

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**UTILIZACIÓN DE UN KIT DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE
AFLATOXINA M₁ EN ORINA DE VACAS LECHERAS ALIMENTADAS
ARTIFICIALMENTE CON AFLATOXINA B₁**

por

**BENOIT GONZÁLEZ, Irene Cristina
MORATORIO GARCÍA Y SANTOS, Mariana**

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY 2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Sulamita Collazo

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Alejandra Capelli

Tercer miembro:

Dra. Silvana Carro

Cuarto miembro:

Dr. Gonzálo Suárez

Quinto miembro:

Dr. Álvaro Santana

Fecha:

04 de octubre, 2017

Autores:

Br. Irene Cristina Benoit González

Br. Mariana Moratorio García y Santos

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora, Dra. Alejandra Capelli por la dedicación y el apoyo.

A nuestros co-tutores, Dr. Gonzalo Suárez y Dr. Álvaro Santana, por la orientación en el trabajo, e incentivarnos siempre a superarnos.

A la cátedra de Toxicología por su colaboración, especialmente a la Dra. Carmen García y Santos y a la Licenciada Ana Ingold.

A nuestras familias, pilares que nos han impulsado a seguir siempre adelante, sin las cuales nada sería igual.

A nuestros compañeros y amigos que nos han acompañado y apoyado a lo largo de estos años de formación, siempre con una palabra de aliento.

Al personal de Biblioteca de Facultad de Veterinaria, por la incansable ayuda en la búsqueda bibliográfica.

A los tesisistas y técnicos del campo experimental de Libertad, que hicieron de nuestro trabajo práctico un compartir con un lindo grupo humano.

Al personal del campo experimental de Libertad, por su disposición y ayuda en las actividades prácticas.

Por último a nuestra querida Facultad de Veterinaria, que desde 2011 ha sido nuestra segunda casa, nos ha permitido formarnos y crecer en el ámbito académico y personal.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Hongos toxicogénicos y micotoxinas	11
Hongos productores de aflatoxina	11
Aflatoxicosis.....	12
Metabolismo de las aflatoxinas.....	13
Métodos de detección de aflatoxinas	14
Importancia de las aflatoxinas en la salud pública y marco normativo	15
Control y prevención de aflatoxicosis	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Diseño experimental.....	19
Tratamiento de los animales.....	19
Toma de muestras.....	21
Cuantificación de micotoxinas en alimento.....	22
Cuantificación de Aflatoxina M ₁ en orina	22
Análisis estadísticos	24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Cuantificación de micotoxinas en alimentos	25
Cuantificación de aflatoxinas en orina	26
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	37
Anexo 1. Perfiles metabólicos	37
Anexo 2. Dieta ajustada según NRC	39

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Períodos del ensayo experimental.....	19
Cuadro 2. Composición de la dieta aportada a los animales experimentales expresada en Kg de MS y MF	20
Cuadro 3. Cuantificación de aflatoxinas y zearalenona en los alimentos	25
Figuras 1 y 2. Administración individual de los alimentos a los animales experimentales	21
Figura 3. Preparación de muestras de orina bovina para centrifugado	22
Figura 4. Pocillos del kit Helica Biosystem inc. Cat. No. 991AFLM01U-96.....	23
Figura 5. Concentración de AFM1 de Grupos 2 y 3 expresadas en µg/L en función del tiempo	26
Figura 6. Cromatograma de una muestra de orina positiva a la presencia de Aflatoxina.....	28

RESUMEN

Las aflatoxinas son de las micotoxinas más estudiadas debido a los perjuicios que causan en la salud humana y animal. Se conocen 20 tipos de aflatoxinas, de las cuales la aflatoxina B₁ (AFB₁) es considerada la de mayor importancia, debido a su carcinogenicidad y a que uno de sus metabolitos, la aflatoxina M₁ (AFM₁) es eliminado en la leche de vacas que consumen AFB₁. Es a través de ésta que la AFM₁ puede llegar a los humanos. Considerando el riesgo de exposición a alimentos contaminados con aflatoxinas para humanos y animales, se han establecido límites máximos de detección permitidos. Entre las técnicas más difundidas para detectar aflatoxinas está la técnica de ELISA. Los kits de Elisa utilizados para detectar AFM₁ en leche son muy difundidos, siendo de difícil empleo en categorías, razas o especies de animales no productores de leche. La medición de AFM₁ en orina podría ser de gran valor diagnóstico no sólo por ser una técnica sensible, económica, rápida y de fácil muestreo, sino porque permitiría ser empleada en categorías de animales no productores de leche. El objetivo de la presente tesis es evaluar la utilización de un kit comercial de ELISA para detectar AFM₁ en orina de vacas lecheras en producción, alimentadas artificialmente con niveles predeterminados de AFB₁ con y sin agregado de secuestrante. Doce vacas lecheras en producción, se bloquearon y distribuyeron en tres grupos de cuatro vacas cada uno (Grupo 1; 2 y 3, n=4). Los tratamientos administrados fueron: grupo 1 alimento libre de AFB₁ y de secuestrante (grupo control); grupo 2 alimento contaminado con AFB₁ y grupo 3 alimento contaminado con AFB₁ y secuestrante comercial de aflatoxinas. El ensayo tuvo una duración total de 18 días. A partir del día 1 se obtuvieron por masaje vulvar muestras de orina individual diariamente a todos los animales experimentales. A todas las vacas lecheras que consumieron alimento contaminado artificialmente con AFB₁ se les detectó AFM₁ mediante la utilización del Kit comercial de Elisa. El perfil de eliminación de AFM₁ entre vacas que consumieron AFB₁ (grupo 2) y vacas que además se les administró secuestrante de aflatoxinas (grupo 3) fue similar (P>0.05, Test Student). La medición de AFM₁ en orina demostró ser de valor diagnóstico no sólo por las ventajas de la técnica (sensible, económica, rápida) y de la facilidad del muestreo, sino por la versatilidad de su empleo en animales no productores de leche.

SUMMARY

Aflatoxins are some of the most widely studied mycotoxins as they cause harm to human and animal health. 20 different aflatoxins are known, out of which aflatoxin B1 (AFB1) is the most important due to its carcinogenicity and to the fact that one of its metabolites, aflatoxin M1 (AFM1) is excreted in the milk of cows that consume AFB1. By means of this milk, humans may be exposed to AFM1. Considering the risk of exposure for humans and animals to food contaminated with aflatoxins, maximum allowed detection levels have been set. ELISA is among the most widely used techniques to detect aflatoxins. ELISA kits are widely used to detect AFM1 in milk, although it is difficult to employ them in animal categories, breeds or species which are not milk-producing. Testing AFM1 levels in urine may provide a valuable diagnosis since it is a sensitive, cost-effective, quick and easy-to-sample technique which may be used in categories of non-milk producing animals. The objective of this thesis is to evaluate the use of a commercial ELISA kit in detecting AFM1 in the urine of producing dairy cows artificially fed with predetermined AFB1 levels with or without added sequestrants. A dozen producing dairy cows were divided into three groups of four cows each (Group 1; 2 and 3, n=4). The treatments administered were: group 1 (control group) AFB1 and sequestrant free food; group 2 AFB1 contaminated food and group 3 was food contaminated with AFB1 and with commercial sequestrant for aflatoxins. The trial lasted 18 days. As of day 1, daily individual urine samples for all the test animals were obtained through vulvar massage. AFM1 was detected by means of a commercial ELISA kit in all dairy cows which consumed AFB1 contaminated food. The AFM1 elimination profile among cows which consumed AFB1 (group 2) and cows which were administered sequestrant for aflatoxins (group 3) was similar ($P>0.05$, Test Student). Testing AFM1 levels in urine proved to be a valuable diagnosis due to its technical advantages (sensitive, cost-effective, quick) as well as to its versatility when used in non-milk producing animals.

INTRODUCCIÓN

En la última década, el uso de suplementos alimenticios ha ido aumentando, ya que son una de las herramientas más utilizadas para mantener y aumentar la producción láctea. Su uso tiene ventajas, como aumentar la producción animal o suplementar en períodos de restricción forrajera (DIEA, 2016); también tiene desventajas, entre ellas el potencial desarrollo de hongos que se observa principalmente en los concentrados de tipo energético (Coulombe, 1993).

Algunas especies de hongos pueden ser toxicogénicos debido a que tienen la capacidad de producir micotoxinas. Estas sustancias son parte del metabolismo secundario de hongos, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* y tienen la capacidad de producir intoxicación en el hombre y en los animales. Estos mohos suelen desarrollarse en sustratos como cereales, maíz, soja, sorgo, maní y ensilados entre otros (Jacobsen y col., 2007). Para entender la relevancia de las micotoxinas se ha estimado que del 25 al 40% de los cereales del mundo están contaminados con éstas sustancias (FAO, 2003), siendo estos sustratos importantes difusores por ser muy utilizados en la alimentación animal (Yiannikouris y Jouany, 2002).

Las micotoxinas con mayor relevancia a nivel veterinario son aflatoxinas, deoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas y ocratoxinas (Yiannikouris y Jouany, 2002; Heidler, 2004). El efecto de éstas en animales varía según el tipo de micotoxina, nivel y duración de la ingesta (Mertens, 1979). Dentro de éstas, las aflatoxinas (AF) representan un grupo muy estudiado debido a sus efectos (principalmente carcinogénico) a nivel de la salud humana y animal (Bhatnagar y col. 2006) Se destaca el género *Aspergillus* como el principal productor de aflatoxinas, y dentro de este las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. Se conocen 20 tipos de aflatoxinas, siendo la aflatoxina B₁ (AFB₁) la más relevante. Esto se debe a que uno de sus metabolitos, la aflatoxina M₁ (AFM₁) es eliminada a través de la leche, componente muy importante de la dieta del hombre, principalmente de los niños (Prandini y col., 2009).

Existen diferentes susceptibilidades a las AF según la especie animal, siendo los rumiantes menos susceptibles que otras especies. Esto se debe a su capacidad de degradar parte de las AF en el rumen (Fink- Gremmels, 2008). La AFB₁ que no es degradada en su paso por el rumen, es absorbida en intestino, pasando por difusión sanguínea al hígado. En este órgano se metaboliza a un producto biológicamente activo denominado AFB₁-8,9-epóxido, derivado que puede reaccionar con el ADN, ARN y proteínas formando aductos (Essigman y col., 1977). A su vez, la AFB₁ también puede ser hidroxilada en hígado, dando como resultado AFM₁, y otros metabolitos (Eaton y col., 1994). La AFM₁ puede seguir dos vías, conjugarse con ácido glucurónico y ser excretada vía biliar, o ingresar a la circulación sistémica y ser eliminada por leche y orina (Fink- Gremmels, 2008). De la tasa de conversión de AFB₁ a AFM₁ un 0,3 a un 6,2 % es excretada por leche (Magan y Olsen, 2004), mientras que 1,6 % sería eliminada por orina (Allcroft y col., 1968).

Una de las medidas de control y prevención de AFM₁ en leche y productos lácteos, es disminuir la disponibilidad de AFB₁ en alimentos de los animales. Por otro lado uno de los métodos más eficientes para reducir la biodisponibilidad de las AF en el animal es el agregado de secuestrantes o agentes adsorbentes en el alimento. Éstos

se unen a las AF en el tracto gastrointestinal de los animales formando complejos insolubles que se eliminan por la materia fecal (Phillips y col., 2002). Otra medida complementaria es la detección precoz de AFB₁ y AFM₁. Con ese fin, se llevan a cabo diferentes técnicas, principalmente cromatográficas e inmunoensayos, en alimentos destinados al consumo humano y animal (Rosi y col. 2007). Uno de los métodos de inmunoensayo más usado es la técnica de ELISA (Enzyme Linked Inmunosobent Assay). Ésta es ampliamente difundida para monitorear AFB₁ en alimentos y AFM₁ en leche. Los kits para detectar AFM₁ en la matriz leche son muy difundidos, pero estos no pueden ser utilizados en categorías, razas o especies de animales no productores de leche. En estos casos, para monitorear individualmente si existió o no consumo de AFB₁, sería conveniente el uso de kits de detección en una matriz diferente como la orina. En poblaciones humanas de distintas partes del mundo, se ha monitoreado la exposición de AFM₁ con kits de detección en orina (Sabran y col., 2012). No obstante, no se encontraron reportes sobre su empleo en bovinos. Es por este motivo que el presente estudio propone convalidar el empleo de un kit comercial para detectar AFM₁ en la matriz orina de vacas lecheras contaminadas artificialmente con AFB₁.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Hongos toxicogénicos y micotoxinas

Los hongos o mohos pueden crecer sobre distintos tipos de alimentos produciendo el deterioro de los mismos. Algunas especies de hongos tiene la capacidad de producir micotoxinas. Estos metabolitos secundarios son capaces de ocasionar enfermedades en el hombre y en los animales. Los hongos productores de micotoxinas son llamados toxicogénicos y suelen desarrollarse en sustratos como maíz, cereales, soja, sorgo, maní, ensilados, ya sea en granos o cultivos o durante el transporte (Jacobsen y col., 2007). Los principales factores ambientales que favorecen la proliferación de hongos toxicogénicos son humedad y temperatura. También son importantes las condiciones de pH de los sustratos así como el aporte de nitrógeno y oxígeno (Nelson, 1993). Entre el 25 y 40% de los cereales del mundo están contaminados por micotoxinas (FAO, 2003), por lo que son considerados importantes difusores por ser muy utilizados en la alimentación animal (Yiannikouris y Jouany, 2002).

Dentro de los géneros productores de micotoxinas se destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Jacobsen y col., 2007). Estas toxinas, pueden ocasionar graves perjuicios en la salud humana y animal, pudiendo ser carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, estrogénicas, neurotóxicas o inmunotóxicas (Yiannikouris y Jouany, 2002; Mallmann y Dilkin, 2011). Estos efectos pueden observarse tanto en los humanos como en los animales que las consuman. Las micotoxinas que presentan mayor relevancia a nivel veterinario son aflatoxina, deoxinivalenol, zearalenona, fumonisina y ocratoxina (Yiannikouris y Jouany, 2002; Heidler, 2004). El efecto de éstas en animales varía según el tipo de micotoxina, nivel y duración de la ingesta. También depende de factores animales que estén presentes como la especie, sexo, edad, raza, estado general de salud, inmunidad y nivel nutricional. Pero no debemos olvidarnos de los factores ambientales que son fundamentales como el manejo, bioseguridad, higiene, temperatura y humedad a la cual están expuestos los alimentos. Los animales que presentan mayor susceptibilidad son los jóvenes; aumentando la prevalencia en ambientes estresantes, altas temperaturas, mala ventilación, alta humedad y hacinamiento (Heidler, 2004).

Hongos productores de aflatoxinas

Dentro de las micotoxinas de interés veterinario las aflatoxinas representan uno de los grupos más estudiados debido a sus efectos a nivel de la salud humana y animal. Se destaca como principal género productor de aflatoxinas al *Aspergillus*, siendo las especies más comunes *A. flavus*, *A. parasiticus* y en menor medida *A. nominus* (Prandini y col., 2009). Los dos primeros son ubicuos y tienen mayor afinidad por semillas de oleaginosas y plantas en crecimiento. Las fuentes de contaminación de aflatoxinas más comunes son: maíz y sus derivados, arroz, nueces, maní, frutos secos, semillas de algodón, otras semillas oleaginosas, cereales y condimentos (Coppock y col., 2012). Las zonas de climas tropicales y subtropicales son las que representan mayor riesgo de presencia de *Aspergillus*. Estos hongos pueden colonizar los productos post-cosecha que no fueron adecuadamente almacenados (Mostrom y Jacobsen, 2011; Battilani, 2004, citado por Prandini y col. 2009).

Las temperatura de crecimiento del *Aspergillus* varía entre 13-42°C, siendo el rango óptimo de 25 a 30°C; con requerimientos de humedad de 80 a 85% (Jacobsen y col., 2007). Según Moss (1991), la producción de aflatoxinas se ve favorecida a una temperatura de 33 °C y una AW de 0,99, aunque puede ser también formada a 15°C con una AW de 0,95. Mientras que para Battilani (2004, citado por Prandini y col., 2006) la máxima producción de aflatoxinas oscila entre los 20 y 30°C. Existen otros factores que influyen la producción de aflatoxinas como el aporte de Carbono y Nitrógeno (Bhatnagar y col., 2006) y Zinc (Moss, 1991).

Aflatoxicosis

La aflatoxicosis es la enfermedad originada por el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas. Para los animales los alimentos más comunes son el maíz y sus derivados, mientras que para el hombre productos como maní, avellanas, nueces, frutos secos y la leche son los que representan mayor riesgo (Prandini y col. 2009).

En los animales los efectos tóxicos del consumo de éstas micotoxinas varían según especie y edad. Los monogástricos suelen ser más sensibles que los rumiantes, ya que estos últimos degradan parte de las aflatoxinas que consumen en el rumen (Fink- Gremmels, 2008; Mostrom y Jacobsen, 2011). Dentro de los monogástricos las aves son las más sensibles. En cuanto a la edad; los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos (Jacobsen y col., 2007; Mostrom y Jacobsen, 2011).

La aflatoxicosis se clasifica en aguda o crónica según la cantidad de aflatoxinas ingerida y el período de tiempo de consumo. Los principales signos agudos que se observan en los animales son inapetencia y depresión. La toxicidad crónica se presenta con mayor frecuencia y ocurre por exposición a bajas concentraciones por períodos prolongados de tiempo, que varía de semanas a meses (Diekman y Green, 1992; Osweiler, 2000). Los primeros signos que se observan en la aflatoxicosis crónica en mamíferos son disminución de consumo, pérdida de peso y disminución de crecimiento (Brown y col., 1981; Diekman y Green, 1992; Osweiler, 2000). En vacas lecheras se incluye disminución de producción láctea (Brown y col., 1981; Ogunade y col., 2016) y de grasa en la leche (Ogunade y col., 2016). Como observaciones patológicas se ha encontrado cirrosis hepática, necrosis o inflamación hepática, proliferación celular en conductos biliares y fibrosis periportal (Newberne y Butler, 1969). En sangre se demostró un aumento de los niveles de bilirrubina, colesterol y de las enzimas hepáticas (AST, SGOT, LDH) (Bodine y col., 1976, citado por Mertens, 1979), así como reducción en el conteo de eritrocitos y en la concentración de hemoglobina (Ogunade y col., 2016).

En el caso del humano la aflatoxicosis aguda puede provocar vómitos, diarrea, hemorragias, defectos en la coagulación, abortos y muerte. La forma crónica suele ser la que se presenta con mayor frecuencia y se puede observar inmunosupresión, mutagénesis, teratogénesis y diferentes carcinomas, sobre todo de origen hepático (Carvajal, 2013). Por todos estos efectos, es que las aflatoxinas son muy estudiadas y controladas en alimentos destinados al consumo humano y animal (Prandini y col., 2009).

Metabolismo de las aflatoxinas

Una vez ingerido el alimento con aflatoxinas en el organismo animal, ocurren una serie de procesos metabólicos que contribuyen a la detoxificación de la misma. Generalmente son ingeridos varios tipos de aflatoxinas, siendo la aflatoxina B₁ (AFB₁) la de mayor importancia, ello se debe a su toxicidad y a la excreción de uno de sus metabolitos (aflatoxina M₁) a través de la leche (Prandini y col., 2009).

La AFB₁ presenta un complejo metabolismo, en una primera fase se puede dar un proceso de detoxificación irreversible con la formación de metabolitos hidroxilados como AFM₁ y AFQ₁, detoxificación reversible y formación de aflatoxicol o activación con formación de AFB₁-8,9 epóxido (Neal, 1998).

Como se ha mencionado, existen diferencias de susceptibilidad a las aflatoxinas según la especie animal, siendo los ruminantes menos susceptibles que otras especies. Esto se debería a su capacidad de degradar parte de las aflatoxinas en el rumen dando como resultado un metabolito secundario denominado Aflatoxicol (Fink- Gremmels, 2008). En este metabolito se potencia el poder mutagénico y carcinogénico (Coulombe y col., 1982), aunque demuestra menor toxicidad que la AFB₁, no obstante la reacción de óxido-reducción es de tipo reversible, lo cual hace que se considera un reservorio de toxicidad (Wong y Hsieh, 1980).

La AFB₁ que no es degradada en su primer paso por el rumen, es absorbida en intestino, pasando por difusión sanguínea vía porta al hígado (Magan y Olsen, 2004). Este órgano forma un producto por epoxidación denominado AFB₁-8,9-epóxido, por acción de la enzima Citocromo P450. Este producto, es capaz de reaccionar con proteínas y con ácidos nucleicos especialmente formando aductos con el N₇ de la base Guanina (Essigman y col., 1977) lo que sería responsable de la actividad carcinogénica de las aflatoxinas (Eaton y col. 1994; Neal, 1998). A su vez el AFB₁-8,9-epóxido en presencia de la enzima epóxido hidrolasa se transforma en AFB₁-8,9-dihydrodiol, el cual puede existir en una forma de dialdehído que es capaz de formar aductos con las bases de Schiff al unirse con el grupo amino de algunas proteínas, particularmente con el aminoácido lisina (Swenson y col. 1973; Neal, 1998), así como unirse a las proteínas celulares, formando aductos citotóxicos (Neal, 1998). Este tipo de reacción se la relaciona con la toxicidad aguda de las aflatoxinas (Eaton y col. 1994; Patterson, 1973; Neal, 1998). La epoxidación de AFB₁ es un paso esencial que determina la adquisición de las características carcinogénicas y mutagénicas (Yiannikouris y Jouany, 2002).

El AFB₁-8,9-dihydrodiol, en presencia de la enzima aldehído reductasa AFAR, es transformado en AFB₁-dialcohol brindando protección contra los efectos de una toxicidad aguda de la AFB₁ al evitar la unión de este metabolito a las proteínas (Neal, 1998). Por otro lado, en la segunda fase del metabolismo, considerada de detoxificación, AFB₁-8,9-epóxido puede conjugarse con Glutación mediante la acción de la enzima Glutathion s-transferasa (Hayes y col., 1991).

A su vez, la AFB₁ como tal puede ser hidroxilada en hígado por acción de la enzima Citocromo P450, dando como resultado metabolitos que tienen menor actividad biológica que el compuesto original. En el caso de AFB₁ la hidroxilación en el carbono 3 y 9 forma AFQ₁ y AFM₁ respectivamente (Eaton y col. 1994). Por desmetilación de AFB₁ se produce en algunas especies AFP₁ así como se forma

AFB_{2α} por hidratación de AFB₁ (Wong y Hsieh, 1980), siendo considerados todos estos metabolitos de menor mutagenicidad y carcinogenicidad (Coulombe y col., 1982). En la fase 2, todos estos metabolitos pueden ser conjugados por medio de la enzima Glutación s- transferasa con glutatión, glucurónidos y sulfónidos (Galtier, 1999) de manera de disminuir la toxicidad y aumentar la solubilidad en agua, facilitando su excreción a través de orina y leche (Dominguez-Bello, 1996). La AFM₁ formada en esa etapa, puede seguir dos caminos, conjugarse con ácido glucurónico y ser excretada vía biliar, o ingresar a la circulación sistémica y ser eliminada por orina y leche (Fink- Gremmels, 2008). En el caso de la eliminación de AFM₁ por leche se ven involucrados diversos procesos de filtración intercelular, difusión pasiva a través de la membrana así como transporte activo (Yannikouris y Jouany, 2002). De la tasa de conversión de AFB₁ a AFM₁ en bovino un 0,32 a un 6,2 % (Magan y Olsen, 2004) es excretada por leche. Mientras que de la tasa de conversión de AFB₁ a AFM₁ que es excretada por orina según Allcroft y col., (1968) es del 1,61 %.

La tasa de conversión de AFB₁ a AFM₁ se ve influenciada por diversos factores nutricionales y fisiológicos, entre ellos; régimen alimenticio, rango de ingestión, digestión, salud animal y etapa de lactación (Britzi y col., 2013). La capacidad de biotransformación hepática y producción de leche (Veldman y col., 1992) así como variación individual (Munksgaard y col., 1987), por día y entre ordeñes (Van Egmond, 1994) son factores que también influyen el pasaje de AFB₁ a AFM₁. La conversión puede variar según Britzi y col., (2013) de 5,8% en lactación media a 2,5% en lactación tardía, mientras que según Veldman y col. (1992) la misma es de 6,2 % en lactación temprana y 1,8% en tardía. Ambos autores coinciden en que en la excreción de AFM₁ es mayor en lactación temprana, lo cual se explica por un aumento en la permeabilidad en la membrana celular alveolar de la glándula mamaria en esta etapa teniendo en cuenta que la conversión depende de la actividad enzimática del animal. Esto último explica porque independientemente del consumo de AFB₁, vacas de alta producción tienen mayor conversión a este metabolito que vacas de menor producción. Si comparamos sólo el nivel de consumo de AFB₁ con respecto a la eliminación de AFM₁ en leche sin considerar los demás parámetros estos tendrían una correlación lineal (Veldman y col., 1992).

La AFM₁ se detecta en leche de 12 a 24hs post ingestión de AFB₁, disminuyendo los niveles 48 - 72hs de suprimida la dieta problema (Van Egmond, 1994; Brown y col., 1981). En orina la AFB₁ y AFM₁ es detectada 6 hs post ingesta del alimento contaminado con aflatoxinas y en algunas vacas se detectó hasta 5 días después de retirado dicho alimento (Brown y col., 1981). El pico de excreción de AFM₁ en orina se detecta a las 24 hs post ingestión de la micotoxina (Allcroft y col., 1968).

Métodos de detección de aflatoxinas

Para la detección de AFB₁ y AFM₁ en diferentes matrices como cereales, leche, subproductos lácteos y orina, se deben utilizar métodos sensibles ya que se detectan pequeñas cantidades, para ellos se utilizan métodos cromatográficos y de inmunoensayos (Rosi y col. 2007). De estos métodos los más utilizados son cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography [TLC]), cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography [HPLC]), cromatografía de gases (Gas Chromatography [GC]) e inmunoensayo enzimático (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay [ELISA]) (Turner, y col. 2009).

Una de las técnicas más difundida para la detección de aflatoxinas es la de inmunoensayo enzimático - ELISA. Esta prueba inmunoenzimática de unión primaria detecta el enlace específico antígeno-anticuerpo y cuantifica los inmunocomplejos formados, mediante un marcador enzimático que actúa con un sustrato cromógeno. El grado de transformación del sustrato incoloro a un producto coloreado se cuantifica por espectrofotometría. Las ventajas de la técnica son numerosas: es un método muy sensible, de bajo costo, fácil manejo y que permite analizar gran número de muestras en cortos períodos de tiempo (Gómez-Lucía y col., 2007; Rosi y col., 2007). Autores como Rosi y col. (2007) realizaron una comparación entre la performance de la técnica de ELISA y la de HPLC concluyendo que la primera es un método analítico fiable y preciso para la detección de AFM₁ en leche.

La técnica es muy utilizada para conocer el grado de AFM₁ en leche y las aflatoxinas totales en los alimentos. Si bien estos kits son muy difundidos para su aplicación en vacas lecheras, no pueden ser utilizados en categorías, razas o especies de animales no productores de leche. La exposición a las aflatoxinas en sistemas de producción cárnica puede derivar en pérdidas de ganancia diaria, afectando la salud animal, y por consiguiente la rentabilidad productiva y económica de los productores. Es así que, para realizar un monitoreo individual en animales no productores de leche expuestos al consumo de AFB₁, el uso de kits para medir concentraciones de AFM₁ en orina, sería de gran utilidad. Los kits de orina, han sido utilizados para monitorear poblaciones humanas en riesgo de exposición en distintas partes del mundo (Sabran y col., 2012). Sin embargo, no se encontraron reportes sobre su empleo en bovinos.

Dentro de los kits de ELISA comerciales disponibles para la detección de AFM₁ en orina, es usado el método competitivo con antígeno marcado. En esta técnica el antígeno marcado con la enzima compete con el antígeno problema presente en la muestra, por los centros de unión de una cantidad conocida de anticuerpos específicos, los cuales se encuentran unidos covalentemente a una fase sólida (Rivera Coll, 1998).

Importancia de las aflatoxinas en la salud pública y marco normativo

Se conocen 20 tipos de aflatoxinas, siendo la aflatoxina B₁ (AFB₁) la de mayor importancia, debido a su toxicidad y a la presencia de uno de sus metabolitos (aflatoxina M₁) en la leche de los animales que la consumieron. Es a través de este alimento que la aflatoxina M₁ (AFM₁) llega al consumo humano, principalmente niños, ya que la leche y sus derivados son unos de los principales componentes de la dieta (Prandini y col., 2009). Ambas micotoxinas, AFB₁ y AFM₁, son clasificadas como hepatotóxicas y carcinogénicas grado 1 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 1993, 2002). Existe evidencia epidemiológica que sugiere que la exposición a aflatoxinas en sinergia con la infección crónica del virus de la Hepatitis B, se consideran factores de riesgo que incrementan la prevalencia del cáncer en el hígado (carcinoma hepatocelular, HCC) en poblaciones susceptibles (Ross y col. 1992, Omer y col., 2004). Se estima que entre el 21 y 24 % de todos los cánceres de hígado que aparecen en el mundo son provocados por las aflatoxinas (Liu y col., 2012).

Las aflatoxinas son termoestables y pueden sobrevivir a una variedad de procesos (Phillips y col., 1994). El proceso de peletización de alimentos puede disminuir la

presencia de hongos toxicogénicos pero no disminuye el riesgo de la producción de aflatoxinas (Jacobsen y col., 2007).

Considerando el riesgo de la exposición a alimentos contaminados con aflatoxinas para humanos y animales, organismos como la FAO y OMS han establecido límites máximos de detección permitidos para las mismas en diferentes tipos de alimentos (FAO, 2003). En Uruguay estos límites se rigen por el Decreto N° 155/006 del 31/05/2006, la cual plantea niveles de 20 µg/Kg de AF para alimentos de consumo humano (por ejemplo maíz y maní), 0,5 µg/L de AFM₁ en productos y derivados lácteos, excepto en leche en polvo donde los niveles ascienden a 5 µg/L. En nuestro país, existen controles oficiales del MGAP a través del Plan Nacional de Residuos Biológicos que evalúa la presencia de AFM₁ en leche de exportación y consumo interno.

Para alimentos destinados al consumo animal en Uruguay no existe un decreto vigente, sino una sugerencia de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, donde establece 20 µg/Kg de aflatoxinas totales en alimentos para vacas lecheras, 200 µg/Kg para vacas de cría y 500 µg/Kg para ganado de engorde. En el caso de aflatoxina B₁ el límite máximo recomendado es de 5 µg/Kg en el total de la dieta (Daniel Cabella, comunicación personal, 2017).

Control y prevención de aflatoxicosis

La forma más efectiva de control de AFM₁ en leche y productos lácteos es disminuir el crecimiento del hongo productor y la contaminación de AFB₁ en la materia prima y en la ración de las vacas lecheras (Prandini y col., 2009). Para ello es importante tener buenas prácticas de manejo de los alimentos desde la producción hasta el procesado y almacenamiento de la materia prima que va a ser parte de la alimentación animal. A nivel de campo la estrategia principal es alterar las condiciones que pueden ser favorables para el desarrollo de los hongos (Munkvold, 2003), estas prácticas incluyen el uso de especies de cultivos resistentes al ataque de insectos ya que éstos pueden debilitar plantas y granos y predisponer a la colonización de hongos (Moss, 1991; Jacobsen y col., 2007). En un estudio realizado en México, Rodríguez del Bosque (1996), demostró que la combinación de prácticas a nivel de campo como siembra temprana, uso de menor densidad de semillas, junto con la selección de semillas híbridas resistentes a la colonización fúngica y al ataque de insectos se pudo observar una disminución en las concentraciones de aflatoxinas. Otro aspecto importante es la cosecha, de forma de lograr un cultivo con bajo contenido de humedad y en plena madurez (FAO, 2014), utilizando mecanismos que eviten el daño físico del grano para evitar la colonización de hongos en la siguiente etapa (almacenamiento) (Munkvold, 2003). Otro punto clave a controlar es el almacenamiento, en donde puede surgir la contaminación por variaciones de humedad (Hell y col., 2000) o temperatura, considerándose esta última el factor de mayor relevancia en el caso del grano seco (Munkvold, 2003). Para controlar el desarrollo fúngico y posterior producción de micotoxinas, se pueden utilizar agentes conservantes como ácidos orgánicos (ácido propiónico) en granos que únicamente se van a destinar al consumo animal (FAO, 2014). En los ensilajes buenas condiciones de anaerobiosis y bajo pH suele controlar el crecimiento de los hongos (Mc Donald y col., 1991).

Otro método de control empleado es el agregado de secuestrantes o agentes adsorbentes en el alimento. Éstos se unen a las aflatoxinas en el tracto gastrointestinal de los animales formando complejos insolubles que se eliminan por la materia fecal. De esta manera reducen la biodisponibilidad de las aflatoxinas para el animal (Phillips y col., 2002), protegiéndolo de sus efectos tóxicos y disminuyendo la transferencia de AFM₁ hacia la leche (Díaz y col., 2004). Un secuestrante ideal debe reunir ciertos requisitos: como ser efectivo en la unión con las micotoxinas, en su inactivación y eliminación. No debe dejar residuos tóxicos, ni alterar las propiedades nutritivas de los alimentos así como su palatabilidad. También debe ser un producto económico y tecnológicamente factible (FAO, 1977).

Existen diferentes tipos de secuestrantes de micotoxinas, como son los orgánicos, inorgánicos o multimodulares. Entre los orgánicos se encuentran los glucomanos esterificados (EGM) derivados de fibras vegetales, y dentro de los inorgánicos están los aluminosilicatos hidratados de calcio y sodio (HSCAS), las zeolitas (también basadas en silicato), bentonitas, carbón activado y tierra de diatomeas (Díaz y Smith, 2008). Los mismos autores determinaron que si un secuestrante no es efectivo en adsorber micotoxinas *in vitro*, tiene escasa o nula capacidad de hacerlo *in vivo*. Diferentes estudios han demostrado que los HSCAS tienen afinidad particular por las aflatoxinas y se unen rápidamente a ellas en el tracto gastrointestinal, pero no son efectivos para prevenir efectos adversos causados por otras micotoxinas (Phillips y col., 2002). Las zeolitas son cristales de aluminosilicato hidratados que adsorben compuestos polares con alta selectividad (Mumpton, 1999). El carbón activado es considerado eficiente para adsorber gran cantidad de micotoxinas según Galvano y col. (1996).

La adsorción de micotoxinas depende de la concentración de las mismas, la cantidad de secuestrante, y la relativa afinidad de los compuestos por las micotoxinas. La adsorción es también influenciada por el pH, siendo máxima a un pH cercano a 4; así como por la concentración relativa de fosfato. Estos últimos son óptimos en el tracto gastrointestinal, lo que sugiere una mejor unión micotoxina-secuestrante (Dawson y col., 2001).

En nuestro país se comercializan secuestrantes de micotoxinas para bovinos de los tres tipos, siendo algunos específicos para aflatoxinas y otros para multitoxinas.

HIPÓTESIS

La administración de alimentos contaminados artificialmente con AFB₁ a vacas lecheras en producción, genera niveles detectables de AFM₁ por medio de un Test de ELISA comercial en orina.

Las vacas alimentadas con AFB₁ y secuestrante de micotoxinas presentan menores niveles de AFM₁ en orina respecto a vacas que consumen el alimento sin secuestrante.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la detección de un kit comercial de ELISA para cuantificar AFM₁ en orina en vacas lecheras en producción, alimentadas artificialmente con AFB₁ con y sin agregado de secuestrante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Corroborar la presencia de AFM₁ en orina inmediatamente posterior a la administración de alimento contaminado artificialmente con AFB₁ en las vacas en producción.

Cuantificar mediante la técnica de ELISA las concentraciones de AFM₁ en orina de vacas que recibieron artificialmente AFB₁ en el alimento.

Contrastar las concentraciones de AFM₁ cuantificadas en la orina de vacas que recibieron alimentos contaminados artificialmente con AFB₁ con vacas que recibieron AFB₁ más el agregado de secuestrante.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental

El ensayo experimental se llevó a cabo en el Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria, Ruta 1 km 42,5 Libertad -San José.

La determinación de Aflatoxinas totales en alimentos y de Aflatoxina M₁ en orina; se realizó en el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria – UdelaR.

Previo al inicio del ensayo, se determinó el estado metabólico en que se encontraban 16 vacas en producción del rodeo comercial disponibles para investigación, para esto realizaron perfiles metabólicos con el fin de evaluar la funcionalidad hepática (gama-glutamil transferasa, aspartato aminotransferasa y Albúminas totales) y el estatus energético (beta-hdroxibutirato, ácidos grasos no esterificados y glicemia) que presentaban los animales, seleccionándose individuos sin alteraciones de estos parámetros. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de Facultad de Veterinaria (ANEXO 1).

De las 16 vacas disponibles, 12 fueron seleccionadas y bloqueadas por número de partos, litros de leche producidos y días de lactancia. De éstas, 9 eran de la raza Holando y 3 eran cruza (Holando con Jersey). Los animales del ensayo experimental fueron segregados del rodeo comercial y alojados en un potrero libre de malezas tóxicas.

Los animales fueron agrupados en tres grupos de cuatro individuos cada uno (n=4). Al grupo 1 se lo designó como grupo control, y se le administró alimento libre de AFB₁ y de secuestrante; al grupo 2 se le administró alimento contaminado con AFB₁ y al grupo 3 alimento contaminado con AFB₁ y secuestrante comercial de aflatoxinas.

El ensayo tuvo una duración de 18 días, los que se dividieron en 3 períodos que son expresados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Períodos del ensayo experimental

1er PERÍODO	2do PERÍODO	3er PERÍODO
Duración: 4 días	Duración: 10 días	Duración: 4 días
Acostumbramiento al manejo y alimentación individual de los 3 grupos	Administración de AFB ₁ al grupo 2 Administración AFB ₁ y secuestrante al grupo 3	Administración dieta sin AFB ₁ y sin secuestrante a los 3 grupos

Tratamiento de los animales

El manejo de los animales experimentales se rigió de acuerdo a la Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria de la UdelaR (protocolo aprobado CEUA FVET-PI-159).

Para todas las vacas se formuló una dieta para cubrir los requerimientos de vacas de 550 kg de PV, produciendo 24 litros diarios de leche, con 3,5% de grasa y 3,2% de proteína y se evaluó con el programa National Research Council (NRC) 2001. Como se detalla en el Cuadro 2 la misma consistía en: harina de soja, maíz molido, cascarilla de soja (administrada en sala de ordeño), silo pack de alfalfa, silo de maíz planta entera, núcleo vitamínico mineral (sin secuestrante) y urea. De los alimentos administrados se determinó la composición química ver ANEXO 2.

Cuadro 2. Composición de la dieta aportada a los animales experimentales expresada en kg de MS y MF

Alimento	Kg MS	Kg MF
Harina de soja	2.28	2.5
Maíz molido	0.35	0.40
Cascarilla de soja	4.45	5
Silo pack	4	8.89
Silo maíz planta entera	7	23.33
Núcleo vitamínico mineral	0.30	0.30
Urea	0.05	0.05
Total	18.43	40.47

Kg MS: kilogramos de materia seca diarios por animal. Kg MF: kilogramos de materia fresca diarios por animal.

Los diferentes tratamientos se administraron posterior al ordeño de la mañana en el potrero que estaba asignado a los animales (Figuras 1 y 2). Las aflatoxinas fueron administradas junto con el maíz molido, seleccionado por presentar alta palatabilidad y poder asegurar el consumo total de la dosis diaria de AFB₁, seguido de la administración de la harina de soja con urea y agregado de secuestrante a los animales del grupo 3. La dosis de 60 µg/Kg de AFB₁ administrada se calculó en base a 19 kg de materia seca totalizando 1140 µg de AFB₁ por animal y por día.

Las aflatoxinas fueron previamente producidas en el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria, a partir de una cepa de *A. parasiticus* IMI 242695

perteneciente a la colección del International Mycological Institute Inglaterra. Para su cultivo se utilizó PDA (Potato Agar Dextrosa) y la producción de AF se realizó en arroz. La, AFB₁ producida se cuantificó mediante la técnica de HPLC en el Laboratorio de Farmacología de Facultad de Veterinaria. Posteriormente fue fraccionado en dosis individuales de 1140 µg de AFB₁ de tal manera que los animales recibían 60 µg de AFB₁ por kg de alimento de alimento suministrado diariamente.

De los secuestrantes disponibles en el mercado se seleccionó un Hidroaluminosilicato de sodio y calcio (HSCAS), en función de la frecuencia de uso y a la afinidad por las aflatoxinas. El secuestrante se administró una vez al día junto con las aflatoxinas, la dosis utilizada fue la indicada por el fabricante.



Figuras 1 y 2. Administración individual de los tratamientos a los animales experimentales.

Toma de muestras

Para la selección de los animales, una semana previa de iniciar el ensayo se colectaron muestras de sangre de la vena coccígea para la evaluación de los perfiles metabólicos, a modo de elegir animales sin alteraciones en estos parámetros. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de Facultad de Veterinaria.

Para la detección de aflatoxina se tomaron muestras de orina diariamente luego del ordeño de la tarde durante todo el período experimental (18 días). El muestreo se realizó en frascos estériles (150 mL), por el método de masaje vulvar. Los frascos se refrigeraron a – 18 °C hasta el momento de su procesamiento en el Laboratorio de Toxicología de Facultad de Veterinaria.

Se tomaron muestras de todos los alimentos que recibieron los animales: harina de soja, maíz molido, cascarilla de soja, silo pack de alfalfa y silo de maíz planta entera. La muestras fueron refrigeradas a -18°C hasta ser procesadas para el análisis de de aflatoxinas totales.

Cuantificación de micotoxinas en alimentos

Para determinar si los animales estaban recibiendo naturalmente cantidades significativas de aflatoxinas en la dieta; se cuantificaron los niveles de aflatoxinas totales mediante una técnica de inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA).

La detección y cuantificación de AF en los alimentos se realizó mediante el kit de ELISA comercial Ridascreen® Aflatoxinas totales, Fast, Alemania. El límite de detección para este test es de 2 µg/Kg. El procesamiento de las muestras comenzó con la molienda de 5 gramos de alimentos, se mezcló con 25 mL de metanol al 70% y se colocó durante 15 minutos en agitador a 200 rpm para realizar la extracción de las aflatoxinas. Luego las muestras se filtraron con papel de filtro. El extracto obtenido se diluyó en agua destilada. Del extracto diluido y del estándar se sembraron en pocillos para ELISA. A cada pocillo se le incorporó conjugado y el anticuerpo anti-aflatoxina. Los pocillos se incubaron a 22 °C en estufa durante 10 minutos. Se lavó con una solución buffer. Posteriormente se incorporó una solución cromógena y se incubó durante 5 minutos en estufa. La reacción se detuvo mediante el empleo de una solución de 1N H₂SO₄ y la lectura se realizó en espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda. Los resultados obtenidos se analizaron con el software RIDASOFT Win® expresando los niveles de aflatoxinas en µg/Kg (ppb).

Cuantificación de aflatoxinas en orina

Los niveles de AFM₁ en orina se cuantificaron mediante la técnica de ELISA competitiva directa, utilizando el kit Helica Biosystems inc. Cat. No. 991AFLM01U-96, USA. El límite de detección para este test es de 150 ng/mL.

Para preparar las muestras de orina fueron descongeladas, se extrajeron 5 mL de la misma y se colocaron en tubos de ensayo identificados (Figura 3). Se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos y se removieron detritos y precipitados presentes.



Figura 3. Preparación de muestras de orina bovina para centrifugado.

Se diluyeron las muestras y los estándares del kit con agua destilada en proporción 1:20; estos últimos corresponden a concentraciones conocidas de aflatoxinas de 0.0, 0.15, 0.40, 1.50 y 4.00 ng/mL.

Por otro lado, se colocaron 200 μ L de buffer de reacción por pocillo de mezcla de la microplaca, utilizando un pocillo por cada estándar y muestra que se va a ensayar. Luego se agregaron 100 μ L de cada estándar y muestra diluidos a cada pocillo de mezcla conteniendo el buffer (Figura 4). Posteriormente 100 μ L de cada pocillo de mezcla se colocaron en los pocillos cubiertos por los anticuerpos. Esta última microplaca se incubó durante 1 hora en estufa a 25°C.

Finalizada la incubación, se descartó el contenido y se lavaron los pocillos con Buffer fosfato salino-Tween 3 veces. A cada pocillo se le agregó 100 μ L del conjugado enzimático (aflatoxina ligada a peroxidasa de remolacha) y se incubó durante 15 minutos a 25°C. A continuación, se descartó el contenido de los pocillos y se los lavó con Buffer fosfato salino-Tween. Posteriormente se adicionaron 100 μ L del reactivo cromógeno a cada pocillo y se incubó 15 minutos a 25°C. Por último se añadieron 100 μ L de la solución "stop" a cada pocillo para detener la reacción y transcurridos 5 minutos se leyó la absorbancia de los micropocillos mediante espectrofotometría utilizando un filtro de 450 nm.

Debido a que el ensayo se encuentra enmarcado en un proyecto de Maestría se realizó la técnica de HPLC, por el método modificado AOAC #2000.08, en una muestra de orina para confirmar la presencia de AFM₁ en dicha matriz orina.

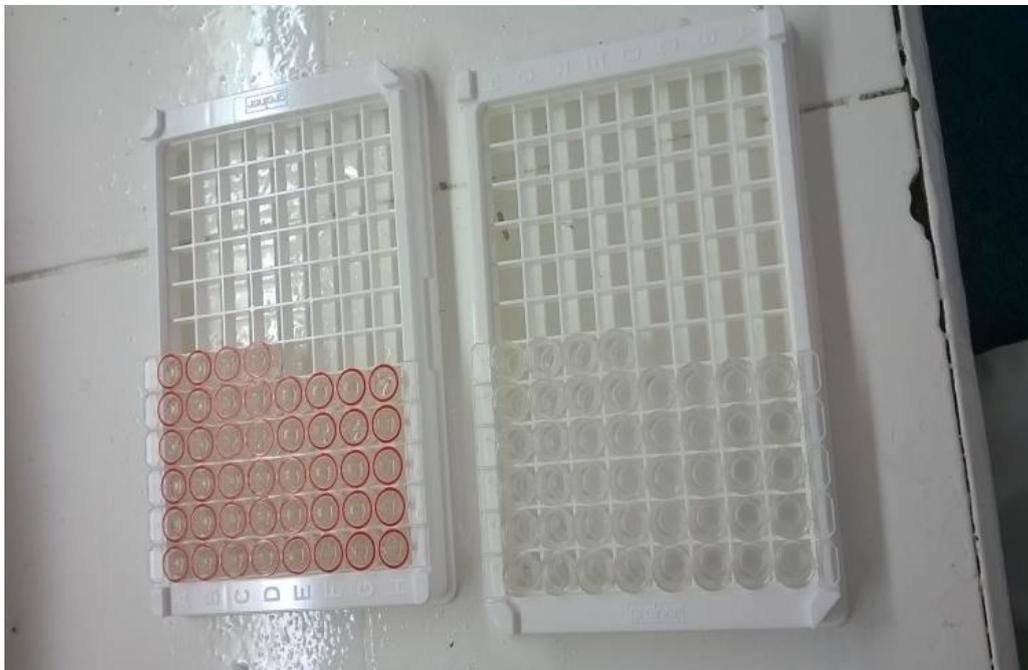


Figura 4. Pocillos del kit Helica Biosystems inc. Cat. No. 991AFLM01U-96, USA.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un Modelo Lineal Mixto, considerando los efectos fijos (tratamiento y tiempo) y efecto aleatorio (animal), mediante el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2012). Utilizando el test de Student los datos se reportaron como media y \pm desvío estándar (DE). El nivel de significancia considerado fue de 95% ($p < 0,05$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de micotoxinas en alimentos

Los niveles de contaminación por micotoxinas en las muestras de alimentos administrados a los animales para aflatoxinas totales y zearalenona expresados en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ son expuestos en el Cuadro 3. Como se puede observar en el cuadro, el único alimento libre de ambas micotoxinas fue el maíz, siendo la matriz seleccionada para la administración de la aflatoxina artificial.

Los demás alimentos presentaban bajas concentraciones de aflatoxinas, las cuales se encontraban muy por debajo de las niveles admitidos por la DGSG del MGAP para ganado lechero. El silo de maíz de planta entera fue el que presentó mayor concentración de aflatoxinas, seguido por el silo pack de alfalfa, aún así se encontraban en bajas concentraciones. La cascarilla de soja y la harina de soja presentaron menores concentraciones de aflatoxinas que los anteriores. Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Capelli en el 2014, que encontró mayores concentraciones de aflatoxinas en los ensilajes utilizados para ganado lechero en distintas zonas de nuestro país. Considerando la cantidad de aflatoxinas encontradas en las muestras de alimentos y las proporciones de las mismas en la dieta, éstas no interfirieron en los resultados de cuantificación de AFM_1 en orina.

En cuanto a la zearalenona, el único componente de la dieta que sobrepasó el límite establecido fue la cascarilla de soja; la cual representó aproximadamente el 24% del total de la dieta por animal. El límite establecido para zearalenona en alimentos destinados a vacas, cerdos y aves por el MGAP es de $200 \mu\text{g}/\text{Kg}$. En Nueva Zelanda se han asociado problemas reproductivos en ganado lechero que recibían dietas con concentraciones de $400 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de ZEA. También fueron reportados en casos severos abortos en vacas (Mirocha y col., 1968; Mirocha y col., 1974). De estos síntomas ninguno fue observado en las vacas del ensayo, lo cual se puede explicar por el porcentaje que representa la cascarilla de soja en la dieta, por el tiempo al que fueron expuestos los animales y por el nivel de concentración de zearalenona (menor a $400 \mu\text{g}/\text{Kg}$).

Cuadro 3. Cuantificación de aflatoxinas y zearalenona en los alimentos

Alimento	Aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Zearalenona ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Maíz	No presenta	No presenta
Silo de maíz PE	4.16	120
Silo pack	3.22	43
Cascarilla de soja	<2	263
Harina de soja	<2	140

$\mu\text{g}/\text{Kg}$: microgramo por kilogramo.

Cuantificación de aflatoxinas en orina

Los resultados que se obtuvieron del análisis de las muestras de orina para AFM₁ en el grupo 1 (grupo control) fueron negativos, en algunos puntos se obtuvieron trazas de aflatoxina M₁ lo que se le puede atribuir a la presencia de concentraciones basales encontradas en los alimentos que fueron administrados a los animales.

En la Figura 5 se puede observar el perfil de los niveles de AFM₁ en orina para las muestras obtenidas de los animales del grupo que recibió aflatoxinas y el que recibió aflatoxinas más el secuestrante. En dicho gráfico se relacionan las concentraciones de AFM₁ expresadas en µg/L (ppb), con las horas desde el inicio de los tratamientos. Estas concentraciones se consideran relativas, ya que en las condiciones en las que se realizó el ensayo, no se determinó el volumen diario total de orina producido por animal.

En ambos grupos se observó que el perfil de excreción de AFM₁ es similar. A las 12 horas post-administración oral de la AFB₁ (Grupo 2) y de AFB₁ + secuestrante (Grupo 3), se detectó la presencia del metabolito en orina. En el perfil de ambos grupos, se contactó un patrón de excreción similar, con un máximo a las 12 hs post administración para luego disminuir y mantener una meseta. Posterior a la supresión de los tratamientos se observó una disminución progresiva.

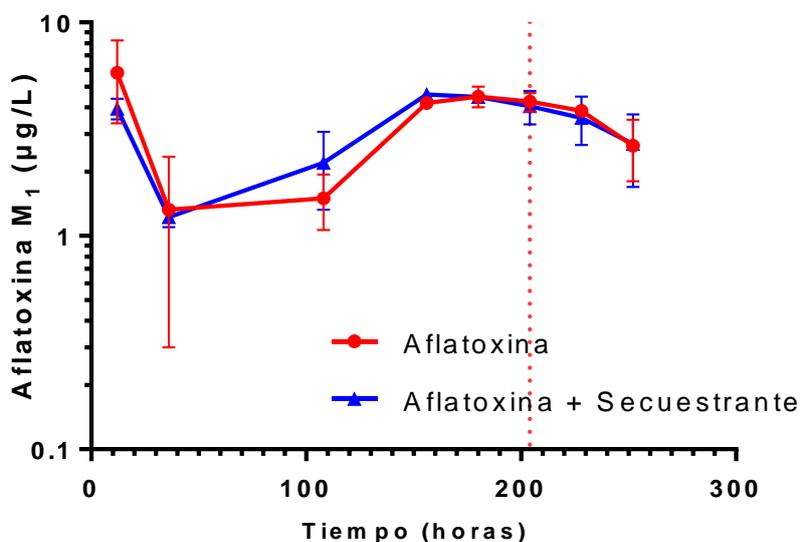


Figura 5. Concentración de AFM₁ de Grupos 2 y 3 expresada en µg/L en función del tiempo.

La línea punteada en la figura 5, indica el fin de la administración de los tratamientos del ensayo, lo cual se corresponde con la observación de una caída de las concentraciones de AFM₁ en orina. Comparando nuestros resultados con los publicados por Allcroft y col. (1968) coincidimos en que a las 12 horas post administrada la AFB₁ detectaron y cuantificaron AFM₁ en orina, con un patrón de

perfil similar en las primeras 24 horas, para luego disminuir, encontrándose trazas hasta las 120 horas post tratamiento. A diferencia de lo realizado en nuestro ensayo, Allcroft y col. administraron una única dosis de aflatoxinas mayor a la administrada en nuestro ensayo. En ambos ensayos se utilizaron diferentes métodos analíticos, estos autores utilizaron cromatografía en capa fina, mientras que en nuestro experimento se utilizó la técnica de Elisa.

Estadísticamente, no se encontró diferencia significativa en las Áreas Bajo la Curva de los perfil de concentración en función del tiempo de la AFM₁ excretada por orina, entre el grupo que recibió aflatoxinas (grupo 2) y el que recibió aflatoxinas y secuestrante (Grupo 3) ($P>0,05$). Los perfiles descritos por el grupo que recibió aflatoxina con el agregado de secuestrantes (grupo 3) no demostró una disminución significativa en el excreción de AFM₁ ($P>0,05$). En las condiciones de este ensayo la eficiencia del secuestrante no fue la esperada. Ello puede deberse a que la eficiencia esperada por el fabricante está determinada en modelos de simulación *in vitro*. Muchos secuestrantes son testeados en modelos de simulación *in vitro*, pero los resultados no siempre son comparables con ensayos *in vivo* donde variables como el pH, el rango de absorción del secuestrante, la temperatura (Ramos y Hernández 1996, Phillips 1998, Lemke y col. 2001) y los fluidos biológicos (Ledoux y Rottinghaus, 1999) son importantes factores que pueden alterar la respuesta del secuestrante. Algunos autores como Moschini y col. (2006) plantean una posible competencia entre las aflatoxinas y otras moléculas biológicas por los sitios de unión de los secuestrantes en tracto gastrointestinal que también podrían afectar la performance de los secuestrantes *in vivo*.

Por todos estos motivos contraponer estudios en modelos simulados *in vitro* con estudios *in vivo* son de difícil convalidación. Díaz y Smith en el 2008 concluyeron que si un secuestrante no es efectivo en absorber micotoxinas *in vitro*, tienen escasa o nula capacidad de hacerlo *in vivo*. La habilidad de adsorción de los secuestrantes de micotoxinas *in vitro* no está necesariamente correlacionada con la respuesta *in vivo*. No obstante este hecho, determina una ponderación en la importancia en desarrollar modelos alternativos que permitan realizar un *screening* primario a las nuevas alternativas que surgen de secuestrantes para micotoxinas.

En cuanto a la técnica de detección utilizada en el ensayo podemos decir que el kit de ELISA usado detectó AFM₁ en orina. El metabolito fue corroborado mediante un confirmatorio por una técnica analítica de HPLC (datos no presentados) tal cual lo refleja en la Figura 6.

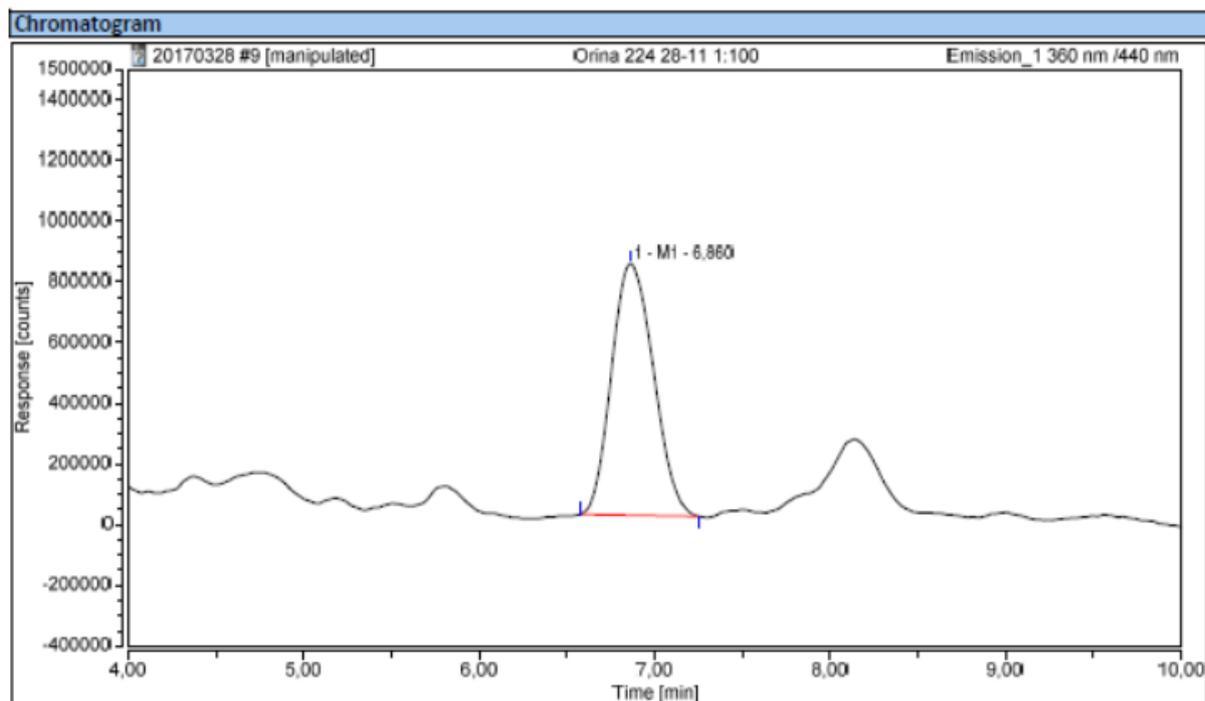


Figura 6. Cromatograma de muestra de orina del animal ID 224 con pico de Aflatoxina M1.

Existen extensas documentaciones de concentraciones de AFM1 en orina de humanos ya que esta cuantificación es utilizada para determinar si hay exposición a AFB1 en diferentes poblaciones (Ali y col. 2016; Wang y col., 2008; Sabran y col., 2012). Pero no encontramos estudios en bovinos que reporten datos de concentraciones de AFM1 en orina.

Además de esto cabe destacar que la medición de AFM1 en orina puede ser de gran valor diagnóstico no sólo por las ventajas de la técnica (sensible, económica, rápida) y el fácil muestreo, sino también que podemos utilizarlo en animales no productores de leche.

CONCLUSIONES

La administración de alimento contaminado artificialmente con AFB₁ a vacas en producción, determina la presencia de AFM₁ en orina 12 horas posterior a su ingestión.

La técnica de ELISA permite cuantificar concentraciones de AFM₁ en orina de vacas que recibieron artificialmente AFB₁ en el alimento.

Las concentraciones de AFM₁ cuantificadas en la orina de vacas que recibieron alimentos contaminados artificialmente con AFB₁ en comparación con las vacas que recibieron AFB₁ más el agregado de secuestrante no reflejaron diferencias significativas en los perfiles de excreción.

La determinación de AFM₁ en orina de bovinos mediante kits de ELISA, es una herramienta diagnóstica de fácil aplicación para determinar la exposición de los animales al consumo de alimentos contaminados con AFB₁.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Ali, N.; Blaszkewicz, M.; Hossain, K.; Degen, G.H. (2016) Determination of aflatoxin M₁ in urine samples indicates frequent dietary exposure to aflatoxins B₁ in the Bangladeshi population. *Int J Hig Environ Health*; 220:271-281.
- 2- Allcroft, R.; Roberts, B.A.; Lloyd, M.K. (1968) Excretion of Aflatoxin in a Lactating Cow. *Food Cosmet Toxicol*; 6:619-625.
- 3- Bhatnagar, D.; Ehrlich, K.C.; Cleveland, T.E. (2006) Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*; 61(2): 83–93.
- 4- Britzi, M.; Friedman, S.; Miron, J.; Solomon, R.; Cuneah, O.; Shimshoni, J.A.; Soback, S.; Ashkenazi, R.; Armer, S.; Shlosberg, A. (2013) Carry-Over of Aflatoxin B₁ to Aflatoxin M₁ in High Yielding Israeli Cows in Mid- and Late-Lactation. *Toxin*; 5:173-183.
- 5- Brown, R.W.; Pier A.C.; Richard, J.L.; Krogstad, R.E. (1981) Effects of Dietary Aflatoxin on Existing Bacterial Intramammary Infection of Dairy Cows. *Am J Vet Res*; 42:927-933.
- 6- Capelli, A. (2014) Determinación de Aflatoxinas Totales en alimentos destinados al consumo de vacas lecheras y Aflatoxina M₁ en leche. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay, 33p.
- 7- Carvajal, M. (2013) Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB₁-ADN. *Rev Esp Cienc Quím Biol*; 16:109-120. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43228901004> Fecha de consulta: 31/05/2017.
- 8- Coulombe, R. A.; Shelton, D. W.; Sinnhuber, R. O.; Nixon, J. E. (1982) Comparative mutagenicity of aflatoxins using a Salmonella/trout hepatic enzyme activation system. *Carcinogenesis* 3: 1261-1264
- 9- Coulombe, R.A. Jr. (1993) Symposium: Biological Action of Mycotoxins. *Journal of Dairy Science*; 76:880-891.
- 10- Coppock, R.W.; Christian, R.R.G.; Jacobsen, B.J. (2012) Aflatoxins. En: Gupta, J. *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*. 2° ed. Amsterdam, Elsevier, p.1181-1199.

- 11-Dawson, K.A., Evans, J., Kudupoje, M. (2001) Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. En: Lyons TP, Jacques KA. Biotechnology in the Feed Industry. Nottingham, Nottingham Univ Press, p. 169-
- 12- Díaz, D.E.; Hagler, J.W.M.; Blackwelder, J.T.; Eve, J.A.; Hopkins, B.A.; Anderson, K.L.; Jones, F.T.; Whitlow, L.W. (2004) Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*; 157:233-241.
- 13-Díaz, D.; Smith, T. (2008) Mycotoxin sequestrating agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins. En: Díaz D. The mycotoxin blue book. Nottingham, Nottingham University Press, 349p.
- 14-DIEA (2016). Anuario OPYPA 2016. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_opypa_2016_en_baja.pdf
Fecha de consulta: 13/03/2017.
- 15-Diekman, M.A.; Green, M.L. (1992) Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. *J Anim Sci* 70: 1615-1627.
- 16-Dominguez-Bello (1996) Detoxification in the rumen. *Ann Zootech*; 45:323-327.
- 17-Eaton, D. L.; Ramsdell, H.S.; Neal G.E. (1994) Biotransformation of aflatoxins. En: Eaton, D.L., Groopman J. D. The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. San Diego, ed. Academic Press, pp 45-72.
- 18-Essigmann, J. M.; Croy, R. G.; Nadzan, A. M.; Busby, W. F.; Reinhold, V. N.; Buchi, G.; Wogan, G. N. (1977) Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B, in vitro. *Proc Natl Acad Sci*; 74:1870-1874.
- 19-FAO (1977) Report of the joint FAO/WHO/UNEP conference on mycotoxins. Paper 2. Roma, FAO.
- 20-FAO (2003) Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Roma, FAO, 45p.
- 21-FAO (2014) Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas. 2014. Roma, FAO, 11p.
- 22-Fink- Gremmels, J. (2008) Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit Contam Part A*; 25:172-180.

- 23-Galtier, P. (1999) Biotransformation and fate of mycotoxins. *J Toxicol-Toxin Rev*; 18:295-312.
- 24-Galvano, F.; Pietri, A.; Fallico, B.; Bertuzzi, T.; Scire, S.; Galvano, M.; Maggiore, R. (1996) Activated carbons: In vitro affinity for aflatoxin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J Food Prot*; 59:545–550.
- 25-Gomez-Lucia, E.; Blanco M. del M; Doménech, A. (2007) Valoración de la Respuesta Inmune de Base Humoral. En: Gomez-Lucia, E.; Blanco M. del M; Doménech, A. *Manual de Inmunología Veterinaria*. Madrid, Ed. PEARSON, Prentice Hall, pp 309-354.
- 26-Hayes, J.D.; Judah D.J.; McLellan L.I.; Neal G.E. (1991) Contribution to the Glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to Aflatoxin B1. *Pharmac Ter*; 50:443-472.
- 27-Heidler, D. (2004) Dealing with mycotoxins in swine feed. *Revista da Sociedade Científica de Suinocultura* 14-20.
- 28-Hell, K.; Cardwell, K.F.; Setamou, M.; Poehling, H.M. (2000) The influence of storage practices on aflatoxins contamination in maize in four agroecological zones in Benin, West Africa *J Stored Prod Res*; 36:365–82.
- 29-IARC. International Agency for Research on Cancer. (1993) Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, World Health Organization N° 56, 599p.
- 30-IARC. International Agency for Research on Cancer. (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, World Health Organization N° 82, 590p.
- 31-Jacobsen, B.J.; Coppock R.W.; Mostrom, M. (2007) *Mycotoxins and Mycotoxicoses*. Montana State University, Extension Publication EBO174, Bozeman, MT, 29p.
- 32-Ledoux, D.R.; Rottinghaus, G.E.; (1999) In vitro and in vivo testing of adsorbents for detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs. En: Lyons, T.P., Jacques, K.A., *Biotechnology in the Feed Industry*. Stamford, Nottingham University Press, pp. 369–379.

- 33-Lemke, S.L.; Ottinger, S.E.; Mayura, K.; Ake, C.L.; Pimpukdee, K.; Wang, N.; Phillips, T.D. (2001) Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. *Anim Feed Sci Technol*; 93:17–29.
- 34-Liu, Y.; Chang, Ch-Ch. H.; Marsh, G.M.; Wu F. (2012) Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*; 48:2125-2136.
- 35-Magan, N.; Olsen, M. (2004) *Mycotoxins in food. Detection and control.* Boston, Ed. CRC Press, 471p.
- 36-Mallmann, C.A., Dilkin, P. (2011) *Mycotoxins and Mycotoxicosis in swine.* Coconut Grove: Special Nutrients, 183p.
- 37-McDonald, P.; Henderson, A.R.; Heron, S.J.E. (1991) *The Biochemistry of Silage.* 2a. ed. Marlow. Chalcombe Publications. 33p.
- 38-Mertens, D.R. (1979) Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. *Proc. Interaction of Mycotoxins in Animal Production Symposium*; 13:118-136.
- 39-Mirocha, C.J.; Harrison, J.; Nichols, A.A.; McClintock, M. (1968) Detection of fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl Microbiol*; 16: 797-798.
- 40-Mirocha, C.J.; Schauerhamer, B.; Pathre, S.V. (1974) Isolation, detection and quantification of zearalenone in Maite and barley. *J Assoc Off Anal Chem*; 57: 1104-1110.
- 41-Moschini, M.; Masoero, F.; Diaz, D.E.; Gallo, A. (2006) Plasma aflatoxin concentrations over time in bolus fed lactating dairy cows. *J Anim Sci*; 84:74.
- 42-Moss, M.O. (1991) The environmental factors controlling mycotoxin formation. En: Smith EJ, Henderson RS. *Mycotoxins and Animal Foods.* Boca Raton, CRC, p. 37-56.
- 43-Mostrom, M.S.; Jacobsen, B.J. (2011) Ruminant Mycotoxicosis. *Vet Clin N Am-Food Anim Pract*; 27:315-344.
- 44-Mumpton, F.A. (1999) La roca mágica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:3463-3470.

- 45-Munksgaard, L.; Larsen, J.; Werner, H.; Andersen, P.,; Viuf, B.T. (1987) Carry-over of aflatoxin from cow's feed to milk and milk products. *Milchwissenschaft*; 42:165-167.
- 46-Munkvold, G.P. (2003) Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu Rev Phytopatol*; 41:99–116.
- 47-Neal, G.E. (1998) Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. *Revue Méd Vét*; 149:550-560.
- 48-Nelson, C.E. (1993) Strategies of mold control in dairy feeds. *J Dairy Sci*; 76:898-902.
- 49-Newberne, P.M.; Butler, W.H. (1969) Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Res*; 29:236-250.
- 50-Ogunade, I.M.; Arriola, K.G.; Jiang, Y.; Driver, J.P.; Staples, C.R.; Adesogan, A.T. (2016) Effects of 3 sequestering agents on milk aflatoxin M₁ concentration and the performance and immune status of dairy cows fed diets artificially contaminated with aflatoxin B₁. *J Dairy Sci*; 99: 6263-6273.
- 51-Omer, R.E.; Kuijsten, A.; Kadaru A.M.Y.,; Kok, F.J.; Idris M.O.; Elkhidri, I.M.; van't Veer P. (2004) Population attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to Hepatocellular Carcinoma. *Nutr Cancer*; 48:15-21.
- 52-Osweiler, G.D. (2000) Mycotoxins: Contemporary Issues of Food Animal Health and Productivity. *Vet Clin N Am-Food Anim Pract*; 16(3): 511-530.
- 53-Patterson, D.S.P. (1973) Review Section. Metabolism as a Factor in Determining the Toxic Action of the Aflatoxins in Different Animal Species. *Food Cosmet Toxicol*; 11:287-294.
- 54-Phillips, T.D.; Clement, B.A.; Park, D.L.; (1994) Approaches to reduction of aflatoxin. En: Eaton LD, Groopman JD. *The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary Agricultural Significance*. NY, Academic Press, p383-406.
- 55-Phillips, T.D.; Kubena, L.F.; Harvey, R.B.; Taylor, D.R.; Heidelbaugh, N.D. (1988) Hydrated sodium calcium aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Sci*; 67:243–247.

- 56-Phillips, T.D.; Lemke, S.L.; Grant, P.G. (2002) Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Adv Exp Med Biol*; 504:157-171.
- 57-Pittet, A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds-an updated review. *Rev Med Vet* 49:479-492.
- 58-Prandini, A.; Tansini, G.; Sipolo, S.; Filippi, L.; Laporta, M.; Piva, G. (2009) On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol*; 47:984-991.
- 59-Ramos, A.J.; Hernandez, E. (1996) In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonited silicate. A study of adsorption isotherms. *Anim Feed Sci Technol*; 62:263–269.
- 60-Rivera Coll A. (1998) Enzimoinmunoanálisis. En: Fuentes Arderiu, X.; Castiñeiras Lacambra, M.J.; Queraltó Compañó, J.M. *Bioquímica Clínica y Patología Médica*. 2a. ed. Barcelona, Ed. Reveté, pp 347-364.
- 61-Rodriguez Del Bosque, L.A. (1996) Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in northeastern Mexico. *Plant Dis*; 80:988–993.
- 62-Rosi, P.; Borsari, A.; Lasi, G.; Lodi, S.; Galanti, A.; Fava, A.; Girotti, S.; Ferri, E. (2007) Aflatoxin M₁ in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. *Int Dairy J* 17:429-435.
- 63-Ross, R.K.; Yuan, J.M.; Yu, M.C.; Wogan, G.N.; Quan, G-S.; Tu, J-T.; Groopman, J.D.; Gao, Y-T.; Henderson, B.E. (1992) Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *The Lancet*; 339:943-946.
- 64-Sabran, M.R.; Jamaluddin, R.; Abdul Mutalib, M.S.; Abdul Rahman, N.A. (2012) Association Between Aflatoxin M₁ Excreted in Human Urine Samples with the Consumption of Milk and Dairy Products. *Bull Environ Contam Toxicol*; 89:1115-1119.
- 65-Swenson, D.H.; Miller, J.A.; Miller E.C. (1973) 2,3Dihydro-2,3Dihydroxy-Aflatoxin B₁: an acid hydrolysis product of an RNA-Aflatoxin B₁ adduct formed by hamster and rat liver microsomes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*; 53:1260-1267.
- 66-Turner, N.W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S.A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins: A Review. *Anal Chim Acta* 632:168-180.

- 67-Van Egmond, H.P. (1994) Aflatoxins in Milk. En: Eaton, D.L., Groopman J. D. The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. San Diego, ed. Academic Press, pp 365-381.
- 68-Veldman, A.; Meijs, J.A.C.; Borggreve, G.J.; Heeres-van-der-Tol, J.J. (1992) Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Ann Prod*; 55:163-168.
- 69-Wang, P.; Afriyie-Gyawu, E.; Tang, Y.; Johnson, N.M.; Xu, L.; Tang, L.; Huebner, H.J.; Ankrah, N.A.; Ofori-Adjei, D.; Ellis, W.; Jolly, E.; Williams, J.H.; Wang, J.-S.; Phillips, T.D. (2008) NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis: II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. *Food Addit Contam*; 25(5):622-634.
- 70-Wong, Z.A.; Hsieh, D.P.H (1980) The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B₁ in the monkey, rat and mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*; 55:115-125.
- 71-Yiannikouris, A.; Jouany, J.P. (2002) Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim Res*; 51:81-99.

ANEXOS

Anexo 1. Perfiles metabólicos.

- Perfil Metabólico -
Universidad de la Republica

Propietario: Tambo Libertad		RUT:		Laboratorio 1 68										
Empresa:		Dirección:		Fecha obtención:										
mail propietario:		mail solicitante:		Fono/Fax:										
Veterinario: Alejandra Capelli		Especie: bovino		Ubicación:										
Grupo 1: lactancia establecida		Sexo: H		Raza: Holando y cruza										
				Edad: multipara año/mes										
N° Ident.	CC	BHB	NEF	COL	URE	PRO	ALB	GLO	Ca	P	Ca:Pi	Mg		
	1 a 5	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	g/L	g/L	g/L	mmol/L	mmol/L		mmol/L		
1	926	4.0 + 0.40	0.22	6.00 + 1.60	- 73	31	42	2.00 - 1.50	1.33	1.00				
2	243	3.0	0.66 + 0.25	4.50	3.00	76	26 - 49	2.20	1.40	1.57	0.80			
3	100	3.5	0.40	0.15	4.40	2.10 - 68	30	38	2.10	1.30	1.62 + 1.00			
4	241	4.0 + 0.66	+ 0.18	6.20 + 3.10	67	29 - 39	29	39	2.30	1.60	1.44	0.90		
5	921	3.5	0.36	0.15	4.00	2.10 - 72	27 - 45	2.20	1.30	1.69 + 0.90				
6	808	3.5	0.44	0.24	3.50	2.10 - 79	29	50	2.20	1.60	1.38	0.70		
7	307	- 0.34	0.15	5.70 + 1.30	- 82	26 - 56	+ 2.10	1.90	1.11	0.80				
8	501	3.5	0.65 + 0.24	4.50	1.40 - 76	29 - 47	2.20	1.50	1.47	0.80				
Valores	Grupo	Media	3.6 + 0.5	0.20	4.9	2.1 - 74	28 - 46	2.16	1.5	1.4	0.9			
		Median:	3.5	0.4	0.2	4.5	+ 2.1	+ 74.2	+ 28.5	+ 46.1	+ 2.2	+ 1.5	+ 1.5	+ 0.9
		DE	0.3	0.1	0.04	1.0	0.7	5.2	1.6	6.1	0.09	0.2	0.2	0.1
		H	2.3 + 1.3	- 1.2	1.7	- 2.5	- - 0.7	- 2.3	- 1.0	- 1.3	- 0.6	1.0	- 0.3	
		CD	1.4 + 0.9	0.36	2.0 + 0.6	0.9	0.5	1.0 + 0.61	0.7	1.2	+ 0.9			
		% Bajo L	14.3	0.0	0.0	0.0	75.0	0.0	62.5	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0
% Sobre	29	37.5	0.0	37.5	0.0	0.0	12.5	0.0	0.0	25.0	0.0			
Valores	Referencia	Mínimo	2.5	0.06	0.10	2.7	2.6	66	29	28	2.10	1.1	1.0	0.66
		Máximo	3.5	0.6	0.60	5.3	7.0	90	41	52	2.6	2.3	1.6	1.14
		Media	3.0	0.3	0.4	4.0	4.8	78	35	40	2.35	1.7	1.3	0.9
		DE	0.3	0.15	0.1	0.5	1.1	6.0	3.0	6.0	0.15	0.3	0.2	0.12

N° Ident.	AST	GGT	It	
	U/L	U/L	leche	
1	926	69.8	28	20.4
2	243	100	28	27.8
3	100	65.6	23	17.2
4	241	90.2	12	22.0
5	921	78.5	22	20.2
6	808	68.4	18	28.0
7	307	66.9	18	
8	501	61.8	18	22.0
Valores	Grupo	Media	75	21
		Median:	69	20.0
		DE	13.6	5.5
		H	- 0.2	0.0
		CD	0.5	0.6
		% Bajo L	0.0	0.0
% Sobre	0.0	0.0		
Valores	Referencia	Mínimo	50	3.0
		Máximo	110	39.0
		Media	80	21.0
		DE	25	9.0

- Perfil Metabólico -
Universidad de la Republica

N° Ident.		CC	BHB	NEF	COL	URE	PRO	ALB	GLO	Ca	P	Ca:Pi	Mg	
		1 a 5	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	g/L	g/L	g/L	mmol/L	mmol/L		mmol/L	
9	9	3.5	0.50	0.15	3.40	2.70	84	25	59	2.20	2.00	1.1	0.70	
10	311	2.5	0.58	0.22	6.10	+ 2.60	74	30	44	2.50	1.70	1.5	0.90	
11	101	3.0	0.39	0.17	6.10	+ 3.00	71	29	42	2.30	1.50	1.5	1.00	
12	28	3.5	0.37	0.23	4.40	2.20	- 75	29	45	2.40	1.80	1.3	0.90	
13	946	4.0	+ rec	+ 0.17	4.70	2.60	72	29	- 44	2.30	1.70	1.4	0.90	
14	224	3.0	0.50	0.16	4.50	2.50	- 71	30	41	2.20	2.10	1	0.90	
15	42	4.0	+ rec	+ 0.15	3.80	1.70	- 75	31	44	2.50	1.60	1.6	0.80	
16	36	3.5	0.44	0.15	5.20	2.60	76	28	- 48	2.20	1.70	1.3	0.80	
Valores	Grupo	Media	3.4	0.5	0.18	4.8	2.5	- 75	29	- 46	2.33	1.8	1.3	0.9
		Median	3.5	0.5	0.17	4.6	2.6	74.5	29.1	43.9	2.3	1.7	1.3	0.9
		DE	0.5	0.1	0.03	1.0	0.4	4.2	1.9	5.7	0.13	0.2	0.2	0.1
		H	1.5	1.1	-0.8	1.2	-2.1	-0.6	-2.1	- 1.0	0.2	0.2	0.2	-0.3
		CD	2.1	+ 0.5	0.21	1.5	+ 0.4	0.7	0.6	1.0	0.85	0.7	1.3	+ 0.8
		% Bajo L	0.0	0.0	0.0	0.0	37.5	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% Sobre	25.0	33.3	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Valores	Referencia	Mínimo	2.5	0.06	0.10	2.7	2.6	66	29	28	2.15	1.1	1.0	0.66
		Máximo	3.5	0.6	0.60	5.3	7.0	90	41	52	2.6	2.3	1.6	1.14
		Media	3.0	0.3	0.30	4.0	4.8	78	35	40	2.3	1.7	1.3	0.9
		DE	0.3	0.15	0.2	0.65	1.1	6.0	3.0	6.0	0.15	0.3	0.2	0.12

N° Ident.		AST	GGT	LECHE	
		U/L	U/L	L	
9	9	94	22	23.2	
10	311	96	rec	+ 30.0	
11	101	85	24	24.6	
12	28	77	29	25.0	
13	946	77	34	24.4	
14	224	64	21	26.4	
15	42	78	18	23.6	
16	36	58	28	26.6	
Valores	Grupo	Media	79	25	25.5
		Median	78	24.0	24.8
		DE	13.2	5.5	2.2
		H	-0.1	0.5	
		CD	0.5	0.6	
		% Bajo L	0.0	0.0	
% Sobre	0.0	14.3			
Valores	Referencia	Mínimo	50	3.0	
		Máximo	110	39.0	
		Media	80	21.0	
		DE	25	9.0	

Anexo 2. Dieta ajustada según NRC.

Page 1

Thursday, November 24, 2016

Summary Report

Animal Inputs

Animal Type : Lactating Cow
Age : 72 months
Body Weight : 550 kg
Milk Fat : 3.50%
Days In Milk : 240

Milk Production : 24.0 (kg/day)
Days Pregnant : 30
Breed : Holstein
Milk True Protein : 3.00%

Diet Nutrient Balances

Requirements	NEI (Mcal/day)	MP (g/day)	Ca (g/day)	P (g/day)	K (g/day)
Maintenance	9.1	674	17	20	133
Pregnancy	0.0	0	0	0	0
Lactation	16.6	1075	29	22	36
Growth	0.0	0	0	0	0
Total Required	25.7	1749	47	41	169
Total Supplied	27.0	1743	45*	33*	251*
Balance	1.3	-6	-2	-8	82

* Note that these mineral supplied values are total *absorbable* supplied.

Animal Performance

DMI - Actual : 18.4 (kg/day)
DMI - Predicted : 18.9 (kg/day)

NEI Allowable Milk : 25.9 (kg/day)
MP Allowable Milk : 23.9 (kg/day)

Milk Production : 24.0 (kg/day)

Days to gain one condition score : > 305

Daily Weight Change due to Reserves : 0.3 (kg/day)

Protein Values

RDP Required : 1734 (g/d)
RDP Supplied : 1864 (g/d)
RDP Balance : 130 (g/d)

RUP Required : 949 (g/d)
RUP Supplied : 941 (g/d)
RUP Balance : -8 (g/d)

MP - Bacterial : 943 (g/d)
MP - RUP : 713 (g/d)
MP - Endogenous : 87 (g/d)

CP - Diet : 15.2 (%DM)
CP - RDP : 10.1 (%DM)
CP - RUP : 5.1 (%DM)

Diet Concentrations

NDF : 47.4 (%DM)
 Forage NDF : 29.1 (%DM)
 ADF : 31.3 (%DM)
 NFC : 30.3 (%DM)
 Undiscounted TDN : 64 (%DM)
 ME : 2.35 (Mcal/kg DM)
 NEI : 1.47 (Mcal/kg DM)
 NEg : 0.90 (Mcal/kg DM)
 Ca : 0.5 (%DM)
 P : 0.3 (%DM)
 Ether-Extract : 2.7 (%DM)
 DCAD : 221 (mEq/kg)

Target Diet Concentrations

NEI : 1.36 (Mcal/kg)
 MP : 92 (g/kg)
 Ca : 2 (g/kg)
 P : 2 (g/kg)

Diet Summary

	kg/day	kg/day	%
Feed Name	(Dry Matter)	(As-Fed)	(Dry Matter)
Silo Pack	4.00	8.89	21.71
SMPE	7.00	23.33	37.99
Harina de Soja	2.28	2.50	12.35
Grano Maiz Seco	0.35	0.40	1.91
Cascarilla Soja	4.45	5.00	24.15
Nucleo Vit-Min	0.30	0.30	1.63
Urea	0.05	0.05	0.27

Energy and Protein Supply

Feed Name	DMI (kg/day)	TDN (g/day)	ME (Mcal/day)	NEI (Mcal/day)	NEg (Mcal/day)	CP (g/day)	RUP (g/day)	RDP (g/day)	NDF (kg/day)	MCP (g/day)
Silo Pack	4.0	2559	9.4	5.9	3.6	652	225	427	1.3	-
SMPE	7.0	4225	14.5	8.9	4.9	385	134	251	4.1	-
Harina de Soja	2.3	1751	7.7	5.0	3.5	1135	371	764	0.6	-
Grano Maiz Seco	0.4	293	1.1	0.7	0.5	21	10	12	0.1	-
Cascarilla Soja	4.5	2944	10.6	6.6	4.1	472	202	270	2.8	-
Nucleo Vit-Min	0.3	0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	-
Urea	0.1	0	0.0	0.0	0.0	141	0	141	0.0	-
Totals :	18.4	11772	43.3	27.0	16.5	2806	941	1864	8.7	1474

Feed Name	ME (Mcal/kg)	NEI (Mcal/kg)	NEg (Mcal/kg)	Kp (%/hr)
Silo Pack	2.36	1.47	0.90	5.11
SMPE	2.07	1.27	0.70	5.11
Harina de Soja	3.37	2.18	1.52	6.70
Grano Maiz Seco	3.03	1.95	1.33	6.70
Cascarilla Soja	2.39	1.49	0.92	6.70
Nucleo Vit-Min	0.00	0.00	0.00	6.70
Urea	0.00	0.00	0.00	6.70

Increment over Maintenance : 3.0 X
 Energy/Protein Discount Factor : 3.7%
 Undiscounted TDN in Diet : 63.9%
 Diet RUP Digestibility : 75.7%