9 endo-epóxido y 8,9 exo-epóxido, que se une y ejerce un ataque electrofílico sobre las estructuras subcelulares (Tulayakul, Sakuda, Dong y Kumagai, 2005). Cuando las AFs se metabolizan (hidrólisis, desmetilación o cetereducción), forman compuestos intermedios menos tóxicos con mayor solubilidad en agua (AFM₁, AFM₂, AFQ₁, AFQ₂, AFP₁, AFP₂ y aflatoxicol); por lo tanto, se eliminan a través de heces, orina, leche o huevo (Yiannikouris y Jouany, 2002; Galtier, 1999). La forma más común de eliminación de metabolitos en la orina de perros es AFM₁, así como trazas de AFQ₁ (Bingham *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009). Cuando el epóxido se une al ADN, se forma un aducto AF-ADN (dihidro-8-(N7guanil)-9hidroxi-1 AF-N7 - guanidina), que se reordena como AFformaminopirimidina (AF-FAPy), o se excreta a través de la orina como AF-N7guanina, que se considera un biomarcador de daño genotóxico por AF (Yiannikouris y Jouany, 2002; Galtier, 1999; Bingham *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009).

Un mecanismo de desintoxicación importante en muchas especies animales es la participación de un grupo de enzimas llamadas glutatión S-transferasas (GST) (Uribe-Yunda y Navas, 2012). La función de la GST es unir el epóxido con el tripéptido de glutatión reducido (GSH), que pierde dos aminoácidos, ácidos (glicina y glutamato) que se eliminan como un residuo

de cisteína ligado a la AF, llamado ácido mercaptúrico o N-acetilcisteína-AF, que se elimina a través de la bilis o la orina (Rawal, Kim y Coulombe, 2010). Los perros tienen una actividad GST reducida, lo que los hace especialmente susceptible al daño por AFs, además, una deficiencia de GSH o sus tres aminoácidos precursores facilita la aparición de la lesión oxidativa más extensa (Bruchim *et al.*, 2012; Mehrzad *et al.*, 2019; Towner *et al.*, 2003).

2.8.2. Hallazgos clínicos en la aflatoxicosis en perros

La dosis letal mediana (DL₅₀) de AFB₁ para el perro es de 0.5-1.5 mg/kg de peso corporal; las manifestaciones clínicas se observan incluso con dosis superiores a 60g/kg de AF en el pienso. Las dosis más altas se asocian con formas agudas de aflatoxicosis (Stenske *et al.*, 2006) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Intoxicación aguda en perros por ingestión de aflatoxinas en alimento comercial seco para perro

País	Número de perros intoxicados (n)	Mortalidad (%)	Rango de AF en ACS (µ/kg)	Referencia
Brasil	4	100	AFB ₁ -AFB ₂ (89.0-191)	(Gunsen y Yaroglu, 2002)
Brasil	2	100	AFB ₁ (83.2-150)	(Hagiwara, Kogika y Malucelli, 1990)
Israel	50	68.0	AF (80-300)	(Bruchim <i>et al.</i> , 2012)
Sur África	10	100	AF (100-300)	(Bastianello <i>et al.</i> , 1987)
Sur África	100	96.0	AF (<5-4946)	(Arnot, Duncan, Coetzer y Botha, 2012)
Estados Unidos	9	100	AFB ₁ (223-579)	(Newman <i>et al.</i> , 2007)
Estados Unidos	72	36.1	AF (48-800)	(Dereszynski <i>et al.</i> , 2008)

Los signos clínicos que presentan los perros con aflatoxicosis se identifican como alteraciones digestivas, hemodinámicas y nerviosas. Los hallazgos digestivos incluyen vómitos, anorexia, hematemesis, hematoquecia y melena. Los cambios hemodinámicos reportados son ascitis, edema periférico, ictericia, deshidratación, disminución de la presión arterial, diátesis hemorrágica y petequias en las membranas mucosas (Bruchim *et al.*, 2012; Bastianello *et al.*, 1987; Arnot *et al.*, 2012; Dereszynski *et al.*, 2008). Los hallazgos clínicos relacionados con alteraciones del sistema nervioso central son atribuibles a encefalopatía hepática, manifestada por depresión, vocalización, estupor, convulsiones y coma (Bruchim *et al.*, 2012; Dereszynski *et al.*, 2008).

Los hallazgos clínicos observados en los casos de aflatoxicosis también están relacionados con algunas variables de la bioquímica sanguínea y las pruebas de coagulación; los cambios que se producen son el aumento de la actividad específica de las enzimas hepáticas: alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y alcalina fosfatasa (ALT, AST y ALP). El aumento de la actividad de estas enzimas de la membrana hepática es un biomarcador de daño debido a la lesión inducida por los epóxidos generados a través del metabolismo de la AF. Las pruebas de coagulación en casos de aflatoxicosis muestran una disminución en la capacidad de la sangre para coagular, evidenciado principalmente por un aumento en el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial activada (PT y aPTT), así como una disminución de la antitrombina en el plasma, la actividad de la proteína C y el factor de coagulación VII (FVII: C) (Prins *et al.*, 2010). Los efectos hemorrágicos de la AF se atribuyen a su estructura química que contiene un anillo cumarínico con efecto anticoagulante, por lo que se produce un retraso en la coagulación y secundariamente induce coagulación intravascular diseminada (CID) con depleción de los factores de coagulación (Bruchim *et al.*, 2012; Hagiwara, Kogika y Malucelli, 1990).

En la aflatoxicosis, también se observa hiperbilirrubinemia, que se asocia con insuficiencia hepática o incapacidad para conjugar la bilirrubina generada en el bazo en cantidades superiores a lo normal, lo que da lugar a un aumento de la bilirrubina total (Newman *et al.*, 2007). En las intoxicaciones agudas por AF, se observa una disminución de las proteínas totales y la albúmina, cambios que están relacionados con la función hepática alterada, así como con la pérdida de proteínas por hemorragia entérica, ascitis y edema (Ensley y Radke, 2019). La disminución de las concentraciones de colesterol en las intoxicaciones por AF se debe a la colestasis, que surge de la fibrosis de las vías biliares (Rauber *et al.*, 2007). Por tanto, los signos clínicos digestivos y nerviosos que se presentan simultáneamente con los cambios enzimáticos y hemáticos especificados, sugieren la presencia de aflatoxicosis, la cual debe ser corroborada con datos de la historia clínica y con la presencia de AF en el alimento y en el estómago del perro. En general, los análisis bioquímicos y las pruebas de coagulación se utilizan para la detección precoz de los efectos de la exposición a la AF; y constituyen biomarcadores de exposición y daño por AF (Wada, Usui y Sakuragawa, 2008).

2.9. CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO PARA PERROS

Las formas naturales de AF y sus metabolitos se pueden encontrar en los ingredientes utilizados para producir ACS para perros (Cuadro 4). Por tanto, las FA presentes en las ACS son un riesgo

para la salud, lo cual es especialmente importante porque las ACS se utilizan como único o principal componente de la dieta durante la mayor parte de la vida de un perro; además, todo el pienso que contiene cada bolsa se suele consumir hasta ser agotado, lo que sugiere que la ingestión prolongada de alimentos contaminados con estas micotoxinas, incluso en dosis bajas, pueden tener efectos adversos para la salud (Hernández *et al.*, 2020).

Cuadro 4. Presencia de aflatoxinas en alimento comercial seco para perro

País	Número de muestras (n)	Técnica de análisis	Media AF (µg/kg)	Muestras positivas (%)	Referencia
Brasil	45	TLC	AFB ₁ (19.0)	AFB ₁ (6.7)	(Maia y Pereira Bastos de Siqueira, 2002)
Brasil	180	HPLC	AFB ₁ (7.0)	AFB ₁ (100)	(Campos <i>et al.</i> , 2009)
Brasil	(AE) 49 (AP) 25 (ASP) 13	HPLC	(AE) AF (1.2) (AP) AF (0.4) (ASP) AF (0.5)	AF (95.4)	(Teixeira <i>et al.</i> , 2017)
China	32	LC-MS/MS	AFB ₁ (47.7)	AFB ₁ (87.5)	(Shao <i>et al.</i> , 2018)
Estados Unidos	9	ELISA, TLC, HPLC	AFB ₁ (530) AFB ₂ (19.0)	AFB ₁ (88.8) AFB ₂ (77.7)	(Newman <i>et al.</i> , 2007)
Italia	(AE) 24 (AP) 24	LC-MS, PLC-MS/MS	AFB ₁ y AFG ₁ (< 0.5) AFB ₂ (5.7) AFG ₂ (15.8) AFB ₁ (4.3)	AF (12.0)	(Gazzotti <i>et al.</i> , 2015)
Italia	55	UHPLC-Q-Orbitrap HRMS		AFB ₁ (25.8)	(Castaldo <i>et al.</i> , 2019)
México	19	HPLC	AFB ₁ (5.0), AFB ₂ (0.07), AFG ₁ (0.05), AFG ₂ (0.03), AFM ₁ (2.0) AFM ₂ (0.1) AFP ₁ (1.1), AFL (0.3)	AFB ₁ (79.0), AFB ₂ (26.0), AFG ₁ (63.0), AFG ₂ (21.0), AFM ₁ (63.0), AFM ₂ (89.0), AFP ₁ (58.0), AFL (47.0)	(Sharma y Marquez, 2001)
México	29	HPLC-FL	AFB ₁ (1.6), AFB ₂ (0.1), AFG ₁ (28.2), AFG ₂ (1.3), AFM ₁ (1.8), AFM ₂ (0.2), AFP ₁ (1.7), AFL (28.6)	AFB ₁ (76.0), AFB ₂ (4.0), AFG ₁ (86.0), AFG ₂ (93.0), AFM ₁ (48.0), AFM ₂ (21.0), AFP ₁ (100), AFL (100)	(Fuentes <i>et al.</i> , 2018)
Nigeria	30	HPLC	AF (9.6)	AF (100)	(Akinrinmade y Akinrinde, 2012)
Polonia	25	HPLC-FLD	AF (0.2)	AF (4.0)	(Błajet-Kosicka <i>et al.</i> , 2014)

Sur África	(AE)10 (AP)10	TLC, HPLC- FLD	(AE) AFB ₁ (44.1) (AP) AFB ₁ (20.1)	AFB ₁ (100)	(Singh y Chuturgoon, 2017)
Turquía	21	ELISA	AFB ₁ (6.6)	AFB ₁ (100)	(Basalan <i>et al.</i> , 2004)
Turquía	18	ELISA	AF 1.75 a 20	AF (16.7)	(Gunsen y Yaroglu, 2002)
Brasil	Estudio retrospectivo	HPLC	AFB ₁ - AFG ₁ (89.0- 191)	-	(Reis-Gomes <i>et al.</i> , 2014)

Definición: AF: Aflatoxina total; AFB₁: Aflatoxina B₁; AFB₂: Aflatoxina B₂; AFG₁: Aflatoxina G₁; AFG₂: Aflatoxina G₂; AFL: Aflatoxicol; AFM₁: Aflatoxina M₁; AFM₂: Aflatoxina M₂; AFP₁: Aflatoxina P₁; ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; LC-MS/MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem; LC-MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; PLC-MS / MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS: cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución; HPLC-FL: cromatografía líquida de fluorescencia de alto rendimiento; HPLC-FLD con detección de fluorescencia (FLD); AE: alimento estándar; AP: alimento premium; ASP: alimento super premium

2.10. MICOTOXINAS

2.10.1. Zearalenona

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina producida principalmente por especies de hongos del género *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* y *F. semitectum* (Bhatnagar, Yu, y Ehrlich, 2002). Debido a su similitud estructural con los estrógenos naturales, induce efectos estrogénicos en humanos y animales (Bennett y Klich, 2003). Esta micotoxina se une competitivamente a los receptores de estrógenos (ER α y ER β); actúan desplazando el estradiol de su proteína de unión uterina, provocando una respuesta estrogénica (Yazar y Omurtag, 2008). Los efectos adversos en perros incluyen reducción de la fertilidad, alteraciones en los ovarios y en los niveles séricos de progesterona y estradiol (Gajęcka, Zielonka y Gajęcki, 2015).

La ZEA se absorbe después de la exposición oral. Una vez ingerida, puede absorberse y metabolizarse mediante hidroxilación a α -zearalenol (α -ZEA) y β -zearalenol (β -ZEA) por acción de enzimas hidroxisteroide deshidrogenasas del citocromo P₄₅₀. El α -ZEA, es tres o cuatro veces más estrogénico, y el β -ZEA, es menos estrogénico que la ZEA (Catteuw *et al.*, 2019). Se produce una biotransformación adicional a conjugados de glucurónido por acción de la uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferasa (UGT) para facilitar la eliminación de estas toxinas del cuerpo. La glucuronidación eficaz de la ZEA en el intestino delgado y en el hígado reduce significativamente las cantidades de compuesto original no conjugado (es decir, receptor activo) que llega a la circulación. Sin embargo, la acción de la UGT es inhibida por una alta concentración de ZEA (Videmann *et al.*, 2008). La zearalenona experimenta una extensa circulación enterohepática y excreción biliar en la mayoría de las especies. La principal vía de excreción para la mayoría de las especies es a través de las heces.

2.10.2. Fumonisin

Las fumonisinas (FUM) se produce principalmente por hongos del género *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*. Existen más de 28 fumonisinas y se clasifican en cuatro grupos (A, B, C y P) (Rheeder, Marasas, y Vismer, 2002). La fumonisina B₁ (FB₁) es la que se encuentra con mayor frecuencia y comprende del 70 al 80% de la familia total de las fumonisinas (Alshannaq y Yu, 2017). La FB₁ produce efectos tóxicos al interrumpir el metabolismo de los esfingolípidos (Yazar y Omurtag, 2008). El hígado y el riñón se ven afectados principalmente en la toxicidad aguda por fumonisinas y el sistema inmunológico en la exposición crónica a fumonisinas (Boermans y Leung, 2007).

2.10.3. Ocratoxina

La ocratoxina (OTA) es un compuesto producido por *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y otras especies de *Penicillium*. El grupo de toxinas más importante es la ocratoxina A (Duarte, Pena, y Lino, 2010). La OTA es liposoluble, tiende a acumularse en los tejidos de los animales especialmente los cerdos (Stoev *et al.*, 2002).

La OTA se absorbe principalmente en el tracto gastrointestinal y se une a la albúmina sérica en la sangre. En animales y humanos, la OTA puede ser metabolizada por enzimas de fase I y fase II a muchos productos diferentes en el hígado, riñón e intestino. La mala biotransformación y la lenta eliminación de metabolitos contribuyen a la toxicidad, carcinogenicidad y especificidad orgánica de la OTA (Lyagin y Efremenko, 2019). En el intestino, la ocratoxina α (OT α), un metabolito principal, es formado por carboxipeptidasas, que escinden el enlace peptídico en la OTA (Wen *et al.*, 2016). Otros metabolitos principales de la OTA son 4-hidroxi-ocratoxina A (4-OH-OTA) y 10- hidroxiocratoxina A (10-OH-OTA). La mayoría de los metabolitos de la OTA, como OT α , OTB, 4-OH-OTA y 10-OH-OTA, son menos tóxicos que el compuesto original (Wu *et al.*, 2013). Sin embargo, la apertura del anillo de lactona en condiciones alcalinas (llamada OTA abierta con lactona), que se encuentra en los roedores, conduce a metabolitos más tóxicos que la propia OTA. Estas reacciones de tipo de fase I probablemente se relacionan con la acción de la familia de enzimas CYP₄₅₀, incluidas CYP1A₁, CYP1A₂, CYP3A₁, CYP3A₂, CYP3A₄, CYP3A₅, CYP2B₆ y CYP2C₉ (Tao *et al.*, 2018). La biotransformación de fase II ocurre principalmente en el hígado con la conjugación de OTA con sulfato, glucurónido, hexosa/pentosa y glutatión (Kőszegi y Poór, 2016).

2.10.4. Deoxinivalenol

El deoxinivalenol (DON) pertenece a la familia de sustancias químicas conocidas como tricotecenos, compuestos sesquiterpenoides caracterizados por un anillo epoxi en la posición C-12,13 (Pitt, 2014).

Se han identificado más de 150 variantes de tricotecenos (Yazar y Omurtag, 2008). Entre los TCTC, el deoxinivalenol (DON) es el más común (Bennett y Klich, 2003).

Los TCTC son producidos principalmente por hongos de la especie *Fusarium*. Sin embargo, las especies de *Acremonium* (*Cephalosporium*), *Cylindrocarpon*, *Dendrodochium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* y *Stachybotrys* también pueden producir TCTC (Bottalico y Perrone, 2002). Los productores de TCTC más importantes son *F. graminearum* y *F. culmorum* (Alshannaq y Yu, 2017).

Los TCTC pueden penetrar fácilmente las bicapas lipídicas de la membrana celular para reaccionar con el ADN, el ARN y los organelos celulares (Wannemacher, Bunner, y Neufeld, 1991). El principal mecanismo de toxicidad de la TCTC es la inhibición de la síntesis de proteínas ribosómicas, seguida de una alteración secundaria de la síntesis de ADN y ARN (Richard, 2007).

El deoxinivalenol DON no es un sustrato del metabolismo de fase I, se biotransforma en la fase II (Schelstraete *et al.*, 2019). Los principales metabolitos del DON incluyen los conjugados DON glucurónido y sulfato y (DOM-1) el deepoxi-desoxinivalenol (Payros *et al.*, 2016). El DON se conjuga con glucósidos o sulfonatos para formar DON-3-glucósido (D3G); sulfonatos de DON, OM y D3G; y glucurónidos DON-3-, DON-7-, DON-8- y DON- 15- identificados en porcinos, ratas, pollos, bovinos y humanos (Schwartz *et al.*, 2013).

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Las croquetas para perro expandidas en Aguascalientes se encuentran contaminadas por aflatoxinas y su concentración se asocia a la presencia de *Aspergillus flavus* y a los ingredientes empleados para su fabricación.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de *Aspergillus flavus* en alimentos comerciales secos para perros; además de evaluar su concentración de aflatoxinas deduciendo las alteraciones de la inocuidad de los alimentos y el riesgo para la salud que tienen los perros al ingerirlos.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.3.1. Obtener una muestra representativa de la oferta de alimentos comerciales secos para perros expandidos en Aguascalientes.
- 3.3.2. Aislar e identificar la microbiota fúngica en los alimentos comerciales secos para perros.
- 3.3.3. Cuantificar la concentración de micotoxinas presentes en los alimentos mediante ELISA indirecta.
- 3.3.4. Determinar la capacidad aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* en vapores de amonio en agar-coco y HPLC.
- 3.3.5. Realizar análisis molecular para *Aspergillus flavus*.
- 3.3.6. Evaluar la asociación de la presencia de aflatoxinas con los ingredientes con que se elaboraron los alimentos.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE MUESTREO

El estudio se realizó en Aguascalientes, México (22°27'35"- 21°37'20" N; 101°50'07" - 102°52'27" O). El clima es semiseco con temperatura media anual de 18 °C; con una precipitación pluvial media de 526 mm y el periodo principal de lluvias en verano (INEGI, 2017). Se obtuvo una relación de centros comerciales, tiendas de mascotas, veterinarias y tiendas de abarrotes que registraban el expendio de ACS y se realizó una visita a para obtener información de las marcas y tipos que se vendían en los establecimientos. Se encontraron un total de 145 tipos de ACS (Cuadro 5), los que fueron considerados como un marco de muestreo.

4.1.1. Cálculo del tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se calculó en 58 tipos de ACS mediante la fórmula siguiente para estimar proporciones en una población finita (Segura y Nicholas, 2000) (Figura 2).

$$n = \frac{NZ^2pq}{Nd^2 + z^2pq}$$

Figura 2. Tamaño de muestra para estimar una proporción

Donde: n = Tamaño de muestra (58); N= Tamaño de la población (145 tipos de ACS); Z = Valor distribución normal estándar (1.96); p = Prevalencia o proporción esperada de la contaminación con *Aspergillus* spp. o con AFs en el ACS, se utilizó un valor de proporción p = 0.5, q = 1-p; d = Precisión deseada (máximo error = 0.10).

$$n = \frac{145(1.96^2)(0.5)(0.5)}{[145(0.1^2)] + [(1.96^2)(0.5)(0.5)]}$$

$$n = \frac{139.2}{1.45 + 0.96}$$

$$n = \frac{139.2}{2.41}$$

$$n = 57.75$$

La selección de las muestras se realizó mediante la técnica de muestreo bola de nieve (Espinoza, 2018); para lo cual se visitaron sucesivamente los establecimientos en orden alfabético y se adquirieron muestras expendidas de ACS. La adquisición del ACS se suspendió cuando en tres comercios sucesivos se encontraron los mismos tipos que habían sido adquiridos previamente. Finalmente, fueron adquiridos 77 tipos diferentes de ACS (Cuadro 5).

Cuadro 5. Características del alimento comercial seco para perro comercializados en el centro de México

Tipo de alimento	Oferta (N)	Muestreo (n)	(n/N%)	Proteína (mín. %)	Humedad (máx. %)	Fibra (máx. %)	Precio *US\$/kg±(EE)
Origen							
Nacional	120	64	53.3	24.0	11.0	4.0	3.9 ^b ± 0.24
Internacional	25	13	52.0	26.0	11.0	4.0	5.9 ^a ± 0.92
Clasificación comercial							
Estándar	87	52	59.8	22.0	12.0	5.0	2.6 ^b ± 0.17
Premium	58	25	43.1	27.0	11.0	4.0	7.7 ^a ± 0.37
Prescripción (Edad)							
Cachorro	55	27	49.1	27.0	11.0	4.0	5.1 ^a ± 0.45
Adulto	90	50	55.6	22.0	11.0	4.0	3.7 ^b ± 0.30
Prescripción (Talla)							
General	72	43	59.7	22.0	12.0	5.0	2.2 ^a ± 0.10
Específica	73	34	46.6	26.0	11.0	4.0	6.8 ^a ± 0.39
Total	145	77	53.1				

*Precio en dólares americanos de referencia (www.banxico.org.mx: enero 2020)

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

La clasificación del tipo de ACS se registró de acuerdo con la prescripción (edad y talla) y comercial (estándar y premium) declarada por el fabricante. La composición de los ACS fue registrada a partir de la información nutricional informada por el fabricante para identificar los ingredientes empleados. Se clasificaron los ACS por la presencia o ausencia de cereales, oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas, tubérculos, subproductos de origen animal, fungicidas e ingredientes con capacidad secuestrante y tipo de ACS.

4.2. MANEJO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Se obtuvieron 300 g de cada tipo de alimento y se secaron en una estufa (OF-22G JEOI-TECH, Lab. Companion, Corea) a 40 °C durante 24 horas; posteriormente, se molieron en un molino universal de funcionamiento continuo (MF series 10 Basic, IKA® Werke, Alemania).

Las muestras secas y molidas se depositaron en bolsas herméticas para congelar (Ziploc®); cada bolsa se identificó con el nombre comercial del producto y con un número consecutivo indicando el orden en el que se irán obteniendo las muestras. Las muestras se almacenaron en congelación hasta su procesamiento.

4.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *ASPERGILLUS FLAVUS* Y OTRA FLORA FÚNGICA

4.3.1. Técnica de vaciado en placa por dilución

Las muestras previamente molidas se les adicionó peptona de caseína estéril al 0.1%; se realizaron cuatro diluciones por cada muestra: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} ; se sembraron en agar rosa de bengala y czapeck; posteriormente se incubaron a 27-30° C durante 5 a 7 días (Santibáñez *et al.*, 2011) (Anexo C).

4.3.2. Identificación de la estructura morfológica mediante la preparación de tinción azul de algodón con lactofenol

Para identificar los hongos *Aspergillus flavus* y otra microbiota fúngica, se tomó un segmento de la colonia de interés y se realizaron preparaciones con tinción azul de algodón con lactofenol sobre un portaobjetos previamente estéril. Se observó al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA) a diferentes magnificaciones (López-Jácome *et al.*, 2014) para la identificación de los hongos a nivel de género, con base en las descripciones especializadas de Barnett y Hunter (1998). Con la ayuda de las claves taxonómicas de Klich (2002) se identificaron las colonias del género *Aspergillus* y otra microflora fúngica (Anexo D).

4.4. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

4.4.1. Cuantificación de aflatoxinas en el alimento comercial seco por el método de ELISA indirecta

La técnica se realizó con base a las especificaciones del inserto incluido en el kit. La extracción de las aflatoxinas se hizo con una mezcla de metanol-agua (70% v/v). La cuantificación se realizó por duplicado con un kit comercial de ELISA indirecta (Ridascreen Fast® aflatoxin R-5202, R-Biopharm, Alemania) y se leyó la absorbancia de cada muestra en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (Biotek ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de las absorbancias se registraron y se calcularon usando un software (Ridasoft Win versión 1.8). La concentración de aflatoxinas se estimó mediante una curva de calibración elaborada con aflatoxina B₁ purificada (Anexo E).

4.5. DETECCIÓN DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE *ASPERGILLUS FLAVUS*

4.5.1. Detección cualitativa de la capacidad aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* por el método de vapores de amonio

Se realizó las técnicas de vapores de amonio en agar coco, para detectar la capacidad oxigénico de los aislados de *A. flavus* (Saito y Machida, 1999) (Anexo F).

4.5.2. Detección cualitativa de la capacidad aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* por el método de cromatografía en capa fina

Para la identificación de aflatoxinas por cromatografía en capa fina se utilizó el procedimiento descrito por la AOAC 972.26. La extracción se hizo con metanol: agua (80:20) en los cultivos previamente triturados. Se utilizaron placas de sílica gel como fase estacionaria. Las placas con el estándar (AFB_1) y las muestras se colocaron en una cámara cromatográfica con fase móvil cloroformo: acetona: isopropanol (85:10:5). Se dejó correr la fase móvil durante una hora y media y posteriormente se visualizó en el tranluminador (Anexo G).

4.5.3. Cuantificación de aflatoxinas en *Aspergillus flavus* por el método de Cromatografía líquida de alta eficacia

La cuantificación de aflatoxinas se realizó de acuerdo con el método oficial AOAC 990.33 (Scott, 1995) empleando columnas de fase sólida (Anexo H).

4.6. ANÁLISIS MOLECULAR PARA *ASPERGILLUS FLAVUS*

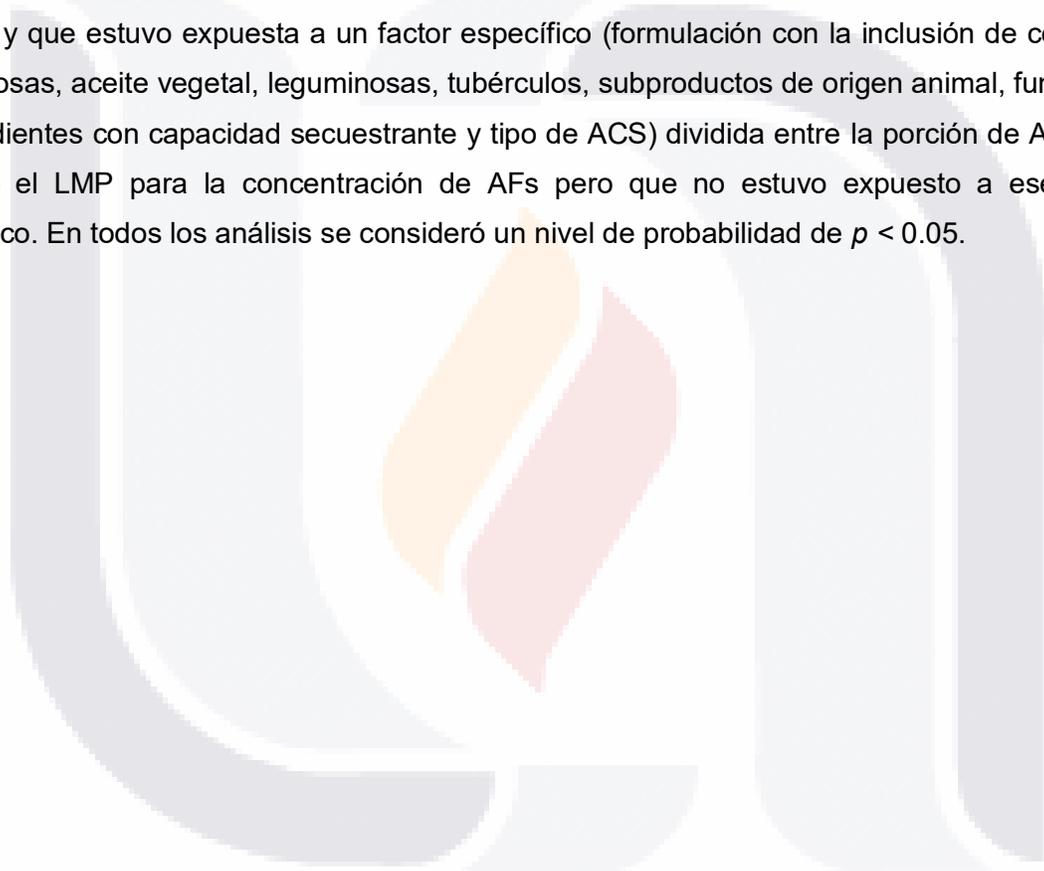
La extracción de ADN genómico de cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp. se realizó siguiendo métodos estandarizados previamente (Hoffman y Winston, 1987) (Anexo I).

4.7. CUANTIFICACIÓN DE ZEARALENONA, FUMONISINA, OCRATOXINA Y DEOXINIVALENOL EN ALIMENTO COMERCIAL SECO

La cuantificación de se realizó por duplicado por el método de ELISA indirecta empleando kits comerciales (Ridascreen Fast® Zearalenon R5502, R-Biopharm, Alemania; Ridascreen Fast® Fumonisin R5602, R-Biopharm, Alemania; Ridascreen Fast® Ochrotoxin A R5402, R-Biopharm, Alemania; Ridascreen Fast® Deoxynivalenol R5902, R-Biopharm, Alemania). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron. Se obtuvo la absorbancia de cada muestra en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (Biotek ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de las absorbancias se registraron y se calcularon usando un software (Ridasoft Win versión 1.8) (Anexo J).

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados aplicando una prueba de normalidad con el método de Kolmogórov-Smirnov a un nivel de confianza del 95%. La comparación de las medias muestrales para cada variable se realizó mediante la prueba de Tukey (HSD) con un software estadístico (Statgraphics Centurion, versión 16.1.03). Para identificar el riesgo de superar el LMP establecido para la concentración de AFs se realizó la prueba de Chi-cuadrada (χ^2) de la razón de probabilidades o razón de momios (RM), calculando la porción de ACS que excedió el LMP para la concentración de AFs y que estuvo expuesta a un factor específico (formulación con la inclusión de cereales, oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas, tubérculos, subproductos de origen animal, fungicidas e ingredientes con capacidad secuestrante y tipo de ACS) dividida entre la porción de ACS que excedió el LMP para la concentración de AFs pero que no estuvo expuesto a ese factor específico. En todos los análisis se consideró un nivel de probabilidad de $p < 0.05$.



5 RESULTADOS

5.1. IDENTIFICACIÓN DE *ASPERGILLUS FLAVUS* Y OTRA MICROFLORA FÚNGICA

Se encontró que poco más de la mitad de las muestras de ACS (41/77 = 53.2 %) presentó contaminación fúngica, mientras que el 7.8 % (6/77) contenían una concentración de hongos superior a los niveles máximos recomendados (10^6 UFC/g).

Se obtuvieron un total de 85 aislamientos fúngicos purificados, los cuales el mostraron características morfológicas correspondientes con los principales géneros toxigénicos siguientes (Figura 3): *Aspergillus* spp. (69.4 %), *Fusarium* spp. (1.1 %) y *Penicillium* spp. (12.9 %). También se identificaron aislados con morfología correspondiente a los géneros *Cladosporium* spp., *Mucor* spp. y *Alternaria* spp (9.4, 4.7 y 1.7 %, respectivamente).

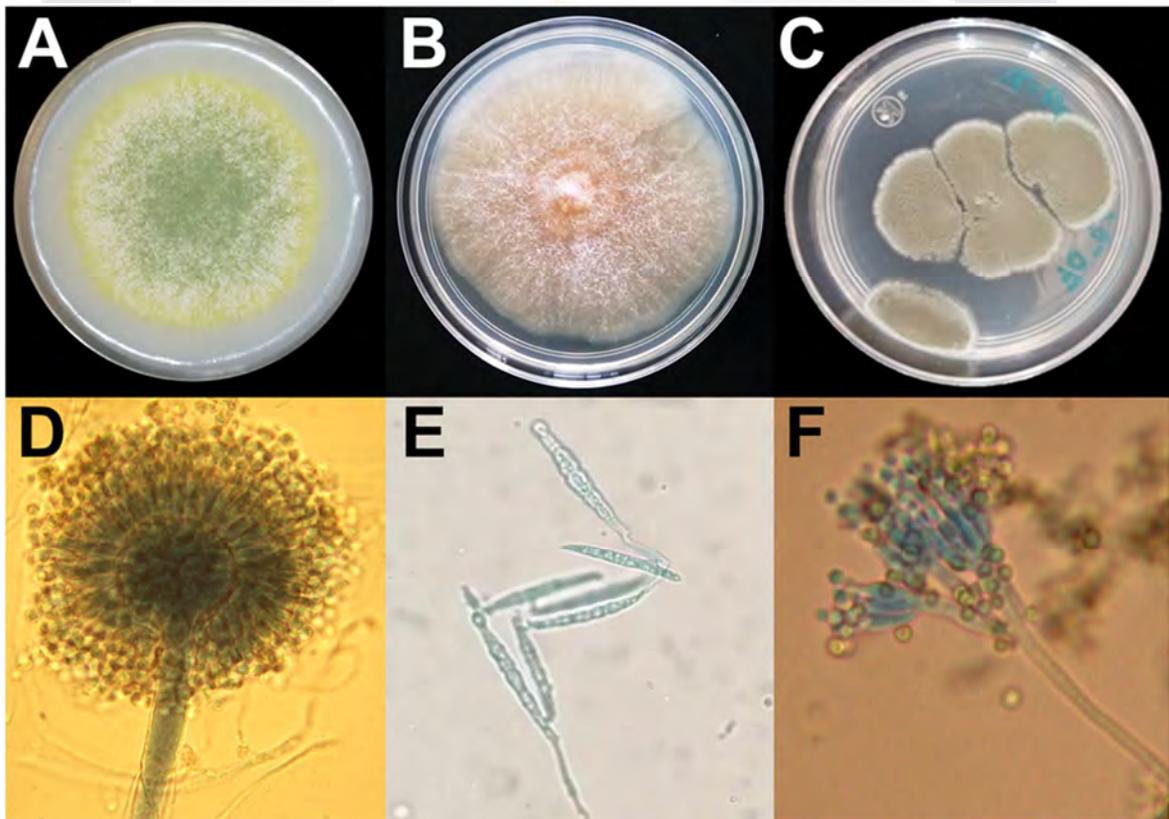


Figura 3. Aislados monospóricos. Imagen propia

Panel: A) Estructura morfológica macroscópica del género *Aspergillus* spp., **Panel: B)** Estructuras morfológica macroscópica del género *Fusarium* spp., **Panel: C)** Estructura morfológica macroscópica del género *Penicillium* spp., **Panel: D)** Estructura morfológica microscópica del género *Aspergillus* spp (40x)., **Panel: E)** Estructura morfológica microscópica del género *Fusarium* spp (40x)., **Panel: F)** Estructura morfológica microscópica del género *Penicillium* spp. (40x).

De los aislados *Aspergillus* spp., el 40.7% (24/59) correspondieron a la morfología de *A. flavus*.

Al ser cultivados en agar coco, macroscópicamente mostraron una textura lanosa-aterciopelada; con coloración verde olivo con micelio de color blanco de textura delgada. Microscópicamente, presentaron conidióforos de longitud variable con contenido de esporas; el estípite con paredes rugosas y ensanchamiento claviforme formando una vesícula; además se observaron fiálides en el ápice y otros con presencia méticas y fiálides en toda la superficie (Figura 3).

5.2. EVALUACIÓN DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO POR EL MÉTODO DE ELISA INDIRECTA

Todos los alimentos presentaron concentraciones de aflatoxinas (Figura 4). La curva de frecuencias de la concentración de AF presentó una aproximación normal (p 0.14); la concentración media de aflatoxinas en ACS fue de $14.8 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ con intervalo de confianza al 95.0% de 14.2-15.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$; la concentración mínima fue de 8.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y concentración máxima de 22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mientras que aproximadamente uno de cada diez de los alimentos analizados sobrepasó el LMP de AF recomendado por las legislaciones de países de América Latina (FAO, 2003; Stenske *et al.*, 2006), todos los alimentos rebasaron las recomendaciones europeas (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (European Commission, 2016).

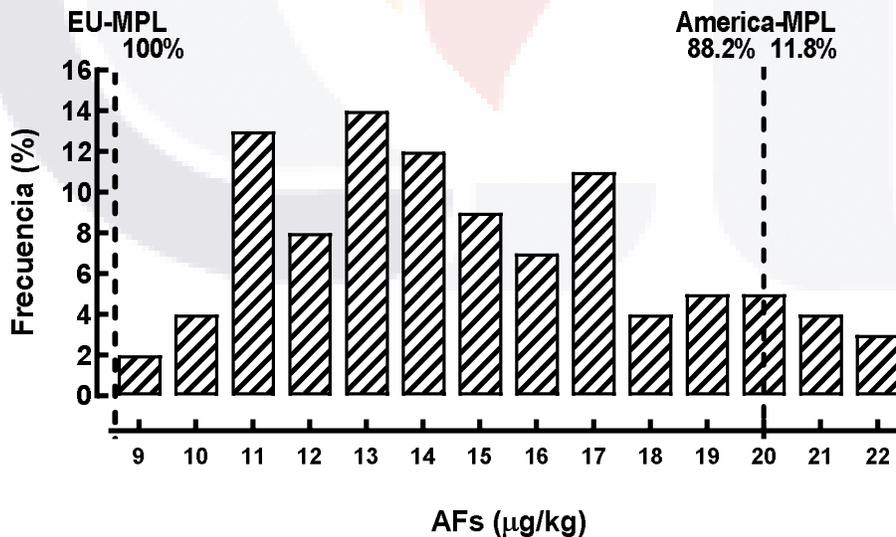


Figura 4. Frecuencia de la concentración de aflatoxinas (AFs) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. (MPL máximo permisible level) LMP, Límite máximo permisible: América (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); Unión Europea (5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

5.2.1. Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de aflatoxinas

El ACS con humedad mayor a 10 % mostró una concentración estimada de AFs significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la en los ACS que contenían humedad menor. También se detectó un riesgo significativo (RM $\chi^2 p < 0.05$) tres veces mayor de encontrar concentraciones por arriba del LMP en aquellos ACS que registraron humedad mayor a 10% (Cuadro 6) en relación con los ACS que tenían humedad menor 10 %. Aunque se detectó un mayor riesgo también para los ACS que en su formulación contenían una mayor concentración de proteína, grasa y cenizas (>22, >12 y >7%, respectivamente), la asociación estadística no fue significativa ($p > 0.05$).

Cuadro 6. Asociación entre el análisis bromatológico del alimento comercial seco para perro y la concentración de aflatoxinas

Característica	(n)	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$\pm\text{EE}$	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Humedad relativa						
>10%	31	17.4 ^a	± 0.36	19.4	0.01	3.4
$\leq 10\%$	46	13.0 ^b	± 0.29	6.5		
Proteína						
>22%	47	14.9 ^a	± 0.36	14.9	0.12	2.5
$\leq 22\%$	30	14.7 ^a	± 0.46	6.7		
Grasa						
>12%	22	14.9 ^a	± 0.53	18.2	0.11	2.2
$\leq 12\%$	55	14.8 ^a	± 0.34	9.1		
ELN						
Presente	47	14.4 ^a	± 0.52	12.8	0.78	1.1
Ausente	30	15.0 ^a	± 0.34	11.2		
Fibra						
>4%	30	15.2 ^a	± 0.46	13.3	0.61	1.3
$\leq 4\%$	47	14.5 ^a	± 0.36	10.6		
Ceniza						
>7%	38	15.5 ^a	± 0.40	15.8	0.11	2.3
$\leq 7\%$	39	15.1 ^a	± 0.39	7.7		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permisible (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (< 0.05); RM: Razón de momios; ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.

5.2.2. Asociación entre los cereales en el alimento comercial seco y la concentración de aflatoxinas

La concentración promedio de AFs en los ACS que contenían trigo fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la concentración estimada de AFs en los ACS que no utilizaron este ingrediente (Cuadro 7). Sin embargo, al calcular el riesgo de exceder el LMP no hubo una

asociación significativa ($p > 0.05$) entre la proporción de los ACS que contenían trigo y los que no lo incluyeron en su formulación.

Cuadro 7. Asociación entre la concentración de aflatoxinas y la inclusión de cereales en alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media \pm EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Trigo					
Presente	47	15.5 ^a \pm 0.35	12.8	0.60	1.3
Ausente	30	13.8 ^b \pm 0.44	10.0		
Cebada					
Presente	22	15.5 ^a \pm 0.53	18.2	0.11	2.2
Ausente	55	14.5 ^a \pm 0.33	9.1		
Maíz					
Presente	55	15.0 ^a \pm 0.34	9.1	0.11	0.45
Ausente	22	14.3 ^a \pm 0.53	18.2		
Arroz					
Presente	38	15.2 ^a \pm 0.40	13.2	0.57	1.4
Ausente	39	14.4 ^a \pm 0.40	10.3		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permissible (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios

No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las medias de concentración de AFs en presencia o ausencia de algún subproducto de origen animal en los ACS (Cuadro 8). Sin embargo, si se detectó una asociación significativa ($p < 0.05$, χ^2) en la proporción de ACS que excedieron el LMP entre los ACS que presentaron en su formulación harina y aceite de pescado, en comparación con los que no los incluyeron; por lo cual el riesgo (RM) de encontrar concentraciones por arriba del LMP fue más tres veces que en los ACS que registraron ausencia de los ingredientes. La totalidad de las muestras adquiridas emplearon harina de carne y hueso en la formulación del ACS, por lo que no se pudo establecer ninguna asociación con estos ingredientes.

Cuadro 8. Asociación entre la concentración de aflatoxinas y la inclusión de subproductos de origen animal en alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media \pm EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Huevo y leche					
Presente	27	15.1 ^a \pm 0.48	18.5	0.05	2.6
Ausente	50	14.7 ^a \pm 0.35	8.0		
Harina y aceite de pescado					
Presente	31	15.3 ^a \pm 0.45	19.4	0.01	3.4
Ausente	46	14.5 ^a \pm 0.37	6.5		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permissible (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios

Los ACS que contenían fungicidas o agentes secuestrantes minerales de micotoxinas mostraron concentración media de AFs significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación a la concentración estimada de AFs en los ACS donde no fueron incluidos estos aditivos (Cuadro 9). Además, se detectó una asociación protectora significativa ($p < 0.05$, χ^2) al comparar la proporción de ACS que excedieron el LMP pero que no incluyeron estos componentes y aquellos que sí los agregaron a su formulación, por lo cual el riesgo (RM) de presentar concentraciones por arriba del LMP fue menor que en los ACS que incluyeron fungicidas o agentes secuestrantes.

Cuadro 9. Asociación entre la inclusión de fungicidas y agentes secuestrantes con la concentración de aflatoxinas en el alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media \pm EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	>LMP (%)	Valor de P (χ^2)	RM
Fungicidas					
Presente	46	13.5 ^a \pm 0.33	6.5	0.01	0.29
Ausente	31	16.7 ^b \pm 0.40	19.4		
Adsorbentes orgánicos					
Presente	43	14.7 ^a \pm 0.38	9.3	0.30	0.59
Ausente	34	14.9 ^a \pm 0.43	14.7		
Secuestrantes minerales					
Presente	43	13.9 ^a \pm 0.36	7.0	0.04	0.35
Ausente	34	15.9 ^b \pm 0.41	17.7		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permisible; P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios

5.3. DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO DE VAPORES DE AMONIO

Los 18 aislados identificados como *A. flavus* se analizaron por la técnica de vapores de amonio en agar coco para identificar de manera cualitativa la capacidad aflatoxigénica. Dos aislamientos tuvieron reacción positiva a la presencia de AFs (Figura 5).

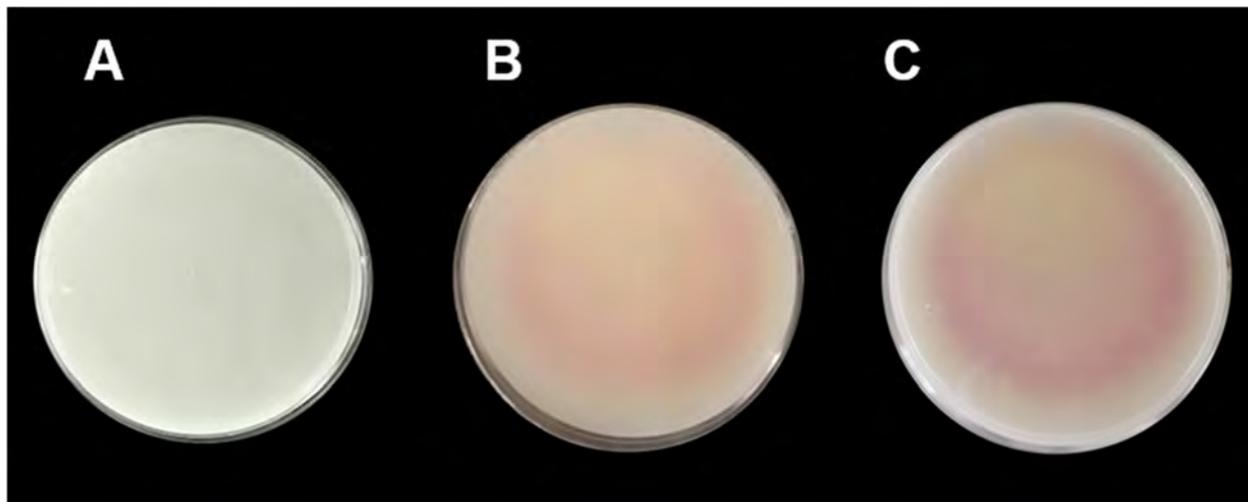


Figura 5. *Aspergillus flavus* en medio agar coco.
 Intensidad de color al contacto con vapores de amonio
Panel: A) Colonia-15: Aislamiento no aflatoxigénica (AF⁻).
Panel: B) Colonia-13 y **Panel: C)** Colonia-16: Aislamientos aflatoxigénicos (AF⁺)

5.4. DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Los 18 aislados identificados como *A. flavus* se analizaron por la técnica de cromatografía en capa fina para identificar de manera cualitativa la capacidad aflatoxigénica. Dos aislamientos tuvieron reacción positiva a la presencia de AF (Figura 6).

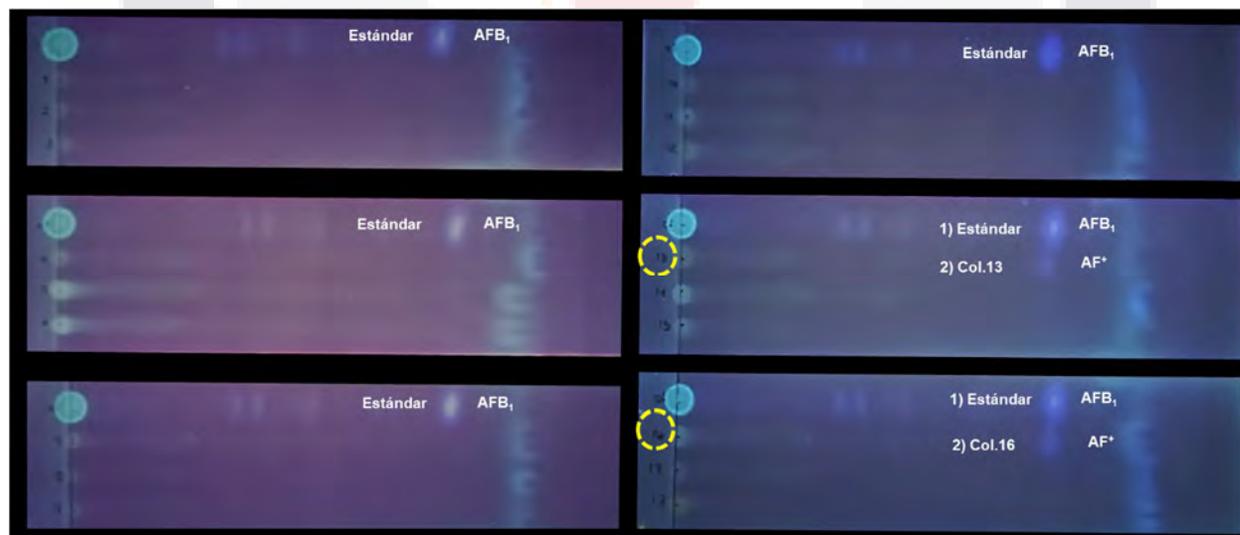


Figura 6. Placa de sílica gel vista en transluminador
 1) Estándar purificado de AFB₁; 2) Aislados *A.flavus* obtenidos del ACS (AF⁺)

5.5. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN ASPERGILLUS FLAVUS POR EL MÉTODO DE HPLC

No se presentaron diferencias entre la concentración media de AF y el crecimiento de *A. Flavus* en los ACS ($p > 0.05$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación entre la concentración de aflatoxinas en las colonias de *A. Flavus* del alimento comercial seco

AF en ACS	(n)	Media (µg/kg)	EE	P(χ^2)	RM	>LMP (%)
<i>A. flavus</i>	18	15.1 ^a	±0.59	0.90	0.90	11.0
Sin crecimiento	59	14.7 ^a	±0.32			12.0

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)
 Abreviaturas: E.E: Error estándar; P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios; LMP: Límite máximo permisible

5.6. ANÁLISIS MOLECULAR PARA ASPERGILLUS FLAVUS

Los 18 aislados identificados morfológicamente como *A. Flavus*, amplificaron para el gen ITS en un rango de 600 a 800pb; Calmodulina con un rango de 400 a 600pb y *afIR* (gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas) con 798pb (Figura 7).

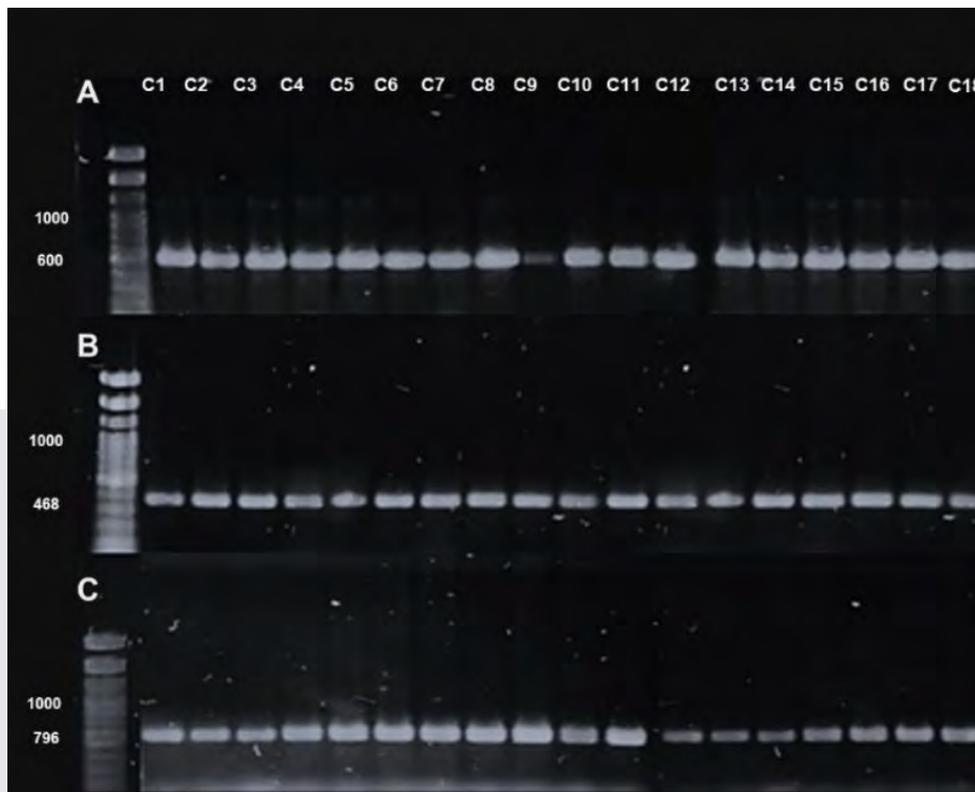


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados del gen de la región de espaciadores internos de la transcripción (ITS) (Panel A), Calmodulina (Panel B) y aflR (Panel C)

5.7. EVALUACIÓN DE ZEARALENONA EN EL ALIMENTO COMERCIAL SECO POR EL MÉTODO DE ELISA INDIRECTA

Todos los alimentos presentaron concentraciones de ZEA (Figura 8). La curva de frecuencias de la concentración de ZEA presentó una aproximación normal (p 0.26); la concentración media de ZEA en ACS fue de 228 ± 3.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con intervalo de confianza al 95.0% de 220-235 $\mu\text{g}/\text{kg}$; la concentración mínima fue de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y concentración máxima de 322 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Más de la mitad de los alimentos analizados sobrepasaron el LMP de ZEA recomendado por las legislaciones europeas (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (European Commission, 2016).

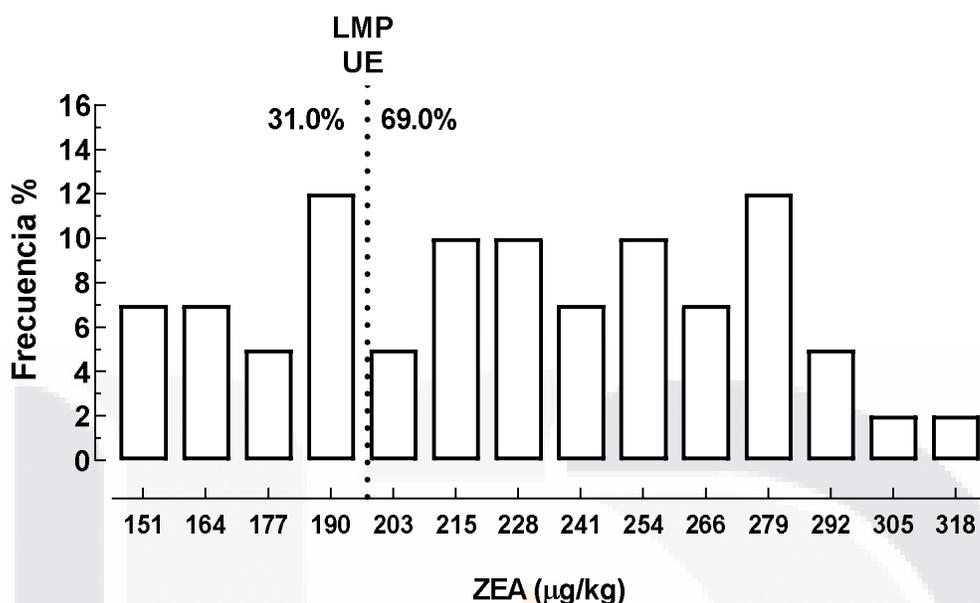


Figura 8. Frecuencia de la concentración de zearalenona (ZEA) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. (MPL maximum permissible level) LMP, Límite máximo permisible: Unión Europea (200 µg/kg)

5.7.1. Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de zearalenona

Los alimentos con grasa >12% fueron significativamente mayor ($p < 0.05$) en el contenido promedio de ZEA en comparación a los alimentos con $\leq 12\%$ de grasa registrada (Cuadro 11).

Además, hubo una asociación significativa (RM χ^2 $p < 0.05$) entre la proporción de alimentos que excedieron el LMP (200 µg/kg) y los alimentos que presentaron grasa >12%, por lo que la razón de probabilidad de encontrar concentraciones superiores al LMP en alimentos con grasa >12% fue más de tres veces en comparación a los alimentos de grasa $\leq 12\%$.

Cuadro 11. Asociación entre el análisis bromatológico del alimento comercial seco para perro y la concentración de zearalenona

Característica	(n)	Media (µg/kg)	±EE	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Humedad relativa						
>10%	31	227 ^a	±5.9	77.4	0.05	2.0
≤10%	46	228 ^a	±4.9	63.0		
Proteína						
>22%	47	226 ^a	±4.8	66.0	0.33	0.70
≤22%	30	231 ^a	±6.0	73.3		
Grasa						
>12%	22	235 ^a	±4.3	76.4	0.01	3.2
≤12%	55	208 ^b	±6.8	50.0		
E.L.N						
Presente	47	234 ^a	±6.8	70.2	0.80	1.1

Ausente	107	225 ^a	±4.5	68.2		
Fibra						
>4%	30	230 ^a	±6.0	76.7	0.09	1.9
≤4%	47	226 ^a	±4.8	63.8		
Ceniza						
>7%	38	235 ^a	±5.3	73.7	0.19	1.6
≤7%	39	230 ^a	±5.2	64.1		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permisible (200 µg/kg); P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios; ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.

5.7.2. Asociación entre los cereales en el alimento comercial seco y la concentración de zearalenona

Se observó en los alimentos que contenían maíz fue significativamente mayor la concentración promedio de ZEA ($p < 0.05$) en comparación a los alimentos que no registraron este cereal. Sin embargo, no tuvo una asociación significativa ($p > 0.05$) entre los alimentos con maíz y la proporción de alimentos que excedieron el LMP. (Cuadro 12).

Cuadro 12. Asociación entre la concentración de zearalenona y la inclusión de cereales en alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media (µg/kg)	± EE	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Maíz						
Presente	55	234 ^a	±4.4	72.7	0.09	1.9
Ausente	22	213 ^b	±6.9	59.1		
Trigo						
Presente	47	233 ^a	±4.8	74.5	0.05	1.9
Ausente	30	219 ^a	±6.0	60.0		
Arroz						
Presente	38	230 ^a	±5.4	73.7	0.1	1.6
Ausente	39	225 ^a	±5.3	64.1		
Cebada						
Presente	22	226 ^a	±7.1	68.2	0.9	0.95
Ausente	55	228 ^a	±4.5	69.1		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permisible (200 µg/kg); P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios; ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.

Los alimentos que se registraron con presencia de huevo y leche fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en el contenido promedio de ZEA en comparación a los alimentos que no tuvieron los ingredientes (Cuadro 13); sin embargo, no hubo una asociación significativa ($p > 0.05$) entre los alimentos que contenían huevo y leche y la proporción de alimentos que excedieron el LMP.

Cuadro 13. Asociación entre la concentración de zearalenona y la inclusión de subproductos de origen animal en alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media (µg/kg)	± EE	>LMP (%)	Valor P (χ ²)	RM
Huevo y leche						
Presente	27	239 ^a	±4.4	40.7	0.1	0.13
Ausente	50	207 ^b	±6.0	84.0		
Harina y aceite de pescado						
Presente	31	230 ^a	±5.9	71.0	0.63	1.2
Ausente	46	226 ^a	±4.9	67.4		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permissible (200 µg/kg); P(χ²): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios; ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.

En el estudio se detectó una diferencia significativa mayor ($p < 0.05$) entre las medias de concentración de ZEA en los alimentos con presencia de aceite vegetal (Cuadro 14); pero no hubo una asociación significativa entre los alimentos con aceite vegetal y la proporción de alimentos que excedieron el LMP ($p > 0.05$).

Cuadro 14. Asociación entre la inclusión de oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas y tubérculos en el alimento comercial seco y la concentración de zearalenona

Ingrediente	(n)	Media (µg/kg)	± EE	>LMP (%)	Valor P (χ ²)	RM
Oleaginosas						
Presente	27	229 ^a	±6.4	66.7	0.67	0.85
Ausente	50	227 ^a	±4.7	70.0		
Aceite vegetal						
Presente	38	236 ^a	±5.2	57.9	0.1	0.35
Ausente	39	219 ^b	±5.3	79.5		
Leguminosas						
Presente	49	229 ^a	±4.7	67.4	0.59	0.82
Ausente	28	226 ^a	±6.3	71.4		
Tubérculos						
Presente	45	224 ^a	±4.9	66.7	0.49	0.78
Ausente	32	233 ^a	±5.8	71.9		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permissible (200 µg/kg); P(χ²): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios; ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.

5.8. EVALUACIÓN DE FUMONISINA, OCRATOXINA Y DEOXINIVALENOL

5.8.1. Fumonisin

El 93.0% de las muestras presentaron concentraciones de FUM; ninguna de las muestras sobrepasó el LMP en alimentos destinados para perros recomendado por las legislaciones de la Unión Europea (European Commission, 2016) y América del Norte (FAO, 2003). Por lo cual, se

evalúo las concentraciones por valor \geq al rango intercuartílico superior (Q_4) (1.4mg/kg). El 26.0% de las muestras presentan concentraciones $\geq Q_4$ (Figura 9).

La curva de frecuencias de la concentración de FUM presentó una aproximación normal (p 0.64). La concentración media de FUM fue de 1.1mg/kg \pm 0.06 con intervalo de confianza al 95.0% de 0.93 a 1.2 mg/kg. La concentración mínima fue de 0.0mg/kg y la concentración máxima de 2.3mg/kg.

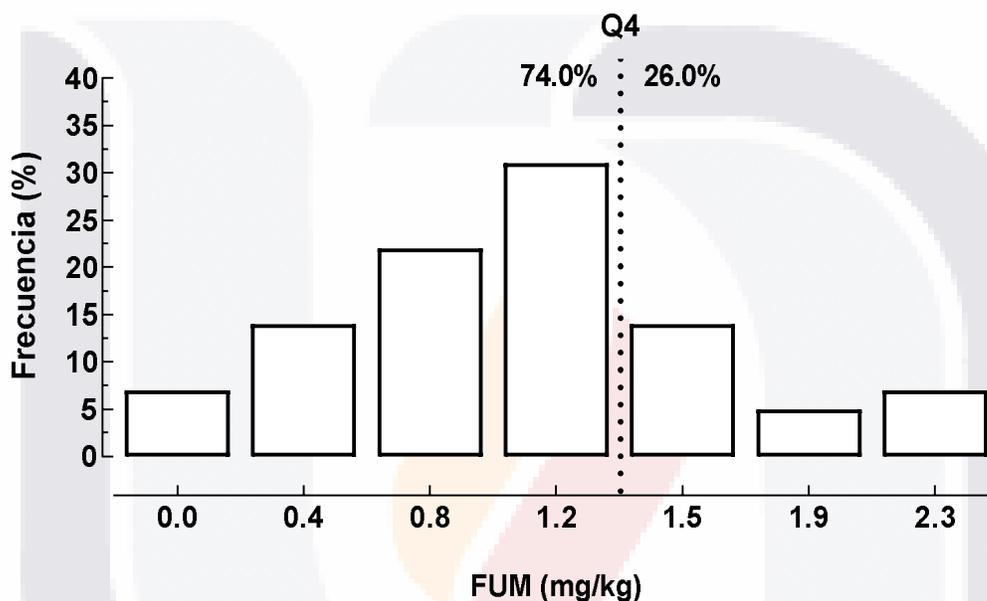


Figura 9. Frecuencia de la concentración de fumonisina (FUM) en alimento comercial seco para perro en el centro de México.

5.8.2. Ocratoxina

El 81.0% de las muestras presentaron concentraciones de OTA; ninguna de las muestras sobrepasó el LMP en alimentos destinados para perros recomendado por las legislaciones de la Unión Europea (European Commission, 2016). Por lo cual, se evaluó las concentraciones por el valor \geq al rango intercuartílico superior (Q_4) (1.9 μ g/kg). El 36.0% de las muestras presentan concentraciones $\geq Q_4$ (Figura 10).

La curva de frecuencias de la concentración de OTA presentó una aproximación normal (p 0.09). La concentración media de OTA fue de 1.4 μ g/kg \pm 0.10 con intervalo de confianza al 95.0% de 1.2 a 1.6 μ g/kg. La concentración mínima fue de 0.0 μ g/kg y la concentración máxima de 3.0 μ g/kg.

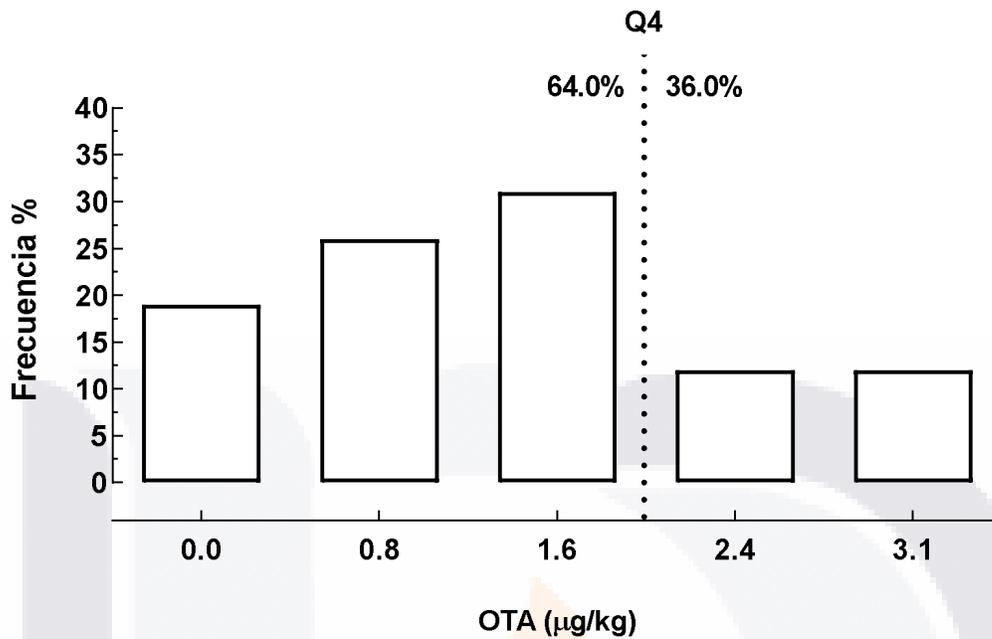


Figura 10. Frecuencia de la concentración de ocratoxina (OTA) en alimento comercial seco para perro en el centro de México.

5.8.3. Deoxinivalenol

El 95% de las muestras resultaron negativas a esta micotoxina y ninguna muestra sobrepasó el LMP de deoxinivalenol en alimentos destinados para perros recomendado por las legislaciones de la Unión Europea (European Commission, 2016) y América del Norte (FAO, 2003) (Figura 11).

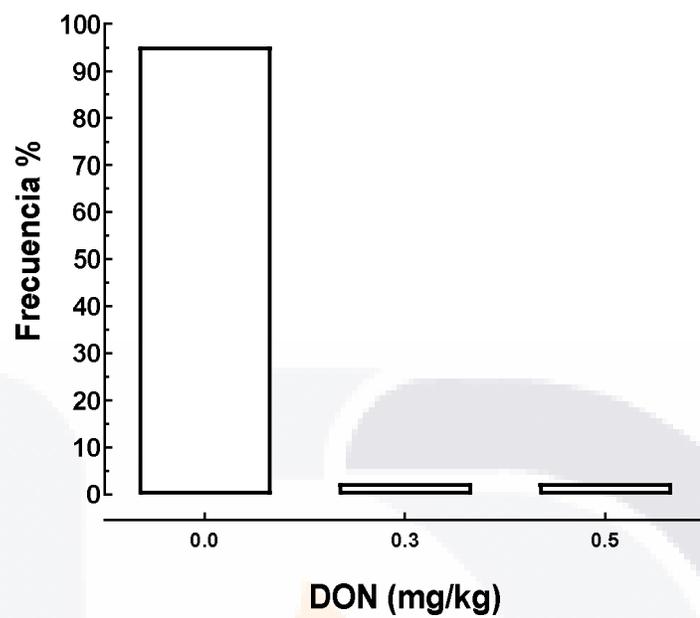


Figura 11. Frecuencia de la concentración de deoxinivalenol (DON) en alimento comercial seco para perro en el centro de México.

6 DISCUSIÓN

6.1. AISLAMIENTO FÚNGICO

Estudios informan que los contaminantes fúngicos más frecuentes presentes en el ACS para perros son *Aspergillus* spp., *Mucor* spp. y *Penicillium* spp (Witaszak *et al.*, 2019; Singh y Chuturgoon, 2017; Błajet-Kosicka *et al.*, 2014). Los géneros identificados en este estudio son consistentes con los encontrados en estudios realizados en otros países, donde se identificaron los mismos géneros fúngicos (Witaszak *et al.*, 2019; Singh y Chuturgoon, 2017; Błajet-Kosicka *et al.*, 2014). también, se han encontrado recuentos de contaminación fúngica de moderados a altos (hasta 10^6 UFC/g) en ACS. Solo 18 cepas de *A. flavus* obtenidas del alimento produjeron AF ($9.83 \pm 0.64 \mu\text{g}/\text{kg}$) en los medios de cultivo.

Aunque la información sobre la presencia de *Aspergillus* spp. y otra microflora fúngica en diversos ingredientes de la alimentación humana es extensa, los estudios de esta contaminación en el ACS son escasos, a pesar de estar realizados con ingredientes similares. Además, estos informes se refieren a la contaminación del alimento completo, pero no se han informado resultados de microflora toxigénica en los ingredientes del ACS (Witaszak *et al.*, 2019; Hořda *et al.*, 2017; Singh y Chuturgoon, 2017; Błajet-Kosicka *et al.*, 2014).

6.2. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

En este estudio se encontró que todos los alimentos presentaron concentraciones de AF. Se ha informado que las formas naturales de AF y sus metabolitos se pueden encontrar en los ingredientes utilizados para hacer ACS para perros. Los cereales son los ingredientes más comunes para la elaboración de ACS y pueden contener altos niveles de contaminación por AF, lo que los convierte en las fuentes más probables de contaminación por aflatoxinas (Rodríguez *et al.*, 2019).

6.2.1. Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de aflatoxinas

La humedad generó un efecto en la proporción de muestras que excedieron el LMP ya que se observó tres veces más el riesgo de presentar concentraciones por arriba del LMP en alimentos con humedad $>10\%$ por lo cual coincidió con la mayor presencia de AF en los ACS.

Se ha informado que la temperatura y la actividad del agua óptimas para que los genes reguladores de la ruta de biosíntesis de AF alcancen su máxima expresión son $28-30^\circ\text{C}$ y $0.96-0.99$, respectivamente, aunque el rango de producción de AF es muy amplio (Chiewchan *et al.*, 2015). Por lo tanto, si el sustrato se rehidrata durante condiciones de almacenamiento inadecuadas, las concentraciones de AF pueden aumentar.

En este estudio se encontró que un alto porcentaje (19.4%) de los alimentos con humedad >10% tenían un alto contenido de AF. Se sugiere que el resultado podría atribuirse a que cuando la materia prima extruida para la formulación de ACS presenta un exceso de contenido de humedad relativa (20-25%) en la etapa inicial del proceso y se reduce por secado (8-10%), solo se inhibe el crecimiento de las formas vegetativas de la microflora fúngica, pero las esporas y micotoxinas producidas dentro del material procesado permanecen estables (Chiewchan *et al.*, 2015).

6.2.2. Asociación entre los ingredientes y la concentración de aflatoxinas

Los resultados de este estudio muestran que hubo mayor contaminación por AF en presencia de trigo lo que se atribuye a que la contaminación ocurrió en varias etapas de la producción, como la floración, la cosecha, el procesamiento o el almacenamiento de cereales (Ott *et al.*, 2020).

Los cereales suelen estar integrados en los alimentos para perros, especialmente maíz, sorgo, arroz, trigo y cebada. Estos ingredientes son ampliamente utilizados como fuente de carbohidratos, fibra, proteínas, grasas, minerales y vitaminas (Macías- Montes *et al.*, 2020); asimismo se incluyen por su bajo costo y valor nutricional aceptable; además de esto, no afecta la palatabilidad y digestibilidad de los nutrientes (Tegzes *et al.*, 2019).

La contaminación por AF en el trigo se presenta principalmente en la etapa de postcosecha (Coppock, Christian y Jacobsen, 2018). Se ha informado que el grano mal secado con contenido de humedad superior al 14 % y almacenado a temperaturas > 20° C pueden contaminarse potencialmente con AF ya que las condiciones inadecuadas de almacenamiento y transporte pueden reactivar los hongos y provocar la contaminación después del secado (Chiewchan *et al.*, 2015).

Este estudio encontró que la mayoría de los alimentos que contenían trigo presentaron contaminación de AF por encima del LMP. Lo que sugiere que la contaminación por AF puede ser inevitable en los alimentos con presencia de cereales a pesar de los esfuerzos para controlar la contaminación en el campo y durante el almacenamiento (Wan, Chen y Rao, 2020). Estos datos sugieren que se presentó un efecto en los alimentos que tuvieron harina y aceite de pescado en la estimación de AF y la proporción que excedieron el LMP.

Se ha informado que el aceite de pescado es una rica fuente de EPA (ácido eicosapentaenoico), DHA (ácido docosahexaenoico) y n-3 FA (ácidos grasos omega-3) que se integra como complemento en los alimentos para perros; y la harina de pescado es un producto resultante de

la cocción, prensado, deshidratación y molienda de pescados enteros o subproductos que se utilizan como fuente alternativa de proteína (Dillon *et al.*, 2021).

En este estudio se encontró que un alto porcentaje (19.0%) de los alimentos que contenían harina y aceite de pescado presentaron concentraciones mayores de AF, lo que coincide con la idea sugerida de que el resultado podría atribuirse a que la temperatura y la humedad de almacenamiento son factores clave en la contaminación con AFB₁ (Alshawabkeh *et al.*, 2015). Por lo cual, para garantizar la calidad de estos ingredientes, debe haber un manejo adecuado en el empaque para asegurar la protección del producto contra la contaminación por AF (Shad, Ghavami y Atungulu, 2019).

Los resultados de este estudio mostraron una asociación protectora de los fungicidas contra las AF ya que se encontró un bajo porcentaje (6.5%) de los alimentos que tenían un alto contenido de AF por encima del LMP.

Por lo cual coincide con la idea sugerida de que son un método utilizado para prevenir la formación de AF ya que los fungicidas se utilizan como inhibidores de la microbiota fúngica basados en una amplia variedad de compuestos químicos como los ácidos benzoico, acético, sórbico y propiónico que inhiben el crecimiento de los hongos acidificando su contenido citoplásmico (Atungulu *et al.*, 2018).

Se presentó una asociación protectora de los secuestrantes minerales contra las AF ya que se encontró un bajo porcentaje (7.0%) de los alimentos que tenían un alto contenido de AF por encima del LMP; por lo tanto, la biodisponibilidad de AF se puede disminuir mediante el uso de compuestos que reducen su absorción gastrointestinal.

Se ha informado que los compuestos secuestrantes se utilizan ampliamente porque se unen a la AF en el tracto digestivo de los perros a través de la quimisorción β -dicarbonilo de la AF, lo que reduce su absorción intestinal. Además, los secuestrantes minerales más utilizados son algunos filosilicatos, como los aluminosilicatos hidratados de calcio y sodio, la bentonita y los tectosilicatos o zeolitas. Se ha indicado que la bentonita se administra para absorber AF a través del intercambio de cationes y grupos carbonilo, así como la interacción ion-dipolo (Di Gregorio, *et al.*, 2014); y la adsorción de la zeolita surge de la interacción del AF con el Ca²⁺ existente en su superficie (Tomašević-Čanović *et al.*, 2003).

6.3. CUANTIFICACIÓN DE ZEARALENONA

En este estudio se encontró que todos los alimentos presentaron concentraciones de ZEA. Se ha informado que las formas naturales de ZEA se pueden encontrar en los ingredientes utilizados para hacer ACS para perros. Los cereales son los ingredientes más comunes para la elaboración de ACS y pueden contener altos niveles de contaminación por ZEA, lo que los convierte en las fuentes más probables de contaminación por aflatoxinas (Rodríguez *et al.*, 2019).

6.3.1. Asociación entre el análisis bromatológico y la concentración de zearalenona

Los resultados sugieren que hubo un efecto en la concentración de ZEA en los alimentos que presentaron mayor porcentaje de grasa (>12%) y en la proporción de alimentos que excedieron el LMP; por lo cual los alimentos con >12% de grasa coincidieron con la mayor concentración de ZEA en los ACS.

La grasa es un componente importante en los ACS para perros ya que es una fuente concentrada de energía; sirve como precursor de prostaglandinas y otros eicosanoides; funciona como portador de vitaminas liposolubles y mejora la palatabilidad a los alimentos. Sin embargo, los ingredientes que aportan grasa de origen animal y vegetal pueden estar contaminados por ZEA (EFSA, 2017). Por lo cual la incorporación de los ingredientes contaminados presenta un riesgo importante para la salud de perros (Kanber, 2022).

6.3.2. Asociación entre los ingredientes y la concentración de zearalenona

Los resultados de este estudio muestran que hubo mayor contaminación por zearalenona en presencia de maíz respectivamente lo que se atribuye a que la contaminación ocurrió en varias etapas de la producción, como la floración, la cosecha, el procesamiento o el almacenamiento de cereales (Ott *et al.*, 2020).

Los cereales suelen estar integrados en los alimentos para perros, especialmente maíz, sorgo, arroz, trigo y cebada. Estos ingredientes son ampliamente utilizados como fuente de carbohidratos, fibra, proteínas, grasas, minerales y vitaminas (Macías-Montes *et al.*, 2020); asimismo se incluyen por su bajo costo y valor nutricional aceptable; además de esto, no afecta la palatabilidad y digestibilidad de los nutrientes (Tegzes *et al.*, 2019).

El maíz es una alternativa de para la alimentación de los perros. Sin embargo, se debe considerar la contaminación por ZEA en las materias primas para piensos. Por lo cual en diversos estudios informan que la fabricación de alimentos completos para perros debe tener un manejo adecuado debido a la gravedad de la contaminación por ZEA (Wu *et al.*, 2016).

Este estudio encontró que la mayoría de los alimentos que contenían maíz, presentaron contaminación de ZEA por encima del LMP. Lo que sugiere que la contaminación por ZEA puede

ser inevitable en los alimentos con presencia de cereales a pesar de los esfuerzos para controlar la contaminación en el campo y durante el almacenamiento (Wan, Chen y Rao, 2019).

También, los resultados muestran que hubo mayor contaminación por ZEA en alimentos que registraron leche y huevo en los ingredientes.

Se ha informado que la leche y los huevos se añaden a la alimentación de los perros como fuente importante de proteínas y grasas; sin embargo, ZEN y sus metabolitos pueden excretarse en la leche (Signorini *et al.*, 2012) y en el huevo (Lee *et al.*, 2016) que pueden contaminar estos ingredientes que son utilizados en la fabricación de los ACS (Molina *et al.*, 2019).

Este estudio muestra que, aunque la mayoría de los alimentos no contenían leche y huevo, hubo una diferencia significativa mayor de ZEA en los alimentos que presentaron estos ingredientes.

El estudio sugiere que la contaminación por ZEA en los alimentos para perros es debido a que ZEA es ingerida y metabolizada por animales productivos donde podrían acumularse en diferentes órganos y tejidos llegando a la cadena alimentaria a través de la carne, la leche o los huevos (Alshannaq y Yu, 2017). Por lo tanto, la contaminación representa un grave problema de salud tanto para los animales de granja, animales de compañía y para los consumidores humanos.

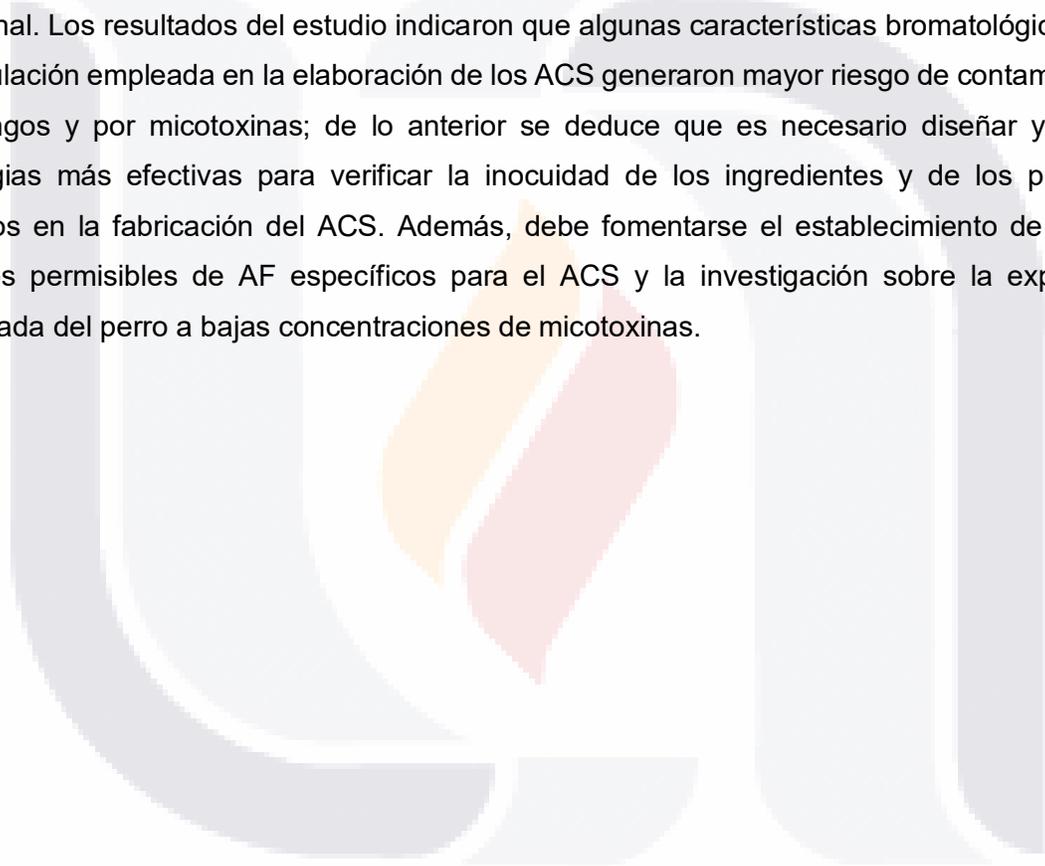
Además, en este estudio se encontró un incremento de la concentración de ZEA en alimentos que contenían aceite vegetal.

Se ha informado que el aceite vegetal en los ingredientes para la elaboración de los ACS es importante para el perro ya que son fuente de energía, tienen propiedades antiinflamatorias y contribuyen a la formación de membranas celulares y de hormonas. Sin embargo, ZEN tiene propiedad lipofílica por lo cual se puede enriquecer con aceites vegetales, lo que contribuye considerablemente a la exposición general de esta micotoxina (Koch, Mauch y Riedel, 2022).

Se ha reportado concentraciones elevadas de ZEA en aceite de maíz y aceite de soja; por lo cual, este estudio sugiere que el aceite de maíz en particular contribuyó de manera importante a la exposición de ZEA (Koch, Mauch y Riedel, 2022; Chang y *col.*, 2020).

7 CONCLUSIÓN

En el presente estudio se detectó una contaminación considerable por *Aspergillus flavus* toxigénico, así como una concentración importante de aflatoxinas en la totalidad de las muestras recolectadas en un muestreo aleatorio y representativo de alimento comercial seco para perro. Estos hallazgos sugieren que se encuentra en riesgo la salud de los perros, el desarrollo adecuado de su función zotécnica y también pudiera afectar a las ramas agroindustriales que proveen este pienso, al alterar la inocuidad del producto y deteriorar su valor económico y nutricional. Los resultados del estudio indicaron que algunas características bromatológicas y de la formulación empleada en la elaboración de los ACS generaron mayor riesgo de contaminación por hongos y por micotoxinas; de lo anterior se deduce que es necesario diseñar y aplicar estrategias más efectivas para verificar la inocuidad de los ingredientes y de los procesos utilizados en la fabricación del ACS. Además, debe fomentarse el establecimiento de niveles máximos permisibles de AF específicos para el ACS y la investigación sobre la exposición prolongada del perro a bajas concentraciones de micotoxinas.



8 GLOSARIO

Absorción: Proceso por el cual los tóxicos cruzan las membranas celulares y entran en la circulación sanguínea o sistema linfático.

Adsorción: Proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de algún material en contra posición de la absorción que es un fenómeno de volumen.

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Molécula compleja, integrante de los cromosomas, que almacena la información hereditaria en forma de variaciones en la secuencia de las bases de purina y pirimidina; esta información se traduce en la síntesis de las proteínas, por lo que es determinante de todas las características físicas y funcionales de las células y del organismo.

Aflatoxicosis: Intoxicación producida por el consumo de sustancias o alimentos contaminados con aflatoxinas.

Aflatoxinas: Micotoxinas producidas en pequeñas concentraciones por hongos del género *Aspergillus* spp., principalmente.

Agente oxidante: Agente químico que en reacciones electroquímicas gana electrones, provocando la oxidación de otro agente químico.

Aluminosilicatos: Es un material que contiene óxido de aluminio y sílice.

Bentonita: Arcilla de gran poder decolorante, de grano muy fino, del tipo de montmorillonita, que contiene bases y hierro utilizada en cerámica.

Biotransformación. Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de éstos. Conversión de un químico desde una forma a otra por un organismo biológico.

Carcinogénico. Habilidad de una sustancia para causar cáncer.

Citocromo P₄₅₀. Encontrado en la mitocondria adrenal y en los microsomas hepáticos, es una cadena de transporte de electrones en la cual el componente terminal es el citocromo P450; este sistema participa en la destoxificación de sustancias extrañas por alterarlas para aumentar su solubilidad y facilitar la excreción. El término abarca un gran número de isoenzimas que son codificadas por una superfamilia de genes. Término relacionado. monooxigenasa, oxidasas de función mixta, reacciones de fase I.

Conidio o espora: Mitosporas asexuales, que se forman a partir de una célula conidiógena o hifa fértil.

Conidióforo: Estructura de los hongos que se encarga de la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Es una estructura morfológica característica de los hongos imperfectos.

Cuerpo fructífero: Esporocarpio multicelular de los hongos basidiomicetos y ascomicetos, sobre la que se forman otras estructuras y se producen las esporas en el estado reproductivo del ciclo de vida de los hongos.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Detoxificación: Es el acto de retirar la toxina de un producto tóxico o contaminado.

Distribución. Es el proceso durante el cual una sustancia química absorbida es transferida desde su sitio de absorción a otras áreas del cuerpo.

Dosis letal media (DL₅₀). Dosis, calculada estadísticamente, de un agente químico o físico (radiación) que se espera produzca la muerte del 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay). Es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la cuantificación de la presencia de un antígeno usando una enzima enlazada a un anticuerpo para el antígeno.

Esclerocio: Masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias, capaces de sobrevivir a condiciones ambientales extremas.

Fiálide: Célula terminal de conidióforo en forma de botella, que se une por su base a la métula.

Glutación reducido (GSH). Tripéptido no proteínico; es un antioxidante cuya función es la de mantener la estabilidad de la membrana, reducir los factores de estrés oxidativo y las especies de oxígeno reactivas que se producen a partir del proceso de peroxidación de lípidos.

Hepatotóxico. Sustancia nociva para las células del hígado.

Hifa: Filamento septado o no de tamaño microscópico, que reunido con otros filamentos forma el cuerpo vegetativo de los hongos.

Hongo: Organismo eucariota que pertenece al reino fungi.

Intoxicación. Proceso patológico, con signos y síntomas clínicos, causado por una sustancia de origen exógeno o endógeno.

Isoenzimas (isoformas). Enzimas en un organismo que catalizan la misma reacción, pero difieren en estructura; estas diferencias pueden tener un rango de uno a varios residuos de aminoácidos.

Metabolismo: Suma de todos los procesos químicos y físicos que tienen lugar en un organismo; en sentido más estricto, cambios físicos y químicos que sufre una sustancia en un organismo. Incluye la incorporación y distribución en el organismo de los componentes químicos, los cambios (biotransformaciones sufridas) y la eliminación de los compuestos y de sus metabolitos. Término relacionado: biotransformación.

Metabolito: Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo. Término relacionado: biotransformación.

Métula: Célula de un conidióforo que lleva las fiálides.

Micotoxicosis: Trastornos en la salud de animales y personas producidos por la ingestión o inhalación de una o varias micotoxinas.

Micotoxina: Metabolito secundario tóxico, de composición variada, producidos por organismos del reino fungi; suele referirse a sustancias tóxicas producidas por hongos que afectan a animales vertebrados en bajas concentraciones.

Mutagénico: Cualquier sustancia que puede inducir cambios heredables (mutaciones) en el genotipo de una célula como consecuencia de alteraciones o de pérdida de genes o de cromosomas o de parte de estos. Perturba a la secuencia de bases del ADN y causa una mutación; con frecuencia son químicos, pero pueden también ser fuentes de energía tales como la luz ultravioleta.

Proteína. Una macromolécula biológica compuesta de un arreglo lineal de aminoácidos unidos por uniones peptídicas; las funciones de las proteínas en los procesos biológicos incluyen catálisis, transporte y almacenaje, movimiento, soporte mecánico, protección inmune, la generación y transmisión de impulsos nerviosos y el control del crecimiento y diferenciación.

Susceptibilidad: Condición en la que existe una disminución de la resistencia de un individuo frente a determinada enfermedad o intoxicación, y que se experimenta con dosis a exposiciones inferiores a las habitualmente nocivas para el resto de la población.

Teratogénico: Agente que por administración a la madre en periodo prenatal induce malformaciones estructurales o defectos en la descendencia.

Toxicidad: Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir este, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

9 REFERENCIAS

- AAFCO. (2007). Association of American Feed Control Officials: Official Publication. *Association of American Feed Control Officials*: Atlanta, GA, USA.
- AboDaham, T., Amra, H., Sultan, Y., Magan, N., Carlobos, A., Cumagun, C. y Yli, T. (2020). New genotypes of aflatoxigenic fungi from Egypt and the Philippines. *Current Research in Environmental and Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, 10(1), 142–155. <https://doi.org/10.5943/cream/10/1/15>.
- Alshannaq, A. y Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632.
- Akinrinmade, J. y Akinrinde, A. (2012). Aflatoxin status of some commercial dry dog foods in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 11(52), 11463–11467. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1106>.
- Alassane-Kpembi, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., François, A. A., Oswald, I. P. y Puel, O. (2013). New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(1), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.023>.
- Alonso, R., Aguirre, A. y Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68(2), 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00169-7).
- Alsayyah, A., ElMazoudy, R., Al-Namshan, M., Al-Jafary, M. y Alaqeel, N. (2019). Chronic neurodegeneration by aflatoxin B₁ depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109407>.
- Alshannaq, A. y Yu, J. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>.
- Alshawabkeh, K., Alkhalaileh, N. I., Abdelqader, A., Al-Fataftah, A. R. y Herzallah, S. M. (2015). Occurrence of aflatoxin B₁ in poultry feed and feed ingredients in Jordan using ELISA and HPLC. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 7(4), 316–20. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajejts.2015.7.4.10172>.
- Amaiike, S. y Keller, N. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 107–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>.

- Amri, E. y Lenoi, S. (2016). Aflatoxin and fumonisin contamination of sun-dried sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) chips in Kahama sun-dried sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) chips in Kahama district, Tanzania. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 4(3), 55–62. <https://doi.org/10.12691/jaem-4-3-2>.
- Aquino, S. y Corrêa, B. (2011). Aflatoxins in pet foods: A risk to special consumers. En Torres-Pacheco, I. *Aflatoxins – Detection, Measurement and Control*. Rijeka, Croatia: InTech. p. 53–74. <https://doi.org/10.5772/25171>.
- Annot, L., Duncan, N., Coetzer, H. y Botha, C. (2012). An outbreak of canine aflatoxicosis in Gauteng Province, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 83(1), 1–4. <https://doi.org/10.4102/jsava.v83i1.2>.
- Atungulu, G., Mohammadi-Shad, Z. y Wilson, S. (2018). Mycotoxin issues in pet food. En S. Ricke, G. Atungulu, C. Rainwater, y S. Park (Edits.). *Food and Feed Safety Systems and Analysis*. Academic Press. p. 25–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00002-6>.
- Bagwan, N. (2011). Aflatoxin B₁ contamination in papaya fruits (*Carica papaya* L.) during post-harvest pathogenesis. *Indian Phytopathology*, 64(1), 48–50.
- Barnett, H. L. y Hunter, B. B. (1998). Illustrated general of imperfect fungi. En *The American Phytopathological Society*. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. p. 218.
- Basalan, M., Hismiogullari, S., Hismiogullari, A. y Filazi, A. (2004). Fungi and aflatoxin B₁ in horse and dog feeds in Western Turkey. *Journal of Veterinary Medicine*, 156(5), 248–252.
- Bastianello, S., Nesbit, J., Williams, M. y Lange, A. (1987). Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54(4), 635–640.
- Beloshapka, A., Buff, P., Fahey Jr, G. y Swanson, K. (2016). Compositional analysis of whole grains, processed grains, grain co-products, and other carbohydrate sources with applicability to pet animal nutrition. *Foods*, 5(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods5020023>.
- Bennett, J. W. y Arnold, J. (2001). Genomics for fungi. En. Howard, R. y Gow, N. *The mycota*. Springer-Verlag. Berlin y New York. p. 267–297.
- Bennett, J. W. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>.
- Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. y Payne, G. A. (2000). Encyclopedia of food microbiology. London: Academic press. p. 72–79.

- Bhatnagar, D., Yu, J. y Ehrlich, K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chemical immunology*, 81(1), 167–206.
- Bingham, A., Huebner, H., Phillips, T. y Bauer, J. (2004). Identification and reduction of urinary aflatoxin metabolites in dogs. *Food and Chemical Toxicology*, 42(11), 1851–1858. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.06.016>.
- Błajet-Kosicka, A., Kosicki, R., Twarużek, M. y Grajewski, J. (2014). Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Additives y Contaminants: Part B Surveill*, 7(4), 302–308. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.933269>.
- Bradshaw, J. W. (2006). The evolutionary basis for the feeding behavior of domestic dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*). *The Journal of Nutrition*, 136(7), 1927S–1931S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.7.1927S>.
- Bruchim, Y., Segev, G., Sela, U., Bdolah-Abram, T., Salomon, A. y Aroch, I. (2012). Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.024>.
- Bueno, D., Silva, J. y Oliver, G. (2001). Mycoflora in commercial pet foods. *Journal of Food Protection*, 64(5), 741–743. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.5.741>.
- Buffington, C., Holloway, C. y Abood, S. (2004). Normal dogs. En C. Buffington, C. Holloway, y S. Abood. *Manual of Veterinary Dietetics*. St Louis, Misuri: Saunders. p. 9–11.
- Campos, S., Keller, L., Cavaglieri, L., Krüger, C., Fernández Juri, M., Dalcero, A., *et al.* (2009). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin B₁ in commercial pet food in Brazil. *World Mycotoxin Journal*, 2(1), 85–90. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1020>.
- Carter, B. y Fontana, A. (2008). Water activity: the key to pet food quality and safety. *White Paper, Pet Food Industry*.
- Case, L., Carey, D., Hirakawa, D. y Daristotle, L. (2011). Feeding Management Throughout the Life Cycle. En L. Case, D. Carey, D. Hirakawa, y L. Daristotle, *Canine and Feline Nutrition*. Saint Louis: Mosby. p.191–294. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-39175-8>.
- Case, L., Daristotle, L., Hayek, M. y Raasch, M. (2011). Basics of Nutrition. En L. Case, L. Daristotle, M. Hayek, y M. Raasch, *Canine and Feline Nutrition*. Saint Louis: Mosby. p.3–53. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-39175-8>.
- Case, L., Daristotle, L., Hayek, M. y Raasch, M. (2011). History and regulation of pet food. En L. Case, L. Daristotle, M. Hayek, y M. Raasch, *Canine and Feline Nutrition*. Saint Louis: Mosby. p.121–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06619-8.10014-3>.

- Case, L., Daristotle, L., Hayek, M. y Raasch, M. (2011). Types of pet foods. En L. Case, L. Daristotle, M. Hayek, y M. Raasch, *Canine and Feline Nutrition*. Saint Louis: Mosby. p.163–176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06619-8.10017-9>.
- Castaldo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Izzo, L., Tolosa, J., Rodríguez, Y. y Ritieni, A. (2019). Target analysis and retrospective screening of multiple mycotoxins in pet food using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Toxins*, 11(8), 434. <https://doi.org/10.3390/toxins11080434>.
- Catteuw, A., Broekaert, N., De Baere, S., Lauwers, M., Gasthuys, E., Huybrechts, B., *et al.* (2019). Insights into in vivo absolute oral bioavailability, biotransformation, and toxicokinetics of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalenone-14-glucoside, and zearalenone-14-sulfate in pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(12), 3448–3458.
- Cavus, S. y Fatih, T. (2018). Determination of mold contamination and aflatoxin levels of the meat products/ingredients collected from Turkey market. *Journal of Food Safety*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/jfs.12494>.
- Chang, X., Liu, H., Sun, J., Wang, J., Zhao, C., *et al.* (2020). Zearalenone removal from corn oil by an enzymatic strategy. *Toxins*, 12(2), 117. <https://doi.org/10.3390/toxins12020117>.
- Chiewchan, N., Mujumdar, A. y Devahastin, S. (2015). Application of drying technology to control aflatoxins in foods and feeds: A Review. *Drying Technology: An International Journal*, 33(14), 1700–1707. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1068795>.
- Cleveland T.E., Carter-Wientjes C.H., De Lucca A.J. y Boué S.M. (2009). Effect of Soybean Volatile Compounds on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production. *Journal Food of Science*, 74(2), 83–87. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01078.x>.
- CONAFAB (2021). Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal. *Producción Pecuaria y Alimento Balanceado en México*. México. ULR: <https://www.conafab.org/informativos/anuario-estadistico>.
- Copetti, M., Santurio, J., Cavalheiro, A., Alves, S. y Ferreiro, L. (2009). Comparison of different culture media for mycological evaluation of commercial pet food. *Acta Scientiae Veterinariae.*, 37(4) 329–335. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16392>.
- Coppock, R. W., Christian, R. G. y Jacobsen, B. J. (2018). Aflatoxins. En Gupta, R. *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. Hopkinsville, Kentucky. USA: Elsevier Inc. p. 983–994. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6>.
- Crane, S. W., Griffin, R. y Messent, P. (2000). Introduction to commercial pet foods. En M. Hand, C. Thatcher, R. Remillard, P. Roudebush, y L. Lewis. *Small Animal Clinical Nutrition*. Topeca, KS: Mark Morris Inst. p.111–126.

- Deffenbaugh, L. (2007). Optimizing pet food, aquatic and livestock feed quality. En M. Riaz. *Extruders and Expanders in Pet Food Aquatic Andlivestock Feeds*. Germany: Agrimedia GmbH Clence. p. 327–342.
- Delaney, S. y Fascetti, A. (2012). Feeding the healthy dog and cat. En S. Delaney, y A. Fascetti. *Applied Veterinary Clinical Nutrition*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. p.82–83.
- Dereszynski, D., Center, S., Randolph, J., Brooks, M., Hadden, A., Palyada, *et al.* (2008). Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(9), 1329–1337. <https://doi.org/10.2460/javma.232.9.1329>.
- Di Gregorio, M., de Neeff, D., Jager, A., Corassin, C., de Pinho, A., de Albuquerque, *et al.* (2014). Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Reviews*, 33(3), 125–135. <https://doi.org/10.3109/15569543.2014.905604>.
- Diener, U. L., Cole, R. J., Sanders, T. H., Payne, G. A., Lee, L. S. y Klich, M. A. (1987). Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1) 249–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.001341>.
- Dillon, G., Cardinal, C., Keegan, J., Yiannikouris, A., Brandl, W. y Moran, C. (2021). The analysis of docosahexaenoic acid (DHA) in dried dog food enriched with an aurantiochytrium limacinum biomass: Matrix extension validation and verification of AOAC method 996.06. *Journal of AOAC International*, 104(1), 68–77. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa097>.
- Drusch, S. y Ragab, W. (2003). Mycotoxins in fruits, fruit Juices, and dried fruits. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1514–1527. <https://doi.org/10.4315 / 0362-028X-66.8.1514>.
- Ehrlich, K. y Cotty, P. J. (2004). An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 473–478. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1670-y>.
- Ensley, S. y Radke, S. (2019). Diseases of swine. En J. Zimmerman, L. Karriker, A. Ramirez, K. Schwartz, S. G.W, y J. Zhang. *Mycotoxins in Grains and Feeds*. p.1055–1071. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch69>.
- Erwig, L. y Gow, N. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology Nature Research*, 14(3) 163–176. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.21>.
- Espinoza, P., López, R. y Lozano, S. (2018). Muestreo de bola de nieve. En Espinoza. P., López, R., Lozano, S. *Técnicas de muestreo*. México: UNAM:(2–4). <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-cesar-vallejo/sistemica/pdf-proyectofinal-bola-de-nieve-compress/28006947>.

- European Commission. (2016). Commission Recommendation (EU) 2016/1319 of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food. *Official Journal of the European Union*, 208, 58–60.
- FAO (2003). Food and Agriculture Organization. Worldwide Regulations for mycotoxins in food and feed. FAO Food Nutr paper 81 2003:59. <https://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>.
- Fisher, M. y Henk, D. (2012). Sex, drugs and recombination: the wildlife of *Aspergillus*. *Molecular Ecology*, 21(6), 1305–1306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05506.x>.
- Fuentes, S., Carvajal, M., Ruiz, S., Martínez, N., Gómez, A. y Rojo, F. (2018). Presence of mutagens and carcinogens, called aflatoxins, and their hydroxylated metabolites in industrialized food for dogs. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 10(3), 76–86. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000399>.
- Gajęcka, M., Zielonka, Ł. y Gajęcki, M. (2015). The effect of low monotonic doses of zearalenone on selected reproductive tissues in pre-pubertal female dogs—A review. *Molecules*, 20(11), 20669–20687. <https://doi.org/10.3390/molecules201119726>.
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G. y Perrone, G. (2015). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026>.
- Galtier, P. (1999). Biotransformation and Fate of Mycotoxins. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 18(3-4), 295–312. <https://doi.org/10.3109/15569549909009259>.
- Gazzotti, T., Biagi, G., Pagliuca, G., Pinna, C., Scardilli, M., Grandi, M. y Zaghini, G. (2015). Occurrence of mycotoxins in extruded commercial dog food. *Animal Feed Science and Technology*, 202, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.02.004>.
- Girio, T., Filho, A., Junior, O., Amaral, L. y Girio, R. (2012). Microbiological quality of dog feed sold in sealed packages and in bulk. *Ars Veterinaria Jaboticabal, SP*, 28(1), 36–40.
- Granados, F., Redondo, M. y Jaikel, D. (2018). Mycotoxin contamination of beverages obtained from Tropical Crops. *Beverages*, 4(4), 83. <https://doi.org/10.3390/beverages4040083>.
- Gross, K., Debraekeleer, J. y Zicker, S. (2000). Normal dogs. En M. Hand, C. Thatcher, R. Remillard, y P. Roudebush. *Small Animal Clinical Nutrition*. Marceline: Walsworth Publishing. 247–250.
- Gunsen, U. y Yaroglu, T. (2002). Aflatoxin in dog and horse feeds in Turkey. *Veterinary and Human Toxicology*, 44(2), 113–114.

- Hacıbekiroğlu, I. y Kolak, U. (2013). Aflatoxins in various food from Istanbul, Turkey. *Food Additives y Contaminants: Part B: Surveillance*, 6(4), 260–264. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.813080>.
- Hagiwara, M., Kogika, M. y Malucelli, B. (1990). Disseminated intravascular coagulation in dog; with aflitoxicosis. *Journal of Small Animal Practice*, 31(5), 239–243. <https://doi.org/10.1111/j.1748-58271990.tb00793x>.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A., Warn, P., Bowyer, P. y Denning, D. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(6), 1677–1692. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007641-0>.
- Hendriks, W. y Sritharan, K. (2002). Apparent ileal and fecal digestibility of dietary protein is different in dogs. *American Society for Nutritional Sciences. Journal of Nutrition*, 132(6), 1692S–1694S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1692s>.
- Hernández, E., Valdivia, A., Cruz, C., Saldaña, M., Quezada, T., Rangel, E. y Ortiz, R. (2020). Diagnosis of subclinical aflatoxicosis by biochemical changes in dairy cows under field conditions. *Pakistan Veterinary Journal*, 41(1) 33–38. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2020.075>.
- Herrera, M., Bervis, N., Carramiñana, J., Juan, T., Herrera, A., Ariño, A. y Lorán, S. (2019). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins and deoxynivalenol in cereal-based baby foods for infants. *Toxins*, 11(3)150. <https://doi.org/10.3390/toxins11030150>.
- Hoffman, C. y Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4).
- Hołda, K., Wiczuk, W., Hać-szymańczuk, E. y Głogowski, R. (2017). Comprehensive microbiological evaluation of dry foods for growing dogs marketed in Poland. *Animal Science*, 56(1), 81–89. <https://doi.org/10.22630/AAS.2017.56.1.10>.
- IARC. (1993). International Agency for Research on Cancer. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisins B₁ and B₂ and fusarin C. En *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyo: International agency for research on cancer. p.445–466.
- INEGI (2017). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico y geográfico de Aguascalientes. INEGI, Aguascalientes, 2017. https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825092078.pdf.

- INEGI. (2021). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Encuesta nacional de bienestar autorreportado. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), Dirección general adjunta de encuestas sociodemográficas, Aguascalientes. <https://www.inegi.org.mx/programas/enbiare/2021/>.
- Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Haesaert, G., Donoso, S., Tiisekwa, B. y De Meulenaer, B. (2015). Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agro-ecological zones of Tanzania. *Food Control*, 54, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.002>.
- Klich, M. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant Pathology*, 8(6), 713–722. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2007.00436.X>.
- Koch, M., Mauch, T. y Riedel, J. (2022). Development of a hydrazine-based solid-phase extraction and clean-Up method for highly selective quantification of zearalenone in edible vegetable oils by HPLC-FLD. *Toxins*, 14(8), 549. <https://doi.org/10.3390/toxins14080549>.
- Kószegi, T. y Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, 8(4) 111. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>.
- Lankhorst, C., Tran, Q., Havenaar, R., Hendriks, W. y Van der Poel, A. (2007). The effect of extrusion on the nutritional value of canine diets as assessed by in vitro indicators. *Animal Feed Science and Technology*, 138 (3–4)285–297. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.11.015>.
- Lee, M., Seo, D. J., Jeon, S. B., Ok, H. E., Jung, H., Choi, C. y Chun, H. S. (2016). Detection of foodborne pathogens and mycotoxins in eggs and chicken feeds from farms to retail markets. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(4), 463–468. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.463>.
- LeGrand-Defretin, V. y Munday, H. (1995). Feeding dogs and cats for life. En I. Burger. *The Waltham Book of Companion Animal Nutrition*. Tarrytown, NY: Elsevier. p.63–64.
- Lepine, A. (1997). Nutritional considerations affecting canine reproduction. En Proceedings. *Canine Reproductive Health*. North American Veterinary Conference. p. 23–27.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G. y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10–18. <http://www.medigraphic.com/rid>.
- Lyagin, I. y Efremenko, E. (2019). Enzymes for detoxification of various mycotoxins: Origins and mechanisms of catalytic action. *Molecules*, 24(13), 2362. <https://doi.org/10.3390/molecules24132362>.

- Macías-Montes, A., Rial-Berriel, C., Acosta-Dacal, A., Henríquez-Hernández, L. A., Almeida-González, M., Rodríguez-Hernández, *et al.* (2020). Risk assessment of the exposure to mycotoxins in dogs and cats through the consumption of commercial dry food. *Science of The Total Environment*, 708 (2020), 134592. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134592>.
- Maia, P. y Pereira Bastos de Siqueira, M. (2002). Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods. *Food Additives & Contaminants*, 19(12), 1180–1183. <https://doi.org/10.1080/0265203021000011214>.
- Martins, M. L., Martins, H. y Bernardo, F. (2003). Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias*, 98(548), 179–183.
- Mehrzad, J., Fazel, F., Pouyamehr, N., Saman, H. y Hesam, D. (2019). Naturally occurring level of aflatoxin B₁ injures human, canine and bovine leukocytes through ATP depletion and caspase activation. *International Journal of Toxicology*, 39(1), 30–38. <https://doi.org/10.1177/1091581819892613>.
- Mirabito, P., Adams, T. y Timberlake, W. E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell*, 57(2), 859–868. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90800-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90800-3).
- Molina, A., Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Leiva, A. y Granados-Chinchilla, F. (2019). Mycotoxins at the start of the food chain in Costa Rica: Analysis of six *Fusarium* toxins and Ochratoxin A between 2013 and 2017 in animal feed and Aflatoxin M₁ in dairy products. *Toxins*, 11(6), 312. <https://doi.org/10.3390/toxins11060312>.
- Munitz, M., Resnik, S., Pacin, A., Salas, P., Gonzalez, H., Montti., *et al.* (2014). Mycotoxigenic potential of fungi isolated from freshly harvested Argentinean blueberries. *Mycotoxin Research*, 30(4), 221–229. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0206-2>.
- Muñoz, D., Rodríguez, R., Mota, J. y Suarez, L. (2015). Isolation and identification of phylamentous fungi in feed for domestic pets (dogs and cats). *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia*, 25(6) 432–438.
- Murray, S., Flickinger, E., Patil, A., Merchen, N., Brent, J. y Fahey, G. (2001). In vitro fermentation characteristics of native and processed cereal grains and potato starch using ileal chyme from dogs. *Journal of Animal Science*, 79(2), 435–444. <https://doi.org/10.2527 / 2001.792435x>.

- Nazir, A., Kalim, I., Sajjad, M., Usman, M. y Iqbal, M. (2019). Prevalence of aflatoxin contamination in pulses and spices in different regions of Punjab. *Chemistry International*, 5(4), 274–280. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3339415>.
- Newman, J., Smith, J., Stenske, K., Newman, L., Dunlap, J., Imerman, P. y Kirk, C. (2007). Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(2), 168–175. <https://doi.org/10.1177/104063870701900205>.
- NRC. (2006). Nutrient requirements of dogs and cats. Washington: National Academies Press.
- Ott, L., Appleton, H., Shi, H. K., y Mellata, M. (2020). High voltage atmospheric cold plasma treatment inactivates *Aspergillus flavus* spores and deoxynivalenol toxin. *Food Microbiology*, 95 (2021) 103669. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103669>.
- Payros, D., Alassane-Kpembé, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P. y Oswald, I. P. (2016). Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*, 90(12), 2931–2957. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1826-4>.
- Peterson, D. (2001). Oat antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 33(2), 115–129. <https://doi.org/10.1006/jcres.2000.0349>.
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V. y Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply Chain: A focus on cereal byproducts. *Toxins (Basel)*, 8(2), 45. <https://doi.org/10.3390/toxins8020045>.
- Pitt, J.I. (2014). Mycotoxins: Deoxynivalenol and Other Trichothecenes A. In *Encyclopedia of Food Safety*. Academic press: Waltham, MA, USA. p. 295–298. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00193-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00193-1).
- Pour, S., Mahmoudi, S., Masoumi, S., Rezaie, S., Barac, A., Ranjbaran., et al. (2020). Aflatoxin M₁ contamination level in Iranian milk and dairy products: A systematic review and meta-analysis. *World Mycotoxin Journal*, 13(1), 67–82. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2485>.
- Prins, M., Schellens, C., van Leeuwen, M., Rothuizen, J. y Teske, E. (2010). Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *The Veterinary Journal*, 185(2), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.05.009>.
- PROFECO (2016). Procuraduría Federal del Consumidor. *Alimento para Perros*. (467), 41-57.
- Rauber, R., Dilkin, P., Giacomini, L., de Almeida, C. y Mallmann, C. (2007). Performance of Turkey poults fed different doses of aflatoxins in the diet. *Poultry Science*, 86(8), 1620–1624. <https://doi.org/10.1093/ps/86.8.1620>.

- Rawal, S., Kim, J. y Coulombe, R. (2010). Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.011>.
- Reis-Gomes, A., Marcolongo-Pereira, C., Sallis, E., Pereira, D., Schild, A., Faria, R. y Meireles, M. (2014). Aflatoxicosis in dogs in Southern Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(2) 162–166. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000200011>.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. y Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101–2105.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P. y Garon, D. (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12), 2420–2425. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.018>.
- Richardson, D. (1999). Developmental orthopedics: Nutritional influences in the dog. En S. Ettinger, y E. Feldman. *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: Saunders. p. 252–258.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Gordillo, R., Andrade, M. J. y Córdoba, J. J. (2007). Desarrollo de métodos de PCR en tiempo real para la cuantificación de mohos productores de aflatoxinas, ocratoxina A y patulina en productos cárnicos. *Higiene y Seguridad Alimentaria*, (1), 89–95.
- Rojas, M., González, I., De la Cruz, S., Hernández, P., García, T. y Martín, R. (2011). Application of species-specific polymerase chain reaction assays to verify the labeling of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*) and ostrich (*Struthio camelus*) in pet foods. *Animal Feed Science Technology*, 169(1–2), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.05.006>.
- Saito, M. y Machida, S. (1999). A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, 40(2), 205–208. <https://doi.org/10.1007/BF02464300>.
- Santibáñez, R., Hernández, M., Montañez, O. D., Tapia, J. M., Martínez, J. A. y Avellaneda, J. H. (2011). Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimento para bovino. *Ciencia y Tecnología*, 4(1), 19–23. <https://doi.org/10.18779/cyt.v4i1.52>.
- Schleicher, M., Cash, S. B. y Freeman, L. M. (2019). Determinants of pet food purchasing decisions. *The Canadian Veterinary Journal*, 60(6), 644–650.
- Schwartz, H. E., Hametner, C., Slavik, V., Greitbauer, O., Bichl, G., Kunz-Vekiru, E., Schatzmayr, D. y Berthiller, F. (2013). Characterization of three deoxynivalenol sulfonates formed by

reaction of deoxynivalenol with sulfur reagents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), 8941–8948. <https://doi.org/10.1021/jf403438b>.

Scott, P. (1995). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry. *Natural Toxins*, 49, 1–30.

Scudamore, K. (2005). Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 22(1), 17–25. <https://doi.org/10.1080/02652030500309392>.

Segura-Correa JC y Honhold N. (2000). Métodos de muestreo para la producción y salud animal. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. https://www.researchgate.net/publication/273945817_METODOS_DE_MUESTREO_PARA_LA_PRODUCCION_Y_LA_SALUD_ANIMAL.

Shad, Z., Ghavami, M. y Atungulu, G. G. (2019). Occurrence of aflatoxin in dairy cow feed ingredients and total mixed ration. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 35(5), 679–686. <https://doi.org/10.13031/aea.13454>.

Shao, M., Li, L., Gu, Z., Yao, M., Xu, D., Fan., *et al.* (2018). Mycotoxins in commercial dry pet food in China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(4), 237–245. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1475425>.

Sharma, M. y Marquez, C. (2001). Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science Technology*, 93(1–2), 109–114. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00274-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00274-7).

Signorini, M., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C., deBasilico, M., Basilico, J. y Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.036>.

Singh, S. D. y Chuturgoon, A. A. (2017). A comparative analysis of mycotoxin contamination of supermarket and premium brand pelleted dog food in Durban, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88(1)1–6. <https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1488>.

Singh, S., Gamlath, S. y Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(8), 916–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01309.x>.

Smith, L. E., Prendergast, A. J., Turner, P. C., Humphrey, J. H. y Stoltzfus, R. J. (2017). Aflatoxin exposure during pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(4), 770–776. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0730>.

- Soriano, J. M. y Burdaspal, P. (2007). Aflatoxinas del grupo B y G. En *Micotoxinas en Alimentos*. Díaz de Santos, España: C. J. Soriano. p.99–117.
- Stenske, K., Smith, J., Newman, S., Newman, L. y Kirk, C. (2006). Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(11), 1686–1691. <https://doi.org/10.2460/javma.228.11.1686>.
- Stoev, S. D., Paskalev, M., MacDonald, S. y Mantle, P. G. (2002). Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53(6), 481–487.
- Svihus, B., Uhlen, A. y Harstad, O. (2005). Effect of starch granule structure associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 122(3–4), 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.025>.
- Tatay, E., Meca, G., Font, G. y Ruiz, R. M. (2014). Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolization in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*, 28(1) 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.025>.
- Tegzes, J., Oakley, B. y Brennan, G. (2019). Comparison of mycotoxin concentrations in grain versus grain-free dry and wet commercial. *Toxicology Communications*, 3(1), 61–66. <https://doi.org/10.1080/24734306.2019.1648636>.
- Teixeira, E., Frehse, M., Freire, R., Ono, M., Bordini, J., Hirozawa, M. y Ono, E. (2017). Safety of low and high-cost dry feed intended for dogs in Brazil concerning fumonisins, zearalenone and aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 10(3) 273–283. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2166>.
- Tessari, E. N., Kobashigawa, E., Cardoso, A. L. y Ledoux, D. R. (2010). Effects of Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ on Blood Biochemical. *Toxins*, 2(4), 453–460. <https://doi.org/10.3390/toxins2040453>.
- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G., Matijašević, S. y Đuričić, M. (2003). Surfactant modified zeolites–new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous*, 61(1–3)173–180. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(03\)00365-2](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(03)00365-2).
- Towner, R. A., Qian, S. Y., Kadiiska, M. B. y Mason, R. P. (2003). In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(10), 1330–1340. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.002>.
- Tulayakul, P., Sakuda, S., Dong, K. y Kumagai, S. (2005). Comparative activities of glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B₁ in livers of experimental and farm animals. *Toxicon*, 46(2) 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.023>.

- Uribe-Yunda, D. y Navas, M. (2012). Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B₁. *Revista Ciencias de la Salud*, 10(3), 403–419.
- Varga, J., Frisvad, J. y Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69(1), 57–80. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05>.
- Videmann, B., Mazallon, M., Tep, J. y Lecoeur, S. (2008). Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(10), 3279–3286.
- Wada, H., Usui, M. y Sakuragawa, N. (2008). Hemostatic abnormalities and liver diseases. En E. J. Favalaro. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. New York: USA. p.772–778. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1145259>. ISSN 0094-6176.
- Wan, J., Chen, B. y Rao, J. (2020). Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 928–953. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12546>.
- Wannemacher, R. W., Bunner D. L. y Neufeld H. A. (1991). Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals. En Smith J. E. y Henderson R. S. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 500.
- Wen, J., Mu, P. y Deng, Y. (2016). Mycotoxins: cytotoxicity and biotransformation in animal cells. *Toxicology Research*, 5(2), 377–387. <https://doi.org/10.1039/c5tx00293a>.
- Wilson, D. M., y Payne, G. A. (1994). Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. En D. L. Eaton, y J. Groopman, *The Toxicology of Aflatoxins: Human health, Veterinary and Agricultural Significance*. San Diego, California. p.309–325.
- Witaszak, N., Stępień, Ł., Bocianowski, J. y Wąskiewicz, A. (2019). *Fusarium* species and mycotoxins contaminating veterinary diets for dogs and cats. *Microorganisms*, 7(1), 26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010026>.
- Witaszak, N., Wąskiewicz, A. y Bocianowski, J. (2020). Contamination of pet food with mycobiota and *Fusarium* mycotoxins mycotoxins–focus on dogs and cats. *Toxins*, 12(2), 130. <https://doi.org/10.3390/toxins12020130>.
- Wortinger, A. y Burns, K. (2015). Nutrition and Disease Management for Veterinary Technicians and Nurses (2 ed.). Oxfordshire: Blackwell Publishing.

- Wu, J., Xu, W., Zhang, C., Chang, Q., Tang, X., Li, K. y Deng, Y. (2013). Trp266 determines the binding specificity of a porcine aflatoxin B₁ aldehyde reductase for aflatoxin B₁-dialdehyde. *Biochemical Pharmacology*, 86(9), 1357–1365. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.014>.
- Wu, L., Li, J., Li, Y., Li, T., He, Q., Tang, Y., *et al.* (2016). Aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from different province in China. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(63), 2–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0122-8>.
- Wu, M.-Y., Mead, M., Kim, S.-C., Rokas, A. y Yu, J.-H. (2017). WetA bridges cellular and chemical development in *Aspergillus flavus*. *Plos One*, 12(6), e0179571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179571>.
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V. y Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/03602530802563850>.
- Xu, L., Zhang, Z., Zhang, Q., Zhang, W., Yu, L. W., Li, H. y Li, P. (2018). An On-Site Simultaneous Semi-Quantification of Aflatoxin B₁, Zearalenone, and T-2 Toxin in Maize- and Cereal-Based Feed via Multicolor Immunochromatographic Assay. *Toxins*, 10(2), 87. <https://doi.org/10.3390/toxins10020087>.
- Yathavamoorthi, R., Nithin, C., Ananthanarayananana, T., Suseela, M., J, B., Anandana, R. y Gopal, T. (2020). Tuna red meat as a novel ingredient in pet food for dogs. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29(8), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1799468>.
- Yazar, S. y Omurtag, G. Z. (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(11), 2062–2090. <https://doi.org/10.3390/ijms9112062>.
- Yiannikouris, A. y Jouany, J. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Animal Research*, 51(2), 81–99. <https://doi.org/10.1051/animres:2002012>.
- Yu, J., Nierman, W. C., Fedorova, N. D., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. y Bennett, J. W. (2011). What can the *Aspergillus flavus* genome offer to mycotoxin research? *Mycology*, 2(3), 218–236. <https://doi.org/10.1080/21501203.2011.605180>.
- Zicker, S. (2008). Evaluating pet foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food? *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(3), 121–126. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.04.003>.

Zöngür, A. (2020). Investigation of DON and aflatoxin content in agria and hermes chips potato cultivars grown in Aksaray, Sivas, Kayseri, Niğde. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(1), 521–527. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00334-w>.

Zuluaga, C., Buriticá, P. y Martín-Montoya, M. (2008). Generalidades de las uredinales (*Fungi: Basidiomycota*) y de sus relaciones filogenéticas. *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 41–56.



10 ANEXOS

10.1. ANEXO A. ARTÍCULO NÚMERO UNO PRUBLICADO..... 97

10.2. ANEXO B. ARTÍCULO NÚMERO DOS ENVÍADO..... 111

10.3. ANEXO C. TÉCNICA DE VACIADO EN PLACA POR DILUCIÓN..... 140

10.4. ANEXO D. IDENTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA MORFOLÓGICA MEDIANTE LA PREPARACIÓN DE TINCIÓN AZUL DE ALGODÓN CON LACTOFENOL 141

10.5. ANEXO E. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES POR LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA..... 141

10.6. ANEXO F. DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO DE VAPORES DE AMONIO 143

10.7. ANEXO G. DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA..... 144

10.8. ANEXO H. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA 144

10.9. ANEXO I. ANÁLISIS MOLECULAR PARA *ASPERGILLUS FLAVUS*..... 145

10.10. ANEXO J. CUANTIFICACIÓN DE ZEARALENONA, FUMONISINA, OCRATOXINA Y DEOXINIVALENOL POR LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA 148

10.1. ANEXO A. ARTÍCULO NÚMERO UNO PUBLICADO



Review

Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review

Lizbeth Martinez-Martinez ¹, Arturo G. Valdivia-Flores ^{1,*}, Alma Lilian Guerrero-Barrera ², Teóduło Quezada-Tristán ¹, Erika Janet Rangel-Muñoz ¹ and Raúl Ortiz-Martinez ¹

- ¹ Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20130, Mexico; lizbeth.martinez@edu.uaa.mx (L.M.-M.); teodulo.quezada@edu.uaa.mx (T.Q.-T.); janet.rangel@edu.uaa.mx (E.J.R.-M.); raul.ortiz@edu.uaa.mx (R.O.-M.)
- ² Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20130, Mexico; alguerre@correo.uaa.mx
- * Correspondence: avaldiv@correo.uaa.mx; Tel: +52-449-910-8101

Abstract: Since its first patent (1897), commercial dry feed (CDF) for dogs has diversified its formulation to meet the nutritional needs of different breeds, age, or special conditions and establish a foundation for integration of these pets into urban lifestyles. The risk of aflatoxicosis in dogs has increased because the ingredients used to formulate CDF have also proliferated, making it difficult to ensure the quality required of each to achieve the safety of the entire CDF. This review contains a description of the fungi and aflatoxins detected in CDF and the ingredients commonly used for their formulation. The mechanisms of action and pathogenic effects of aflatoxins are outlined; as well as the clinical findings, and macroscopic and microscopic lesions found in aflatoxicosis in dogs. In addition, alternatives for diagnosis, treatment, and control of aflatoxins (AF) in CDF are analyzed, such as biomarkers of effect, improvement of blood coagulation, rate of elimination of AF, control of secondary infection, protection of gastric mucosa, reduction of oxidative stress, use of chemo-protectors, sequestrants, grain-free CDF, biocontrol, and maximum permitted limits, are also included.

Keywords: *Aspergillus flavus*; aflatoxicosis; biomarkers; blood coagulation; hepatic diseases

Key Contribution: This review study highlights the extensive presence of *Aspergillus flavus* and its aflatoxins (AF) in commercial dry food (CDF) for dogs; unfortunately, information on mycotoxins in dogs is scarce and scattered. Various agro-industrial by-products used as ingredients of CDF show high levels of AF, which reveals the exposure of dogs to AF in their diet, causing clinically observable damage from low doses (60 µg/kg). Treatment and control strategies for contamination due to AF in CDF are also outlined. Therefore, this study serves as the foundation for the knowledge of the risk that dogs integrated into urban life have, in which the CDF contaminated by AF is ingested until all the feed contained within each bag is finished, suggesting an urgent need for quality control mechanisms.



Citation: Martínez-Martínez, L.; Valdivia-Flores, A.G.; Guerrero-Barrera, A.L.; Quezada-Tristán, T.; Rangel-Muñoz, E.J.; Ortiz-Martínez, R. Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review. *Toxins* 2021, 13, 65. <https://doi.org/10.3390/toxins13010065>

Received: 16 December 2020
Accepted: 12 January 2021
Published: 15 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Commercial dry feed (CDF) for dogs was first patented in 1860 by James Spratt, but it was not until 1957 that it started to be sold commercially. The diversity in the CDF formula increases due to the rise in the knowledge of the nutritional needs of dogs depending on their breeds, ages, and activities carried out. Another aspect that drives the supply of CDF is the increasing availability of agro-industrial ingredients of diverse bromatological composition, which guides the diversification of suitable feed formulas for dogs with differences in their digestive needs, nutrient profiles, and metabolism [1]. Another aspect that drives the demand for CDF is the integration of the dog into the urban lifestyle, as

well as the strengthening of the human–pet bond in which dog owners give equal priority to the healthy diet of their pets as well as their own [2].

The CDF offer includes dry derivatives of all types of meat and guts from chicken, beef, pork, and other species; quail, pheasant, and ostrich meat are even incorporated in the making of these feeds [3]. CDF also adds various cereals, such as corn, rice, wheat, barley, and sorghum due to their low cost and acceptable nutritional value; besides this, it does not affect the palatability and digestibility of the nutrients, although the quality and safety of cereals is sometimes objectionable [4]. These ingredients are widely used as a source of energy, as well as a supply of some vitamins, minerals, fibers, and fats [5]. In addition, protein ingredients from soybeans and soybean paste are incorporated as well as some high-fiber ingredients such as alfalfa and oatmeal [6].

Products may be contaminated with *Aspergillus* spp. fungus, aflatoxins (AF), or some of their secondary metabolites as well as other mycotoxins; contamination occurs at various stages of ingredient production, such as flowering, harvest, processing, or storage of cereals as well as metabolic residues in meat, dairy, and egg products [7–9]. *Aspergillus* species are mainly found in tropical and subtropical regions around the world. However, due to the global import of food materials and climate change, it is likely that soon also regions with temperate climates (such as Europe) will be as affected as developing countries [10].

As presented later in this review, contamination by *Aspergillus* spp. or its metabolites is an important factor because it reduces the nutritional value of the substrate and produces a great variety of toxic effects; consequently, regulations have been established throughout the world on the maximum permissible levels of aflatoxins in food and feed. Reports of outbreaks of clinical forms of aflatoxicosis in dogs are scarce, but their geographic distribution is very diverse: North America, Latin America, Asia, and Africa. This coincides with a worldwide distribution of aflatoxigenic fungi and their aflatoxins in both complete dog feed and ingredients [11]. Therefore, this work aims to review the presence of aflatoxigenic fungi and their metabolites in commercial dry feed for dogs. The mechanisms of action of AF and its repercussions on animal health are examined. Viable alternatives for the diagnosis and therapy of aflatoxicosis are analyzed; in addition, the control of CDF contamination by aflatoxins is highlighted.

2. Methods

This review was carried out by establishing a research objective, search strategies and relevant research articles; a selection of articles, data extraction, data mapping and summary of results were carried out [12]. The literature for this review was identified by searching online databases (Google scholar, PubMed, and Web of Science). Scientific publications were searched from 2000 to 2020. The search terms were ‘aflatoxin’, ‘dog’, ‘food or feed’, and ‘flavus’. All relevant scientific publications were included in the review, but other kind of information was excluded from the analysis. Two researchers independently searched the literature. Then, the two sets of literature were compared; disagreements about the inclusion of the literature were resolved through group discussion to make the decision. Data on the design, objectives, sample size, setting, instrumental methodology, and main findings were extracted. The articles were classified in the following research areas: ‘*Aspergillus* spp.’, ‘Aflatoxins’, ‘Feed ingredients’, ‘Commercial dry feed’, ‘Clinical findings’, ‘Lesions’, ‘Therapeutic strategies’ and ‘Control’. All findings and statements in this review are based on published information as indicated in the references.

3. Presence of *Aspergillus* spp. in Commercial Dry Feed for Dogs

The presence of toxigenic *Aspergillus* spp. in cereals or other dog feed ingredients incorporated into CDF formulations deteriorates the quality and affects the safety of the whole feed [13]. Cereals and other ingredients are suitable substrates for the growth of fungal microflora, both in the pre-harvest stage and in storage [14]. When the raw extruded material for CDF formulation presents an excess of relative humidity content (20–25%) in the initial stage of the process, and it is reduced by drying (8–10%), only the growth of

the vegetative forms of the fungal microflora is inhibited, but the spores and mycotoxins produced within the processed material remain stable. It has been reported that the optimal temperature and water activity for regulatory genes of the AF biosynthesis pathway to reach their maximum expression are 28–30 °C and 0.96–0.99, respectively, although the AF production range is very wide [15–17]. Therefore, if the substrate is rehydrated during improper storage conditions, AF concentrations may increase.

Some studies report that the most frequent fungal contaminants present in CDF for dogs are *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., and *Rhizopus* spp. Several of the genera and species isolated and identified are mycotoxigenic, which produces a risk to dogs' health [11,18–20] (Table 1). Most of the samples included in each study were contaminated by *Aspergillus* spp. and by some other type of toxigenic fungal microbiota. Although information regarding the presence of *Aspergillus* spp. and other fungal microflora in various ingredients of human food is extensive, studies of this contamination in CDF are scarce, despite being made with similar ingredients. Furthermore, these reports refer to contamination of whole feed, but no results of toxigenic microflora in CDF ingredients have been reported [18–21].

Table 1. Fungal microflora detected in commercial dry feed for dogs.

Location	Number of Samples (n)	Major Fungi Identified	Positive Samples (%)	Citation
Argentina	12	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Mucor globosus</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>M. racemosus</i> , <i>Rhizopus</i> spp.	100	[11]
Brazil	180	<i>A. flavus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. flavipes</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	100	[22]
Brazil	34	<i>Absidia</i> spp., <i>Aureobasidium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Claysonilia</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Emericella</i> spp., <i>Eurotium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Geotrichum</i> spp., <i>Monascus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Olyptichium</i> spp., <i>Paeclomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Phoma</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Scapulariopsis</i> spp., <i>Syncephalastrum</i> spp., <i>Tilletiopsis</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Wallenia</i> spp., Yeasts	74	[23]
Brazil	60	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.	53.3	[24]
Poland	25	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	52	[19]
Poland	20	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.	25	[21]
Poland	25	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>F. verticilloides</i> , <i>F. proliferatum</i>	100	[18]
Portugal	20	<i>A. niger</i> , <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	100	[25]
South Africa	20	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. verticilloides</i> , <i>Penicillium</i> spp.	100	[20]
United Kingdom	5	<i>Absidia</i> spp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Eurotium</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Syncephalastrum</i> spp., <i>Wallenia</i> spp., yeasts	100	[26]
Venezuela	4	<i>Acremonium charitcola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>F. rosei</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>	94	[27]

4. Aflatoxins and Their Biotransformation Products

The AF are difuranocoumarin compounds produced as secondary metabolites of fungi of the genus *Aspergillus* spp. following a polyketide path; *A. flavus* is the main species of fungus involved in AF production [9,11,22]. Four AF naturally present in agricultural products are described (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂); other forms of AF are derived from the metabolic process of these primary forms within the human or animal body [28]. AF are not destroyed by boiling nor do they confer, color, aroma, or flavor to contaminated ingredients, so they usually go unnoticed by both the owner and the dog [13]. When dogs ingest CDF made with ingredients contaminated with AF, the mycotoxin are absorbed in the duodenum and bind to plasma albumin and proceed to be transported through the bloodstream [29].

In various tissues, especially in the liver and kidneys, AF are biotransformed and bioactivated by isoenzymes of the multiple function oxidase system or cytochromes (CYP₄₅₀), giving rise to highly active electrophilic forms called 8,9 endo-epoxide and 8,9 exo-epoxide, which bind and exert an electrophilic attack on subcellular structures [30]. When AF are metabolized (hydrolysis, demethylation, or ketoreduction), they form less toxic intermediate compounds with greater solubility in water (AFM₁, AFM₂, AFQ₁, AFQ₂, AFP₁, AFP₂ and aflatoxicol); therefore, they are eliminated through feces, urine, milk, or egg [31,32]. The most common ways of elimination of metabolites in the urine of dogs is AFM₁, as well as traces of AFQ₁ [33,34]. When the epoxide binds to DNA, then an AF-DNA adduct (dihydro-8-(N⁷-guanyl)-9hydroxy-1 AF-N⁷-guanidine) is formed, which rearranges as AF-formaminopyrimidine (AF-FAPy), or it is excreted through urine as AF-N⁷ guanine, which is considered a biomarker of genotoxic damage from AF [31–34]. In general, all compounds derived from natural forms of AF, due to the activity of the enzymes that participate in the detoxification process, are considered biomarkers of exposure and damage [35].

An important detoxification mechanism in many animal species is the involvement of a group of enzymes called Glutathione S-transferases (GST) [36]. The function of GST is to bind the epoxide with the reduced glutathione tripeptide (GSH), which loses two amino acids (glycine and glutamate) to be eliminated as a cysteine residue linked to AF, called mercapturic acid or N-acetylcysteine-AF, which is eliminated through bile or urine [37]. Dogs have a reduced GST activity, which makes them especially susceptible to AF damage; in addition, a deficiency of GSH or its three precursor amino acids facilitates the occurrence of the most extensive oxidative injury [38–40].

5. Contamination of Feed Ingredients by Aflatoxins

Cereals are usually integrated into dog feeds, especially corn, sorghum, rice, wheat, oats, barley, and millet; they are a good source of carbohydrates, fiber, protein, fat, minerals, and vitamins [41,42]. However, cereals present an important risk for the health of dogs because they are vulnerable to contamination by *A. flavus* both in the field and in storage [43–45]. In some CDF formulations for dogs, pumpkin seeds, chia, quinoa, and even some legumes such as lentils are included among the ingredients due to their high protein and mineral content. However, these ingredients can also be contaminated by some forms of AF [46–48]. Furthermore, the incorporation of both potatoes and sweet potatoes in the manufacturing of premium types of dog feeds is used as a source of carbohydrates and fiber. It is reported that the presence of *A. flavus* and high concentrations of AF can be found in potato tubers [49,50].

Fruits in CDF are used as a natural source of fiber; papaya is one of the main fruits that are included, however, it may have *A. flavus* in the postharvest, which has effects on its nutritional value, and it may also have AF concentrations [51]. Blueberries are used as antioxidants, although there are reports of *A. flavus* contamination and concentrations of AFB₁, AFB₂, y AFG₁ [52]. Orange and coconut are other ingredients that are included in some dog feeds, but they can also be contaminated by FA-producing fungal microflora [53–55].

Dairy and meat products as well as eggs are added to dog feed as an important source of proteins and fats. However, secondary AF metabolites such as AFM₁, AFM₂, AFP₁ may be found, which can also contaminate these feed ingredients [56]. The AF residues can be located in by-products of animal origin used in the manufacturing of CDF, such as liver, kidneys, muscle, meat, milk, and egg. The residual compounds in eggs, milk and meat are derived from the biotransformation of the original AF ingested in the feed of animals used for food and remain in the dog that ingests the CDF [57].

6. Aflatoxin Contamination in Commercial Dry Feed for Dogs

Natural forms of AFs and its metabolites can be found in the ingredients used to make CDF for dogs (Table 2). Cereals used in the formulation of CDF may contain high levels of AF contamination (0.48–1.081 µg/kg), making them the most likely sources of aflatoxin contamination [58,59]. AFB₁ is the most abundant form in open sampling CDF trials, with values that vary widely (<0.5 and 4.946 µg/kg) [8,60]. CDF is classified into economic, premium, or super premium types of dog feeds according to the nutritional quality of the ingredients, but this classification does not guarantee that it is an AF-free product because they are found in all types of CDF [20,61,62]. Therefore, AF present in the CDF are a health risk, which is especially important because CDF is used as the sole or main component of the diet during most of a dog’s life; in addition, all the feed contained on each bag is usually eaten until it is exhausted, suggesting that prolonged ingestion of feed contaminated with these mycotoxins, even at low doses, can have adverse health effects [63].

Table 2. Presence of aflatoxins in commercial dry feed for dogs.

Location	Number of Sample (n)	Test	Mean AF (µg/kg)	Positive Samples (%)	Citation
Brazil	45	TLC	AFB ₁ (19.0)	AFB ₁ (6.7)	[64]
Brazil	180	HPLC	AFB ₁ (7.0)	AFB ₁ (100)	[22]
Brazil	(AE) 49 (AP) 25 (ASP) 13	HPLC	(SF) AF (1.2) (PF) AF (0.4) (SPF) AF (0.5)	AF (95.4)	[61]
China	32	LC-MS/MS	AFB ₁ (47.7)	AFB ₁ (87.5)	[65]
United States	9	ELISA, TLC, HPLC	AFB ₁ (530) AFB ₂ (19.0)	AFB ₁ (88.8) AFB ₂ (77.7)	[66]
Italy	(AE) 24 (AP) 24	LC-MS, PLC-MS/MS	AFB ₁ y AFG ₁ (<0.5) AFB ₂ (5.7) AFG ₂ (15.8)	AF (12.0)	[62]
Italy	55	UHPLC-Q-Orbitrap HRMS	AFB ₁ (4.3)	AFB ₁ (25.8)	[67]
Mexico	19	HPLC	AFB ₁ (5.0), AFB ₂ (0.07), AFG ₁ (0.05), AFG ₂ (0.03), AFM ₁ (2.0) AFM ₂ (0.1) AFP ₁ (1.1), AFL (0.3)	AFB ₁ (79.0), AFB ₂ (26.0), AFG ₁ (63.0), AFG ₂ (21.0), AFM ₁ (63.0), AFM ₂ (89.0), AFP ₁ (58.0), AFL (47.0)	[68]
Mexico	29	HPLC-FL	AFB ₁ (1.6), AFB ₂ (0.1), AFG ₁ (28.2), AFG ₂ (1.3), AFM ₁ (1.8), AFM ₂ (0.2), AFP ₁ (1.7), AFL (28.6)	AFB ₁ (76.0), AFB ₂ (4.0), AFG ₁ (86.0), AFG ₂ (93.0), AFM ₁ (48.0), AFM ₂ (21.0), AFP ₁ (100), AFL (100)	[8]
Nigeria	30	HPLC	AF (9.6)	AF (100)	[69]
Poland	25	HPLC-FLD	AF (0.2)	AF (4.0)	[19]

Table 2. Cont.

Location	Number of Sample (n)	Test	Mean AF ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Positive Samples (%)	Citation
South Africa	(AE)10 (AP)10	TLC, HPLC-FLD	(SF) AFB ₁ (44.1) (PF) AFB ₁ (20.1)	AFB ₁ (100)	[20]
Turkey	21	ELISA	AFB ₁ (6.6)	AFB ₁ (100)	[70]
Turkey	18	ELISA	AF 1.75 \pm 20	AF (16.7)	[71]
Brazil	Retrospective study	HPLC	AFB ₁ -AFG ₁ (89.0-191)	-	[72]

Definitions: AF: Total aflatoxin; AFB₁: Aflatoxin B₁; AFB₂: Aflatoxin B₂; AFG₁: Aflatoxin G₁; AFG₂: Aflatoxin G₂; AFL: Aflatoxicol; APM₁: Aflatoxin M₁; APM₂: Aflatoxin M₂; AFP: Aflatoxin P₁; ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay; HPLC: High Performance Liquid Chromatography; LC-MS/MS: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; LC-MS: Liquid chromatography coupled to mass spectrometry; PLC-MS/MS: Ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS: ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry; HPLC-FL: Fluorescence High Performance Liquid Chromatography; HPLC-FLD with fluorescence detection (FLD); SF: standard feed; PF: premium feed; SPP: super premium feed.

7. Clinical Findings in Dog Aflatoxicosis

The median lethal dose (LD₅₀) of AFB₁ for the dog is of 0.5–1.5 mg/kg body weight; clinical manifestations are even observed at doses greater than 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of AF in feed [73]. As can be seen in Table 3, higher doses are associated with acute forms of aflatoxicosis. In addition, studies of poisoning outbreaks in dogs have found very high AFB₁ values (<5.0 mg/kg) [66].

Table 3. Acute poisoning in dogs due to ingestion of aflatoxins in commercial dry feed (CDF).

Location	Number of Intoxicated Dogs (n)	Mortality (%)	Range of AF in CDF ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Citation
Brazil	4	100	AFB ₁ -AFB ₂ (89.0-191)	[72]
Brazil	2	100	AFB ₁ (83.2-150)	[74]
Israel	50	68.0	AF (80-300)	[38]
South Africa	10	100	AF (100-300)	[75]
South Africa	100	96.0	AF (<5-4946)	[76]
United States	9	100	AFB ₁ (223-579)	[66]
United States	72	36.1	AF (48-800)	[77]

The clinical signs shown by dogs with aflatoxicosis are identified as digestive, hemodynamic, and nervous alterations. Digestive findings include vomiting, anorexia, hematemesis, hematochezia, and melena. The hemodynamic changes reported are ascites, peripheral edema, jaundice, dehydration, decreased blood pressure, hemorrhagic diathesis, and petechiae in the mucous membranes [38,75-77]. Clinical findings related to central nervous system disturbances are attributable to hepatic encephalopathy, manifested by depression, vocalization, stupor, seizures, and coma [38,77].

The clinical findings observed in cases of aflatoxicosis are also related to some variables of the blood biochemistry and coagulation tests (Table 4); the changes that occur are the increase in the specific activity of the liver enzymes: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase (ALT, AST, and ALP). The increased activity of these hepatic membrane enzymes is a biomarker of damage due to injury induced by the epoxides generated via AF metabolism. Coagulation tests in cases of aflatoxicosis show a decrease in the ability of blood to clot, evidenced mainly by an increase in prothrombin time and activated partial thromboplastin time (PT and aPTT) as well as a decrease in antithrombin in plasma, protein C activity, and coagulation factor VII (FVII: C) [78]. A decrease in fibrinogen and platelets is also observed. The hemorrhagic effects of AF are attributed to its chemical structure that contains a coumarin ring with an anticoagulant effect; therefore, a delay in coagulation occurs and secondarily induces disseminated intravascular coagulation (DIC) with depletion of the coagulation factors [38,74].

Table 4. Blood biochemistry and coagulation tests in aflatoxicosis in dogs *.

Analyte	A. Intoxication	B. Reference Values	Comparison (A/B)
Blood biochemistry			
Total bilirubin ($\mu\text{M/L}$)	130 (1.71–428)	2.7 (0.00–5.1)	48.1 (0.00–83.9)
ALT (U/L)	598 (6.0–2278)	59.5 (5.0–106)	10.1 (1.20–21.5)
AST (U/L)	178 (15.0–748)	31.8 (9.0–56.0)	5.6 (1.7–13.4)
ALP (U/L)	284 (10.0–3477)	67.3 (4.0–140)	4.2 (2.5–24.8)
TP (s)	41.4 (4.5–71)	12.0 (6.0–18.0)	3.4 (0.75–3.9)
APTT (s)	34.5 (9.6–241)	15.7 (10.0–23.8)	2.2 (0.96–10.1)
GGT (U/L)	10.4 (0.00–44.4)	7.8 (0.00–19.0)	1.34 (0.00–2.3)
Total protein (g/dL)	4.9 (1.10–7.9)	6.3 (5.4–7.1)	0.78 (0.20–1.11)
Albumin (g/dL)	2.5 (0.50–3.9)	3.5 (2.8–4.1)	0.70 (0.18–0.95)
Coagulation tests			
FVII:C (% activity)	32.0 (1.40–67.0)	125 (50–200)	0.26 (0.03–0.34)
Platelets ($\text{X}10^9/\text{L}$)	156 (8.0–432)	347 (143–700)	0.45 (0.06–0.62)
Protein C (% activity)	18.0 (4.0–55.0)	105 (75–135)	0.17 (0.05–0.41)
Cholesterol (mmol/L)	1.26 (0.00–7.9)	5.2 (2.6–8.6)	0.24 (0.00–0.91)
Antithrombin (% activity)	11.0 (0.00–147)	105 (65–145)	0.10 (0.00–1.01)
Fibrinogen (mg/dL)	37.0 (11.0–344)	305 (100–510)	0.12 (0.11–0.67)

Definitions: ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; PT: prothrombin time; APTT: active partial thromboplastin time; GGT: γ -glutamyltransferase; FVII: C: Coagulation factor VII * Mean and range values adapted from: [38,66,77,79].

In aflatoxicosis, hyperbilirubinemia is also seen, which is associated with liver failure or inability to conjugate bilirubin generated in the spleen in higher-than-normal amounts, resulting in an increase in total bilirubin [66]. In acute AF poisonings, a decrease in total proteins and albumin is observed. These changes are related to impaired liver function, as well as protein loss from enteric hemorrhage, ascites, and edema [80]. The decrease in cholesterol concentrations in AF poisonings is due to cholestasis, which arises from fibrosis of the bile ducts [81]. Therefore, the digestive and nervous clinical signs that are present simultaneously with the enzymatic and hematic changes specified, suggest the presence of aflatoxicosis, which must be corroborated with clinical history data and with the presence of AF in the feed and in the dog's stomach. In general, biochemical analyses and coagulation tests are used for the early detection of the effects of exposure to AF; therefore, they constitute biomarkers of exposure and damage by AF [82].

8. Macroscopic and Microscopic Lesions in Aflatoxicosis in Dogs

When dogs ingest CDF contaminated by AF, bioactive compounds are generated that attack subcellular structures and cause damage [30]. For this reason, various macroscopic and microscopic lesions are presented that can be used as a suggestive diagnostic element. The most reported findings are restricted to the liver; however, localized lesions in other organs are also reported, which are related to direct damage from AF, liver failure, coagulation abnormalities, or disseminated intravascular coagulation (Table 5) [66,75,76].

Table 5. Macroscopic and microscopic lesions in aflatoxin poisoning in dogs *

Location	Macroscopic Lesions	Microscopic Lesions
Generalized	Hemorrhagic diathesis, jaundice, and ascites.	
Hepatic	Hepatomegaly, uneven surface, pale yellowish discoloration, enhanced lobular pattern, cholestasis, and gallbladder edema.	Hepatocytes with micro and macrovesicular steatosis, cytomegaly, pyknosis, karyorexis, and necrosis. Centrilobular areas with hemorrhage, reticulin, and collagen. Hyperplasia and proliferation of bile ducts.
Pulmonary	Atelectasis, congestion, pleural effusion, hydrothorax, and petechiae.	Alveoli with hemorrhage and perivascular edema.
Cardiac	Echymosis and petechiae in the endocardium and epicardium. Hydropericardium.	
Digestive	Edema and congestion in the gastrointestinal lumen, mesenteric lymph nodes and pancreas.	Necrosis with mononuclear infiltration in the mucosa.
Splenic	Splenomegaly	Diffuse perivascular edema and red pulp with hemorrhages and erythrophagocytosis.
Renal	Dark red coloration with subcapsular depressions and multifocal hemorrhages.	Fluid accumulation in Bowman's space and glomerular basement membrane thickening. Multifocal vascular congestion in the interstitial tissue of the renal medulla and pelvis. Degeneration, ectasia, and necrosis of the proximal and distal tubular epithelium.

* Adapted from [66,74–76,83–87].

9. Therapeutic Strategies

When a diagnosis of aflatoxicosis has been established in dogs, it is suggested that therapy include, in addition to symptomatic treatment, hemostatic stabilization, increasing the rate of AF elimination and hepatic–renal protection (Table 6) [33,38]. Because AF have an anticoagulant effect like coumarin, the provision of vitamin K₁ is proposed to promote the activation of coagulation factors II, VII, IX, X, protein C, and protein S [73,82,88], as well as the provision of intravenous plasma to provide procoagulant proteins [88]. To increase the rate of elimination of AF metabolites, intravenous fluid therapy is administered [33], which is also indicated to correct dehydration and hypovolemia that occur in these cases. As symptomatic treatment, antiemetics, such as metoclopramide or ondansetron; protectors of the gastroenteric mucosa, such as famotidine and sucralfate; and broad-spectrum antibiotics are administered. The latter are used to protect against systemic infection caused by AF-mediated immunosuppression.

Table 6. Suggested therapy for aflatoxicosis treatment in dogs *.

Drug	Dose	Administration via	Usual Interval (h/d)	Therapeutic Indications
Hemostatic Stabilization				
Vitamin K ₁	2.0 mg/kg	SC	24/5	Synthesis of coagulation factors
Intravenous plasma	10.0 mL/kg	IV	Until TP & TTPa are restored	Correction of coagulopathy
Elimination of AF and Hepato-Renal Protection				
Hartman solution	40.0–60.0 mL/kg/d	IV	cbp	Increased glomerular filtration rate and restoration of water/electrolyte balance
N-acetylcysteine	70.0 mg/kg	IV	12/15	GSH synthesis and AF binding
Silymarin	20 mg/kg	PO	24/30	Counter AF epoxides
Vitamin E	10.0 U/kg	PO	24/30	Counter AF epoxides
L-carnitine	50.0–100 mg/kg	PO	8/30	Decreased liver lipidoses and counter epoxides

Table 6. Cont.

Drug	Dose	Administration via	Usual Interval (h/d)	Therapeutic Indications
Symptomatic Treatment				
Metoclopramide	0.40 mg/kg	SC	8/3	Antiemetic
Ondansetron	0.15 mg/kg	IV	12/3	Antiemetic
Famotidine	0.5 mg/kg	IV	12/30	Decreased gastric secretion
Sucralfate	0.5–1.0 g/dog	PO	8/30	Gastric cytoprotection
Ampicillin	25.0 mg/kg	IV	8/7	Broad spectrum bactericide
Enrofloxacin	5.0–20.0 mg/kg	IV	12/7 dias	Broad spectrum bactericide

Definitions: TP: prothrombin time; TTPa: activated partial thromboplastin time. * Adapted from [38,77,88–90].

The use of N-acetylcysteine (NAC) in dogs with AF poisoning is successful [91] because this compound provides an essential amino acid (L-cysteine) for the intracellular synthesis of GSH; this tripeptide is bound to reactive AF epoxides by the interaction of the GST enzyme, and the combined AF-GSH compound is eliminated as mercapturic acid in feces and urine [92]. Furthermore, NAC functions by itself as a free radical scavenger and has anti-inflammatory properties [91]. The use of silymarin is also proposed [84]; this flavonoid derived from milk thistle could increase GST activity and promote GSH's synthesis [88]. When the rate of elimination of reactive AF metabolites is increased, the attack of subcellular structures is reduced or inhibited and therefore, cellular integrity is protected, especially of the liver and kidney as targeted organs of attack by AF [89]. Vitamin E is another liver protector used in CDF to prevent lipid peroxidation by AF epoxides and to prevent damage to cell membranes. In the same sense, the use of L-carnitine reduces oxidative damage; this amino acid transports fatty acids from the cytosol to the mitochondria for their β -oxidation and energy generation, thereby reducing intracellular lipid deposition and protecting the cell membrane against the epoxide-induced lipid peroxidation processes of AF [93].

10. Methods Used to Control Aflatoxins in Commercial Dry Feed

The dog feed industry uses various physicochemical and biological methods to reduce AF contamination. Physical processing techniques of CDF ingredients are successfully used, including sieving and pearling of cereals, which are used to separate damaged grains and abrasion of the outer portions of the seeds; both methods decrease the growth of fungal microflora and reduce the content of AF [94]. The use of washing techniques for cereal grains is suggested; although the product moistened by this method requires being completely dried before storage, which generates an additional cost [95]. The proper extrusion of the grains eliminates fungal spores present in the mixture of raw materials because they cannot survive at the temperature and pressure used (150 °C, 37 atm) [96].

They also use fungal microbiota inhibitors based on a wide variety of chemical compounds. Benzoic, acetic, sorbic, and propionic acids inhibit the growth of fungi by acidifying their cytoplasmic content, which is why it is a method used to prevent the formation of AF [94]. The use of ozone gas (O₃) in DCF is proposed as an oxidizing agent because O₃ alters the structure of cell membranes and induces alterations in cell permeability and destruction of the fungal microflora. Furthermore, when O₃ is applied to feed, a reaction occurs with the double bond C8 = C9 to form a vinyl ether in the furan terminal ring of AF; then, an intermediate compound called AF-ozonide is formed; finally, the AF-ozonide is easily degraded into less toxic compounds (carboxylic acid, aldehyde, ketone, and carbon dioxide) [96–99].

The bioavailability of AF can be decreased by using compounds that reduce its gastrointestinal absorption [31]. These sequestering compounds are widely used because they bind to AF within the digestive tract of dogs through the chemisorption of β -dicarbonyl from AF, thereby reducing their intestinal absorption. The most widely used mineral sequestrants are some phyllosilicates, such as hydrated calcium and sodium aluminosilicates, bentonite, and tectosilicates or zeolites [100]. Bentonite is administered to absorb

AF through cation exchange and carbonyl groups, as well as ion-dipole interaction [100]. The adsorption of the zeolite arises from the interaction of the AF with Ca^{2+} existing on its surface [101]. Furthermore, the use of organic compounds derived from yeast and other microorganisms is a method of adsorption of AFs present in CDF for dogs. *Saccharomyces cerevisiae* cell walls contain large proportions of mannoproteins and β -D-glucomannan, which exhibit high activity to adsorb AF. Lactic acid bacteria also could reduce the bioavailability of AF through their adsorption by peptidoglycans from their cell wall [102].

The methods of reducing the bioavailability of AF in feed have a wide range of efficacy, but they do not eliminate the risk of poisoning at high concentrations of AF, or long-time ingestion, and they do not prevent the development of fungi and an increased AF concentration when CDF is improperly stored [63]. Even AF contamination has not been able to be eliminated in the food supply chain, even if good agricultural practices are adhered to or optimal storage conditions are maintained. Although the best conditions of agro-industrial production of CDF are able to ensure that the concentration of AF is innocuous and it is distributed within airtight sacks, as soon as the sack is exposed to the environment, the hygroscopicity increases the relative humidity of the CDF (>17%) and the conidia can germinate and begin the production of AF to toxic levels. This risk may be greater with increasing ambient temperature, relative humidity, and time of consumption of the sack content [16,17,103].

One of the most common strategies to control AF contamination is to set the maximum residue level (MRL) or the action levels for AF, which are the maximum concentrations permitted of AF in food or feed [104]. The MRL for AF in feedstuffs varies widely among different countries (0.0–50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and is indicated for any animal feed. The European Union has fixed the MRL for AFB₁ at 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in complete feed and twice as much for feed materials; China, Japan, and Korea apply the same MRL (10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for animal feed, especially in dairy feed. However, in many countries in both North America and Latin America, the MRL for AF (aflatoxin B₁ + B₂ + G₁ and G₂) are set at 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for AF in feedstuffs because it is assumed that animals like dogs are susceptible to the toxic effects of AF at higher doses [73,105]; although, many countries of Asia and Oceania, like India, Nepal and Senegal have higher MRL (>20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for AF in feedstuffs, including in the dog feed [63,95,104,106]. On other hand, these regulations are intended to protect animal health and prevent AF toxicity; but there is no evidence of the effect that prolonged exposure to AF below the MRL could have on dog health, especially when AF-contaminated CDF is ingested until all the feed contained within each bag is finished, suggesting an urgent need for quality control mechanisms.

11. Conclusions and Recommendations

Aflatoxins and the fungi that produce them, particularly *Aspergillus flavus*, are common in the main ingredients used to make commercial dry feed for dogs (grains, meat and bone meals, viscera, tubers, fruits, etc.). These ingredients are agro-industrial by-products that are used to satisfy the specific nutritional requirements of the dog (age, weight, activity, etc.) and to allow its incorporation into the urban lifestyle. Therefore, the presence of mycotoxigenic fungi and their toxins could be considered a serious problem for the health of the dog, to develop its zootechnical function as a companion, guardian, or as a sports animal. In addition, dangerous levels of aflatoxins are potentiated because the dog must ingest large amounts of the CDF until all the content found in each bag that its owner purchases is finished off. Although studies on the impact of exposure to AF on the health of dogs are limited, these studies are adequate to demonstrate its impact on clinical manifestations, macroscopic and microscopic lesions, and hematological and enzymatic alterations. Therefore, to address these problems, the use of therapeutic and control strategies that mitigate the impact developed by aflatoxins is recommended. In addition, the establishment of maximum permissible levels of AF specifically for CDF and research on prolonged exposure to low concentrations of aflatoxins should be encouraged.

Author Contributions: Conceptualization, L.M.-M. and A.G.V.-F.; methodology, E.J.R.-M.; data curation, E.J.R.-M.; writing—original draft preparation, L.M.-M. and A.G.V.-F.; writing—review and editing, A.G.V.-F., A.L.G.-B., T.Q.-Y., and R.O.-M.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Science and Technology National Council (CONACyT, grant number 738906 and Universidad Autónoma de Aguascalientes (project number: PIP/SA 19-1).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to Adrian Ugarte, Keith MacMillan, and Abby Greazel for their participation for researching information and translating the draft manuscript into the English language.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Case, L.; Daristotle, L.; Hayek, M.; Raasch, M. History and regulation of pet food. In *Canine and Feline Nutrition*; Case, L., Daristotle, L., Hayek, M., Raasch, M., Eds.; Mosby: Saint Louis, MO, USA, 2011; pp. 121–129. [\[CrossRef\]](#)
- Schleicher, M.; Cash, S.B.; Freeman, L.M. Determinants of pet food purchasing decisions. *Can. Vet. J.* **2019**, *60*, 644–650. [\[PubMed\]](#)
- Rojas, M.; González, I.; De la Cruz, S.; Hernández, P.E.; García, T.; Martín, R. Application of species-specific polymerase chain reaction assays to verify the labeling of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*) and ostrich (*Struthio camelus*) in pet foods. *Anim. Feed Sci. Tech.* **2011**, *169*, 128–133. [\[CrossRef\]](#)
- Yegzes, J.H.; Oakley, B.B.; Brennan, G. Comparison of mycotoxin concentrations in grain versus grain-free dry and wet commercial dog foods. *Toxicol. Commun.* **2019**, *3*, 61–66. [\[CrossRef\]](#)
- Beloshapka, A.; Buff, P.P.; Fahey Jr, G.C.; Swanson, K.S. Compositional analysis of whole grains, processed grains, grain co-products, and other carbohydrate sources with applicability to pet animal nutrition. *Foods* **2016**, *5*, 23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yathavamoorthi, R.; Nithin, C.T.; Ananthanarayanan, T.R.; Mathew, S.; Bindu, J.; Anandana, R.; Gopal, T.K. Tuna red meat as a novel ingredient in pet food for dogs. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **2020**, *29*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
- Ott, L.C.; Appleton, H.J.; Shi, H.; Keener, K.; Mellata, M. High voltage atmospheric cold plasma treatment inactivates *Aspergillus flavus* spores and deoxynivalenol toxin. *Food Microbiol.* **2020**, in press. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fuentes, S.; Carvajal, M.; Ruiz, S.; Martínez, N.C.; Gómez, A.A.; Rojo, F. Presence of mutagens and carcinogens, called aflatoxins, and their hydroxylated metabolites in industrialized food for dogs. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2018**, *10*, 76–86. [\[CrossRef\]](#)
- Alshannaq, A.; Yu, J. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health* **2017**, *14*, 632. [\[CrossRef\]](#)
- Mahato, D.K.; Lee, K.E.; Kamle, M.; Devi, S.; Dewangan, K.N.; Kumar, P.; Kang, S.G. Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2266. [\[CrossRef\]](#)
- Bueno, D.J.; Silva, J.O.; Oliver, G. Mycoflora in commercial pet foods. *J. Food Protect.* **2001**, *64*, 741–743. [\[CrossRef\]](#)
- Arksey, H.; O'Malley, L. Scoping studies: Towards a methodological framework. *Int. J. Soc. Res. Methodol.* **2007**, *8*, 19–32. [\[CrossRef\]](#)
- Aquino, S.; Corrêa, B. Aflatoxins in Pet Foods: A risk to special consumers. In *Aflatoxins—Detection, Measurement and Control*; Torres-Pacheco, I., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2011; pp. 53–74. [\[CrossRef\]](#)
- Bennett, J.M.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zicker, S.C. Evaluating pet foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food? *Top Companion Anim. Med.* **2008**, *23*, 121–126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gallo, A.; Solfrizzo, M.; Epifani, F.; Panzarini, G.; Perrone, G. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *217*, 162–169. [\[CrossRef\]](#)
- Chiewchan, N.; Mujumdar, A.; Devahastin, S. Application of drying technology to control aflatoxins in foods and feeds: A Review. *Dry Technol.* **2015**, *33*, 1700–1707. [\[CrossRef\]](#)
- Witaszak, N.; Stepien, L.; Bocianowski, J.; Waskiewicz, A. *Fusarium* species and mycotoxins contaminating veterinary diets for dogs and cats. *Microorganisms* **2019**, *7*, 26. [\[CrossRef\]](#)
- Bhaje-Kosicka, A.; Kosicki, R.; Twanuzek, M.; Grajewski, J. Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Addit. Contam. B Part* **2014**, *7*, 302–308. [\[CrossRef\]](#)
- Singh, S.D.; Chuturgoon, A.A. A comparative analysis of mycotoxin contamination. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2017**, *88*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
- Hołda, K.; Wiczuk, W.; Hać-szymańczuk, E.; Głogowski, R. Comprehensive microbiological evaluation of dry foods for growing dogs marketed in Poland. *Anim. Sci.* **2017**, *56*, 81–89. [\[CrossRef\]](#)

22. Campos, S.G.; Keller, L.M.; Cavaglieri, L.R.; Krüger, C.; Fernández, M.G.; Dalçero, A.M.; Magnoli, C.E.; Rosa, C.A. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin B₁ in commercial pet food in Brazil. *World Mycotoxin J.* **2009**, *2*, 85–90. [[CrossRef](#)]
23. Copetti, M.V.; Santurio, J.M.; Cavalheiro, A.S.; Alves, S.H.; Ferreira, L. Comparison of different culture media for mycological evaluation of commercial pet food. *Acta Sci. Vet.* **2009**, *37*, 329–335. [[CrossRef](#)]
24. Girio, T.M.S.; Filho, A.N.; Junior, O.D.R.; Amaral, L.A.; Girio, R.J.S. Microbiological quality of dog feed sold in sealed packages and in bulk. *Ars. Vet. Jaboticabal. SP* **2012**, *28*, 36–40.
25. Martins, M.L.; Martins, H.M.; Bernardo, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* **2003**, *98*, 179–183.
26. Scudamore, K.A.; Hetmanski, M.T.; Nawaz, S.; Naylor, J.; Rainbird, S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess* **2009**, *14*, 175–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Muñoz, D.J.; Rodríguez, R.; Mota, J.J.; Suarez, L.R. Isolation and identification of phylamentous fungi in feed for domestic pets (dogs and cats). *Rev. Ciêntif. FCV-LUZ* **2015**, *25*, 432–438.
28. Klich, M. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 713–722. [[CrossRef](#)]
29. Tessari, E.N.; Kobashigawa, E.; Cardoso, A.L.; Ledoux, D.R. Effects of Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ on blood biochemical. *Toxins* **2010**, *2*, 453–460. [[CrossRef](#)]
30. Tulayakul, P.; Sakuda, S.; Dong, K.S.; Kumagai, S. Comparative activities of glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B₁ in livers of experimental and farm animals. *Toxicol* **2005**, *46*, 204–209. [[CrossRef](#)]
31. Yiannikouris, A.; Jouany, J. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Anim. Res.* **2002**, *51*, 81–99. [[CrossRef](#)]
32. Galtier, P. Biotransformation and Fate of Mycotoxins. *J. Toxicol.* **1999**, *18*, 295–312. [[CrossRef](#)]
33. Bingham, A.; Huebner, H.; Phillips, T.; Bauer, J. Identification and reduction of urinary aflatoxin metabolites in dogs. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 1851–1858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wu, Q.; Jezkova, A.; Yuan, Z.; Pavlikova, L.; Dohnal, V.; Kuca, K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab. Rev.* **2009**, *41*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Benkerrour, N. Aflatoxins: Producing-molds, structure, health issues and incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African countries. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health* **2020**, *17*, 1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Uribe-Yunda, D.E.; Navas, M.C. Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B₁. *Rev. Cienc. Salud.* **2012**, *10*, 403–419.
37. Rawal, S.; Kim, J.E.; Coulombe, R., Jr. Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res. Vet. Sci.* **2010**, *89*, 325–331. [[CrossRef](#)]
38. Bruchim, Y.; Seggev, G.; Sela, U.; Bdolah, Y.; Salomon, A.; Aröch, I. Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 279–287. [[CrossRef](#)]
39. Mehrzad, J.; Fazel, E.; Pouyamehr, N.; Hosseinkhanl, S.; Dehghani, H. Naturally occurring level of aflatoxin B₁ injures human, canine and bovine leukocytes through ATP depletion and caspase activation. *Int. J. Toxicol.* **2019**, *141*, 16–25. [[CrossRef](#)]
40. Towner, R.A.; Qian, S.Y.; Kadiiska, M.B.; Mason, R.P. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radic. Biomol.* **2003**, *35*, 1330–1340. [[CrossRef](#)]
41. Macias, A.; Rial, C.; Acosta, A.; Henriquez, L.A.; Almeida, M.; Rodriguez, A.; Zumbado, M.; Boada, L.D.; Zaccaroni, A.; Luzardo, O.P. Risk assessment of the exposure to mycotoxins in dogs and cats through the consumption of commercial dry food. *Sci. Total Environ.* **2020**, *15*, 134592. [[CrossRef](#)]
42. Peterson, D.M. Oat antioxidants. *J. Cereal. Sci.* **2001**, *33*, 115–129. [[CrossRef](#)]
43. Wan, J.; Chen, B.; Rao, J.J. Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. *Compr. Rev. Food Sci. F* **2019**, *19*, 1–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Xu, L.; Zhang, Z.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Yu, L.; Wang, D.; Li, H.; Li, P. An on-site simultaneous semi-quantification of aflatoxin B₁, zearalenone, and T-2 toxin in maize- and cereal-based feed via multicolor immunochromatographic Assay. *Toxins* **2018**, *10*, 87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kamala, A.; Ortiz, J.; Kimanya, M.; Haesaert, G.; Donoso, S.; Yitsekwa, B.; De Meulenaer, B. Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agro-ecological zones of Tanzania. *Food Control* **2015**, *54*, 208–215. [[CrossRef](#)]
46. Herrera, M.; Bervis, N.; Carramiñana, J.J.; Juan, Y.; Herrera, A.; Ariño, A.; Lorán, S. Occurrence and exposure assessment of aflatoxins and deoxynivalenol in cereal-based baby foods for infants. *Toxins* **2019**, *11*, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hacibekiroglu, I.; Kolak, U. Aflatoxins in various food from Istanbul, Turkey. *Food Addit. Contam. B* **2013**, *6*, 260–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Nazir, A.; Kalim, I.; Sajjad, M.; Usman, M.; Iqbal, M. Prevalence of aflatoxin contamination in pulses and spices in different regions of Punjab. *Chem. Int.* **2019**, *5*, 274–280. [[CrossRef](#)]
49. Zongür, A. Investigation of DON and aflatoxin content in Agria and Hermes chips potato cultivars grown in Aksaray, Sivas, Kayseri, Niğde. *J. Plant Dis. Protect* **2020**, *127*, 521–527. [[CrossRef](#)]
50. Amri, E.; Lenoi, S. Aflatoxin and fumonisin contamination of sun-dried sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) chips in Kahama district, Tanzania. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *4*, 55–62. [[CrossRef](#)]
51. Bagwan, N.B. Aflatoxin B₁ contamination in papaya fruits (*Carica papaya* L.) during post harvest pathogenesis. *Indian Phytopath.* **2011**, *64*, 48–50.

52. Munitz, M.S.; Resnik, S.L.; Pacin, A.; Salas, P.; Gonzalez, H.L.; Montti, M.L.; Drunday, V.; Guillin, E. Mycotoxigenic potential of fungi isolated from freshly harvested Argentinean blueberries. *Mycotoxin Res.* **2014**, *30*, 221–229. [[CrossRef](#)]
53. Drusch, S.; Ragab, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *J. Food Protect.* **2003**, *66*, 1514–1527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Abo-Dalam, T.H.; Amra, H.; Sultan, Y.; Magan, N.; Carlobos, A.L.; Cumagun, C.J.; Yli, T. New genotypes of aflatoxigenic fungi from Egypt and the Philippines. *Fungal. Biol.* **2020**, *10*, 142–155. [[CrossRef](#)]
55. Granados, F.; Redondo, M.; Jaikel, D. Mycotoxin contamination of beverages obtained from tropical crops. *Beverages* **2018**, *4*, 83. [[CrossRef](#)]
56. Pour, S.H.; Mahmoudi, S.; Masoumi, S.; Rezaie, S.; Barac, A.; Ranjbaran, M.; Oliya, S.; Mehravar, F.; Sasani, E.; Noorbakhsh, F.; et al. Aflatoxin M₁ contamination level in Iranian milk and dairy products: A systematic review and meta-analysis. *World Mycotoxin J.* **2020**, *13*, 67–82. [[CrossRef](#)]
57. Cavus, S.; Formuk, F.; Sarioglu, K.; Yetim, H. Determination of mold contamination and aflatoxin levels of the meat products/ingredients collected from Turkey market. *J. Food Saf.* **2018**, *38*, 1–7. [[CrossRef](#)]
58. Pitt, J.I.; Taniwaki, M.H.; Cole, M.B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control* **2013**, *32*, 205–215. [[CrossRef](#)]
59. Rodriguez, M.; Ramos, A.J.; Prim, M.; Sanchis, V.; Marin, S. Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M₁ in milk. *Mycotoxin Res.* **2019**, *36*, 11–22. [[CrossRef](#)]
60. Algahtani, F.D.; Morshdy, A.E.; Hussein, M.; Abouelkheir, E.S.; Adeboye, A.; Valentine, A.; Elabbasy, M.T. Biogenic amines and aflatoxins in some imported meat products: Incidence, occurrence, and public health impacts. *J. Food Qual.* **2020**, 8718179. [[CrossRef](#)]
61. Teixeira, E.M.; Frehse, M.S.; Freire, R.L.; Ono, M.A.; Bordini, J.G.; Hirozawa, M.T.; Ono, E.Y. Safety of low and high cost dry feed intended for dogs in Brazil concerning fumonisins, zearalenone and aflatoxins. *World Mycotoxin J.* **2017**, *10*, 273–283. [[CrossRef](#)]
62. Gazzotti, T.; Biagi, G.; Pagliuca, G.; Pinna, C.; Scardilli, M.; Grandi, M.; Zaghini, G. Occurrence of mycotoxins in extruded commercial dog food. *Anim. Feed Sci. Tech.* **2015**, *202*, 81–89. [[CrossRef](#)]
63. Hernandez, E.; Valdivia, A.; Cruz, C.; Saldaña, M.; Quezada, Y.; Rangel, E.; Ortiz, R.; Medina, L.; Jaramillo. Diagnosis of subclinical aflatoxicosis by biochemical changes in dairy cows under field conditions. *Pak. Vet. J.* **2020**, 1–6. [[CrossRef](#)]
64. Maia, P.P.; de Siqueira, M.E.P.B. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 1180–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Shao, M.; Li, L.; Gu, Z.; Yao, M.; Xu, D.; Fan, W. Mycotoxins in commercial dry pet food in China. *Food Addit. Contam.* **2018**, *11*, 237–245. [[CrossRef](#)]
66. Newman, S.J.; Smith, J.R.; Stenske, K.A.; Newman, L.B.; Dunlap, J.R.; Imerman, P.M.; Kirk, C.A. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2007**, *19*, 168–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Castaldo, L.; Graziari, G.; Gaspari, A.; Izzo, L.; Tolosa, J.; Rodriguez, Y.; Ritiari, A. Target analysis and retrospective screening of multiple mycotoxins in pet food using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Toxins* **2019**, *11*, 434. [[CrossRef](#)]
68. Sharma, M.; Marquez, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2001**, *93*, 109–114. [[CrossRef](#)]
69. Akinrinmade, J.E.; Akinrinde, A.S. Aflatoxin status of some commercial dry dog foods in Ibadan, Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 11463–11467. [[CrossRef](#)]
70. Basalan, M.; Hismiogullari, S.E.; Hismiogullari, A.A.; Filazi, A. Fungi and aflatoxin B₁ in horse and dog feeds in western Turkey. *Revue Med. Vet.* **2004**, *156*, 248–252.
71. Gunser, U.; Yaroglu, Y. Aflatoxin in dog and horse feeds in Turkey. *Vet. Hum. Toxicol.* **2002**, *44*, 113–114.
72. Reis-Gomes, A.; Marcolongo-Pereira, C.; Sallis, E.S.V.; Pereira, D.I.B.; Schild, A.L.; Faria, R.O.; Meireles, M.C.A. Aflatoxicosis in dogs in Southern Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* **2014**, *34*, 162–166. [[CrossRef](#)]
73. Stenske, K.; Smith, J.; Newman, S.; Newman, L.; Kirk, C. Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *J. Am. Vet. Med.* **2006**, *228*, 1686–1691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Hagiwara, M.; Kogika, M.; Malucelli, B. Disseminated intravascular coagulation in dog with aflatoxicosis. *J. Small Anim. Pract.* **1990**, *31*, 239–243. [[CrossRef](#)]
75. Bastianello, S.S.; Nesbit, J.W.; Williams, M.C.; Lange, A.L. Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **1987**, *54*, 635–640. [[PubMed](#)]
76. Arnot, L.; Duncan, N.; Coetzer, H.; Botha, C. An outbreak of canine aflatoxicosis in Gauteng province, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2012**, *83*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Dereszynski, D.; Center, S.; Randolph, J.; Brooks, M.; Hadden, A.; Palyada, K.; McDonough, S.; Messick, J.; Stokol, T.; Bischoff, K.; et al. Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005–2006). *JAVMA J. Am. Vet. Med. A* **2008**, *232*, 1329–1337. [[CrossRef](#)]
78. Prins, M.; Schellens, C.J.; van Leeuwen, M.W.; Rothuizen, J.; Teske, E. Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *Vet. J.* **2010**, *185*, 163–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Donahue, S.M.; Brooks, M.; Otto, C.M. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **2011**, *21*, 346–355. [[CrossRef](#)]
80. Ensley, S.M.; Radke, S.L. Mycotoxins in grains and feeds. In *Diseases of Swine*; Zimmerman, J.J., Kariker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Zhang, J., Eds.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 1055–1071. [[CrossRef](#)]

81. Rauber, R.H.; Dilkin, P.; Giacomini, L.Z.; de Almeida, C.A.A.; Mallmann, C.A. Performance of Turkey poult fed different doses of aflatoxins in the diet. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 1620–1624. [[CrossRef](#)]
82. Wada, H.; Usui, M.; Sakuragawa, N. *Hemostatic Abnormalities and Liver Diseases*; Favaloro, J.E., Ed.; Seminars in Thrombosis and Hemostasis: New York, NY, USA, 2008.
83. Newberne, P.; Russo, R.; Wogan, G. Acute toxicity of aflatoxin B₁ in the dog. *Pathol. Vet.* **1966**, *3*, 331–340. [[CrossRef](#)]
84. Bischoff, K.; Rumbelha, W. Pet food recalls and pet food contaminants in small animals: An update. *Vet. Clin. Small Anim.* **2018**, *48*, 917–931. [[CrossRef](#)]
85. Eroksuz, Y.; Kaya, E.; Issi, M.; Baydar, E.; Cevik, A.; Eroksuz, H.; Asci, Z.; Timurkan, O. Subacute aflatoxicosis due to moldy bread consumption in a dog. *Revue Méd. Vet.* **2015**, *166*, 259–265.
86. Ural, K.; Ulutas, B.; Tunca, R.; Kum, C.; Avci, H.; Boyacioglu, M.; Gultekin, M.; Atasoy, A. Aflatoxicosis in rottweilers after eating moldy bread: Clinicopathological features and effective tetrasulphate therapy. *Vet. Arhiv.* **2013**, *83*, 403–412.
87. Wouters, A.T.; Casagrande, R.A.; Wouters, F.; Watanabe, T.T.; Boabaid, F.M.; Cruz, C.E.; Driemeier, D. An outbreak of aflatoxin poisoning in dogs associated with aflatoxin B₁-contaminated maize products. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2013**, *25*, 282–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Weingarten, M.A.; Sande, A.A. Acute liver failure in dogs and cats. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **2015**, *25*, 455–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Griebisch, C.; Whitney, J.; Angles, J.; Bennett, P. Acute liver failure in two dogs following ingestion of cheese tree (*Glochidion ferdinandii*) roots. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **2018**, *1*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Sanderson, S.L. Taurine and carnitine in canine cardiomyopathy. *Vet. Clin. Small Anim.* **2006**, *36*, 1325–1343. [[CrossRef](#)]
91. Viviano, K.R.; Wielen, B.V. Effect of N-Acetylcysteine supplementation on intracellular glutathione, urine isoprostanes, clinical score, and survival in hospitalized ill dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2013**, *27*, 250–258. [[CrossRef](#)]
92. Wild, C.P.; Turner, P.C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* **2002**, *17*, 471–481. [[CrossRef](#)]
93. Citi, M.; Gunes, V.; Atakisi, O.; Ozcan, A.; Tuzcu, M.; Dogan, A. Protective effect of L-carnitine against oxidative damage caused by experimental chronic aflatoxicosis in quail (*Coturnix coturnix*). *Acta Vet. Hung.* **2005**, *53*, 319–324. [[CrossRef](#)]
94. Atungulu, G.G.; Mohammadi-Shad, Z.; Wilson, S. Mycotoxin issues in pet food. *Food Feed Saf. Syst. Anal.* **2018**, *1*, 25–44. [[CrossRef](#)]
95. Leung, M.C.K.; Diaz-Llano, G.; Smith, T.K. Mycotoxins in pet food: A review on worldwide prevalence and preventative strategies. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9623–9635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Silva, J.; Pereira, M.N.; Scussel, V.M. Ozone gas antifungal effect on extruded dog food contaminated with *Aspergillus flavus*. *Ozone Sci.* **2018**, *7*, 1–8. [[CrossRef](#)]
97. Lambert, R.; Stratford, M. Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 157–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Christ, D.; Savi, G.D.; Scussel, V.M. Effectiveness of ozone gas in raw and processed food for fungi and mycotoxin decontamination—A review. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* **2016**, *6*, 326–348. [[CrossRef](#)]
99. Diao, E.; Hou, H.; Chen, B.; Shan, C.; Dong, H. Ozonolysis efficiency and safety evaluation of aflatoxin B₁ in peanuts. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 519–525. [[CrossRef](#)]
100. Di Gregorio, M.C.; de Neeff, D.V.; Jager, A.V.; Corassin, C.H.; de Pinho, A.C.; de Albuquerque, R.; de Azevedo, A.C.; Fernandes, C.A. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Rev.* **2014**, *33*, 125–135. [[CrossRef](#)]
101. Tomašević-Canović, M.; Daković, A.; Rottinghaus, G.; Matijašević, S.; Đurić, M. Surfactant modified zeolites—new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous Mat.* **2003**, *61*, 173–180. [[CrossRef](#)]
102. Lahtinen, S.J.; Haskard, C.A.; Ouwehand, A.C.; Salminen, S.J.; Ahokas, J.T. Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit. Contam.* **2004**, *21*, 158–164. [[CrossRef](#)]
103. De Luna-López, M.C.; Valdivia-Flores, A.G.; Jaramillo-Juárez, F.; Reyes, J.L.; Ortiz-Martínez, R.; Quezada-Tristán, Y. Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxins production in immature grains of maize genotypes. *J. Food Sci. Eng.* **2013**, *3*, 688–698. [[CrossRef](#)]
104. FAO (Food and Agriculture Organization). Worldwide Regulations for mycotoxins in food and feed 2003. *FAO Food Nutr. Pap.* **2003**, *81*, 59.
105. Witaszak, N.; Waśkiewicz, A.; Bocianowski, J.; Stepień, E. Contamination of pet food with mycobiota and *Fusarium* mycotoxins—focus on dogs and cats. *Toxins* **2020**, *12*, 130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. EU (European Union). Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. *Off. J. Eur. Communities* **2003**, *46*, 33–37.

10.2. ANEXO B. ARTÍCULO NÚMERO DOS ENVIADO

Contaminación de alimento comercial seco para perro por *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en el centro de México

***Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of commercial dry dog feed in central Mexico**

Lizbeth Martínez-Martínez^a, Arturo Gerardo Valdivia-Flores^{a*}, Teódulo Quezada-Tristán^a, Alma Lilián Guerrero-Barrera^b, Erika Janet Rangel-Muñoz^a, Karla Isela Arroyo Zúñiga^a, Fernanda Álvarez-Días^a, Marcelo Lisandro Signorini-Porchietto^c

^a Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad 940, Col Cd. Universitaria, 20131, Aguascalientes, Ags., México.

^b Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas.

^c Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Ruta Nacional 34 km 227-2300, Rafaela– Santa Fe, Argentina.

Resumen

El alimento comercial seco (ACS) para perro es una ración integral completamente mezclada y troquelada con calor y presión para darle forma de croqueta. El ACS está formulado con diversos ingredientes y subproductos agroindustriales de origen agrícola y pecuario. Se ha demostrado que la contaminación por *Aspergillus flavus* y por aflatoxinas (AFs) en los alimentos es un problema global que causa daños a la salud humana y animal. El objetivo fue evaluar la presencia de microflora fúngica y la contaminación por AFs en el ACS. Se seleccionó una muestra aleatoria (n=77) de ACS

comercializado en Aguascalientes, México. Las muestras fueron procesadas y cultivadas por diluciones seriadas, obteniendo aislados monospóricos, los cuales se caracterizaron morfológica, toxigénica (HPLC) y molecularmente (PCR). La concentración de AFs en ACS se cuantificó por HPLC. En el 48.0% de ACS se observó crecimiento fúngico y 8.0% superaron el límite máximo permisible (LMP= 10^6 UFC/g). Se encontraron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Alternaria* y *Fusarium* (69.4, 12.9, 9.4, 4.7, 1.7 y 1.1%, respectivamente). Todas las muestras de ACS mostraron contaminación por AFs (14.8 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el 11.8% excedió el LMP ($20.0 \mu\text{g}/\text{kg}$) sugerido por la normatividad; la contaminación se asoció significativamente ($p < 0.05$) con algunos ingredientes empleados, humedad del ACS e inclusión de fungicidas y secuestrantes. Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de elaboración del ACS no elimina completamente la contaminación por hongos ni por las AFs presentes en los ingredientes empleados para su formulación; en consecuencia, se trasladan al producto terminado poniendo en riesgo la salud de los perros y la eficacia de la cadena alimenticia.

Palabras clave: Micotoxinas, Alimento seco, *Fusarium*, Zearalenona, Cadena alimenticia.

Abstract

Commercial dry feed (CDF) for dog is a whole feed ration, completely mixed and die-cut with heat and pressure to give it a croquette shape. ACS is formulated with various ingredients and agro-industrial by-products of vegetable and livestock origin. *Aspergillus flavus* and aflatoxin (AFs) contamination in food has been shown to be a global problem causing damage to human and animal health. The objective was to evaluate the presence of fungal microflora and AFs contamination in CDF. A random sample ($n=77$) of CDF

marketed in Aguascalientes, central Mexico, was selected. The samples were processed and cultured by serial dilutions (rose bengal+chloramphenicol and Czapeck), obtaining monosporic isolates, which were characterized morphologically, toxigenically (HPLC) and molecularly (PCR). The concentration of AFs in CDF was quantified by HPLC. Fungal growth was observed in 48.0% of CDF samples and 8.0% exceeded the maximum permissible level (MPL=10⁶ CFU/g). The genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Alternaria* and *Fusarium* were found (69.4, 12.9, 9.4, 4.7, 1.7 and 1.1%, respectively). All CDF samples showed AFs contamination (14.8±0.3 µg/kg) and 11.8% exceeded the MPL (20.0µg/kg) suggested by the regulations; contamination was significantly associated (p<0.05) with some ingredients used, relative humidity of the ACS and inclusion of fungicides and sequestrants. The results obtained suggest that the ACS manufacturing process does not eliminate fungal contamination or AFs present in the ingredients used for its formulation; consequently, they are transferred to the finished product, putting the health of the dogs and the efficiency of the food chain at risk.

Key words: Mycotoxins, Dry food, *Fusarium* spp., Zearalenone, Food chain.

Introducción

El alimento comercial seco (ACS) para perro es una ración integral completamente mezclada y troquelada mediante calor y presión en forma de croqueta; está compuesto por diversos productos y subproductos agroindustriales de origen agrícola y pecuario, por lo que son importantes como una salida frecuente de las cadenas de suministro agroindustrial ^(1,2). En México se ha popularizado el uso de ACS como un soporte para la integración del perro al estilo de vida urbana y por la diversidad de formulaciones nutricionales diseñadas para satisfacer tanto las necesidades raciales y etarias de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

animales, como para absorber los subproductos ofertados por la agroindustria nacional. En México, el Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal registra 22 fábricas que elaboran anualmente 1.3 miles de toneladas de ACS ⁽²⁾ lo cual se ve complementado con una oferta abundante de marcas internacionales.

En la fabricación del ACS se incorporan productos y subproductos agroindustriales de diversa composición bromatológica para cumplir sus requerimientos nutricionales ⁽³⁾. La calidad nutrimental y sanitaria de estos ingredientes se traslada a la formulación final, por lo que se ha señalado que además de amplias variaciones bromatológicas, el ACS presenta riesgos de contaminación por diversos agentes patógenos como los hongos micotoxigénicos ⁽⁴⁻⁶⁾. La contaminación fúngica ocurre en varias etapas de la producción de los ingredientes vegetales, como la floración, la cosecha, el procesamiento o el almacenamiento de cereales; así como también mediante la permanencia de los residuos metabólicos de las micotoxinas en la carne, los productos lácteos y en los huevos ^(5,7,8). Los géneros fúngicos toxigénicos más frecuentes encontrados en los ingredientes que se utilizan para formular de ACS son *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. ⁽⁹⁻¹¹⁾ Así mismo, las micotoxinas más frecuentes encontradas en los ingredientes alimenticios son las aflatoxinas (AFs), por lo que la presencia de estas micotoxinas representa un factor de riesgo para la salud de los animales y pérdidas económicas para la agroindustria porque reduce el valor nutricional del producto alimenticio ⁽⁴⁻⁶⁾.

La intoxicación de los perros por AFs ocasiona alteraciones hemodinámicas, digestivas y nerviosas, así como cambios en la bioquímica y capacidad de coagulación de la sangre de los perros, los cuales son especialmente sensibles a las AFs porque naturalmente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tienen una actividad reducida de la enzima glutatión S transferasa (GST), primordial para la ruta de detoxificación de xenobióticos ⁽¹²⁾. Aunque no existen límites máximos permisibles (LMP) específicos para AFs en el ACS para perro ⁽⁵⁾, se ha sugerido emplear los LMP establecidos para los alimentos destinados a otros animales de granja ⁽¹³⁾, especialmente los niveles adoptados por las legislaciones locales, tomando en consideración los lineamientos del *Codex Alimentarius* o de la Comunidad Europea (20 ó 5.0 µg/kg, respectivamente) ^(13,14).

Los informes de brotes de formas clínicas por intoxicación de AFs en perros son escasos, pero su distribución geográfica es muy diversa: América del Norte, América Latina, Asia y África ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Esto coincide con una distribución mundial de los hongos toxigénicos tanto en el ACS como en los ingredientes con que se elaboran ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. Además, la forma de expender el ACS en bolsas o sacos usualmente grandes permite potenciar la concentración de AFs, debido a que el perro debe ingerir todo el contenido que se encuentra en cada bolsa, pero las esporas y las toxinas fúngicas son resistentes al proceso de fabricación ⁽²⁰⁾. En síntesis, la presencia de hongos toxigénicos y sus toxinas puede considerarse un grave problema para que el perro pueda desarrollar adecuadamente su función zotécnica como animal de compañía, guardián o deportivo, así como un área de oportunidad para la agroindustria nacional e internacional. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de microflora fúngica y la contaminación por AFs en el ACS para perro.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

El estudio se realizó en Aguascalientes, México (22°27'35"- 21°37'20" N; 101°50'07" - 102°52'27" O). El clima es semiseco con temperatura media anual de 18 °C; con una precipitación pluvial media de 526 mm y el periodo principal de lluvias en verano ⁽²¹⁾. Se obtuvo una relación de centros comerciales, tiendas de mascotas, veterinarias y tiendas de abarrotes que registraban el expendio de ACS y se realizó una visita a para obtener información de las marcas y tipos que se vendían en los establecimientos. Se encontraron un total de 145 tipos de ACS (Cuadro 1), los que fueron considerados como un marco de muestreo. El tamaño de la muestra se calculó en 58 tipos de ACS mediante la fórmula siguiente para estimar proporciones en una población finita⁽²²⁾:

$$n = \frac{NZ^2pq}{Nd^2 + Z^2pq}$$

Donde: n = Tamaño de muestra (58); N= Tamaño de la población (145 tipos de ACS); Z = Valor distribución normal estándar (1.96); p = Prevalencia o proporción esperada de la contaminación con *Aspergillus* spp. o con AFs en el ACS, se utilizó un valor de proporción p = 0.5, q = 1-p; d = Precisión deseada (máximo error = 0.10).

La selección de las muestras se realizó mediante la técnica de muestreo bola de nieve ⁽²³⁾; para lo cual se visitaron sucesivamente los establecimientos en orden alfabético y se adquirieron muestras expandidas de ACS. La adquisición del ACS se suspendió cuando en tres comercios sucesivos se encontraron los mismos tipos que habían sido adquiridos previamente. Finalmente, fueron adquiridos 77 tipos diferentes de ACS (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características del alimento comercial seco para perro comercializados en el centro de México

Tipo de alimento	Oferta (N)	Muestreo (n)	(n/N%)	Proteína (mín. %)	Humedad (máx. %)	Fibra (máx. %)	Precio *US\$/kg±(EE)
Origen							
Nacional	120	64	53.3	24.0	11.0	4.0	3.9 ^b ±0.24
Internacional	25	13	52.0	26.0	11.0	4.0	5.9 ^a ± 0.92
Clasificación comercial							
Estándar	87	52	59.8	22.0	12.0	5.0	2.6 ^b ± 0.17
Premium	58	25	43.1	27.0	11.0	4.0	7.7 ^a ± 0.37
Prescripción (Edad)							
Cachorro	55	27	49.1	27.0	11.0	4.0	5.1 ^a ± 0.45
Adulto	90	50	55.6	22.0	11.0	4.0	3.7 ^b ± 0.30
Prescripción (Talla)							
General	72	43	59.7	22.0	12.0	5.0	2.2 ^a ± 0.10
Específica	73	34	46.6	26.0	11.0	4.0	6.8 ^a ± 0.39
Total	145	77	53.1				

*Precio en dólares americanos de referencia (www.banxico.org.mx: enero 2020)

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

La clasificación del tipo de ACS se registró de acuerdo con la prescripción (edad y talla) y comercial (estándar y premium) declarada por el fabricante. La composición de los ACS fue registrada a partir de la información nutricional informada por el fabricante para identificar los ingredientes empleados. Se clasificaron los ACS por la presencia o ausencia de cereales, oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas tubérculos, subproductos de origen animal, fungicidas e ingredientes con capacidad secuestrante y tipo de ACS.

Manejo de las muestras

Las muestras se secaron en una estufa con circulación forzada de aire y se pulverizaron (500-800 μm) en un molino universal de funcionamiento continuo y fueron almacenadas dentro de bolsas selladas en refrigeración (4-5 °C) hasta su procesamiento (<2 semanas). El aislamiento fúngico se realizó la técnica de placas de dilución en serie para el recuento de colonias fúngicas en el ACS. Las muestras de diluyeron (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y las siembras se realizaron en agar rosa de bengala + cloranfenicol y Czapeck. El periodo de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incubación en la oscuridad fue entre 27–30 °C durante siete días ⁽²⁴⁾. Se hicieron preparaciones de las colonias fúngicas con tinción azul de algodón con lactofenol ⁽²⁵⁾. La identificación de los aislamientos se hizo con las características morfológicas macroscópicas y microscópicas ^(18,19,26).

Análisis molecular

La extracción de ADN genómico se obtuvo de aislamientos monospóricos congruentes con la morfología de *A. flavus*. mediante métodos estandarizados previamente ⁽²⁷⁾. Se usó la técnica de electroforesis en gel de agarosa (1%) para verificar la calidad del ADN obtenido. Las muestras de ADN se depositaron en el gel con buffer de carga (Platinum™ II Green PCR Buffer 5X Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se colocaron en una cámara electroforética con buffer de carga (TAE 1, 95 voltios, 40 min). Las bandas resultantes se observaron en un fotodocumentador de imágenes con el software Quantity One (versión 4.6.7.).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó para amplificar los fragmentos de ADN genómico en la región de los espaciadores internos de la transcripción (ITS1-5.8S-ITS2- RNAr), el gen de la calmodulina (CaM) y el gen iniciador de la vía biosintética de la aflatoxina (*aflR*) siguiendo los protocolos descritos previamente ^(28,29). Se emplearon los siguientes iniciadores para ITS1, ITS4; CMDA7-F, CMDA8-R; aflR-F, aflR-R: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 5'-TCCTCCGCTTATTGATATG -3'; 5'-GCCAAAATCTTCATCCGTAG-3', 5'-ATTTTCGTTTCAGAATGCCAGG-3'; 5'-GGGATAGCTGTACGAGTTGTGCCAG-3', 5'-TGGKGCCGACTCGAGGAAYGGGT-3' (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Para la amplificación se utilizó la enzima Taq-polimerasa Platinum Green Hot Start PCR 2X Máster Mix (Thermo Fisher Scientific) y las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador. La calidad de los productos de PCR (ITS, CaM y *AflR*) se verificó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el primer carril del gel se incluyó una escalera con marcador de peso molecular (1.0 μ L escalera de ADN de 100 pb, 0.5 μ g/ μ L. Invitrogen ADN Ladder) junto con 1.0 μ L del buffer (BlueJuice Gel Loading Buffer 10X). Las bandas se visualizaron en el fotodocumentador de imágenes con el software Quantity One (versión 4.6.7.). Los productos de PCR se purificaron con el reactivo de limpieza ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Afflymetrix, Thermo Fisher Scientific Inc. Santa Clara, California, EUA).

Cuantificación de Micotoxinas

La cuantificación de la concentración de AFs se realizó por duplicado de acuerdo con el método oficial AOAC 990.33⁽³⁰⁾. El contenido de las AFs se extrajo utilizando tubos de fase sólida (SPE; SupelcleanTM LC-18 SPE tube, Sigma-Aldrich, USA), metanol:agua, ácido acético, tetrahidrofurano (THF) y hexano. La derivatización de los extractos se realizó con ácido trifluoroacético; se inyectó en un sistema de HPLC con detector de fluorescencia (Varian Pro Star binary pump; FP detector 2020, Varian Associates Inc., Victoria, Australia), columna C18 y protector de columna (LC- 18 and LC-18; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las estimaciones de AFs se obtuvieron con ayuda de un software (Galaxie Ver. 1.9.302.530) y las concentraciones se calcularon utilizando curvas estándar de AFs purificadas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

El ACS también se analizó según las instrucciones del fabricante para las micotoxinas siguientes: zearalenona (ZEA), ocratoxina (OTA), fumonisinas (FUM) y deoxinivalenol

(DON) mediante análisis de ELISA indirecta (Ridascreen Fast: Zearalenon R5502, Fumonisin R5602, Ochratoxin A R5402, Deoxynivalenol R5902, R-Biopharm, Alemania).

Análisis estadístico

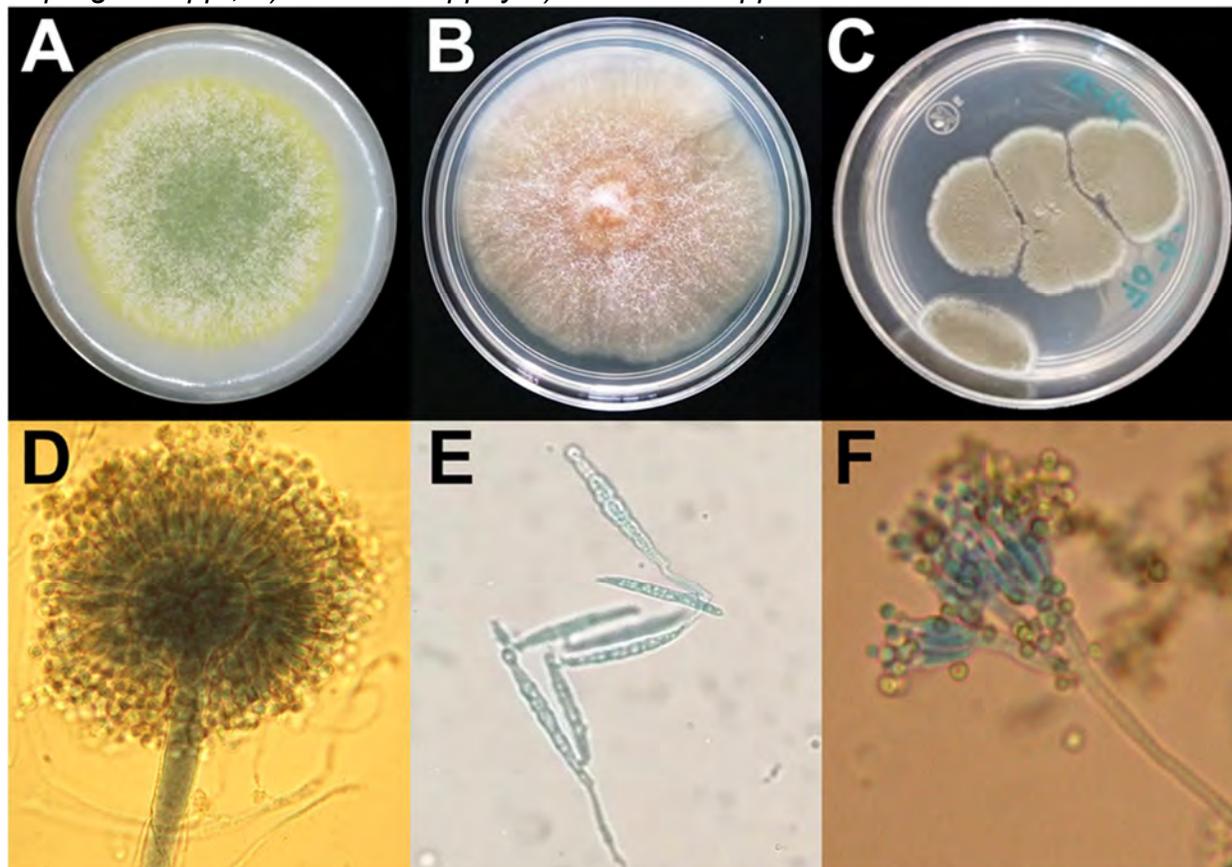
Los datos fueron analizados aplicando una prueba de normalidad con el método de Kolmogórov-Smirnov a un nivel de confianza del 95%. La comparación de las medias muestrales para cada variable se realizó mediante la prueba de Tukey (HSD) con un software estadístico (Statgraphics Centurion, versión 16.1.03). Para identificar el riesgo de superar el LMP establecido para la concentración de AFs se realizó la prueba de Chi-cuadrada (χ^2) de la razón de probabilidades o razón de momios (RM), calculando la porción de ACS que excedió el LMP para la concentración de AFs y que estuvo expuesta a un factor específico (formulación con la inclusión de cereales, oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas, tubérculos, subproductos de origen animal, fungicidas e ingredientes con capacidad secuestrante y tipo de ACS) dividida entre la porción de ACS que excedió el LMP para la concentración de AFs pero que no estuvo expuesto a ese factor específico. En todos los análisis se consideró un nivel de probabilidad de $p < 0.05$.

Resultados

La mayoría de los ACS adquiridos (82.8%) fueron elaborados por fabricantes nacionales, mientras que el 17.2% fueron ACS elaborados por marcas comerciales internacionales (Cuadro 1). Se encontró que poco más de la mitad de las muestras de ACS (41/77 = 53.2 %) presentó contaminación fúngica, mientras que el 7.8 % (6/77) contenían una concentración de hongos superior a los niveles máximos recomendados (10^6 UFC/g). Se obtuvieron un total de 85 aislamientos fúngicos purificados, los cuales el mostraron características morfológicas correspondientes con los principales géneros toxigénicos

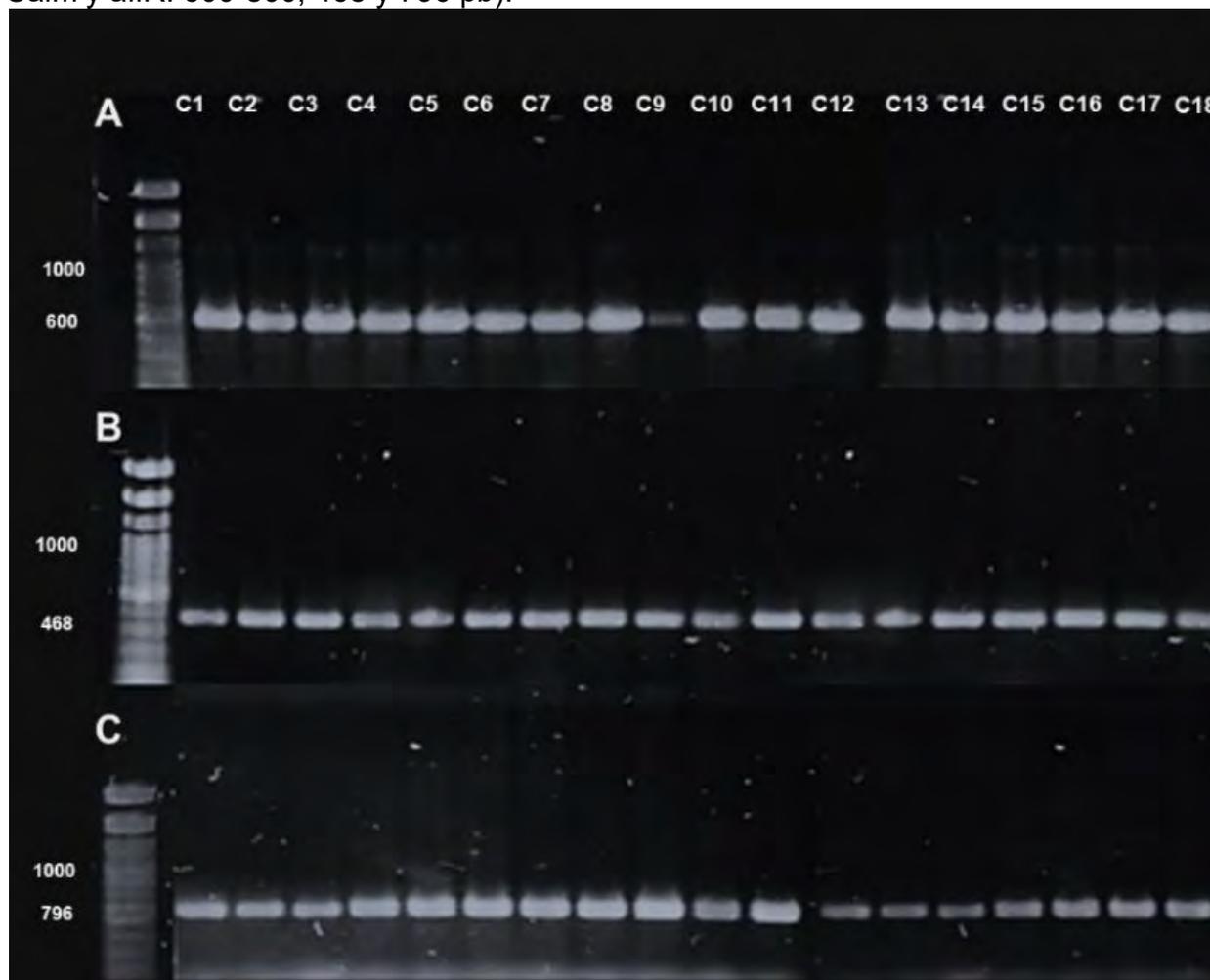
siguientes (Figura 1): *Aspergillus* spp. (69.4 %), *Fusarium* spp. (1.1 %) y *Penicillium* spp. (12.9 %). También se identificaron aislados con morfología correspondiente a los géneros *Cladosporium* spp., *Mucor* spp. y *Alternaria* spp (9.4, 4.7 y 1.7 %, respectivamente).

Figura 1. Estructura morfológica macroscópica y microscópica (40x) de los aislados monospóricos. *Páneos:* A) *Aspergillus* spp., B) *Fusarium* spp., C) *Penicillium* spp., D) *Aspergillus* spp., E) *Fusarium* spp. y F) *Penicillium* spp.



De los aislados *Aspergillus* spp., el 40.7% (24/59) correspondieron a la morfología de *A. flavus* ⁽¹⁹⁾; en el 75.0% (18/24) de los aislamientos de *A. flavus* demostró *in vitro* la capacidad de producción de aflatoxinas ($9.8 \pm 0.64 \mu\text{g/kg}$ en 7 días) y también expresaron los genes *CaM* y *aflR* y la región ITS (Figura 2) mediante el análisis de PCR.

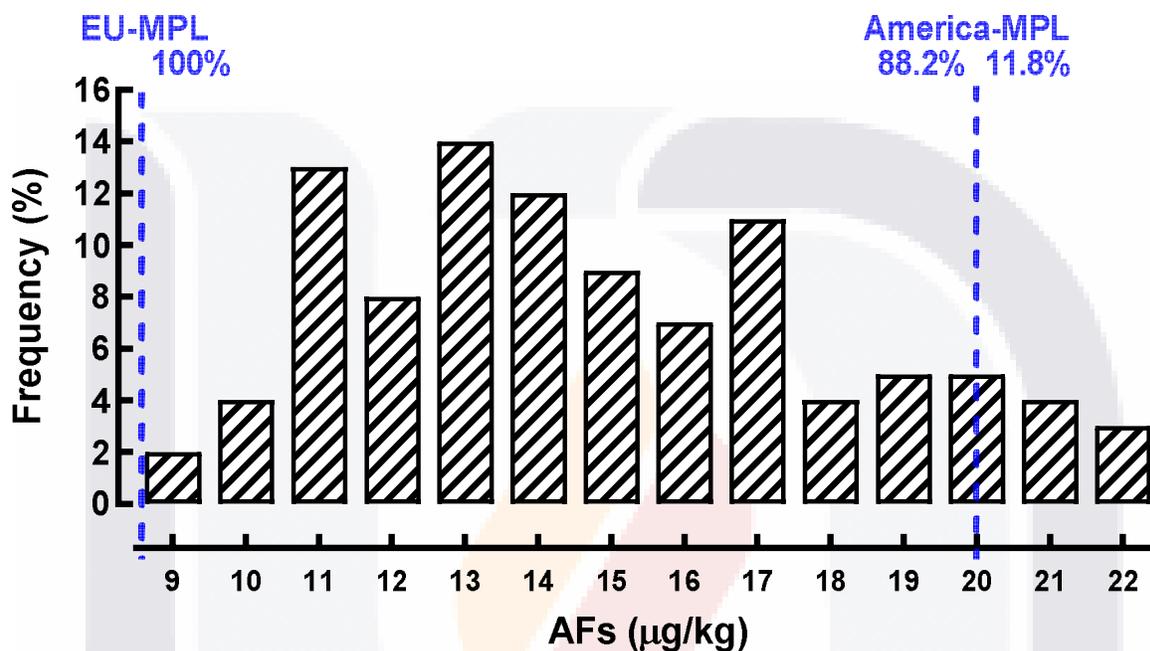
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR. Panel A: amplificación de la región de espaciadores internos de la transcripción (ITS). Panel B: amplificación de Calmodulina (Calm). Panel C: amplificación del gen iniciador de la vía biosintética de la aflatoxina (*aflR*). Marcador de peso molecular en pares de bases (ITS, Calm y *aflR*: 600-800, 468 y 796 pb).



Todas las muestras de ACS presentaron concentraciones detectables de AFs (Figura 3). La frecuencia de la concentración de AFs presentó una aproximación normal ($p=0.14$); la concentración mínima fue de 8.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y concentración máxima de 22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$; se estimó una concentración media de $14.8 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$, con intervalo de confianza al 95.0% de 14.2-15.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. También se detectó que aproximadamente uno de cada diez (11.8 %) de los ACS analizados sobrepasó el LMP de AFs recomendado por la mayoría de las

legislaciones de países de América para el uso de cereales (20 µg/kg) ⁽³¹⁾, mientras que todos los ACS rebasaron las recomendaciones europeas (5.0 µg/kg) ⁽¹⁴⁾.

Figura 3. Frecuencia de la concentración de aflatoxinas (AFs) en alimento comercial seco para perro en el centro de México. (MPL máximo permissible level) LMP, Límite máximo permissible: América (20 µg/kg); Unión Europea (5.0 µg/kg).



Las concentraciones de OTA, FUM y DON (datos no mostrados) estuvieron por debajo de los límites de detección; mientras que las concentraciones estimadas de ZEA (228 ± 13.8 µg/kg) en ningún caso sobrepasaron el LMP (400 µg/kg) que se sugiere para regular esta micotoxina ⁽³¹⁾. En este estudio no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la concentración de AFs las características generales del ACS, como el origen, la clasificación comercial (estándar o premium) ni la prescripción por edad o talla del perro; tampoco se detectó alguna asociación estadística que permitiera identificar estas características como factores de riesgo que generen concentraciones por arriba del LMP (Cuadro 2).

Cuadro 2. Asociación entre las características del alimento comercial seco para perro y la concentración de aflatoxinas

Tipo de alimento	(n)	Media (µg/kg)	±EE	>LMP (%)	Valor P (χ ²)	RM
Origen						
Nacional	64	15.0 ^a	±0.32	12.5	0.49	1.71
Internacional	13	13.9 ^a	±0.61	7.7		
Clasificación comercial						
Estándar	52	15.1 ^a	±0.34	11.5	0.93	0.95
Premium	25	14.2 ^a	±0.50	12.0		
Prescripción (Edad)						
Cachorro	27	15.0 ^a	±0.48	18.5	0.05	2.6
Adulto	50	14.7 ^a	±0.35	8.2		
Prescripción (Talla)						
General	43	15.3 ^a	±0.38	14.0	0.32	1.7
Específica	34	14.2 ^a	±0.42	8.8		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permissible (20 µg/kg); P(χ²): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios

La concentración promedio de AFs en los ACS presentó diferencias significativas asociadas con características del ACS y con los ingredientes empleados. El ACS con humedad mayor a 10 % mostró una concentración estimada de AFs significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la en los ACS que contenían humedad menor. También se detectó un riesgo significativo (RM $\chi^2 p < 0.05$) tres veces mayor de encontrar concentraciones por arriba del LMP en aquellos ACS que registraron humedad mayor a 10% (Cuadro 3) en relación con los ACS que tenían humedad menor 10 %. Aunque se detectó un mayor riesgo también para los ACS que en su formulación contenían una mayor concentración de proteína, grasa y cenizas (>22, >12 y >7%, respectivamente), la asociación estadística no fue significativa ($p > 0.05$).

Cuadro 3. Asociación entre el análisis bromatológico del alimento comercial seco para perro y la concentración de aflatoxinas

Característica	(n)	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$\pm\text{EE}$	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Humedad relativa						
>10%	31	17.4 ^a	± 0.36	19.4	0.01	3.4
$\leq 10\%$	46	13.0 ^b	± 0.29	6.5		
Proteína						
>22%	47	14.9 ^a	± 0.36	14.9	0.12	2.5
$\leq 22\%$	30	14.7 ^a	± 0.46	6.7		
Grasa						
>12%	22	14.9 ^a	± 0.53	18.2	0.11	2.2
$\leq 12\%$	55	14.8 ^a	± 0.34	9.1		
ELN						
Presente	47	14.4 ^a	± 0.52	12.8	0.78	1.1
Ausente	107	15.0 ^a	± 0.34	11.2		
Fibra						
>4%	30	15.2 ^a	± 0.46	13.3	0.61	1.3
$\leq 4\%$	47	14.5 ^a	± 0.36	10.6		
Ceniza						
>7%	38	15.5 ^a	± 0.40	15.8	0.11	2.3
$\leq 7\%$	39	15.1 ^a	± 0.39	7.7		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permissible (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); P(χ^2): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios; ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.

La concentración promedio de AFs en los ACS que contenían trigo fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la concentración estimada de AFs en los ACS que no utilizaron este ingrediente (Cuadro 4). Sin embargo, al calcular el riesgo de exceder el LMP no hubo una asociación significativa ($p > 0.05$) entre la proporción de los ACS que contenían trigo y los que no lo incluyeron en su formulación. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las medias de concentración de AFs en presencia o ausencia de algún subproducto de origen animal en los ACS (Cuadro 4). Sin embargo, si se detectó una asociación significativa ($p < 0.05$, χ^2) en la proporción de ACS que excedieron el LMP entre los ACS que presentaron en su formulación harina y aceite de pescado, en comparación con los que no los incluyeron; por lo cual el riesgo (RM) de encontrar

concentraciones por arriba del LMP fue más tres veces que en los ACS que registraron ausencia de los ingredientes. La totalidad de las muestras adquiridas emplearon harina de carne y hueso en la formulación del ACS, por lo que no se pudo establecer ninguna asociación con estos ingredientes.

Cuadro 4. Asociación entre la concentración de aflatoxinas y la inclusión de alimentos y subproductos agroindustriales en alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media ± EE (µg/kg)	>LMP (%)	Valor P (χ ²)	RM
Trigo					
Presente	47	15.5 ^a ± 0.35	12.8	0.60	1.3
Ausente	30	13.8 ^b ± 0.44	10.0		
Cebada					
Presente	22	15.5 ^a ± 0.53	18.2	0.11	2.2
Ausente	55	14.5 ^a ± 0.33	9.1		
Maíz					
Presente	55	15.0 ^a ± 0.34	9.1	0.11	0.45
Ausente	22	14.3 ^a ± 0.53	18.2		
Arroz					
Presente	38	15.2 ^a ± 0.40	13.2	0.57	1.4
Ausente	39	14.4 ^a ± 0.40	10.3		
Oleaginosas					
Presente	27	15.1 ^a ± 0.48	14.8	0.37	1.6
Ausente	50	14.6 ^a ± 0.35	10.0		
Aceite vegetal					
Presente	38	14.8 ^a ± 0.41	13.2	0.57	1.3
Ausente	39	14.8 ^a ± 0.40	10.3		
Leguminosas					
Presente	49	14.8 ^a ± 0.36	12.2	0.77	1.1
Ausente	28	14.8 ^a ± 0.47	10.7		
Tubérculos					
Presente	45	14.9 ^a ± 0.37	13.3	0.45	1.5
Ausente	32	14.7 ^a ± 0.44	9.4		
Huevo y leche					
Presente	27	15.1 ^a ± 0.48	18.5	0.05	2.6
Ausente	50	14.7 ^a ± 0.35	8.0		
Harina y aceite de pescado					
Presente	31	15.3 ^a ± 0.45	19.4	0.01	3.4
Ausente	46	14.5 ^a ± 0.37	6.5		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)

Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permisible (20 µg/kg); P(χ²): Prueba chi-cuadrado (<0.05); RM: Razón de momios

Los ACS que contenían fungicidas o agentes secuestrantes minerales de micotoxinas mostraron concentración media de AFs significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación a la concentración estimada de AFs en los ACS donde no fueron incluidos estos aditivos (Cuadro 5). Además, se detectó una asociación protectora significativa ($p < 0.05$, χ^2) al comparar la proporción de ACS que excedieron el LMP pero que no incluyeron estos componentes y aquellos que sí los agregaron a su formulación, por lo cual el riesgo (RM) de presentar concentraciones por arriba del LMP fue menor que en los ACS que incluyeron fungicidas o agentes secuestrantes.

Cuadro 5. Asociación entre la inclusión de fungicidas y agentes secuestrantes con la concentración de aflatoxinas en el alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media \pm EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	>LMP (%)	Valor de P (χ^2)	RM
Fungicidas					
Presente	46	13.5 ^a \pm 0.33	6.5	0.01	0.29
Ausente	31	16.7 ^b \pm 0.40	19.4		
Adsorbentes orgánicos					
Presente	43	14.7 ^a \pm 0.38	9.3	0.30	0.59
Ausente	34	14.9 ^a \pm 0.43	14.7		
Secuestrantes minerales					
Presente	43	13.9 ^a \pm 0.36	7.0	0.04	0.35
Ausente	34	15.9 ^b \pm 0.41	17.7		

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($p < 0.05$)
 Abreviaturas: EE: Error estándar; LMP: Límite Máximo Permissible; $P(\chi^2)$: Prueba chi-cuadrado (<0.05);
 RM: Razón de momios

Discusión

El alimento comercial seco o croqueta ha representado un elemento clave para la incorporación de los perros al estilo de vida urbano y también ha representado un importante mercado para muy diversas cadenas agroindustriales ⁽²⁾. Al igual que en otros productos de origen agrícola y animal, la contaminación por microflora fúngica y por micotoxinas es prácticamente inevitable ⁽⁸⁾. En el presente estudio se detectó la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contaminación por *Aspergillus flavus* toxigénico en un tercio ($18/77 = 31.2 \%$) de una muestra aleatoria de ACS, así como una concentración detectable de aflatoxinas en la totalidad de las muestras; además, el 11.8% de los ACS rebasaron el límite máximo permisible de AFs ($20.0 \mu\text{g}/\text{kg}$) sugerido por la normatividad ⁽³¹⁾. En nuestro conocimiento, este hallazgo no ha sido reportado previamente en México y es importante, porque la contaminación por AFs pone en riesgo la salud de los perros y el desarrollo adecuado de su función zotécnica (compañía, guardia, trabajo, etc.) por el que son criados ⁽³²⁾. así como también afecta económicamente a las ramas agroindustriales que proveen los ingredientes, al alterar la inocuidad del producto y deteriorar su valor económico y nutricional.

En este estudio se encontró que los ACS presentaron concentraciones bajas a moderadas de otras micotoxinas. Los niveles de OTA, FUM y DON se estimaron por debajo de los límites de detección. La concentración de ZEA alcanzó concentraciones cercanas a la mitad (57.0%) del nivel máximo permisible empleado en los países europeos que regulan esta micotoxina ($400 \mu\text{g}/\text{kg}$) ⁽³¹⁾; sin embargo, este hallazgo de ausencia de concentraciones importantes de micotoxinas diferentes a las AFs no garantiza que dichos contaminantes no pudieran estar presentes en otras circunstancias, porque las micotoxinas son contaminantes usuales en los cereales que se emplean como ingredientes comunes en la fabricación de alimento para perros ⁽³³⁾; lo anterior sugiere que la fabricación de ACS debe tener un manejo adecuado debido a la gravedad de la contaminación por micotoxinas ⁽³⁴⁾.

Aunque la información sobre la presencia de *A. flavus* y AFs en diversos ingredientes de la alimentación humana es extensa, los estudios de contaminación en el ACS son

escasos, a pesar de estar formulados con ingredientes similares. En este estudio, *Aspergillus* spp., fue el género detectado con mayor frecuencia (69.4%) en el ACS, lo cual concuerda con diversos autores ^(9,11,35) que identificaron en otros países los mismos géneros fúngicos contaminantes del ACS para perro. En el presente estudio se encontró microflora fúngica en el 53.2 % de las muestras y el 7.8 % rebasó la concentración máxima de hongos (5000 UFC/g) sugerida como máxima permisible ⁽³⁶⁾. La confirmación de la identidad de los aislamientos con morfología de *A. flavus* se logró mediante la amplificación de los genes y regiones génicas (ITS, CaM y *aflR*) lo cual se ha propuesto como un código de barras predeterminado para la identificación de estos hongos con la capacidad de producción de AFs ^(37,38). Estos hallazgos sugieren que la persistencia de formas activas de los hongos con capacidad toxigénica significa un riesgo adicional, ya que si los procesos usuales de elaboración de la croqueta no son capaces de destruir la microflora fúngica, cuando cambian las condiciones ambientales (actividad del agua y temperatura) por apertura de los sacos donde se almacena el producto terminado, las esporas y esclerocios del *A. flavus* pueden originar formas vegetativas nuevas con capacidad de utilizar los sustratos alimenticios, producir aflatoxinas e incrementar la concentración preexistente en el ACS ⁽³⁹⁾. Además, la cantidad usual de ACS contenido en el saco es suficiente para una duración de varios días o semanas en las que el perro tiene que consumir todo el material, independientemente de su calidad e inocuidad.

En este estudio se encontró una asociación significativa entre algunas características del ACS y la concentración detectada de AFs, lo cual fue reforzado con la estimación del incremento en el riesgo de sobrepasar el LPM. Especialmente la humedad relativa superior al 10% mostró tres veces más el riesgo de presentar concentraciones por arriba

del LMP en comparación con alimentos con una humedad relativa inferior (Cuadro 3). Este hallazgo coincide con otros estudios que informan que la actividad del agua presente en la matriz alimenticia es un factor relevante para la expresión de los genes reguladores de la ruta de biosíntesis de AFs ⁽⁴⁰⁾. Por lo que, si el sustrato contiene mayor humedad o se rehidrata durante su almacenamiento, las concentraciones de AFs pueden aumentar. Este resultado podría atribuirse a que la materia prima extruida para la formulación de ACS presenta en la etapa inicial del proceso un exceso de contenido de humedad relativa (20-25%) y aunque se reduce por secado hasta niveles bajos (8-12%), solo se inhibe el crecimiento de las formas vegetativas de la microflora fúngica, pero sus esporas y micotoxinas producidas dentro del material procesado permanecen estables ⁽⁴⁰⁾.

Los resultados de este estudio también mostraron que hubo mayor contaminación por AFs en presencia de algunos componentes de la fórmula empleada en la fabricación. Especialmente, los ACS que contenían trigo o harina y aceite de pescado presentaron concentraciones mayores de AFs y un mayor riesgo de sobrepasar el LMP. En el caso de los cereales, la contaminación se ha atribuido a la exposición de los cultivos en varias etapas de la producción (floración, cosecha, transporte, procesamiento o almacenamiento) ^(7, 40,41). Estos ingredientes son ampliamente utilizados como fuente de carbohidratos, fibra, proteínas, grasas, minerales y vitaminas ⁽⁴²⁾; por otra parte, la harina y el aceite de pescado son productos resultantes del procesamiento de pescados enteros o subproductos (cocción, prensado, deshidratación y molienda) y constituyen una fuente de proteína rica en ácidos grasos de alto valor nutricional (ácido eicosapentaenoico, docosahexaenoico y omega-3) ⁽⁴³⁾. Estos ingredientes se incluyen en las fórmulas por su bajo costo y porque mantienen un valor nutricional aceptable para la fisiología del perro,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

además, su inclusión no afecta la palatabilidad y digestibilidad de los nutrientes ⁽³⁴⁾. Lo que sugiere que la contaminación por AFs puede ser común en los ACS con presencia de cereales o subproductos de pescado ^(44,45). Por lo cual, se debiera garantizar la calidad de estos ingredientes, hacer un manejo adecuado y un manejo proceso eficaz del producto terminado para asegurar la protección contra la contaminación por AFs ⁽⁴⁶⁾.

Los resultados de este estudio mostraron que los ACS que incluyeron fungicidas o secuestrantes minerales en su formulación tuvieron tanto una menor concentración media de AFs como un menor porcentaje de AFs por encima del LMP ($p < 0.05$) en comparación con los que no los incluyeron, lo cual sugiere una asociación protectora de estos agentes contra el riesgo de una contaminación por AFs superior al LMP. Este hallazgo coincide con la idea sugerida de que el empleo de los agentes fungicidas y secuestrantes son métodos útiles para reducir los efectos tóxicos de las AFs, ya que los fungicidas tienen un efecto inhibitor del crecimiento de los hongos por acidificación de su contenido citoplásmico ⁽⁴⁷⁾; mientras que los secuestrantes minerales ejercen su asociación protectora mediante la quimisorción β -dicarbonilo de las AFs, lo que reduce su biodisponibilidad mediante absorción gastrointestinal ^(48,49).

De forma sorpresiva, en este estudio no se encontró asociación ($p > 0.05$) entre la concentración de AFs o la proporción que sobrepasaban el LMP sugerido por la normatividad (Cuadro 2) contra algunas características consideradas como evidencia de calidad por los usuarios (alimentos premium, origen internacional o mayor precio). Lo anterior sugiere que la confianza del consumidor se basa en otros criterios diferentes a la inocuidad del ACS, como difusión mercadotécnica, supuesta asociación entre calidad y precio, palatabilidad o apariencia.

Conclusión

En el presente estudio se detectó una contaminación considerable por *Aspergillus flavus* toxigénico, así como una concentración importante de aflatoxinas en la totalidad de las muestras recolectadas en un muestreo aleatorio y representativo de alimento comercial seco para perro. Estos hallazgos sugieren que se encuentra en riesgo la salud de los perros, el desarrollo adecuado de su función zootécnica y también pudiera afectar a las ramas agroindustriales que proveen este pienso, al alterar la inocuidad del producto y deteriorar su valor económico y nutricional. Los resultados del estudio indicaron que algunas características bromatológicas y de la formulación empleada en la elaboración de los ACS generaron mayor riesgo de contaminación por hongos y por micotoxinas; de lo anterior se deduce que es necesario diseñar y aplicar estrategias más efectivas para verificar la inocuidad de los ingredientes y de los procesos utilizados en la fabricación del ACS. Además, debe fomentarse el establecimiento de niveles máximos permisibles de AF específicos para el ACS y la investigación sobre la exposición prolongada del perro a bajas concentraciones de micotoxinas.

Agradecimientos. Los autores desean agradecer el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT No. 738906) y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (proyecto No: PIP/SA 22-2).

Conflictos de interés. Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés potencial con respecto a la presente investigación, autoría y / o publicación de este artículo

Literatura citada

1. Carranza-Trinidad R, Valdivia-Flores AG. Supply chain: an input-output perspective. An example of application in the dairy products industry. *Int J Supply Chain Oper Resil* 2018; 3(3):236-247. doi: 10.1504/IJSCOR.2018.093258
2. CONAFAB (Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal). Producción pecuaria y alimento balanceado en México. México. 2021. ULR: <https://www.conafab.org/informativos/anuario-estadistico>
3. Beloshapka A, Buff PP, Fahey Jr GC, Swanson KS. Compositional analysis of whole grains, processed grains, grain co-products, and other carbohydrate sources with applicability to pet animal nutrition. *Foods* 2016;5(2):23. doi:10.3390/foods5020023
4. Castaldo L, Graziani G, Gaspari A, Izzo L, Tolosa J, Rodríguez Y, Ritieni A. Target analysis and retrospective screening of multiple mycotoxins in pet food using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS *Toxins* 2019;11(8):434. doi:10.3390/toxins11080434
5. Fuentes S, Carvajal M, Ruiz S, Martínez N, Gómez A, Rojo F. Presence of mutagens and carcinogens, called aflatoxins, and their hydroxylated metabolites in industrialized food for dogs. *J Microb Biochem Technol* 2018;10(3):76-86. doi: 10.4172/1948-5948.1000399
6. Shao M, Li L, Gu Z, Yao M, Xu D, Fan W. Mycotoxins in commercial dry pet food in China. *Food Addit Contamb* 2018;11(4): 237-245. doi:10.1080/19393210.2018.1475425
7. Ott L, Appleton H, Shi H, Keener K, Mellata M. High voltage atmospheric cold plasma treatment inactivates *Aspergillus flavus* spores and deoxynivalenol toxin. *Food Microbiol* 2021; 95:103669. doi:10.1016/j.fm.2020.103669
8. Alshannaq A, Yu J. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Pub Health* 2017;14(6):632. doi:10.3390/ijerph14060632

9. Witaszak N, Stępień Ł, Bocianowski J, Wąskiewicz A. *Fusarium* species and mycotoxins contaminating veterinary diets for dogs and cats. *Microorganisms* 2019;7(1):26. doi:10.3390/microorganisms7010026
10. Hołda K, Wiczuk W, Hać-szymańczuk E, Głogowski, R. Comprehensive microbiological evaluation of dry foods for growing dogs marketed in Poland. *Anim Sci* 2017; 56(1):81-89. doi:10.22630/AAS.2017.56.1.10
11. Singh SD, Chuturgoon AA. A comparative analysis of mycotoxin contamination of supermarket and premium brand pelleted dog food in Durban, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 2017;88(1):1-6. doi:10.4102/jsava.v88i0.1488
12. Dereszynski D, Center S, Randolph J, Brooks M, Hadden A, Palyada, K, *et al.* Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005–2006). *JAVMA J Am Vet Med A* 2008;232(9):1329-1337 doi:10.2460/javma.232.9.1329
13. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations- World Health Organization). General standard for contaminants and toxins in food and feed. *Codex Alimentarius* 2019. Codex stan 193–1995. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf
14. Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. *Off J Eur Union* 2003; L 285: 33-37. <https://www.legislation.gov.uk/eudr/2003/100/adopted>

15. Reis-Gomes A, Marcolongo-Pereira C, Sallis E, Pereira D, Schild A, Faria R, Meireles M. Aflatoxicosis in dogs in Southern Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 2014;34(2):162-166. doi:10.1590/S0100-736X2014000200011
16. Arnot L, Duncan N, Coetzer H, Botha C. An outbreak of canine aflatoxicosis in gauteng province, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 2012;83(1):1-4. doi:10.4102/jsava.v83i1.2
17. Bruchim Y, Segev G, Sela U, Bdolah T, Salomon A, Aroch I. Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. *Res Vet Sci* 2012;93(1):279-287. doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.024
18. Álvarez-Días MF, Torres-Parga B, Valdivia-Flores AG, Quezada-Tristán T, Alejos-De La Fuente JI, Sosa-Ramírez J, Rangel-Muñoz EJ. *Aspergillus flavus* and total Aflatoxins Occurrence in dairy feed and aflatoxin M₁ in bovine milk in Aguascalientes, México. *Toxins* 2022;14(5): 292. doi:10.3390/toxins14050292
19. Rangel-Muñoz EJ, Valdivia-Flores AG, Moreno-Rico O, Hernández-Delgado S, Cruz-Vázquez C, De Luna-López MC, Quezada-Tristán T, Ortiz-Martínez R, Máyek-Pérez N. Characterization of *Aspergillus flavus* and quantification of aflatoxins in feed and raw milk of cows in Aguascalientes, Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu* 2020;11(2):435-454. doi:10.22319/rmcp.v11i2.5686
20. Martínez-Martínez L, Valdivia-Flores AG, Guerrero-Barrera AL, Quezada-Tristán T, Rangel-Muñoz, EJ, Ortiz-Martínez, R. Toxic effect of aflatoxins in dogs fed contaminated commercial dry feed: A Review. *Toxins* 2021;13(1): 65. doi:10.3390/toxins13010065
21. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). Anuario estadístico y geográfico de Aguascalientes. INEGI, Aguascalientes, 2017.

https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825092078.pdf

22. Segura-Correa JC, Honhold N. Métodos de muestreo para la producción y salud animal. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 2000. https://www.researchgate.net/publication/273945817_METODOS_DE_MUESTREO_PARA_LA_PRODUCION_Y_LA_SALUD_ANIMAL
23. Espinoza P, López R, Lozano S. Muestreo de bola de nieve. En Espinoza P, López R, Lozano S, Técnicas de muestreo. México: UNAM 2018:(2-4). <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-cesar-vallejo/sistemica/pdf-proyctofinal-bola-de-nieve-compress/28006947>
24. Santibáñez Escobar R, Martínez Ibarra JA, Tapia González JM, Avellaneda Cevallos JH, Hernández Gallardo M, Montañez Valdez OD. Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimento para bovinos. Cienc Tecnol 2011;4(1):19-23. doi:10.18779/cyt.v4i1.96
25. Leck, A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. Community Eye Health 1999; 12(30):24. <https://www.cehjournal.org/article/preparation-of-lactophenol-cotton-blue-slide-mounts/>
26. Klich MA. Identification of common *Aspergillus species*. First edition. Louisiana, USA: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; 2002.
27. Fani SR, Moradi M, Probst C, Zamanizadeh H, Mirabolfathy M, Haidukowski M, Logrieco A. A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio Orchards of Iran. Eur. J. Plant Pathol 2014;140:631-642. doi:10.1007/s10658-014-0499-1

28. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomon R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(9):3270-3273. doi:10.1128/aem.62.9.3270-3273.1996
29. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols*; Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Eds. Academic Press, Inc.: New York, NY, USA, 1990: 315-322. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
30. Scott PM. Mycotoxin methodology. *Food Addit Contam* 1995;12(3):395-403. doi:10.1080/02652039509374321
31. FAO (Food and Agriculture Organization). Worldwide Regulations for mycotoxins in food and feed 2003. *FAO Food Nutr paper* 81 2003:59. <https://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>
32. Case L, Carey D, Hirakawa D, Daristotle L. Feeding Management Throughout the Life Cycle. In Case L, Carey D, Hirakawa D, Daristotle L. *Canine and feline nutrition*. 3 ed. USA: Mosby. 2011: 191-294. doi:https://doi.org/10.1016/C2009-0-39175-8
33. Rodríguez M, Ramos A, Prim M, Sanchis V, Marín S. Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M₁ in milk. *Mycotoxin Res* 2019;36(1):11-22. doi:10.1007/s12550-019-00362-y
34. Tegzes J, Oakley B, Brennan G. Comparison of mycotoxin concentrations in grain versus grain-free dry and wet commercial. *Toxicol- Commun* 2019;3(1):61-66 doi:10.1080/24734306.2019.1648636
35. Błajet-Kosicka A, Kosicki R, Twarużek M, Grajewski J. Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry

and fluorescence detection. *Food Addit Contam B Part* 2014;7(4):302-308.
doi:10.1080/19393210.2014.933269

36. GMP (Good Manufacturing Practices + International B.V.). Specific Feed Safety Limits. GMP+ International. The Netherlands, 2021: 1-78.
<https://www.gmpplus.org/media/zuwj0gam/ts-1-5-specific-feed-safety-limits.pdf>

37. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hubka V, Perrone G, Seifert K.A, Susca A, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2014;78:141-173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004

38. Okayo RO, Andika DO, Dida MM, K'Otuto GO, Gichimu BM. Morphological and molecular characterization of toxigenic *Aspergillus Flavus* from groundnut kernels in Kenya. *Int J Microbiol* 2020, 2020, 8854718

39. Medina A, Akbar A, Baazeem A, Rodríguez A, Magan N. Climate change, food security and mycotoxins: Dowe know enough?. *Fungal Biol Rev* 2017;31(3):143-154.
doi:10.1016/j.fbr.2017.04.002

40. Chiewchan N, Mujumdar A, Devahastin S. Application of drying technology to control aflatoxins in foods and feeds: A Review *Dry Technol* 2015;33(14):1700-1707.
doi:10.1080/07373937.2015.1068795

41. Coppock RW, Christian RG, Jacobsen BJ. Aflatoxins. In Gupta RC. *Veterinary toxicology. Basic and clinical principles*. 3 ed. Hopkinsville, Kentucky, USA: Elsevier Inc.2018: 983–994. doi:10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6

42. Macías A, Rial C, Acosta A, Henríquez L, Almeida M, Rodríguez Á, et al. Risk assessment of the exposure to mycotoxins in dogs and cats through the consumption of commercial dry. *food Sci Total Environ* 2020;708:134592. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134592

43. Dillon G, Cardinal C, Keegan J, Yiannikouris A, Brandl W, Moran C. The analysis of docosahexaenoic acid (DHA) in dried dog food enriched with an *Aurantiochytrium limacinum* biomass: Matrix extension validation and verification of AOAC method 996.06. *Journal of AOAC International* 2021;104(1):68-77. doi:10.1093/jaoacint/qsaa097
44. Wan J, Chen B, Rao J. Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. *Compr Rev Food Sci F* 2020;19(3):928-953. doi:10.1111/1541-4337.12546
45. Alshawabkeh K, Alkhalailah NI, Abdelqader A, Al-Fataftah AR, Herzallah SM. Occurrence of aflatoxin B₁ in poultry feed and feed ingredients in Jordan using ELISA and HPLC. *Am-Eurasian J Toxicol Sci* 2015;7(4):316-20. doi:10.5829/idosi.ajejts.2015.7.4.10172
46. Shad Z, Ghavami M, Atungulu GG. Occurrence of aflatoxin in dairy cow feed ingredients and total mixed ration. *Appl Eng Agric* 2019;35(5):679-686. doi:10.13031/aea.13454
47. Atungulu G, Mohammadi-Shad Z, Wilson S. Mycotoxin issues in pet food. In Ricke S, Atungulu G, Rainwater C, Park S. Edits. *Food and feed safety systems and analysis*. 1st ed. Academic Press 2018: 25-44. doi:10.1016/B978-0-12-811835-1.00002-6
48. Di Gregorio M, de Neeff D, Jager A, Corassin C, de Pinho A, de Albuquerque R, *et al.* Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Rev* 2014;33(3): 125-135. doi:10.3109/15569543.2014.905604
49. Tomašević-Čanović M, Daković A, Rottinghaus G, Matijašević S, Đuričić M. Surfactant modified zeolites—new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous Mat* 2003;61(1-3): 173-180. doi:10.1016/S1387-1811(03)00365-2

10.3. ANEXO C. TÉCNICA DE VACIADO EN PLACA POR DILUCIÓN

Las muestras de croquetas previamente molidas se sembraron en medio de cultivo czapeck y rosa de bengala agar.

Para la preparación del medio rosa de bengala agar, se pesó en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA) 26.6 g de extracto de malta (Bioxon[®], BD Becton Dickinson, EUA), 20 g de agar-agar (Bioxon[®], BD Becton Dickinson, EUA) y 0.025 g de rosa de bengala, se diluyeron en un litro de agua destilada; el preparado se agitó hasta su ebullición.

La preparación del medio czapeck, se pesó en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA) 49 g de medio de cultivo Czapeck (Bioxon[®], BD Becton Dickinson, EUA), se diluyó en un litro de agua destilada; el preparado se agitó frecuentemente hasta su ebullición.

Las preparaciones se esterilizaron en una autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Los medios estériles se vaciaron en cajas petri estériles dentro de una campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2 (LVC-180, LuministellMR, México); se limpió la superficie de la campana con etanol al 75%, se introdujeron los medios de cultivo estériles, cajas de petri estériles, marcador permanente, tijeras y se dejó el material dentro de la campana de flujo laminar bajo luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

Se vació 15 ml de los medios en cada caja de petri, se dejó gelificar durante 20 minutos dentro de la campana para posteriormente tapar los medios, se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Para la preparación de peptona de caseína se pesó en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA) 1.0 g (Bioxon[®], BD Becton Dickinson, EUA) y se disolvió en un litro de agua destilada; se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, para obtener una solución estéril de peptona de caseína al 0.1%; se conservó en refrigeración para su almacenamiento hasta su uso.

Se pesó 10 g de las muestras molidas, se diluyeron en 90 ml de peptona de caseína al 0.1% para obtener una dilución de 1:10; de la dilución anterior se tomó 1 ml para depositarlo en un tubo estéril con 9 ml de peptona de caseína al 0.1% para obtener una dilución 1:100; de la dilución anterior se tomó 1 ml y se depositó en un tubo estéril con 9 ml de peptona de caseína al 0.1% para obtener la dilución 1:1000; finalmente se tomó un 1 ml de la dilución anterior y se depositó en un tubo estéril con 9 ml de peptona de caseína al 0.1% para obtener una dilución de 1:10000.

De cada dilución se sembraron 100µl en una caja petri con medio de cultivo rosa de bengala y otra con medio czapeck, se utilizaron seis perlas de vidrio y vigorosamente se agitaron 20 veces en diversas direcciones para esparcir sobre la superficie del agar los 100 µL; se retiraron las perlas de vidrio, se sellaron las cajas previamente identificadas y se incubaron en la oscuridad a 27°C durante un periodo de 5 a 7 días.

Las cajas se revisaron cada 24 horas hasta observar el crecimiento de las colonias y se registraron en una bitácora.

10.4. ANEXO D. IDENTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA MORFOLÓGICA MEDIANTE LA PREPARACIÓN DE TINCIÓN AZUL DE ALGODÓN CON LACTOFENOL

Previamente a las preparaciones, se limpió la campana de extracción con alcohol al 96%, El material requerido fue portaobjetos, cubreobjetos, agujas de disección, tinción azul de algodón con lactofenol y las colonias fúngicas que crecieron.

Se dejó el material dentro de la campana y con luz UV durante 15 minutos; posterior al tiempo, se tomó una torunda con alcohol para limpiar y flamear con ayuda de un mechero el portaobjetos en ambas superficies.

Las colonias fúngicas que crecieron en las cajas petri se identificaron con un número consecutivo. Se colocó una gota de azul de algodón con lactofenol en el centro del portaobjetos previamente desinfectado, con la aguja de disección se tomó una porción de la colonia de interés y se colocó sobre la gota del colorante, se extendió la preparación con ayuda de otra aguja de disección, se cubrió con un cubreobjetos previamente esterilizado.

Las preparaciones se identificaron con número de la muestra a la que pertenecerá la colonia, número de aislado, fecha de preparación e iniciales de quien realizó la tinción.

Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus, EUA) y se registraron en una bitácora.

Los aislados compatibles con morfología *Aspergillus flavus* se resembraron bajo las mismas medidas de esterilidad en una caja de petri con medio de cultivo czapeck, para lograr su purificación.

10.5. ANEXO E. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES POR LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA

De las muestras previamente molidas, se pesaron 5g de cada muestra en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA); se agregó 25ml de metanol al 70%; Se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

agitó vigorosamente durante 3 minutos; se filtró el extracto a través de un papel filtro Whatman[®] No.1 y se diluyó 1 ml de la solución filtrada con 1 ml de agua destilada.

Se colocaron los pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras que se analizaron. Se agregó 50µl de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, usando una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra. Se agregó 50µl del conjugado aflatoxina-enzima a los pocillos correspondientes; se agregaron 50µl del anticuerpo anti-aflatoxina a los pocillos correspondientes, se mezclaron el contenido de la microplaca suavemente y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se vació en un recipiente, golpeando energéticamente en el marco del porta-pocillos (tres veces consecutivas) sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa los restos líquidos.

Se lavaron los pocillos con 250µl de tampón de lavado utilizando una micropipeta multicanal y se vaciaron los pocillos de la forma indicada anteriormente. Este paso se repitió tres veces consecutivas.

Se agregó 100µl de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se agregó 100µl de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente, se leyó la absorbancia de cada muestra en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (Biotek ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de las absorbancias se registraron y se calcularán usando un software (Ridasoft Win versión 1.8). La concentración de aflatoxinas se estimó mediante una curva de calibración (Figura 12).

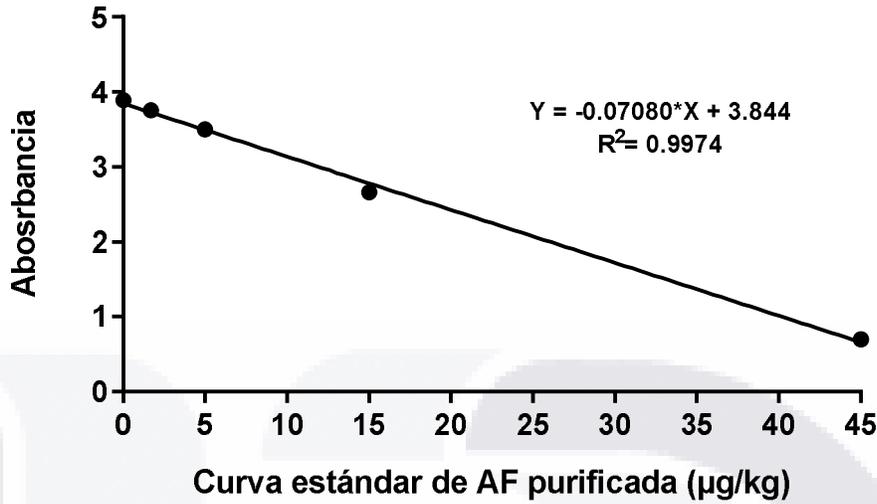


Figura 12. Curva estándar para aflatoxinas totales

10.6. ANEXO F. DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO DE VAPORES DE AMONIO

Se pesó 200 g de coco rallado y se agregó a 1L de agua destilada caliente para posteriormente mezclar durante 5 minutos; la mezcla se filtró por medio de tres capas de manta de cielo y se ajustó el pH a 6.5. Por cada litro de producto filtrado se agregó 20g de agar, se mezcló con frecuencia hasta su ebullición.

El medio agar-coco se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 min para posteriormente vaciar 15ml del medio en cajas de petri estériles, dentro de la campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2 (LVC-180, LuministellMR, México), previamente desinfectada. Las cajas con el medio se dejaron enfriar hasta su gelificación, posteriormente, se taparon y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Se realizó la inoculación única y al centro de las colonias de *Aspergillus flavus* en el medio de cultivo agar-coco para su posterior incubación a 30°C durante tres días con revisiones de cada 24 horas.

En las cajas petri se colocaron bocabajo y en las tapas se agregó 300µl de hidróxido de amonio al 25%. El reverso de la colonia de las cepas productoras de AF se observó el cambio de coloración después de administrar la solución de amoniaco. La mayor intensidad del color estuvo relacionada con mayor producción de AF.

10.7. ANEXO G. DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

En condiciones asépticas, dentro de una campana de extracción se fragmentó el medio de cultivo con el aislado monospórico de *A.flavus* y se colocó en un matraz erlenmeyer de 125 ml que se tapó con papel aluminio. Se agregaron 15ml de metanol:agua (8:2), se homogenizó por agitación durante 5 minutos (método 972.26 AOAC, 2000). El contenido del matraz se pasó a un tubo Falcon de 50 ml para centrifugarse a 6000rpm durante 10 minutos, se recuperó en sobrenadante por filtración usando papel filtro de porosidad número 1 y se recuperó en un tubo limpio. Se agregaron 5ml de hexanos, recuperando la fase hidrofílica en otro tubo limpio. A la fase hidrofílica se le agregaron 5ml de cloroformo, se agitó durante 5 minutos y se recuperó la fase cloroformo para repetir nuevamente este paso. En un tubo limpio se recuperaron 2.5ml de la fase de cloroformo que se evaporaron a sequedad en baño maría y se re suspendió en 500 μ l de cloroformo.

Para realizar la cromatografía, las placas de sílica gel sin indicador de fluorescencia (Z265629, Sigma-Aldrich, EUA) SE ACTIVARON A 110°C en una estufa de alta temperatura (OF-22G JEOI-TECH, Lab Companion, Corea) durante 30 min. En la placa cromatográfica se marcó la línea de origen (1.5cm del borde inferior de la placa), se colocaron 5 μ l del estándar de AFB₁ sobre la línea de origen y del lado izquierdo (1^{er} carril), después 40 μ l de cada muestra (una muestra por carril) sobre la línea de origen y con un espacio entre muestras de 1cm aprox. Las placas con el estándar y las muestras se colocaron dentro de una cámara cromatográfica con fase móvil cloroformo: acetona: isopropanol (85:10:5) y se dejó correr la fase móvil durante 1.5 hrs. Las placas se retiraron de la cámara y se secaron a 100°C en una estufa de alta temperatura durante 100 min. Las placas se visualizaron bajo luz UV en un transluminador a una longitud para identificar la presencia o ausencia de manchas correspondientes a AFB₁ con respecto al estándar.

10.8. ANEXO H. CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN *ASPERGILLUS FLAVUS* POR EL MÉTODO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

Para extraer las aflatoxinas, se pesarán 50 g de la muestra sólida, se agregará 100ml de metanol: agua (4:1) para posteriormente ser mezclada durante tres minutos; se filtrarán con papel filtro de porosidad uno, de acuerdo con el método oficial 990.33 de la AOAC (Scott, 1995), empleando columnas de fase sólida (SPE; Supelclean™ LC-18 SPE tube, Sigma-Aldrich, EUA).

El eluato extraído de las muestras derivatizadas con ácido trifluoroacético se analizarán mediante HPLC (Límite mínimo de detección 2 μ g/kg) con detector de fluorescencia (Bomba

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

binaria Varian Pro Star; FP detector 2020, Varian Associates Inc., Victoria, Australia), columna C18 y guarda columna (LC-18 y LC-18; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Los datos de cuantificación se obtendrán a través del software Galaxie (Ver. 1.9.302.530) y las concentraciones de AF se calcularán mediante curvas estándar de AF purificadas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

10.9. ANEXO I. ANÁLISIS MOLECULAR PARA *ASPERGILLUS FLAVUS*

Fase de enriquecimiento

Consiste en la producción de la masa celular poniendo el micelio en un medio enriquecido de sustrato dando todas las condiciones óptimas para su desarrollo.

En un tubo de 15ml (Falcon®), se colocó 4ml de caldo papa-dextrosa. Del cultivo monospórico de cada aislamiento, se tomó con un palillo estéril un disco de micelio de aproximadamente 1.0mm de diámetro y se colocó en cada tubo (Falcon®) con el caldo papa dextrosa. Los tubos cerrados e identificados se incubaron a 30°C durante 48 horas. Después del tiempo de incubación, los tubos (Falcon®) se centrifugaron a 3500 rpm durante 45min. Se descartó el sobrenadante y la masa celular de cada tubo se transfirió a tubos de microcentrífuga (Eppendorf®) de 2 ml y se les agregó 500µl de agua destilada estéril. Se centrifugaron los tubos (Eppendorf®) a 8000 rpm durante 5 minutos y se desecharon los sobrenadantes.

Fase de lisis

Consiste en destruir la célula para poder liberar el ADN. Se utiliza perlas de vidrio, así como sales para generar hidrólisis electrostática de Remius y no producir lisis del ADN

Las pastillas de micelio se resuspendieron en 300µl de buffer de lisis (Tritón X-100, 2%; SDS, 2%; NaCl, 0.1M; Tris-HCL pH8, 10Mm; EDTA, 1Mm) y se les agregó 300µl de Fenol-Cloroformo (1:1) y 300 mg de perlas de vidrio (Biospect®) de 1mm de diámetro. Se mezclaron en un agitador de tipo vortex durante 1 min y se dejaron reposar en hielo durante 1 min. Esta operación se repitió 3 veces. Se dejaron reposar a -20°C durante 30min. Se les agregó 300µl de TE (10:1; Tris 10Mm y EDTA 1mM) y se centrifugaron los tubos (Eppendorf®) a 12000 rpm durante 10 min. En un vial nuevo (Eppendorf®), se transfirió 500µl del sobrenadante y se les agregó 6µl de RNAsa (Biotech®). Se incubaron a 37°C durante 15 min.

Fase de precipitación

Consiste en atraer el ADN a la superficie y mantener los residuos en el fondo del tubo (Eppendorf®); además de obtener una pastilla de ADN condensada en un solo sitio por medio de la centrifugación.

Se les agregó 10 µl de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol absoluto. Se agitaron por inversión suave y se dejaron reposar a -20°C durante 30 min. Se centrifugaron los tubos (Eppendorf®) a 12000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante cuidando de no desechar la pastilla. Se lavaron las pastillas con 100µl de etanol al 70%. Se desechó el etanol y se dejaron secar hasta evaporar el alcohol.

Fase de elusión

Es la resuspensión en solución isotónica del material de ADN extraído.

La pastilla de ADN de cada muestra se resuspendió en 35µl de TE 1X y se conservaron a -20°C hasta su análisis.

ELECTROFORESIS DE ADN GENÓMICO

Con la técnica de electroforesis en gel se observó la calidad y la cantidad de ADN obtenido.

Preparación del gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1%.

Se pesó 0.318g de Agarosa y se agregó 31.8ml de TAE 1X. Se disolvió mediante calor, en horno de microondas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que se pudo soportar en la palma de la mano. Se agregó 0.5µl de revelado (GelRed®). Posteriormente se vertió en la caja con peine para su gelificación. Después de la gelificación se retiró el peine de la caja cuidadosamente. Se colocó la caja en la cámara de electroforesis (Labnet–Enduro®. Fuente de alimentación 250 V) y se vertió con TAE 1X.

Carga y corrida de muestras

Se cortó un trozo de papel (Parafilm®) y se puso en una superficie plana. En el papel, por cada muestra de ADN se colocó 1.0µl buffer (Platinum™ II Green PCR Buffer 5X) y se agregó 3.0 µL de ADN genómico a cada gota del buffer; se mezcló con la micropipeta; se colocó en el segundo pocillo del gel y sucesivamente se fueron depositando el resto de las muestras.

En el primer pocillo del gel, se agregó un ADN control de concentración conocida (Invitrogn® ADN Ladder 0.5µg/µl) junto con 1.0µl del buffer (Platinum™ II Green PCR Buffer 5X).

Al terminar de cargar todas las muestras, se tapó la cámara y se conectaron los electrodos en la fuente de poder.

El gel se dejó correr a 95 volts durante 40 min

AMPLIFICACIÓN DE GENES PCR

La amplificación de fragmentos de ADN genómico se realizó para la región de espaciadores internos de transcripción (ITS1-5.8S-ITS2-ARNr) con iniciadores (Thermo Fisher Scientific, MA USA) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATG-3); así

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como iniciadores CMDA7-F (5'-GCCAAAATCTTCATCCGTAG-3') y CMDA8-R (5'-ATTCGTTTCAGAATGCCAGG-3') para el gen Calmodulina (CaM). Se amplificó el gen regulador de la ruta biosintética de aflatoxinas (*afIR*) empleando los iniciadores *afIR* -F (5'-GGGATAGCTGTACGAGTTGTGCCAG-3') y *afIR* -R (5'-TGGKGCCGACTCGAGGAAYGGGT-3') de Eurofins Genomics, Lousville KY, USA.

Para las pruebas de amplificación se utilizó la Taq-polimerasa Platinum Green Hot Start PCR 2X Máster Mix (Thermo Fisher Scientific®).

El volumen total de mezcla para la reacción de amplificación de la región ITS fue de 25.0 µl (ADN 5.0µl; Taq-Polimerasa 12.5µl; oligonucleótido forward 1.0µl; oligonucleótido reverse 1µl; agua libre de nucleasas 5.5µl).

Las condiciones para la reacción de PCR para la amplificación de un fragmento de la región ITS1-5.8S-ITS2 RNAr fueron: un periodo de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C/1 min, alineación a 54°C/1 min y extensión a 72°C/1min), con una extensión final de 9 min a 72°C (White et al., 1990).

El volumen total de la mezcla para la reacción de amplificación de gen CaM fue de 25µL (ADN 5.5µl; Taq-Polimerasa 12.5µl; oligonucleótido forward 0.4µl; oligonucleótido reverse: 0.4µl; agua libre de nucleasas: 6.7µl).

Las condiciones para la reacción de PCR del gen de CaM fueron las siguientes: un periodo de desnaturalización un ciclo de 1min/94°C seguido de 30 ciclos (1min/94 °C, para el alineamiento 1 min/53 °C y para la extensión 1min/72 °C) y se agregó un período de extensión final de 10min a 72°C (Geiser et al. 1998). Las reacciones de amplificación (ITS y CaM) se realizaron en un termociclador (Techne®).

El volumen total de la mezcla para la reacción de amplificación de gen *afIR* fue de 25µL (ADN 5.5µl; Taq-Polimerasa 12.5µl; oligonucleótido forward 0.4µl; oligonucleótido reverse: 0.4µl; agua libre de nucleasas: 6.7µl).

La calidad de los productos de PCR se verificó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, con 4µl de producto de PCR (ADN amplificado). En el primer pocillo del gel se agregó 1 µl de un ADN control de concentración conocida (100 pb) (Invitrogen® ADN Ladder 0.5 µg/ µl) como marcador de peso molecular junto con 1.0 µl del buffer (BlueJuice Gel Loading Buffer 10X). Se visualizó el bandeo en el fotodocumentador.

10.10. ANEXO J. CUANTIFICACIÓN DE ZEARALENONA, FUMONISINA, OCRATOXINA Y DEOXINIVALENOL POR LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA

Zearalenona. De las muestras previamente molidas, se pesaron 5g de cada muestra en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA); se agregó 25ml de metanol al 70%; se agitó vigorosamente durante 3 minutos; se filtró el extracto a través de un papel filtro Whatman® No.1y se diluyó 1 ml de la solución filtrada con 1 ml de agua destilada.

La cuantificación se realizó por duplicado con un kit comercial de ELISA indirecta (Ridascreen Fast® Zearalenon R5502, R-Biopharm, Alemania).

Se colocaron los pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras que se analizaron. Se agregó 50µl de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, usando una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra. Se agregó 50µl del conjugado zearalenona-enzima a los pocillos correspondientes; se agregaron 50µl del anticuerpo anti-zearalenona a los pocillos correspondientes, se mezclaron el contenido de la microplaca suavemente y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se vació en un recipiente, golpeando energéticamente en el marco del porta-pocillos (tres veces consecutivas) sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa los restos líquidos.

Se lavaron los pocillos con 250µl de tampón de lavado utilizando una micropipeta multicanal y se vaciaron los pocillos de la forma indicada anteriormente. Este paso se repitió tres veces consecutivas.

Se agregó 100µl de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se agregó 100µl de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente, se leyó la absorbancia de cada muestra en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (Biotek ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de las absorbancias se registraron y se calcularán usando un software (Ridasoft Win versión 1.8). La concentración de zearalenona se estimó mediante una curva de calibración (Figura 13).

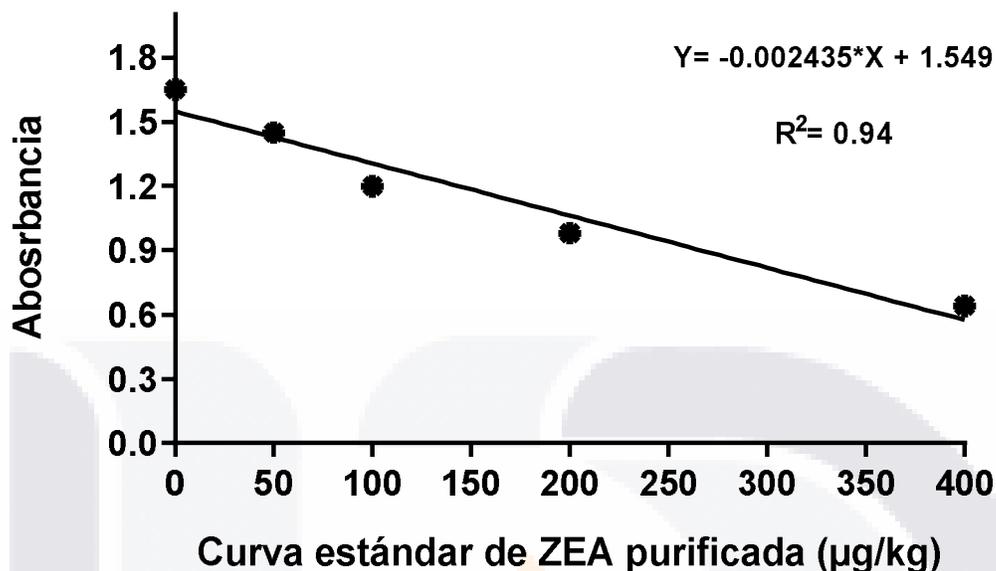


Figura 13. Curva estándar para zearalenona

Fumonisin. De las muestras previamente molidas, se pesaron 5g de cada muestra en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA); se agregó 25ml de metanol al 70%; se agitó vigorosamente durante 3 minutos; se filtró el extracto a través de un papel filtro Whatman® No.1 y se diluyó el extracto 1:14 (1+13) con agua destilada (ej. 100µl del extracto + 1.3ml de agua destilada).

La cuantificación se realizó por duplicado con un kit comercial de ELISA indirecta (Ridascreen Fast® Fumonisin R5602, R-Biopharm, Alemania).

Se colocaron los pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras que se analizaron. Se agregó 50µl de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, usando una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra. Se agregó 50µl del conjugado fumonisin-enzima a los pocillos correspondientes; se agregaron 50µl del anticuerpo anti-fumonisin a los pocillos correspondientes, se mezclaron el contenido de la microplaca suavemente y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se vació en un recipiente, golpeando energéticamente en el marco del porta-pocillos (tres veces consecutivas) sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa los restos líquidos.

Se lavaron los pocillos con 250µl de tampón de lavado utilizando una micropipeta multicanal y se vaciaron los pocillos de la forma indicada anteriormente. Este paso se repitió tres veces consecutivas.

Se agregó 100µl de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se agregó 100µl de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente, se leyó la absorbancia de cada muestra en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (Biotek ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de las absorbancias se registraron y se calcularán usando un software (Ridasoft Win versión 1.8). La concentración de fumonisina se estimó mediante una curva de calibración (Figura 14).

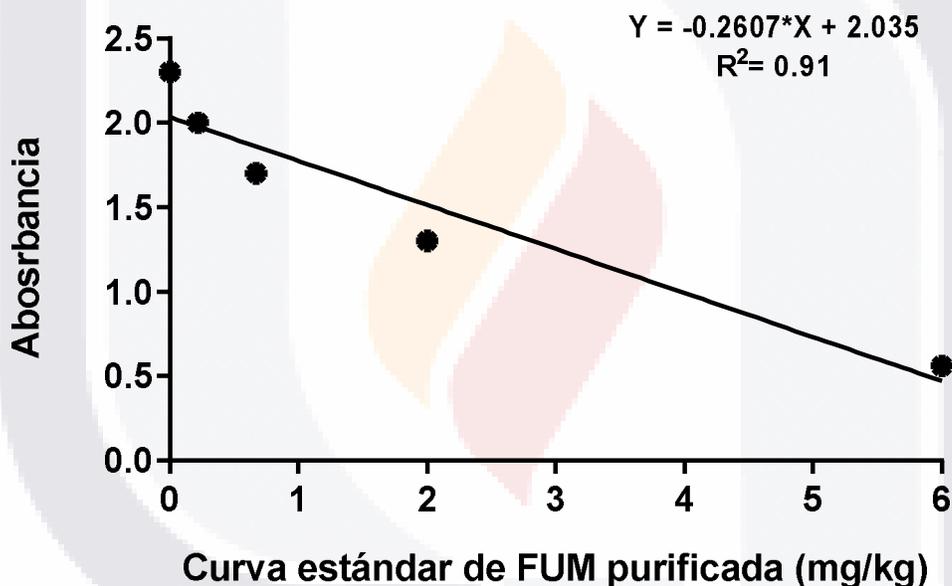


Figura 14. Curva estándar para fumonisina

Ocratoxina. De las muestras previamente molidas, se pesaron 10g de cada muestra en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA); se agregó 50ml de tampón de extracción (ECO, solución lista para usarse); se agitó vigorosamente durante 5 minutos; se filtró el extracto a través de un papel filtro Whatman® No.1y se diluyó 1 ml de la solución filtrada con 1 ml de tampón lavado.

La cuantificación se realizó por duplicado con un kit comercial de ELISA indirecta (Ridascreen Fast® Ochratoxin A R5402, R-Biopharm, Alemania).

Se colocaron los pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras que se analizaron. Se agregó 50µl de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, usando una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra. Se agregó 50µl del conjugado ocratoxina-enzima a los pocillos correspondientes; se mezclaron el contenido de la microplaca suavemente y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se vació en un recipiente, golpeando energéticamente en el marco del porta-pocillos (tres veces consecutivas) sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa los restos líquidos.

Se lavaron los pocillos con 250µl de tampón de lavado utilizando una micropipeta multicanal y se vaciaron los pocillos de la forma indicada anteriormente. Este paso se repitió tres veces consecutivas.

Se agregó 100µl de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 3 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se agregó 100µl de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente, se leyó la absorbancia de cada muestra en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (Biotek ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de las absorbancias se registraron y se calcularán usando un software (Ridasoft Win versión 1.8). La concentración de ocratoxina se estimó mediante una curva de calibración (Figura 15).

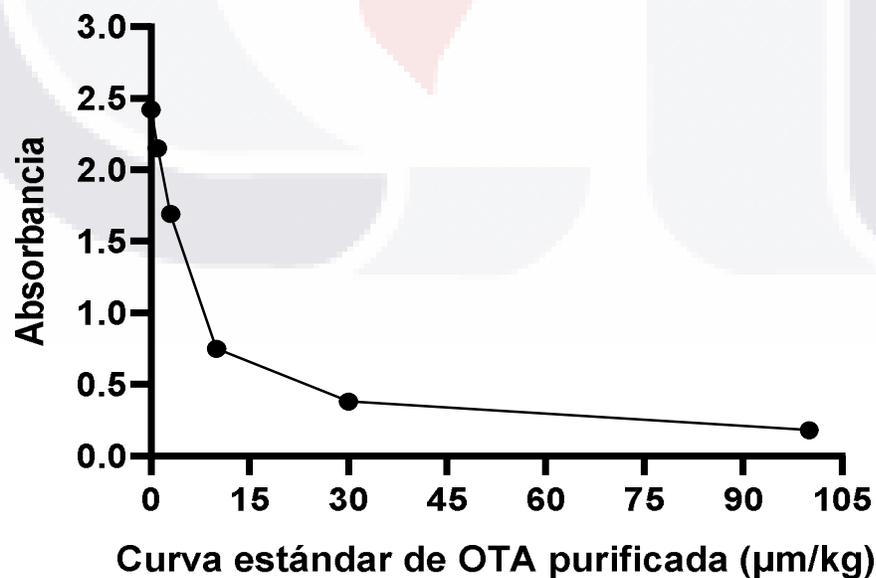


Figura 15. Curva estándar para ocratoxina

Deoxinivalenol. De las muestras previamente molidas, se pesaron 5g de cada muestra en una balanza semi analítica (BBADAM PGW 453e, Adam Equipment, EUA); se agregó 100ml de agua destilada; se agitó vigorosamente durante 3 minutos y se filtró el extracto a través de un papel filtro Whatman® No.1.

La cuantificación se realizó por duplicado con un kit comercial de ELISA indirecta (Ridascreen Fast® Deoxynivalenol R5902, R-Biopharm, Alemania).

Se colocaron los pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y las muestras que se analizaron. Se agregó 50µl de los estándares y de las muestras a analizar en los pocillos correspondientes, usando una punta nueva y estéril para cada estándar y cada muestra. Se agregó 50µl del conjugado deoxinivalenol-enzima a los pocillos correspondientes; se agregaron 50µl del anticuerpo anti- deoxinivalenol a los pocillos correspondientes; se mezclaron el contenido de la microplaca suavemente y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se vació en un recipiente, golpeando energéticamente en el marco del porta-pocillos (tres veces consecutivas) sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa los restos líquidos.

Se lavaron los pocillos con 250µl de tampón de lavado utilizando una micropipeta multicanal y se vaciaron los pocillos de la forma indicada anteriormente. Este paso se repitió tres veces consecutivas.

Se agregó 100µl de sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 3 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se agregó 100µl de la solución stop a cada pocillo y se mezcló el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente, se leyó la absorbancia de cada muestra en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (Biotek ELx800TM, Bio Tek, EUA). Los resultados de las absorbancias se registraron y se calcularán usando un software (Ridasoft Win versión 1.8). La concentración de deoxinivalenol se estimó mediante una curva de calibración (Figura 16).

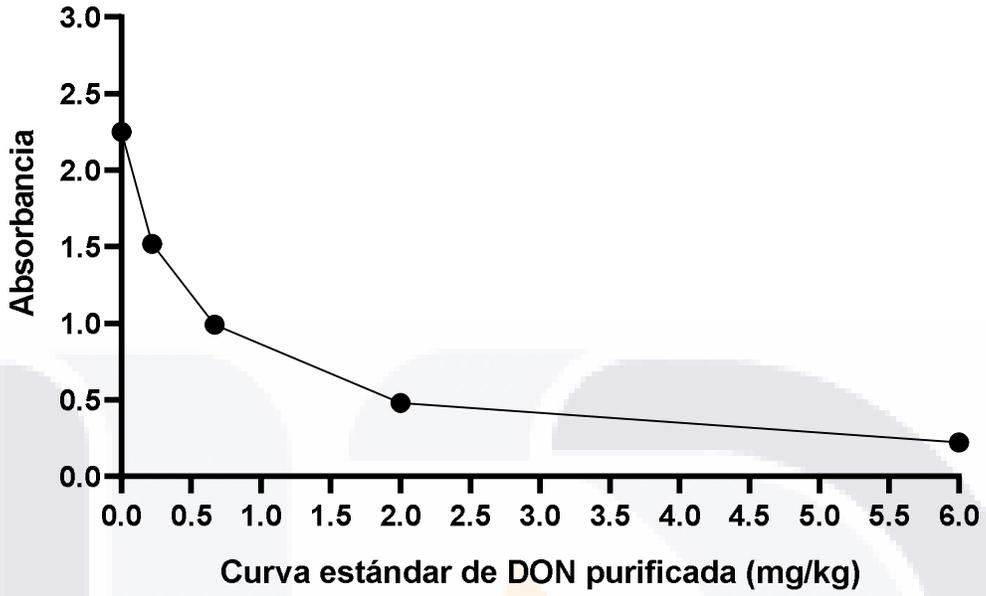


Figura 16. Curva estándar para deoxinivalenol