

73964

LANDA, MARIA FLORENC

Relevamiento de la m

2015

73964



Este trabajo fue realizado en la cátedra de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Tesista: Mic. Florencia Landa

Director: Dra. Ana M. Dalcero

Co-Director: Dr. Carlos Da Rocha Rosa

Tribunal de Tesis:

Dra. Liliana Odierno

Dra. Cecilia Farnochi

Dr. Marcelo Rosmini

Río Cuarto, 12 de Mayo de 2015

0336

MFN:
Clasif:
T.931

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, a mi directora y co-director, al tribunal de tesis, a la Dra. Lilia Cavaglieri y a la Dra. Laura González Pereyra por su apoyo incondicional, a mi familia y amigos colegas que hicieron posible la realización de esta tesis doctoral.

RESUMEN

La piel de chinchilla es una de las más exóticas y apreciadas en el mercado internacional. La cría de estos animales es una actividad muy rentable. Los alimentos balanceados constituyen la base de la dieta de las chinchillas y representan entre el 60 y 70 % del costo de producción de dichas pieles. El manejo inadecuado de insumos y/o de las materias primas que los constituyen, puede permitir el desarrollo indeseable de hongos que producen alteración de las características nutricionales y contaminación con sus micotoxinas. En Argentina, se han detectado casos de aflatoxicosis aguda en criaderos. Los objetivos del presente trabajo fueron: i) aislar la microbiota general y micotoxigénica de las muestras de alimentos balanceados de chinchillas recolectadas en forma representativa y aleatoria en los establecimientos de producción; ii) identificar las especies pertenecientes a los géneros de *Aspergillus* y *Fusarium*; iii) determinar la capacidad de las especies del género *Aspergillus* sección *Flavi* de producir aflatoxina B₁ (AFB₁); iv) determinar la capacidad de las especies del género *Fusarium* de producir fumonisina B₁ (FB₁); v) detectar y cuantificar la incidencia natural de AFB₁ y FB₁ en las muestras de alimentos; vi) analizar los hígados mediante estudios macroscópicos e histopatológicos de las chinchillas muertas sospechadas de padecer aflatoxicosis; vii) detectar y cuantificar la incidencia natural de zearalenona (ZEA) y deoxinivalenol (DON) en muestras de alimentos balanceados consumidos por chinchillas sospechadas de padecer micotoxicosis asociadas a estas micotoxinas. Los resultados obtenidos demostraron que en alimentos balanceados, las materias primas, y los suplementos dietarios utilizados en la cría de las chinchillas, presentan baja calidad higiénica considerando que los recuentos fúngicos superaron el límite establecido para garantizar la seguridad micotoxicológica de los insumos. Los géneros con especies toxicogénicas principalmente aislados de materias primas y raciones utilizadas en las dietas de las chinchillas fueron *Aspergillus* y *Fusarium*, siendo las especies de mayor incidencia *A. flavus* y *F. verticillioides*. Un elevado porcentaje de estas cepas aisladas fueron capaces de producir AFB₁ o FB₁ y los alimentos balanceados presentaron contaminación con estas toxinas en niveles que superaron los límites recomendados. La detección de micotoxinas desde alimentos presentó niveles mas elevados con FB₁ que con AFB₁. Las dietas suministradas a las chinchillas con sintomatología asociada a una micotoxicosis por ZEA y/o DON, presentaron contaminación con estas toxinas fúngicas, y en algunas muestras no solo superaron los límites sino que hubo una co-ocurrencia de las mismas.

ABSTRACT

Chinchilla fur is one of the most exotic and appreciated in the international market. The breeding of these animals is a very profitable activity. Prepared feeds are the basis of the chinchilla's diet and represent between 60 and 70% of this fur production cost. Inadequate management of foods and / or raw materials that constitute them may allow the fungal growth, producing undesirable alteration of the nutritional characteristics and mycotoxin contamination. It has been reported acute aflatoxicosis cases in Argentina. The aims of this study were: i) to isolate the general and mycotoxigenic mycobiota of raw material and chinchilla feeds samples; ii) to identify *Aspergillus* and *Fusarium* species; iii) to determinate the ability of *Aspergillus* section Flavi to produce aflatoxin B₁ (AFB₁) in vitro ; iv) to determinate the ability of *Fusarium* species to produce fumonisin B₁ (FB₁); v) to detect and quantify the natural incidence of AFB₁ and FB₁ of feed samples; vi) to analyze livers by macroscopic and histopathologic studies of the dead chinchillas suspected to suffer aflatoxicosis; vii) to detect and quantify the natural incidence of zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON) in feed samples consumed by chinchillas suspected of micotoxycosis associated with these mycotoxins. The results showed that the chinchilla feeds, raw materials, and dietary supplements used in breeding chinchillas, have low hygienic quality considering that the fungal counts exceeded the micotoxicological limit to guarantee food safety. The genera with toxigenic species mainly isolated from raw materials and chinchilla feeds samples were *Aspergillus* and *Fusarium*, while the species *A. flavus* and *F. verticillioides* were the most isolated. A high percentage of these isolates were able to produce AFB₁ or FB₁. Chinchilla feeds were contaminated with AFB₁ and FB₁ in levels that exceeded the recommended limits. The contamination of feeds with FB₁ was higher than AFB₁. The feeds supplied to chinchillas with symptoms associated with micotoxycosis by ZEA and / or DON, showed contamination with these fungal toxins, in some samples not only they exceeded the limits but was a co-occurrence of the same.

ABREVIATURAS

AFB₁: aflatoxina B₁

AFB₂: aflatoxina B₂

AFG₁: aflatoxina G₁

AFG₂: aflatoxina G₂

AFM₁: aflatoxina M₁

AFs: aflatoxinas

ANOVA: análisis de la varianza

AOAC: Association of Official Agricultural Chemists

a_w: actividad de agua

CAST: Council for Agricultural Science and Technology

CYA: agar Czapek extracto de levadura

DG18: agar diclorán glycerol 18 %

DON: deoxinivalenol

DRBC: agar diclorán rosa de bengala cloranfenicol

DS: desvío estándar

DT: dieta terminación

ED: energía digestible

EFSA: European Food Safety Authority

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FB₁: fumonisina B₁

FB₂: fumonisina B₂

FBs: fumonisinas

GMP: Good Manufacturing Practices

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

IARC: International Agency for Research on Cancer

LSD: test de la mínima diferencia significativa de Fisher

MEA: agar extracto de malta

ND: no detectable

OTA: ocratoxina A

TLC: cromatografía em capa delgada

UFC: unidades formadoras de colonia

YES: medio extracto de levadura sacarosa

ZEA: zearalenona

INDICE GENERAL

I. Introducción	1
I.1. <i>Chinchillas.</i>	1
I.1.1. Generalidades.	1
I.1.2. La cría en cautiverio.	1
I.1.3. El auge de la cría de chinchillas.	2
I.1.4. Comercialización de las pieles.	4
I.2. <i>La industria de los alimentos destinados a la cría de chinchillas.</i>	5
I.2.1. Formulación nutricional de los alimentos.	7
I.2.2. Clasificación de alimentos de chinchillas.	10
I.3. <i>El ecosistema de los granos almacenados.</i>	10
I.4. <i>Hongos toxicogénicos y micotoxinas presentes en alimentos balanceados.</i>	12
I.5. Micotoxicosis en animales.	13
I.6. <i>Género Aspergillus y sus micotoxinas.</i>	16
I.6.1. Sección <i>Flavi</i> : biología y hábitat.	18
I.6.2. Las aflatoxinas.	19
I.6.3. Contaminación de materias primas y alimentos con aflatoxinas.	22
I.6.4. Micotoxicosis producidas por aflatoxinas.	24
I.7. <i>Género Fusarium y sus micotoxinas.</i>	24
I.7.1. Las fumonisinas.	26
I.7.2. Contaminación de materias primas y alimentos con fumonisinas.	29
I.7.3. Zearalenona.	30
I.7.4. Deoxinivalenol.	31
I.7.5. Contaminación de materias primas y alimentos con zearalenona y deoxinivalenol.	33
I.8. <i>Regulaciones vigentes de concentraciones de micotoxinas en alimentos para animales.</i>	34
II. Hipótesis.	36
III. Objetivos.	37
IV. Metodología.	38
IV.1. <i>Toma de las muestras.</i>	38
IV.2. <i>Estudio de la microbiota en alimentos balanceados destinados a la cría de chinchilla.</i>	38
IV.2.1. Determinación de la actividad acuosa.	38
IV.2.2. Recuento, aislamiento e identificación de la microbiota contaminante.	39
IV.2.3. Identificación de las especies del género <i>Aspergillus</i> .	40

IV.2.4. Identificación de las especies del género <i>Fusarium</i> .	41
IV.3. <i>Determinación de la capacidad aflatoxicogénica de las especies del género Aspergillus sección Flavi aisladas de alimentos balanceados y suplementos dietarios.</i>	41
IV.3.1. Cepas.	41
IV.3.2. Producción de aflatoxinas.	42
IV.4. <i>Determinación de la capacidad de producción de fumonisina B₁ de las especies del género Fusarium aisladas de alimentos balanceados.</i>	43
IV.4.1. Cepas.	43
IV.4.2. Producción de fumonisina B ₁ .	43
IV.4.3. Extracción, detección y cuantificación de fumonisina B ₁ .	43
IV.5. <i>Estudio de la incidencia natural de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ en alimentos destinados a la cría de chinchillas.</i>	44
IV.5.1. Análisis de aflatoxina B ₁ .	44
IV.5.2. Análisis de fumonisina B ₁ .	45
IV.6. Análisis estadístico.	45
IV.7. <i>Estudio de los hígados.</i>	46
IV.7.1. Toma de las muestras.	46
IV.7.2. Estudios macroscópicos.	46
IV.7.3. Estudios histopatológicos.	46
IV.8. <i>Estudio de la incidencia natural de zearalenona y deoxinivalenol en alimentos consumidos por chinchillas con sintomatología asociada a estas micotoxinas.</i>	46
IV.8.1. Toma de las muestras.	46
IV.8.2. Análisis de zearalenona.	47
VI.8.3. Análisis de deoxinivalenol.	47
V. Resultados.	49
V.1. <i>Estudio de la microbiota en alimentos balanceados destinados a la cría de chinchillas.</i>	49
V.1.1. <i>Determinación de la actividad acuosa.</i>	49
V.1.2. Recuento de la microbiota contaminante.	49
V.1.3. Frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos	51
V.1.4. Densidad relativa de las especies fúngicas	53
V.2. <i>Determinación de la capacidad aflatoxicogénica de las especies del género Aspergillus sección Flavi aisladas de alimentos balanceados y suplementos dietarios</i>	55

V.3. <i>Determinación de la capacidad de producción de fumonisina B₁ de las especies del género Fusarium aisladas de alimentos balanceados</i>	55
V.4. <i>Estudio de la incidencia natural de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ en alimentos destinados a la cría de chinchillas</i>	55
V.4.1. Análisis de aflatoxina B ₁	55
V.4.2. Análisis de fumonisina B ₁	57
V.5. <i>Estudios macroscópicos e histopatológicos de hígados de chinchillas</i>	58
V.6. <i>Estudio de la incidencia natural de zearalenona y deoxinivalenol en alimentos balanceados consumidos por chinchillas con sintomatología asociada</i>	60
V.6.1. Incidencia natural de zearalenona	61
V.6.2. Incidencia natural de deoxinivalenol	61
V.6.3. Co-ocurrencia de zearalenona y deoxinivalenol en alimentos destinados a la cría de chinchillas	62
V.6.4. Sintomatología asociada con la presencia de deoxinivalenol y zearalenona en los criaderos de chinchillas	62
VI. Discusión	64
VII. Conclusiones	76
VIII. Bibliografía	77
Producción científica derivada del trabajo de tesis	94
Anexo medios de cultivo y soluciones	95

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de alimentos balanceados de chinchillas.	8
Tabla 2. Cantidad máxima recomendada de micotoxinas en alimentos balanceados para animales.	35
Tabla 3. Recolección de muestras.	39
Tabla 4. Actividad acuosa de alimentos balanceados y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas provenientes de distintos criaderos.	49
Tabla 5. Recuentos fúngicos totales (UFC/g) obtenidos de materias primas, alimentos balanceados y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas.	50
Tabla 6. Análisis de la varianza según origen del alimento y el medio de cultivo utilizado y la interacción de dichas variables sobre el recuento fúngico total.	50
Tabla 7. Análisis de la varianza según el alimento, el tipo de alimento (TAL) y la interacción de dichas variables sobre el recuento fúngico total.	51
Tabla 8. Recuentos fúngicos totales de los alimentos destinados a la cría de chinchillas.	51
Tabla 9. Cepas de <i>Aspergillus flavus</i> productoras de aflatoxina B ₁ .	55
Tabla 10. Cepas de <i>F. verticillioides</i> productoras de fumonisina B ₁ .	55
Tabla 11. Aflatoxina B ₁ (ng/g) en alimentos destinados a la cría de chinchillas.	56
Tabla 12. Análisis de la varianza de la concentración de aflatoxina B ₁ según el alimento y tipo de alimento (TAL).	56
Tabla 13. Aflatoxina B ₁ en la interacción de los alimentos y tipos de alimentos (TAL) de chinchillas.	57
Tabla 14. Fumonisina B ₁ (µg/g), frecuencia de contaminación y porcentaje que supera el límite propuesto, en muestras de alimentos destinados a la cría de chinchillas.	58
Tabla 15. Análisis de la varianza de la concentración de fumonisina B ₁ según el alimento y tipo de alimento (TAL).	58
Tabla 16. Deoxinivalenol (µg/g) en alimentos destinados a la cría de chinchillas.	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países importadores de pieles de chinchillas.	3
Figura 2. Principales provincias Argentinas productoras de chinchillas.	4
Figura 3. Esquema de máquina extrusadora.	6
Figura 4. Proceso de elaboración de alimentos balanceados.	7
Figura 5. Micotoxicosis primaria y secundaria.	16
Figura 6. Características microscópicas del género <i>Aspergillus</i> .	19
Figura 7. Rutas de biotransformación de AFB ₁ .	21
Figura 8. Estructura histológica hepática	23-24
Figura 9. Formación y tipos de microconidios producidos por especies de <i>Fusarium</i> .	27
Figura 10. Células conidiógenas de especies de <i>Fusarium</i> .	27
Figura 11. Macroconidios de especies de <i>Fusarium</i> .	28
Figura 12. Estructura química de las fumonisinas B ₁ y B ₂ .	29
Figura 13. Estructura química de la zearalenona.	30
Figura 14. Estructura química del deoxinivalenol.	32
Figura 15. Esquema de inoculación para la identificación de las especies del género <i>Aspergillus</i> .	40
Figura 16. Esquema de inoculación para la identificación de las especies del género <i>Fusarium</i> .	42
Figura 17 a-b-c. Frecuencia de aislamiento (%) de los diferentes géneros fúngicos encontrados en alimentos balanceados, materias primas y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas.	52
Figura 18 a- b- c. Densidad relativa de las especies de los géneros <i>Fusarium</i> y <i>Aspergillus</i> aislados de alimentos balanceados y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas.	54
Figura 19. Corte de hígado de chinchilla normal sacrificada.	60
Figura 20. Porcentaje de muestras positivas y negativas de incidencia natural de ZEA en alimentos balanceados destinado a la cría de chinchillas.	61
Figura 21. Porcentaje de muestras de alimentos destinados a la cría de chinchillas contaminadas con zearalenona y deoxinivalenol.	63



I. INTRODUCCION

I.1. Chinchillas

I.1.1. Generalidades

Chinchilla es un género de roedores de la familia *Chinchillidae* conocidos coloquialmente como chinchillas. Estos roedores son nativos de la zona sur de los Andes, y del norte de Bolivia y Perú. El género *Chinchilla* agrupa dos especies salvajes y una variedad doméstica. La chinchilla de cría ó doméstica (*Chinchilla lanígera*) es un híbrido resultante del cruce de las especies salvajes (*Chinchilla laniger* x *Chinchilla brevicaudata*), adaptada a la cautividad, cuya principal finalidad es la producción de pieles, siendo también utilizada como animal de laboratorio y compañía. La chinchilla en estado salvaje se encuentra extinguida desde fines del siglo XIX, debido a la caza furtiva que la extinguió por completo de su hábitat natural. En la adultez pesan entre 500 y 800 g, y miden entre 20 y 30 cm de largo, tienen un pelaje largo, espeso y suave, cuyos folículos tienen entre 70 y 100 fibras cada uno, razón por la cual tienen un pelaje compacto y sedoso. Están adaptadas a un hábitat hostil, ingieren cualquier vegetal comestible, pudiendo consumir insectos y dietas muy ricas en fibras. Viven alrededor de 10 años en libertad y aproximadamente 25 en cautividad, a los 8 meses de edad alcanzan la madurez sexual, la gestación dura un mínimo de 111 días, las crías nacen con pelo, con los ojos abiertos y dientes útiles, siendo capaces de correr, saltar y consumir alimentos sólidos a las pocas horas de nacer (Aleandri, 2002).

I.1.2. La cría en cautiverio

La cría en cautiverio iniciada a partir de los años 20 se consolidó como una salvaguarda para la preservación de la especie y como una actividad ecológica y económicamente sustentable. La chinchilla demanda poco trabajo, consume 25 g diarios de alimento balanceado, alfalfa y agua (Aleandri, 2002). La cría se realiza en jaulas estandarizadas que permiten colocar una importante cantidad de animales en espacios reducidos, y están equipadas con bebederos y comederos, dispuestos de forma tal que el productor tiene fácil acceso para controlar y satisfacer las necesidades de atención de los animales. Una vez por semana se debe realizar la limpieza del piso de las jaulas que tienen una cama de viruta y una bandeja con marmolina (material industrial compuesto por carbonatos y polímeros con propiedades fisicoquímicas adecuadas para resistir la exposición constante a la humedad) para que la chinchilla se revuelque y de esa forma se limpie y airee la piel, evitando la compactación de pelos, tricomas y apelmamientos que disminuyen su calidad. El control de la

temperatura del criadero es un factor muy importante, siendo recomendable entre 20 a 22 °C durante la etapa de reproducción, y 18 °C para chinchillas en etapa de engorde. Para el control de la temperatura existen distintas alternativas entre las más utilizadas se encuentra el uso de aire acondicionado y sistemas de calefacción (García Márquez, 2005).

Las familias son poligámicas, un macho sirve a 5 o 6 hembras. Las jaulas se encuentran dispuestas en línea de 5 o 6, y por detrás pasa un corredor por donde circula el macho que sirve a las hembras que entran en celo. Una vez que una hembra fue servida, se cierra la puerta que conecta la jaula con el corredor, y el macho no entra más. Luego del período de gestación, la hembra pare y, los gazapos permanecen allí durante 30 y 60 días hasta el destete para pasar a un lugar de engorde. A los 6 meses tanto el macho como la hembra están en condiciones de procrear y a los 11 meses de edad ya se pueden sacrificar (a los machos sobrantes). Las chinchillas tienen 1 o 2 partos anuales, con un número de gazapos que varía entre 1 y 3 en cada parto (Aleandri, 2002). La producción de chinchillas es una inversión a largo plazo, que comienza a ser rentable años después, dependiendo de la inversión inicial. En términos de la producción, más allá de la inversión inicial, el mantenimiento de un criadero de chinchillas es relativamente sencillo y económico en función de la elevada rentabilidad que se obtiene de la comercialización del producto final cuando se cumplen las exigencias de los mercados internacionales. La cría implica dos factores muy importantes, contar con reproductores iniciales de excelente calidad y genética, capaces de transmitir buenas características a la progenie y además, el manejo y cuidado adecuado de las chinchillas para que llegado el momento de transformarla en piel, se hayan exteriorizado por completo todas las cualidades (Aleandri, 2011).

I.1.3. El auge de la cría de chinchillas

La difusión mundial de la cría de chinchillas (*Chinchilla lanígera*) se debe a tres aspectos principales: el aumento en la demanda de animales pequeños como mascotas, la producción de reproductores y la producción de pieles finas. Otro factor que contribuye a esta difusión es la tendencia mundial del consumo de pieles producidas en criadero conocidas como “ecológicas”. Los mercados que más consumen y demandan pieles de chinchillas son Japón, China, Hong Kong, Rusia, USA, Alemania, Italia, Francia y España (Figura 1). Actualmente la demanda de pieles alcanza la cifra de 700 mil pieles al año, siendo esta superior a la oferta disponible que

apenas satisface al mercado con 200 mil unidades; de allí el elevado precio y rentabilidad del negocio (Aleandri, 2012).

Argentina se posiciona entre los principales productores mundiales de pieles de chinchilla con importantes criaderos distribuidos en toda su geografía (Aleandri, 2011). Los datos sobre el número y tamaño (cantidad de animales) de los criaderos en Argentina son de difícil obtención, dado el carácter de pequeño emprendimiento hogareño de esta actividad. Además, una gran parte de la misma pertenece a una economía informal, haciendo difícil la identificación de estas unidades de producción y sus tamaños (Luca, 2003).

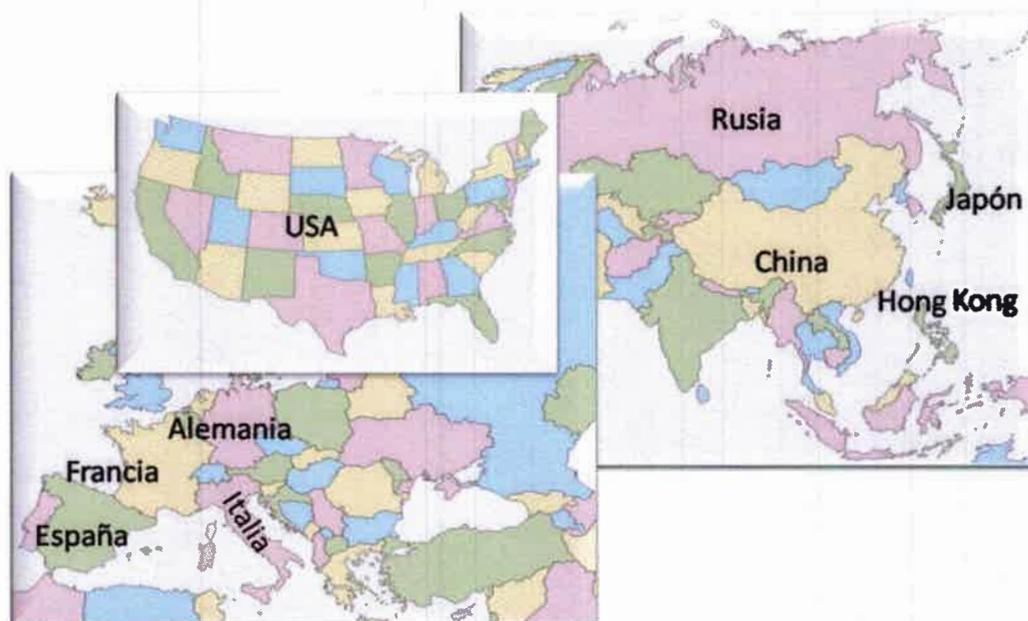


Figura 1. Principales países importadores de pieles de chinchillas.

Las principales provincias productoras de pieles de chinchillas en Argentina son Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba (Figura 2). Si bien Córdoba es una provincia con una gran población y poder económico, aún está lejos de la producción de pieles de Buenos Aires y Entre Ríos y, compite fuertemente con Santa Fe. En Córdoba residen una gran cantidad de productores de pieles de chinchillas, pero no existe en ésta provincia una “cabaña madre” dedicada totalmente a la actividad. Existen criaderos ya sea en grandes ciudades como también en pequeñas poblaciones, pero generalmente la cría se realiza como una actividad secundaria, aportando un ingreso económico extra para quien lleva a cabo la actividad (Luca, 2003, 2010, Aleandri, 2011).

Luego de un par de años de un mercado que sufrió a la par de la crisis internacional, la chinchilla renace con toda la fuerza como la piel más deseada del mundo peletero y del mundo de la moda. Durante el periodo enero-junio de 2012 Argentina vendió pieles de chinchillas como nunca antes para confeccionar accesorios de todo tipo. Las pieles de chinchillas de nuestro país son reconocidas como las mejores del mundo y tienen abiertos todos los mercados internacionales.



Figura 2. Principales provincias Argentinas productoras de chinchillas.

I.1.4. Comercialización de las pieles

Una chinchilla puede vivir hasta 20 años, procrear hasta los 12 pero comercialmente se las trabaja hasta los 7 u 8 años, luego su piel tiene un alto valor residual. Las ventas son públicas, y las pieles se venden unitariamente y su valor dependerá exclusivamente de la calidad individual de cada una de ellas (Aleandri, 2002, 2011, García Márquez, 2005).

Los encargados de la comercialización de las pieles de chinchillas a nivel mundial se llaman acopiadores. Estos últimos existen en todo el mundo, se dirigen a ciudades donde consiguen una cantidad razonable de pieles para comprar en forma pública (frente a la totalidad de los productores que ofrecen sus pieles) piel por piel y con patrones de comparación. El acopiador pone en una mesa pieles de diferentes calidades y tamaños, las cuales son los patrones de comparación. Las diferencias son evidentes, aún para un criador inexperto ó un simple observador. Las primeras serán

más chicas, más claras y más chatas, aumentando tamaño, color, largo de pelo y demás, a medida que suben sus precios (Aleandri, 2002, 2011).

La comercialización de pieles de chinchillas en Argentina tiene aproximadamente un 30% de rentabilidad. Debido a las políticas de exportación que son incentivadas en la actualidad y al elevado precio en dólares de estas pieles en los mercados internacionales, no hay duda que es un buen momento para invertir en chinchillas. Si bien es cierto que los costos en pesos han sufrido los efectos de la inflación, los mismos han quedado ahora rezagados en función del aumento de la divisa norteamericana, moneda por excelencia con que se comercializa este producto. Esta actividad netamente exportadora, lleva medio siglo desarrollándose en nuestro país, siendo una industria mediana, sólida, consistente y con una proyección real y entusiasta.

El mercado de las pieles de chinchillas en Argentina se realiza mediante cuatro ventas públicas por año donde se comercializan desde 3.000 hasta 15.000 pieles por vez. En el año 2012 Argentina exportó 30.000 pieles con variabilidad en precios (Aleandri, 2012). Los precios de las pieles que han sido exportadas durante el año 2013 se ubicaron entre 22 y 90 dólares. Es importante destacar que no hay cuello de botella en la comercialización, debido a que entre el pequeño, mediano o gran criador y el consumidor de la piel (país internacional) solo hay un eslabón, el acopiador internacional que viene al país a comprar la producción. Eso permite que la cadena de comercialización tenga menos manos intervinientes y por ende más valor agregado para el productor (Aleandri, 2011).

I. 2. La industria de los alimentos destinados a la cría de chinchillas

Se define alimento balanceado como “un producto que contribuye a la nutrición animal favoreciendo el desarrollo, mantenimiento y reproducción”. Ingredientes tales como fosfatos minerales, derivados animales, vitaminas y otros micronutrientes se mezclan con granos crecidos a campo y otros componentes para lograr el alimento terminado, los cuales deben cubrir el requerimiento del metabolismo de un animal en función de su etapa metabólica, edad y peso. Las raciones destinadas a las chinchillas, actualmente se formulan a base de cereales y concentraciones menores de otros nutrientes necesarios para garantizar una alimentación óptima.

Durante la producción de alimentos balanceados, las materias primas ingresan a las plantas de elaboración a granel, y son almacenadas en celdas individuales. La mayoría de los alimentos balanceados secos son elaborados con una máquina llamada extrusadora (Figura 3). Para la elaboración del alimento balanceado, las

materias primas molidas son pesadas en una balanza automática con sistemas computarizados de dosificación que reproducen exactamente las cantidades indicadas en la formulación de cada alimento. Esta dosificación incluye el agregado de una premezcla de micronutrientes, a efectos de obtener una dilución homogénea dentro de la mezcla total de insumos. La mezcla generada es introducida a la extrusadora y es sometida a vapor, presión y a una temperatura elevada (aproximadamente a 90 °C. durante 60 minutos) mientras es extraída a través de moldes que determinan la forma final del producto (Figura 4). El alimento debe ser enfriado previo al empaque, por medio de cortinas de aire filtrado, para evitar la condensación de humedad. Luego, los alimentos son generalmente rociados con compuestos que hacen al mismo más palatable. Si bien todas las condiciones antes mencionadas eliminan microorganismos y reducen el número de esporas, el producto final es susceptible de contaminación durante el proceso de secado, rociado y en el envasado (Grodsinsky, 2006).

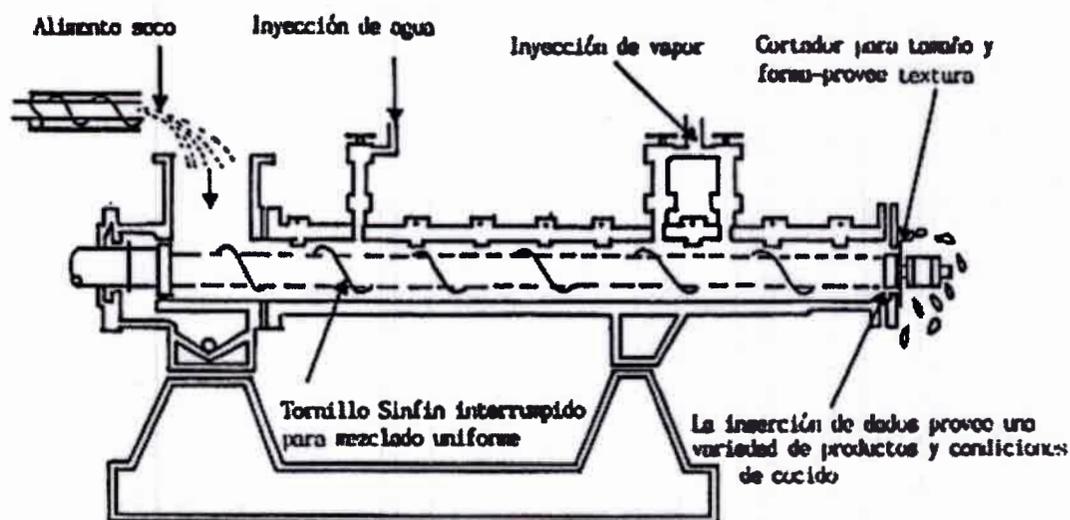


Figura 3. Esquema de máquina extrusadora.



Figura 4. Proceso de elaboración de alimentos balanceados.

Las materias primas o ingredientes deben, previamente, superar los controles de calidad reglamentarios e internos de cada empresa y son sometidos a análisis organolépticos, químicos, físicos y microbiológicos. Estos controles se reiteran en puntos críticos del proceso de producción. Una vez terminado el alimento, existen distintas medidas de control para mantener el alimento en buenas condiciones, entre las más importantes se encuentran:

- ✓ limpieza de los equipos de elaboración y manipulación del alimento
- ✓ almacenamiento del alimento en un lugar limpio y fresco
- ✓ contenido de humedad del alimento y del forraje por debajo de 13%

La industria de los alimentos balanceados para animales es un sector cuyo desarrollo ha aumentado en los últimos tiempos. Provee los ingredientes necesarios (materias primas y alimentos terminados) para producir animales saludables (Whitlow y Hagler 2002).

1.2.1. Formulación nutricional de los alimentos

Las chinchillas son animales estrictamente herbívoros y son originarias de zonas áridas con escasa cobertura vegetal, donde las plantas tienen una elevada cantidad de fibra y un escaso valor alimenticio. Para conseguir una alimentación equivalente en los criaderos, se les administra alimentos balanceados suplementados con una fuente de fibra, generalmente alfalfa deshidratada o avena y, agua potable y fresca. El consumo de alimento balanceado promedio de una chinchilla adulta puede variar entre los 25 y 30 g por animal y por día, esto depende de su peso, temperatura ambiente, estado sanitario, condición fisiológica, etc. La formulación nutricional de los alimentos balanceados suministrados a chinchillas reproductores, machos y hembras, y a su cría se muestra en la Tabla 1 (Aleandri, 2011, 2012).

Tabla 1. Composición nutricional de alimentos balanceados de chinchillas.

Nutrientes	Composición porcentual (%)
Proteína	16
Grasa	4
Hidratos de carbono	36
Fibra	36
Minerales	8

La genética es la base de un buen criadero y la nutrición es la llave para poder expresarla al máximo y así alcanzar la calidad en la piel y en la reproducción. Para esto debe haber un correcto equilibrio de proteínas y aminoácidos, ácidos grasos, fibra, hidratos de carbono, minerales y vitaminas.

✓ *Proteínas:* las mejores fuentes proteicas son de origen animal, y se adicionan a los alimentos en forma de harinas. Si bien las de origen vegetal tienen menor calidad proteica que las de origen animal, son actualmente muy utilizadas en estas formulaciones. Entre las fuentes de proteína de origen vegetal más utilizadas en los alimentos balanceados de chinchillas se encuentran la soja, cebada y avena.

✓ *Grasa:* es una fuente de energía muy importante y fácilmente metabolizable, necesaria para mantener la piel y el pelaje del animal en buenas condiciones. El exceso de grasa es perjudicial para la chinchilla ya que produce trastornos hepáticos (hígados grasos), diarrea y mala calidad de piel.

✓ *Hidratos de carbono:* el aporte nutritivo de hidratos de carbono, se cumple con la incorporación de granos. Aportan una textura agradable al alimento y son fuente de energía. Un exceso puede provocar animales gordos repercutiendo en la fertilidad y calidad de piel.

✓ *Fibra:* el aporte de fibra es de suma importancia para mantener la integridad del intestino de la chinchilla y el peristaltismo del mismo (monogástrica herbívora), como así también para el correcto desarrollo de la flora bacteriana. El salvado de trigo, cáscara de soja, avena y alfalfa son ingredientes que aportan fibra a los alimentos balanceados de chinchillas. Sin embargo, el mayor aporte de fibra en la dieta de las chinchillas está dado por el suministro de alfalfa deshidratada, generalmente administrada en forma de cubos.

✓ *Minerales y vitaminas:* el calcio y el fósforo son macrominerales y, no solo deben estar en la cantidad correcta sino que además deben mantener relación para no provocar trastornos del crecimiento y descalcificación. La relación recomendada es de 1,5 ó 2 a 1 calcio-fósforo. Los microminerales y las vitaminas son necesarios para

todos los procesos metabólicos del organismo, actuando fundamentalmente en la reproducción y en la calidad de la piel y son aportados por premezclas vitamínicas minerales cumpliendo con los requerimientos de la especie. Entre los minerales presentes en alimentos balanceados de chinchillas se encuentran en forma de sales carbonato de calcio, cloruro de sodio, carbonato de cobalto, óxido de zinc, iodato de calcio, sulfato de cobre, óxido manganoso, sulfato ferroso y bicarbonato de sodio. Las vitaminas son: vitamina A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, biotina, ácido fólico, niacina, pantoténico, vitamina C, y colina (Aleandri 2011, 2012, Luca, 2010).

Si bien las materias primas utilizadas para la elaboración de los alimentos balanceados destinados a chinchillas pueden variar, la composición nutricional de los mismos debe ser siempre la recomendada (Tabla 1). Los principales granos utilizados son: alfalfa, avena, trigo, cebada, girasol, soja y lino. La alfalfa es el insumo principal en la formulación de los balanceados destinados a chinchillas, por medio del cual se incorpora fibra en la dieta alimentaria. Este forraje es muy nutritivo, tiene un elevado contenido de minerales, calcio, vitamina A, D, E, K y proteínas, y el contenido de estas últimas varía del 10 % al 19 % y su calidad es óptima (Aleandri, 2002).

Los alimentos balanceados tienen incorporadas distintas sustancias para aumentar el gusto, estabilidad, características y apariencia de los mismos, entre ellas emulsificantes (evitan que se separe el agua de la grasa), antioxidantes (previenen la rancidez) y colorantes artificiales. Además, agregados probióticos como levaduras, que mejoran la adsorción de nutrientes, aumentan la digestibilidad de la fibra, y estabilizan el pH del intestino. Según la calidad del alimento, éstos pueden ser enriquecidos con minerales quelados (mayor biodisponibilidad) de: zinc (promueve la producción de keratina, e interviene en la inmunidad y fertilidad), selenio (antioxidante, factor de inmunidad y fertilidad), cobre (síntesis colágeno), manganeso (síntesis de cartílago). Otros agregados que pueden tener los alimentos balanceados de chinchillas son: ácidos grasos esenciales y zinc para mejorar el pelo, oligosacáridos mananos para mantener la integridad de la mucosa intestinal, cloruro de colina para protección hepática, antifúngicos y secuestrantes de micotoxinas (Aleandri, 2011, 2012).

En los criaderos de chinchillas generalmente se suplementa el alimento balanceado con cubos de alfalfa. Éstos facilitan el desgaste de las muelas de las chinchillas, son atractivos para estos animales porque les permiten roer, son fáciles de manipular y almacenar, tienen elevado valor nutricional garantizado por el fabricante, tienen gran digestibilidad y carecen de polvillos y pérdidas. Debido al alto grado de compresión, los cubos de alfalfa se encuentran poco expuestos a la degradación a través del tiempo, pudiendo ser almacenados por más de un año.

I.2.2. Clasificación de alimentos de chinchillas

En Argentina las fábricas que producen alimentos balanceados para chinchillas, elaboran un solo tipo de alimento denominado *chinchilla completo* ó bien dos tipos de alimentos, *chinchilla madre* y *chinchilla piel*. La diferencia entre estos alimentos radica principalmente en el tipo y cantidad de minerales y vitaminas que son agregados, como así también en el aporte energético de los mismos. El alimento *chinchilla completo* satisface los requerimientos nutricionales de las chinchillas en todas las fases de su ciclo de vida, tanto para la etapa de reproducción como la de crecimiento. Este alimento no excede los niveles de grasa ni energía y, el contenido de calcio y fósforo está en la proporción recomendada. Además, contiene las vitaminas y minerales necesarios para la producción de piel.

Las fábricas que elaboran dos tipos de alimentos, lo hacen diferenciando las necesidades de los animales en la etapa reproductiva y en la de crecimiento:

Chinchilla madre: este alimento se suministra a hembras en etapa reproductiva, en servicio o preñadas, que necesitan mayor aporte de minerales y nutrientes, pero sin excederse de peso (alimento con menor aporte energético).

Chinchilla piel: se utiliza durante la etapa de crecimiento ó maduración de piel (es decir, desde el séptimo mes de vida hasta la finalización). Este alimento contiene mayores niveles de aminoácidos y colina, además se incorpora zinc y semillas de lino que favorecen la producción del pelo y la calidad de la piel.

I.3. El ecosistema de los granos almacenados

Los granos de cereales y frutos oleaginosos son parte importante de alimentos destinados al consumo humano y animal. El manejo inapropiado de estos cultivos durante la cosecha causa pérdidas significantes en la cantidad y calidad. Los microorganismos están ubicuamente presentes en el agroecosistema y a partir de él son diseminados y colonizan comunidades de plantas. Las semillas en maduración no son la excepción, por lo que se contaminan con una amplia cantidad de bacterias, levaduras, y hongos filamentosos a través del aire, insectos, lluvia, equipos y prácticas agronómicas. Por ello, cuando los granos son cosechados transportan un amplio rango de contaminantes microbianos (Magan y col., 2004).

Las condiciones de almacenamiento son más estables y controladas que en el campo. El grano almacenado se considera un "ecosistema individual" y "hecho por el hombre" (Wallace y Sinha, 1981). El contenido de humedad de un sustrato es un factor crítico para el crecimiento de microorganismos y la subsiguiente producción de sus toxinas (Vlachou y col., 2004). Éstos necesitan la presencia de agua en una forma

disponible, para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. La mejor forma de medir la disponibilidad de agua es mediante la actividad de agua (a_w), la cual se define como la relación entre la presión de vapor del agua del alimento y la del agua pura a la misma temperatura. La a_w , temperatura, presión de oxígeno, conservadores químicos, tiempo de almacenamiento e interacción con otros organismos como insectos y roedores, son factores importantes para el control del crecimiento de los microorganismos en los granos, y no pueden ser considerados de forma aislada, ya que todos interactúan durante el almacenamiento (Lacey y Magan, 1991). Además, el potencial destructivo de insectos y roedores depende del ambiente en el cual viven y se multiplican, y de su mecanismo fisiológico para interactuar con otras variables bióticas y abióticas. Éstos, junto con ácaros y hongos, rompen la superficie del grano y favorecen la diseminación de la microbiota presente en la superficie de los mismos (Vazquez Arista, 2001).

El número de especies fúngicas que se encuentran colonizando el grano almacenado es muy amplio, representado por un alto número de géneros que incluyen especies psicrotolerantes, mesófilas, termófilas, xerófilas e hidrófilas (Hill y Lacey, 1983, Magan y Lacey, 1984). Las especies más características pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, capaces de crecer a valores de a_w intermedios y bajos. (Etcheverry y col., 1999). También es posible encontrar especies de *Eurotium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, y termófilos como *Talaromyces thermophilus*, *Rhizomucor pusillus*, y *Thermomyces lanuginosus* (Lacey y col., 1980). Los hongos presentes en el campo como especies de *Alternaria* que necesitan altas a_w para crecer, disminuyen de forma importante en el grano almacenado debido a que el procesamiento de secado disminuye la a_w de los mismos.

La producción de las micotoxinas puede darse a campo, durante la cosecha, pos-cosecha, el almacenamiento, el procesamiento de los alimentos o en los comederos, siempre que existan las condiciones ambientales que lo permitan. Los géneros fúngicos implicados en la producción de micotoxinas incluyen a especies de *Fusarium* y *Alternaria*, que generalmente contaminan los cultivos y producen sus micotoxinas a campo, y especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, más conocidos como hongos de almacenamiento (Roigé y col., 2009).

El almacenamiento de los cultivos, constituye una compleja fase intermedia entre el productor, procesador y consumidor. Para evitar la pérdida de la calidad nutricional de los granos se requiere el conocimiento de diferentes aspectos políticos, socioeconómicos y meteorológicos, como así también de aquellos relacionados al sistema físico del almacenamiento y de los depredadores más comunes (Vazquez

Arista, 2001). Los granos de cereales, pueden ser almacenados en silos bolsa o en silos convencionales, constituyendo así el ecosistema de éstos productos. Actualmente, para el mantenimiento equilibrado del ecosistema de los granos almacenados, se aplican tecnologías que controlan continuamente los factores ambientales (temperatura, humedad, aireación). Se utilizan prácticas de manejo de los productos que consisten en el secado de los granos con sistemas eficientes de ventilación y el uso de estructuras de almacenamiento en ambientes controlados con concentraciones adecuadas de gases y/o plaguicidas. Además, se cuenta con políticas económicas y de mercado que aseguran la ubicación final del producto (Lafarga Arnal, 2010). En los países en desarrollo los sistemas de conservación son deficientes, produciéndose desarrollo de actividad biológica y consecuentemente pérdidas en la calidad y en la cantidad de los granos. Un manejo post-cosecha inadecuado lleva al deterioro rápido de la calidad y disminuye severamente la germinación y el valor nutricional de las semillas. La actividad microbiana puede causar efectos indeseables en los granos incluyendo decoloración, aporte de calor y disminución de la materia seca a causa de la utilización de los hidratos de carbono como fuente de energía, degradación de lípidos y proteínas. Además, los hongos filamentosos presentes pueden producir micotoxinas altamente tóxicas y carcinogénicas (Lacey y Crook, 1988).

I.4. Hongos toxigénicos y micotoxinas presentes en alimentos balanceados

Los peligros de contaminación en alimentos balanceados y forrajes incluyen la presencia de toxinas producidas por hongos (micotoxinas) y el crecimiento de bacterias patogénicas como *Salmonella* spp. La carga inicial de bacterias y hongos en un alimento refleja la calidad higiénica de los mismos. Las especies fúngicas toxicogénicas tienen enzimas capaces de desdoblar macromoléculas complejas en compuestos más sencillos utilizados para el crecimiento y el metabolismo fúngico. Además, producen metabolitos secundarios de bajo peso molecular no asociados al proceso de crecimiento del hongo, producidos en niveles elevados durante la fase estacionaria de crecimiento (Moss, 1996). Muchos de estos metabolitos resultan tóxicos tanto para los microorganismos (antibióticos), como para vegetales (fitotoxinas), animales y el hombre (micotoxinas) (Vining, 1992). El término "micotoxina" fue adoptado en el año 1962 luego de un inusual episodio de intoxicación en las cercanías de Londres, Inglaterra, durante el cual murieron alrededor de 100.000 pavos. La misteriosa "enfermedad X de los pavos" (Turkey X Disease) fue relacionada con el consumo de un alimento a base de maní en el cual se encontraron metabolitos

tóxicos producidos por el hongo *Aspergillus flavus*, a los cuales se los denominó como "aflatoxinas" (AFs) (Bennet y Klich, 2003). Las micotoxinas son definidas como "metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad metabólica, causa la enfermedad o muerte de hombres y animales, incluyendo las aves" (Pitt, 1996). La gran diversidad de micotoxinas existente es un problema grave. Aunque se han identificado y caracterizado químicamente alrededor de 400 micotoxinas diferentes y la lista continúa creciendo, las investigaciones se han centrado en aquellas que afectan a la salud humana y de animales domésticos de granja y de compañía (Hussein y Brasel, 2001). Éstas incluyen principalmente a AFs, ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FBs), zearalenona (ZEA), trichotecenos (TRs) y alcaloides del ergot, incluyéndose a micotoxinas emergentes tales como la citrinina, patulina y esterigmatocistina.

La contaminación con micotoxinas es esporádica y variable, encontrándose diferentes niveles en diferentes años, sustratos y ubicaciones geográficas dependiendo de las condiciones climáticas (CAST, 1989, Withlow y Hagler, 2002, Kuiper-Goodman, 2004, Bryden, 2009). Además, la presencia de micotoxinas no siempre implica la presencia de micelio visible, por lo que un alimento con características organolépticas normales puede poseer elevados niveles de toxina (González Pereyra y col. 2008b).

Las micotoxinas tienen estructura química extremadamente variable, bajo peso molecular y causan efectos no deseados sobre animales o humanos que se encuentran expuestos a éstas (Withlow y Hagler, 2002). Son compuestos orgánicos biológicamente activos y de amplio espectro que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, producidos por un número diverso de especies fúngicas diferentes en su morfología, bioquímica y nicho ecológico. En general, los hongos que las producen se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente contaminando alimentos especialmente de origen vegetal.

1.5. Micotoxicosis en animales

Normalmente, la exposición a las micotoxinas se realiza a través del consumo de alimentos contaminados. Las enfermedades causadas por la exposición a alimentos o raciones contaminadas con micotoxinas se denominan "micotoxicosis" (Nelson y col., 1993). El primer registro de micotoxicosis conocido tiene lugar en la Edad Media, debido al consumo de centeno contaminado con esclerocios (llamados también ergots) de *Claviceps purpurea*, productor de alcaloides. Esta epidemia llamada en ese entonces "Fuego de San Antonio", se conoce hoy como ergotismo y es

el primer caso registrado de micotoxicosis en humanos. Los síntomas tempranos incluían alucinaciones, inflamación de las extremidades y sensación de ardor, que terminaban luego en gangrenas y pérdida de los miembros (CAST, 2003).

Las micotoxicosis pueden darse de forma directa o indirecta según el tipo de alimento contaminado que se consuma, si es de origen animal o vegetal. Así, se denominan "micotoxicosis primarias" cuando animales o humanos sufren la intoxicación a través del consumo de alimentos vegetales contaminados directamente con micotoxinas y "micotoxicosis secundarias" cuando la toxina se adquiere al consumir alimentos derivados de animales que consumieron vegetales o granos que contenían dichas toxinas (Figura 5) (Lillehøj, 1991). Las micotoxicosis también pueden presentarse como agudas o crónicas dependiendo de la cantidad de toxina ingerida. La ingestión de una cantidad grande de una determinada micotoxina en un período corto de tiempo, lleva al desarrollo de una enfermedad aguda con la manifestación de síntomas visibles y que pueden resultar en la muerte de varios o todos los animales implicados, dependiendo del nivel de contaminación. Por el contrario, la ingestión de pequeñas cantidades de micotoxinas durante un período prolongado (que es lo que sucede en general), lleva a un proceso crónico de características no tan marcadas, donde los principales síntomas son la pérdida de peso, la inmunosupresión y por ende la disminución de los parámetros productivos (CAST, 2003).

Las micotoxicosis pueden definirse por ciertas características típicas:

- ✓ No son enfermedades de carácter transmisible.
- ✓ No se observa ningún efecto ante el tratamiento con drogas o antibióticos.
- ✓ Se observan en brotes estacionales en el campo, debido a las condiciones climáticas que afectan el desarrollo del hongo.
- ✓ El brote generalmente se asocia con un alimento o forraje específico.
- ✓ Al examinar el alimento o forraje sospechoso, éste posee signos de contaminación fúngica y/o niveles detectables de micotoxinas.
- ✓ Al eliminar el alimento contaminado de la dieta los síntomas desaparecen (Lillehøj, 1991, Carrillo, 2003, Hussein y Brasel, 2001).

Las micotoxinas pueden estar presentes en los alimentos destinados a chinchillas ya que son resistentes al calor aplicado durante el proceso de pelletizado. La chinchilla de criadero, monogástrica no rumiante, alimentada con alimento balanceado y forraje, está particularmente expuesta a micotoxinas, ya que a diferencia de los rumiantes, no posee microorganismos capaces de inactivarlas una vez que han sido ingeridas. Dosis elevadas de micotoxinas pueden ser letales. Sin embargo, una ingesta crónica de dosis subletal o baja puede causar daños en los órganos y deprimir



el sistema inmunológico, lo que conduce a infecciones bacterianas secundarias y mal estado general. Poseen actividad citotóxica, interrumpen diversas estructuras celulares tales como membranas e interfieren procesos celulares vitales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Guerre y col., 2000), destruyendo tejidos. La mayoría son carcinogénicas, produciendo mutaciones genéticas y deformaciones en embriones en desarrollo, y algunas producen toxicidad aguda, la cual se pone de manifiesto por trastornos digestivos o dermatitis (Houssein y Brasel, 2001). Cada micotoxina produce lesiones y síntomas característicos, pero comunmente se presentan en combinación, siendo esto lo más grave ya que producen sinergismo. El grado de lesión no sólo depende de la dosis, sino también del tiempo durante el cual se ha ingiriendo la toxina.

Las micotoxicosis en animales están mejor comprendidas que en humanos ya que los estudios experimentales correlacionan más directamente los síntomas encontrados en los animales luego de la exposición a las toxinas. Como existe mortalidad de animales asociada a micotoxicosis, los efectos en la economía, eficiencia y productividad de los animales son generalmente considerables. Los efectos generales de las micotoxinas en muchos casos, sobre la salud y productividad de los animales es dosis-dependiente y habitualmente los individuos jóvenes son más susceptibles. El diagnóstico de las micotoxicosis es difícil, ya que los efectos observados no son necesariamente únicos para una determinada micotoxina, sino que pueden ser compartidos por otras micotoxinas y organismos patógenos. Además, en las intoxicaciones naturales, muchos factores del medio ambiente, nutricionales, de manejo etc., pueden influir sobre la condición de la enfermedad. Para realizar el mejor diagnóstico, debe recolectarse información del animal vivo y post-mortem, así como también realizar un análisis químico del alimento involucrado en la intoxicación (CAST, 2003).

Las micotoxinas son invisibles, inodoras y no pueden detectarse por olfato o gusto, pero pueden reducir significativamente el rendimiento de los animales de producción. Debido a la naturaleza compleja de estos contaminantes naturales y la dificultad para detectarlos, debe adoptarse un criterio para tratar de reducir el riesgo de contaminación y/o mantener la misma en niveles aceptables. Para ello, el monitoreo de las materias primas y alimentos terminados es esencial para disminuir el riesgo de micotoxicosis, pérdida de peso y reducción de la producción (Binder, 2007).

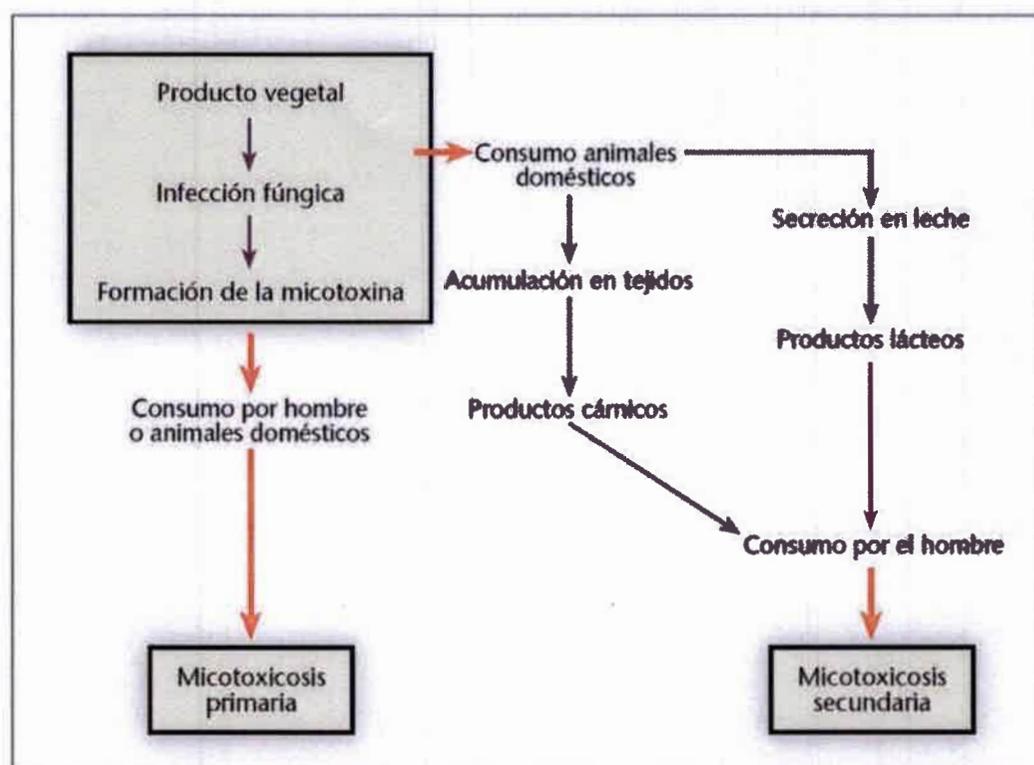


Figura 5. Micotoxicosis primaria y secundaria.

1.6. Género *Aspergillus* y sus micotoxinas

Aspergillus es un género de hongos anamórficos que se reproducen por la producción de fialósporas (conidios que nacen a partir de una fiálide) (Pitt y col, 2000). Este género incluye más de 200 especies conocidas, las cuales son saprófitas y pueden crecer sobre un amplio rango de sustratos naturales (maderas, textiles, cemento, medicamentos, granos de cereales y frutos oleaginosos) en climas tropicales y subtropicales (Pitt y Hocking, 1997).

Este es un género de particular importancia debido a que posee varias especies capaces de desarrollar y producir metabolitos a a_w bajas y a temperaturas elevadas (Moss, 1991). Poseen gran versatilidad metabólica y capacidad para dispersar sus esporas en el ambiente (Pitt, 1981). Algunas de estas especies son consideradas patógenas, alergénicas y toxicogénicas representando un riesgo potencial para la salud, mientras que otras poseen cualidades benéficas, pudiendo ser utilizadas en la producción de alimentos fermentados y terapéuticos (Pitt y Hocking, 1997).

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por Antonio Micheli en 1729, quien aplicó el nombre *Aspergillus* al estado imperfecto del hongo (anamorfo) (Malloch y Cain, 1972). Raper y Fennell (1965) propusieron los principales

lineamientos para la clasificación de este género; consideraron dos familias: *Eurotiaceae* y *Moniliaceae*; dividiendo al género en 18 grupos y 132 especies con 18 variedades. Desde entonces, sólo se han realizado revisiones menores en la taxonomía de este género. Samson y Van Reenen-Hoekstra (1988) introdujeron 42 taxones adicionales y elaboraron una revisión de las especies descritas desde 1945. Recientemente se ha dividido al género en 6 subgéneros cada uno con una o más secciones, las cuales corresponden a los grupos anteriormente considerados por Raper y Fennell (1965), y se consideran más de 200 especies (Gams y Samson, 1985, Samson, 1992, Pitt y Hocking, 1997).

Todas las especies de este género tienen una característica taxonómica en común: la disposición de conidios en cabezas aspergilaras y presencia de célula pie en el origen del conidióforo. Estas características estables, combinadas con otras primarias y secundarias constituyen la base para la taxonomía clásica del género *Aspergillus* (Pitt y Hocking, 1997).

Los criterios diagnósticos utilizados para clasificar a las secciones de *Aspergillus* se basan en las características macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas en los medios Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), Agar Nitrato Glicerol 25% (G25N) y Agar Czapek Extracto de Levadura Sacarosa 20% (CY20S). Las descripciones macroscópicas se basan en los siguientes aspectos:

- ✓ Diámetro, textura y reverso de las colonias.
- ✓ Color de los conidios y del micelio.
- ✓ Producción de pigmentos.
- ✓ Producción de esclerocios y/o cleistotecios.

Las características microscópicas son las que se muestran en la Figura 6:

- ✓ Forma, color y tamaño de la cabeza aspergilar.
- ✓ Forma y tamaño de la vesícula.
- ✓ Longitud del estipe.
- ✓ Presencia de fiálides y/o métulas y disposición sobre la cabeza aspergilar.
- ✓ Diámetro, textura y tamaño de los conidios.
- ✓ Forma y tamaño de los esclerocios, ascos y ascosporas, presencia o ausencia de células de Hülle.

Ciertas especies de *Aspergillus* producen esclerocios, los cuales son estructuras de supervivencia compactas, que varían en forma y tamaño. El color varía de amarillo a marrón ó negro. Las características morfológicas de las colonias pueden

cambiar con el medio, condiciones de crecimiento, y mutaciones (Raper y Fennell, 1965).

Algunas especies pertenecientes a este género son productoras de micotoxinas, y causantes de importantes micotoxicosis en humanos y animales (Pitt y Hocking, 1997). Casi 50 especies de *Aspergillus* han sido reconocidas como capaces de sintetizar metabolitos tóxicos. Las micotoxinas más importantes producidas por especies de este género y detectadas en alimentos son: las AFs, OTA, esterigmatocistina y ácido ciclopiazónico (CAST, 2003).

1.6.1. Sección *Flavi*: biología y hábitat

Para establecer los criterios taxonómicos en la clasificación de esta sección, Klich (2002) examinaron más de 150 cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. nomius*. Dentro de la sección *Flavi*, *A. flavus* y *A. parasiticus*, son las especies más importantes por su capacidad toxicogénica y son distinguidos por su rápido crecimiento a 25 y 37°C, y el color amarillo o verde brillante de sus conidios. La diferencia entre estas especies es que *A. flavus* produce conidios muy variables en forma y tamaño, tienen paredes delgadas y son relativamente lisas a moderadamente rugosas, en contraste, *A. parasiticus* produce conidios esféricos, con paredes gruesas y rugosas. Las vesículas de *A. flavus* son largas, de más de 50 micrómetros de diámetro, y poseen métulas, mientras que *A. parasiticus* raramente excede los 30 micrómetros de diámetro y las métulas no son comunes. La ornamentación de los conidios resultó ser el criterio morfológico más efectivo para distinguir estas especies. El perfil aflatoxicogénico es otro criterio importante para distinguir la especie *A. flavus* de *A. parasiticus* y *A. nomius*. Estas especies son productoras de AFs, mientras que *A. oryzae* y *A. tamarii* no son toxicogénicos. Las cepas de *A. flavus*, son productoras de AFs del grupo B (AFB₁ y AFB₂), mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* son productoras del grupo B y G (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂). No todas las cepas son potencialmente toxicogénicas, además *A. parasiticus* es más estable en la producción de estas toxinas que *A. flavus*. (Frisvad y col., 2005).

La especie *A. flavus* se encuentra presente en el suelo y es el principal productor de AFs y contamina una amplia variedad de productos agrícolas (maní, girasol, maíz, sorgo, almendras, nueces, higos, semillas de algodón, etc.), en el campo, el almacenamiento, en las plantas procesadoras de alimentos y en su distribución. El maíz es susceptible a *A. flavus* a través de las barbas, por donde éste ingresa (Marsh y Payne, 1984). Las condiciones de stress en el momento de la anthesis (polinización) llevan a la contaminación con AFs a campo (Withlow y Hagler, 2002).

Aspergillus parasiticus contamina con mayor frecuencia el maní (Davis y Diener, 1983). Hasta 1970 se pensaba que la mayor parte de la contaminación con AFs se generaba post-cosecha, sin embargo, muchos estudios demostraron que también ocurre la contaminación del grano en el campo.

Actualmente, mediante nuevas técnicas de identificación molecular, se han incorporado tres nuevas especies a esta sección y son potencialmente productoras de AFs: *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus* y *A. arachidicola* (Cary y col., 2005, Pildain y col., 2008).

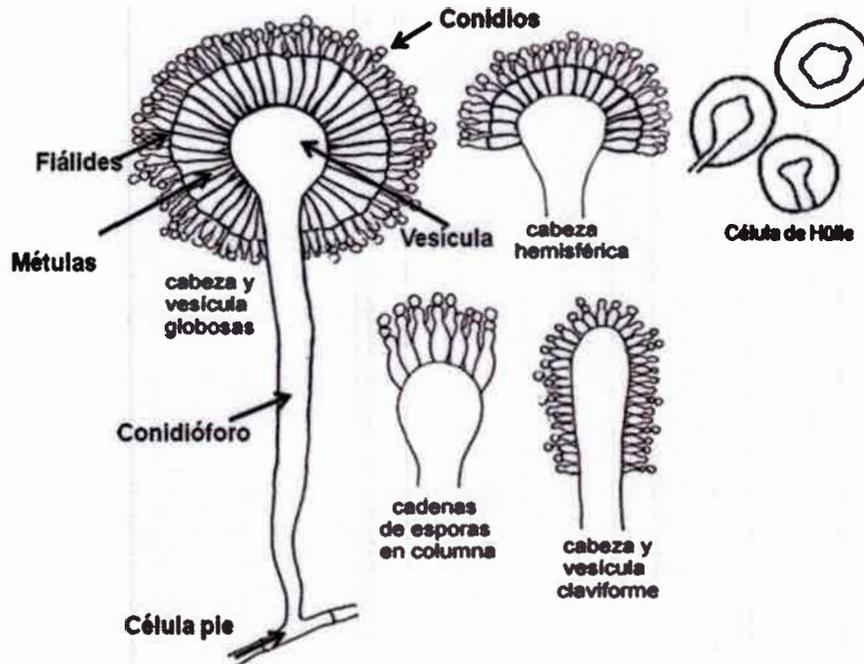


Figura 6. Características microscópicas del género *Aspergillus* (Alcalá y col., 2010).

Es posible encontrar especies aflatoxicogénicas en otras secciones del género *Aspergillus*, pero la sección *Flavi* contiene el mayor número de especies que producen AFs.

1.6.2. Las aflatoxinas

Las AFs son sintetizadas fundamentalmente por las especies de la sección *Flavi*, *A. flavus* y *A. parasiticus* (Bennett y Papa, 1988, Payne y Brown, 1998, Abbas, 2005), y también por otras especies del género, de menor importancia en cuanto a niveles de producción y presencia en productos agroalimentarios (Cary y Ehrlich, 2006, Horn, 2007). Estas son las especies *A. toxicarius*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii* (Hedayati y col., 2007) y *A. parvisclerotigenus* (Frisvad y col., 2004) ubicadas también en la sección *Flavi*, mientras que *A. ochraceoroseus* (Klich y col.,

2000) y *A. rambellii* (Frisvad y col., 2005) pertenecen a la sección *Ochraceorosei*, y *Emericella astellata* (Frisvad y col., 2004, Cary y col., 2005) y *E. venezuelensis* (Frisvad y col., 2005, Cary y col., 2005) a la sección *Nidulantes*. Como se mencionó en el apartado anterior, las dos nuevas especies de la sección *Flavi* (*A. minisclerotigenes* y *A. arachidicola*) también son productoras de AFs (Pildain y col., 2008).

Existen cuatro AFs principales: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂. Estructuralmente las toxinas del grupo B poseen una estructura bifurano-cumarina fusionado a un anillo de ciclopentanona; mientras que las del grupo G poseen una estructura de bifurano-cumarina fusionado a un anillo de lactona. El grupo B es azul fluorescente y el grupo G verde fluorescente bajo la luz UV en placas de cromatografía de capa delgada (TLC). Los subíndices 1 y 2 indican los patrones de movilidad cromatográfica de los componentes en TLC. Las aflatoxinas B₂ y G₂ son los derivados hemiacetálicos de las aflatoxinas B₁ y G₁ (Hethcote y Hibbert, 1978). La biotransformación de las aflatoxinas en varias especies animales resulta en la producción de aflatoxina M₁ (AFM₁) y M₂ (AFM₂). Estas AFs fueron aisladas de la leche y orina de animales que consumieron productos contaminados con AFB₁ y AFB₂ (Allcroft y Caunagham, 1963). Las AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, y AFM₁, son las que contaminan con mayor frecuencia alimentos de origen vegetal y sus productos derivados (Gourama y Bullerman, 1995).

El efecto de las AFs sobre la salud animal varía según la especie. La AFB₁ es la más tóxica, la Agencia Internacional de Investigaciones sobre Cáncer (IARC) considera que existen evidencias epidemiológicas suficientes para clasificarla como un carcinógeno humano del grupo 1A (IARC, 1993). Las AFs son absorbidas en el tracto gastrointestinal y son activadas en el hígado. La biotransformación de la AFB₁ se inicia con las enzimas citocromo P450 (CYP450) donde sufre oxidación a AFBO, el cual puede unirse a los residuos de guanina de los ácidos nucleicos causando alteraciones irreversibles que pueden llevar a carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad (Eaton y Gallagher, 1994, Do y Choi, 2007, Ferguson y Philpott, 2008, Verma, 2004). Además, el AFBO puede conjugarse con glutatión para continuar con la vía de detoxificación o ser hidrolizada por una epóxido hidrolasa para generar un hidrodiool (AFB₁-8,9-dihidrodiool o dhd-AFB₁), el cual puede reaccionar fuertemente con proteínas y tener efectos citotóxicos. En los casos en que el epóxido llega a conjugarse con glutatión, o la AFB₁ no sufre epoxidación sino adición grupos OH- y posterior conjugación con ácido glucurónico o sulfato, los efectos tóxicos de la molécula se ven neutralizados (Figura 7) (Eaton y Gallagher, 1994).

El hecho de que se presenten diferentes tipos de citocromos P450 capaces de transformar la AFB₁ a formas reactivas (fase I biotransformación), además de una

pobre conjugación de estas formas reactivas con glutatión o sulfatos (fase II de biotransformación) hace que diferentes especies animales presenten diferentes niveles de susceptibilidad.

Clínicamente, la aflatoxicosis aguda altera la estructura normal del hígado (Figura 8), y se manifiesta principalmente con daño hepático intenso y una disminución de la función del mismo. La unidad funcional del hígado es el *lóbulo* ó *lobulillo hepático*, el cual tiene forma hexagonal y esta constituido por células epiteliales especializadas llamadas hepatocitos. En los vértices de los lobulillos se encuentra el *espacio porta* o *triada portal*, constituido por tres vasos sanguíneos, una rama de la vena porta (suministra los nutrientes), una rama de la vena hepática (suministra el oxígeno) y el canaliculo biliar (transporta la bilis). Además en el centro del lobulillo se encuentra la *vena centrolobulillar* (rama de las venas suprahepáticas) cuya función es excretar los desechos del metabolismo de los hepatocitos.

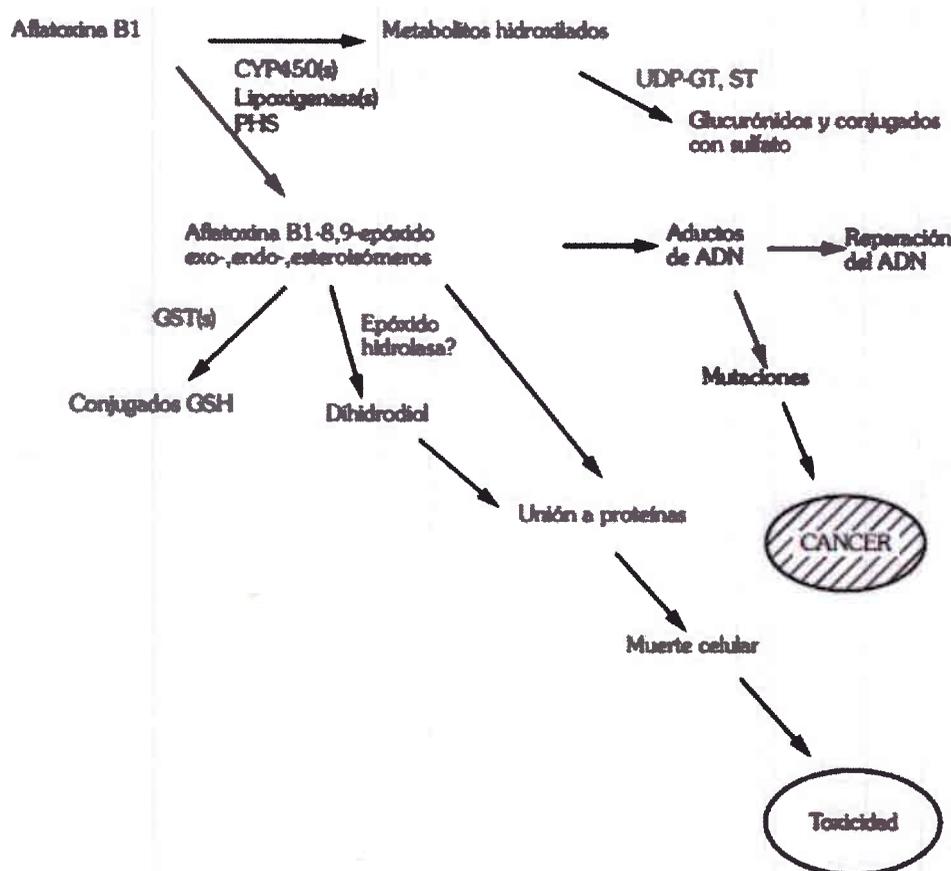


Figura 7. Rutas de biotransformación de AFB₁ (modificado de Eaton y Gallagher, 1994). CYP450(s): citocromo P450; PHS: prostaglandina H-sintetasa; GST(s): glutatión S- transferasa; UDP-GT(s): glucoronosiltransferasa; ST: sulfotransferasa.

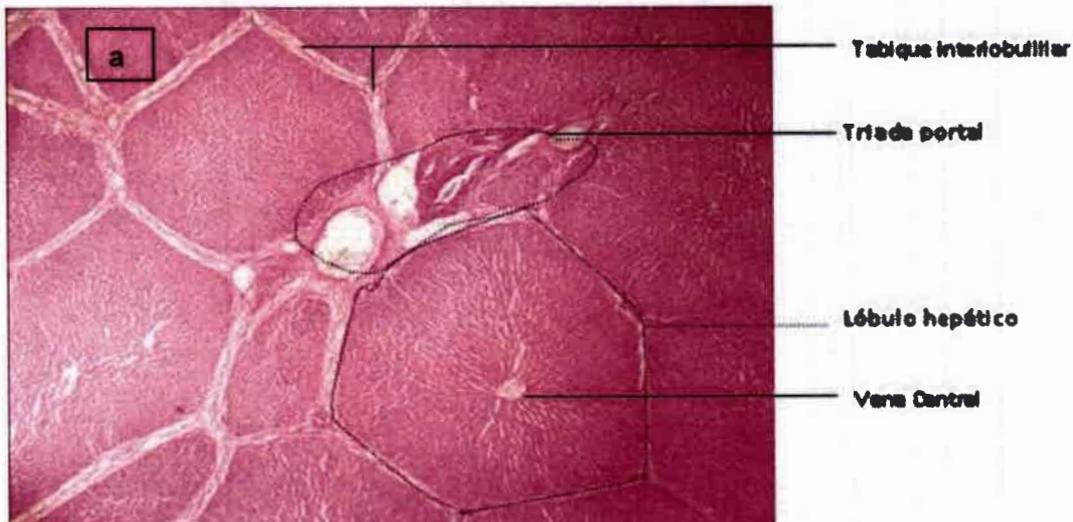
La sangre llega al lobulillo por medio de la vena porta y arteria hepática, y se mezclan en los sinusoides (capilares hepáticos que forman cordones entre los hepatocitos) para nutrir a los hepatocitos, los cuales producto de su metabolismo generan la bilis. La bilis (se genera para excretar colesterol, bilirrubina y otros desechos) se excreta hacia la vena centrolobulillar. Frente a una intoxicación, se produce alteración de esta construcción hepática, observándose degeneración grasa (acumulación grasa) en la periferia del lobulillo (degeneración perilobulillar), proliferación de conductos biliares y necrosis de hepatocitos. Se ha informado que, dosis subagudas de AFs producen efectos carcinogénicos, teratogénicos, y numerosos cambios en el sistema inmune en diversas especies animales. Macroscópicamente se observan hígados con necrosis hemorrágica focal y cambios grasos. En la forma aguda hay hepatomegalia, y en forma crónica, cirrosis con hígado pálido y duro, hidrotórax (acumulación de líquido en el espacio pleural) y edema de la pared de la vesícula biliar. Las alteraciones microscópicas producidas por consumo de AFs son necrosis hemorrágica hepática con cambios grasos en casos agudos e hiperplasia de los conductos biliares con mínima necrosis de hepatocitos en casos subagudos o crónicos. El consumo de alimento contaminado con AFB₁ produce proliferación de los conductillos biliares hacia la periferia del lobulillo hepático. En casos crónicos hay extensa fibrosis interlobular y esto puede progresar hasta cirrosis (Perusia y Rodríguez, 2001). Sin embargo, los efectos observados varían dependiendo de la dosis, tiempo de exposición, especie, dieta o estado nutricional.

Desde el punto de vista reglamentario, las AFs se consideran contaminantes inevitables de los alimentos, dado que no pueden prevenirse ni eliminarse totalmente con las buenas prácticas agrícolas actuales. Por consiguiente, se tolera la exposición de la población animal a cierto nivel de AFs dependiendo de su susceptibilidad, y se reconoce la necesidad de establecer niveles máximos permitidos de estas micotoxinas en los alimentos destinados al consumo humano y animal. La contaminación con AFs es esporádica y depende en gran medida de condiciones ambientales, siendo la humedad y la temperatura los factores más determinantes. Además, si los granos de cereales y frutos de oleaginosos llegan al almacenamiento dañados, contaminados con conidios de *A. flavus* y/o *A. parasiticus* y el porcentaje de humedad de los mismos supera el 15%, es probable el desarrollo de dichas especies y la consecuente contaminación con AFs (CAST, 2003).

1.6.3. Contaminación de materias primas y alimentos con aflatoxinas

Si bien la producción de las AFs es consecuencia de la combinación de especies fúngicas, sustrato y ambiente, los factores que afectan la producción son temperatura, contenido de humedad del sustrato y del ambiente, pH, luz, aireación y niveles de gases atmosféricos. La temperatura óptima para la producción depende del tipo de sustrato considerado; en general sobre sustratos naturales es entre 25 y 28 °C, no detectándose toxinas por debajo de 8 °C y por encima de 42 °C. El período de incubación para obtener la máxima cantidad de toxina depende de la combinación cepa-sustrato. El contenido de humedad del sustrato y la humedad relativa del ambiente son parámetros críticos en la producción, se informó máxima producción de AFs sobre granos de maíz con 25% de humedad a 25 °C. En general, la formación de AFs no ocurre hasta que la humedad del sustrato se encuentre por debajo del 32%. La humedad relativa mínima para la producción varía entre 83 y 88%, aumentando en forma proporcional al contenido de humedad hasta un 99%.

Los granos de cereales y frutos de oleaginosos son mejores sustratos que los medios de cultivo sintéticos o complejos para la producción de AFs. Estos son ricos en fuentes carbonadas, contienen glucosa, fructosa o sacarosa, y en aminoácidos glicina y ácido glutámico. Los minerales cinc y manganeso, son esenciales para la producción de AFs, la mezcla de hierro y cadmio estimulan la producción, mientras que el hierro inhibe el crecimiento fúngico y la producción de toxinas (Gourama y Bullerman, 1995, Reddy y col., 2009, Leung y col., 2010).



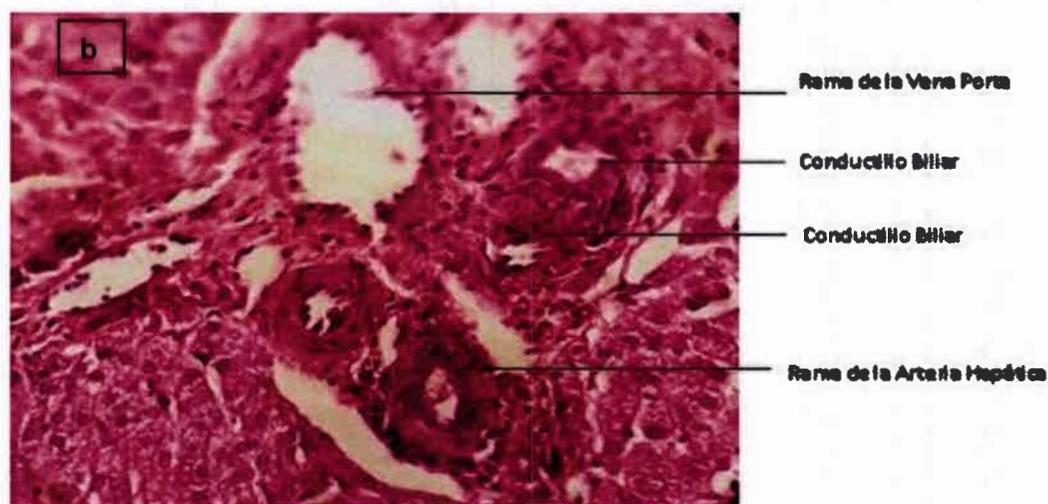


Figura 8. a) Estructura histológica hepática normal **b)** espacio porta o triada portal.

1.6.4. Micotoxicosis producidas por aflatoxinas

Las AFs son severos hepatotóxicos, pueden ser letales cuando se consumen en altas dosis. Las dosis sub-letales producen toxicidad crónica que puede ser cancerígena, afectando principalmente al hígado en varias especies. El diagnóstico de micotoxicosis en animales se basa en estudios experimentales con toxinas específicas y animales específicos, en condiciones de laboratorio bien definidas, de manera que los resultados de tales estudios pueden estar muy lejos de situaciones de la vida real o natural. Un correcto diagnóstico depende en gran medida de recibir una muestra representativa del alimento que fue suministrado a los animales antes del episodio de intoxicación, como así un examen post-mortem de un grupo representativo de los animales intoxicados (CAST, 2003).

Los conejos, son al igual que las chinchillas pequeños animales tanto de compañía como de peletería, y son comparables ya que presentan tamaño, fisiología y comportamiento similar. La sensibilidad de los conejos a diferentes micotoxinas, especialmente a las AFs ha sido informada por distintos investigadores. Una de las principales características de micotoxicosis en conejos es la reducción de la ingesta de alimentos (aproximadamente 20-60%) que provoca un retraso en el crecimiento y por lo tanto en la productividad. Las micotoxicosis en conejos incluyen patologías agudas (muertes de conejos adultos y abortos) o crónicas en función de la micotoxina en cuestión, su concentración, tiempo de exposición, efectos acumulativos, y sinergismos entre las micotoxinas (Gimeno y Martins, 2011).

1.7. Género *Fusarium* y sus micotoxinas

La mayoría de las especies de *Fusarium* son parásitos de plantas nativas y cultivadas, causando podredumbre de frutos, marchitamiento y tizones (Bottalico y col., 1983, 1987, Logrieco y Bottalico, 1988, Arseniuk y col., 1991, Pronczuk y col., 1991). Debido a esto y a su gran capacidad de adaptación a diferentes nichos, las especies pertenecientes a este género son consideradas como los patógenos de plantas más importantes del mundo.

Fusarium es un género que forma parte de la microbiota de campo. Este hongo crece entre 6 y 40 °C, con una temperatura óptima entre 18 y 30 °C. Es aerobio y necesita una a_w superior a 0,88 para crecer y proliferar y, un a_w mayor a 0,91 para producir micotoxinas. *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son especies de gran relevancia debido a que infectan frecuentemente los cultivos de maíz y productos derivados de consumo humano y animal en todo el mundo (Marasas y col., 1984, Ross y col., 1990, Nelson, 1992). Ambas especies son potenciales productoras de micotoxinas tales como: FBs, moniliformina, fusaproliferina, beauvericina, etc. (Scudamore y col., 1998). Otras micotoxinas producidas por el género *Fusarium* son el deoxinivalenol (DON) y la ZEA producidas principalmente por la especie *F. graminearum*. Estas micotoxinas son producidas en el campo y su ocurrencia depende de las condiciones meteorológicas, no pudiendo ser controladas completamente por estrategias de producción.

El género *Fusarium* exhibe un amplio grado de diversidad con respecto a sus características morfológicas, fisiológicas y ecológicas. Sin embargo, el elevado nivel de biodiversidad o variaciones trajo como consecuencia grandes dificultades en el desarrollo de un sistema taxonómico estable y aceptable. Los estudios taxonómicos del género tienen dos inconvenientes: la falta de estabilidad de las especies en los medios comunes de laboratorio y el uso de distintos sistemas en diferentes países empleados para su clasificación (Leslie y Summerell, 2006).

Durante la década de 1980, con la colaboración entre taxonomistas del género *Fusarium* de Europa, EE.UU, Australia y Sudáfrica se alcanzó un elevado nivel de acuerdo entre los criterios taxonómicos de Gerlach y Nirenberg (1982) en Alemania, Nelson y col., (1983) en los EE.UU, y Burgess (1981) en Australia. Esta uniformidad cambió drásticamente durante la década de 1990 con la aplicación del concepto de especie filogenética según las secuencias de ADN de los genes utilizados en diagnóstico. En base a este nuevo concepto resultaron especies nuevas de *Fusarium*, muchas de las cuales no se pueden distinguir morfológicamente y la identificación de especies del género *Fusarium* parecía ser nuevamente un caos.

El Manual de laboratorio *Fusarium* de John Leslie y Brett Summerell (2006), integra los conceptos de especie morfológica, biológica y filogenética. Este manual incluye capítulos detallados con las técnicas y métodos, así como la descripción de enfoques de taxonomía e identificación de *Fusarium*, seguida de la descripción de 70 especies de *Fusarium*. La descripción de cada especie contiene fotografías y descripciones de las características morfológicas principales, la información del estado sexual, taxonomía, patología, ecología, genética y biología molecular. Una revisión exhaustiva de la literatura se da para cada especie, incluyendo referencias a las publicaciones más recientes.

El Manual de Laboratorio *Fusarium* constituye un hito en el estudio del género *Fusarium* y ayudará a cerrar la brecha entre la taxonomía morfológica y filogenética. Este contiene los criterios que serán utilizados por todo el mundo para la identificación de especies de *Fusarium* durante el tercer milenio.

Este género se caracteriza por poseer microconidios (Figura 9) y macroconidios (Figura 11) como estructuras de propagación. Los macroconidios pueden producirse tanto en esporodoquios como en el micelio aéreo, mientras que los microconidios sólo se producen en micelio aéreo. Dependiendo de la especie, los macro y microconidios producidos en el micelio aéreo pueden presentarse a partir de células conidióforas monofialídicas o polifialídicas (Figura 10), mientras que los macroconidios que crecen en los esporodoquios sólo se producen a partir de monofialídes. Algunas especies forman clamidosporas como estructuras de resistencia y propagación. Estas pueden presentarse solitarias, en cadenas ó en grupos. De todas las estructuras mencionadas la morfología de los conidios es la principal característica morfológica utilizada para la identificación de especies de *Fusarium*, muchas de las cuales son cosmopolitas (Leslie y Summerell, 2006).

1.7.1. Las fumonisinas

Algunas especies del género *Fusarium* producen micotoxinas denominadas FBs, familia de toxinas con más de 18 miembros identificados, de las cuales se destacan las fumonisinas B₁, B₂ y B₃ por su toxicidad (Figura 12). La fumonisina B₁ (FB₁) es un diéster del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico y el 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15- pentahidroieicosano y es la más frecuente de las FBs, (Marasas y col., 2000). Las principales especies productoras de FBs son *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, hongos comunes del suelo. Estas especies suelen encontrarse en cereales cultivados en regiones templadas de todo el mundo y son especialmente

abundantes en maíz (Ghiasian y col., 2006, Díaz y col., 2008, Laguna y col., 2011, Mohammadi y col., 2011).

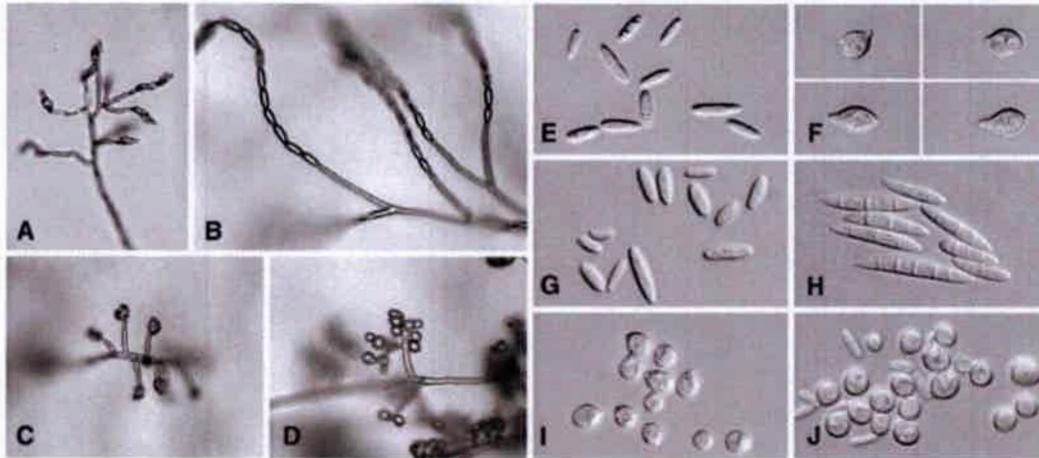


Figura 9. Formación y tipos de microconidios producidos por especies de *Fusarium*. **A.** Microconidios producidos en cortas cadenas. **B.** Microconidios producidos en largas cadenas. **C.** Microconidios producidos en falsas cabezas. **D.** Microconidios napiformes en falsas cabezas. **E.** Microconidios ovales. **F.** Microconidios piriformes. **G.** Microconidios claviformes. **H.** Microconidios fusiformes. **I.** Microconidios napiformes. **J.** Microconidios globosos (Leslie y Summerell, 2006).

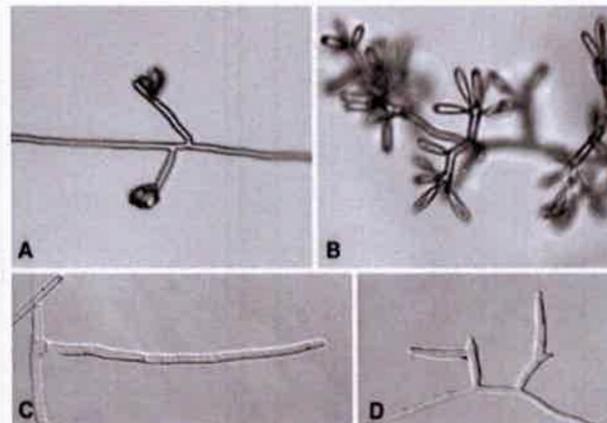


Figura 10. Células conidiógenas de especies de *Fusarium*. **A.** Microconidios sobre monofialides. **B.** Microconidios sobre polifialides. **C.** Monofialide. **D.** Polifialide (Leslie y Summerell, 2006).

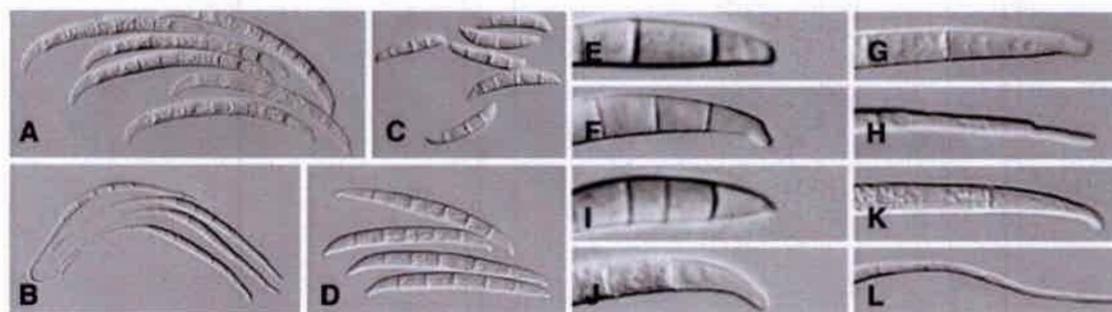


Figura 11. Macroconidios de especies de *Fusarium*. **A-D.** Variación de forma y longitud de macroconidios. **E-H.** Variación de la célula basal de macroconidios. **I-L.** Variación en la célula apical de macroconidios (Leslie y Summerell, 2006).

Si bien no se han reportado hasta la fecha casos de micotoxicosis agudas en mascotas causadas por FBs, el consumo de alimento contaminado con bajas concentraciones durante un tiempo prolongado, conlleva al riesgo de toxicidad crónica (carcinogénesis) en animales (Leung, 2006). La FB₁ es hepatotóxica en todas las especies animales ensayadas, en particular ratones, ratas, équidos, conejos, cerdos, aves y primates no humanos. Además, son nefrotóxicas en cerdos, ratas, ovejas, ratones y conejos. En ratas y conejos se produce toxicidad renal a dosis inferiores a las de hepatotoxicidad (Marasas y col., 2000).

La toxicidad de la FB₁ se ve reflejada en su capacidad de alterar el metabolismo de los esfingolípidos por la inhibición de la enzima ceramida sintasa (N-aciltransferasa y la esfingosina N-aciltransferasa), enzima responsable de la acilación de la esfingosina y esfinganina (Voss y col., 2007, Steyn y col., 2009). Además, modifica la concentración y la proporción entre la esfinganina y la esfingosina (en los mamíferos, la concentración de esfingosina es de 3 a 5 veces más elevada que la de esfinganina) de forma que se disminuye la biosíntesis de la esfingosina y se acumula esfinganina, produciéndose el bloqueo de la síntesis de esfingolípidos complejos, que son la base de formación de mensajeros secundarios que controlan los diferentes procesos entre células tales como la activación y desactivación de proteínas específicas y la expresión genética (Lino y col., 2004).

Esta inhibición metabólica de los esfingolípidos, produce una disminución del crecimiento celular y acumulación de bases esfingoides libres (Marasas y col., 2000), esto último desencadena una cascada de eventos que pueden causar toxicidad, especialmente en el hígado y los riñones, y la carcinogenicidad. La relación de esfinganina / esfingosina en suero, plasma u orina se ha utilizado como un biomarcador de la exposición a las FBs (Voss y col., 2007). Actualmente se sabe que

otras micotoxinas pueden también alterar la relación entre esos dos esfingolípidos (Mallmann y Dilkin, 2007).

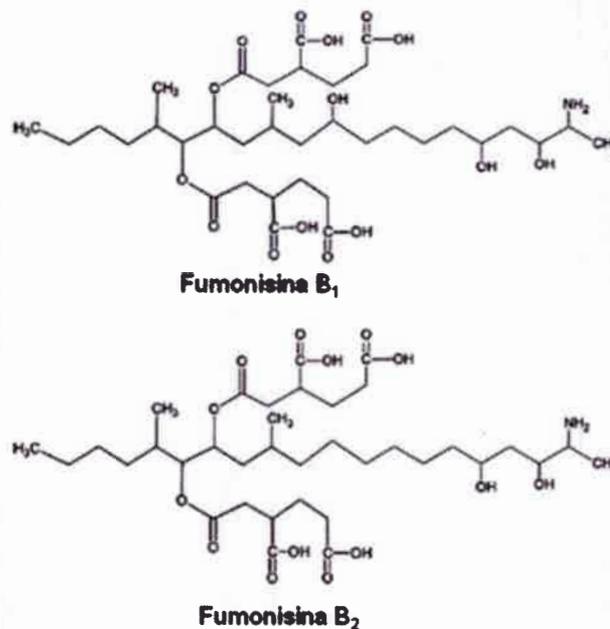


Figura 12. Estructura química de las fumonisinas B₁ y B₂ (Zain, 2011)

Los efectos toxicológicos de las FBs están relacionados con enfermedades en los animales tales como la leucoencefalomalacia equina (ELEM) y el edema pulmonar porcino (PPE), y con el cáncer esofágico en seres humanos (Marasas y col., 2000). La FB₁ es considerada actualmente como un posible cancerígeno para humanos (Grupo 2B) (IARC, 2002). Debido a su presencia en alimentos y piensos, principalmente maíz, existe una exposición humana y animal muy importante, es por ello que se debería intentar reducir los niveles de FB₁ a niveles mínimos.

1.7.2. Contaminación de materias primas y alimentos con fumonisinas

Las condiciones climáticas durante el crecimiento de la planta, en particular en el momento de la floración, tienen una gran influencia en la producción de toxinas por las especies del género *Fusarium*. El riesgo de infección se incrementa con una baja humedad del suelo, con elevadas temperaturas diurnas combinadas con bajas temperaturas nocturnas. Así mismo, la presencia de daños físicos en la planta, como los producidos por insectos, pueden suponer vías de entrada de estos patógenos. Es bien sabido que muchos hongos toxicogénicos sobreviven en residuos de cosecha, con lo que se debe evitar, o al menos disminuir, la cantidad de granos y restos de plantas que queden en los campos tras la cosecha del maíz. Una adecuada rotación

de cultivos puede ser también una forma eficaz de disminuir este inóculo en el terreno. La siembra y cosecha tempranas en latitudes templadas puede disminuir los riesgos de infección. En resumen, las buenas prácticas agrícolas y de almacenamiento encaminadas a reducir a un mínimo los factores de riesgo, pueden prevenir, hasta cierto punto, la contaminación por hongos de este género (CAST, 2003, Ariño, 1994). *F. verticillioides* es una especie considerada generalmente como un hongo de precosecha. Sin embargo las FBs pueden contaminar los granos de cereales tanto en el estadio de precosecha como durante la cosecha (Chulze y col., 1996). Las condiciones climáticas desfavorables durante la cosecha del maíz, generan condiciones ambientales adecuadas para la producción de estas micotoxinas. De éste modo pueden llegar al almacenamiento y formar parte de la materia prima utilizada en la elaboración de los alimentos balanceados, siendo estables a los métodos utilizados en la elaboración de los mismos (EMAN, 2007).

1.7.3. Zearalenona

La ZEA (Figura 13) es una micotoxina producida por *F. graminearum* y otras especies pertenecientes al género *Fusarium* (*F. sporotrichioides* y *F. culmorum*) y está presente en sustratos tales como maíz, trigo, cebada, avena y sorgo. Es un compuesto no esteroideo que presenta actividad similar al estrógeno en ciertos animales de granja tales como cerdos, vacas y ovejas (Schwarzer, 2009).

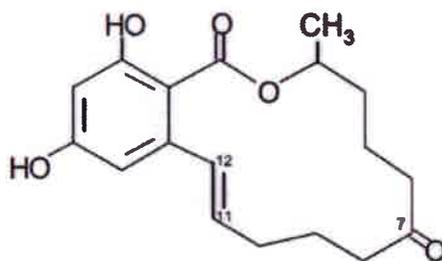


Figura 13. Estructura química de la zearalenona

McErlean (1952) fue el primero en sugerir que *F. graminearum* (estado sexual *Gibberella zeae*) era la causa del hiperestrogenismo en cerdos. Urry y col. (1966) identificaron químicamente el compuesto causante. Esta toxina es color blanca, tiene estructura cristalina y su punto de fusión es 164-165 °C, es insoluble en agua, pero soluble en solución acuosa alcalina y diversos disolventes orgánicos. La ZEA es estable durante el almacenamiento, molienda, el procesamiento, y es termoestable (EFSA, 2004 b). Fue clasificada por la IARC (1993) en el grupo 3, debido a que no hay evidencias carcinogénicas en humanos.

La ZEA se absorbe rápidamente tras la administración oral. Su absorción se estima que es 80-85% y la micotoxina y sus derivados se detectan en sangre aproximadamente 30 minutos después de la administración oral (Olsen, 1989) unido a las globulinas y hormonas reproductivas (Gajęcki, 2002). Después de la ingestión de alimentos contaminados con ZEA, esta micotoxina se une a los receptores de estrógenos, provocando cambios funcionales y morfológicos en los órganos reproductivos sensibles (Fitzpatrick y col., 1989, Katzenellenbogen y col., 1979, Shier y col., 2001). Esta alteración que provoca la ZEA y sus principales metabolitos depende de la afinidad entre los receptores de estrógeno, ubicados en hígado, intestino, útero, mamas e hipotálamo, y la toxina (Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007). Numerosos estudios reportan desórdenes en el sistema reproductivo de animales domésticos asociados al consumo de alimentos contaminados con ZEA, con resultados tales como la alteración de la estructura y función de los órganos sexuales ocasionando hiperestrogenismo e infertilidad (Kim y col., 2003, Avantaggiato y col., 2003). El hígado es el principal órgano responsable del metabolismo de los esteroides, pero otros tejidos tales como riñones, testículos, próstata, hipotálamo, ovario, intestino, contienen la enzima responsable metabolizar la ZEA y generar sus derivados hidroxilados los cuales presentan mayor toxicidad que la misma. Los cerdos son muy sensibles a la ZEA, mientras que las aves son muy tolerantes. En cerdas pre-púberes aparecen síntomas tales como inflamación de la vulva, que puede derivar a prolapso vaginal o rectal. Internamente, puede haber distorsión, agrandamiento o inflamación del útero y atrofia de los ovarios. En cerdos machos también pueden presentarse signos como atrofia testicular, aumento del tamaño de las glándulas mamarias y disminución de la fertilidad (Friend y col., 1990).

1.7.4. Deoxinivalenol

El DON (Figura 14) es una micotoxina perteneciente a los TRs, compuestos que han sido clasificados en cuatro grupos: A, B, C y D. Debido a su incidencia natural y asociación con micotoxicosis en seres humanos y animales, los grupos A y B son los de mayor significancia toxicológica (Logrieco y col., 2002). Dentro del grupo A se encuentran toxina T-2 y toxina HT-2, y diacetoxiscirpenol, y dentro del grupo B la fusarenona X, DON y nivalenol. Los tipos A y B se distinguen por la presencia o ausencia de un grupo carbonilo en la posición C₈, respectivamente (Schwarzer, 2009). Los TRs son alcoholes relativamente simples y ésteres de cadena corta, contienen un epóxido entre el C₁₂ y C₁₃, que es responsable de su actividad toxicológica. El total de tricotecenos que se encuentran naturalmente exceden los 60 compuestos y sus

estructuras químicas varían tanto en la posición, el número y la complejidad de sus esterificaciones (Glenn, 2007). Los TRs se han detectado fundamentalmente en maíz y trigo, pero también son contaminantes de cebada, avena, arroz, centeno, verduras, y otros cultivos.

El DON es estable a temperaturas elevadas (120 °C), y moderadamente estable a temperaturas cercanas a 180°C, es soluble en agua y en algunos solventes polares (metanol acuoso, acetonitrilo y acetato de etilo) (EFSA, 2004 a). Originalmente esta toxina fue nombrada "Rd-toxina" por investigadores japoneses (Morooka y col., 1972). Poco tiempo después, Vesonder y col. (1973) aislaron el mismo compuesto que llamaron vomitoxina.

Los cerdos son las especies más sensibles al DON y concentraciones de 2 a 5 ppm en las dietas están asociadas con el rechazo de alimentación mientras que concentraciones superiores a 20 ppm se relacionan con la inducción de vómitos (Haschek y col., 2002). Estas respuestas se deben a un desequilibrio neuroquímico en el cerebro porcino. La toxicidad aguda y subaguda en cerdos se caracteriza por la presencia de vómitos, rechazo de alimento, diarrea y pérdida de peso. Estudios en animales (cerdos y aves) demostraron que la exposición alimentaria crónica a DON provoca disminución en la ganancia de peso, anorexia, disminución de la eficiencia nutricional y alteración inmune (Trenholm y col., 1984, Rotter y col., 1996, Haschek y col., 2002).

A nivel molecular, el DON interrumpe la función normal de la célula mediante la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la unión al ribosoma y mediante la activación de las quinasas celulares implicadas en la transducción de señal relacionado con la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Pestka y Smolinski, 2005). El DON se metaboliza rápidamente en el intestino por acción microbiana (Eriksen y col., 2002), y no hay evidencia de acumulación de esta toxina en tejidos (JECFA, 2001, Eriksen y col., 2003) ni su transferencia a la leche (Keese y col., 2008).

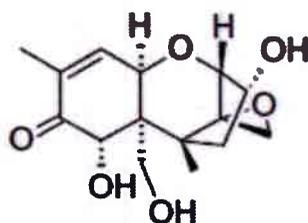


Figura 14. Estructura química del deoxivalenol

La IARC (1993) clasificó al DON en la categoría 3, esto quiere decir que no es reconocido como un carcinógeno humano. La FDA permite 1 µg/g en los productos finales consumidos por humanos (McMullen y col., 1997).

I.7.5. Contaminación de materias primas y alimentos con zearalenona y deoxinivalenol

El trigo y maíz son granos especialmente vulnerables a la infección por *Fusarium* y consecuentemente son los más contaminados con DON y ZEA en comparación con otros granos de cereales (Döll y Dänicke, 2011). La presencia de DON y ZEA se asocia principalmente con las especies *F. graminearum* y *F. culmorum*, importantes patógenos de las plantas que causan fusariosis de la espiga en el trigo y pudrición de la mazorca de maíz (*Gibberella zeae*) (Chelkowski, 1998). La incidencia de fusariosis de la espiga está fuertemente asociada con la humedad en el momento de la floración (antes), siendo el momento de la lluvia el factor más crítico. Se ha establecido una relación directa entre la incidencia de fusariosis de la espiga y la contaminación de trigo con DON. Además, productos agrícolas tales como maíz, cebada, trigo, avena, sorgo y semillas de sésamo, así como el heno y ensilado de maíz están frecuentemente contaminados con ZEA (Hagler y col., 1984, Schollenberger y col., 2006) los cuales son ingredientes principales de muchos productos alimenticios para humanos o animales.

La contaminación con ZEA prevalece antes de la cosecha, sin embargo la toxina no puede ser completamente excluida luego de ésta. Además, el hongo productor también puede sintetizar sus derivados hidroxilados tales como los metabolitos α -zearalenol (α -ZOL) y β -zearalenol (β -ZOL) en el maíz infectado por *Fusarium* (Bottalico y col., 1985). La incidencia varía según el tipo de cultivo, las condiciones climáticas del año y la región geográfica. La gran variabilidad en la composición en las dietas de animales de granja impide el cálculo de los niveles de exposición reales basados en la ocurrencia de ZEA en las materias primas individuales, y además el heno y pasto administrado en las granjas también presenta contaminación con esta micotoxina pero no existen documentaciones acerca de los niveles de contaminación en los mismos (EFSA, 2004 b).

El DON es un contaminante a nivel mundial de cereales y otros productos, y su síntesis se ve favorecida con condiciones de humedad elevada y temperaturas entre 6 y 24 °C. El interés en ésta micotoxina reside en el hecho de que la contaminación de las cosechas, alimentos e insumos para animales con esta es un problema

permanente y de alcance mundial, y que su toxicidad altera la salud y la productividad de los mismos (Leeson y col., 1995, Desjardins, 2006).

I.8. Regulaciones vigentes de concentraciones de micotoxinas en alimentos para animales

La necesidad de establecer una legislación para fijar límites en la concentración de micotoxinas en alimentos para humanos y animales es reconocida en varios países del mundo. Prácticamente, todos los países que tienen una economía de mercado bien desarrollada, tienen reglamentaciones en lo que respecta a las micotoxinas. Por el contrario, muchos de los países que están en fase de desarrollo y donde la agricultura tiene una gran importancia, no tienen reglamentaciones para micotoxinas. Los fundamentos que influyen para la reglamentación de las micotoxinas están sujetos a varios factores principales, tales como:

- ✓ disponibilidad de datos toxicológicos.
- ✓ disponibilidad de datos respecto a la incidencia de micotoxinas en varios alimentos.
- ✓ homogeneidad de la micotoxina en la masa de alimentos.
- ✓ disponibilidad en los métodos analíticos de control.
- ✓ legislación en otros países con los que hay contactos comerciales.

En general las reglamentaciones varían según las normativas de los países o las comunidades de comercialización internacional a las que pertenecen ya sea Unión Europea, MERCOSUR, etc. (Requena y col., 2005).

Las regulaciones del contenido de micotoxinas en los alimentos para animales en el mundo, se enfocan principalmente a los animales de granja, poniendo menos atención a los animales de compañía. En la mayoría de los países, los alimentos balanceados para mascotas, son regulados por un máximo de contaminación por micotoxinas para todos los ingredientes, más que una legislación para cada mascota. Tanto Estados Unidos como Canadá establecieron un límite legal de 20 µg/kg para AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ para todos los alimentos para consumo animal. Además, La Unión Europea ha establecido el mismo valor (20 µg/kg de AFB₁) como límite legal en alimentos para animales (DOUE, 2003). La Comisión Europea estableció un valor orientativo referenciado para las FB₁ + FB₂ en productos para alimentación animal. Dicha recomendación establece una concentración máxima de 5 µg/g de FBs para piensos complementarios y completos para cerdos, équidos, conejos y animales de compañía. Además, el Diario Oficial de la Unión Europea (2006), también establece valores recomendados de DON y ZEA para materias primas y alimentos destinados al

consumo animal. Estos valores máximos recomendados son 5 $\mu\text{g/g}$ y 0,5 $\mu\text{g/g}$ de DON y ZEA en piensos complementarios y completos respectivamente (DOUE, 2006):

Tabla 2. Cantidad máxima recomendada de micotoxinas en alimentos balanceados para animales

Micotoxina	Máximos niveles recomendados	
	ppm ($\mu\text{g/g}$)	ppb ($\mu\text{g/kg}$)
AFB ₁	0,02	20
FB ₁ + FB ₂	5	5000
ZEA	0,5	500
DON	5	5000



II. HIPÓTESIS

Un estudio previo realizado por Gonzáles Pereyra y col., (2008) en nuestro laboratorio informó la muerte de 200 animales en un criadero de chinchillas de Río Cuarto atribuida a un caso de aflatoxicosis aguda, corroborada por los estudio macro y microscópicos de los hígados de 9 chinchillas. Los resultados mostraron la contaminación del alimento balanceado con niveles de AFB₁ (212 ± 4,48 ppb) superiores a los límites establecidos en las reglamentaciones vigentes (20ppb) (DOUE, 2003; GMP, 2008). En base a los antecedentes descriptos se plantean las siguientes hipótesis:

- ✓ Diferentes hongos toxicogénicos y sus micotoxinas contaminan las materias primas y raciones destinadas a la alimentación de chinchillas en los establecimientos dedicados a su producción.
- ✓ La aflatoxina B₁ es la micotoxina de mayor incidencia natural en alimentos balanceados destinados a la producción de chinchillas y su presencia es compatible con síntomas de aflatoxicosis.
- ✓ Los abortos y falta de preñez producidos en los criaderos de chinchillas, como el rechazo del alimento y pérdida de peso de los animales, son compatibles con la presencia de zearalenona y deoxinivalenol en los alimentos balanceados respectivamente.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivos generales

- ✓ Evaluar la incidencia natural de aflatoxina B₁, fumonisina B₁, zearalenona y deoxinivalenol, y las especies potencialmente toxicogénicas en alimentos destinados a la cría de chinchillas.
- ✓ Estudiar a nivel macroscópico e histopatológico los hígados de chinchillas sospechosas de padecer aflatoxicosis.

III.2. Objetivos específicos

- ✓ Aislar la microbiota general y micotoxigénica de las muestras recolectadas en forma representativa y aleatoria en los establecimientos.
- ✓ Identificar las especies pertenecientes a los géneros de *Aspergillus* y *Fusarium*.
- ✓ Determinar la capacidad de las especies del género *Aspergillus* sección *Flavi* de producir aflatoxina B₁.
- ✓ Determinar la capacidad de las especies del género *Fusarium* de producir fumonisina B₁.
- ✓ Detectar y cuantificar la incidencia natural de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ en las muestras de alimentos.
- ✓ Analizar los hígados mediante estudios macroscópicos e histopatológicos de las chinchillas muertas sospechadas de padecer aflatoxicosis.
- ✓ Detectar y cuantificar la incidencia natural de zearalenona y deoxinivalenol en muestras de alimentos balanceados consumidos por chinchillas sospechadas de padecer micotoxicosis asociadas a estas micotoxinas.

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Toma de las muestras

Se recolectaron muestras de materias primas (pellets de alfalfa, soja y trigo), de los distintos alimentos balanceados (pellets de chinchilla pelo, chinchilla madre y chinchilla completo) y de los suplementos dietarios (cubos de alfalfa y avena) destinados a la cría de chinchillas provenientes de tres criaderos y una fábrica de piensos de la provincia de Córdoba. La fábrica y uno de los criaderos se encuentran ubicados en Río Cuarto, mientras que los dos criaderos restantes pertenecen a la localidad de Alcira Gigena. El muestreo comenzó en el año 2009 en la fábrica y en el criadero de Río Cuarto, y posteriormente en el 2010 se finalizó el muestreo en la fábrica y se comenzó en los criaderos de Alcira Gigena. Los muestreos en los criaderos de Río Cuarto y Alcira Gigena finalizaron en los años 2012 y 2013 respectivamente. Las materias primas y raciones destinadas a la cría de chinchillas muestreadas fueron las siguientes:

✓ *Materias primas*: sirven de base para elaborar los piensos terminados que se suministran a las chinchillas en los criaderos.

✓ *Alimentos balanceados*: se reconocen 3 variedades distintas. Hay fábricas de alimentos que sólo producen un tipo de alimento destinado a las chinchillas, cualquiera sea su edad y su etapa del desarrollo (alimento completo), mientras que otras fábricas diferencian el alimento en 2 tipos: a- alimento chinchilla madre, suministrado a las chinchillas reproductoras preñadas; b- alimento chinchilla piel, proporcionado a las chinchillas que se destinan a piel (machos sobrantes y hembras que no se reproducirán).

✓ *Suplementos dietarios*: además de estos alimentos, a las chinchillas se les suministra alfalfa o avena para aportar fibra a la dieta. La alfalfa suministrada suele ser en cubos, debido a que estos facilitan el desgaste de los dientes de estos roedores.

Se recolectaron un total de 33 muestras de materias primas, 109 de alimentos terminados, y 25 de suplementos dietarios (Tabla 3).

Las muestras se homogeneizaron y cuartearon hasta obtener una muestra representativa de 500 g (muestra de laboratorio). Esta última fue molida y guardada a 4 °C para su posterior análisis de AFs y FBs, tomando previamente una alícuota de 30 g para el análisis inmediato de la actividad acuosa (a_w) y de la microbiota.

IV.2. Estudio de la microbiota en alimentos balanceados destinados a la cría de chinchillas

IV.2.1. Determinación de la actividad acuosa

El día del muestreo se pesó 2 g de cada muestra previamente molida y se determinó su a_w a través de un equipo AQUALAB CX2 (Decagon, Devices, Pullman, Washington, Inc. USA). Antes de la medición de las muestras, el equipo fue calibrado a temperatura ambiente y los patrones que se utilizaron para su calibración también fueron llevados a la misma temperatura. El patrón utilizado fue cloruro de sodio (NaCl), a la a_w 0,760 comparado con el manual del operador.

Tabla 3. Recolección de muestras

	Tipo de alimento	Número de muestras recolectadas
Materias primas	pellet alfalfa	12
	pellet soja	11
	pellet trigo	10
Alimentos balanceados	chinchilla completo	21
	chinchilla piel	56
	chinchilla madre	32
Suplementos dietarios	cubos de alfalfa	15
	avena	10

IV.2.2. Recuento, aislamiento e identificación de la microbiota contaminante

Para la determinación del número de unidades formadoras de colonias por gramo de materias prima (UFC/g), alimento balanceado, y suplementos dietarios se realizó el método de diseminación en superficie, homogeneizando 50 g de muestra en 450 ml de agua peptonada al 0,1% durante 30 minutos en agitación. Diluciones seriadas 1/10 de la solución anterior, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} fueron sembradas en alícuotas de 0,1 ml (por triplicado) sobre los medios de cultivo sólidos diclorán-rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) para el recuento general y diclorán-glicerol 18% (DG18) para el aislamiento de especies xerofílicas. Las placas de DRBC y DG18 se incubaron a 25 °C durante 7 días. Aquellas placas que contenían entre 10-100 colonias fueron utilizadas para los recuentos, expresados en UFC/g de alimento balanceado. Se observaron macroscópica y microscópicamente las diferentes colonias desarrolladas y se realizó la identificación a nivel de género de acuerdo a las claves taxonómicas de propuestas por Pitt y Hocking (2009). Las cepas pertenecientes al género *Aspergillus* se subcultivaron en agar extracto de malta (MEA) y las del género *Fusarium* en agar hojas de clavel (AHC) para su posterior identificación a nivel de especies. Luego se determinó:

✓ *Frecuencia de aislamiento de cada género fúngico*: porcentaje de muestras en las cuales cada género está presente.

✓ *Densidad relativa de cada especie fúngica de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus**: porcentaje de cepas aisladas de cada especie con respecto al total dentro del género.

IV.2.3. Identificación de las especies del género *Aspergillus*

A partir de cada cepa se realizó una suspensión de esporas en agar semisólido; y desde aquí se inoculó en los diferentes medios de cultivos. Para la identificación de las especies del género *Aspergillus* se cultivaron las cepas en MEA, agar Czapeck extracto de levadura (CYA) y agar Czapeck extracto de levadura sacarosa 20% (CY20S). Cada cepa fue inoculada en los medios de cultivo en tres puntos equidistantes entre sí, en relación al borde y centro de la placa. Los medios de cultivo se incubaron durante 7 días siguiendo el esquema de inoculación e incubación que se muestra en la Figura 15.

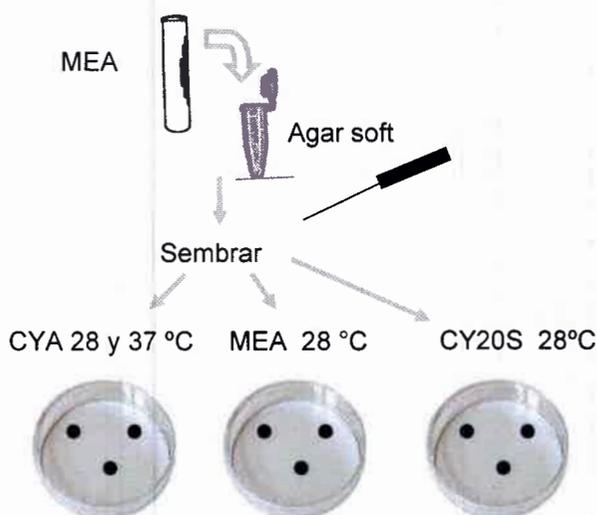


Figura 15. Esquema de inoculación para la identificación de las especies del género *Aspergillus*.

Cada cepa se identificó de acuerdo a la metodología propuesta por Pitt y Hocking (1997) y Klich (2002). Para clasificar a las especies de *Aspergillus*, los criterios diagnósticos utilizados se basaron en las características macro y microscópicas de las colonias desarrolladas en los medios MEA, CYA y CY20S. Todos estos medios se incubaron a 28 y/o 37 °C durante 7 días, para permitir el desarrollo de las colonias.

Las descripciones macroscópicas se basan en los siguientes aspectos:

- ✓ diámetro, textura y reverso de las colonias
- ✓ color de los conidios y del micelio
- ✓ producción de los pigmentos
- ✓ producción de esclerocios, y/o cleistotecios.

Las características microscópicas relevantes en la identificación son:

- ✓ forma, color y tamaño de la cabeza aspergilar
- ✓ forma y tamaño de la vesícula
- ✓ longitud del estipe
- ✓ presencia de fiálides y/o métulas y disposición sobre la cabeza aspergilar
- ✓ diámetro, textura y tamaño de los conidios
- ✓ forma y tamaño de los esclerocios, ascos y ascosporas, presencia o ausencia de células de Hülle.

IV.2.4. Identificación de las especies del género *Fusarium*

A partir de las cepas de *Fusarium* aisladas por el método estándar de dilución en placa (Booth, 1971), se realizó un cultivo monospórico, para lo cual se tomó una pequeña cantidad de propágulos fúngicos y se realizó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril. Luego de homogeneizar dicha suspensión se la transfirió a una placa de Petri con agar agua, se diseminó por rotación y se descartó (Figura 16).

Las placas se incubaron inclinadas durante 16 a 18 horas a temperatura ambiente para permitir la germinación de las esporas. Posteriormente se procedió a la obtención de conidios germinados bajo lupa (40 X) mediante aguja histológica. Un conidio se transfirió a AHC en placas de Petri de 6 cm y otro a tubos de ensayos con agar papa glucosado (APG). Los cultivos se incubaron durante dos semanas con ciclos alternativos de luz blanca /luz negra de 12 horas a 24 °C. Se analizaron las características morfológicas y culturales en medio AHC y APG, respectivamente. La identificación de las cepas se realizó según Nelson y col. (1983) y Leslie y Summerell (2006).

IV.3. Determinación de la capacidad aflatoxicogénica de las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de alimentos balanceados y suplementos dietarios

IV.3.1. Cepas

Se evaluó el perfil aflatoxicogénico de las cepas de la sección *Flavi* aisladas de las muestras de alimentos balanceados y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas, proveniente de la fábrica y de los criaderos. Para ello se repicó la raíz

cuadrada de cepas fenotípicamente iguales. De esta manera, el número de cepas ensayadas para determinar la capacidad toxicogénica correspondió 45.



Figura 16. Esquema de inoculación para la identificación de las especies del género *Fusarium*.

IV.3.2. Producción de aflatoxinas

La producción de AFs se determinó según la metodología propuesta por Geisen (1996). Las cepas se cultivaron en placas de MEA a 30 °C durante 5 días. Una colonia de cada cepa fue barrida con ansa y transferida a un tubo Eppendorf, previamente pesado, y por diferencia, se calculó el peso de la colonia para la posterior cuantificación de AFs. Se adicionaron 500 µl de cloroformo y la mezcla fue centrifugada durante 20 minutos a 4000 rpm, a temperatura ambiente. El extracto clorofórmico fue separado del micelio y evaporado a sequedad. El residuo fue resuspendido en 200 µl de cloroformo y aplicado sobre una cromatoplaaca de sílica gel sin indicador de fluorescencia (Merck). Para la corrida cromatográfica se usó cloroformo: acetona (9:1). Se utilizó una solución testigo de AFs que contenía 1,5 µg/ml de cada AFs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) (Sigma, St Louis, USA). La detección se realizó por visualización de las placas de TLC bajo luz UV de longitud de onda

larga. La cuantificación se realizó comparando la fluorescencia de los extractos bajo luz UV con las soluciones testigo.

IV.4. Determinación de la capacidad de producción de fumonisina B₁ de cepas de *F. verticillioides* aisladas de alimentos balanceados

IV.4.1. Cepas

Se evaluó el perfil toxicogénico de 40 cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas de las muestras de alimento balanceado. Nuevamente, el número de cepas ensayadas correspondió a la raíz cuadrada de cepas fenotípicamente iguales.

IV.4.2. Producción de fumonisina B₁

Para evaluar la capacidad de las cepas de producir FB₁ se colocaron 50 g de maíz comercial en frascos Erlenmeyer de 250 ml, se hidrataron con 50 ml agua destilada, y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 30 minutos durante dos días consecutivos. Posteriormente se inocularon los granos de maíz con un taco de la cepa desarrollada durante 7 días en el medio CLA. Cada cepa se inoculó por triplicado y se incubó en oscuridad a 25 ± 2 °C, durante 28 días. Para evitar la formación de cúmulos por efecto de la fermentación, los cultivos se agitaron manualmente durante los primeros días de incubación. Después del período de incubación los granos se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C durante 48 horas; se molieron finamente en molinillo a cuchillas y se almacenaron a 4 °C hasta el análisis (Magnoli y col., 1999).

IV.4.3. Extracción, detección y cuantificación de fumonisina B₁

La extracción de las FBs se realizó a partir de 15 g de cultivo molido con 50 ml de una mezcla de acetonitrilo: agua (1:1), en agitación durante 30 minutos. Una vez filtrada la mezcla a través de papel de filtro Whatman N° 1, se tomaron alícuotas de 2 ml y se guardaron a 4 °C hasta su análisis.

El extracto se cuantificó por HPLC, siguiendo la metodología propuesta por Shephard y col. (1990) y modificada por Doko y col. (1995). Para ello se diluyeron 50 µl del extracto en 500 µl de acetonitrilo: agua (1:1). Una alícuota de 50 µl del extracto diluido se derivatizó con 200 µl de una solución de O-ptaldialdeído (OPA). La solución derivatizante se preparó disolviendo 40 mg de OPA en 1 ml de metanol, adicionando 5 ml de tetraborato de sodio 0,1 M y 50 µl de 2-mercaptoetanol. Las FBs derivatizadas se analizaron usando un sistema de detección con fluorescencia/HPLC fase reversa. El sistema HPLC consistió en una bomba Hewlett Packard 1050, conectado a un detector de fluorescencia Hewlett Packard 104 A y a un integrador



Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase reversa de C₁₈ Phenomenex Luna (150 x 4,5 mm, 5 µm de tamaño de partícula). Como fase móvil se utilizó metanol: fosfato de sodio dihidrogenado 0,1 M (75:25), y el pH de la solución fue ajustado a 3,35 ± 0,5 con ácido ortofosfórico. El flujo de la fase móvil fue de 1,5 ml/min. El rango de excitación y emisión fue de 335 y 440 nm respectivamente. La solución testigo fue preparada disolviendo FB₁ pura (Sigma Aldrich) en acetonitrilo: agua (1:1) a una concentración de 100 µg/ml. La cuantificación de la FB₁ se basó en las medidas de los picos comparados con los de las soluciones testigos de referencia.

IV.5. Estudio de la incidencia natural de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ en alimentos destinados a la cría de chinchillas

IV.5.1. Análisis de aflatoxina B₁

La detección y cuantificación de las aflatoxinas se realizó utilizando cromatografía líquida de alta performance (HPLC), siguiendo la metodología propuesta por Trucksess y col. (1994) con algunas modificaciones. Se pesaron 25 g de muestra de alimento, se mezclaron con 100 ml de acetonitrilo: agua (84:16), y luego se homogeneizó en agitador de vaivén durante 30 minutos. Posteriormente se filtró el extracto a través de papel de filtro Whatman N°4 y un volumen de 8 ml del filtrado se pasó por una columna de limpieza Mycosep 228 (Romer Laboratorios, USA), para las muestras de alimentos balanceados. Se recuperó un volumen de 4 ml del extracto a partir de la columna, se secó por evaporación con nitrógeno y se conservó a 4 °C hasta su análisis. El extracto seco se resuspendió en 400 µl de fase móvil acetonitrilo: metanol: agua (1:1:4). Una alícuota de 200 µl del extracto fue derivatizada con 700 µl de una solución de ácido trifluoroacético/ácido acético glacial/agua (20:10:70) a 65 °C durante 8,5 minutos. Una alícuota de 100 µl de la solución derivatizada fue inyectada en el sistema HPLC el cual consistió de una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA, USA) y un detector de fluorescencia programable Hewlett Packard 1046, conectados a una estación de trabajo Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase reversa Phenomenex Luna (C₁₈, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil empleada fue acetonitrilo: metanol: agua (1:1:4), a una velocidad de flujo de 1,5 ml por minuto. La fluorescencia de la AFB₁ derivatizada fue registrada a una longitud de onda de 360 nm de excitación y 440 nm de emisión. La cuantificación de la AFB₁ se basó en las

medidas de los picos comparados con los de las soluciones testigos de referencia. Límite de detección de la técnica: 1 ng/g.

IV.5.2. Análisis de fumonisina B₁

Se detectó y cuantificó la concentración de FB₁ utilizando HPLC según la metodología propuesta por Shepard y col. (1990), modificada por Doko y col. (1995). Para la extracción de la toxina, 25 g de muestra fueron mezclados con 50 ml de metanol: agua (3:1) y agitados en agitador orbital durante 30 minutos. El extracto se filtró a través de papel Whatman N° 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA). Diez mililitros del filtrado de cada muestra se pasaron a través de columnas de intercambio aniónico SAX (Strata, Phenomemex) previamente acondicionadas con 5 ml de metanol y 5 ml de metanol: agua (3:1) y la elución se realizó con 10 ml de una solución de ácido acético al 1% en metanol. Cada eluido se recogió en balones y se evaporó el solvente en evaporador rotatorio. El residuo se resuspendió en metanol y se trasvasó a un vial con tapa rosca. El metanol se evaporó con N₂ en baño de agua caliente y el residuo se guardó a - 5 °C hasta el momento del análisis por HPLC. El residuo seco se resuspendió en 50 µl de fase móvil metanol: fosfato de sodio di-hidrogenado 0,1 M (75:25) a pH 3,35 (ajustado con ácido ortofosfórico) y previamente se derivatizó con 200 µl de solución de ortoaldehído (OPA) preparado de la siguiente manera: 40 mg OPA + 5 ml tetraborato de sodio 0,1 M + 50 µl de 2-mercaptoetanol + 1 ml metanol. Se agitó el residuo resuspendido con la solución durante 30 segundos y se realizó la inyección exactamente a los 3 minutos. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase reversa C18 Phenomenex Luna 150mm x 4.5 mm tamaño de partícula 5 µ. La fase móvil utilizada fue metanol: fosfato de sodio di-hidrogenado 0,1 M (75:25) pH 3,35 (ajustado con ácido ortofosfórico). El flujo fue 1.5 ml/min y la detección de la fluorescencia se realizó a una longitud de excitación de 335 nm y de emisión de 440 nm. El tiempo de retención estimado se encontró entre 4,5 y 5 minutos para FB₁. Límite de detección de la técnica: 1 ng/g.

IV.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza. Los resultados de los recuentos fúngicos fueron transformados a log₁₀ (UFC g⁻¹) para obtener homogeneidad de la varianza. Las medias de los tratamientos se compararon utilizando el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (Quinn y Keough, 2002). Por otra parte, las concentraciones de AFB₁ y FB₁ detectadas y cuantificadas en los alimentos, fueron transformadas previamente utilizando la función inversa 1/(x+1)

para lograr la homogeneidad de la varianza. El análisis fue realizado utilizando PROC GLM en SAS (Instituto SAS, Cary, NC).

IV.7. Estudio de los hígados

IV.7.1. Toma de las muestras

Se recolectaron hígados de chinchillas al azar de los tres criaderos en estudio durante la faena de los animales. Además se muestrearon hígados, riñón y pulmón de animales muertos por causas desconocidas para investigar alteraciones compatibles con una micotoxicosis.

IV.7.2. Estudios macroscópicos

Se registró el peso, el tamaño, y color de los hígados de las chinchillas sacrificadas.

IV.7.3. Estudios histopatológicos

Se realizaron cortes de tejidos del órgano blanco (hígado), y luego se fijaron con formalina neutra al 10%. Las muestras, se cortaron con un micrótopo, se embebieron en parafina y posteriormente fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Se analizaron las características hepatocelulares tales como vacuolización citoplasmática, hiperplasia nodular, y proliferación del conducto biliar.

IV.8. Estudio de la incidencia natural de zearalenona y deoxinivalenol en alimentos consumidos por chinchillas con sintomatología asociada a estas micotoxinas

IV.8.1. Toma de las muestras

Durante fines de 2012 y comienzos de 2013 en los criaderos de la localidad de Alcira Gigena, se informaron problemas tales como falta de preñez y abortos (sintomatología relacionada con la presencia de ZEA en los alimentos), como así también disminución del peso corporal y tamaño del animal por el rechazo al alimento (sintomatología relacionada con la presencia de DON en los alimentos). Para investigar la presencia de ZEA y DON, los productores remitieron muestras al laboratorio durante la aparición de los casos y se analizaron las tres variedades de los alimentos balanceados terminados pelleteados: chinchilla pelo, chinchilla madre y chinchilla completo. Las muestras enviadas por los productores no fueron homogéneas en cuanto al número, ya que los muestreos se realizaron en el momento que aparecían síntomas en las chinchillas. Se realizó un pool de las muestras

recibidas de ambos criaderos, para el análisis micotoxicológico posterior de modo tal que se analizaron muestras de alimento chinchilla completo (n= 21); muestras de alimento chinchilla madre (n= 10) y muestras de alimento chinchilla piel (n= 18). Las muestras se homogeneizaron y cuartearon hasta obtener una muestra representativa de 500 g (muestra de laboratorio). Esta última se molió y conservó a 4 °C para su posterior análisis de ZEA y DON.

IV.8.2. Análisis de zearalenona

La detección y cuantificación de ZEA se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC) según la metodología descrita en Official Methods of Analysis (AOAC, 1995). Para cada muestra, se extrajeron 25 g del material homogeneizado y molido con 125 ml de una mezcla de metanol: agua (60:40) y 80 ml de hexano. La mezcla fue agitada por 30 minutos en un agitador orbital y luego filtrada a través de un papel Whatman N° 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA). Se tomó un volumen de 25 ml del filtrado pertenecientes a la fase metanol: agua, se colocó en una ampolla de decantación y se extrajo dos veces con 25 y 15 ml de cloroformo, respectivamente. La fase clorofórmica se recolectó en un balón y se evaporó el solvente en un evaporador rotatorio. El extracto seco se resuspendió en 200 µl de benceno: acetonitrilo (98:2) y se sembró en una placa para TLC de sílica gel 60 con fondo de aluminio (20 x 20 cm, Merck, Alemania). Se sembraron spots de diferentes volúmenes (5, 10 y 15 µl) de cada uno de los extractos de las muestras y de soluciones de patrones de ZEA, a fin de poder cuantificar. Las placas fueron desarrolladas en el sistema de solventes cloroformo: acetona (90:10) dentro de una cuba saturada. Luego de la corrida, las placas se dejaron secar al aire bajo campana de extracción de gases y se observaron los cromatogramas bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm. Las cantidades relativas de dicha toxina se determinaron cuantitativamente por comparación visual bajo luz UV con las soluciones patrones de concentración conocida. Límite de detección de la técnica: 100 µg/kg.

IV.8.3. Análisis de deoxinivalenol

El análisis de DON en muestras de alimento terminado se realizó según la metodología descrita por AOAC (1995). Se tomaron 25 g de muestra del alimento terminado previamente molido y se colocaron en un Erlenmeyer junto con 100 ml de acetonitrilo: metanol (14:1), con agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitador orbital. Se filtró el material con papel Whatman N°4 y se recolectó el

filtrado. Se tomó un volumen de 8 ml del filtrado y se pasaron por una columna de limpieza Mycosep 227 (Romer Laboratorios, USA). Se recolectaron 4 ml del extracto obtenido con la columna de limpieza, y se colocaron en un vial de vidrio. Posteriormente, se secó por evaporación con nitrógeno y se conservó a 4 °C hasta su análisis. El mismo procedimiento se repitió con cada una de las muestras. El extracto seco se resuspendió en 400 µl de fase móvil acetonitrilo: metanol (12:88) y se analizaron por HPLC. Para la determinación se utilizó una columna de fase reversa C18 Phenomenex Luna 150 mm x 4,5 mm tamaño de partícula 5 µ, con fase móvil constituida por MeOH: H₂O (12: 88), y el flujo de 1.5 ml/min. La detección UV fue a 220 nm de absorvancia, y el tiempo de retención promedio fue entre 10 y 11 minutos. Límite de detección de la técnica: 5 ng/g.

V. RESULTADOS

V.1. Estudio de la microbiota en alimentos balanceados destinados a la cría de chinchillas

V.1.1. Determinación de la actividad acuosa

La Tabla 4 muestra los niveles de a_w de las muestras de materias primas, alimento balanceado (chinchilla piel, chinchilla madre y chinchilla completo) y suplementos dietarios (cubos de alfalfa y avena) destinados a la cría de chinchillas provenientes de la fábrica y de los criaderos de Rio Cuarto y Alcira Gigena. Los niveles de a_w variaron entre 0,402 a 0,620 para alimentos balanceados, mientras que para los suplementos se encontraron entre 0,453 y 0,602 para los cubos de alfalfa, y entre 0,444 y 0,588 para la avena. El alimento chinchilla madre superó el límite de a_w propuesto (0,615) para preservar la calidad higiénica de los alimentos balanceados para mascotas (Lowe y Kershaw, 1995), mientras que los restantes alimentos balanceados, las materias primas y los suplementos dietarios se mantuvieron por debajo de dicho valor recomendado.

Tabla 4. Actividad acuosa de alimentos balanceados y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas provenientes de distintos criaderos.

Alimento	Tipo de alimento	Actividad acuosa	
		Rango	Promedio
Alimento balanceado	chinchilla madre	0,407- 0,620	0,552
	chinchilla piel	0,402- 0,604	0,499
	chinchilla completo	0,411- 0,526	0,509
Materias primas	pellet alfalfa	0,484-0,613	0,543
	pellet trigo	0,437- 0,530	0,492
	pellet soja	0,487- 0,562	0,527
Suplementos dietarios	cubos de alfalfa	0,453- 0,602	0,512
	avena	0,444- 0,588	0,562

V.1.2. Recuento de la microbiota contaminante

La Tabla 5 muestra el rango de los recuentos generales (DRBC y DG18, medios de recuento general) de cada tipo de alimento proveniente de los distintos criaderos y el porcentaje de muestras contaminadas que sobrepasan el límite permitido (1×10^4 UFC/g) por la GMP (2008). Al analizar los datos individuales, se encontraron recuentos por debajo del límite de detección de la técnica (1×10^2 UFC/g) hasta recuentos que alcanzaron el valor de $1,4 \times 10^6$ UFC/g.



No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos fúngicos totales obtenidos de los alimentos procedentes de los distintos criaderos y el tipo de medio de cultivo (DRBC y DG18) utilizado para realizar el recuento (Tabla 6).

Tabla 5. Recuentos fúngicos totales (UFC/g) obtenidos de materias primas, alimentos balanceados y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas,

Alimento	Tipo de alimento	Recuento fúngico	
		Rango (CFU/g)	Muestras contaminadas (%) por encima de los límites GMP (**)
Alimentos terminados	chinchilla pelo	$1 \times 10^2 - 3,8 \times 10^4$	3,6
	chinchilla madre	$1 \times 10^2 - 5,4 \times 10^3$	0
	chinchilla completo	$1 \times 10^2 - 2,9 \times 10^5$	9,5
Materias primas	pellet alfalfa	$2 \times 10^2 - 3,9 \times 10^4$	11,1
	pellet soja	$2 \times 10^2 - 7,6 \times 10^4$	20
	pellet trigo	$1 \times 10^2 - 8,8 \times 10^4$	28,5
Suplementos dietarios	cubos de alfalfa	$1 \times 10^2 - 1,4 \times 10^6$	80
	avena	$5 \times 10^2 - 9,3 \times 10^4$	33,3

- (**) Límite de recuento recomendado en medio DRBC establecido por la GMP (2008): 1×10^4 UFC/g

- Límite de cuantificación: 1×10^2 UFC/g.

Tabla 6. Análisis de la varianza según origen del alimento y el medio de cultivo utilizado y la interacción de dichas variables sobre el recuento fúngico total.

Fuente de variación	GL	CM	F	p-valor
Origen	2	0,6	0,55	0,5749
Medio	1	0,18	0,17	0,6841
Origen x Medio	2	0,8	0,75	0,4754

GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio; F, F-Snedecor; P, significancia=0,05.

El análisis de la varianza según el alimento (alimentos balanceados, materias primas y suplementos dietarios) y el tipo de alimento (chinchilla madre, chinchilla pelo, chinchilla completo, pellet de alfalfa, pellet de trigo, pellet de soja, cubos de alfalfa y avena) demostró diferencias estadísticamente significativas entre los alimentos utilizados, pero no dentro de cada tipo de alimento (TAL) (Tabla 7). El test a posteriori realizado muestra que existen diferencias significativas entre los recuentos de los alimentos (Tabla 8). Las medias obtenidas en este análisis para cada alimento, muestran que los mayores recuentos pertenecen a los suplementos dietarios, luego a las materias primas y por último a los alimentos balanceados.

Tabla 7. Análisis de la varianza según el alimento, el tipo de alimento (TAL) y la interacción de dichas variables sobre el recuento fúngico total.

Fuente de variación	GL	CM	F	p- valor
Alimento	2	316,49	86,92	<0,0001
TAL	2	2,61	0,72	0,4891
Alimento:TAL	3	11,37	2,08	0,1017

GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio; F, F-Snedecor; P, significancia=0,05.

Tabla 8. Recuentos fúngicos totales de los alimentos destinados a la cría de chinchillas.

Alimento	Medias	E.E
Suplementos dietarios	4,17 a	0,17
Materias primas	3,18 b	0,15
Alimentos balanceados	2,03 c	0,07

- Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo al test L

- Los valores de los recuentos fúngicos fueron previamente transformados con la función $\log_{10}(x+1)$.

V.1.3. Frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos

Las Figuras 17 a ,17 b y 17 c muestran la frecuencia de aislamiento (%) de cada género fúngico analizado en las muestras de distintos tipos de alimentos balanceados, materias primas y suplementos dietarios que constituyen la dieta de las chinchillas de criadero.

Como puede observarse en la Figura 17 a, el análisis de la microbiota de los **alimentos balanceados** demostró la presencia de tres géneros de hongos filamentosos con especies potencialmente toxicogénicas, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. El orden de prevalencia de estos géneros fúngicos en los alimentos balanceados analizados fue *Aspergillus*, en segundo lugar el género *Fusarium*, y por último el género *Penicillium*.

En las muestras de las **materias primas** (Figura 17 b), puede observarse que prevaleció el género *Fusarium*, seguido por el género *Aspergillus*, y por último el género *Penicillium*.

Los **suplementos dietarios** que se suministran junto con los alimentos balanceados, difieren en cuanto a la prevalencia de los géneros aislados de cada uno de ellos. Como se observa en la Figura 17 c, en los cubos de alfalfa prevaleció el género *Fusarium*, seguido por el género *Aspergillus* y por último especies del género *Penicillium*, mientras que en la avena el género predominante fue *Penicillium*, seguido de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, respectivamente.

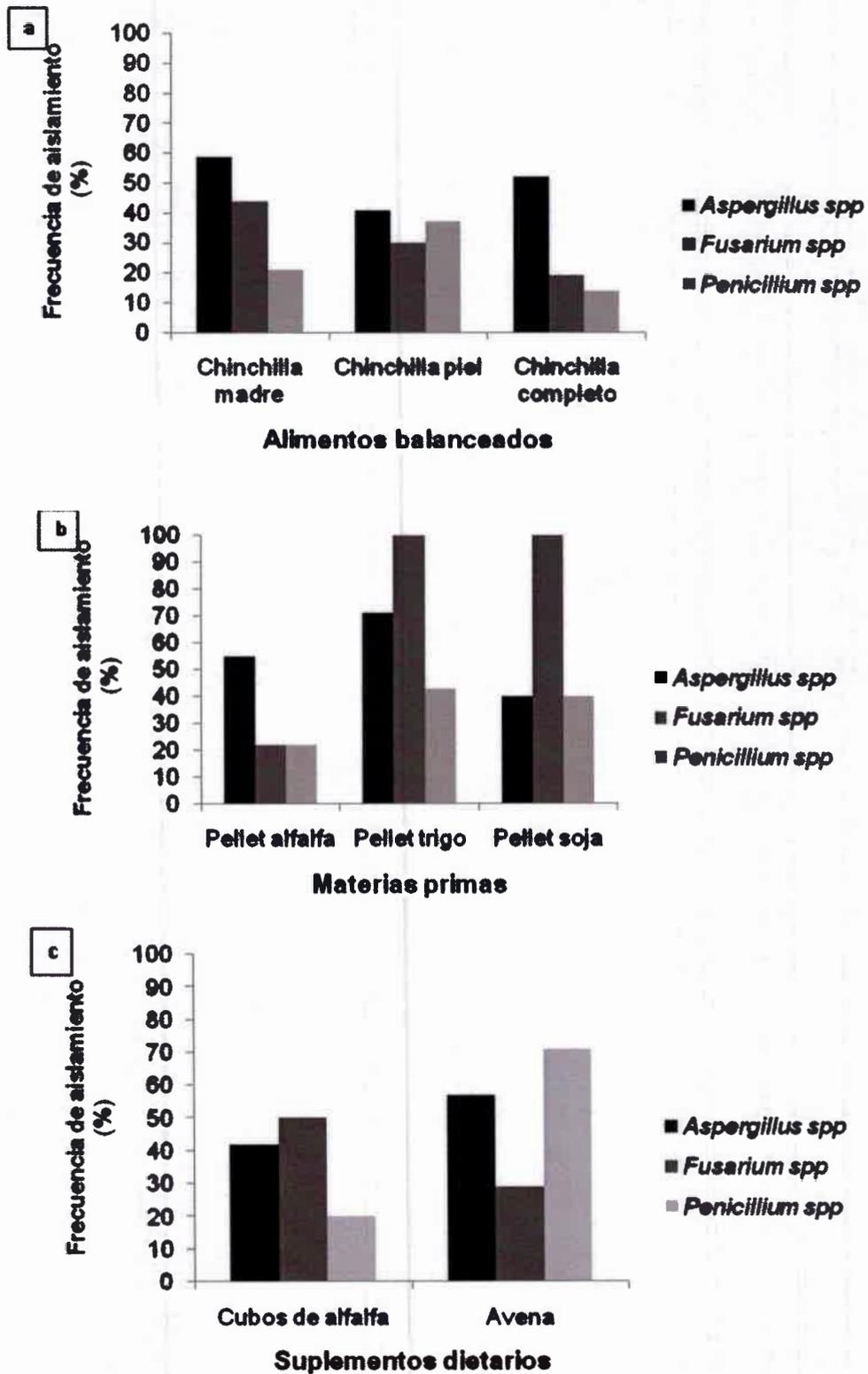


Figura 17 a-b-c. Frecuencia de aislamiento (%) de los diferentes géneros fúngicos en los alimentos balanceados, materias primas y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas.

V.1.4. Densidad relativa de las especies fúngicas

A partir de las muestras de los tres tipos de **alimento balanceado** para chinchillas, se aislaron cinco especies diferentes de *Aspergillus* spp. Estas especies aisladas e identificadas correspondieron a *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. alliaceus*, *A. oryzae* y *A. terreus* (Figura 18 a). En los alimentos chinchilla madre y chinchilla piel predominó *A. flavus*, seguido por la especie *A. fumigatus*. Además, en el alimento balanceado chinchilla piel se identificaron dos especies que no fueron aisladas del alimento chinchilla madre, las cuales correspondieron a *A. oryzae* y *A. alliaceus*. La prevalencia de *A. flavus* y *A. fumigatus* es la esperada debido a que estos alimentos proceden de la misma fábrica y sus ingredientes son los mismos, sólo varían algunas cantidades de micronutrientes. En el alimento chinchilla completo, proveniente de una fábrica distinta a la de los alimentos anteriormente nombrados, prevaleció nuevamente *A. flavus*, seguido por las especies *A. fumigatus* y *A. terreus*. Esta última especie no se aisló de los alimentos chinchilla madre y chinchilla piel. Nuevamente, la prevalencia de los mismos géneros se atribuye a los ingredientes que se utilizan en la elaboración de alimentos balanceados destinados a la cría de chinchillas.

En las **materias primas** utilizadas para la elaboración de los alimentos, la principal especie aislada correspondiente al género *Aspergillus* fue *A. flavus* (Figura 18 b). En las muestras de pellet de alfalfa, se aisló la especie *A. fumigatus*.

En los **suplementos dietarios** (Figura 18 c), la única especie de *Aspergillus* que fue identificada correspondió a *A. flavus*, tanto en los cubos de alfalfa como en avena.

En cuanto a las especies pertenecientes al género *Fusarium* identificadas a partir de los **alimentos balanceados**, puede observarse en la Figura 18 a, que *F. verticillioides* prevaleció en los tres tipos de alimentos. Además en los alimentos chinchilla madre y de chinchilla piel, provenientes de la misma fábrica, se aislaron e identificaron cepas que correspondieron a las especies *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

En las **materias primas** prevaleció *F. verticillioides* (Figura 18 b). Además en los pellets de trigo y soja se identificaron *F. oxysporum* y *F. subglutinans*.

En los **suplementos dietarios** (Figura 18 c) prevaleció *F. verticillioides*, tanto en los cubos de alfalfa como en la avena. Un porcentaje menor de la especie *F. oxysporum* fue identificada en los cubos de alfalfa.

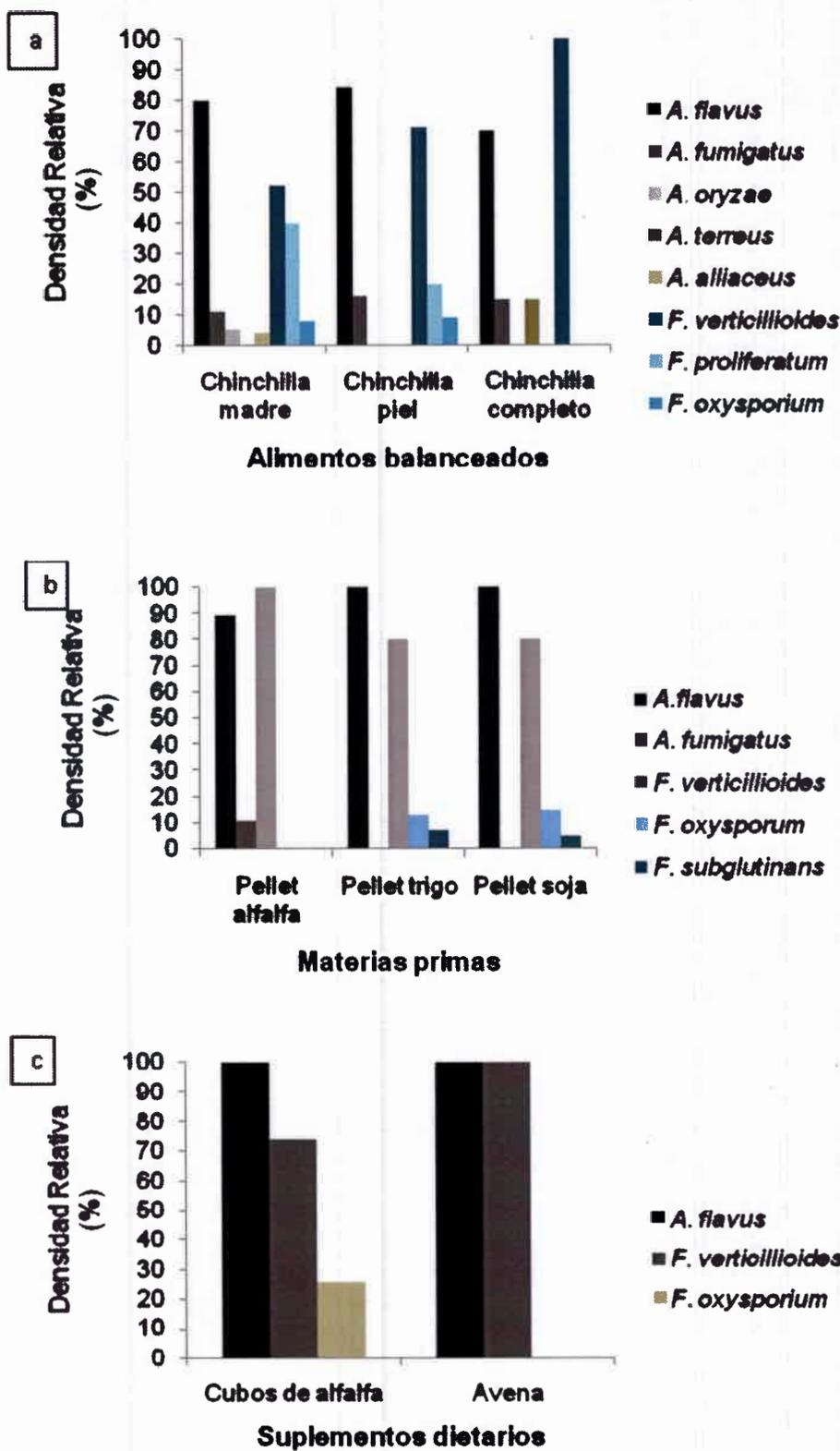


Figura 18 a- b- c. Densidad relativa de las especies de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* aislados de alimentos balanceados y suplementos dietarios destinados a la cría de chinchillas.

V.2. Determinación de la capacidad aflatoxicogénica de las especies del género *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de alimentos balanceados y suplementos dietarios

Se aislaron 45 cepas de *Aspergillus* de los alimentos balanceados de las cuales el 83% correspondió a *A. flavus*, y de dichas cepas el 74% resultaron ser productoras de AFB₁. El rango de producción de la toxina varió entre 0,66 y 68 µg/g para las cepas de *A. flavus* aisladas de alimentos balanceados.

De los suplementos dietarios se aislaron 18 cepas de *Aspergillus*, de las cuales el 100% correspondieron a *A. flavus*, y de éstas el 81% fueron capaces de producir AFB₁ en un rango de 1,4 a 76 µg/g (Tabla 9).

Tabla 9. Cepas de *Aspergillus flavus* productoras de aflatoxina B₁

Alimento	AFB ₁	
	Cepas productoras de AFB ₁ (%)	Rango de producción (µg/g)
Alimentos balanceados	74	0,66-68
Suplementos dietarios	81	1,4-76

- Límite de detección de la técnica: 0,1µg/g

V.3. Determinación de la capacidad de producción de fumonisina B₁ de las especies del género *Fusarium* aisladas de alimentos balanceados

La capacidad de cepas de *F. verticillioides* para producir FB₁, fue ensayada en cepas aisladas de los alimentos balanceados. Se ensayó un total de 40 cepas, de las cuales el 90% fueron capaces de producir FB₁ en un rango de 118 a 16400 µg/g (Tabla 10). Además, de las cepas capaces de producir FB₁, el 83% fue capaz de producir FB₂.

Tabla 10. Cepas de *F. verticillioides* productoras de fumonisina B₁

Alimentos balanceados	FB ₁	
	Cepas productoras (%)	Rango de producción (µg/g)
	90	118-16400

- Límite de detección de la técnica: 1µg/kg

V.4. Estudio de la incidencia natural de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ en alimentos destinados a la cría de chinchillas

V.4.1. Análisis de aflatoxina B₁

Todos los alimentos balanceados presentaron contaminación con AFB₁ (Tabla 11).

Tabla 11. Aflatoxina B₁ (ng/g) en alimentos destinados a la cría de chinchillas

Tipo de alimento	AFB ₁ (ng/g)		
	Muestras contaminadas (%)	Muestras contaminadas (%) por encima de los límites recomendados (**)	Niveles min-máx
Chinchilla piel	47,6	11,8	1,98- 97,34
Chinchilla madre	29,4	0	1,9- 9,74
Chinchilla completo	5	0	0- 4,78
Cubos de alfalfa	53,3	33,3	1,93- 40,40
Avena	0	0	-

- (**) Límite recomendado: 20 ng/g (GMP, 2008).

- Límite de detección de la técnica: 1 ng/g.

El alimento balanceado chinchilla piel presentó el mayor porcentaje de muestras contaminadas (47,6%), de las cuales un 11,8% superaron el límite establecido por el Diario Oficial de la Unión Europea 2006 para los alimentos de consumo animal (20ng/g) (DOUE, 2006). Además, este alimento presentó un rango cuyo valor máximo correspondió al mayor valor de AFB₁ detectado y cuantificado en los alimentos estudiados, como así también presentó la media de concentración de la toxina más elevada en los alimentos analizados. El 29,4 % de las muestras de alimento chinchilla madre presentó contaminación con AFB₁, pero ninguna de ellas sobrepasó el límite establecido. El alimento chinchilla completo fue el menos contaminado, presentó el menor porcentaje de muestras contaminadas (5%) y ninguna de las muestras sobrepasó el límite establecido.

Tabla 12. Análisis de la varianza de la concentración de aflatoxina B₁ según el alimento y tipo de alimento (TAL)

Fuente de variación	GL	CM	F	p- valor
Alimento	1	0,42	3,66	0,0567
TAL	2	1,62	7,10	0,0010
Alimento:TAL	1	2,30	20,15	<0,0001

GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio; F, F-Snedecor; P, significancia=0,05

Tabla 13. Aflatoxina B₁ en la interacción de los alimentos y tipos de alimentos (TAL) de chinchillas

Alimento	TAL	Medias	E.E.
Suplementos dietarios	Avena	1 a	0,08
Alimentos balanceados	Chinchilla completo	0,96 a	0,04
Alimentos balanceados	Chinchilla madres	0,82 b	0,04
Alimentos balanceados	Chinchilla piel	0,75 b	0,04
Suplementos dietarios	Cubos de alfalfa	0,56 c	0,06

- Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo al test LSD

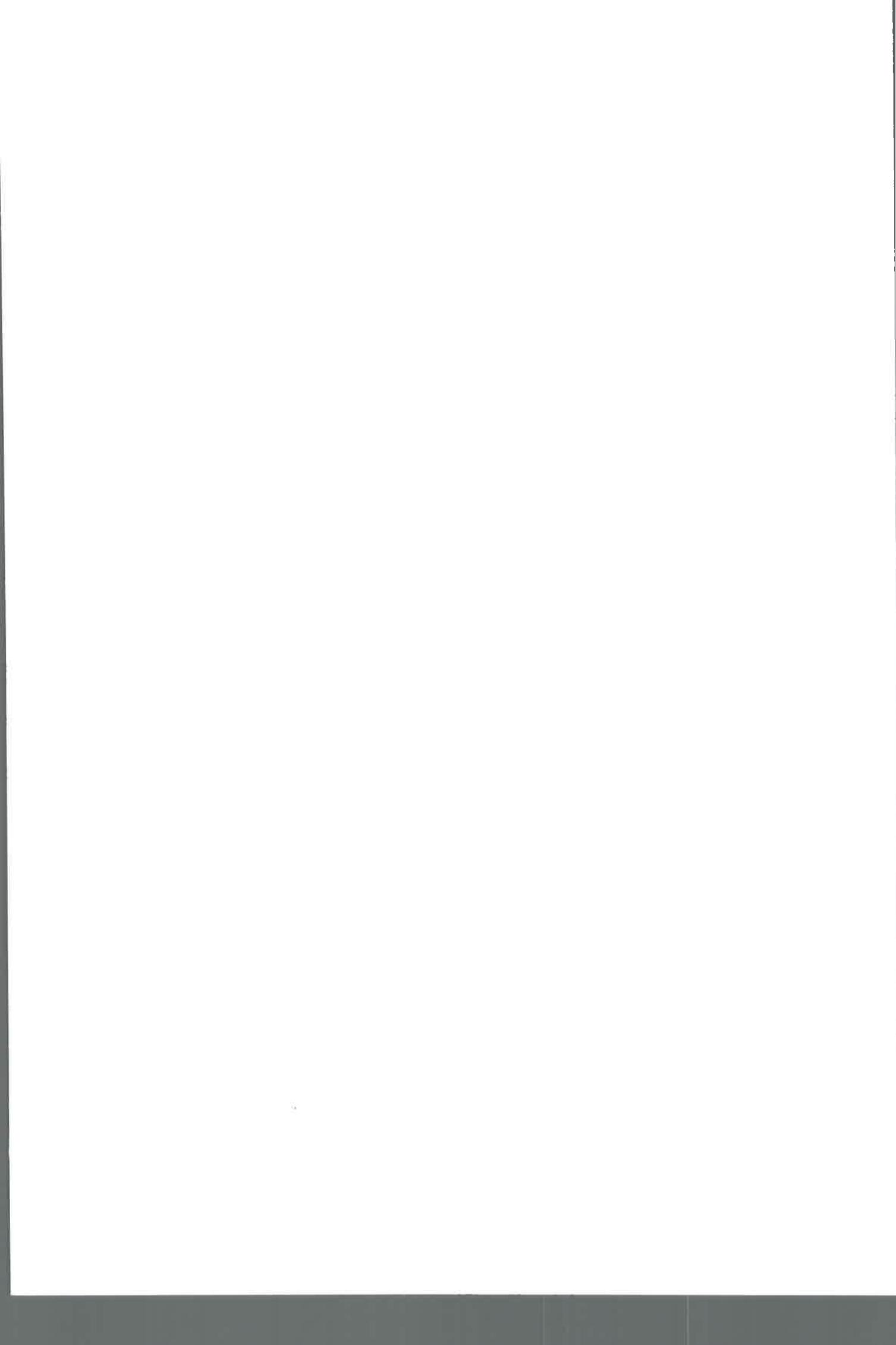
- E.E: error estándar

Los cubos de alfalfa mostraron el mayor porcentaje de muestras contaminadas (53,3%), el porcentaje más elevado de muestras que superaron el límite propuesto (33,3%) (GMP, 2008), y además, la media de concentración de AFB₁ más grande (11,82) de todos los tipos de muestras de alimentos analizadas. Las muestras de avena no tuvieron contaminación con niveles detectables de AFB₁ (Tabla 11).

Las concentraciones de AFB₁ detectadas y cuantificadas en los alimentos, fueron transformadas previamente utilizando la función inversa $1/(x+1)$ para lograr la homogeneidad de la varianza (Tabla 12). Luego, el análisis de la varianza demostró que existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración de AFB₁ entre los distintos tipos de alimentos (TAL) analizados, como así también en la interacción de las variables estudiadas (alimento y tipo de alimento). El test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) demostró que las diferencias entre las concentraciones de la toxina se encontraron entre los cubos de alfalfa con los alimentos chinchilla piel y chinchilla madre, y a la vez estos también mostraron diferencias con el alimento chinchilla completo y el suplemento dietario avena (Tabla 13). Cabe destacar que al transformar las concentraciones de la toxina con una función inversa, la media más pequeña corresponde en realidad a la mayor, de este modo, el alimento que presentó la mayor media de concentración de AFB₁ es el suplemento cubos de alfalfa, luego chinchilla piel, chinchilla madre, chinchilla completo y, por último, el suplemento dietario avena.

V.4.2. Análisis de fumonisina B₁

El análisis de FBs por HPLC reveló que los tres tipos de alimentos balanceados destinados a la cría de chinchillas presentaron contaminación con FB₁ y además, en todos los alimentos analizados se encontraron porcentajes de muestras que sobrepasaron el límite establecido de 5 µg/g (DOUE, 2006) (Tabla 14).



Los suplementos dietarios, si bien presentaron porcentajes elevados de contaminación con niveles detectables de FB₁, no presentaron muestras que superaran el límite establecido por el DOUE (2006) (Tabla 14).

Al realizar el análisis de la varianza respecto del alimento y tipo de alimento, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de FB₁ detectadas en los piensos y suplementos dietarios destinados a las chinchillas (Tabla 15).

Tabla 14. Fumonisina B₁ (µg/g), frecuencia de contaminación y porcentaje que supera el límite propuesto, en muestras de alimentos destinados a la cría de chinchillas

Alimento	Niveles de FB ₁ (µg/g)		
	Muestras contaminadas (%)	Muestras contaminadas (%) por encima de los límites recomendados(**)	Rango
Chinchilla madre	47,1	12,5	1,93-5
Chinchilla piel	42,8	11,1	1,1-10,21
Chinchilla completo	35	14,2	1,2-7,2
Cubos de alfalfa	46,2	-	1,9-3,2
Avena	60	-	1,1-3,7

- (**) Límite recomendado: 5 µg/g (DOUE, 2006).

- Límite de detección de la técnica: 1 ng/g

Tabla 15. Análisis de la varianza de la concentración de fumonisina B₁ según el alimento y tipo de alimento (TAL).

Fuente de variación	GL	SC	F	p-valor
Alimento	1	4,29	1,24	0,2665
TAL	2	1,25	0,16	0,8545
Alimento:TAL	1	1,06	0,27	0,6054

GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio; F, F-Snedecor; P, significancia=0,05

V.5. Estudios macroscópicos e histopatológicos de hígados de chinchillas

Se recolectaron muestras de hígados de chinchillas normales sacrificadas por llegar a su momento de madurez. Los análisis macroscópicos no revelaron cambios en el tamaño (normal), color (cereza brillante) ni peso (entre 10 y 15 gr) en las muestras analizadas. En el análisis histopatológico se observaron en general cambios que variaron entre leves a moderados en cuanto a la degeneración grasa difusa, proliferación de conductillos biliares y necrosis celular. Se observó un caso con presencia de degeneración grasa intensa difusa y marcados signos de necrosis. Además, se encontraron cortes, donde se observaron núcleos de hepatocitos con

vacuolas intranucleares de todos los grados cuya causa es desconocida hasta el momento. Por otro lado en el criadero 1 de Alcira Gigena durante el mes de Mayo del 2011 se produjeron 14 muertes de chinchillas (1 o 2 muertes cada 2 días, aproximadamente), las cuales presentaban sintomatología correspondiente a una intoxicación. De las chinchillas muertas se tomó muestras de hígado, riñón y pulmón para su posterior estudio histopatológico. Los resultados de los estudios fueron los siguientes:

- ✓ *Hígado*: se presentaron extensas áreas de necrosis y vacuolas lipídicas en el citoplasma de la mayoría de los hepatocitos, correspondiendo a degeneración grasa microvacuolar y macrovacuolar severa. También se observó degeneración hidrópica intensa de todo el parénquima hepático con cambios nucleares de necrosis en algunos hígados.
- ✓ *Pulmón*: las muestras presentaron engrosamiento de los tabiques interalveolares con hiperemia e infiltrado inflamatorio mononuclear y polimorfonuclear. Se apreciaron áreas de enfisema.
- ✓ *Riñón*: en las muestras se observaron los lúmenes tubulares totalmente colapsados, con protrusión de las células epiteliales hacia la luz. Se apreciaron intensos cambios degenerativos en las células del epitelio tubular, principalmente degeneración grasa sobre la cara basal.

El diagnóstico histopatológico correspondió a hepatitis tóxica grave, insuficiencia renal aguda severa y neumonía intersticial y exudativa incipiente. Las lesiones observadas fueron compatibles con intoxicación aguda, pero dado que no se encontraron niveles detectables de AFB₁ en las muestras del alimento que estaban consumiendo los animales en el momento de ocurrir la muerte de los mismos, no se pudo confirmar una aflatoxicosis aguda. Por otro lado, el análisis de la incidencia natural de FB₁ demostró que el 65% de las muestras de los alimentos suministrados durante el episodio, estaban contaminadas con FB₁, en un rango de 1,1-7,2 µg/g, superando en algunos casos el límite establecido por el DOUE (2006) (límite recomendado: 5 µg/g).

El alimento que estaba siendo consumido por las chinchillas en el momento que comenzaron a presentarse las muertes, fue suspendido y se cambió la marca del mismo.

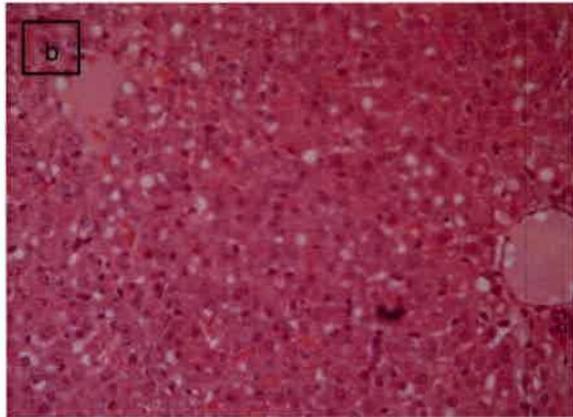
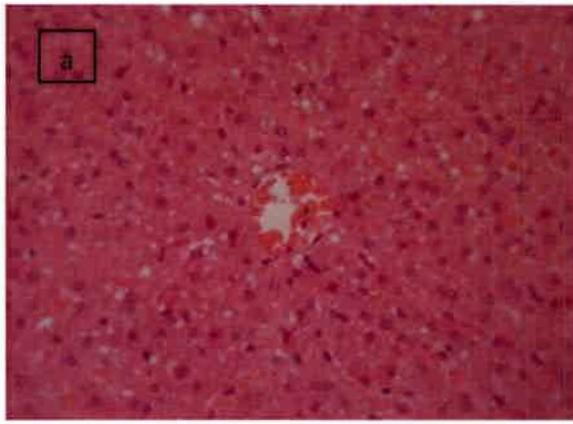


Figura 19. Corte de hígado de chinchilla normal sacrificada. Tinción con Hematoxilina Eosina
a) degeneración grasa moderada difusa. Cambios celulares de necrosis. Leve proliferación de ductos biliares **b)** degeneración grasa intensa difusa, con marcados signos de necrosis de predominio periportal **c)** hígado de chinchilla sacrificada por llegar a su madurez peleterá. Apariencia macroscópica y tamaño normal.

V.6. Estudio de la incidencia natural de zearalenona y deoxinivalenol en alimentos balanceados consumidos por chinchillas con sintomatología asociada

V.6.1. Incidencia natural de zearalenona

Los tres tipos de alimentos que se suministran en los criaderos a las chinchillas presentaron contaminación con ZEA representando un 33% del total de las muestras analizadas. El valor de contaminación encontrado en todas las muestras analizadas fue de 2 µg/g, superando el límite recomendado (0,5 µg/g) por el DOUE (2006).

En la Figura 20 puede observarse claramente que, el alimento chinchilla piel presentó el mayor porcentaje de muestras contaminadas (55,5%), en segundo lugar el alimento más contaminado fue chinchilla madre (30%), y por último el alimento chinchilla completo (14,3%) presentó el menor porcentaje de muestras contaminadas con esta micotoxina.

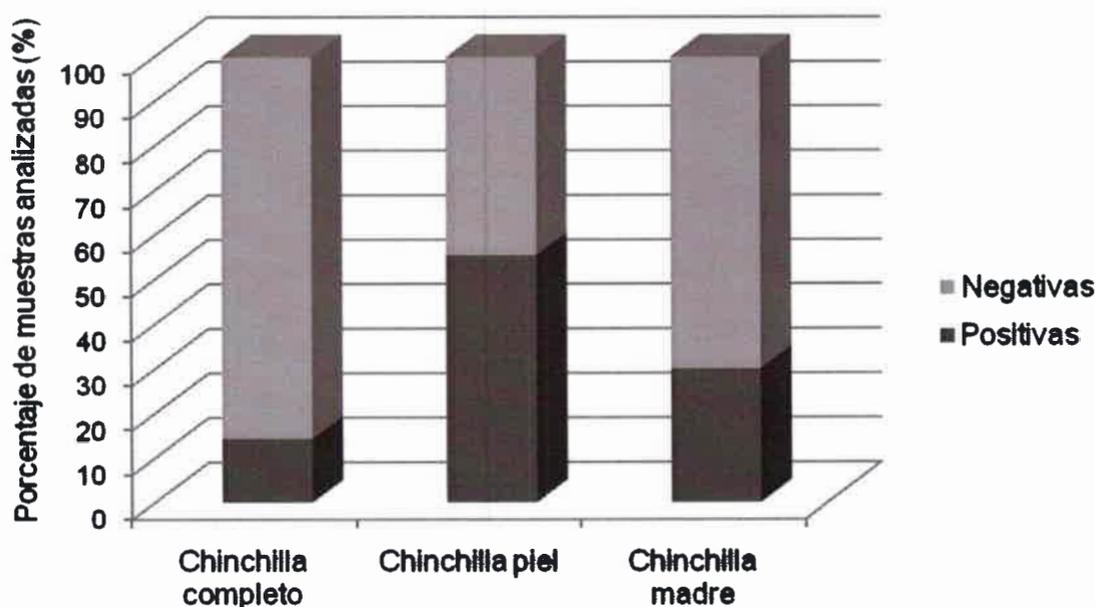


Figura 20. Porcentaje de muestras positivas y negativas de incidencia natural de ZEA en alimentos balanceados destinado a la cría de chinchillas

V.6.2. Incidencia natural de deoxinivalenol

Los tres tipos de alimentos balanceados analizados presentaron contaminación con DON. Como puede observarse en la Tabla 16, el alimento chinchilla piel presentó el mayor porcentaje de muestras contaminadas (77,8%), ninguna muestra superó el límite propuesto por el DOUE (2006). En cambio el alimento chinchilla completo tuvo

un elevado porcentaje de muestras contaminadas (60%), del cual el 16,7 % superó ampliamente dicho límite propuesto (Tabla 16). La mitad de las muestras del alimento chinchilla madre presentó contaminación con DON, y ninguna de las muestras correspondientes a este alimento analizado superó el límite propuesto.

Tabla 16. Deoxinivalenol ($\mu\text{g/g}$) en alimentos destinados a la cría de chinchillas

Tipo de alimento	DON ($\mu\text{g/g}$)			
	Muestras contaminadas (%)	Media	Muestras contaminadas (%) por encima de los límites (**)	Niveles min-máx
Chinchilla completo	60	2,62	16,7	0-22,7
Chinchilla piel	77,8	1,57	-	0-1,57
Chinchilla madre	50	1,19	-	0-1,19

- (**) Límite recomendado: 5 $\mu\text{g/g}$ (DOUE, 2006).

V.6.3. Co-ocurrencia de zearalenona y deoxinivalenol en alimentos destinados a la cría de chinchillas

Al realizar el análisis de la incidencia natural de las dos micotoxinas producidas por *F. graminearum* en las muestras de los alimentos suministrados a las chinchillas en los criaderos en estudio, se observó que el 80% de las muestras analizadas posee contaminación con al menos alguna de las dos micotoxinas.

El mayor porcentaje de muestras se encontraron contaminadas con DON (44%), y un 20% de las muestras estaban co-contaminadas con DON y ZEA ó, y el mismo porcentaje de muestras contaminadas sólo con ZEA. Del total de muestras analizadas, sólo un 16% presentó niveles no detectables de DON y ZEA con las técnicas utilizadas (Figura 21).

V.6.4. Sintomatología asociada con la presencia de deoxinivalenol y zearalenona en los criaderos de chinchillas

Durante el período de recolección de muestras en los criaderos de la localidad de Alcira Gigena, los productores informaron en distintas ocasiones que las chinchillas rechazaban el alimento, permanecían inmóviles en las jaulas, y algunas de ellas terminaban muriendo luego de unos días. Muchas de las chinchillas que presentaron

esta sintomatología padecían de una secreción blanquecina nasal, que se diagnosticó por un veterinario de la misma localidad como una neumonía.

En otras ocasiones, los mismos productores informaron dificultad de preñez en las hembras y en algunos casos se produjeron abortos. Sin embargo los productores no observaron alteraciones en las estructuras sexuales externas

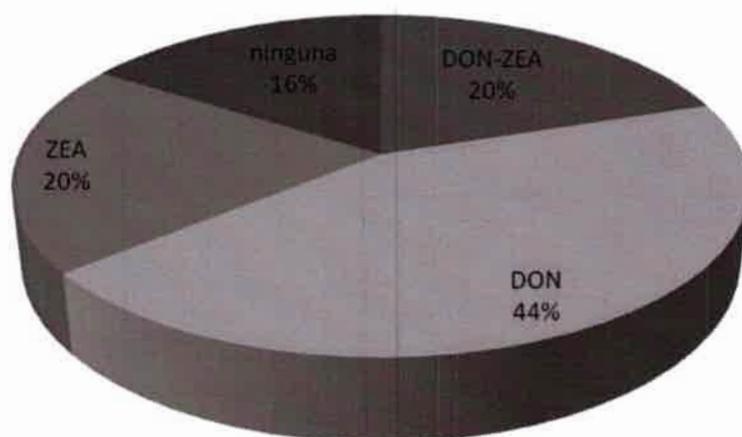


Figura 21. Porcentaje de muestras de alimentos destinados a la cría de chinchillas contaminadas con zearalenona y deoxinivalenol

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron alimentos balanceados destinados a la cría de chinchillas, las materias primas utilizadas en su elaboración y suplementos dietarios que complementan la dieta de éstos animales en granjas de producción de la zona de Río Cuarto y Alcira Gigena.

El análisis incluyó la determinación de la actividad acuosa de los alimentos y la caracterización de la micobiota toxicogénica. Se investigó la capacidad de las especies del género *Aspergillus* sección *Flavi* de producir AFB₁ y de las especies del género *Fusarium* de producir FB₁, además de estudiar la incidencia natural de AFs y FBs en los alimentos suministrados a los animales, y analizar los hígados de las chinchillas muertas sospechadas de padecer aflatoxicosis. Por otro lado, también se determinó la incidencia natural de ZEA y deoxynivalenol DON en muestras de alimentos balanceados consumidos por chinchillas sospechadas de padecer síntomas asociados a estas micotoxinas.

Los alimentos balanceados utilizados en la cría de chinchillas están elaborados a partir de forraje (alfalfa) y distintos granos, que incluyen cereales (trigo, cebada, avena) y oleaginosas (soja, girasol). La composición de los alimentos varía dependiendo el precio de las materias primas, pero la fórmula porcentual nutricional debe mantenerse para cumplir con los requerimientos de las chinchillas. El tamaño del pellet puede variar según la fábrica, sin embargo esto no influye en la calidad del mismo como sí lo hace el tamaño de la partícula que lo constituye, su naturaleza, sus características físico-químicas y la adhesión entre las mismas. Además, la temperatura y humedad durante los procesos de acondicionamiento, granulación y el almacenamiento interfieren en la calidad del pellet. La contaminación de alimentos y productos de cosecha con micotoxinas constituye un problema a escala mundial. La mayoría de los hongos crecen en los cereales y producen sus micotoxinas cuando las condiciones ambientales del sustrato le son favorables. En uno de los primeros reportes de la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (Food and Agriculture Organization, FAO), publicado en 1984, se informó que por lo menos el 25% de las reservas mundiales de granos están contaminadas por micotoxinas (Lawlor y Lynch, 2001). Los hongos presentes en los cultivos son capaces de producir sus toxinas en todas las etapas del procesamiento de los materiales: en el campo y durante la cosecha, el transporte, y el almacenamiento (Withlow y Hagler, 2002). El desarrollo de los métodos modernos de la agricultura, junto con el procesamiento de alimentos a gran escala, ha agravado el problema dando lugar a la aparición de micotoxicosis agudas y crónicas (Dutton, 1996). Además de los alimentos, los forrajes

procesados secos tales como los fardos de alfalfa también pueden aportar micotoxinas a las dietas de los animales, debido a que son sustrato de hongos productores de micotoxinas (Binder y col., 2007). Las condiciones de almacenamiento de las materias primas y alimentos son esenciales para prevenir el desarrollo de las especies fúngicas y la producción de micotoxinas, siendo la a_w y la temperatura los factores físicos más importantes. Se propuso un límite de a_w (0,615) para preservar la calidad higiénica de los alimentos balanceados para mascotas (Lowe y Kershaw, 1995). Si la a_w se mantuviera en niveles menores o cercanos a este valor, se podría inhibir el crecimiento fúngico o mantener por varios meses en niveles no riesgosos, tiempo en el cual se produce la comercialización y consumo de los mismos. En el presente estudio, los niveles de a_w obtenidos en las muestras no superaron el límite propuesto. No existen datos en la literatura acerca de la a_w en alimentos balanceados destinados a chinchillas; sin embargo, estudios previos confirman que el recuento fúngico total se incrementa a medida que los niveles de a_w aumentan en todos los alimentos balanceados destinados a la producción animal durante su almacenamiento (Gomez y col., 1997). Es así que se recomienda el control del contenido de humedad, para preservar la calidad higiénica de los alimentos balanceados y así prolongar su inocuidad y vida útil.

Los resultados obtenidos del recuento de la micobiota muestran que, 2 de los 3 alimentos balanceados ensayados, todas las materias primas y los suplementos dietarios sobrepasaron los límites recomendados (1×10^4). Así también más del 33% de las muestras de avena superaron el límite de UFC/g de alimento establecido por la GMP (2008) para asegurar la calidad higiénica de los alimentos. Los cubos de alfalfa que complementan la dieta de las chinchillas, presentaron el mayor recuento fúngico y, además un elevado porcentaje (80%) de las muestras estaban contaminadas y sobrepasaron el límite propuesto. Greco y col., (2012) estudiaron la micobiota en alimentos balanceados de chinchillas y conejos. Los autores analizaron un total de 42 muestras, de las cuales 17 correspondieron a alimento de conejo y 25 a alimento de chinchillas. Las muestras fueron recolectadas de 7 fábricas de las provincias de Mendoza, Buenos Aires, Córdoba, La Pampa y La Rioja. Los recuentos informados fueron $\leq 4,7 \times 10^5$ UFC/g y el 14% de las muestras analizadas sobrepasó el límite recomendado (GMP, 2008). Por otra parte, los recuentos obtenidos en este estudio, concuerdan con trabajos realizados por nuestro grupo de investigación en diferentes muestras de alimentos destinados a la producción de animales domésticos en los que se obtuvieron recuentos totales similares en dietas para pollos, cerdos y equinos en Argentina y Brasil (Dalcero y col. 1997, 1998, Magnoli y col. 2002, Rosa y col., 2006,

Keller y col., 2007, 2009, González Pereyra y col., 2008 a, 2009). Por el contrario, otros autores informaron recuentos fúngicos totales bajos, entre 10 y 100 UFC/g, en muestras de distintos alimentos balanceados comerciales para perros, gatos y aves provenientes de Portugal (Martins y col., 2003). Estudios realizados con muestras de cereales utilizados en la alimentación animal mostraron recuentos menores a 1×10^4 UFC/g (Abarca y col., 1994, Dalcerro y col., 1997, 1998, Accensi y col., 2004, Magnoli y col., 2002, 2005). Los valores menores de recuentos fúngicos y de porcentajes de contaminación obtenidos en los alimentos balanceados en relación a las materias primas y suplementos dietarios, permiten inferir que el proceso al cual se somete al alimento durante su elaboración, peleteado o extrusado con temperaturas entre 80 y 100 °C, disminuye el número de propágulos fúngicos y esporas viables. En estudios previos, se reportó un descenso significativo de recuentos fúngicos luego del proceso de peleteado (Chelkowsky, 1991, Dalcerro y col., 2002, Fraga y col., 2007). Los cubos de alfalfa elaborados por picado de la fibra y compresión, presentaron mayor contaminación que los pellets, probablemente debido a que durante su procesamiento no se utilizan temperaturas elevadas. Además, si bien el contenido de humedad es muy bajo en los cubos, el nivel de compactación es menor que en los pellets, por lo tanto puede quedar oxígeno entre las partículas favoreciendo el desarrollo de esporas fúngicas.

Los géneros fúngicos potencialmente toxicogénicos aislados en mayor proporción fueron *Aspergillus* spp y *Fusarium* spp, seguidos por *Penicillium* spp. Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios autores (Bragulat y col., 1994, Magnoli y col., 2002, Richard y col., 2007, Ghiasian y Maghsood, 2011) quienes han reportado que las especies pertenecientes a estos géneros constituyen la micobiota predominante en alimentos para animales domésticos. En los 3 tipos de alimentos balanceados se observó prevalencia de las especies del género *Aspergillus*, seguido por las especies de los géneros *Fusarium* y *Penicillium*, respectivamente. En relación a las materias primas, se observó predominancia del género *Aspergillus* en los pellets de alfalfa, mientras que en los de trigo y soja prevaleció el género *Fusarium*. En los suplementos dietarios, fueron dominantes especies del género *Aspergillus* en los cubos de alfalfa, y en la avena las del género *Penicillium*. La predominancia del género *Fusarium* en los pellets de trigo y de soja y en los cubos de alfalfa, con la reducida proporción de especies del género *Aspergillus* puede ser el resultado de un período de almacenamiento corto, lo cual favorece la prevalencia de los hongos de campo entre los cuales se incluye a cepas del género *Fusarium*. Greco y col., (2012) analizaron muestras de alimentos destinados a la cría de chinchillas y conejos e

identificaron especies prevalentes aquellas perteneciente a los géneros *Aspergillus*, seguido por especies de *Penicillium* y *Fusarium*. Campos y col., (2008 a, b) encontraron prevalencia elevada de especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium* en alimentos de diferentes calidades para perros. Bueno y col. (2001) informaron que las especies del género *Aspergillus* predominan en alimentos balanceados para perros y gatos en la Argentina. En una investigación realizada en Reino Unido, Scudamore y col., (1997) informaron predominancia *Penicillium* y *Eurotium* en alimentos balanceados para animales domésticos y para aves silvestres, mientras que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* han sido reportados como prevalentes en alimentos balanceados para perros en Portugal (Martins y col., 2003). Meireles y col., (1994) informaron que especies de *Fusarium* constituyen la micoflora toxicogénica de alimentos para equinos, seguido por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos últimos, fueron informados como géneros prevalentes en alimentos balanceados destinados a conejos, cerdos, vacunos y aves (Abarca y col., 1994, Dalcerro y col., 1997, 1998, 2002, Magnoli y col., 1998, 1999, 2002, 2005, González- Pereyra y col., 2008 b).

Aspergillus flavus y *F. verticillioides*, fueron las especies predominantes aisladas de todos los tipos de alimentos balanceados de chinchillas, materias primas y suplementos dietarios analizados en este trabajo. Estos resultados concuerdan con numerosos estudios que encontraron a la especie *A. flavus* como predominante en muestras de cereales y distintos alimentos (Sanchis y col., 1993, Adebajo y col., 1994, Pitt y col., 1994, Pitt y Hocking, 1997, Accensi y col., 2004, Saleemi y col., 2010). Las especies pertenecientes al género *Aspergillus* son parte de la microbiota presente con frecuencia durante el almacenamiento de sustratos a bajas a_w , tales como granos y mezclas de alimentos. En el presente estudio las especies con mayor frecuencia de aislamiento fueron caracterizadas como especies moderadamente xerofílicas (*A. flavus*), y levemente xerofílica (*A. fumigatus*) (Lacey y Magan, 1991). Las cepas de *A. fumigatus* fueron aisladas en bajo porcentaje pero su sola presencia representa un doble riesgo. Por un lado la ingesta de sus esporas puede producir aspergilosis pulmonar, y por otra parte puede afectar la salud de los animales y de las personas que estén en contacto con las micotoxinas que produce tales como la gliotoxina, fumigaclavina A, fumigaclavina C y diferentes fumitremorgenos (Dos Santos y col., 2003, Boudra y Morgavi, 2005). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que *F. verticillioides* fue claramente la especie predominante en alimentos balanceados, materias primas y suplementos dietarios para el desarrollo de las chinchillas. *F. proliferatum*, fue la segunda especie más aislada mientras que *F.*



oxysporum fue aislado en menor proporción de los alimentos destinados a chinchilla piel y chinchilla madre, respectivamente. En coincidencia con nuestros resultados, *F. verticillioides* es la especie más aislada en alimentos para aves (Oliveira y col., 2007) y en materias primas y alimentos para mascotas (Campos y col., 2008 a, b). La prevalencia de *F. verticillioides* también se ha informado en alimentos destinados a animales domésticos en Argentina, Brasil y México, sin embargo la frecuencia de aislamiento de *F. verticillioides* en nuestro país es más elevada con relación a la descrita en Brasil y México (Dalcero y col., 1998, Magnoli y col., 1998, Oliveira y col., 2007, Bucio Villalobos y col., 2003). Greco y col., (2012) encontraron a *A. flavus* como especie predominante en alimentos de chinchillas y conejos, seguida por las especies *A. parasiticus*, *A. candidus*, *A. flavipes*, *A. penicillioides* y *A. versicolor*, y por último las especies *A. terreus* y *A. niger*. Los autores informaron prevalencia elevada de la especie *F. proliferatum* seguida en segundo lugar por la especie *F. subglutinans*. Esta última especie, no es considerada de importancia en la contaminación natural de los alimentos a base de maíz destinados al consumo humano y animal y, se ha indicado como productora de dos toxinas re-emergentes: fusaproliferina y beauvericina (Torres y col., 2001, Reynoso y col., 2004). Por otra parte en el presente estudio, un porcentaje moderado de las muestras de los alimentos balanceados y suplementos dietarios de chinchillas analizados, mostraron contaminación con especies monoverticiladas, no productoras de micotoxinas del género *Penicillium*. Por el contrario Greco y col., (2012) identificaron un mayor número de especies prevalentes del género *Penicillium* en alimentos de chinchillas y conejos como *P. expansum*, *P. brevicompactum*, *P. roqueforti*, *P. olsonii*, *P. funiculosum* muchas de ellas consideradas toxicogénicas. El estudio de la microbiota presente en muestras de alimentos destinados a animales es una herramienta de utilidad para estimar las micotoxinas podrían estar presentes en la ración o en sus materias primas, en base a las especies fúngicas encontradas. Sin embargo, es de interés destacar que no siempre hay una correlación positiva entre la presencia del hongo y la contaminación con micotoxinas dado que las toxinas son resistentes a las condiciones de procesamiento y almacenamiento pudiendo persistir una vez que el hongo haya desaparecido. Algunos investigadores resaltan la importancia de la determinación de la microbiota para proveer información sobre las micotoxinas pueden estar presentes en el sustrato (Dalcero, y col., 1997, 1998, Magnoli y col., 1999, 2002).

Basalan y col., (2004), propusieron que ninguna de las muestras de alimentos balanceados peleteados para perros debería contener esporas y/o propágulos fúngicos. Lo mismo debe postularse para los alimentos balanceados pelleteados para

chinchillas y animales en general. Los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios, incluido el presente, muestran que esta premisa es difícil de lograr en términos prácticos, debido a que las esporas son capaces de sobrevivir a los procesos de manufactura, extrusión y pelleteado, llevados a cabo para lograr el alimento balanceado. Por lo tanto, es importante controlar la presencia de hongos toxicogénicos, donde el aislamiento de un solo propágulo y/o espora de este tipo de hongos determina un riesgo toxicológico potencial. En consecuencia, destaca la importancia de realizar además del recuento fúngico total, la identificación de las especies fúngicas aisladas. En general, la mayoría de las especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* identificadas en las muestras de materias primas estuvieron presentes también en los alimentos terminados.

Un elevado porcentaje de cepas de *A. flavus* aisladas de las muestras de alimentos balanceados y materias primas fueron capaces de producir AFB₁. Campos y col., (2008 b) informaron porcentajes similares de cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* capaces de producir AFB₁ en alimentos de mascotas de elaboración comercial de diferentes calidades. Este es el primer trabajo donde se reporta la capacidad aflatoxicogénica de cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* aisladas de alimentos balanceados para chinchillas. En otros insumos para animales domésticos, se informaron porcentajes menores (47 y 21%) de cepas de *A. flavus* productoras de aflatoxinas (Magnoli y col., 1998, Fraga y col., 2007). Numerosos estudios realizados en países tales como Italia, Francia, Dinamarca, España y Brasil, han mostrado que *F. verticillioides* es la especie aislada con mayor frecuencia de los granos de maíz durante la etapa a campo, en el cereal cosechado y en los alimentos a base de maíz (Bottalico y col., 1989, Doko y col., 1996, Castella y col., 1999, Kpodo y col., 2000). Sin embargo, no existen datos en la literatura sobre la capacidad toxicogénica de cepas de *F. verticillioides* aisladas de alimentos balanceados para chinchillas. El porcentaje de cepas de *F. verticillioides* productoras de FB₁ detectadas en este estudio fue elevado y similar a lo informado previamente en otros alimentos balanceados para animales de producción (Magnoli y col., 1999).

Los 3 tipos de alimentos balanceados para chinchillas y los cubos de alfalfa presentaron contaminación con AFB₁. El alimento chinchilla piel y los cubos de alfalfa además, presentaron un porcentaje de muestras que superaron el límite propuesto (20 ng/g) (GMP, 2008). Greco y col., (2012) analizaron la incidencia natural de diferentes micotoxinas en alimentos de chinchillas y conejos. Los autores informaron que el 100% de las muestras analizadas estaban contaminadas con AFs en niveles que variaron de 1,70 a 22,5 ng/g, siendo la concentración media 7,26 ng/g. Campos y col.

(2008 a) encontraron valores mayores a 20 ng/g en muestras de harina de maíz y pellet de sorgo, mientras que no detectaron niveles de AFs en alimentos balanceados para perros. Maia y Pereira Bastos de Sequeira (2002) en Brasil, mientras que Gunsen y Yaroglu (2002) y Basalan y col. (2004) en Turquía, encontraron muestras de alimentos comerciales para perros y gatos contaminadas con AFB₁, en concentraciones menores a 20 ng/g. En Gran Bretaña, Scudamore y col. (1997) informaron porcentajes de muestras de insumos para gatos que contenían niveles bajos de AFs. En contraste, Sharma y Marquez (2001) en México, reportaron un 88% de muestras de insumos para mascotas contaminadas con niveles elevados de AFs, alguna de las cuales llegaron a mostrar concentraciones de 59 y 72 ng/g. El alimento balanceado para aves fue descrito como el más contaminado entre diferentes tipos de alimentos para animales, pudiendo atribuirse al uso de porcentajes elevados de granos de cereales y frutos de oleaginosas en la elaboración de estos insumos (Scudamore y col., 1997, Henke y col., 2001, Maia y Pereira Bastos de Sequeira, 2002).

Todos los tipos de alimentos y suplementos dietarios analizados en este estudio, presentaron contaminación con FB₁, y los 3 tipos de alimentos balanceados que constituyen la base de la dieta de las chinchillas mostraron un porcentaje reducido de muestras que superaron el límite propuesto (5 µg/g) (DOUE, 2006). Greco y col., (2012) determinaron que el 100% de las muestras de alimentos balanceados de chinchillas y conejos analizadas estaban contaminadas con FBs, en niveles de 222 a 6000 ng/g.

En muestras de alimentos a base de maíz para diferentes especies animales (aves, cerdos y conejos) provenientes de nuestra región (provincia de Córdoba), la FB₁ fue detectada en un porcentaje elevado de muestras (97%), en concentraciones entre 136 y 270 ng/g (Magnoli y col., 2002). Hopmans y Murphy (1993) informaron la presencia de FB₁ en alimentos comerciales para perros en niveles de 219 a 1410 ng/g de alimento. Por el contrario, Martins y col., (2003) encontraron en el mismo sustrato un porcentaje reducido de muestras de alimentos balanceados contaminados con FB₁ (15%) en concentraciones bajas (12 a 24 ng/g). Scudamore y col., (1997) observaron que el 30% de las muestras de alimentos para aves contenían FB₁ en niveles mayores a los observados en este trabajo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que existió una asociación positiva entre la presencia de especies potencialmente toxicogénicas (*A. flavus* y *F. verticillioides*) en los alimentos balanceados destinados a chinchillas, la capacidad de las especies del género *Aspergillus* sección *Flavi* y las especies del

género *Fusarium* de producir AFB₁ y FB₁ respectivamente, y la contaminación de estos alimentos con dichas micotoxinas. Si bien, la presencia de hongos toxicogénicos en alimentos destinados a animales o en materias primas no implica necesariamente toxicidad, en el presente trabajo las especies *A. flavus* y *F. verticillioides* fueron aisladas de las materias primas, luego de los alimentos balanceados, y sus micotoxinas se encontraron presentes en éstos últimos. Además, cada alimento puede ser infectado por más de una clase de hongos y cada uno de ellos puede producir diferentes toxinas. En consecuencia, varias toxinas fúngicas pueden co-ocurrir simultáneamente dependiendo de las condiciones ambientales y del sustrato, por lo tanto, los individuos se encuentran frecuentemente expuestos a mezclas de estas micotoxinas.

Los efectos biológicos de las toxinas fúngicas dependen de la cantidad ingerida, del número, tiempo de exposición y de la sensibilidad del animal. La ingesta combinada puede causar más efectos adversos que la presencia de una sola micotoxina debido a las interacciones aditivas o sinérgica de sus efectos (Koshinsky y Khachatourians, 1992).

La observación del color y tamaño de los hígados de chinchillas sacrificadas por llegar a su momento de madurez, no exhibieron cambios macroscópicos considerables, y el estudio histopatológico mostró hígados estructuralmente normales. Vale aclarar que, las chinchillas sacrificadas consumieron el alimento que fue analizado, cuyas muestras presentaron contaminación con especies fúngicas potencialmente toxicogénicas, las cuales fueron capaces de producir sus micotoxinas, y éstas últimas fueron detectadas en los mismos alimentos. Aquellas chinchillas que murieron ocasionalmente, presentaron anorexia y decaimiento en las horas previas, y sus hígados presentaron una coloración pálida. Los estudios histopatológicos de los hígados de estas chinchillas revelaron cambios leves a moderados, y en pocos casos se observó degeneración grasa intensa difusa, con marcados signos de necrosis de predominio periportal. La mayor parte de los casos de micotoxicosis agudas informados actualmente en la industria peletera de chinchillas se atribuye a la ingesta de alimentos contaminados con AFs. Sin embargo, recordando el episodio ocurrido en uno de los criaderos de la localidad de Alcira Gigena en el año 2011 mientras transcurría ésta investigación, se produjeron muertes de chinchillas cuya sintomatología era compatible con una intoxicación aguda por AFs. Los alimentos que estaban siendo suministrados durante el episodio fueron retirados y analizado en relación a la incidencia de AFB₁. Si bien estos últimos no presentaron contaminación con niveles detectables de AFs, un elevado porcentaje (65%) de las muestras

analizadas estaban contaminadas con FB_1 en niveles (1,1- 7,2 $\mu\text{g/g}$) que en algunos casos superaron el límite propuesto (5 $\mu\text{g/g}$) (DOUE, 2006). En cerdos la FB_1 puede causar hepatotoxicidad, la cual induce la remoción de fragmentos de la membrana al torrente sanguíneo provocando una intensa respuesta de los macrófagos en los pulmones. Además, esta micotoxina en cerdos inhibe la N-acetiltransferasa generando alteraciones hepáticas, necrosis y degeneraciones progresivas que inhiben la síntesis protéica, la ganancia de peso y la performance del animal, terminando en una falla multiorgánica que desencadena la muerte (Cheeke 1998, Hunssein y Brassel 2001). Probablemente el episodio de muertes en el criadero de Alcira Gigena haya estado relacionado por la contaminación del alimento consumido por la chinchillas con FB_1 . Cepeda y col. (2011) realizaron un estudio sobre la sensibilidad de las chinchillas a las AFs para determinar los síntomas provocados por estas micotoxinas en la especie de roedor *Chinchilla lanígera*. Sólo con la dosis más elevada (200 ng/g) y luego de 8 semanas de exposición observaron disminución en la ganancia de peso y alteraciones hepáticas leves a moderadas. Los resultados obtenidos por estos autores difieren mucho de los casos reales que se presentan periódicamente en los criaderos de chinchillas. González Pereyra y col. (2008 a), diagnosticaron una intoxicación aguda en un criadero de chinchillas de la zona de Río Cuarto (Córdoba) que causó la muerte de 200 chinchillas. En este estudio el consumo de alimento balanceado contaminado con niveles de AFB_1 fue muy superior ($212 \pm 8.48 \text{ ng/g}$) a los límites establecidos en las reglamentaciones vigentes (20 ng/g) (GMP, 2008). El estudio macro y microscópico por necropsia e histopatología de los hígados de 9 chinchillas corroboró que la muerte de las mismas se produjo por una aflatoxicosis aguda (González Pereyra y col., 2008 a).

Entre las micotoxinas del género *Fusarium*, la ZEA y el DON son de especial importancia, ya que son producidas en el campo y su ocurrencia depende principalmente de las condiciones meteorológicas, no pudiendo ser controladas completamente por estrategias de producción. El trigo y maíz son especialmente vulnerables a la infección por *Fusarium* y consecuentemente son los más propensos a la contaminación con ZEA y DON en comparación con otros granos de cereales (Döll y Dänicke, 2011). Si bien no se encontró la especie productora de estas micotoxinas en las materias primas, en los alimentos ni suplementos dietarios suministrados a las chinchillas en los criaderos, se presentaron síntomas de micotoxicosis asociados a estas toxinas en los animales de los establecimientos estudiados, y por esta razón se analizó la incidencia natural de ZEA y DON. Los resultados confirmaron la presencia de las mismas en los alimentos administrados a las chinchillas en los criaderos. Los 3

tipos de alimentos balanceados presentaron contaminación con ZEA en niveles que superaron el límite propuesto (0,5 µg/g) y además, todos los alimentos presentaron contaminación con DON e incluso, un 16 % de las muestras del alimento chinchilla completo superó el límite propuesto (5 µg/g) (DOUE, 2006). Ambas micotoxinas co-ocurrieron en un 20 % de las muestras analizadas. En base a estos resultados se podría atribuir que el rechazo de alimento, infecciones producidas por el deterioro del sistema inmune, los problemas asociados con la preñez así como también los abortos y muertes de chinchillas que se observaron en el criadero de Alcira Gigena, probablemente estuvieron asociados a la presencia de ZEA y DON en los alimentos consumidos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los obtenidos por Greco y col., (2012), quienes encontraron que el 100 % de las muestras de alimento balanceado de chinchillas y conejos analizados estaban contaminadas con ZEA, en niveles que variaron desde < 0,05 a 0,17 µg/g, mientras que el 95 % de los alimentos presentaron niveles de DON entre 0,2 y 1,7 µg/g. Si bien los autores mostraron elevados porcentajes de contaminación, los resultados difieren de los obtenidos en este estudio en que los niveles de estas micotoxinas no superaron los límites recomendados por el Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE, 2006). No existe en la bibliografía información acerca de la susceptibilidad de las chinchillas a ZEA y DON. Entre los animales de granja, el cerdo es la especie más sensible, produciendo disminución voluntaria en consumo de alimento en el caso de DON, e hiperestrogenismo y trastornos en la fertilidad en el caso de ZEA. Los rumiantes y aves de corral se consideran menos sensibles (Dänicke, 2002, EFSA, 2004 a, b, Seeling y Dänicke, 2005, Dänicke y col., 2008) a estas toxinas de *Fusarium* spp. Todas las especies animales evaluadas hasta la fecha son susceptibles a DON siendo el cerdo más sensible que los ratones, y estos últimos más sensibles que las ratas, mientras que las aves y rumiantes se encuentran en el mismo orden de susceptibilidad. Las diferencias en el metabolismo, la absorción, la distribución, y la eliminación de DON entre las especies animales podría explicar esta sensibilidad diferencial (Pestka, 2007). Para causar mortalidad o daño tisular definido en los animales experimentales se necesitan concentraciones elevadas de DON (≥ 27 mg/kg de peso corporal), mientras que la exposición a dosis relativamente bajas (≥ 50 µg/kg de peso corporal) puede causar vómitos en cerdos y en especies sensibles (Pestka, 2007). Distintas alteraciones en animales pueden ser atribuidas al consumo de alimentos contaminados con ZEA ó DON, pero la intensidad de los efectos pueden ser dependientes tanto de las concentraciones de las toxinas en el alimento, como así también de la proporción pudiendo producirse sinergia entre ellas. Los efectos

observados en los experimentos utilizando toxinas puras pueden ser distintos a los observados en los experimentos utilizando granos contaminados naturalmente, incluso utilizando concentraciones similares (Dänicke y col., 2000). En muchos casos, cuando las dietas están contaminadas con una sola toxina las interacciones entre DON y ZEA no se pueden determinar con precisión. Esto puede deberse a la posible presencia de toxinas de *Fusarium* no analizadas o no identificadas, que pueden tener modos de acción similar o incluso diferente. La ZEA afecta la reproducción de cerdos más seriamente debido a su actividad estrogénica, mientras que el DON afecta la reproducción en los cerdos a través de efectos indirectos como la reducción de la ingesta de alimento, lo que resulta en un deterioro de la función de órganos vitales como el hígado y el bazo (Tiemann y Dänicke, 2007). Es importante destacar que, antes que las toxinas puedan modificar los procesos metabólicos es necesario que los alimentos sean voluntariamente consumidos por el cerdo. Los datos informados en la literatura indican que los efectos adversos que producen las dietas contaminadas con DON sobre el crecimiento de los cerdos es causado principalmente por el consumo voluntario del alimento (Rotter y col., 1994, Swamy y col., 2002, Goyarts y col., 2005). Las micotoxinas alteran en conjunto los procesos metabólicos y por lo tanto influyen en la salud y la fertilidad / reproducción de los animales que las consumen.

Si bien la literatura científica ofrece una amplia variedad de información sobre los efectos que producen las micotoxinas individuales en diferentes especies de animales, generalmente estas co-ocurren en las matrices naturales y alimentos procesados. Por ejemplo, la AFB₁ y FB₁, así como el DON u otros tricotecenos (uno o más de ellos) y ZEA suelen co-ocurrir en el mismo grano. Además, en el proceso de fabricación de alimentos balanceados, diversos lotes de diferentes materias primas se mezclan entre sí produciendo una nueva matriz con un nuevo perfil de riesgo. La disminución de los rendimientos en la producción animal pueden deberse a la aparición de síntomas por las interacciones sinérgicas entre múltiples micotoxinas. Los estudios científicos sobre dichos efectos en niveles de toxicidad aguda describen combinaciones de AFs con diversos tricotecenos, así como ocratoxinas con FBs, como también combinaciones de FBs y DON. Sin embargo, poco se sabe de los efectos de las micotoxinas en el rango de contaminación con dosis sub-aguda y de combinaciones con más de dos toxinas (CAST, 2003, Erber y Binder, 2004, Binder, 2007). La co-ocurrencia de las toxinas fúngicas puede ser una explicación a las divergencias descritas en la literatura científica en cuanto a los efectos generados por distintos niveles de micotoxinas purificadas. Los alimentos contaminados naturalmente, pueden contener niveles bajos de múltiples toxinas, por lo que una

toxina específica puede estar asociada con efectos más graves. Las reacciones biológicas después de la ingestión de una micotoxina o una combinación de las estas, varían desde una micotoxicosis aguda con elevada morbilidad y muerte a trastornos insidiosos crónicos con disminución de la productividad de animales. Afortunadamente, los niveles de contaminación en los alimentos balanceados para animales no son en general lo suficientemente elevados como para causar una enfermedad manifiesta, pero puede dar lugar a pérdidas económicas a través alteraciones del sistema inmune, el crecimiento y la producción (Hamilton, 1982, Bryden, 2012). A nivel mundial, las micotoxinas tienen impacto sobre la salud humana y animal, con fuertes implicancias económicas y comerciales (Wu, 2004, Bryden, 2007, Wild, 2007, Wild y Gong, 2010).

VII. CONCLUSIONES

En base a las hipótesis planteadas y a los resultados obtenidos se concluye que:

- ✓ *Los alimentos balanceados, las materias primas, y los suplementos dietarios utilizados en la cría de chinchillas, presentan baja calidad higiénica considerando que los recuentos fúngicos superaron el límite establecido para garantizar la seguridad micotoxicológica de los alimentos.*
- ✓ *Los géneros con especies toxicogénicas principalmente aislados de materias primas y raciones utilizadas en la alimentación de chinchillas fueron *Aspergillus* y *Fusarium*, siendo las especies de mayor incidencia *A. flavus* y *F. verticillioides*. Un elevado porcentaje de estas cepas aisladas fueron capaces de producir aflatoxina B₁ (AFB₁) o fumonisina B₁ (FB₁).*
- ✓ *Los alimentos balanceados presentaron contaminación con AFB₁ y FB₁ con niveles que superaron los límites recomendados. La contaminación de los alimentos fue más elevada con FB₁ que con AFB₁.*
- ✓ *Las dietas suministradas a las chinchillas con sintomatología asociada a una micotoxicosis por zearalenona (ZEA) y/o deoxynivalenol (DON), presentaron contaminación con estas toxinas fúngicas, y en algunas muestras no solo superaron los límites sino que hubo una co-ocurrencia de las mismas.*



VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G., Cabañes F.J. (1994). Microflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. *J. Food Prot.*, 57: 256-258.
- Abbas H.K. (Ed.) (2005). Aflatoxin and food safety. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. Pág. 585.
- Accensi F., Abarca M.L., Cabañes F.J. (2004). Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce Ochratoxin A. *Food Microbiol.*, 21: 623-627.
- Adebajo L.O., Idowu A.A., Adesanya O.O. (1994). Mycobiota and mycotoxins production in Nigeria corn and corn-based snacks. *Mycopathologia* 126: 183–192.
- Alcalá L., Muñoz P., Peláez T., Bouza E. (2010). *Aspergillus* y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
- Aleandri, F (2002). Cría y comercialización de la chinchilla. Compendio actualizado, 3° edición.
- Aleandri, H. (2011). El portal de la chinchilla. (<http://www.chinchilla.com.ar/2011.htm>).
- Aleandri, F. (2012). El portal de la chinchilla. (<http://www.chinchilla.com.ar/furor.htm>).
- Allcroft R., Canagham, R.B.A., (1963). Groundnut toxicity: an examination of toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.* 75: 259-263
- AOAC International (1995). Official Methods of Analysis, 16th ed.; AOAC International: Arlington, VA; Vol. 1.
- Arseniuk E., Scharen A. L., Czembor H.J. (1991). Pathogenicity of seed transmitted *Fusarium* spp. to triticole seedlings. *Mycot. Res.*, 7: 121-127.
- Avantaggiato G., Havenaar R., Visconti A. (2003). Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food Chem. Toxicol.*, 41:1283-1290.
- Basalan M., Hismiogullari S.E., Hismiogullari A.A., Filazi A. (2004). Fungi and aflatoxin B1 in horse and dog feeds in Western Turkey. *Revuede Medicina Veterinária*, 156: 248-252.
- Bennett J.W., Papa K.E. (1988). The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Adv. Plant Pathol.*6: 263-280.
- Bennett, J.W., Klich M., (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 497–516
- Binder E.M., (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim. Feed Sci. Tech.* 133: 149-166.

- Binder E.M., Tan L.M., Chin L.J., Handl J., Richard J., (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and ingredients. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 137: 265-282.
- Booth, C., (1971). The genus *Fusarium*. Kew. Commonwealth Mycological Institute.
- Bottalico, A., Lerario, P., Visconti, A. (1983). Production of mycotoxins (zearalenona, trichotecenes and moniliformin) by *Fusarium* species in Italy. *Microb. Alim.Nut.* 1: 133-142.
- Bottalico A., Visconti A., Logrieco A., Solfrizzo M., Mirocha C.J., (1985). Occurrence of zearalenols (diastereomeric mixture) in corn stalk rot and their production by associated *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 547 – 551.
- Bottalico, A., Logrieco, A., Riviaccio, S., Ricci, V. (1987). Seedborne *Fusarium moniliforme* Sheldon in relation to corn stalk rot incidence in Southern Italy. Mycotoxin Research. European Seminar "Fusarium - Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity". Warsaw, 15-16.
- Bottalico A., Logrieco A., Visconti A., (1989). *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. *Mycopathologia.* 107: 85-92.
- Boudra H y Morgavi DP. (2005). Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Anim.Feed Sci. Tech.*, 120: 113-123.
- Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella O., Cabañes J. (1995). Mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. *J. Sci. Food Agricul.* 67: 215-220.
- Bryden W.L., (2007). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 16 : 95–101.
- Bryden W.L. (2009). Mycotoxins and mycotoxicoses: significance, occurrence and mitigation in the food chain. In: Ballantyne, B., Marrs, T., Syversen, T. (Eds.), *General and Applied Toxicology*. (third ed). John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 3529–3553.
- Bryden W.L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 173:134– 158.
- Bucio Villalobos CM, Martínez OA, Morales González RH. (2003). Contaminación con Hongos en Maíz Recién Cosechado en el Estado de Guanajuato durante el año 2003. Pp 425-431, Memorias del VII congreso nacional de Ciencia de los Alimentos y II Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato. México, 484.
- Bueno D.J., Silva J.O., Oliver G. (2001). Mycoflora in commercial pet foods. *J. Food Prot.*, 64: 741-743.

- Burgess L.W. (1981). General ecology of the Fusaria. In *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* Edited by Nelson P. E., Toussoun T. A. and Cook R. J. University Park: The Pennsylvania State University.
- Campos G.S., Cavaglieri L.R., Fernández- Juri M.G., Krüger C., Dalcero A.M., Magnoli C., Rosa C.A.R. (2008 a). Mycoflora and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 92: 377-383.
- Campos S.G., Cavaglieri L.R., Krüger C., Fernández Juri M.G., Dalcero A.M., Magnoli C.E., Rosa C.A.R. (2008 b). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins in commercial ready pet food in Brazil. *World Mycotoxin J.*, 2: 85-90.
- Carrillo, L., (2003). Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. 1 ed. Salta , 1:165.
- Cary J.W., Klich M.A., Beltz S.B., (2005). Characterization of aflatoxin producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, 97: 425-432.
- Cary, J.W., Ehrlich, K.C., (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*, 162: 167-177.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (1989). Mycotoxins: Economic and Health Risks. Task Force Report No. 116. Ames, Iowa.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report N°139, Ames, Iowa, USA.
- Castella G, Bragulat MR y Cabañes F.J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based and cereals from Spain. *J. Agricul. Food Chem.*, 47:4707-4710.
- Cepeda S.A, Diaz G.G, Murcia H.G. (2011): Aflatoxicosis in chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Rev. MVZ Cordoba* 16: 2356-2363.
- Cheeke P.R., (1998). Natural Toxicants in Feeds and Poisonous Plants, 2nd ed Interstate Publishers, Danville, United States, 116–122.
- Chelkowski J. (1991). Mycological quality of mixed feeds and ingredients. En: Chelkowski, J. (Ed.). Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage, 217-227. Elsevier, Amsterdam.
- Chelkowski J., (1998). Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.), Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel- Hong Kong, 45–64.
- Chulze S., Ramirez M.L., Farnochi M.C., Michelangelo P., Visconti A., March G. (1996). *Fusarium* and fumonisins occurrence in argentinian corn at different year maturity. *J. Agri. Food Chem.*, 44: 2797-2801.
- Clark J.D., Green C.E., Calpin J.P., Hatch R.C., Jain A.V. (1986). Induced Aflatoxicosis in rabbits: blood coagulation defects. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 86: 353-361.

- Dalcero A., Magnoli C., Chiacchiera S., Palacios G., Reynoso M., (1997). Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 137:179-184.
- Dalcero A., Magnoli C., Luna M., Ancasi G., Reynoso M.M., Chiachiera S., Miazzo R., Palacio G., (1998). Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 141, 37-43.
- Dalcero A., Magnoli C., Hallak C., Chiacchiera S.M., Palacio G., Da Rocha Rosa C.A. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Addit. Contam.*, 19: 1065-1072.
- Dänicke S., Valenta H., Ueberschär K.H.,(2000). Risikoabschätzung und Vermeidungsstrategien bei der Fütterung. In: Hrsg. S. Dänicke und E. Oldenburg, Risikofaktoren für die Fusariumtoxinbildung und Vermeidungsstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Fütterung. *Landbauforsch Völk Sonderheft* 216: 35–138.
- Dänicke S., (2002). Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: a European view. *World's Poultry Sci. J.* 58: 451–474.
- Dänicke S., Brüssow K.-P., Valenta H., Ueberschär K.-H., Tiemann U., Schollenberger M., (2005). On the effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 932–943.
- Dänicke S., Döll S., Goyarts T., Valenta H., Ueberschär K.H., Flachowsky G., (2008). Zur Beurteilung des Vorkommens der *Fusarium*-Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) sowie ihrer Metaboliten in physiologischen Substraten des Schweins. *Tierärztl Praxis* 36: 35–47.
- Davis N.D., Deiner U.L., (1983). Some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In: U.L Diener, R.L. Asquith and J.W. Dickens (Eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn. Southern Coop Series Bull. 279, Craftmaster, Opelika, Ala.
- Desjardins A.E. (2006). *Fusarium* mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Díaz C.G., Heredia A.M., Presello D.A., Iglesias J., Lori G.A. (2008). *Fusarium* sección *Liseola*: especies biológicas asociadas a la podredumbre de mazorca de maíz en el Noroeste argentino. 1º Congreso Argentino de Fitopatología. CD: HET-54. Ciudad de Córdoba. Córdoba. 28-30 de mayo.

- Do, J.H., Choi, D. (2007). Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotech. Bioproc. Eng.* 12: 585-593.
- Doko B., Rapior S., Visconti A., Schjoth J., (1995). Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agricul. Food Chem.* 43: 429-434.
- Doko M.B., Canet C., Brown N., Sydenham E.W., Mpuchane S., Siame B.A. (1996). Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereals based foods from eastern and southern Africa. *J. Agricul. Food Chem.*, 44: 3240-3243.
- Döll, S., Dänicke, S. (2011). The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Prev. Vet. Med.* 102: 132– 145.
- Dos Santos V.M., Dorner J.W., Carreira F. (2003) Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia.* 156: 133-138.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea) (2003). Reglamento (CE) N° 2174/2003 de la Comisión de 12 de diciembre de 2003 que modifica el reglamento (CE) N° 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L285, 33-37.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea) (2006). Recomendación de la Comisión de 17 de Agosto de 2006 sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ochratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal. L229, 2006/576/EC, publicado 23-08-2006.
- Dutton M.F., (1996). Fumonisin: mycotoxins of increasing importance . Their nature and their effects. *Pharmacol. Therapeut.* 70: 137-161.
- Eaton, D.L., Gallagher, E.P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Ann.Rev. Pharm. Toxicol.* 34: 135-172.
- EFSA, (2004 a). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* 73: 1–41, Available from: <http://www.efsa.eu.int/>.
- EFSA, (2004 b). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* 89: 1–35, Available from: <http://www.efsa.eu.int/>.
- EMAN (European Mycotoxin Awareness Network) (2007). Diponible en la página web: <http://www.mycotoxins.org/>.

- Erber E., Binder E.M., (2004). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. In: The 5th Korea Feed Ingredient Association International Symposium, Korea Feed Ingredient Association, Seoul, Korea, July 16, 21–45.
- Eriksen G.S., Pettersson H., Johnsen K., Lindberg J.E., (2002). Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 56: 263–274.
- Eriksen G.S., Pettersson H., Lindberg J.E., (2003). Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 57: 335–345.
- Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A., and Chulze S. (1999). Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1, in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia*, 147:37-41.
- Ferguson L.R., Philpott M. (2008). Nutrition and mutagenesis. *Ann. Rev. Nut.*, 28: 313–29.
- Fink-Gremmels, J., Malekinejad, H., (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim.Feed. Sci. Technol.* 137: 326–341.
- Fitzpatrick D.W., Picken C.A., Murphy L.C., Buhr M.M., (1989). Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and β -zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp. Biochem. Physiol.* 94: 691–694.
- Fraga M.E., Curvello F.A., Gatti M.J., Cavaglieri L.R., Dalcerro A.M., Rosa C.A.R. (2007). Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. *Vet. Res. Commun.*, 31: 343- 353.
- Friend D.W., Trenholmt H.L., Thompson B.K., Hartin K.E., Fiser P.S., Asem E.K., Tsang B.K. (1990). The reproductive efficiency of gilts fed very low levels of zearalenone. *Can. J. Anim. Sci.* 70: 635-645.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A., Smedsgaard, J. (2004). *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. *Lett. Appli Microbiol.*, 38: 440-445.
- Gajecki M., (2002). Zearalenone – undesirable substances in feed. *Polish J. Vet. Sci.*, 2:117-122.
- Frisvad J.C., Skouboe P., Samson R., (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. Nov. *Syst. App. Microbiol.* 28:442-453.

- Gams W., Samson R.A. (1985). Typification of *Aspergillus* and related teleomorphic genera. En: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Samson R.A., Pitt J.I. (eds.) New York: Plenum Press., 23-30.
- García Márquez A., (2005). Chinchillas, manuales esenciales. Ed. Albatros.
- Geisen R. (1996). Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 19: 388-392.
- Gerlach W, Nirenberg H., (1982). The genus *Fusarium*—a pictorial atlas. *Mitt Biol Bundesanst Land-u Forstwirsch Berlin-Dahlem* 209:1-406.
- Ghiasian S.A., Maghsood A.H., Yazdanpanah H., Shephard G.S., Van Der Westhuizen L., Vismer H.F, Rheeder J.P., Marasas W.F.O. (2006). Incidence of *Fusarium verticillioides* and levels of fumonisins in corn from main production areas in Iran. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 6118–6122.
- Ghiasian S.A , Maghsood A.H., (2011). Occurrence of aflatoxigenic fungi in cow feeds during the summer and winter season in Hamadan, Iran. *Afr J Microbiol Res.*, 5: 516-521.
- Gimeno A y Martins, M.L. (2000). Micotoxicosis, en enfermedades del conejo. Coordinador: Juan Maria Rosell., Ed. mundi-prensa libros,S.A., 5: 439-464.
- Gimeno A, Martins M (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Special Nutrients, INC. 3 edición. Publicado el 30 de mayo 2013 en: <http://www.specialnutrients.com/pdf/book/3%20edicion%20micotoxinas%20lr%20secure.pdf> .
- Glenn A.E., (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. In: Morgavi, D.P., Riley, R.T. (Eds.), *Fusarium Toxins: Presence in Feeds and Toxic Effects in Animals.* *Anim. Feed Sci. Technol.*, 137: 213-240.
- GLM (Gruppo Lavoro Micotossine) (2007). Fourth *Fusarium* Forum hosted by the European Commission, Brussels 15-16 January 2007.
- GMP (Good Manufacturing Practices) (2008). GMP Certification Scheme Animal Feed. Sector 2006, Appendix 1: Product standards; Regulations on Product Standards in the Animal Feed sector, GMP14.
- Gomez R., Vioque M., Sanchez E., Fernández- Salguero J., (1997). Changes in water activity and some microbial groups during storage of pet feed. *Acta Microbiol Immuno.*, 44: 155-164.
- González Pereyra, M.L., Carvalho, C.Q., Tissera, J.L., , Keller, K.M., Magnoli, C. E., Rosa, C.A. R., Dalcero, A. M., Cavaglieri, L. R., (2008 a). An outbreak of acute

- aflatoxicosis on a chinchilla (*Chinchilla lanigera*) farm in Argentina. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 853–856.
- González Pereyra, M.L., Alonso, V., Sager, R., Morlaco, M.B., Magnoli, C.E., Astoreca, A.L., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M., Dalcerro, A.M. y Cavaglieri, L. (2008 b). Mycobiota and mycotoxins from pre and post fermented corn silage. *J. App. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03634.
- González Pereyra M.L., Keller K.M., Keller L.A.M., Cavaglieri L.R., Queiroz B., Tissera J., Dalcerro A.M., Magnoli C., Rosa C.A.R., (2009). Mycobiota and mycotoxins of equine feedstuffs in the central region of Argentina. *Rev. Bras. Med. Vet.* 31: 24-29.
- Gourama H., Bullerman L.B., (1995). *Aspergillus flavus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feed. *F. Food Protection.* 58: 1395-1404.
- Goyarts T., Dänicke S., Rothkötter H.-J., Spilke J., Tiemann U., Schollenberger M., (2005). On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively. *J. Vet. Med.* 52: 305–314.
- Greco M.V., Pardo A.G., Ludemann V., Martino P.E., Pose G.N., (2012). Mycoflora and natural incidence of selected mycotoxins in rabbit and chinchilla feeds. *Scientific World J.*, vol 2012, doi: 10.1100/2012/956056.
- Grodsinsky S. (2006). Proceso de extrusión y pelleteado en alimentos balanceados. Disponible en la página web: http://www.coloniacanina.com.ar/articulos.php?id_articulo=4. Fecha de acceso: Dicimiebre 2009.
- Guerre P, Eeckhoutte C, Burgat V., Galtier P. (2000). The effects of T-2 toxin exposure on liver drug metabolizing enzymes in rabbit. *Food Addit. Contam.*, 17: 1019-1026.
- Gunsen U., Yaroglu T. (2002). Aflatoxin in dog and horse feeds in turkey. *Vet.Hum. Toxicol.*, 44: 113-114.
- Hagler Jr W.M., Tyczkowska K., Hamilton P.B., (1984). Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone, and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the midwestern United States. *Ppl. Environ.Microbio.*, 47: 151–154.
- Hamilton P.B., (1982). Mycotoxins and farm animals. *Refuah Vet.* 39: 17–45.
- Haschek W.M., Voss K.A., Beasley V.R., (2002). Selected mycotoxins affecting animal and human health. In: Haschek, W.M., Rousseaux, E.C.G., Wallig, M.A.(Eds.), *Handbook of Toxicological Pathology*, second ed. Academic Press, New York, 1: 645–699.

- Heathcote J.G., Hibbert J.R., (1978). Aflatoxins: chemical and biological aspects. Elsevier, Amsterdam.
- Hedayati M.T., Pasqualotto A.C., Warn P.A., Bowyer P., Denning D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.
- Henke S.E., Gallardo V.C., Martinez B., Balley R. (2001). Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. *J. Wildl. Dis.*, 37: 831-835.
- Hill R.A., Lacey J.,(1983). Factors determining the microflora of stored barley grain. *Ann. Appl. Biol.*, 102: 467-483.
- Hopmans E.D., Murphy P.A. (1993). Detection of fumonisins B1, B2, and B3 and hydrolyzed fumonisin B1 in corn-containing foods. *J. Agricul. Food Chem.*, 45: 1655-1658.
- Horn B.W. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review. *Food Addi. Contam.*, 24: 1088-1101.
- Hussein H.S., Brasel J.M., (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* 167:101–134
- IARC (International Agency for Research of Cancer) (1993). Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp 56: 257-263.
- IARC (International Agency for Research of Cancer) (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. 82: 171- 301.
- JEFCA, (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in foods. WHO Food Additive Series 47. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, International Programme on Chemical Safety. World Health Organisation, Geneva.
- Katzenellenbogen B.S., Katzenellenbogen J.A., Mordecai D. (1979). Zearalenones: 23 characterization of the oestrogenic potency and receptor interactions of a series of fungal 24 beta-resorcylic acid lactones. *Endocrinology* 105: 33–40.
- Keese, C., Meyer, U., Valenta, H., Schollenberger, M., Starke, A., Weber, I.-A., Rehage, J., Breves, G., Dänicke, S., (2008). No carry over of unmetabolised deoxynivalenol in milk of dairy cows fed high concentrate proportions. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 1514–1529.
- Keller K.M. Queiroz B.D.; Keller L.A.M.; Ribeiro J.M.M.; Cavaglieri L.R., González P. M.L., Pereyra C.M., Dalcero A.M. and Rosa C.A.R., (2007). The mycobiota and toxicity of equine feeds. *Vet. Res. Commun.* 31: 1037-1045.
- Keller K.M., Keller L.A.M., Queiroz B.D., Oliveira Á.A., Almeida T.X., Marassi A.C., González Pereyra M.L., Cavaglieri L.R., Dalcero A.M., Rosa C.A.R., (2009).

- Study on the mycobiota and mycotoxins of commercial equine feeds in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 30: 224-229.
- Kim I.H., Son H.Y., Cho S.W., Ha C.S., Kang B.H., (2003). Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol. Lett.*, 138: 185-192.
- Klich M.A., Mullaney, E.J., Daly, C.B., Cary, J.W. (2000). Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamaris* and *A. ochraceoroseus*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 53: 605-609.
- Klich M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species (CBS, Utrecht, Netherlands).
- Koshinsky HA, Khachatourians GG. (1992). Trichothecene synergism, additivity and antagonism: the significance of the maximally quiescent ratio. *Nat. Toxins.*, 1: 38-47.
- Kpodo K, Thrane U y Hald B. (2000). Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, 61:147-157.
- Kuiper-Goodman, T., (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In: Magan, N., Olsen, M. (Eds.), *Mycotoxins in Food. Detection and Control*. CRC Press, Woodhead Publishin Limited, England, 3-31.
- Lacey, J.; Hill, S.T.; Edwards, M.A., (1980). Microorganisms in stored grains: their enumeration and significance. *Trop. Stored. Prod. Int.* 39:19-33.
- Lacey, J., Crook, B., (1988). Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann. Occup. Hyg.* 32:515-533.
- Lacey J, Magan N (1991). Fungi in cereal grains, their occurrence and water and temperature relationships. In: Chelkowski, J. (Ed.), *Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Elsevier, Amsterdam, 77-118.
- Lafarga Arnal A. (2010). Cereales: La conservación de los granos almacenados. Disponible en la página web; <http://www.navarraagraria.com/n180/aralmace.pdf>. Fecha de acceso: febrero de 2011.
- Laguna I.G., Nome C., Conci L., Conforto C., Eyherabide G., Giménez Pecci M.D.P., González M., Guzmán F., Incremona M., Lenardon S., Marino de Remes Lenicov A.M., Pérez B.A., Presello D., Rodríguez Pardina P., Sagadin M., Sillón M., Truol G., Copia P., Botta G. (2011). Enfermedades de *Zea mays* L. (maíz). En: *Atlas fitopatológico argentino. VOL. 3, Nº 4*. Eds: Nome, S.F.; Docampo, D.M.; Conci, L.R. y Pérez, B.A. ISSN 1851-8974. Córdoba, Argentina
- Lawlor P. G., Lynch P. B., (2001). Mycotoxins in pig feeds 1: Source of toxins, prevention and management of mycotoxicosis. *Irish Vet. J.*, 54:117-120.

- Leeson S., Dias G.J., Summers J.D., (1995). Tricothecenes. In: poultry metabolic disorders. guelph, Ontario, Canada, 190– 226.
- Leslie J.F., Summerell B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa.
- Leung M.C.K., Goldstone J.V., Boyd W.A, Freedman J.H., Meyer J.N. (2010). *Caenorhabditis elegans* generates biologically relevant levels of genotoxic metabolites from aflatoxin B1 but not benzo[a]pyrene In vivo. *Toxicol. Sci.*, 118: 444–453.
- Lillehøj E.B., (1991). Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal 1-35 en: Smith JE, Henderson RS, eds. *Mycot. Anim. Foods*. CRC Press, Boca Ratón.
- Lino C.M., Silva L.J.G., Pena A.S., (2004). “Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos”. *Rev.Port. Cs Vet.*, 99:181-192.
- Logrieco A., Bottalico A. (1988). *Fusarium* species of the Liseola Section associated with stalk and ear rot of maize in Southern Italy and their ability to produce moniliformin. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 90: 215-219.
- Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Europ. J.Plant Pathol.*, 108: 597-609.
- Lowe J.A., Kershaw S.J. (1995). Water activity-moisture content relationship as a predictive indicator for control of spoilage in commercial pet diet components. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 56: 187-194.
- Luca J.L., (2003). Infochin. (http://www.infochin.com.ar/a_01_05.html.)
- Luca J.L., (2010). Cuencarural.com. (<http://cuencarural.com/granja/chinchillas/69977-tamaños-de-criaderos-de-chinchillas-en-argentina>).
- Magan N., Lacey J., (1984). Effects of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 83-93.
- Magan N., Sanchis V., Aldred D. (2004). The Role of Spoilage Fungi in Seed Deterioration. Cranfield University, Bedford, United Kingdom.
- Magnoli C., Dalcero A., Chiacchiera S., Miazzo R., Saenz M. (1998). Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*, 142: 27-32.
- Magnoli C.E., Saenz M.A., Ferrero S., Chiacchiera S.M., Dalcero A.M. (1999). Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisins-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 145: 35-41

- Magnoli C., Chiacchiera S.M., Miazzo R., Palacio G., Angeletti A., Hallak C., Dalcero A., (2002). The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. *Mycot. Res.*, 18: 7-22.
- Magnoli C., Hallak C., Astoreca A., Ponsone L., Chiacchiera S.M., Palacio G., Dalcero A. (2005). Surveillance of toxigenic fungi and ochratoxin A in feedstuffs from Córdoba province, Argentina. *Vet. Res. Commun.*, 29: 431-445.
- Maia P.P., Pereira Bastos de Sequeira M.E. (2002). Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilian pet foods. *Food Addit. Contam.*, 19: 1180-1183.
- Mallman C.A., Dilkin P., (2007). Micotoxinas e micotoxicoses em suínos. Sociedade Vicente Pallotti- Editora, Santa María, Brasil, 1-238.
- Malloch D., Cain R.F., (1972). New species and combinations of cleistothecial ascomycetes. *Can. J.Bot.* 50: 61-72.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun T.A. (1984). Toxigenic *Fusarium* species, identity and mycotoxicology. Penn State University Press, University Park.
- Marasas W.F.O, Miller J.D., Riley R.T., Visconti A. (2000). Fumonisin B1. *Environ. Health Crit.* 219. WHO, Geneva.
- Marsh, S.F., Payne, G.A., (1984). Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 74:1284-1289.
- Martins M.L., Martins H.M., Bernardo F. (2003). Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, 98: 179-183.
- McErlean B.A., (1952). Vulvovaginitis in swine. *Vet. Rec.* 64: 539–540.
- McMullen M., Jones R., Gallenberg D., (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81: 1340–1348.
- Meireles M.C.A., Correa B., Fischman O., Gambale W., Paula C.R., Chacon-Reche N.O., Pozzi C.R. (1994). Mycoflora of the toxic associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. *Mycopathologia*, 127: 183-188.
- Mohammadi N., Goltapeh E.M., Babaie-Ahari A., Puralibaba H. (2011). Pathogenic and genetic characterization of Iranian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis by ISSR analysis. *J. Agric. Tech.*, 7: 63-72.
- Morooka N., Uratsuji N., Yoshizawa T., Yamamoto H., (1972). Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* species. *J. Food Hygiene Soc. Japan* 13: 368–375.
- Moss M.O. (1996). Mycotoxins. Centenary review. *Mycol. Res.*, 100:513-523.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. University Park, PA: The Pennsylvania.

- Nelson, P.E. (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117: 29-36.
- Oliveira G.R., Ribeiro J.M., Fraga M.E., Cavaglieri L.R., Direito G.M., Keller K.M., Dalcerro A.M., Rosa C.A. (2007). Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia* 162: 355-362.
- Olsen M. (1989). Metabolism of zearalenone in farm animals. In *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*, 1st Ed.; Chelkowski, J., Ed.; Elsevier: Amsterdam-Oxford-New York, 167-177.
- Payne G.P., Brown M.P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 329-62.
- Perusia O.R., Rodríguez R.A., (2001). Micotoxicosis. *Rev. Inv. Vet. Perú* 12: 87-116.
- Pestka J.J., Smolinski A.T., (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev.*, 8: 39-69.
- Pestka J.J., (2007). Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 283-298.
- Pildain M.B., Frisvad J.C., Vaamonde G., Cabral D., Varga J., Samson R.A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 725-735.
- Pitt J.I. (1981). Food spoilage and biodeterioration. En: *Biology of Conidial Fungal*. Cole G. T. and Kendrick B. (eds.). Academic Press, New York, 2: 111-142.
- Pitt J.I., Hocking A.D., Bhudhasamai K, Miscamble B.F., Wheeler K.A., Tanboon E.k. (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 35-53.
- Pitt, J.I. (1996). What are mycotoxins?. *Aust. Mycot. Newsletter*, 7: 1.
- Pitt J.I., Hocking A.D., (1997). *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn. London: Blackie Academic and Professional.
- Pitt J.I., Samson R.A., Frisvad J.C., (2000). List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus. Clasification* (Eds. R.A. Samson), pp 9-49. Treading, U.K.: Harwood Academic Publishers.
- Pitt J.I., Hocking A.D., (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edn. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 519.
- Placinta C.M., D'Mello J.P., McDonald A.M. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 78: 21-37.

- Pronczuck M., Pronczuck S., Messyasz M. (1991). Pathogenicity of *Fusarium* spp. contributing to the stalk rot of maize in Poland. *Mycotox. Res.*, 7: 97-101.
- Raper K.B., Fennell D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Reddy K.R.N, Saritha P., Reddy C.S., Muralidharan K. (2009). Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from discolored rice grains. *African J. Biotech.*, 8: 3303-3308.
- Requena F., Saume E., León A. (2005). Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnia tropical*, 23: 393-410.
- Reynoso MM, Torres AM y Chulze SN. (2004). Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating populations among the *Gibberella fujikuroi* complex isolated from maize. *Mycol. Res.*, 108: 154-160.
- Richard E., Heutte N., Sage L., Pottier D., Bouchart V., Lebailly P., Garon D., (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem. Toxicol.*, 45: 2420–2425.
- Roigé M.B., Aranguren S.M., Riccio M.B., Pereyra S., Soraci A.L., Tapia M.O. (2009). Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 26: 233–237.
- Rosa C.A.R., Ribeiro J.M.M., Keller K.M., Cavaglieri L.R., González Pereyra M.L., Pereyra C.M., Dalcerro A.M., (2006). Contaminación natural con ocratoxina A y micobiota de materias primas y raciones para cerdos. V Congreso Latinoamericano de Micotoxicología, Florianópolis, Brasil.
- Ross P.F., Nelson P.E., Richard J.L., Osweiler G.D., Rice L.G., Plattner R.D., Wilson T.M. (1990). Production of fumonisins by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolated associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3225-3226.
- Rotter, B.A., Thompson, B.K., Lessard, M., Trenholm, H.L., Tryphonas, H., (1994). Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* 23: 117–124.
- Rotter B.A., Prelusky D.B., y Pestka J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health*, 48:1-34.
- Saleemi M.K., Khan M.Z., Khan A, Javed I (2010). Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of *Aspergillus* species. *Pak. J. Bot.*, 42(1): 427-434.

- Samson R.A., Van Reenen-Hoekstra E.S. (1988). Introduction to food-borne fungi. 3rd. Ed. Central Bureau Voor Schimmel Culturs. Baarn. The Netherlands.
- Samson R.A. (1992). Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its telemorphs. En: *Aspergillus: the biology and industrial applications*. Bennett J.W., y Klich M.A. (eds.). Bulteworth, Heineman, Stoneman, London, 353-388.
- Sanchis V, Sanclemente A, Usall J, Viñas I (1993). Incidence of mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in barley. *J. Food Prot.*, 56: 246–248.
- Schollenberger M., Muller H.M., Rufle M., SuchyS., Plank S., Drochner W. (2006). Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia* 161: 43–52.
- Schwarzer K., (2009). Harmful effects of mycotoxins on animal physiology. In: 17th Annual ASAIM SEA Feed Technology and Nutrition Workshop, Hue, Vietnam.
- Scudamore K.A., Hetmanski M.T., Chan H.K., Collins S. (1997). Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Addit. Contam.*, 14: 157-173.
- Scudamore K.A., Nawaz S., Hetmanski M.T. (1998). Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit. Contam.*, 15: 30-55.
- Seeling K., Dänicke S., (2005). Relevance of the *Fusarium* toxins deoxinivalenol and zearalenone in ruminant nutrition – a review. *J. Anim. Feed Sci.* 14: 3–40.
- Sharma M., Marquez C. (2001). Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 93: 109-114.
- Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenström S., Sydenham E.W. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Inter.*, 79: 671-687.
- Shier W.T., Shier A.C., Xie W., Mirocha C.J., (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* 39: 1435–1438.
- Steyn P.S., Gelderbloom W.C.A., Shephard G.S., van Heerden F.R., (2009). Mycotoxins with a special focus on aflatoxins, ochratoxins and fumonisins. In: Ballantyne, B., Marrs, T., Syversen, T. (Eds.), *General and Applied Toxicology.* , third ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 3467–3527.
- Swamy H.V.L.N., Smith T.K., MacDonald E.J., Boermans H.J., Squires E.J., (2002). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum

- chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* 80: 3257–3267.
- Tiemann U, Brüßow K-P, Jonas L, Pöhland R, Schneider F, Dänicke S. (2006 a). Effects of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two *Fusarium* toxins on selected immunological and histological parameters of spleen in gilts. *J. Anim. Sci.* 84:236-245.
- Tiemann U, Brüßow K-P, Küchenmeister U, Jonas L, Kohlschein P, Pöhland R, Dänicke S. (2006 b). Influence of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two *Fusarium* toxins on selected enzymatic and histological parameters of liver in gilts. *Food Chem. Toxicol.* 44:1228-1235.
- Tiemann, U., Dänicke, S., (2007). In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit. Contam.* 24: 306–314.
- Torres A.M., Reynoso M.M., Rojo F.G., Ramirez M.L., Chulze S.N., (2001). *Fusarium* species (section Liseola) and its mycotoxins in maize harvested in northern Argentina. *Food Addit. Contam.*, 18: 836-43.
- Trenholm H.L., Hamilton R.M.G., Friend D.W., Thompson B.K., Martin K.E., (1984). Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: effects on swine, poultry and dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185: 527–531.
- Trucksess M.W., Stack M.E., Nesheim S., Albert R.H., Romer T.R., (1994). Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative Study. *J. Assoc. Off. Analyt. Chem.* 77: 1512-1521.
- Urry W.H., Wehrmeister H.L., Hodge E.B., Hidy P.H., (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Lett.* 22: 3109–3114.
- Vázquez Arista, M. (2001). El ecosistema de los granos almacenados. Avance y perspectiva, 20: 407-413.
- Vesonder R.F., Ceigler A., Jensen A.H., (1973). Isolation of the emetic principle from *Fusarium graminearum* infected corn. *Appl. Microbiol.* 26: 1008–1010.
- Vining L.C. (1992). Role of secondary metabolites from microbes. En: Secondary metabolites: their function and evolution. Chadwick D.J., and Whelan J. (eds.). John Wiley: Chichester, 184-194
- Vlachou S, Zoiopoulos P.E., Drosinos E.H., (2004). Assessment of some hygienic parameters of animal feeds in Greece. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 117: 331–337.
- Voss K.A., Smith G.W., Haschek W.M., (2007). Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137: 299–325.

- Wallace H.A.H.; Sinha R.N., (1981). Causal factors operative in distributional patterns and abundance of fungi: a multivariate study. In: Wicklow DT, Carroll GC eds. The fungal Community-Its Organisation and Role in Ecosystems. New York: Marcel Dekker Inc., 233-247.
- Whitlow L.W., Hagler W.M., (2002). Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* 28: 1-10.
- Wild C.P., (2007). Aflatoxin exposure in low and middle income countries: the critical interface of agriculture and health. *Food Nutr. Bull.* 28: 372–380.
- Wild C.P., Gong, Y.Y., (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31, 71–82.
- Wu F., (2004). Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. *Environ. Sc. Technol.* 38: 4049–4055.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 15, 129–144.

PRODUCCION CIENTÍFICA DERIVADA DEL TRABAJO DE TESIS

- ✓ Chronic exposure to aflatoxigenic fungi related to liver damage in pelt chinchillas (*Chinchilla lanígera*) (2013). **Landa Florencia**, González Pereyra María Laura, Pena Gabriela, Bagnis Guillermo, Cavaglieri Lilia, Da Rocha Rosa Carlos, Dalcero Ana. *Rev. Bio Ciencias* 2 (2): 35-47.
- ✓ Toxigenic mycoflora and Aflatoxins production ability in feed intended for breeding chinchilla. **Landa Florencia**, González Pereyra María Laura, Pena Gabriela, Cavaglieri Lilia, Dalcero Ana, Da Rocha Rosa Carlos, Magnoli Carina. VI Latin American Congress of Micotoxicology and II International Symposium on Algal and Fungal Toxins for Industry. Merida, Yucatán, México. Del 27 de Junio al 1 de Julio de 2010.
- ✓ Coocurrencia de deoxinivalenol y zearalenona en alimentos balanceados destinados a la cría de chinchillas. **Landa Florencia**, Pena Gabriela, Cavaglieri Lilia, Da Rocha Rosa Carlos, Dalcero Ana. VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Rio Cuarto, Córdoba. 3 al 6 de Diciembre 2013.

ANEXO MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medios de recuento general.

- ✓ Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC): glucosa 10 g; peptona 5 g; KH_2PO_4 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; solución de cloranfenicol 2 ml; solución de dicloran 1 ml; solución de rosa de bengala 0,5 ml; agar 15 g; agua destilada 1000 ml.
- ✓ Agar dicloran-glicerol al 18 % (DG18): glucosa 10 g; peptona 5 g; KH_2PO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; solución de cloranfenicol 2 ml; solución de dicloran 1 ml; glicerol 220 g; agar 15 g; agua destilada 1000 ml.

Medios para identificar especies del género *Aspergillus*.

- ✓ Agar semisólido o agar soft (0,1%): agar 0,1 g; agua destilada 100 ml.
- ✓ Agar extracto de malta (MEA): extracto de malta 20 g; glucosa 20 g; peptona 1 g; Agar 20 g; agua destilada 1000 ml.
- ✓ Agar nitrato glicerol al 25% (G25N): KH_2PO_4 0,75 g; Czapek concentrado 10 ml; extracto de levadura 3,70 g; glicerol grado analítico 250 g; agar 12 g; agua destilada 750 ml.
- ✓ Agar Czapek extracto de levadura (CYA): PO_4HK_2 1 g; extracto de levadura 5 g; Czapek concentrado 10 ml; sacarosa 30 g; agar 15 g; agua destilada 1000 ml.
- ✓ Agar Czapek extracto de levadura sacarosa (CY20S): KH_2PO_4 1 g; Czapek concentrado 10 ml; extracto de levadura 5 g; sacarosa 200 g; agar 15 g; agua destilada 1000 ml.

Medios para la identificación de especies del género *Fusarium*.

- ✓ Agar agua (AA): agar 10 g; agua destilada 1000 ml.
- ✓ Agar hojas de clavel (AHC): agar 20 g; agua destilada 1000 ml.

El medio se preparó colocando 1 a 5 hojas de clavel estériles en placas de Petri de 6 cm por 15 mm y se agregó AHC al 2% enfriado a 45 °C. Se almacenó 3 o 4 días previo a su uso para determinar posibles contaminantes provenientes de las hojas.

- ✓ Agar papa glucosado (APG): papa 250 g; glucosa 20 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml.

Se cortaron en trozos papas lavadas sin pelar, se hidrataron con 500 ml de agua y se cocinaron a vapor fluente durante 45 minutos. Por otro lado se esterilizó el agar en 500 ml de agua destilada. Se filtró el caldo con las papas a través de gasa y se adicionó el agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneizó para obtener un puré y la mitad de éste se adicionó al agar junto con la glucosa, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 ml). Se fraccionó el medio en tubos de ensayo, se esterilizaron

en autoclave a 3/4 de atmósfera durante 20 minutos y se dejaron inclinados a solidificar.

Soluciones.

- ✓ Solución stock de dicloran: 200 mg de dicloran se llevaron a 100 ml con etanol.
- ✓ Solución stock de cloranfenicol: 250 mg de cloranfenicol se disolvieron en 100 ml de etanol al 95%.
- ✓ Solución rosa de bengala: 25 mg de rosa de bengala se mezclaron con 30 mL de etanol al 95% y se llevaron a 100 ml con agua destilada.
- ✓ Solución de Czapek concentrada: sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,01 g.); nitrato de sodio (3 g.); cloruro de potasio (0,5 g.); sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,5 g.) se disolvieron en 100 ml de agua destilada.
- ✓ Solución de ortoformaldéhidro (OPA): se mezclaron OPA (40 mg), 1 ml de metanol, 5 ml de tetraborato de sodio 0,1M y 50 μl de 2-mercaptoetanol.

73964

07