

DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS
EN EL MUNICIPIO DE YOPAL, CASANARE, MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA

ERICA MARCELA ARANGUREN REINA
MARÍA JIMENA ARGÜELLES GÓMEZ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C
Noviembre de 2009

DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS
EN EL MUNICIPIO DE YOPAL, CASANARE, MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA

ERICA MARCELA ARANGUREN REINA
MARÍA JIMENA ARGÜELLES GÓMEZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

Microbióloga Industrial
Bacterióloga y Microbióloga Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C
Noviembre de 2009

DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS
EN EL MUNICIPIO DE YOPAL, CASANARE, MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA

ERICA MARCELA ARANGUREN REINA
MARÍA JIMENA ARGÜELLES GÓMEZ

APROBADO

Ingrid Schuler, Ph.D
Decana Académica

Luz Amparo Maldonado, BLC, M.Ed.
Directora Carrera de Bacteriología

Janeth Arias, M.Sc., M.Ed
Directora Carrera de Microbiología Industrial

DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS
EN EL MUNICIPIO DE YOPAL, CASANARE, MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA

ERICA MARCELA ARANGUREN REINA
MARÍA JIMENA ARGÜELLES GÓMEZ

APROBADO

Adriana Paez, M.I
Directora

Ana Karina Carrascal M. Sc
Jurado

Gloria Fuertes
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos asociados al desarrollo de múltiples patologías en animales y seres humanos debido a su carácter tóxico, mutagénico y teratogénico.

La aflatoxina B1 (AFB1), es un tipo de toxina que puede encontrarse en alimentos para consumo de ganado lechero, que al entrar en el organismo del animal, se transforma en otro tipo de aflatoxina, la aflatoxina M1 (AFM1), la cual es secretada junto con la leche destinada directamente al consumo humano o destinada a la producción de derivados lácteos como el queso, hecho que pone en riesgo la salud de la población.

Para contribuir en la vigilancia de la AFM1 en Colombia, se realizó un estudio de quesos frescos provenientes del municipio de Yopal, en el cual se tomaron en cuenta para el estudio 3 importantes proveedores de quesos frescos, se tomaron 9 muestras de cada uno para procesarlas y detectar la presencia o ausencia de la AFM1 mediante la técnica de ELISA utilizando el kit comercial Ridascreen aflatoxina M1 30/15.

En el proveedor 1 se encontró un valor promedio de AFM1 8.46 ppt, resultando una concentración baja para poder causar patologías hepáticas y alteraciones en la información genética de los consumidores de estos quesos; por el contrario los proveedores 2 y 3, correspondientes al 67% de las muestras analizadas arrojaron valores de AFM1 superiores a 240 ppt, lo que supone un riesgo en la salud y calidad de vida de los consumidores.

Se encontró que en Yopal no se está garantizando el cumplimiento de normas que velen por la salud de la comunidad y por tanto se está permitiendo la comercialización de quesos contaminados con AFM1.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos asociados al desarrollo de múltiples patologías en animales y seres humanos debido a su carácter tóxico, mutagénico y teratogénico.

En la actualidad existen distintos tipos de micotoxinas asociadas a intoxicaciones alimentarias. Un tipo frecuente de estas toxinas, son las aflatoxinas B1 y B2, producidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, y las aflatoxinas G1 y G2 sintetizadas únicamente por estos dos últimos.

La aflatoxina B1 (AFB1), es un tipo de toxina que puede encontrarse en alimentos para consumo de ganado lechero, que al entrar en el organismo del animal, se transforma en otro tipo de aflatoxina, la aflatoxina M1 (AFM1), la cual es secretada junto con la leche destinada directamente al consumo humano o destinada a la producción de derivados lácteos como el queso, hecho que pone en riesgo la salud de la población.

Por dicha razón, la presencia de aflatoxinas en alimentos, son monitoreadas constantemente a nivel mundial. La Unión Europea y Estados Unidos se rigen por sus propios límites máximos de concentración de aflatoxinas, provenientes de las conclusiones de múltiples estudios realizados durante años. En Colombia, aunque el tiempo de estudio de la presencia de aflatoxinas en alimentos no es igual a la de otros países, ya el Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC) estipula sus propios límites.

En nuestro país los derivados lácteos, como el queso, hacen parte de la canasta familiar, por tanto es fundamental que exista una rigurosa vigilancia donde se garantice que las concentraciones de AFM1 en quesos, no representen para los consumidores ningún riesgo de padecer patologías asociadas a dicha micotoxina, como puede ser un hepatocarcinoma, colangiocarcinoma o adenocarcinomas.

Para contribuir en la vigilancia de AFM1 en Colombia, se realizó un estudio de quesos frescos provenientes del municipio de Yopal, Casanare. Este municipio hace parte de la segunda región productora de leche en el país, según datos de FEDEGAN (1).

Se tomaron en cuenta para el estudio 3 importantes proveedores de quesos frescos, y de cada proveedor se estudió el proceso de elaboración de quesos (incluyendo la proveniencia de la leche) y se tomaron 9 muestras de cada uno de estos para procesarlas y detectar la presencia o ausencia de la AFM1 mediante la técnica de ELISA.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por *Aspergillus nomius*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*, que se encuentran comúnmente en los granos provistos para a la alimentación de animales destinados al consumo humano, cuando sus condiciones de almacenamiento no son las adecuadas.

Cuando la aflatoxina B1 (AFB1), es ingerida junto con la comida contaminada, por medio de una serie de degradaciones metabólicas se convierte en aflatoxina M1 y esta toxina tiene la capacidad de diseminarse por todo el organismo, pudiéndose encontrar en secreciones como la leche.

Entonces, cuando esta leche contaminada es utilizada como materia prima para la elaboración de quesos, y no se tiene un control riguroso de la calidad de la leche, ni de la salud del animal proveedor de leche, logra transmitirse fácilmente a los humanos causando intoxicaciones leves a severas, según la concentración ingerida. De esta forma, la presencia de AFM1 en quesos se convierte en un importante problema de salud pública, ya que goza de propiedades teratogénicas, mutagénicas, hepatotóxicas, endocrinosupresoras e inmunosupresoras, siendo los niños y ancianos los principales afectados.

La región central de Colombia, a la cual pertenece el departamento del Casanare, hoy en día hace parte de la segunda región productora de leche en Colombia, con una participación del 34% (2), y específicamente en el municipio de Yopal, capital del departamento se distribuyen alrededor de 1.2 millones de litros de leche al año; encontrándose paralelamente empresas productoras de quesos que abastecen la demanda del propio departamento (3).

Por dichas características, y sumando el hecho de que esta región, no goza de un monitoreo que indique la presencia de esta toxina y por tanto el riesgo que corre la población al consumir quesos contaminados con AFM1, se ha decidido tomar esta zona como objeto de estudio.

Adicionalmente, se ha determinado trabajar en quesos porque entre los derivados lácteos, es este quien debe tener una mayor atención, ya que durante su proceso de elaboración, se desarrolla un factor de enriquecimiento exactamente en la etapa de coagulación. La AFM1 aumenta su afinidad por la caseína, lo que conlleva a que las concentraciones de la aflatoxina aumenten 3 a 5 veces más con respecto a los valores presentes en la leche (4-5).

MARCO TEÓRICO

Aflatoxinas

Las aflatoxinas, específicamente son las micotoxinas producidas por el género *Aspergillus*. Este es un hongo que encuentra en el suelo y colonizan fácilmente granos expuestos a altas humedades por largos periodos de tiempo o granos cuyas barreras físicas se encuentran deterioradas. La condiciones mínimas necesarias de temperatura y disponibilidad de agua para que *Aspergillus* spp se desarrolle y produzca aflatoxinas es de 10-12°C y un aw entre 0,75 y 0,83; no obstante su temperatura óptima corresponde a 25°C y su aw de 0,95 (6).

Entre las distintas especies de *Aspergillus* se destacan por la producción de aflatoxinas las especies de *A. flavus* productor de AFB1 y AFB2, y *A. parasiticus* y *A. nomius* que además de estas dos anteriores toxinas producen también AFG1 y AFG2 (7-9).

Las aflatoxinas son sintetizadas por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción y alquilación, llevando a la formación de una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bisdihidrofurano y a una ciclopentanona o lactona (10). Sus pesos moleculares oscilan entre los 312 y 350 D y la mayoría son poco solubles en agua. Son termorresistentes, sus puntos de fusión están por encima de los 250 °C y resisten a pHs desde 3 hasta 10 y gracias a su fluorescencia son fácilmente detectadas en el laboratorio (6,11).

La conversión de la AFB1 Y AFB2 a AM1 y AFM2, por medio de hidroxilaciones en diferentes puntos de la estructura molecular de las AFB, facilita que la toxina atraviese barreras fisiológicas y por tanto puedan encontrarse en leche materna (tanto animal como humana), orina y heces; y al ser estas aflatoxinas catalogadas como teratogénicas, mutagénicas, hepatotóxicas e inmunosupresoras, su presencia en alimentos causan una gran preocupación sobre la salud pública (6-8,11-13).

Metabolismo de la AFB1

Cuando los animales ingieren AFB1, esta es absorbida en el intestino y llevada vía porta hasta el hígado, allí es metabolizada por el citocromo p450 de los hepatocitos resultando el AFB1 exo-8-9- epóxido, el cual al ser altamente inestable se une con el nitrógeno de la guanina, produce un aducto con el ADN y transversiones de guanina a timina (10,17). Este aducto abre su anillo imidazol y forma una molécula mas estable química y biológicamente, la AFB1 formamidopirimidina (AFB1-FAPY), quien es la causantes de errores posteriores en la transcripción del ADN (13-14).

Adicionalmente se puede configurar de forma similar un aducto con la albumina o con la lisina, razón por la cual estos dos compuestos sirven a nivel clínico para determinar el consumo de AFB1. La AFM1 también se ha detectado en orina, lo que indica que esta toxina es igualmente capaz de reaccionar con el ADN y formar aductos (10, 12-14).

En la siguiente fase se busca estabilizar e inactivar al epóxido, hidrolizándolo y conjugándolo con glutatión para formar AFB1-SG que será excretado por orina.

En esta etapa metabólica también se originan tres metabolitos importantes hidroxilados: la AFQ1, la AFP1 y la AFM1, quienes comienzan a distribuirse sistémicamente, pudiéndose encontrar en la leche, huevos y tejidos del animal intoxicado.

Otro derivado importante del metabolismo de la AFB1 es el aflatoxicol, que prolonga la presencia de la AFB1 en el organismo; proviene de reducción de la AFB1 y puede reoxidarse nuevamente a AFB1 por acción coenzimática de NADHP (15).

Toxicidad

Cabe resaltar que las intoxicaciones por AFM1 están ligadas a varios factores como la concentración inicial de AFB1 presentes en los alimentos del ganado, el tiempo de consumo de los alimentos contaminados, el estado de salud y el tiempo transcurrido entre el consumo de la toxina y el momento de la toma de muestra, que puede ser detectado entre 12 y 24 horas.

Según el tiempo de exposición, puede presentarse una intoxicación aguda o crónica.

La intoxicación aguda (corto tiempo de exposición con una dosis alta) se manifiesta como una hepatitis aguda, ya que presenta ictericia, fiebre, depresión, anorexia y diarrea (16). El órgano blanco es el hígado donde se produce una infiltración grasa y necrosis considerable, con muerte celular y pérdidas de funciones esenciales del hígado con la elevación de los niveles de AST y ALT en sangre (17). Se produce una grave inhibición de la síntesis proteica y glucídica (neoglucogénesis casi nula) y de las funciones de detoxificación (glucuroconjugación). Cursa también con anemia hemolítica por lo tanto se eleva notablemente la bilirrubina indirecta.

La intoxicación crónica (largos tiempos de exposición con dosis bajas) se manifiesta con vómitos, dolor abdominal y hepatitis, cuyas frecuencias van aumentando, también se evidencia hemorragia subcutánea y anemia hemolítica. Se presentan alteraciones en los ciclos hormonales que conllevan, infertilidad, abortos espontáneos y ovarios poliquísticos entre otros.

La hipercolesterolemia se asocia a modificaciones químicas de residuos de lisina, claves para la proteína ApoB 100 de las LDL. Las LDL modificadas no son reconocidas por sus receptores específicos, y por tanto no son capaces de depositar los triglicéridos y colesterol en tejidos periféricos, de forma tal que retornan al hígado y aumentan la concentración de estos en sangre. El mecanismo de acción de las aflatoxinas a nivel celular es inhibir la síntesis de ADN y ARN y evitar la incorporación de aminoácidos y fosfolípidos al metabolismo.

A nivel inmunológico reduce la fagocitosis, la linfoblastogénesis, la respuesta del hospedante contra injerto, la activación de linfocitos T y B y la activación del complemento; sin embargo una vez se elimina la aflatoxina de circulación, la respuesta inmunológica se restablece (16).

A su vez ambos tipos de intoxicación aumentan la susceptibilidad a determinadas infecciones, como las producidas por *Candida* spp, *Listeria* spp, *Salmonella* spp y *Mycobacterium* spp.

Otros estudios han demostrado que la infección del virus de la hepatitis B (HBV) que cursa junto con la ingesta de AFM1, aumenta el riesgo de carcinoma hepatocelular, esto debido a que el HBV impide el buen funcionamiento de los hepatocitos, y por tanto la detoxificación de la aflatoxina, aumentando su tiempo de residencia en el hígado (18).

La AFM1 tienen una TD50 (dosis de micotoxina con la cual el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) de 10,38 µg/Kg/día; los valores de LOAEL (concentración a la cual el nivel de factores adversos es bajo) para la aflatoxina M1 es menor de 2,5 µg /Kg/día y la TDI (dosis tolerable por día) es de 2 ng/Kg/día (6).

Normatividad

La IARC (agencia internacional para la investigación del cáncer) a clasificado a la AFB1 como una sustancia tipo 1 y a la AFM1 como tipo 2B (carcinógeno para humanos y posible carcinógeno respectivamente), sin embargo en animales la AFM1 ya se ha demostrado su propiedad carcinógena, por dicha razón la presencia y niveles de contaminación de aflatoxinas en alimentos humanos o animales son continuamente monitoreados y reglamentada a nivel mundial (6,10).

En el caso de la concentración máxima permitida de AFM1 en quesos, no todos los países la ha normativizado, solo en algunos países europeos como Holanda y Austria, se ha determinado una concentración máxima de 200 y 250 ppt (ng/l) respectivamente (6).

La leche por el contrario, si goza de una clara reglamentación. En la UE se establece que para leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo tratada térmicamente, la concentración máxima permitida de aflatoxina M1 es de 50 ppt, y en caso de preparados para lactantes se permite máximo 25 ppt.

El FDA en cambio establece que la concentración máxima permitida de AFM1 en leche entera, semidescremada y descremada es de 500 ppt, norma adoptada por algunos países de la América Latina (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) (6).

En Colombia, es la NTC 3581 la encargada de regular la concentración en la leche, estipulando una concentración máxima de 400 ppt, pero aun no se ha reglamentado el valor para quesos.

El *Codex alimentarius*, compuesto por un conjunto de normas alimentarias internacionales voluntarias que garantizan la inocuidad, la buena calidad y la idoneidad de los alimentos, también ha propuesto niveles máximos permisibles de AFM1 en leches, sin nombrar derivados lácteos como el queso(19).

Métodos de detoxificación de AFM1 en leche

En la etapa de fabricación de quesos, cuando se realiza la proteólisis de la leche, la caseína aumenta su hidrofobicidad, característica necesaria para la unión de AFM1 a la caseína, que conlleva a un factor de enriquecimiento en el cuajo. (5,20). Por esta razón es importante encontrar métodos que aseguran la inactivación de la toxina en la leche antes de ser utilizada en la producción de los quesos.

Para disminuir la concentración inicial de AFM1 en la leche, se han realizado varios experimentos en donde se encuentra que cuando la leche es calentada a 64 °C por 30 min., entre 64 y 100 °C de 15 a 20 min, o a calentamientos directos de la leche durante 3-4 horas y algunos procesos de pasteurización; se evidenció que la concentración de la aflatoxina prácticamente se ve inalterada, teniendo la capacidad de residir en derivados lácteos.

Con otros tipos de calentamientos entre 71 y 120 °C por 30 min., se ha reducido la AFM1 entre un 12-35% y con otros procesos de pasteurización como la ultrapasteurización, esterilización, evaporación, secado Roller y Spray, se ha conseguido disminuir la contaminación de AFM1 del orden de 32 a 86% (10,21).

Consecuentemente con lo anterior, la principal herramienta es la inactivación por calor, en la que se utilizan temperaturas superiores a 150 °C, y debe presentarse disponibilidad suficiente de agua, ya que esta es una herramienta para abrir el anillo de la AFM1, con el fin de convertirlo en un ácido carboxílico terminal que por efecto de la temperatura se descarboxilará (6).

Otro método, aplicado en leches, es la radiación UV, esta actúa sobre el doble enlace del anillo furánico, siendo capaz de disminuir la concentración entre un 3,6 y un 100% dependiendo del tiempo de exposición de la leche y el volumen tratado.

También se utilizan métodos químicos como la exposición de la leche a bisulfato potásico al 0.4% a 25 °C durante 5 horas, presentándose una disminución en la concentración de AFM1 de hasta un 45% (22).

Sin embargo hoy el uso de estos métodos está restringido debido al alto costo de los materiales, a la toxicidad de los mismos y a la caída nutricional de los alimentos tratados. Entonces se han planteado otro tipo de estrategias de tipo biológico, como utilizar bacterias ácido lácticas y bifidobacterias para reducir la disponibilidad de la aflatoxina a nivel gastrointestinal. (6,17).

Métodos de control

Teniendo en cuenta que la eliminación de AFM1 en la leche, es un proceso complejo que no garantiza la eliminación completa de la toxina en muchos casos, la solución entonces debe estar planteada hacia la eliminación de la AFB1. Esto conlleva a aplicar medidas preventivas durante todas las etapas de producción del alimento del ganado, desde la etapa inicial del cultivo, pasando por la etapa de cosecha, continuando con el almacenamiento y transporte hasta culminar con la distribución (19).

También se puede implementar métodos de detoxificación, como la desactivación térmica por medio del tostado del alimento, la irradiación por rayos gamma o UV, la adsorción con carbono activado o aluminosilicato o el tratamiento químico con NH_3 (23).

Métodos de detección AFM1

Para el análisis de rutina de aflatoxinas en muestras contaminadas se utilizan principalmente tres métodos: 1: cromatografía de líquidos de alta eficiencia o HPLC (High performance liquid chromatography), 2: cromatografía en capa fina o TLC (thin layer chromatography), y 3: ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) competitivo (24).

Para los análisis por cromatografía, en una primera etapa se purifica la toxina mediante el paso por una columna de inmunoafinidad, donde la aflatoxina es recuperada a partir de la interacción de esta con un antígeno específico; en la segunda etapa se hace una lectura de la concentración basándose en la fluorescencia o el delta de absorbancia (23).

En el ELISA competitivo directo, hay fijado a la placa un anticuerpo anti AFM1 y sobre los sitios de unión de este se dará una competencia entre el antígeno de la muestra y el conjugado enzimático; así pues a mayor concentración de AFM1, menor la cantidad de conjugado enzimático fijado, por lo que el color será inversamente proporcional a la concentración de la toxina (8, 23-24).

Una técnica reciente es la resonancia de plasmones en superficie o SRP (*surface plasmon resonance*), en esta técnica la AFM1 disuelta en la leche es capturada por unos inmunosensores ópticos, que tiene la capacidad de capturar a la toxina y traducir esta unión en señales ópticas gracias a los plasmones de superficie de un metal (los plasmones son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de un metal que se comportan en función a la refracción de la luz), entonces cuando se presenta una unión entre la aflatoxina y el biosensor, el ángulo de incidencia de la luz y la longitud de onda cambia, lo que es detectado por un espectroscopio. En comparación con los métodos analíticos convencionales la SPR permite detecciones directas y en tiempo real, posee una elevada sensibilidad y las muestras no tienen que purificarse; algunos de los inconvenientes son su elevado costo, sensibilidad a la temperatura, e ineficacia para productos diluidos (7,12, 25-26).

A nivel clínico, igualmente la detección de aflatoxina en humanos y animales es muy importante y se realiza midiendo bien sea el aducto AFM1-guanina en orina o el AFM1 - albúmina en el suero, para detectar la exposición a la aflatoxina en las 24 h anteriores o la exposición crónica respectivamente. (7-8,12, 21).

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar y cuantificar por medio de la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la presencia de aflatoxina M1 en quesos frescos comercializados en Yopal, departamento del Casanare, Colombia.

Objetivos específicos

Determinar la presencia o ausencia de AFM1 en quesos frescos del municipio de Yopal (Casanare), Colombia.

Cuantificar mediante ELISA la concentración de AFM1 las muestras de quesos frescos obtenidas.

Sugerir una concentración máxima de AFM1 permitida en quesos frescos en Colombia.

Aportar información de casos de contaminación de AFM1 en quesos frescos comercializados en el municipio de Yopal.

METODOLOGÍA

Obtención de la muestra

Para el estudio se tomaron en cuenta tres empresas lácteas representativas de la ciudad de Yopal, en donde su distribución de quesos frescos se hace a las ciudades más importantes del país. Se realizó una indagación de la procedencia de la leche. Acto seguido se tomaron 9 muestras de quesos frescos del mismo lote de cada proveedor y se transportaron bajo cadena de frío a los laboratorios de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá para su análisis.

Preparación de la muestra

Una vez las muestras llegaron al laboratorio, inmediatamente se procedió a enumerarlas y posteriormente se realizó un macerado y homogenizado manual. De este macerado se tomaron 4 g de la muestra en 80 ml de diclorometano, y se mezcló por agitación durante 15 min. La mezcla obtenida se filtró y se tomaron 10 ml para la etapa de evaporación en baño serológico a 95 °C hasta que se obtuvo un residuo aceitoso en el fondo del tubo.

Este residuo se resuspendió en 0,5 ml de buffer PBS, 0,5 ml de metanol y 1 ml de heptano. Después de mezclar y centrifugar a 2700 gravedades por 15 min, la fase superior fue removida, y de la fase metanol agua se tomaron 100 µl para diluirlos en 400 µl de buffer 1 y tomar de esto 100 µl para el ensayo.

Determinación aflatoxina M1

La determinación de la micotoxina se realizó por medio del método inmunoenzimático directo y competitivo utilizando el kit Ridascreen Aflatoxina M1 30/15, fabricado por R- Biofarmar, Alemania, el cual se fundamenta en la competencia entre el antígeno de la muestra y el conjugado enzimático del kit, por el sitio activo de un anticuerpo anti AFM1 fijado a la microplaca; así pues a mayor concentración de AFM1, menor la cantidad de conjugado enzimático fijado.

Los estándares de AFM1 (incluidos en el kit) y las muestras se adicionaron a los pozos de la microplaca recubiertos con anticuerpos anti AFM1 (los patrones se montaron en duplicado y las muestras en triplicado) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. Después de la etapa de lavado se agregó 100 µl del conjugado enzimático a cada pozo y nuevamente se incubó por 15 min bajo las mismas condiciones y se removió el exceso de conjugado por lavado. Posteriormente se adicionaron 100 µl del sustrato cromógeno, se mezcló y se incubó por 15 min en oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de solución stop e inmediatamente se procedió a leer las absorbancias a 450 nm.

Cálculos de resultado

Los valores de los patrones y de las muestras fueron digitados usando el software RIDASOFT Win y los datos fueron expresados en ng/L (ppt). Se estableció la curva de calibración de los patrones con su correspondiente coeficiente de correlación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque en Colombia la NTC 1232 y 5219, exige la determinación de aflatoxinas en alimentos por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC, este estudio se basó en la inmunoabsorción ligada a enzimas, ELISA.

Para la escogencia de la técnica se tuvieron en cuenta estudios realizados sobre los kits de ELISA disponibles en el mercado, donde se reportan porcentajes de recuperación de AFM1 superiores al 80% (27-28). Estos estudios también compararon reproducibilidad y especificidad de la cromatografía y de ELISA, obteniéndose valores cercanos entre una y otra técnica, siendo para el coeficiente de variación de reproducibilidad 4-15% y 10-15% correspondientemente, y para la especificidad 96.8-108% y 96.2-115% (28).

Adicionalmente para la elección de la técnica se tomó en cuenta la simplicidad y facilidad del montaje, ya que se necesita un volumen pequeño de muestra, la purificación de ésta es simple y se pueden analizar varias muestras a la vez (27).

Curva de calibración

Tabla 1. Valores de las absorbancias de los estándares utilizados leídas en multiscan a 450 nm

Estándar	Concentración AMF1 estándares (ppt)	Absorbancia	CV*	Valor calculado (ppt)	% de desviación
1	0	1.159	1,4		
2	5	0.883	3,2	5,01	0,2
3	10	0.750	0,8	9,97	0,3
4	20	0.541	1,6	19,98	0,1
5	40	0,344	2,7	40,28	0,7
6	80	0,268	2,9	79,25	0,9

* CV: coeficiente de desviación

La realización de la curva patrón es uno de los puntos críticos para determinar la presencia y cantidad de AFM1 en las muestras de queso, ya que a partir de las concentraciones de los estándares 0, 5, 10, 40, 40 y 80 ppt y sus correspondientes absorbancias se puede graficar una tendencia de los valores de absorbancia bajo diferentes concentraciones de la aflatoxina.

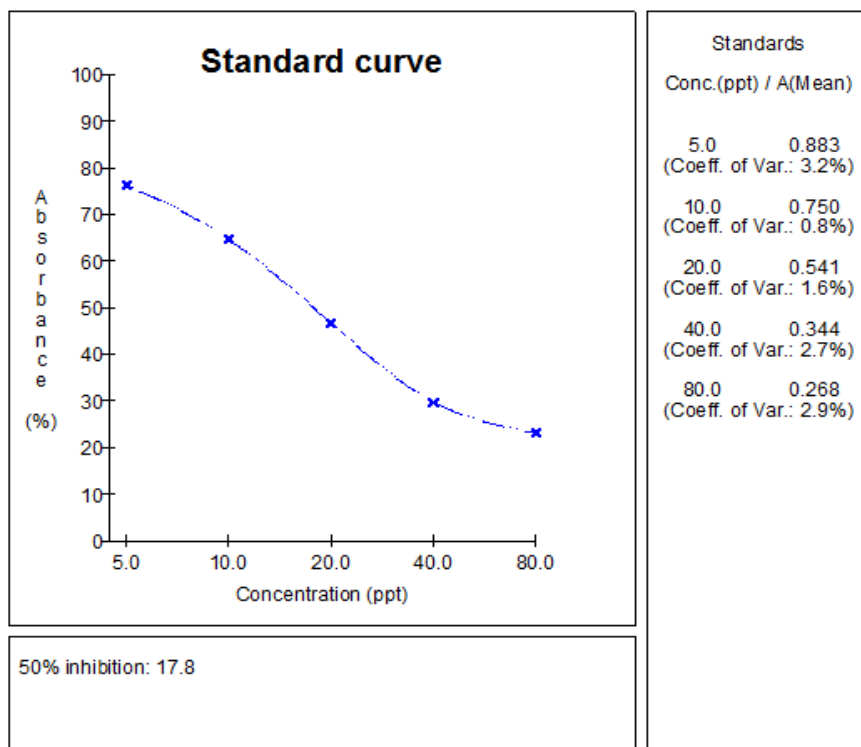
En el caso del kit utilizado, el tipo de gráfica que se utiliza es de tipo spline, que corresponde a una curva definida mediante polinomios de grado tres para interpolar datos.

Esta metodología es muy importante cuando se están realizando curvas patrón, ya que al utilizar el método de interpolación, genera una curva que pasa por todos los puntos; diferente al método de aproximación, que genera una curva que normalmente no pasa por todos los puntos de control, excepto por los puntos extremos (29).

Los valores de absorbancia que se obtuvieron (Tabla 1), en comparación a los valores reportados por el kit, son muy cercanos, ya que se maneja un coeficiente de variación no superior a 3.2%, lo que indica un grado de variabilidad bajo, que corresponde a una homogeneidad en los datos (valor máximo permitido por el Ridascreen de coeficiente de variación = 5%).

Con respecto al porcentaje de desviación entre los datos de los estándares reportados por Ridascreen AFM1 30/15 y los datos obtenidos en la práctica, los valores no superaron el 0,9%, indicando un grado de precisión en la realización de la técnica.

El 50% de inhibición reportado en la *Gráfica 1* correspondió a 17,8 ppt, indicando que a esta concentración el 50% del conjugado se ha ligado al anticuerpo. Este dato es relevante cuando se realiza más de una curva de calibración, ya que los valores obtenidos no deben tener una diferencia mayor o menor del 30%. La diferencia entre el valor reportado por el kit (20,2 ppt) y el valor obtenido no superó el 30 %, que significa una buena reproducibilidad de la técnica.

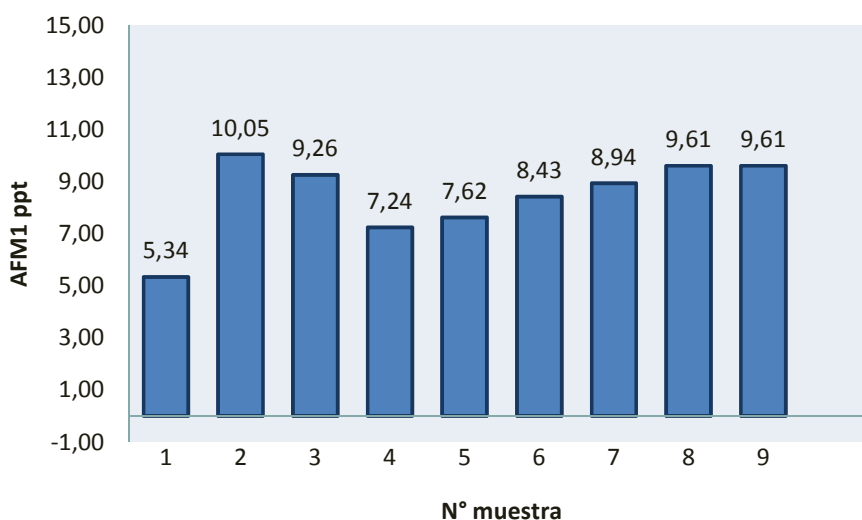


Gráfica 1. Curva patrón para la determinación de la concentración de AFM1.

Al analizar los datos de las concentraciones de AFM1 obtenidas en los quesos frescos del proveedor 1 (*Tabla 2*), se encuentra que son concentraciones que todavía logran ser cuantificadas por Ridascreen, al encontrarse por encima del límite de detección correspondiente a 5 ppt. El promedio de la aflatoxina oscila en 8,46 ppt, según se observa en la *Tabla 2*. Si comparamos estos valores con los valores máximos permitidos en los países que regulan la AFM1 en quesos (Holanda, Austria), que no superan las 250 ppt, claramente las concentraciones están muy por debajo, lo que indica que la concentración de la aflatoxina presente en estos quesos evaluados no proporciona algún riesgo de salud para la población.

Tabla 2. Valores de AFM1 obtenidos en los quesos frescos comercializados por el proveedor 1.

N° muestra	Absorbancia	CV	Concentración AFM1 (ppt)
1	0.873	0.9	5.34
2	0.748	1.1	10.05
3	0.768	1.0	9.26
4	0.820	0.5	7.24
5	0.810	0.9	7.62
6	0.789	1.1	8.43
7	0.776	1.7	8.94
8	0.759	0.9	9.61
9	0.759	1.1	9.61
Promedio			8,46



Gráfica 2. Concentraciones de AFM 1 en quesos frescos comercializados en Yopal por el proveedor 1.

Sin embargo, es importante encontrar la fuente de contaminación de AFB1, puesto que se debe tener en cuenta que en cualquier momento las condiciones de temperatura y humedad pueden variar, de forma tal que se favorezca un aumento en la síntesis de AFB1 por parte de los hongos implicados.

En la visita que se le realizó al lugar que surte de leche al proveedor 1, se encontró que los alimentos están dispuestos en un pequeño cuarto, con piso y paredes de baldosa que facilitan la limpieza de este y con un sistema rudimentario de ventilación y refrigeración.

La cantidad de alimento almacenado era poco, puesto que según se explicó el alimento se recolecta una vez por semana y evitan guardarlo por periodos prolongados de tiempo para evitar que animales, especialmente roedores deterioren el alimento.

Con esto, se podría pensar que la contaminación de aflatoxinas, específicamente AFB1, viene de la cosecha, donde se presenta un deterioro de esta debido a la presencia de *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. flavus* en el suelo.

Indirectamente también se puede evaluar la calidad de la leche utilizada para la producción del lote. Teniendo en cuenta los estudios que demuestran que el factor de enriquecimiento del queso, FE, es 3 a 5 veces la concentración de AFM1 en leche, se puede determinar que la posible concentración de AFM1 en la leche corresponde a un valor entre 1.69 ppt (8.46 ppt /FE5) y 2.82 (8.46 ppt/ FE3) ppt, tomado como valor de referencia el promedio de las concentraciones. Y estos valores son aceptados tanto como la NTC 3581 como por la reglamentación de la Comunidad Europea, siendo esta última más estricta en cuanto a los valores permitidos.

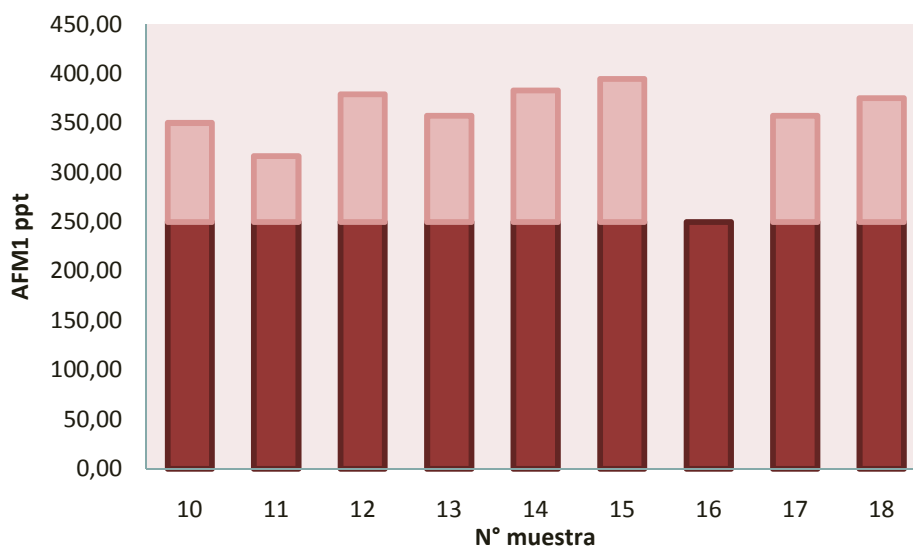
En cuanto a los resultados del proveedor 2, se detectó la presencia de AFM1 en concentraciones desde 245 ppt hasta 394 ppt (*Tabla. 3*). Sobresale en la *Gráfica 3*, que los valores de AFM1 superan los 250 ppt, hecho que sugieren que los consumidores de quesos frescos del proveedor 2 tienen mayor riesgo de desarrollar una falla hepática, ya que según se ha demostrado, el daño hepático es mayor cuando se consume la aflatoxina junto con alimentos ricos en lípidos, como el queso, ya que los lípidos son oxidados en presencia de aflatoxinas formando grupos epoxi, los cuales pueden reaccionar con los grupos nucleofílico de ADN y de algunas proteínas, promoviendo mutaciones y pérdidas funcionales(17).

Otro gran problema en la ingesta de AFM1, ligado a la anemia hemolítica y al descenso de albumina por disfunción hepática, es el aumento de la bilirrubina indirecta en sangre, que conlleva a una encefalopatía hiperbilirrubinémica. Al estarse lisando los glóbulos rojos por causas extracorpúsculares, se aumenta la concentración de biliverdina en sangre y su tasa de reducción, por lo que aumentará la bilirrubina indirecta. Esta estando en altas concentraciones es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica y actuar como una neurotóxica y por tanto producir daños irreversibles asociados generalmente a pérdida auditiva, motora y cognoscitiva; agravándose en el caso de niños.

Estas concentraciones también preocupan, si se tiene en cuenta la TDI (dosis diaria tolerable). En un caso hipotético, una persona adulta de 60 kg con una TDI de 120 ppt que consume 200 g al día de este queso con una concentración de 351 ppt (valor promedio encontrado), estaría aportando a su dieta 1,2 ppt/kg/día de AFM1, valor muy cercano al TDI correspondiente a 2 ppt/Kg/día, lo que podría poner en riesgo la salud. En el caso de los niños, la situación se agudiza, ya que un niño de 6 años con 20 kg de peso estaría consumiendo 3,5 ppt/kg/día.

Tabla 3. Valores de AFM1 obtenidos en los quesos frescos comercializados por el proveedor 2.

N° muestra	Absorbancia	CV	Concentración AFM1 (ppt)
10	0.136	2.8	350.28
11	0.146	2.1	316.83
12	0.128	2.3	379.25
13	0.134	3.1	357.33
14	0.147	2.2	383.01
15	0.145	3.1	394.52
16	0.134	2.0	245.06
17	0.127	2.3	357.33
18	0.124	2.9	375.51
Promedio			351.01



Gráfica 3. Concentraciones de AFM 1 en quesos frescos comercializados en Yopal por el proveedor 2.

Dicho valor puede conllevar a una intoxicación aguda, o en el caso de seguir consumiendo por tiempo prolongado quesos contaminados con concentraciones similares, convertirse esta en una intoxicación crónica.

En cuanto a la calidad de la leche utilizada para la elaboración de este queso, esta si está cumpliendo con la NTC 3581; puesto que el límite máximo de AFM1 que se permite es de 400 ppt, y esta leche puede haber contenido desde 70 hasta 117 ppt por el factor de enriquecimiento (calculándose AFM1 promedio/factor enriquecimiento).

En base a este hecho, debería replantearse la concentración máxima de AFM1 en leche, ya que 400 ppt es una concentración muy alta para la leche destinada a la elaboración de quesos teniendo en cuenta el factor de enriquecimiento. La reglamentación podría guiarse entonces, por la norma adopta en la Comunidad Europea, en donde la leche no supera las 50 ppt (30) y consecuentemente las 250 ppt en quesos (6).

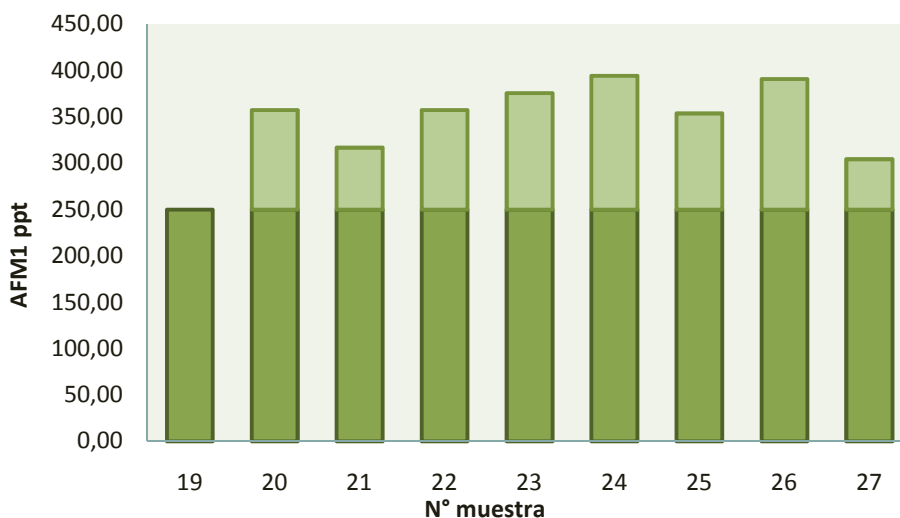
Finalmente los quesos frescos del proveedor 3 analizados, al igual los del proveedor 2, mostraron concentraciones similares como se observa en la *Tabla 4*. La concentración mínima encontrada fue de 245 ppt y la máxima de 394 ppt, con un promedio de 343 ppt, valores que llevan nuevamente a pensar que las condiciones de cosecha o almacenamiento del alimentos de las vacas tienen importantes falencias, lo que está permitiendo que *A. flavus*, *A. parasiticus* y/o *A. nomius* se desarrollen fácilmente sobre los granos y cumplan sobre estos todo su ciclo de vida.

Un dato que llamó la atención cuando se estaba indagando sobre las empresas y la proveniencia de la leche para la fabricación del queso, es que ambas empresas son surtidas de leche por un mismo hato, hecho que se ve reflejado en las similares concentraciones de AFM1 encontradas en los quesos (*Gráfica 4*).

En el momento que se realizó la visita al hato, se evidenció que las condiciones de almacenamiento de los granos y concentrados del ganado no cumplían con los parámetros mínimos de humedad y temperatura que evitaran el desarrollo de microorganismos en el lugar. No se tenía un lugar adecuado para guardar el alimento, este se encontraba en una esquina del establo, donde el agua lluvia podía acumularse y deteriorar los alimentos. Claro está que la temperatura y la aireación tampoco se controlan.

Tabla 4. Valores de AFM1 obtenidos en los quesos frescos comercializados por el proveedor 3.

N° muestra	Absorbancia	CV	Concentración AFM1 (ppt)
19	0.171	1.2	245.06
20	0.134	1.1	357.33
21	0.146	1.6	316.83
22	0.134	3.5	357.33
23	0.129	1.2	375.51
24	0.124	2.9	394.53
25	0.135	2.2	353.79
26	0.125	3.6	390.65
27	0.150	1.0	304.25
Promedio			343.92



Gráfica 4 Concentraciones de AFM 1 en quesos frescos comercializados en Yopal por el proveedor 3.

Teniendo en cuenta que las concentraciones de AFM1 obtenidas en los quesos de los proveedores 2 y 3, son un riesgo inminente para quienes los consumen, es de suma importancia tomar medidas que garanticen la ausencia de AFB1 en los alimentos del ganado.

Es indispensable concientizar tanto a los productores de queso como a los proveedores de leche que se debe realizar un monitoreo de los alimentos destinados al consumo pecuario, comenzando con las características microbiológicas del suelo en el que se cosechan los granos o los cereales, siguiendo con una revisión de la cosecha obtenida, continuando con las condiciones higiénicas del transporte de dichos alimentos y terminando con las condiciones de almacenaje (utilización de un silo hermético y secado de los granos); para que de dicha forma se pueda garantizar alimentos libres no solo de AFB1, sino de otras micotoxinas que afectan la salud tanto de animales como de humanos.

Como la radicación de *Aspergillus* spp en suelos, granos y almacenes es un proceso largo, deben hacerse también monitoreos de la concentración de AFB1 en los alimentos pecuarios para poder tener una idea de la concentración de AFM1 secretada en la leche y por tanto el riesgo de salud que puede presentar el consumo de esta misma o sus derivados.

Para esto existe una relación lineal entre los niveles de AFB1 en alimento contaminado y el contenido de AFM1 en la leche:

$AFM1 \text{ (ng/Kg de leche)} = 1.2 \times \text{consumo de AFB1 } (\mu\text{g/vaca por día}) + 1.9;$ (31)
relación que debe ser utilizada por las fincas que comercializan productos para consumo humano, cuya vigilancia control o erradicación de AFB1, están en proceso.

Al revisar casos de AFM1 en quesos reportados en países como Francia, Emiratos Árabes, Egipto, Indonesia, Alemania y Kuwait entre otros, se encuentra que sus concentraciones algunas veces son indetectables y que pocas veces superan las 50 ppt (32-33), sugiriendo que son países que han logrado controlar la presencia de la aflatoxina en el queso, bien sea por la disminución de AFB1 en los alimentos del ganado o por la detoxificación de AFM1 en la leche, y por tanto podrían servir de guía para aquellos productores de queso con concentraciones importantes de AFM1, como los proveedores 2 y 3.

CONCLUSIONES

Se determinó y cuantificó la concentración de AFM1 en quesos frescos por medio de la técnica inmunoenzimática ELISA de tipo competitivo directo.

Se halló que el 100% de las muestras de queso analizadas estaban contaminadas con AFM1, indicando un control poco efectivo de presencia de AFB1 en el alimento del ganado.

Se estableció que 67% de las muestras de queso analizadas manejaron concentraciones de AFM1 superiores a 250 ppt, valores establecidos por países de la comunidad europea, lo que pone en riesgo la salud y calidad de vida de los consumidores de quesos comercializados por los proveedores 2 y 3 del estudio.

Se concluyó que los quesos elaborados por el proveedor 1 son seguros para el consumo de la población, en cuanto a exposición de AFM1 se refiere.

Se encontró que el hato abastece de leche a los proveedores 2 y 3, en Yopal, no está llevando a cabo un correcto proceso de almacenamiento del alimento de su ganado lechero, lo que lleva a producir y vender quesos con concentraciones importantes de AFM1 que pueden poner en riesgo la salud de la población.

RECOMENDACIONES

Concientizar tanto a los productores de queso como a los proveedores de leche de que se debe realizar un monitoreo de los alimentos destinados al consumo pecuario.

Determinar la presencia de AFM1 y cuantificar la concentración en leches comercializadas en el municipio de Yopal, para ampliar el panorama de la situación real de intoxicaciones por dicha aflatoxina y de esta forma poder tomar medidas de control y vigilancia que garanticen el bienestar de la población y no el de los productores lácteos.

Realizar esta misma clase de estudio en los departamentos colombianos con mayor impacto en el sector lechero para obtener información respecto a la situación de AFM1 en quesos frescos.

REFERENCIAS

1. Lafaurie, J.F. Sector lácteo Colombiano, Una propuesta para reconstruir al sector.
http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/PAGE/FNG_PORTAL/PG_SERVICIOS/COYUNTURA_LECHERA1/UNA_PROPUESTA_PARA_RECONSTRUIR_AL_SECTOR.PDF. consultado el 26 de julio de 2009.
2. Confederación empresarial del campo de Colombia . Análisis del mercado de la leche en Colombia.
<http://www.confecampo.com/estadisticas/COOAGROCAMPO--LECHE.ppt>. consultado el 26 de julio de 2009.
3. CORPOICA. http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Libreria/verpublicacion.asp?id_publicacion=1830. Consultado el 5 de agosto de 2009.
4. Fallah A, Jafari T, Fallah A, Rahnama M. Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 1872–1875.
5. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 984–991.
6. Gimeno A. Aflatoxina M1 en la leche riesgo para la salud pública prevención y control. *Alimentación animal* 2004; 49: 32-44.
7. Wang Y, Dostálek J, Knoll W. Long range surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; 24: 2264–2267.
8. ICONTEC. NTC 3581: Nivel máximo permitido de aflatoxina en los alimentos.
9. Basilico J. C. Aflatoxina M1. Catedra de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/presentaciones/aptitud_leche/charla_aflatoxina.pdf . consultado el 24 de marzo de 2009.
10. Guzmán D. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública Mexicana* 2007; 49: 227-235.
11. Periaea M, Radic B, Lucic A, Pavlovic. Toxic effects of mycotoxins in human. *Bulletin of the World Health Organization* 1999; 77(9): 754 – 766.
12. Unusan N. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food chemical toxicology* 2006; 44: 1897-1900.
13. Zinedine L, Gonzalez O, Soriano J.M, Molto J.C, Idrissi I, Mañes J. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiologie* 2007; 114: 25-29.
14. Atanda O, Oguntubo A, Adejumo O, Ikeorah J, Akpan I. Aflatoxin M1 contamination of milk and ice cream in Abeokuta and Odeda local governments of Ogun State, Nigeria. *Chemosphere* 2007; 68: 1455-1458.
15. Afanador J. Efecto de las aflatoxinas sobre la salud y producción porcinas. Trabajo de grada. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia. 1997.
16. Arango M.C. Micotoxinas y salud humana. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

17. <http://www.geocities.com/biosaluduc/MICOTOXINAS.html>. consultado el 24 de marzo de 2009.
18. Bermúdez R, Martinto L, Franqui L, Sánchez I. Principales riesgos potenciales del uso de microorganismos transgénicos. http://www.cursosparamedicos.com/newsite/pags/ac_cient/monos/microorganismos.pdf. consultado el 24 de marzo de 2009.
19. CODEX alimentarius. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es consultado el 24 de marzo de 2009.
20. De Luca L. Micotoxinas. http://www.engormix.com/micotoxinas_laboratorios_burnet_s_articulos_464_MYC.htm. consultado el 9 de abril de 2009.
21. Manetta A. C, Giammarco M, Di Giuseppe L, Fusaro I, Gramenzi A, Formigoni A, Vignola G, Lambertini L. Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry* 2009; 113: 595–599.
22. Kamkar A, Karim G, Shojaee F, Khaksar. Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 2236–2238.
23. Saume E, León A. Revisión Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical* 2005; 23(4): 393-410.
24. Combita A, Mildenberg S. Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del valle del cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa. Trabajo de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. 2009
25. Medina J. C, Castillo E. Determinación de micotoxinas por medio de ensayos inmunoquímicos. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S15.htm>. consultado el 8 de abril de 2009.
26. Alimentatec. Resonancia de plasmones superficiales. <http://www.alimentatec.com/muestrapaginas.asp?nodo1=0&nodo2=0&idcontenido=661&content=18>. consultado el 8 de abril de 2009.
27. Pei SC, Zhang y, Eremin S, Lee W. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control* 2009; 20: 1080–1085.
28. Rosia P, Borsaria A, Lasia G, Lodia S, Galantia A, Favaa A, Girottib S, Ferri E. Aflatoxin M1 in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. *International Dairy Journal* 2007;17: 429–435.
29. Amaro D, Valverde J. Métodos de Aproximación de Curvas de Spline. <http://www.seccperu.org/files/InformeCurvasSpline.pdf>. consultado el 15 de octubre de 2009.
30. Comisión del Codex Alimentarius. Informe de la 32ª reunión del comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Beijing, República Popular de China. 20-24 de marzo de 2000. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/005/X7137S/X7137s.pdf>. consultado el 22 de octubre de 2009.

31. Diaz G. Aflatoxina M1: un carcinógeno de potencial presencia en la leche. Seminario Nacional en Producción y Sanidad Bovina. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Mayo 18–20, 2005, Bogotá, Colombia. http://www.cundinamarca.gov.co/Cundinamarca/Archivos/FILE_EVENTOSENTI/FILE_EVENTOSENTI10232.pdf. consultado el 24 de *marzo de 2009*.
32. Dasht B, Al-Hamli S, Alomirah H, Al-Zenki S, Abbas A, Sawaya W. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control* 2009; 20: 686–690.
33. Nuryono N, Agus A, Wedhastri S, Maryudani YB, Sigit Setyabudi FMC, Böhm J, Razzazi-Fazeli E. A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. *Food Control* 2009; 20: 721–724.