

11661
3
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**



**EFFECTOS DEL CONSUMO DE AFLATOXINAS Y DE LA
VACUNACION CON EL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA
DE FABRICIO EN EL POLLO DE ENGORDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A :

M.V.Z. JUAN CARLOS VALLADARES DE LA CRUZ

DIRECTOR: MVZ. PhD ROBERTO A. CERVANTES O.

ASESOR: QFB. PhD SARA E. VALDES M.

**TESIS CON
EXAMEN DE GRADUACION**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

R E S U M E N

JUAN CARLOS VALLADARES DE LA CRUZ. Efectos del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio en el pollo de engorda (bajo la dirección de Roberto Arnulfo Cervantes Olivares y la asesoría de Sara Esther Valdes Martínez).

El consumo de aflatoxinas y la vacunación con virus vivo de la Infección de la bolsa de Fabricio (IBF) son dos factores que pueden generar efectos detrimentales en las aves domésticas. El objetivo del presente trabajo fué evaluar los efectos de ambos factores en el pollo de engorda.

Se utilizaron 200 pollos de engorda de 1 día de edad divididos en 4 lotes; el lote 1 fué el Testigo, el lote 2 recibió una dieta con 2.5 ug/g de aflatoxinas, el lote 3 fué vacunado con IBF al 5to día de edad y el lote 4 recibió una dieta con 2.5 ug/g de aflatoxinas y fué vacunado con IBF al 5to día de edad.

Los animales fueron estudiados 7 semanas y fueron muestreados semanalmente para evaluar sus parámetros productivos (ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia), hematológicos (biometría hemática), inmunológicos (anticuerpos antinewcastle, intradermoreacción y fagocitosis) y patológicos (lesiones macroscópicas y microscópicas).

Los animales intoxicados con aflatoxinas mostraron menor consumo de alimento y ganancia de peso, mayor índice de conversión alimenticia y de mortalidad natural, anemia leve; reducción en la respuesta de inmunidad celular y de resistencia inespecífica y lesiones en hígado y en bolsa de Fabricio. Los animales intoxicados y vacunados tuvieron parámetros más bajos que los que sólo fueron intoxicados o vacunados.

El consumo de aflatoxinas puede incrementar la susceptibilidad del pollo de engorda hacia el virus vacunal de la Infección de la bolsa de Fabricio.

LISTA DE CONTENIDO

Página

INTRODUCCION	1
REVISION DE LA LITERATURA	11
1.- AFLATOXICOSIS	11
Historia	11
Etiología	12
Aspergillus	14
Aflatoxinas	17
Clasificación	18
Biosíntesis	23
Producción en condiciones naturales y epizootiología de la aflatoxicosis	26
Producción de las aflatoxinas in vitro	30
Metabolismo y Patogenia	32
Fisiopatología y Lesiones	40
Alteraciones en el crecimiento y desarrollo	40
Lesiones morfológicas	43

Patología clínica	47
Alteraciones en el sistema inmunológico	52
Signología	59
Diagnóstico	60
Muestreo	62
Pruebas presuntivas	64
Métodos cuantitativos	68
Pruebas confirmatorias	74
Tratamiento	75
Prevención y Control	78
Detoxificación	80
2.- ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA	
INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO	89
Historia	90
Incidencia y Distribución	90
Etiología	91
Epizootiología	93
Signos Clínicos	96
Patogenia	96
Lesiones Macroscópicas	98
Lesiones Microscópicas	99
La infección subclínica y el estado de inmunodepresión	100
Diagnóstico	104
Prevención y Control	104

OBJETIVO	108
MATERIAL Y METODOS	109
1.- Animales de experimentación	109
2.- Producción de aflatoxinas	111
3.- Preparación de la dieta de los animales de experimentación	117
4.- Vacunas	118
5.- Parámetros Productivos	119
6.- Parámetros Hematológicos	120
7.- Parámetros Inmunológicos	120
8.- Estudio Patológico	122
9.- Diseño Experimental	123
10.- Análisis Estadístico	124
RESULTADOS	127
CONCLUSIÓN	177
BIBLIOGRAFÍA CITADA	206

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1.- Características microscópicas del género <i>Aspergillus</i>	16
2.- Estructura de las aflatoxinas y metabolitos estrechamente relacionados	20
3.- Biogénesis propuesta para la AFB1	25
4.- Química de la reacción de la AFB1 con amoniaco para su detoxificación	86
5.- Diagrama de producción de aflatoxinas in vitro	113
6.- Efectos del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en la ganancia de peso del pollo de engorda	133
7.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el consumo de alimento del pollo de engorda	135

8.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en los principales parámetros productivos del pollo de engorda	137
9.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el Hematocrito (%) del pollo de engorda	141
10.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en la concentración de Hemoglobina (g/100 ml) del pollo de engorda	142
11.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No de glóbulos rojos (millones/mm ³) del pollo de engorda	145
12.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No de glóbulos blancos (miles/mm ³) del pollo de engorda	147
13.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en la concentración de proteínas plasmáticas (g/100 ml) del pollo de engorda	149

14.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No relativo de linfocitos circulantes (%) del pollo de engorda	150
15.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No relativo de heterófilos circulantes (%) del pollo de engorda	151
16.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No relativo de monocitos circulantes (%) del pollo de engorda	152
17.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No relativo de eosinófilos circulantes (%) del pollo de engorda	153
18.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No relativo de basófilos circulantes (%) del pollo de engorda	154
19.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en la producción de Ac contra el virus de la enfermedad de Newcastle (inhibición de hemaglutinación) ...	157

- 20.- Foco de metaplasia mieloide y degeneración
grasa discreta en hepatocitos. Lote 4 (AFLA-
IBF), 2ª semana (X100)174
- 21.- Degeneración grasa hepatocítica con gotas
hialinas en el citoplasma. Lote 4 (AFLA-IBF)
3ª semana (X400)174
- 22.- Hiperplasia biliar y degeneración grasa he-
patocítica. Lote 4 (AFLA-IBF), 7ª semana
(X400)175
- 23.- Necrosis linfoide central en nódulo de bolsa
de Fabricio. Lote 2 (AFLA), 2ª semana
(X400)175
- 24.- Depleción linfoide central en nódulo de
bolsa de Fabricio. Lote 4 (AFLA-IBF), 2ª
semana (X400)176
- 25.- Depleción linfoide central e infiltración hete-
rófila en nódulo linfoide de bolsa de Fabricio.
Lote 4 (AFLA-IBF), 3ª semana (X400)176

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
1.- Características fisicoquímicas de las aflatoxinas	22
2.- Susceptibilidad por especie a las aflatoxinas	33
3.- Efecto de las aflatoxinas en la inmunogénesis	54
4.- Métodos analíticos para aflatoxinas	63
5.- Pasos básicos para el análisis químico de las aflatoxinas	69
6.- Métodos cuantitativos usados para aflatoxinas	71
7.- Análisis bromatológico de los alimentos utilizados en los animales de experimentación	110
8.- Diseño experimental	125
9.- Resultados de la cinética de producción de aflatoxinas in vitro	128

10.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en la mortalidad natural del pollo de engorda	131
11.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el peso corporal del pollo de engorda	132
12.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el consumo de alimento del pollo de engorda	134
13.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en la conversión alimenticia del pollo de engorda	136
14.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el Hematocrito (%) del pollo de engorda	140
15.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en la concentración de Hemoglobina (g/100ml) del pollo de engorda	143
16.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No de glóbulos rojos (millones/mm ³) del pollo de engorda	144

- 17.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en el No de glóbulos
blancos (miles/mm 3) del pollo de
engorda 146
- 18.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en la concentración de
proteínas plasmáticas (g/100 ml) del
pollo de engorda 148
- 19.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en la producción de Ac
contra el virus de la enfermedad de
Newcastle (Inhibición de hemaglutinación) ... 156
- 20.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en la respuesta de
intradermoreacción a PHA del pollo de
engorda 158
- 21.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en el porcentaje de
fagocitosis y en el índice fagocítico
del pollo de engorda 159
- 22.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en el peso relativo
del hígado del pollo de engorda 161

- 23.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en el peso relativo
de la bolsa de Fabricio del pollo de
engorda 162
- 24.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en el peso relativo
del bazo del pollo de engorda 163
- 25.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la
vacunación con IBF en el peso relativo
del timo de pollo de engorda 164

I N T R O D U C C I O N

La presencia de un sistema inmunológico funcional es muy importante para el desarrollo de los animales domésticos, lo que permite obtener animales más sanos y con ésto incrementar la productividad de la industria pecuaria (Morilla y Bautista, 1980; Sharma 1987). Si la competencia inmunológica se ve comprometida, la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas se incrementa y el desempeño productivo de los animales tiende a deteriorarse (Sharma, 1987).

La inmunidad (del latín immunis, a salvo, exento de cargos), es la capacidad del organismo para reconocer y destruir toda sustancia considerada como extraña (Tizard, 1982); en realidad, el sistema inmunológico es un sistema fisiológico importante para regular el crecimiento, la estructura y la función de las células y tejidos del organismo (Carpentier, 1982) proporcionándole al mismo tiempo propiedades que le confieren resistencia contra agentes infecciosos específicos (Jawetz y col. 1982).

El sistema inmunológico es extremadamente complejo, al igual que el endócrino, ejerce un control dentro del organismo en virtud de que sus componentes circulantes son capaces de actuar en sitios muy alejados de su lugar de origen. La complejidad del sistema inmunológico se debe a una intrincada red de comunicaciones que puede lograr múltiples efectos basados en una variedad relativamente pequeña de

tipos celulares. De este modo, se puede ampliar enormemente una respuesta determinada o disminuirla de manera notable, dependiendo de las necesidades momentáneas del organismo. Un sistema inmunológico que funcione adecuadamente es una defensa eficaz contra partículas extrañas, como microorganismos patógenos, y contra células propias que han sufrido una transformación neoplásica (Stites y col. 1983).

El sistema inmunológico esta compuesto por una serie de elementos celulares, genéticos y moleculares íntimamente relacionados entre sí. Los principales componentes celulares son los macrófagos y los linfocitos.

Los macrófagos tienen gran variedad de funciones en las respuestas inmunes. Aunque en la actualidad se considera que los macrófagos no son específicos para un antígeno determinado, su papel en la concentración y en la presentación de los antígenos a los linfocitos es crucial (Stites y col. 1983). Al parecer el macrófago es el que determina cuales linfocitos serán inducidos para ser estimulados y puestos en función por los diversos antígenos. Además, estas células segregan varios mediadores biológicamente activos capaces de regular el tipo y la magnitud de las respuestas de los linfocitos, mediante el incremento o la supresión de la división y diferenciación celular. Más adn, el macrófago juega un papel clave en el procesamiento del antígeno y es la principal célula del sistema mononuclear fagocítico (Stites y col.1983).

Los linfocitos son los componentes celulares antígeno-específicos del sistema inmunológico, y actúan mediante receptores de la membrana celular. Cada receptor es estrictamente específico y las diferentes líneas de linfocitos manifiestan su especificidad característica. El origen de la especialización del linfocito aún se desconoce y continúa el debate acerca de que si se transmite genéticamente o es inducido por mutación somática. Las dos principales clases de linfocitos, B y T, difieren en la naturaleza de sus receptores celulares.

En el caso de las aves, durante los primeros estadios del desarrollo, las células progenitoras de los linfocitos residen en el saco vitelino y migran hacia el timo o la bolsa de Fabricio para su posterior diferenciación en linfocitos T y B, respectivamente (Peterson, 1975).

Los linfocitos T se encuentran en todo el organismo, constituyen aproximadamente el 60% de los linfocitos sanguíneos y son la población celular predominante en las áreas periarteriolas del bazo (Peterson, 1975). Los linfocitos B también están ampliamente distribuidos en el organismo, constituyen aproximadamente un 30% de los linfocitos de la sangre periférica y son las células predominantes de los centros germinales linfoides; su estadio final de desarrollo son las células plasmáticas (Peterson, 1975).

En las aves, el desarrollo de los macrófagos y de los

linfocitos T y B empieza desde la incubación, la maduración embrionaria del sistema linfoide procedente del saco vitelino pasa al timo a los 5-6 días de incubación y a la bolsa de Fabricio a los 8-14 días (Kramer, 1975).

El proceso de diferenciación del sistema inmunológico continúa después del nacimiento, lo que se comprueba por los efectos de la timectomía y la bursectomía neonatales. La bursectomía, especialmente cuando se realiza inmediatamente después del nacimiento, puede afectar el desarrollo de las células B. Drogas, virus y rayos X pueden así mismo, alterar el proceso de diferenciación (Peterson, 1975).

La respuesta inmunológica hacia un agente infeccioso puede ser completamente diferente dependiendo de la especie y de la edad del animal afectado, del agente infeccioso involucrado y del estado funcional del sistema inmunológico (Peterson, 1975).

En el caso de las aves, el sistema inmunológico puede ser subdividido en tres sistemas: el inmune humoral, el inmune celular y el inmune secretor (Leslie, 1975). Los sistemas inmunes humoral y secretor son tradicionalmente considerados bursodependientes (células B), mientras que el sistema inmune celular es timodependiente (células T) (Leslie, 1975).

Los antígenos, especialmente cuando son particulados, como algunos virus y bacterias, son fagocitados rápidamente después de su entrada al organismo, por las células del sistema reticuloendotelial. Estos macrófagos ingieren al antígeno que después es expuesto a las enzimas de los lisosomas. Este

mecanismo destruye gran cantidad de microorganismos y es considerado la primera línea de defensa del organismo (Peterson, 1975).

Los antígenos fragmentados, con o sin ácido ribonucleico, son entonces pasados directamente a los linfocitos. Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad mediada por células (IMC) y los linfocitos B de la inmunidad mediada por anticuerpos (IMAc). Los linfocitos T ejercen sus funciones via moléculas específicas e inespecíficas biológicamente activas llamadas interleucinas. La inmunidad mediada por células es importante en los siguientes efectos biológicos: reacción a injertos, hipersensibilidad retardada, inmunidad tumoral y una gran variedad de respuestas inmunológicas hacia infecciones bacterianas, micóticas y virales (Kramer, 1975; Leslie, 1975).

Las células B expresan su función por la síntesis de anticuerpos; los productos de las células plasmáticas de las aves son IgM, IgA, IgA secretoria e IgY. Es probable que la IgY sea funcionalmente equivalente a la IgG de los mamíferos y es la inmunoglobulina 7 S predominante en el suero; aún no han sido descritas IgE o IgD en los pollos, y aunque se han descrito anticuerpos capaces de sensibilizar la piel de las aves por anafilaxia cutánea pasiva, estos anticuerpos no han sido bien caracterizados (Leslie, 1975).

La IgA secretoria es la principal inmunoglobulina responsable de la respuesta inmune local de las mucosas, y es sintetizada primordialmente en el tejido linfoide asociado a

los bronquios (TLAB) y en el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI); la capacidad de la IgA secretoria para activar la vía alterna del complemento y para bloquear la fijación de antígenos a las mucosas es la base de la respuesta inmune local (Bienestock, 1975).

Los conocimientos acerca del desarrollo y la funcionalidad del sistema inmunológico proveen una perspectiva útil para analizar las respuestas inmunes hacia los agentes que producen enfermedades en las aves. Estas enfermedades frecuentemente son el resultado de la interacción de agentes infecciosos con los componentes del sistema inmunológico y de la capacidad del mismo dependerá, en última instancia, el estado de salud del animal (Peterson, 1975).

En la industria avícola se han utilizado gran cantidad de recursos técnicos y humanos para el control y la erradicación de las enfermedades infecciosas (Tadeu y col. 1977) en donde la manipulación artificial del sistema inmunológico de las aves ha sido esencial; ciertamente, las vacunas son utilizadas con mayor eficacia en medicina veterinaria que en medicina humana, por ejemplo, no se ha logrado proteger con el esquema ampliado de vacunación (DPT, BCG, polio y sarampión) a 1000 millones de niños (meta para el año 2000), mientras que en la industria avícola se inmunizan artificialmente 15,000 millones de pollos anualmente contra la enfermedad de Marek, con una vacuna más fragil que la del sarampión (Kumate en Morilla y Bautista,

1986).

En el caso de las aves domésticas, la competencia inmunológica es especialmente importante en el periodo inmediato posterior al nacimiento, cuando los pollos son vacunados contra varios microorganismos patógenos. Si los pollos están inmunodeprimidos en el momento de la vacunación, la capacidad de las vacunas para estimular una respuesta inmune efectiva se reduce y los animales vacunados permanecen vulnerables a los efectos de los agentes patógenos (Sharma, 1987).

La literatura reporta que las modificaciones en los mecanismos de resistencia natural y de inmunidad pueden ser causadas por un número importante de agentes que se encuentran en el medio ambiente (Tizard, 1982; Stites y col., 1983). Las investigaciones de las últimas décadas indican que el medio ambiente físico y el comportamiento influyen significativamente sobre la capacidad del ave para realizar una respuesta inmunológica efectiva (Siegel, 1983). Estos factores incluyen alteraciones en la temperatura, restricciones alimenticias o manejo inadecuado de la parvada (Siegel, 1983). Otros agentes nocivos para el sistema inmunológico son los desechos químicos industriales, agrícolas y algunas sustancias tóxicas que se forman por la actividad microbiológica que se presenta en condiciones naturales en algunos productos alimenticios (Pier y Mc Loughlin, 1985). Las micotoxinas pertenecen a este grupo de sustancias.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de una amplia variedad de hongos que crecen en granos, aceites vegetales, frutas, forrajes y alimentos almacenados (Sharby, 1977; Mirocha, 1982). Los efectos ejercidos por las micotoxinas en los mecanismos de resistencia e inmunidad han sido sujetos a numerosas revisiones, donde se establece que tres grupos de micotoxinas están frecuentemente asociados con actividad inmunodepresora: las aflatoxinas, la ocratoxina A y ciertas toxinas del grupo de los tricotecanos (Sharby, 1977; Morilla, 1980; Pier, 1981; Pier y Mc Loughlin, 1985).

Por otra parte, existen agentes infecciosos que son capaces de afectar el desarrollo y la capacidad del sistema inmunológico de las aves. Algunos virus aviares, de los que se ha demostrado actividad inmunodepresora, incluyen al virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF), al de la enfermedad de Marek (VEM) y a los virus de la reticuloendoteliosis, leucosis linfoide, bronquitis infecciosa, enfermedad de Newcastle, anemia infecciosa aviar y viruela aviar (Jordan, 1986). De éstos virus, el VIBF y el VEM son los más importantes y los mejor estudiados, ambos son enzoóticos en las zonas productoras de aves y las parvadas comerciales se exponen en forma temprana a ambientes contaminados (Sharma, 1987), incluso algunas cepas vacunales del VIBF son capaces de producir efectos detrimentales en el sistema inmunológico (García, 1985).

La posibilidad de que más de uno de los factores

inmunodepresores se presenten al mismo tiempo en el medio ambiente de los animales es considerable y las anormalidades en el sistema inmunológico de las aves se pueden manifestar de diferente manera. Por ejemplo, una cepa del VIBF que bajo condiciones experimentales no producía la muerte de los animales, causó cerca de un 50% de pérdidas cuando se presentó contaminación con aflatoxinas en la dieta (Chang y Hamilton, 1982).

Puesto que la aflatoxicosis y la infección de la bolsa de Fabricio se presentan en forma natural en pollos jóvenes, es de gran importancia el estudio de la interacción y de los efectos de estos padecimientos en el sistema inmunológico de las aves.

Giambrone y col. (1978b), estudiaron el sinergismo entre las aflatoxinas y una cepa patógena de VIBF, administrando 2.5 ug de aflatoxinas por gramo de alimento por cuatro semanas e inoculando la cepa patógena de IBF a la tercera semana, dando por resultado un significativo aumento de la mortalidad y una menor ganancia de peso corporal, en comparación con aquellos animales que sólo recibieron aflatoxinas o IBF, aunque ninguno de los tratamientos redujo significativamente la respuesta de anticuerpos hacia el virus vacunal de la enfermedad de Newcastle.

Sin embargo no existen estudios que analicen los efectos posibles de las aflatoxinas y las cepas vacunales de VIBF, cuya presentación simultánea es muy probable bajo las condiciones de producción nacionales, por lo tanto, el presente trabajo

pretende detectar los efectos de la ingestión de aflatoxinas en pollos jóvenes que son vacunados con una cepa de virus vivo de VTBF, en términos de comportamiento productivo y capacidad inmunológica.

REVISION DE LA LITERATURA

1.- AFLATOXICOSIS

Las micotoxinas más estudiadas y ampliamente distribuidas son las aflatoxinas, un grupo de metabolitos íntimamente relacionados entre sí, producidos por ciertas cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* que crecen en diversos productos alimenticios (Nibbelinck, 1987). A pesar de ser de reciente aparición en el ámbito científico, como problema plenamente reconocido, la aflatoxiosis se ha convertido en una enfermedad de gran repercusión económica para la avicultura (Edds y Bortell, 1983).

Las aflatoxinas son consideradas de primera importancia en salud pública y salud animal, así como en productividad agropecuaria; sus implicaciones en la autorización y regulación de la venta de productos alimenticios, y la posibilidad de que residuos tóxicos procedentes de granos o animales penetren en la cadena de alimentación humana, han estimulado enormemente las investigaciones sobre éste tema (Pier, 1981).

HISTORIA

Aunque la existencia de venenos de hongos ha sido conocida por siglos, la muerte de 100,000 pavipollos en

Inglaterra en 1960 fué la responsable del interés actual que ha surgido hacia las micotoxinas (Sharby, 1977; Krogh, 1983). La etiología de la muerte de los pavipollos era inicialmente desconocida, por lo que la enfermedad fué llamada "Enfermedad X de los pavos" (Blount, 1961). En 1961 se determinó que el agente causal era una sustancia tóxica presente en el cacahuete brasileño, producida por *Aspergillus flavus*, por lo que a la enfermedad se le llamó aflatoxicosis (Sargeant y col., 1961). Nesbitt y col. en 1962 identificaron, mediante cromatografía y bajo luz ultravioleta dos sustancias, una con fluorescencia azul (blue) y otra con fluorescencia verde (green), a las que les llamaron aflatoxina B y aflatoxina G respectivamente. El interés sobre las aflatoxinas motivó entonces la investigación en las micotoxinas conocidas y el descubrimiento de muchas otras (Nibbclink, 1987).

En la actualidad se conocen más de 100 hongos toxigénicos, pero sólo en una docena de géneros se ha confirmado el papel de las micotoxinas como causa de enfermedad, tal es el caso de las toxinas de *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phitomyces* y *Aspergillus* (Pier, 1981).

ETIOLOGIA

Los hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en el suelo; son organismos aerobios y no poseen clorofila, por lo que no son capaces de producir sus propios nutrientes orgánicos como lípidos,

carbohidratos y proteínas, que son adquiridos a partir del sustrato de crecimiento de su medio ambiente (Cavalheiro, 1983).

Los factores que pueden afectar el desarrollo de los hongos incluyen humedad, temperatura, aereación y sustrato. El componente ambiental simple de mayor control crítico para el crecimiento de los hongos es la humedad. Los hongos son capaces de desarrollarse a niveles de humedad frecuentemente observados en las raciones para animales y que son inadecuados para el crecimiento bacteriano (Sharby, 1977).

Con base en sus necesidades de humedad los hongos pueden ser agrupados en tres categorías: hongos de campo, hongos de almacenamiento y hongos de descomposición avanzada (Sharby, 1977). Los hongos de campo invaden las semillas en desarrollo en la planta, con un 22-25% de humedad, y se incluyen en ésta categoría a los géneros *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Claviceps*. Los hongos de almacén son aquellos encontrados en las semillas en condiciones de humedad presentes en el grano almacenado (13-18%) e incluyen principalmente a especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Los hongos de descomposición avanzada requieren condiciones similares de humedad pero rara vez se desarrollan en semillas, como *Fusarium graminearum*.

ASPERGILLUS

Los hongos del género *Aspergillus* son hongos filamentosos que pertenecen al grupo de los ascomicetos, conociéndose hasta la fecha 18 grupos diferentes (Raper y Fennell, 1970).

Los hongos del género *Aspergillus* son aerobios pero la cantidad de oxígeno que requieren y su tolerancia a altas concentraciones de CO₂ son variables dependiendo de la especie y de la cepa (Goldblatt, 1969).

En condiciones de laboratorio, *Aspergillus* crece bien en medios de cultivo sintéticos de uso rutinario en Micología, como el Sabouraud detrosa agar (SDA), el agar dextrosa papa (ADP) y el medio de Czapek Dox (Campbell y Stewart, 1980). En los medios de cultivo, *Aspergillus* produce colonias planas, de textura fina aterciopelada, que después de uno o dos días de crecimiento se hacen algodonosas; en los estadios iniciales de crecimiento, las colonias son de color blanco, pero el hongo posee conidias pigmentadas que van cambiando la coloración colonial a rosa, anaranjado, amarillo, verde, gris, café o negro, dependiendo del grupo del que se trate, dando un aspecto "polvoriento" a la superficie (Campbell y Stewart, 1980).

Microscopicamente, éste género se caracteriza por la presencia de una vesícula dilatada en la punta de algunas hifas aéreas, llamadas conidióforos, de las cuales irradian pequeñas prolongaciones denominadas fiálicas (antiguamente denominadas esterigma). Las fiálicas pueden estar soportadas

directamente sobre la vesícula (uniseriadas) o estas sobre profiálicas que salen de la vesícula (biseriadas). Sobre éstas estructuras se encuentran colocadas las esporas (Fig. 1):

La coloración de la colonia y la estructura de las cabezas conidiales son de gran importancia para la diferenciación de las especies. Los datos necesarios para la identificación de un aislamiento deben incluir textura de la colonia, color y velocidad de crecimiento, morfología de los conidióforos incluyendo el número de filas de las fiálicas, su arreglo columnar o radial y el tamaño y forma de las esporas. El libro "The genus *Aspergillus*" de Raper y Fennell (1970) facilita en gran medida la diferenciación de las especies.

En condiciones naturales, *Aspergillus* crece sobre materia orgánica y su crecimiento y esporulación se ven favorecidos por un exceso de calor y humedad en el medio ambiente, aunado a una abundancia de materia orgánica (Ghazilkanian, 1982). Este género puede desarrollarse adecuadamente en un amplio rango de temperatura, entre 5.5 y 45 °C, las esporas no pueden germinar a temperaturas de 4.4 °C, aunque no mueren, y son destruidas con temperaturas de 75-100 °C (Ghazilkanian, 1982). El intervalo de pH adecuado para su crecimiento va de 5.4 a 8.0 (Raper y Fennell, 1970).

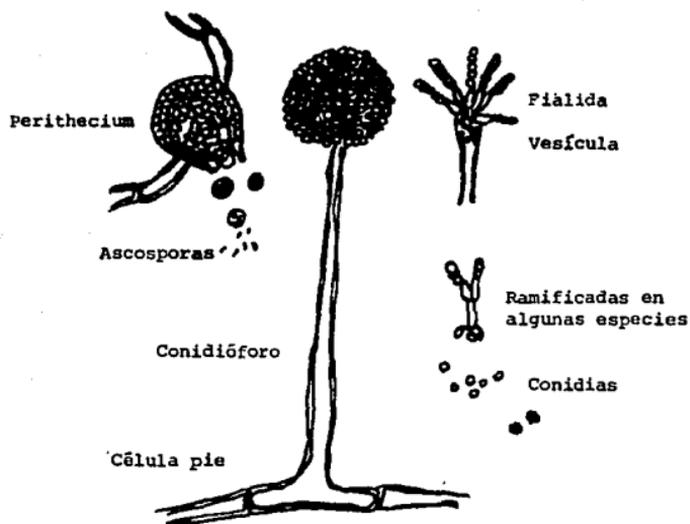


Figura 1.- Características microscópicas del género *Aspergillus*

TIPOS DE HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS

Aparentemente existe un gran grupo de cepas de *Aspergillus flavus* y de *Aspergillus parasiticus* que producen aflatoxinas (Cavalheiro, 1983) y aproximadamente cerca de la mitad de las cepas pueden ser toxigénicas bajo condiciones ambientales óptimas (Pier, 1981). La literatura especializada (Goldblatt, 1969) cita a otros hongos que también pueden ser capaces de producir aflatoxinas, como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. ostionus*, *A. ruber*, *Penicillium citrium*, *P. frequentans*, *P. puberulum*, *P. variable* y *Rhizopus* spp.

La temperatura óptima para el desarrollo de *A. flavus* es de 36 a 38 °C, y para *A. parasiticus* es entre 30 y 35 °C, temperaturas diferentes hacen cambiar la cantidad y el tipo de aflatoxinas producidas. *A. flavus* es el único hongo que requiere de un mínimo de 18.3 a 18.5% de humedad en base a peso fresco cuando crece en maíz (el sustrato debe estar en equilibrio con una humedad relativa del 85%) y puede crecer a ésta baja cantidad de agua sin competencia con otros hongos (Mirocha, 1982).

AFLATOXINAS

Como se ha mencionado, las aflatoxinas son metabolitos producidos por cepas de *Aspergillus flavus* y de *Aspergillus parasiticus*. Son clasificadas como metabolitos secundarios, ya que, según Dutton (1988) "son productos naturales que tienen una distribución taxonómica restringida, no poseen una

función obvia en el crecimiento celular y son sintetizados por células que han terminado su crecimiento". Las aflatoxinas son compuestos heterocíclicos altamente oxigenados, químicamente considerados bisfuranoisocumarinas, compuestos con elevada actividad farmacológica (Wogan, 1966; Goldblatt, 1969). Algunas aflatoxinas se producen naturalmente en el sustrato contaminado por los hongos, mientras que otras son metabolitos formados en el organismo animal después de la ingestión del alimento contaminado (Hsieh y col. 1977).

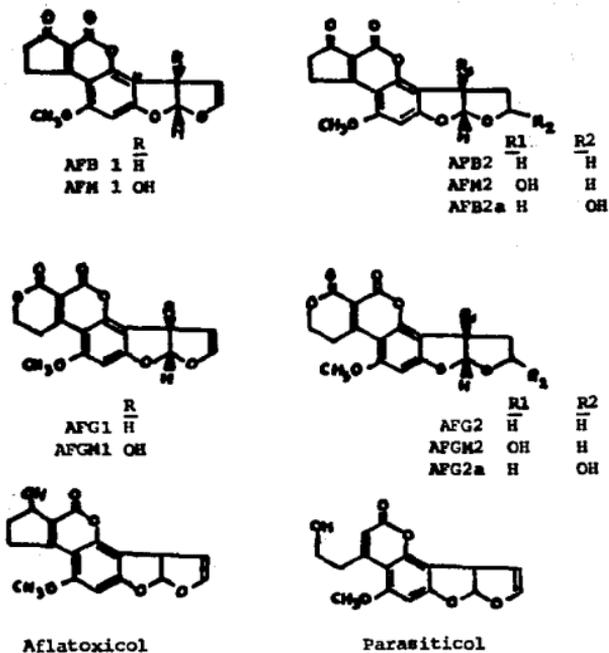
La posibilidad de extracción de las toxinas por medio de solventes orgánicos, así como su capacidad de ser separadas por cromatografía en capa fina y de ser detectadas por fluorescencia bajo luz ultravioleta, proporciona en gran medida facilidades para su aislamiento y caracterización .

CLASIFICACION

Originalmente las aflatoxinas fueron divididas en dos grandes grupos, B y G, llamados así por el color fluorescente que emiten cuando son observados bajo luz ultravioleta. Las aflatoxinas B (blue) fluorescen en color azul brillante y las aflatoxinas G (green) fluorescen en color verde (Wogan, 1966; Goldblatt, 1969). Hartley y col. en 1966, fueron los primeros en separar las toxinas por cromatografía, designandolas B1, B2, G1 y G2 de acuerdo a su valor decreciente de Resistencia al flujo (Rf) (Moreno y Hernández, 1988)

Tres variaciones estructurales de las moléculas de aflatoxinas dan a la familia 8 tipos diferentes de aflatoxinas: (1) la serie B tiene en su estructura un anillo ciclo pentano, sustituido en la serie G por una lactona. (2) la serie 1 tiene un doble enlace en el anillo furano terminal de una porción bisfurano, ausente en la serie 2, y (3) la serie M tiene un grupo hidroxilo en el carbono terciario por la fusión de dos anillos furano. Con estas características juntas en todas las combinaciones posibles, resultan los siguientes metabolitos (Dutton, 1988): aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), aflatoxina M1 (AFM1), aflatoxina M2 (AFM2), aflatoxina GM1 y aflatoxina GM2. Los metabolitos relacionados son aflatoxina B2a (AFB2a), aflatoxina G2a (AFG2a), aflatoxicol y parasiticol (aflatoxina B3) (Figura 2).

La mayoría de las aflatoxinas se encuentran en la fracción lipídica de los alimentos, así como en la fracción insaponificable del sustrato; algunas de sus características importantes son su resistencia a temperaturas muy altas (arriba de 300 °C) y a los procesos de peleteado y enlatado; son insolubles en agua y en disolventes no polares pero muy solubles en disolventes polares como metanol, eter, cloroformo y benceno; son estables en cloroformo y son muy sensibles al contacto con el aire y el oxígeno; son destruidas por álcalis, ácidos fuertes y agentes oxidantes y



Dutton, 1987.

Figura 2.- Estructura de las aflatoxinas y metabolitos estrechamente relacionados.

son inactivadas con soluciones de hipoclorito de sodio, también hay degradación cuando son expuestas a la luz visible y a la luz ultravioleta (Wogan, 1966; Goldblatt, 1969).

Algunas características fisicoquímicas de éstos compuestos son resumidas en el Cuadro 1.

La aflatoxina principal es la AFB1, es la más tóxica del grupo y tiene un punto de fusión de 268-269 °C. Su peso molecular, detectado por espectrofotometría de masas es de 362, y su composición resumida es C₁₇ H₁₂ O₆, es una molécula altamente insaturada (Goldblatt, 1969). La AFB1 presenta reacciones de adición con un grupo hidroxilo bajo condiciones fuertemente ácidas, alterándose enormemente sus propiedades cromatográficas. Ozonólisis resulta de la fragmentación de la AFB1 y los productos de esta reacción incluyen ácidos leucínico, succínico y glutárico (Wogan, 1966).

La AFG1 fluoresce en color verde y posee un R_f ligeramente menor al de la AFB1, su fórmula molecular resumida es C₁₇ H₁₂ O₇, y se diferencia de la AFB1 porque el anillo pentanona es sustituido por una lactona (Goldblatt, 1969). La presencia del anillo lactona determina la posibilidad de hidrólisis alcalina, y ha sido reportada la reciclización parcial de los productos de la hidrólisis alcalina después de una posterior acidificación (Wogan, 1966).

La AFB2 y la AFG2 son dihidroderivados de las dos anteriores (Wogan, 1966). La AFB2a es de fluorescencia azul y

Cuadro 1.- Características fisicoquímicas de las aflatoxinas

AFLATOXINA	AFL1	AFL2	AFLG1	AFLG2
Formula molecular	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Peso molecular	312	314	328	330
Rf 1/2/1	0.48	0.45	0.43	0.36
Punto de Fusión	258.- 265°C	286.- 289°C	244.- 246°C	237.- 240°C
Emisión fluoresc.	425nm	425nm	458nm	458nm
Color fluoresc.	azul	azul	verde	verde
Nivel mín. detección Silica gel*	1-5ng	1-5ng	1-5ng	1-5ng
HPLC**	0.1ng	0.1ng	0.1ng	0.1ng

* Fluorescencia amarilla despues de rociar con KOH 20%

** Whatman. Inc.

Adaptado de Schar (1980) y Purchase (1974)

la AFG2a es verde bajo radiación ultravioleta, ambas son más polares que la AFB1 y son derivados hidroxilos de AFB2 y de AFG2, son inestables y se descomponen en productos amarillos en presencia de aire y en condiciones alcalinas (Mirocha, 1982).

La AFM1 es un producto del metabolismo animal y fué descubierta por primera vez en la leche (M=milk), también se encuentra en la mayoría de los animales intoxicados con aflatoxinas; la AFM1 es más polar que la AFB1, por lo que su valor Rf es más pequeño cuando se resuelve en cromatografía en capa fina sobre sílica gel (Mirocha, 1982).

El aflatoxicol fué originalmente descrito como un producto de transformacuón de la AFB1 por el hongo *Dactylium dendroides*, y por preparaciones de higado de humano y de pescado; tiene el mismo valor Rf que la AFB2 y al parecer, es carcinogénico; se forma por reducción enzimática de la AFB1 y la reacción puede ser invertida y entonces el aflatoxicol puede actuar como reservorio de AFB1 (Mirocha, 1982).

BIOSINTESIS

Basados en numeroso experimentos con C 14, Biollaz y col. (1970), establecieron que la AFB1 puede ser sintetizada completamente a partir del grupo acetato, y el origen de los átomos de carbono individuales puede ser atribuido al metabolismo del acetato (Mirocha, 1982).

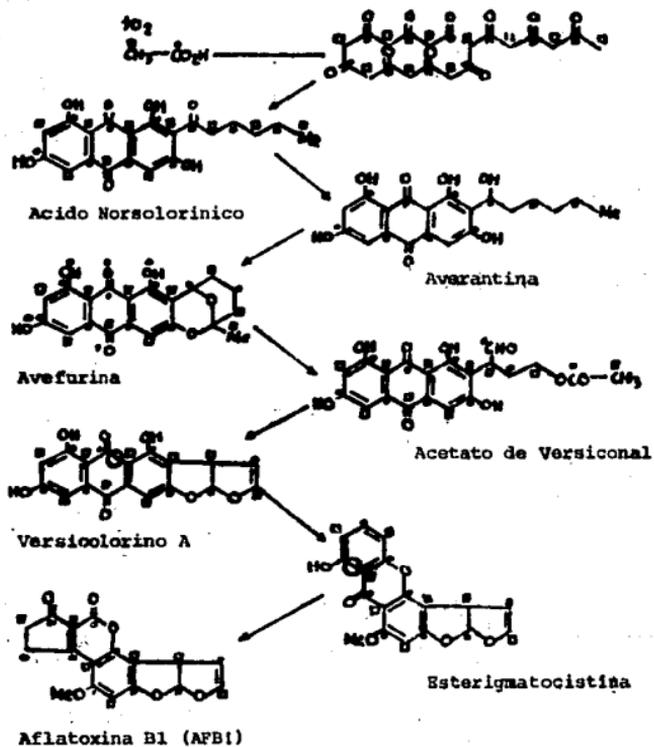
Las investigaciones más recientes indican que la AFB1

proviene de un compuesto de 18 carbonos, el polihidroxi-naftaleno endoperóxido derivado de una sola cadena de policetona. El endoperóxido, a través de una serie de arreglos, da lugar a una antraquinona intermedia con una cadena lateral de bisfurano, el versicolorino A; la pérdida oxidativa posterior de los dos compuestos derivados del acetato, puede llevar primero a la esteregmato-cistina, y posteriormente a la AFB1 (Dutton, 1988) (Fig. 3).

Este metabolismo secundario deriva del metabolismo primario del hongo y la producción de aflatoxinas puede ser afectada por la actividad metabólica, un nivel reducido de coenzimas, la presencia de iones metálicos y la carga genética de la cepa productora (Dutton, 1988).

En general la presencia de zinc, magnesio, asparagina, prolina y altas concentraciones de sacarosa estimulan la producción de aflatoxinas, mientras que niveles elevados de nitrógeno inorgánico y de fosfatos inhiben la producción (Reddy y col, 1971; Dutton, 1988).

Buchanan y col. (1987) sugieren que el efecto de los carbohidratos como la glucosa (inducción carbon catabólica) es mediada a través de una disminución en la formación de NADPH por represión de las enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico. La disminución de la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico minimiza la oxidación del acetato, quedando éste disponible para la síntesis de aflatoxinas. Estos investigadores sugieren que la síntesis de aflatoxinas



Dutpp, 1988

Figura 3.- Biogénesis propuesta para la AFB1.

ocurre en asociación con una inactivación glucosa-mediada de la mitocondria y que la síntesis de aflatoxinas no está regulada por el estado general energético de la célula, pero puede ser controlada por el estado energético de compartimientos subcelulares (Buchanan y col. 1987).

PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN CONDICIONES NATURALES Y EPIZOOTIOLOGIA DE LA AFLATOXICOSIS

Aspergillus flavus es un constituyente de la microflora del aire y del suelo en todo el mundo y es una causa importante del deterioro de los alimentos almacenados (Goldblatt, 1969; Purchase, 1974). Las fuentes de las aflatoxinas que la literatura menciona incluyen a todo tipo de productos que contengan carbohidratos o grasas, y cita a granos (maíz, trigo, avena, centeno, sorgo, cacahuete, cebada, mijo, arveja, frijol, nuez, copra y semilla de soya), forrajes (ensilado de maíz, heno de grama común y pasto bermuda) y alimentos derivados (alimentos concentrados, pasta y harina de soya, harina de pescado, harinolina, polvo de chile indio, harina y semilla de algodón y harina y mantequilla de cacahuete (Pier, 1981; Mirocha, 1982; Cavalheiro, 1983; Rosiles, 1987; Nibbclink, 1987).

La distribución de las fuentes de aflatoxinas es variable y no parece haber un lugar donde hubiere mayor o menor frecuencia de contaminación, aunque las muestras provenientes de clima cálido parecen contener niveles más

altos que las procedentes de climas húmedos y fríos (Rosiles, 1977). Se ha observado, por ejemplo, que los problemas causados por el consumo de pasta y harina de cacahuete se presentan casi siempre en el verano (Pier, 1981). En México han sido reportados aislamientos de cepas de *Aspergillus* spp productoras de aflatoxinas incluso en alimentos de consumo humano (Sandoval y col., 1976).

Aunque existen muchos factores que modifican la formación de aflatoxinas (cepa del hongo involucrada, sustrato, humedad relativa del ambiente y del sustrato, temperatura y tiempo del crecimiento del hongo, grado de madurez del sustrato, estado físico del sustrato, concentración de oxígeno y de CO₂ en el medio ambiente y la presencia de otros microorganismos en el sustrato) (Goldblatt, 1969). Los hallazgos de laboratorio indican que los cuatro factores principales que determinan la formación de aflatoxinas son humedad, temperatura, aereación y sustrato (Nibbclink, 1987).

Las cepas de campo de *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden variar enormemente en su capacidad para producir aflatoxinas, tanto en sustratos naturales como in vitro, la capacidad genética de la cepa en particular es determinante para la producción de los metabolitos tóxicos (Goldblatt, 1969; Pier, 1981), aproximadamente cerca de la mitad de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* son toxigénicas bajo condiciones ambientales óptimas (Pier, 1981).

El sustrato sobre el cual crece el hongo es un factor importante a considerar para evaluar la cantidad y el tipo de aflatoxinas producidas, los sustratos con gran cantidad de carbohidratos (maíz, trigo, arroz) generalmente producen mayor cantidad de aflatoxinas que las semillas de oleaginosas (cacahuete, soya, algodón), probablemente porque éstas contienen elevadas proporciones de lípidos que no son rápidamente metabolizados por *Aspergillus* (Goldblatt, 1969).

Varios autores han demostrado que el factor más importante para la producción de aflatoxinas por *A. flavus* es la humedad relativa alrededor del sustrato natural (Goldblatt, 1973). La humedad relativa óptima para la producción de aflatoxinas es, en el ambiente alrededor del sustrato, del 80-98% y la humedad del sustrato superior al 15% (Nibbclink, 1987).

La temperatura óptima para el crecimiento de *A. flavus* es de 36-38 °C, mientras que la temperatura óptima para la producción de aflatoxinas es de 25 °C (Nibbclink, 1987). La cantidad relativa de AFB1 y AFG1 producidas también es modificada por la temperatura (Purchase, 1974). Rabie y Smalley reportan una temperatura óptima de 24 °C para AFB1 y de 30 °C para AFG1. West. y col. (1973) demostraron que cuando AFB1 y AFG1 son producidas en arroz, un incremento gradual de la temperatura de 15 a 21 y a 28 °C produce una mayor cantidad de aflatoxinas y aumenta la proporción de AFB1 en relación a AFG1.

La composición del ambiente gaseoso influye en las reacciones fisiológicas de los hongos y por lo tanto en la síntesis de sus metabolitos; la reducción de la cantidad de oxígeno al 1% reduce drásticamente la producción de las toxinas (Cavalheiro, 1983).

La mayoría de los productos agrícolas, exceptuando al maíz, las nueces y las semillas de algodón, están libres de aflatoxinas al momento de la cosecha, y se contaminan durante su almacenamiento. El maíz es contaminado en el campo, en aquellas regiones donde las mazorcas de las plantas son atacadas por insectos; la ruptura de los granos y el daño causado por los insectos puede facilitar la invasión de hongos toxigénicos y la formación de las toxinas puede requerir solo de algunas horas cuando existen condiciones favorables (Pier, 1981).

Como principales factores predisponentes para la formación de aflatoxinas se hace especial mención a la negligencia en la preparación de los silos donde hay actividad micótica en la superficie, el deficiente almacenaje de los granos en las bodegas y el insuficiente secado de los granos en el campo. Un punto común de contaminación del alimento y sus ingredientes es el área circundante a los silos y a los transportadores expuestos a cambios de temperatura que causan traspasos de humedad (Hamilton, s.a.).

PRODUCCION DE AFLATOXINAS IN VITRO

Las investigaciones sobre las aflatoxinas han estimulado

el desarrollo de procedimientos para la producción de las mismas bajo condiciones controladas, para contar así con material disponible para investigaciones posteriores (Shotwell y col. 1966) y se han hecho intentos para la producción de estas toxinas en cultivos líquidos y sólidos, en medios artificiales y en sustratos naturales. La producción de aflatoxinas en medios líquidos tiene una eficiencia menor que la realizada en medios sólidos y en sustratos naturales.

Reddy y col. (1971) lograron una producción de 28-30 mg de aflatoxina por 100 ml de medio líquido a base de sacarosa, asparagina y sales minerales, en condiciones estacionarias y rotatorias. La ausencia de asparagina en el medio redujo drásticamente la producción de las toxinas; el pH inicial fue crítico en la producción, siendo de 4.5 el valor óptimo. En estudios realizados en México, Osorio (1976) utilizando varios medios, reporta una producción máxima de 24.53 ug/ml aflatoxinas en un medio de fitona, a las 168 horas de incubación, con agitación constante.

Obihoya y col. (1983) utilizando Sabouraud dextrosa agar como medio base, encontraron que altas concentraciones de nitritos inhiben el crecimiento de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas.

El zinc es el micromineral más importante para la producción de aflatoxinas, a una concentración de 0.8-2.0 ppm (Goldblatt, 1969) induce la formación de policetonas en lugar

de ácidos grasos, al inhibir la formación de NADPH (Dutton, 1988).

La utilización de sustratos sólidos naturales en la producción de aflatoxinas es muy importante para efectos de la reproducción experimental de enfermedades en animales, ya que se puede lograr la obtención de un material con una concentración conocida de las toxinas, que puede ser utilizado directamente en experimentos controlados, incorporándolos directamente en las dietas (Shotwell y col., 1966).

Los sustratos preferidos para la producción de grandes cantidades de aflatoxinas son arroz y trigo desmenuzados; las cepas de *A. flavus* recomendadas son NRRL 2999, NRRL 3145 y NRRL A-13794 (Goldblatt, 1969).

Una humedad elevada del sustrato y una atmósfera con un 99-100 % humedad relativa son recomendadas para el crecimiento de *A. flavus* en cultivo puro. Temperaturas de 28-30 °C son las más recomendables, un período de incubación de una semana es usualmente satisfactorio, sin embargo, el período de incubación puede variar de acuerdo a la temperatura, humedad, cepa utilizada y sustrato; la cantidad de aflatoxinas en el sustrato puede disminuir considerablemente durante un período prolongado de incubación posterior al tiempo máximo de producción de la toxina (Goldblatt, 1969).

Shotwell y col. (1966) utilizando una cepa de *A. flavus*

NRRL 2999 lograron una producción de AFBI de 1 mg por gramo de material inoculado, utilizando una fermentación sólida en arroz, a 28 oC, por 5 días. West y col (1973) tomando como base el procedimiento de Shotwell y col. (1966), con incrementos graduales de temperatura cada 48 horas (15 oC, 21 oC y 28 oC) lograron una producción de 1.85 mg de AFBI por gramo de material inoculado.

METABOLISMO Y PATOGENIA

Las aflatoxinas son toxinas que tienen actividad mutagénica, teratogénica y carcinogénica comprobada (Pier y Mc Loghlin, 1985). Estas propiedades tóxicas varían dependiendo de la dosis ingerida, el tiempo de exposición, la especie, la raza, la edad y el sexo de los animales afectados (Reddy y col., 1984ñ Defalla y col., 1987)

El grado de susceptibilidad es extremadamente variable entre las diferentes especies (Pier, 1982) (Cuadro 2). Las aves son especialmente susceptibles a las aflatoxinas y en las especies domésticas el orden decreciente de susceptibilidad es de patos recién nacidos, pavos, gansos, faisanes juvenes y pollos. Los pollos juvenes se afectan más severamente que los adultos, y existen ciertas razas y estirpes que son más susceptibles, por ej. la Newhampshire es susceptible a dietas con 0.5 ppm, mientras que esta concentración no afecta a la White Leghorn (Nibbclink, 1987).

La susceptibilidad por edad es especialmente importante en

Cuadro 2.- Susceptibilidad por especie a las aflatoxinas

ESPECIE	DOSES ÚNICAS[*] AL DÍA	REFERENCIA
Pato	0.36	Carnahan 1963
Gato	0.55	Newberne 1969
Cerdo	0.62	Faterson 1973
Ferreo	1.00	Newberne 1969
Pavo	1.36	Pier 1980
Ovino	2.00	Arnbrecht 1970
Pollo	6.50	Smith 1970
Rata	5.5-17.9	Hogan 1966

* Dosis única mg/kg

Pier 1980

animales muy jóvenes, por ej. la DL 50 en patos de dos días de edad es el doble de la DL 50 en patos de un día (Pier, 1981).

Cuando animales de la misma edad y raza son experimentalmente alimentados con aflatoxinas, frecuentemente existen variaciones marcadas en los efectos entre los individuos del mismo grupo experimental (Pier, 1981); un hallazgo reciente indica que por lo menos una parte de la resistencia dentro de la misma edad y raza puede ser hereditaria (Pier, 1981) y se han tratado de seleccionar líneas de aves aflatoxina-resistentes (Edds y Bortell, 1983).

Se han realizado gran cantidad de estudios para definir los efectos bioquímicos críticos resultantes de la interacción de las aflatoxinas con los constituyentes celulares, utilizando diversos modelos biológicos como inoculación a animales, cultivos celulares y cultivos bacterianos. Los cambios bioquímicos ocurren inmediatamente después de la exposición de los animales o de los cultivos celulares y revelan un patrón general de respuesta sobre ciertas vías metabólicas específicas; las reacciones involucran alteraciones en el metabolismo de los ácidos nucleicos y de las proteínas (Wogan, 1966; Goldblatt, 1969).

La interacción de las aflatoxinas con el ácido desoxirribonucleico (DNA) es el evento crucial y crítico en esta secuencia. Esta interacción interfiere la transcripción del DNA y provoca una alteración en la síntesis, tanto de DNA

como de ácido ribonucleico (RNA), por inhibición de las polimerasas respectivas, con el resultado final de la inhibición de la síntesis de proteínas, particularmente en los casos en los que la síntesis proteica es mediada por la síntesis de RNA DNA-dependiente (Wogan, 1966).

Estudios realizados utilizando diversos criterios como alteraciones en el espectro de absorción de las aflatoxinas y por diálisis de equilibrio indican que la AFB1 es capaz de unirse a un filamento de DNA simple (Goldblatt, 1969).

Essigmann y col. (1977) aislaron e identificaron el producto principal DNA-derivado formado por la interacción de la AFB1 con DNA aislado de timo de becerro, en presencia de microsomas de hígado de rata. El producto principal fué identificado como 2,3-dihidro-2(N7-guanil)3hidroxiAFB1, con las funciones guanina e hidroxilo teniendo una transfiguración, el nivel de unión resultante fué igual a un residuo de aflatoxina para 60 nucleótidos de DNA.

Wang y Cerutti en 1980 estudiaron las reacciones bioquímicas involucradas y los productos resultantes de la unión espontánea entre la AFB1 y el DNA, bajo condiciones in vitro similares a las anteriores, demostrando también la formación de 2,3-dihidro-2(N7-guanil)3hidroxiAFB1 (AFB1-N7-gua). Estos investigadores indican que la AFB1-N7-gua puede descomponerse, bajo condiciones fisiológicas, por tres vías: (1) liberación de DNA y de 2,3-dihidro-2-3-dihidroaflatoxina B1 (AFB-dhd), (2) liberación de DNA y de

AFB1-N7-gua, con el resultado de sitios aguaninicos en DNA, de evidente estabilidad química, y (3) la formación de 2,3,dihidro-2-(N5-formil-2',5',6',-triamino-4'-oxo-N5-pirimidil)-3-hidroxi aflatoxina B1 (AFB1-triamino-O-Py), que es un producto secundario que permanece unido al DNA.

La relativa abundancia de éstas lesiones secundarias sobre el DNA varían en los diferentes tejidos de acuerdo al pH y a la disponibilidad de enzimas catalizadoras, y son la base de las lesiones observadas en las células de los mamíferos (Wang y col. 1980).

Esta unión de la AFB1 con el DNA demostrada in vitro no tiene aún evidencias clara que demuestren que también ocurre in vivo, no está claro si las reacciones in vivo están determinadas por una molécula intacta de AFB1 o si ésta requiere una conversión metabólica previa. por ej. una alquilación, ya que la literatura reporta que en el organismo animal el sistema de oxidasas mixtas (MFO) de los microsomas hepáticos convierte a las moléculas de aflatoxinas en una estructura más polar, que es la que reacciona con el DNA (Pier, 1981).

La mayoría de la información disponible sobre los efectos de la AFB1 en el metabolismo del DNA in vivo se han obtenido en experimentos en los cuales se estimula la síntesis de DNA por hepatectomía subtotal en ratas. Las aflatoxinas inhiben la síntesis de DNA, RNA total y de fosfolípidos. Recando y col (1965) (citados por Goldblatt,

1969) en base a la captación de timidina-H3, indican que la síntesis de DNA se inhibe en un 65% después de una hora y en un 95% después de 12 horas del tratamiento con 100 ug de AFB1, aunque las enzimas responsables de la síntesis de DNA (fosfoquinasa, polimerasas, factor activador nativo de DNA) permanecen totalmente activas. Así, la AFB1 actúa directamente in vivo en la molécula de DNA e inhibe su capacidad de actuar como molde para la síntesis de más DNA.

Además de inhibir la síntesis de DNA, las aflatoxinas inhiben drásticamente la incorporación de nucleósidos precursores del RNA nuclear, inhibiendo así la síntesis del RNA nuclear (Goldblatt, 1969), aparentemente por inhibición de la actividad de la RNA polimerasa. La interferencia en la transcripción genética está determinada por la inhibición de la RNA polimerasa y está relacionada a la interacción de la tóxica con el DNA, de tal manera que se inhibe la síntesis de RNA DNA-dependiente (RNA mensajero), aunque también se ha demostrado una inhibición directa de la enzima por efectos de la aflatoxina (Goldblatt, 1969). La supresión en la síntesis de RNA persiste en la rata hasta por 72 horas y eventualmente se asocia a una disminución del RNA ribosomal.

La consecuencia final de la inhibición de la síntesis de RNA mensajero es la reducción en la síntesis de proteínas. Estudios realizados in vitro demuestran que la presencia de AFB1 inhibe la incorporación de leucina y alanina a la síntesis de proteínas (Goldblatt, 1969). En contraste con

éstos hallazgos, los resultados de estudios in vivo indican que la incorporación de aminoácidos a la síntesis de proteínas no es significativamente inhibida por las aflatoxinas; aparentemente in vivo la inhibición de la síntesis de proteínas se observa en proteínas específicas y es secundaria a la inhibición de la síntesis de DNA y de enzimas específicas (Goldblatt, 1969).

En los cultivos celulares y bacterianos, el primer efecto biológico detectable por la adición de aflatoxinas es la supresión de la síntesis de DNA y de la mitosis. Este efecto es detectado poco tiempo después de la exposición a la toxina y lleva a la célula a un estado de disminución de la actividad mitótica para sobrevivir. La producción anormal de células gigantes en los cultivos, parece ser de tipo no sincitial, y está asociada con la mitosis inhibida en metafase (Purchase, 1974).

En cultivos bacterianos, Beuchat y Lechowich (1971a y 1971b) demostraron alteraciones bioquímicas (disminución en la concentración de DNA y de RNA), retardo en la esporulación y alteraciones morfológicas (formas filamentosas y disminución del número de mesosomas) en *Bacillus megaterium* cuando éste fué cultivado con 3.8 ppm (ug) de AFB1 por ml de medio.

La supresión de la mitosis, la inhibición de la síntesis de DNA y la inducción de bacteriófagos en bacterias lisogénicas, indican que las aflatoxinas afectan los sistemas

biológicos de una manera similar a los agentes alquilantes, la actinomicina D, la mitomicina y ciertos alcaloides pirrolicidínicos, conocidos inductores de mutagenicidad y carcinogenicidad (Goldblatt, 1969).

PATOGENIA

La literatura menciona que la vía de entrada más lógica de las aflatoxinas al organismo animal es la vía oral, a través del alimento contaminado. Las aflatoxinas se difunden por todos los tejidos corporales, indicando rápida absorción pero lenta eliminación. En primer lugar, los órganos reproductores, el hígado y los riñones tienen una elevada concentración de aflatoxinas, debido al papel de las vías hepática y renal para la eliminación de las mismas. La médula ósea concentra más aflatoxinas que el encéfalo, el tejido muscular y la grasa corporal, en donde la concentración es menor. Las rutas biliar y fecal son las de mayor excreción de las aflatoxinas puras o de sus derivados; estas vías representan el 65% del total excretado, el resto se elimina por orina (Rosiles y col., 1977).

Harland y Cardeilhac (1975), inyectando intravenosamente aflatoxinas radiomarcadas con C14 a gallinas Leghorn enanas y Rhode Island, anestesiadas y con los ureteres y los conductos biliares canulados, verificaron que la ruta más importante de excreción es la biliar; la cantidad relativa de aflatoxinas excretada por bilis, orina y contenido intestinal, mantuvo

una relación constante de 70:15:15 respectivamente, en un periodo de observación de 350 minutos. En otro experimento hecho en pollos de engorda, las aves retuvieron el 10% de la dosis de aflatoxinas, siendo su distribución en el organismo: sangre 11.04%, hígado 9.83%, corazón 4.30%, molleja 12.5%, músculos pectorales 31.77% y muslo 30.63%. Experimentos similares indican que las ratas excretan alrededor del 80% y los ratones el 90% de la dosis única del compuesto dentro de 24 horas (Goldblatt, 1969).

FISIOPATOLOGIA Y LESIONES

Los efectos biológicos de las aflatoxinas en los animales domésticos se pueden agrupar en cuatro categorías principales: reducción en el rango de crecimiento, daño hepático agudo y/o crónico, interferencia con los mecanismos de defensa naturales e inmunológicos y efectos teratogénicos y mutagénicos (Pier, 1981).

ALTERACIONES EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Uno de los hallazgos de campo más importantes en los casos de aflatoxicosis es la baja en los niveles de ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia (Newberne, 1973; Huff y col., 1984; Hofstad, 1984). Diversos autores han reproducido experimentalmente estos hallazgos. Smith y Hamilton (1970) indican que dosis graduales de aflatoxinas (0.625, 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 ppm) incorporadas

al alimento resultan en una disminución en el rango de crecimiento, y aparentemente se requiere una dosis umbral para producir este efecto, después de la cual se establece una relación lineal entre la dosis de aflatoxinas y la disminución en el rango de crecimiento, aunque estos efectos varían dependiendo de la edad de los animales, el tipo de dieta y el tiempo de exposición a las toxinas (Edds y Bortell, 1983).

Reddy y col. (1984) observaron una reducción en la ganancia de peso y en el consumo de alimento de pollos alimentados con 0.75 ppm (ug/g) de aflatoxinas, durante 28 días. Giambrore y col. (1985a y 1985b) demostraron una alteración significativa de la conversión alimenticia con una dosis de 800 ppb de aflatoxinas no purificadas, y a una dosis de 500 ppb de aflatoxinas purificadas, administradas en cápsulas de gelatina durante en 35 días. Huff y col. (1986) estudiando los efectos de las aflatoxinas y la edad de los animales, reportan disminuciones significativas de peso en pollos alimentados con 5 ppm de aflatoxinas, del 1o al 6to día de edad, y con 2.5 ppm del 1o al 17vo día de edad. Ubsi y col. (1985a) utilizando 1, 2, 3 y 6 ppm de aflatoxinas en pollos de 2 a 42 días de edad, observaron que las aflatoxinas disminuyen la ganancia de peso, el consumo de alimento y aumentan la conversión alimenticia a partir de los 14 días de edad, detectando además que la ganancia de peso y el consumo de alimento se afectan con niveles de aflatoxinas mas bajos

que los necesarios para afectar la conversi3n alimenticia, mientras que De Falla y col. (1987) reportan hallazgos similares con dosis de 0.5 ppm por 7 semanas. Reddy y col. (1984) y Ubosi y col. (1985a), sugieren que la disminuci3n en el consumo de alimento puede ser debida a una alteraci3n en la palatabilidad del mismo o a una depresi3n en el apetito, y que la disminuci3n en la ganancia de peso es consecuencia del menor consumo de alimento.

Cavalheiro (1983) reporta que una dieta con elevado contenido de grasa o de proteina disminuye la severidad de los casos de aflatoxicosis. Richardson y col. (1987) estudiando la correlaci3n entre el nivel de proteina (10-12.5%) y la concentraci3n de aflatoxinas en la dieta (0-2.4 ppm) reportan que una menor concentraci3n de proteina disminuye la dosis efectiva minima aparente para afectar el crecimiento y aumenta el nivel de la respuesta lineal a la concentraci3n de aflatoxinas y se~alan a la concentraci3n de proteina como un factor biol3gico a considerar para evaluar la respuesta de los pollos a la intoxicaci3n. Tambi3n se ha reportado la existencia de interacciones entre las aflatoxinas y algunas vitaminas, como la A, D, E, K, riboflavina, biotina y tiamina. Se ha observado que las deficiencias de vitaminas A, D 3 riboflavina incrementan la susceptibilidad hacia las aflatoxinas, mientras que la deficiencia de tiamina tiene un efecto contrario (Pier, 1981).

Otra posible explicación en la disminución de la eficiencia de la conversión alimenticia es la falta de absorción de nutrientes, representada por un aumento en la concentración de lípidos fecales, aparentemente debida a una disminución en la actividad de la lipasa pancreática y en la concentración de sales biliares del pollo de engorda (Cavalheiro, 1983; Hamilton, s.a.); sin embargo, Richardson y Hamilton, (1987) encontraron que no existe alteración en la concentración de enzimas pancreáticas en pollos de aves destinadas a la producción de huevo.

En adición a la disminución en el rango de crecimiento y en la eficiencia alimenticia, existen reportes que asocian una disminución en la producción de huevos con la ingestión de aflatoxinas (Edds y Bortell, 1983; Hosftad, 1984). Las aflatoxinas producen una disminución en el peso promedio del huevo, pero no afectan la consistencia del cascarón (Cavalheiro, 1983). La baja producción de huevos puede deberse a que la síntesis hepática y el transporte de los precursores de la yema están reducidos y se ha reportado la eliminación de toxinas en los mismos (Tadeu, 1979).

LESIONES MORFOLOGICAS

Las lesiones que se presentan en los pollos durante la aflatoxicosis también son variables y dependen de la dosis y del tiempo de consumo.

El hígado es el principal órgano afectado, y su peso

relativo aumenta significativamente aún con dosis bajas de aflatoxinas, el incremento en el peso relativo es debido a una acumulación progresiva de lípidos (Reddy y col., 1984). Huff y col. (1986), mencionan que la atrofia hepática y no la hepatomegalia, es el cambio inicial en etapas tempranas de la intoxicación. Además de la hepatomegalia, el hígado puede presentar palidez, firmeza, congestión y áreas hemorrágicas, zonas puntiformes de color gris blanquecino, distensión de la vesícula biliar con edema de la pared vesical y menor viscosidad del líquido biliar (Smith y Hamilton, 1970; Newberne, 1973; Reddy y col., 1984; Giambrone y col., 1985b; Defalla y col., 1987).

Histopatológicamente se ha observado tumefacción de los hepatocitos en los casos agudos y variación en el tamaño de los hepatocitos y de sus núcleos (micronúcleos) en los casos subagudos (Nibbclink, 1987). En los casos crónicos se observa degeneración grasa de los hepatocitos, necrosis centrolobulillar, fibrosis, proliferación irregular y progresiva de los conductos biliares, cálculos biliares, dilatación de vasos linfáticos, áreas focales de infiltración e hiperplasia linfoide y nódulos regenerativos del parénquima hepático (Newberne, 1973; Edds y Bortell, 1983). Nibbclink (1987) reporta que en la intoxicación crónica existe la formación de un nuevo plexo vascular alrededor de la vena central que conduce a una necrosis extensa o a la formación de infartos multifocales.

Defalla y col. (1987) reportan en pollos alimentados con 2.5 ppm de aflatoxinas durante 4 semanas los siguientes cambios patológicos en hígado: en la primera semana congestión de sinusoides, hemorragias focales, vacuolización grasa del citoplasma de los hepatocitos centrolobulillares e infiltración nodular de células linfoides; en la 2da, 3a y 4a semanas, cambios progresivos consistentes en tumefacción y vacuolización de los hepatocitos centrolobulillares, necrosis de algunos hepatocitos y ocasionalmente proliferación de conductos biliares, infiltración linfoide nodular y congestión; en uno de los animales sacrificado durante la 3 semana se observó que la hiperplasia biliar estuvo acompañada por infiltración de fibroblastos.

Además del hígado, otras estructuras se encuentran alteradas, tanto en los casos de campo, como en las reproducciones experimentales de la aflatoxicosis.

Los riñones pueden presentar aumento de tamaño y congestión, o palidez y edema perirrenal (Gardiner y Oldroy, 1965; Smith y Hamilton, 1970; Reddy y col., 1984; Chen y col., 1985; Huff y col., 1986; Defalla y col., 1987). Nibbclink (1987) menciona que la aflatoxicosis crónica puede provocar picnosis y dilatación de las células de los túbulos distales del riñón, y que a dosis elevadas (mayores de 10 ppm) además de la necrosis, los túbulos renales pueden contener pigmentos biliares, hialinos y lípidos. Defalla y col. (1987) observaron que la ingestión de dietas con una

dosis de 2.5 ppm por cuatro semanas provoca vacuolización del epitelio tubular renal, infiltración linfoide en glomérulos e intersticio, y la presencia de un material hialino homogéneo en la luz de algunos túbulos.

El corazón puede observarse aumentado de tamaño, con congestión o con excesiva cantidad de líquido pericárdico, Defalla y col. (1987) observaron infiltración linfoide entre las fibras musculares cardíacas.

Las observaciones de campo indican que la bolsa de Fabricio llega a presentar reducción en su peso relativo y distintos grados de atrofia, que dan la apariencia de un incremento en el número de folículos linfoides (Thaxton y col., 1974; Morilla, 1980; Campbell y col., 1983; Defalla y col., 1987; Rosiles, 198). Ubsi y col. (1985 a) reportaron que una dosis de 996 ppb durante 6 semanas, causó una disminución en el tamaño de la bolsa, aunque Reddy y col. (1984), con una dosis de 6 ppm por 28 días, no encontraron alteraciones en el peso relativo del órgano.

El bazo tiende a observarse aumentado de tamaño y congestionado, con reducción en la población de linfocitos en la pulpa blanca (Thaxton y col., 1974; Morilla, 1980; Huff y col. 1986; Defalla y col., 1987).

El timo puede sufrir disminución en su peso relativo y depleción linfoide (Thaxton y col., 1974; Morilla, 1980; Ubsi y col., 1985b; Rosiles, 1987), aunque éste hallazgo puede no ser observado en las reproducciones experimentales

de la enfermedad (Reddy y col. 1984).

Se ha observado una disminución en la fuerza de los huesos de las extremidades de los pollos de engorda (Huff y col., 1984), y la médula ósea se observa pálida (Tung y col., 1975; Huff y col., 1986; Pegram y Wyatt, 1986).

El aparato digestivo presenta inflamación de proventrículo y molleja por un efecto irritante directo de las toxinas (Hofstad, 1984). El páncreas puede estar aumentado de tamaño y edematoso (Richardson y Hamilton, 1987; Cavalheiro, 1983) y en el intestino se observa enteritis mucosa a nivel de duodeno. Hamilton (s.a.) menciona un efecto raro de las aflatoxinas durante un brote experimental, en el que el 15% de las aves afectadas mostraron ruptura del intestino grueso al pasar por la inspección de rastro.

Otros hallazgos morfológicos observados han sido crestas y piernas pálidas, hematomas subcutáneos sobre los músculos pectorales y los muslos (Chen y col., 1985; Defalla y col., 1987; Rosiles y col., 1987), canales congestionadas y ligero edema general (Hofstad, 1984).

PATOLOGIA CLINICA

Las aflatoxinas tienen un efecto depresor sobre los tejidos hematopoyéticos y esto se ve reflejado en la sangre, tanto en el suero como en los elementos celulares (Mohiuddin y col., 1986).

Los hallazgos a nivel serológico incluyen disminución

significativa de proteínas plasmáticas, prealbúmina, albúmina, alfa globulinas, beta globulinas, lipoproteínas y fracción inunoglobulina IgG (IgY) y del factor de coagulación protrombina (Pier, 1973; Campbell y col., 1983; Huff y col., 1986; Pegram y Wyatt, 1986; Defalla y col., 1987; Rosiles, 1987). La concentración de gamaglobulinas está normal o incrementada en la mayoría de los casos (Pier, 1973).

La hipoproteïnemia es debida a una reducción hepática de la síntesis proteica y a una mayor fragilidad capilar, lo que permite la fuga de proteínas al intersticio (Smith y Hamilton, 1970; Morilla, 1980; Nibbclink, 1987).

Una consecuencia importante de la hipoproteïnemia es la hipocoagulabilidad sanguínea y la presencia de hemorragias espontáneas cutáneas, sobretodo en la membrana interdigital (Tung y col., 1975; Microcha, 1982; Huff y col., 1984; Rosiles, 1977). Nibbclink (1987) menciona que una de las causas de la coagulación deficiente es la sustitución de la molécula de cumarina por la aflatoxina.

Con respecto a la cuantificación enzimática del suero, aún a dosis bajas de aflatoxinas se observa un incremento en los niveles de transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP), fosfatasa alcalina sérica (FAS), deshidrogenasa láctica (DHL) y de la lipasa y amilasa pancreática, y un aumento de la sorbitol deshidrogenasa (DHS) y de la deshidrogenasa glutámica (DHG)

(Thaxton y col., 1974; Pegram y Wyatt, 1986; Huff y col., 1986; Defalla y col., 1987; Richardson y Hamilton, 1987). Ubsi y col. (1985) encontraron una reducción de las enzimas microsomales y solubles de hígado, lo que puede incrementar la susceptibilidad a ciertos tóxicos que son inactivados por estas enzimas.

Otros perfiles químicos sanguíneos que se ven alterados son colesterol, ácido úrico, potasio y calcio, que están disminuidos (Huff y col., 1986; Pegram y Wyatt, 1986; Defalla y col., 1987), mientras que los niveles de sodio y ácido glucolítico están aumentados (Defalla y col., 1987). Clarke y col. (1986) mencionan que en pollos White Leghorn machos alimentados con 10 ppm de aflatoxina los niveles plasmáticos de testosterona y hormona luteinizante (LH) se reducen significativamente.

En lo que respecta a los cambios en los elementos celulares de la sangre varios autores mencionan que las aflatoxinas producen anemia caracterizada por una disminución en los valores de hematocrito (ht), del número total de glóbulos y de la concentración de hemoglobina (Hb), aún en dosis muy bajas (Smith y Hamilton, 1970; Tung y col., 1975; Lanza y col., 1977; Campbell y col., 1983; Mohiuddin y col., 1985; Huff y col., 1986). Sin embargo, el origen de la anemia no ha sido bien determinado.

Antes del descubrimiento de las aflatoxinas, Forgacs y Carll (1962), reportan a *A. flavus* como el agente causal del

Síndrome de anemia hemorrágica de los pollos, el cual se presentaba con el consumo de alimento enmohecido y se caracterizaba por hemorragias espontáneas en músculos y órganos internos y por anemia aplástica; sin embargo, Tung y col. en 1970 observaron que la dieta con aflatoxinas aumenta la fragilidad capilar, pero no causa sangrado espontáneo (Tung y col., 1975). La determinación del origen de la anemia se realiza por observaciones en el número y tamaño de los glóbulos rojos, su concentración de hemoglobina y la respuesta adaptativa de la médula ósea, así, en la anemia aplástica hay disminución de ht, Hb y del número de gl. rojos, con aplasia de médula ósea y sustitución del tejido hematopoyético por tejido adiposo; mientras que en una anemia hemolítica hay macrocitosis leve e hiperplasia de médula ósea (Jubb y col, 1985).

Tung y col. (1975), utilizando dosis graduales de aflatoxinas, observaron una disminución en los valores de ht, Hb y del número de gl. rojos, con hiperplasia mieloide y disminución en el tejido adiposo de la médula ósea, además observaron esplenomegalia y una leve respuesta macrocítica en aquellas dosis bajas que disminuyeron el conteo de eritrocitos pero no provocaron cambios en ht y Hb, sugiriendo fuertemente el origen hemolítico de la anemia. Lanza y col. (1977) encontraron que la disminución en los valores de ht, Hb y número de gl. rojos es proporcional al nivel de aflatoxinas administrado. La variabilidad en las respuestas

de acuerdo a la dosis administrada sugiere un efecto acumulativo. La rapidez con la que ocurren dichos cambios postula una posible inhibición de la hematopoyesis, una hematopoyesis anormal, un incremento en la destrucción de gl. rojos, o bien una combinación de los tres mecanismos. Datos recientes sugieren que la hematopoyesis anormal puede jugar un papel importante en la anemia inducida por aflatoxinas debido a que los eritrocitos de los pollos intoxicados son más sensibles a cambios osmóticos, su vida media se reduce o finalmente sus anomalías pueden ser reconocidas y las células eliminadas en el bazo (Huff y col., 1986).

En cuanto a la cuenta leucocitaria, las aflatoxinas producen un aumento en el número total de gl. blancos cuando los niveles tóxicos son elevados, esta es otra característica de la anemia hemolítica y se cree debida a la hiperplasia medular de células progranulocíticas. La leucocitosis está determinada por un incremento en la proporción de heterófilos. Los trombocitos, linfocitos y basófilos disminuyen. La linfocitopenia indica una acción inmunosupresora de las aflatoxinas y la basopenia se presenta en el estadio final de la enfermedad. Los monocitos y los eosinófilos generalmente permanecen sin cambios y, sólo en el caso que exista infección secundaria, habrá eosinopenia (Tung y col., 1975; Chang y Hamilton, 1979a y 1979b; Mchiuddin y col., 1986). Se ha observado una respuesta similar de los leucocitos circulantes cuando los pollos sufren una situación

de estres.

ALTERACIONES EN EL SISTEMA INMUNOLOGICO

El más intenso, pero a la vez más sutil efecto de las aflatoxinas es su capacidad para alterar la funcionalidad del sistema inmunológico (Morilla, 1980; Pier y Mc Loughlin, 1985), aparentemente a través de su acción sobre las células mediadoras del sistema inmunológico, así como también sobre los mecanismos de defensa naturales del organismo.

El papel de las aflatoxinas como agentes inmunodepresores ha sido objeto de numerosas investigaciones. Pier y Mc Loughlin en una extensa revisión sobre el tema en 1985, mencionan los siguientes 5 puntos básicos al respecto:

(1) Las aflatoxinas alteran la inmunogénesis sin suprimir la formación de anticuerpos en la mayoría de los estudios.

(2) Las aflatoxinas deprimen la formación de sustancias humorales no específicas relacionadas con los procesos de resistencia e inmunidad, principalmente complemento e interferón.

(3) Las aflatoxinas inhiben la fagocitosis por los macrófagos.

(5) Las aflatoxinas deprimen la inmunidad mediada por células, principalmente la hipersensibilidad retardada cutánea; la linfoblastogénesis y la migración leucocitaria son deprimidas en grados variables.

Estos hallazgos son resumidos en el Cuadro 3 con

referencia a investigaciones individuales.

Sin embargo, los mecanismos exactos de la inmunodepresión inducida por aflatoxinas permanecen oscuros. Los efectos sobre interferón, complemento y proteínas séricas son presumiblemente el resultado del daño hepático y de la inhibición en la síntesis de proteínas. Los efectos sobre la inmunidad mediada por células (IMC) son inexplicados, y aparentemente son el resultado de alteraciones en las poblaciones de linfocitos de sangre periférica, en la función linfocitaria, en la producción de linfocinas y/o en la función de los macrófagos (Pier y Mc Loughlin, 1985).

Las alteraciones en los órganos del sistema inmunológico ya han sido mencionadas al hablar de LESIONES MORFOLOGICAS. Las aflatoxinas producen deplesi6n del timo con destrucci6n de timocitos corticales y en algunos casos atrofia y/o necrosis de la bolsa de Fabricio. Estos efectos son semejantes a los que producen el virus de Marek sobre el timo y la bolsa de Fabricio, el virus de la Infecci6n de la Bolsa de Fabricio sobre la bolsa y las drogas radiomiméticas en el tejido linfoide, y pueden explicar algunos factores desencadenantes de la inmunodepresi6n (Morilla, 1980).

Las sustancias humorales no específicas mas afectadas durante la aflatoxicosis son el complemento y el interfer6n. Campbell y col. (1983) demostraron una reducci6n en la actividad del complemento en pollos alimentados con 2.5 ppm de aflatoxinas por tres semanas, mientras que Stewart y col.

Cuadro 3.- Efectos de las aflatoxinas en en la inmunogenesis del pollo de engorda.

EFEECTO	MODELO	REFERENCIA
Susceptibilidad incrementada	<i>Candida albicans</i>	Hamilton y Harris, 1971
Susceptibilidad normal	<i>Salmonella gallinarum</i>	Smith y col., 1969
Susceptibilidad incrementada	3 especies de <i>Salmonella</i>	Boonchavit y Hamilton, 1975
Susceptibilidad incrementada	<i>Himeria tenella</i>	Edds y col., 1973
Susceptibilidad incrementada	<i>Himeria tenella</i>	Wyatt y col. 1975
Susceptibilidad incrementada	Infeccion de la bolsa de Fabricio	Bryden y col., 1963
Hipoplasia de timo y bolsa de Fabricio		Thaxton y col., 1974
Depresion de hipersensibilidad cutanea retardada e injerto vs hospedador		Giambrone y col., 1978
Fagocitosis interferida		Chang y Hamilton, 1979
Produccion de Ac normal	<i>Salmonella pullorum</i>	Adinaryanaiah y col., 1973
Produccion de Ac retardada	Eritrocitos de carnero	Michael y col., 1973
Supresion de IgM e IgG (IgM normal)		Giambrone y col., 1978

Pier y McLoughlin, 1985.

(1985) demuestran el mismo efecto con 2.5 ppm por 6 semanas; observaciones similares se han hecho con respecto al interferón (Hofstad, 1984).

Las investigaciones para evaluar los efectos de las aflatoxinas sobre la inmunidad humoral específica han arrojado resultados contradictorios. Algunos autores, como Thaxton y col. (1974) mencionan que existe una marcada depresión en la formación de anticuerpos contra eritrocitos de carnero (ERC) cuando las aves consumen aflatoxinas. Edds y Bortell (1983) mencionan que la depresión en la producción de anticuerpos es muy evidente cuando los animales consumen las aflatoxinas en el momento de la vacunación, y es moderada cuando las consumen después de la misma. Sin embargo, Giambrone y col. (1978b) utilizando vacunas de Newcastle y Bronquitis infecciosa, Giambrone y col. (1978a) evaluando aglutininas naturales contra eritrocitos de conejo, Campbell y col. (1983) con ERC y *Brucella abortus*, Ubsi y col. (1985a) con ERC y Giambrone y col. (1985a) con virus de Newcastle y *Pasteurella multocida*, no lograron demostrar una disminución en la formación de anticuerpos específicos por el consumo de aflatoxinas, a diferentes dosis y en diferentes tiempos. Giambrone y col. (1978a) indican que hay una disminución en la concentración sérica total de IgG (IgY), pero no de IgM, tras el consumo de 2.5 ppm de aflatoxinas durante las primeras cuatro semanas de vida de los pollos.

Los cambios que se han observado sobre la inmunidad

celular inespecífica en la aflatoxicosis incluyen inhibición de la actividad quimiotáctica, tanto espontánea (indirecta) como dirigida (directa) de heterófilos, monocitos y macrófagos alveolares; así como alteración en la capacidad fagocítica de heterófilos, monocitos y macrófagos, pero no de trombocitos (Chang y col. 1976; Chang y Hamilton, 1979a; Chang y Hamilton 1979b; Mohiuddin y col., 1986). Se sugiere que estos efectos sean debidos a la existencia de bajos niveles de complemento en suero, de acción quimiotáctica y opsonizante y/o a una alteración intrínseca de los fagocitos sanguíneos para salir de torrente circulatorio y llegar a los focos inflamatorios de los tejidos; el hecho de que el porcentaje de fagocitosis de los trombocitos no sea afectado, es debido a que este proceso es independiente del sistema del complemento (Chang y Hamilton, 1979a).

Mohiuddin y col. (1986) evaluando la remoción de carbón coloidal de la circulación y la fagocitosis de las células de Kupffer demostraron que la ingestión de 20 ppm de aflatoxinas por tres meses reduce drásticamente la actividad del sistema reticuloendotelial.

La inmunidad mediada por células (IMC) es la porción del sistema inmunológico mas severamente afectada por la ingestión de aflatoxinas, y aunque el mecanismo de acción permanece aún sin entender, investigaciones recientes han aportado nuevos datos al respecto. Diversos autores han reportado que la aflatoxicosis cursa con una inhibición de la

respuesta de hipersensibilidad cutánea retardada, inhibición de la liberación del factor inhibidor de la migración de leucocitos y en la respuesta de injerto contra hospedador (Morilla, 1980). Giambrone y col. (1978a) reportan que 2.4 ppm de aflatoxinas durante 4 semanas disminuyen de manera marcada la reacción de injerto contra hospedador, y la ingestión por 7 semanas reduce la reacción cutánea de hipersensibilidad retardada hacia la tuberculina. Giambrone y col. (1985a y 1985b) evaluaron la IMC mediante pruebas de hipersensibilidad retardada a fitohemaglutinina (PHA) y a antígenos de *Mycobacterium*, reacción de injerto contra hospedador y linfoblastogénesis con concanavalina A, encontrando que la depresión de la IMC es dosis dependiente y se observa a partir de 200 ppb de aflatoxinas por 5 semanas, los efectos mas severos fueron hacia PHA y Concanavalina A.

Las características del hemograma de la intoxicación son anemia, hipoproteinemia y leucocitosis con heterofilia y linocitopenia (Campbell y col. 1983; Mohiuddin y col. 1986), sin embargo, los estudios sobre las subpoblaciones de linfocitos circulantes fracasan en demostrar diferencias entre las poblaciones absolutas de células B y T (Pier y Mc Loughlin 1985).

El último factor a considerar en la capacidad inmunodepresora de las aflatoxinas es la naturaleza de las mismas. La AFB1 químicamente pura es mucho menos inmunodepresora que en mezcla, y el efecto inmunodepresor es

más intenso cuando aflatoxinas son administradas en cápsulas de gelatina que cuando se administras puras. Giambrone y col. (1985a) reportan que la AFB1 administrada en cápsulas no deprime la IMC a una dosis tan alta como 1000 ppb, mientras que si se administra junto con AFB2 la dosis requerida para la disminución de la IMC es de 100 ppb. Estos hallazgos abren nuevas interrogantes sobre el mecanismo de acción de las aflatoxinas, como por ej. la presencia de otra(s) tóxicas junto con la AFB1 para poder generar la inmunosupresión o la posibilidad de que la AFB1 se pueda unir a algún componente de la dieta y con esto disminuir su absorción y/o su actividad biológica.

Toda esta serie de cambios inmunológicos se ven reflejados en un incremento de la susceptibilidad de las aves hacia diferentes enfermedades como coccidiosis (Edds y col., 1973; Wyatt y Huff, 1975), tifoidea y paratifoidea (Boonchuvit y Hamilton, 1976), candidosis (Hamilton y Harris, 1971), Infección de la bolsa de Fabricio (Hamilton, s.a.; Giambrone y col., 1978); y los casos de campo frecuentemente se complican con algunos padecimientos infecciosos (Giambrone y col., 1978b). Cabe señalar que no se ha logrado reducción en la resistencia contra la enfermedad de Newcastle ni contra infecciones por *Aspergillus fumigatus* (Pier, 1973; Rosiles, 1987; Rao y col., 1985).

Al parecer, el daño inmunológico que sufren los pollos durante la aflatoxicosis es sólo temporal, ya que sólo ocurre

durante el período en el que las toxinas se ingirien (Giambrone y col., 1978a; Morilla, 1980; Pier y Mc Loughin, 1985).

SIGNOLOGIA

Los signos de la aflatoxicosis aviar son muy variables, dependiendo de los niveles tóxicos en el alimento y del tiempo de ingestión (Nibbclink, 1987).

En los casos de aflatoxicosis hiperagudas con dosis masivas, se puede observar muerte súbita (por falla hepática) sin signos clínicos evidentes (Nibbclink, 1985).

Los signos de la aflatoxicosis aguda, cuando se observan, incluyen anorexia, epistaxis, melena, y ocasionalmente se presentan signos nerviosos como ataxia y opistótonos, muriendo los animales con las patas rígidas y extendidas hacia atrás, entre 10 y 14 días después de la ingestión de la toxina (Rosiles, 1987).

En el caso de la intoxicación crónica, los signos que se pueden presentar son pérdida gradual del apetito, deficiente ganancia de peso, baja en el ritmo de crecimiento y aumento en el rango de conversión alimenticia (de 2.0-2.1 a 2.3-2.4). Esta conversión alimenticia es uno de los signos más relevantes porque es común en todas las especies y tiene gran impacto económico; este parámetro representa la suma de muchas influencias, pero en sentido práctico representa una falla en la utilización de nutrientes. También se ha

observado un aumento en la tasa de mortalidad (Chen y col., 1985; Edds y Bortell, 1983; Giambrone y col., 1985; Richardson y col., 1986. Ubosi y col., 1985a).

La observación individual de los animales revela que el buche no se llena completamente y se oye un grito de descontento, algunos animales presentan las alas caídas y las plumas revueltas y rotas con tendencia a la automutilación. Se puede llegar a observar decoloración purpúrea de patas y piernas, coprófagia y esteatorrea, con partículas de alimento sin digerir en heces (Edds y Bortell, 1983).

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la aflatoxicosis es difícil ya que los signos y las lesiones son poco específicos. El diagnóstico debe apoyarse en la historia clínica de la parvada, los parámetros productivos, los signos clínicos y los hallazgos de los estudios de necropsia e histopatología.

Son características de un brote de aflatoxicosis el incremento de los problemas veterinarios de causa difícilmente reconocida, la falta de transmisibilidad de la enfermedad de un animal a otro y el poco o nulo efecto del tratamiento con antibióticos o drogas a los animales afectados (Goldblatt, 1973). Un estudio cuidadoso revela una asociación con un alimento específico, como harina de cacahuate, arroz o maíz contaminado, la examinación del alimento sospechoso suele revelar signos de actividad fungal

(Purchase, 1974).

El diagnóstico definitivo de la aflatoxicosis se determina realizando pruebas de laboratorio, tanto químicas como biológicas, para la detección de las toxinas en el alimento y/o en los tejidos de los animales afectados.

Los métodos de detección de aflatoxinas se pueden agrupar en 4 categorías (Romer, 1976):

1. Pruebas de campo: son aquellas que pueden ser utilizadas en los molinos y fabricas de alimento, su mayor uso estriba en que son muy rápidas y evitan demoras excesivas y costos de evaluación.
2. Pruebas de identificación: son pruebas que sirven para identificar grandes lotes de granos que puedan estar contaminados con aflatoxinas. Como la mayoría de las muestras no contienen cantidades detectables de aflatoxinas, se requieren métodos que identifiquen a la mayoría de las muestras no contaminadas con gastos mínimos de tiempo y dinero; una prueba de identificación ideal no debería dar resultados falsos negativos.
3. Pruebas de confirmación: son pruebas que confirman la presencia o ausencia de aflatoxinas en alimentos, huevo, heces, orina o tejidos, son mucho más precisas que las anteriores; una prueba de confirmación ideal no deberá dar resultados falsos positivos.
4. Pruebas cuantitativas: son pruebas que determinan la cantidad exacta de aflatoxinas en la muestra, se utilizan

cuando los resultados de las pruebas de identificación y confirmación son positivas.

Algunas características importantes de estas pruebas se presentan en el Cuadro 4.

MUESTREO

En general se reconoce que el muestreo es el primer paso crítico para cualquier análisis químico que se desee efectuar a un alimento. Esto es particularmente cierto cuando se trata de un análisis para aflatoxinas. La razón por la cual se deben extremar las precauciones al momento de tomar la muestra es que las tóxicas no se encuentran uniformemente distribuidas en el alimento. Las aflatoxinas tienden a concentrarse en ciertas zonas del alimento, especialmente en donde existen pequeños focos de humedad que determinan un microambiente favorable para el desarrollo del hongo. Se recomienda tomar varias muestras de diferentes zonas del alimento almacenado y que éstas sean analizadas de manera individual para conocer el nivel real de contaminación (Wyatt, 1983a).

La muestra debe estabilizarse para evitar modificaciones en la concentración de aflatoxinas por crecimiento adicional del hongo o por degradación bacteriana de las tóxicas; la congelación de la muestra es un método adecuado para la estabilización de la concentración de aflatoxinas en la misma. Se prefiere conservar la muestra hasta su análisis en bolsas de papel ya que las bolsas de plástico tienden a

Cuadro 4.- Metodos analiticos para aflatoxinas

Nombre	Características primarias	Características secundarias	Ejemplo
Campo	Rapidez Facil realizacion	---	Luz UV para deteccion en maiz Hincolumna
Identificacion	Identifica correctamente muestras no contaminadas (no hay falsos negativos)	Bajo costo Deteccion de niveles bajos de toxina Pocos falsos positivos	Cromatografia en capa fina
Confirmacion	Identifica correctamente muestras contaminadas (no hay falsos positivos)	Deteccion de niveles bajos de toxina	Prueba del ac. trifluoroacetico en Cromatografia en capa fina
Cuantificacion	Precisos (reproducibles) Exactos (buena recuperacion)	---	Medicion de la intensidad de fluorescencia en C.C.F. Cromat. Líquida alta Presion

conservar humedad, lo que favorece el crecimiento adicional de los hongos contaminantes (Wyatt, 1983a).

PRUEBAS PRESUNTIVAS

Las pruebas presuntivas rápidas de basan en la fluorescencia característica bajo luz ultravioleta de onda larga asociada con la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Lampara de luz ultravioleta (UV)

La prueba de luz ultravioleta es quizá la prueba más utilizada en relación a la detección de aflatoxinas en materias primas (Wyatt, 1983b). Su uso generalizado basicamente se debe a tres características (1) es la prueba más rápida de todas para la detección de aflatoxinas, (2) el costo del equipo requerido es mínimo, y (3) es muy fácil de capacitar al personal para realizar e interpretar la prueba (Wyatt, 1983b).

La fluorescencia no es debida a la presencia de aflatoxinas, sino que resulta del crecimiento de los hongos productores de las mismas. Cuando los hongos crecen sobre los granos producen un compuesto químico conocido como ácido kójico (2-hidroximetilo-5-hidroxigamapirona), y además quizá produzcan aflatoxinas. El ácido kójico reacciona con ciertos componentes naturales de los granos teniendo como resultado la formación de un complejo químico que produce fluorescencia azul verdosa (FAVB) cuando se observa bajo luz UV. En consecuencia una prueba positiva es simplemente indicativa de

que puede haber aflatoxinas presentes, así esta prueba se clasifica como preliminar, ya que las muestras positivas deberán someterse a un método de análisis más preciso con el objeto de confirmar los resultados (Wyatt, 1983b).

Existen varias fuentes de error en esta prueba, un error consiste en que algunas cepas de hongos que producen muy poco o nada de aflatoxinas producen ácido kójico y por lo tanto se observará fluorescencia positiva; lo contrario también es posible y una cepa en particular puede producir cantidades considerables de aflatoxinas sin producir ácido kójico, y en una muestra positiva a aflatoxinas no se detecte FAVB. También es necesario considerar la presencia de varios tipos de fluorescencia, visible en el maíz, de color blanco, rojo, azul o amarillo, que no tienen relación directa con las aflatoxinas y que también deberán ser descartadas; si existe duda de que la fluorescencia observada sea FAVB, se puede observar entonces la solubilidad de la fluorescencia. La fluorescencia es soluble en agua, a diferencia de los otros tipos de fluorescencia. La solubilidad se determina fácilmente mezclando algunas partículas fluorescentes con agua y volviendo a examinar la muestra bajo luz UV (Wyatt, 1983b).

Finalmente se debe tomar en cuenta que la prueba de luz UV no siempre produce resultados satisfactorios cuando se usa con algunos ingredientes específicos. Esto se debe a que el complejo formado por el ácido kójico depende de una enzima

peroxidasa que se encuentra unicamente en los granos viables; si la peroxidasa no se encuentra en el material a analizar o no es funcional debido a su desnaturalización por almacenaje o tratamientos físicos o químicos, no habrá fluorescencia aunque exista el crecimiento de hongos y la producción de aflatoxinas; los granos almacenados por periodos largos, productos procesados como las tortas de soya o cacahuete y el gluten de malz, y los productos de origen animal (harinas de pescado o carne) no pueden ser analizados por esta técnica (Wyatt, 1983b, Wyatt, 1988a).

Recientemente, Yabe y col. (1987) describieron un método muy sensible para identificar las cepas de hongos productoras de aflatoxinas, utilizando fotografías ultravioleta. Las cepas a identificar son sembradas en cajas de petri con agar GY (2% glucosa, 0.5% extracto de levadura y 2% agar) y son incubadas a 28 °C por tres días, después de los cual el reverso de las cajas es irradiado con luz ultravioleta de onda larga y es fotografiado con una película para luz UV. Las cepas productoras de aflatoxinas aparecen en las fotografías como colonias grises o negras, mientras que las cepas no productoras aparecen como colonias blancas; estos autores reportan que la intensidad de la coloración colonial es proporcional al grado de producción de aflatoxinas y que las aflatoxinas principalmente detectadas son AFB1 y AFG1. Con esta prueba se pueden identificar correctamente a las cepas productoras de toxinas sin necesidad de realizar un

análisis químico del alimento o del medio de cultivo, aunque lleva mas tiempo que la prueba de la fluorescencia directa sobre la muestra sospechosa.

Minicolumna

El uso de pequeñas columnas cromatográficas (minicolumnas) para la detección de aflatoxinas en alimentos y forrajes fue introducida por Holiday en 1968. La minicolumna consiste en un tubo pequeño de vidrio (aprox. 4 mm de diámetro interior) que es llenado con uno o varios tipos de absorbentes, como fluorisil, silica gel, aluminas ácida, básica o neutra, celulosa o arena; posteriormente son desarrolladas con un sistema de solventes y son observadas bajo luz UV (Shotwell y Stubblefield, 1973; Schuller y col., 1976).

En 1972 Cucullu y col. reportaron un método de rastreo para la detección de aflatoxinas por minicolumna en semilla de algodón; en el mismo año Velasco hizo una modificación a la técnica de Holiday, sin obtener resultados falsos negativos y aumentando la sensibilidad de la prueba, por lo que fué adoptada como método oficial de la A.O.A.C. (Velasco, 1973).

El procedimiento cromatográfico de minicolumna para la detección de aflatoxinas ha sido de uso general en gran número de laboratorios y es aplicado a varios productos agrícolas, sus principales ventajas son la disminución del tiempo de desarrollo, equipo y operación simple y bajo costo

por muestra. Probablemente su desventaja más importante es la baja sensibilidad de la prueba. La prueba de minicolumna solo indica la presencia de las toxinas, mas no su tipo, por otra parte, al trabajar sobre extractos de alimento se incrementa la sensibilidad, el manejo y el tiempo del exámen (Velasco, 1973; Stubblefield, 1986; Romer y col., 1979).

METODOS CUANTITATIVOS

Cuando se necesita determinar con un alto grado de seguridad la concentracion real de aflatoxinas en determinada materia prima, alimento contaminado o tejidos animales, se requieren técnicas mucho más sensibles y específicas como la cromatografía en capa fina (CCF) y la cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) (Stubblefield y Shotwell, 1981; Wyatt, 1983c; Stubblefield, 1986).

Para las dos técnicas, el análisis químico requiere de una serie de pasos separados, antes de realizar la detección y cuantificación final (Romer, 1976) (Cuadro 5).

Una vez molida, la muestra debe ser extraída con un solvente adecuado para tratar de obtener el 100% de la tóxina, evitando al máximo la extracción de impurezas. La solución extraída debe ser separada de la muestra, lo que generalmente se logra mediante filtración.

El extracto debe ser concentrado y todas las impurezas eliminadas. Esta fase de "limpieza" puede requerir de 2 a 4 pasos, como la precipitación de impurezas o aún, en algunos casos, el paso del extracto a través de una columna. Estos

**Cuadro 5.- Pasos basicos para el analisis
quimico de las aflatoxinas**

PASO	DESCRIPCION	OBJETIVO
1. Muestreo	1) Prueba de muestreo	1) Muestra representativa
2. Preparacion de la muestra	1) Molido, mezclado, submuestreo	1) Muestra representativa
3. Extraccion	1) Agitador o mezclador	1) Separacion de las toxinas de los componentes insolubles de la solucion de extraccion
4. Limpieza	1) Particion liq-liq (embudo separacion) 2) Cromat. columna 3) Metales divalentes	1) Separacion de las toxinas de compuestos del extracto de la muestra
5. Separacion final	1) Cromat. capa fina 2) Cromat. gas-liq. 3) Cromat. liq. liq. 4) Cromat. minicolumna	1) Separacion de las toxinas de compuestos que interfieren en la deteccion
6. Deteccion y Cuantificacion	1) Fluorescencia en CCF 2) Fluores. en solucion 3) Absorcion UV en sol. 4) CGL-detector de flama	1) Deteccion y medicion de la respuesta
7. Confirmacion	1) Derivados en CCF 2) Pruebas biologicas 3) Espectrofotometria de masas	1) Identificacion final

pasos de limpieza en los análisis son los que consumen más tiempo, sin embargo, esta fase es la más importante, ya que algunas impurezas encontradas normalmente en materias primas pueden interferir con la metodología de detección, tanto en CCF como en CLAP.

En la mayoría de los casos, el extracto semipurificado debe ser concentrado a un volumen conocido (usualmente 0.1-0.2 ml). Después de completar estos pasos, el extracto está listo para continuar con la fase de detección por cualquiera de las dos técnicas cuantitativas.

Una lista de los métodos cuantitativos disponibles para el análisis de aflatoxinas se muestra en el Cuadro 6. La mayoría de esos métodos han sido valorados por la Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.) en estudios colaborativos. La mayoría de las diferencias entre los métodos se deben al tipo de muestra en la que se utilizan (Romer, 1976).

Los dos últimos métodos listados en el Cuadro 6 se aplican a la mayoría de los ingredientes y alimentos mezclados.

Cromatografía en capa fina

La separación final de las aflatoxinas por Cromatografía en Capa Fina (CCF) se realiza por medio de cromatoplasmas de varios materiales, como alumina, sílica gel o Keisigel G, siendo la sílica gel la más utilizada (Stahr, 1980), desarrollando las placas bajo diversos sistemas de solventes,

Cuadro 6.- Metodos cuantitativos usados para aflatoxinas

Ref.	Principal para limpieza	Separacion final	Deteccion final	Ventajas	Desventajas
13	Cromatografia en columna	CCF	Fluorescencia	Buena limpieza	Costo de solventes Duracion de prueba
14	Particion liq-liquida	CCF	Fluorescencia	Bajo costo	Limpieza regular Precision regular
15	Cromatografia en columna	CCF	Fluorescencia	Buena limpieza	Costo de solventes Duracion de prueba
16	Metales divalentes	CCF	Fluorescencia	Buena limpieza	Duracion de prueba
17	Cromatografia en columna	CCF	Fluorescencia	Buena limpieza	Costo de solventes Duracion de prueba
18	Cromatografia en columna	CCF	Fluorescencia	Limpieza rigurosa	Costo de solventes Duracion de prueba
19	Cromatografia en columna	CCF	Fluorescencia	Aplicado a muchos productos	Costo de solventes Duracion de prueba
20	Cromatografia en columna	CCF	Fluorescencia	Buena limpieza, puede usarse, aplicado a muchos productos	Requiere mucha cristaleria

Novar, 1976

ya sea en forma unidimensional o bidimensional (Moreno y Hernández, 1988). La identificación de las toxinas se realiza mediante la detección del color de la fluorescencia emitida bajo luz UV, determinando el valor de resistencia al flujo (Rf) de cada mancha fluorescente y comparándolo contra una solución estandar de concentración conocida corrida en la misma placa. La cuantificación se realiza mediante la comparación de la intensidad de la fluorescencia de la muestra contra concentraciones conocidas de aflatoxinas, por medio de un densitómetro de placa que lee el Área y la densidad óptica de las manchas fluorescentes; en caso de no contar con un densitómetro, se utiliza una comparación visual de la intensidad de la fluorescencia, con sistemas de aplicación antidiagonales estandarizados (Beljaars y col., 1973).

Cromatografía de líquidos de alta presión

El método de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión es el más sensible para la detección de aflatoxinas, que es llevada a cabo bajo luz UV de onda larga (365 nm). Algunos autores han reportado la detección de subpicogramos de aflatoxinas utilizando CLAP con un fluorómetro láser (que consiste en la detección de la fluorescencia usando un rayo láser) (Diebold and Zare, 1977; Pons and Franz, 1978; Diebold, 1979)

Una idea errónea que se tiene con frecuencia es que la técnica de CLAP es más rápida que la de CCF. Esto podría ser

cierto si se tiene en cuenta que la detección de las aflatoxinas en un extracto usando CCF toma varias horas, mientras que el mismo extracto, cuando se analiza por CLAP toma sólo unos minutos. Sin embargo debe recordarse que los pasos de extracción, limpieza y purificación se requieren para ambas técnicas, y éstos requieren de medio a uno y medio días. Adicionalmente para la CCF se requieren de unos minutos para la preparación del equipo, mientras que para la CLAP se requiere de un período largo antes de usar la máquina, con el objeto de que la columna y el detector electrónico se estabilicen. Quizá el atributo principal de la CLAP es la fase cuantitativa del análisis, siendo la sensibilidad de la CLAP mas elevada que la de CCF, además de que se puede conectar al cromatógrafo una computadora o una calculadora electrónica que permitirán cuantificar instantáneamente la cantidad de toxina de la muestra original, finalmente hay que tomar en cuenta el costo de los aparatos requeridos para una prueba de CLAP (Wyatt, 1983c). Las principales ventajas de los métodos fisicoquímicos estriban en que requieren de una instrumentación costosa, el proceso es lento y complicado ya que solo se puede analizar una muestra a la vez.

Investigaciones recientes han tratado de implementar métodos de diagnostico inmunológico para el ensayo de aflatoxinas en alimentos y muestras clinicas, los mas estudiados son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), existiendo incluso conjugados

comerciales para las técnicas mencionadas. Otra aplicación del diagnóstico inmunológico en los estudios sobre aflatoxinas es la detección del DNA modificado por las toxinas en pacientes intoxicados por medio de anticuerpos monoclonales, que se obtienen con hibridomas a partir de células de mieloma de ratón y células de bazo de ratón sensibilizadas con DNA modificado por la AFB1.

PRUEBAS CONFIRMATORIAS

El paso final de cualquier análisis que resulte positivo a la presencia de aflatoxinas es la confirmación. Las pruebas químicas confirmatorias usadas para las aflatoxinas son 1) la separación en CCF y la detección de sus derivados químicos, y 2) la espectrofotometría de masas (Romer, 1976).

La prueba de confirmación más utilizada es la del ácido trifluoroacético (TFA) que se basa en tres propiedades importantes de las aflatoxinas: 1) las aflatoxinas pueden formar derivados en presencia de TFA en la placa de CCF a temperatura ambiente, b) los derivados se pueden mover a cierta altura en la placa de CCF bajo un sistema de solventes adecuado y, 3) los derivados fluorescen azul verdoso bajo luz UV de onda larga (Romer, 1976).

La prueba de espectrofluorometría se basa en la medición de la masa total de la molécula de aflatoxina y de la masa de los fragmentos que se producen al romper la molécula de la toxina, obteniendo un patrón de referencia de características

particulares (Romer, 1976).

El otro grupo de métodos confirmatorios de las aflatoxinas incluyen la demostración de sus efectos tóxicos en sistemas biológicos, como el uso de cultivos bacterianos con *Bacillus megaterium* (Beuchat y Lechowich, 1971a y b), los cultivos celulares, el embrión de pollo, la trucha arcoiris o el pato pekinés de un día de edad (Goldblatt, 1969; Rosiles, 1977).

TRATAMIENTO

No existe tratamiento eficaz para combatir a las aflatoxinas mientras permanecen en el organismo, por lo que el tratamiento a seguir es retirar inmediatamente el alimento contaminado y proporcionar una ración con bajo contenido de grasas y un alto contenido de proteínas de buena calidad; la terapia será paliativa para minimizar los efectos de los cambios patológicos secundarios (Nibbclink, 1987).

Chen y col. (1984) reportan la desaparición de todos los cambios patológicos aparentes provocados en aves por el consumo de 2057 ug/kg de AFB1 en 35 días, 8 días después de eliminar a la toxina de la ración.

Furtado y col. (1982) reportan a su vez una reducción significativa del nivel de aflatoxinas en todos los órganos de cerdos alimentados con 355 ug/kg durante 42 días, 24 horas después de eliminar a la toxina de la dieta, 4 días después de eliminar la toxina, no lograron detectar aflatoxinas en

ningún tejido. Por otra parte, Richardson y col. (1978) demostraron en pollos de engorda, que el aumento en la concentración de proteína de la ración, de 10.00 a 12.75, aumenta significativamente la dosis efectiva mínima aparente de las aflatoxinas para producir lesiones hepáticas en las aves.

La utilización o disposición de alimentos que contengan aflatoxinas presenta muchas dificultades y representa un serio problema económico; hasta ahora, todavía no parece haber ningún método práctico y eficaz que no sea el retiro o remoción de las aflatoxinas del alimento contaminado. Una posible solución económica podría ser el desarrollo de un aditivo no tóxico para la dieta, o alguna modificación a ésta, que pudiera hacer a las aves más resistentes a los efectos tóxicos de las aflatoxinas.

La eficacia de varias sustancias para antagonizar los efectos tóxicos de las aflatoxinas es de gran interés terapéutico y existen algunas alternativas para enfrentar este problema (Dalvi y col. 1974).

En la terapia de adsorción, las moléculas tóxicas se unen a un acarreador inabsorbible que luego es eliminado del tracto intestinal, arrastrando las toxinas; el carbón activado ha sido reconocido como uno de los adsorbentes no tóxicos más efectivos. Una segunda posibilidad consiste en la conjugación de las toxinas absorbidas y sus metabolitos con tiosoles como el glutatión reducido (GSH). Evidencias

experimentales (Degen y Neumann, 1978) indican que los efectos protectores de la GSH contra la toxicidad de la AFB1 es debida a la conjugación de ambas moléculas a través de la acción de GSH transferasas, el glutatiòn es conjugado con el metabolito tóxico AFB₁-2,-3-epoxido, que es entonces excretado como un ácido mercaptúrico conjugado no tóxico.

La tercera posibilidad de tratamiento es la inducción de enzimas microsomales, que aceleran la transformación de ciertas toxinas in vivo, alterando la duración e intensidad de los efectos tóxicos; el fenobarbital es el inductor más común de enzimas microsomales y actúa incrementando la cantidad de citocromo P-450, que es el sistema enzimático que metaboliza a las aflatoxinas, incluso la intoxicación con aflatoxinas provoca una mayor susceptibilidad de las aves a los organofosfatos metabolizados por este sistema (Ehrich y col., 1985).

Dalvi y col. (1974), utilizando pollos de engorda por 8 semanas, con dietas hasta con 10 ppb de AFB1 y carbon activado (0.1% continuo en dieta), glutatiòn reducido (0.05% en agua de bebida) y pentobarbital (0.05% en agua de bebida, alternado por semana), lograron disminuir los efectos adversos de las aflatoxinas en términos de ganancia de peso y consumo de alimento y, aunque los resultados son aparentemente promisorios, no fueron estadísticamente significativos.

Larsen y col. (1985), en pollos de engorda alimentados

con 3000 ppb de AFB1 por 7 semanas, lograron contrarestar los efectos tóxicos de la toxina con el uso del antioxidante hidroxitoluenobulilado (HTB) administrado en la dieta continuamente a una concentración de 0.013%, evaluando los efectos en términos de ganancia de peso.

PREVENCIÓN Y CONTROL

Es reconocido que el mejor método de control de la aflatoxicosis es la prevención de la formación de las aflatoxinas, pero también es cierto que esto no siempre es posible (Pier, 1981). Cuando las condiciones climáticas predisponen a las cosechas a la formación de aflatoxinas o el daño realizado por insectos permiten que niveles críticos de hongos y toxinas se desarrollen, el control es frecuentemente imposible.

Los procedimientos de prevención y control de la formación de las aflatoxinas deben realizarse en los diferentes pasos de los procesos de elaboración de alimentos. Por ejemplo, las tolvas de almacenamiento para ingredientes deben limpiarse periódicamente, sólo deben comprarse materias primas de buena calidad y se deben mantener condiciones de almacén adecuadas, sin almacenar cantidades excesivas o ingredientes con alto contenido de humedad; también es recomendable el análisis periódico de materias primas y alimentos terminados para detectar el crecimiento de microorganismos y la formación de toxinas (Wyatt, 1985).

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Actualmente, las recomendaciones para mantener bajo control a los hongos de almacén se refieren al manejo adecuado de los volúmenes almacenados; este manejo implica el secado de las cosechas a niveles desfavorables para los hongos, menos del 13.5% de humedad en cereales y del 12% en oleaginosas. Lo anterior no es fácil de llevar a cabo por las carencias de facilidades de secado o bien por las condiciones climáticas de algunas regiones, donde en casi todo el año prevalecen humedades relativamente altas que interfieren el buen secado de los granos. Otra medida que se recomienda es el uso de temperaturas bajas de almacenamiento, lo cual implica un alto costo de almacenes refrigerados (Moreno y Zamora, 1986).

El control de la invasión de los granos por insectos frecuentemente requiere del uso de grandes cantidades de insecticidas y puede generar el depósito de cantidades importantes de otros residuos tóxicos en los granos (Pier, 1981).

El control del crecimiento de los hongos se ha realizado con sustancias fungistáticas y fungicidas y no ha sido muy efectivo; se han utilizado un número importante de sustancias como nistatina, tiabendazol, ácido propiónico, violeta de genciana, ácido sorbico, ácido acético y varias sales del ácido propiónico (Wyatt, 1985; Moreno y Zamora, 1985). La nistatina y el tiabendazol son considerados drogas y son relativamente costosos. Los ácidos propiónico y acético se

han utilizado en granos con alto contenido de humedad, destinados a la alimentación animal, pero no pueden ser utilizados en alimentos para consumo humano ya que imparten un olor y un sabor desagradables, ni tampoco pueden ser utilizados para la preservación de las semillas ya que afectan la viabilidad de las mismas (Moreno y Zamora, 1986).

DETOXIFICACION

Cuando ya se tiene el alimento contaminado, una de las últimas opciones posibles antes de desecharlo es tratar de eliminar a las toxinas presentes en él. Numerosos investigadores han trabajado en este punto, pero los resultados obtenidos están en fase de experimentación, ya que la detoxificación también implica un proceso complejo y costoso.

Cualquier método que se utilice para detoxificar un alimento debe reducir el contenido total de micotoxinas a niveles dentro de los máximos aceptados por las disposiciones oficiales, no debe dejar residuos tóxicos y además no debe afectar el valor nutritivo del alimento tratado (Moreno y Zamora, 1986). Paralelamente, los aspectos económicos de adquisición y de uso deben ser los adecuados para permitir su aplicación sin grandes repercusiones de costos. Los métodos utilizados son los siguientes.

1) Temperatura: aunque los primeros informes a este respecto indicaban que las aflatoxinas eran altamente resistentes a

los tratamientos con calor, actualmente se sabe que la cantidad de toxinas presente puede ser reducida mediante la aplicación de calor seco o húmedo (González, s/a).

En el primer caso, es necesario aplicar temperaturas de 120 °C y presión de 15 psi por cuatro horas, para obtener una reducción hasta del 95%. Químicamente se demostró que el calor abre el anillo lactónico por medio de hidrólisis y posteriormente sucede una descarboxilación. Usando calor seco (roasting), ya sea por convección o por radiación, se ha demostrado reducir en un 70% los niveles de AFBI. El grado de reducción varía ampliamente de acuerdo al tiempo de exposición y a la temperatura utilizados, aunque ninguno de estos tratamientos reduce la concentración de aflatoxinas a los valores máximos permitidos por las autoridades de salud.

Desde el punto de vista práctico, a menos que se tengan calentadores suficientes en cantidad y tamaño, el proceso es poco manuable y costoso, por lo que no es recomendable su uso a gran escala, además de que existen efectos detrimentales en el grano tratado (Gonzales, s/a).

2) Extracción con disolventes: este proceso utiliza la propiedad de solubilidad de las aflatoxinas en solventes polares. Estos métodos tienen como ventajas la extracción total de las toxinas, el que no se formen compuestos derivados con actividad biológica y no hay efectos nocivos notables al resto de los nutrientes de los granos tratados. Las desventajas estriban en la necesidad de equipo adecuado

para el proceso (aunque se puede utilizar el equipo utilizado para la extracción del aceite de oleaginosas), algunos carbohidratos se pierden en el proceso por efecto de lavado y hay un incremento de los costos de producción (González, s/a).

3) Agentes oxidantes:

a) Agua oxigenada.- Existen varios sistemas de oxidoreducción que destruyen la actividad biológica de AFB1 y AFG1, pero no de AFB2 y AFG2. Sreenivasamurthy demostró que el tratamiento de suspensiones acuosas de harina de cacahate con 90 ppb de AFB1, con soluciones de peróxido de hidrógeno al 6%, pH 9.5, por 30 minutos, a 80 C, destruye el 97% de la toxina; la harina tratada no mostró efectos tóxicos en patos de un día de edad. Este procedimiento es altamente atractivo para alimentos altamente proteicos, bebidas y lácteos (González, s/a).

b) Ozonización.- El tratamiento de alimentos contaminados con ozono, puede destruir a las aflatoxinas hasta en un 100%. Este procedimiento puede combinarse con la adición aire y/o oxígeno. Desafortunadamente este proceso disminuye paralelamente la cantidad de lisina disponible y el PER del alimento. Esta técnica pudiera ser atractiva para pastas de oleaginosas, leche y algunos granos (González, (s/a).

c) Hipoclorito de sodio.- Puesto que es un compuesto altamente oxidante, se ha propuesto como inactivador de aflatoxinas con buenos resultados. El pH y la concentración a

la que se utiliza son determinantes para lograr una mayor efectividad. El tratamiento con 0.4% de NaOCl a pH 8 reduce hasta en un 80% los niveles de AFB1 y AFB2 presentes en pastas de oleaginosas; el incremento del pH a 9 y la reducción del NaOCl a 0.3% elimina hasta el 99.5% de las toxinas presentes. La actividad del NaOCl es independiente del tiempo y de la temperatura. El uso de este compuesto como inactivador de aflatoxinas en material y mesas de laboratorio es muy socorrido puesto que la actividad biológica es completamente destruida (Gonzalez, (s/a).

d) Acidos.- La presencia de ácidos fuertes destruye la actividad biológica de las aflatoxinas, debido a la adición catalítica de agua en la doble ligadura del anillo furofurano; los hemiacetales formados son AFB2a (de AFB1) y AFG2a (de AFG1). Los ácidos débiles transforman a las aflatoxinas en sus derivados acetoxi o aceti. En realidad, para que se lleven a cabo estas conversiones, se requieren temperaturas de 90 oC, por lo que su uso práctico tiene muy pocas probabilidades de éxito, además de que los compuestos derivados pueden tener actividad biológica similar a la de las aflatoxinas (Gonzalez, s/a).

e) Bases.- El uso de bases orgánicas e inorgánicas es una alternativa económica para la detoxificación de grandes cantidades de alimentos para uso animal y humano. El refinado de aceites es un caso típico durante el cual se destruyen las aflatoxinas que pudieran tener las oleaginosas. El aceite

crudo generalmente se lava con NaOH 0.3-0.8 N para la remoción de gomas, ácidos grasos libres y pigmentos hidrosolubles; con este proceso el contenido de aflatoxinas a cualquier concentración se reduce hasta menos de 1 ppb; el hidróxido de calcio finamente dividido se usa para eliminar aflatoxinas en la copra, cacahuete y harina de algodón (Gonzalez, s/a).

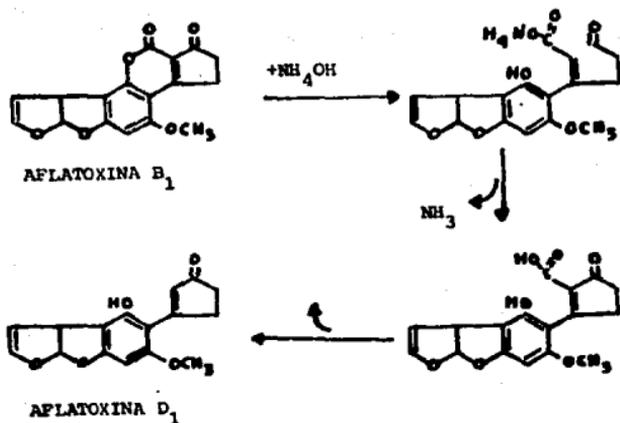
Para tratar cereales, donde las aflatoxinas se encuentran distribuidas en forma aleatoria a lo largo de todo el lote, el uso de metilamina y amoniaco ha sido de buenos resultados. En el caso de la metilamina, se ha encontrado que una concentración de 1.25% reduce el contenido total de aflatoxinas hasta en 5 mg/kg; sin embargo el contenido de lisina se afecta notablemente. Los aspectos económicos de aplicación y algunos otros efectos adversos producidos por compuestos derivados de la metilamina no hacen muy recomendable este proceso (Gonzalez, s/a).

El tratamiento con amoniaco es a la fecha el de mayor éxito, más prometedor y de relativamente bajo costo, por lo que es el más indicado para la detoxificación de alimentos contaminados. La inactivación con amoniaco fué primero desarrollada por Gardner y col. (1971) en cacahuete y harina de algodón. Esta técnica utiliza la adición de amoniaco al grano contaminado, que se deja en reposo por un tiempo relativamente corto para después airearlo con el fin de remover los residuos de amoniaco. Como resultado se observa

una pérdida drástica del contenido de aflatoxinas en el material tratado. La base de la técnica es una reacción química entre las aflatoxinas y el amoniaco, formándose un compuesto conocido como aflatoxina D, que es considerablemente menos tóxico que la AFB1 para la mayoría de los animales domésticos, incluyendo aves. La química de la reacción se presenta en la Figura 4.

El proceso de amoniación debe entenderse como una medida para "salvar" material contaminado cuando los niveles de aflatoxinas no permiten su uso como ingredientes en la ración. A pesar de la efectividad de este proceso, su uso aún no ha recibido aprobación oficial debido a que el amoniaco no es un aditivo permitido en alimentos para consumo humano (Wyatt, 1988b).

4) Detoxificación microbiológica: Existen algunos microorganismos que tienen la capacidad de transformar las aflatoxinas en compuestos atóxicos, entre ellos se puede mencionar al *Flavobacterium auriantiacum* que elimina completamente a la AFB1. Esta bacteria puede desarrollarse en leche, cacahuates y granos. La desventaja de esta alternativa radica en el hecho de que se tiene que añadir una contaminación extra para remover una inicial y quizá esta pudiera dar lugar a otro tipo de problemas. Igualmente efectiva es *Tetrahymena pyriformis* que logra degradar el 60% de AFB1 en dos días, aunque no se conoce si los nuevos productos producidos tienen actividad biológica (Gonzalez,



Wyatt, 1988.

Figura 4. - Química de la reacción de la AFB₁ con amoníaco para su detoxificación.

s/a).

5) Luz ultravioleta: Químicamente se ha demostrado que la luz UV elimina la doble ligadura del anillo furano de la porción cumarínica de la molécula, sin embargo, los productos residuales producidos tienen también una considerable actividad biológica de tipo tóxico, por lo que esta técnica no es recomendable (Gonzalez, s/a).

La decisión del destino del alimento contaminado debe de basarse en los resultados de las pruebas de laboratorio que indiquen el grado de contaminación. Las alternativas y disposiciones oficiales en E.U.A. son las siguientes (Pier, 1981). Si el alimento es nutricionalmente adecuado (ej. no deteriorado por los hongos o los insectos) y contiene 20 ppb o menos de aflatoxinas (como concentración total), puede ser administrado como alimento para animales o comercializado. Para contenidos de aflatoxina de 20-100 ppb, el ingrediente no puede ser comercializado legalmente pero puede ser utilizado como alimento para animales sin gran riesgo (100 ppb de aflatoxinas totales frecuentemente representan aprox. 50 ppb de AFB1), este ingrediente no deberá administrarse a vacas lecheras porque existe el peligro de que AFM1 se elimine en leche, tampoco deberá administrarse en pavos pequeños o lechones por su extrema susceptibilidad a las toxinas. La utilización de alimentos con más de 100 ppb de

aflatoxinas es peligroso en los animales domésticos. Este alimento deberá ser mezclado con uno no contaminado para disminuir la concentración total de aflatoxinas a 100 ppb o menos y será administrado sólo a animales menos susceptibles como bovinos u ovinos adultos, siempre de acuerdo con la legislación local existente para el caso.

Cuando existan grandes lotes de alimentos nutricionalmente adecuados, se debe considerar económicamente el uso de un método detoxificador antes de utilizar dicho alimento (generalmente los alimentos sometidos a procesos de detoxificación no están aprobados para ser comercializados).

La última alternativa es destruir el alimento. Cuando los niveles de aflatoxinas son suficientemente altos para afectar la salud humana o animal y otras alternativas no son recomendables es preferible destruir el alimento que correr los riesgos que implica su utilización (Pier, 1981).

2.- ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO (IBF)

La Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF) o Enfermedad de Gumboro, es una enfermedad viral aguda de pollos jóvenes, altamente contagiosa, que se caracteriza por aparición rápida, corta duración y destrucción severa de los linfocitos de la Bolsa de Fabricio y de otros órganos linfoides (Gordon, 1985).

El Virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio (VIBF) es probablemente el virus inmunodepresor de mayor importancia en la industria avícola, ya sea por sus efectos patológicos directos como por su actividad inmunodepresora (Jordan, 1986). El VIBF es altamente contagioso y extremadamente resistente a medidas de desinfección y sanidad, por lo que es casi imposible mantenerlo fuera de una explotación avícola; una vez establecido en la granja tiende a persistir por mucho tiempo (Giambrone, 1983). Los pollos criados bajo condiciones comerciales tienen altas probabilidades de exponerse al VIBF desde las fases más tempranas de su vida, y aunque esta infección no suele producir una mortalidad elevada, los animales afectados padecen de un estado grave de inmunodepresión y es precisamente este efecto inmunodepresor el que adjudica una gran importancia a la enfermedad en la industria avícola. Las parvadas que presentan inmunodepresión

responden de manera deficiente a las vacunaciones de rutina y desarrollan un incremento en la susceptibilidad a agentes oportunistas (Sharma, 1987). Por lo tanto, la vacunación para prevenir la IBF se ha convertido en una necesidad en las zonas de mayor producción avícola del mundo (Giambrone, 1983).

HISTORIA

La Infección de la Bolsa de Fabricio se reportó inicialmente en 1957 en el distrito de Gumboro, Delaware, E.U.A. Su reconocimiento como una enfermedad específica fue realizado por Cosgrove en 1962, quien la denominó nefrosis aviar por las lesiones que se producían en riñón y que en su momento fue necesario diferenciar de la enfermedad producida por una cepa del virus de la Bronquitis Infecciosa de tendencia nefrotóxica (cepa Gray), estudios posteriores lograron el aislamiento del agente causal de la IBF (Cosgrove, 1962; Winterfield y Hitchner, 1973).

INCIDENCIA Y DISTRIBUCION

La IBF tiene una distribución mundial y se presenta prácticamente en todas las regiones donde existen explotaciones avícolas. En México fue reportada por primera vez por Correa en 1965, quien aisló al virus y reprodujo la enfermedad experimentalmente, posteriormente se realizó una identificación serológica donde se encontró que el 90% de las

parvadas estudiadas tenían anticuerpos neutralizantes contra el virus (Correa, 1981).

ETIOLOGIA

El VIBF no está plenamente identificado en alguno de los grupos taxonómicos de virus conocidos actualmente y diferentes investigadores lo han clasificado previamente como reovirus, picornavirus o diplornavirus; algunos autores proponen clasificarlo en una nueva familia denominada Birnaviridae (Correa, 1981; Gillespie y Timoney, 1983, Sharma, 1989).

El VIBF posee una cadena doble de RNA y 6 proteínas de superficie, es de forma icosaédrica y posee una cápside con 32 capsómeros arreglados en simetría 5:3:2, tiene un diámetro total de 62 nm y su morfología es muy similar a la de los virus de lengua azul y de necrosis pancreática de los peces (Gillespie y Timoney, 1983, Sharma. 1989).

El VIBF es muy resistente al eter y al cloroformo, no es afectado por pH 2 y resiste a los desinfectantes a base de cuaternarios de amonio. Es inhibido a pH 12 y al colocarlo en formalina al 0.5% durante 6 horas hay una marcada reducción del título viral; el virus es inactivado por yodo en 2 minutos a 23 oC y por compuestos derivados del cloro, la cloramina lo inactiva en 10 minutos y el virus puede sobrevivir a 60 oC pero no a 70 oC por 30 minutos (Hitchner, 1978; Correa, 1981; Gillespie y Timoney, 1983).

CULTIVO: El VIBF puede ser cultivado en embriones de pollo procedentes de parvadas que no hayan sufrido la enfermedad y que por lo tanto no tengan anticuerpos maternos que interfieran su multiplicación, la mejor ruta de inoculación es la membrana corioalantoidea, el mayor título viral se obtiene a las 72 horas postinoculación; la inoculación de embriones de 10 días genera mortalidad desde el tercer día postinoculación, con expresión máxima al quinto día; los embriones inoculados presentan edema y distensión de la región abdominal, congestión cutánea y hemorragias petequiales generalizadas (Correa, 1981).

El virus también puede ser cultivado en monoestratos celulares de bolsa de Fabricio, riñón y fibroblastos de embrión de pollo, después de 4 o 5 pases se observa la producción de efecto citopático, formación de placas e inducción de interferón (Hitchner, 1978, Correa, 1981).

El VIBF se replica en el citoplasma celular y antígeno viral puede ser detectado 6 horas después de la inoculación (Correa, 1981).

SEROTIPOS: Aparentemente existen dos grupos serológicos del VIBF, el serotipo 1 aislado de gallinas y patos, y el serotipo 2 aislado de pavos y gallinas; estudios de inmunidad cruzada no han determinado si los diferentes serotipos producen inmunidad cruzada (Correa, 1981), aunque aparentemente no se neutralizan (Sharma, 1989).

Durante el último año se ha reportado la aparición de

cepas de campo de VIBF denominadas "variantes" que producen atrofia severa de la bolsa de Fabricio sin la presencia de edema, hemorragia o necrosis, como lo hacen las cepas conocidas hasta el momento, generalmente no se observan signos clinicos aparentes y las cepas "variantes" son capaces de generar la enfermedad en aves que tienen niveles elevados de anticuerpos maternos o en aves vacunadas con las vacunas comerciales existentes en el mercado (Villegas, 1986).

EPIZOOTIOLOGIA

HOSPEDADORES: las gallinas domésticas son la única especie en la que la infección natural ha sido reportada, aunque el virus ha sido aislado de patos y pavos; todas las razas de gallinas pueden ser infectadas aunque se ha reportado que la raza White Leghorn muestra una reacción más severa al virus que las otras razas (Hitchner, 1978).

El efecto de la infección por VIBF depende del estado inmunológico y de la edad de los animales afectados. Dependiendo de la edad de los animales afectados, dos tipos de enfermedad completamente diferentes pueden ocurrir (Giambrone, 1983).

Si las aves son infectadas en los primeros 8 días de edad, ocurre una enfermedad sin signos clinicos aparentes, actualmente esta forma subclínica de IBF es más común económicamente importante (Giambrone, 1983; Luckert, 1983).

La segunda forma de IBF ocurre cuando la infección se

observa en aves mayores de 8 días de edad, la infección es este caso resulta en una forma clínica de IBF que puede reducir la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia, así como morbilidad y mortalidad evidentes (Giambrone, 1983), se piensa que los animales son más susceptibles a la forma clínica de la enfermedad entre la tercera y la sexta semana de vida, aunque el cuadro clínico ha sido reportado desde la 2da hasta la 15a semanas de edad (Ley y col., 1983). La presentación de la enfermedad en su forma clínica está supeditada a la presencia de la bolsa de Fabricio funcional (Hitchner, 1978).

La infección pasa desapercibida en aves adultas (Gordon, 1985).

TRANSMISION: El VIEF es sumamente contagioso y se difunde rápidamente entre aves afectadas y susceptibles, el virus se elimina en heces de las aves infectadas hasta por 2 semanas (Gordon, 1985) y la infección se transmite por contacto directo y a través de agua y alimento contaminados (Correa, 1981), así como por objetos intermediarios como cama, heces, polvo, utensilios de gallinero, enseres y ropa del personal (Hitchner, 1978). Experimentalmente el virus ha sido transmitido por vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, ocular, intranasal, intracerebral e intracloacal (Correa, 1978, Gordon, 1985). Las aves susceptibles enferman al ser introducidas a locales infectados hasta 122 días después de haber eliminado aves enfermas del mismo local y se

ha demostrado que el gusanillo de la harina *Alphitobius diaperinus* procedente de un local contaminado puede tener capacidad infectante al ser ingerido por aves susceptibles (Correa, 1981).

No hay evidencias de que las aves adultas actúen como portadoras o que el agente sea transmitido a través del huevo (Hitchner, 1978; Gordon 1985).

PERIODO DE INCUBACION: El periodo de incubación es muy corto y evidencias histológicas de infección se pueden observar 24 horas después de una inoculación experimental (Hitchner, 1978). En condiciones naturales los signos clínicos aparecen 4 o 5 días después de poner en contacto aves susceptibles con infectadas y 10 días después de poner aves susceptibles en un ambiente contaminado (Correa, 1981).

MORBILIDAD Y MORTALIDAD: En parvadas completamente susceptibles la enfermedad aparece subitamente, con un elevado nivel de morbilidad, cercano al 100% y signos evidentes; la mortalidad usualmente empieza al tercer día postinfección y desaparece en un periodo de 5 a 7 días, alcanzando un nivel del 20-30%. Los brotes posteriores de la enfermedad en la misma granja son menos severos y pueden pasar desapercibidos. Probablemente esto ocurre cuando las aves se enferman a una edad muy temprana o por la presencia de anticuerpos maternos en el momento de la exposición (Hitchner, 1978).

SIGNOS CLINICOS

La presentación clínica de la enfermedad se caracteriza por depresión marcada, erizamiento de plumas, anorexia, diarrea acuosa blanquecina rica en uratos, deshidratación, tendencia al picoteo de la cloaca, temblores, postración severa y muerte; las inoculaciones experimentales evidencian signos clínicos 24 horas postinoculación (Ley y col. 1983; Craig y col., 1980a y 1980b).

PATOGENIA

Se cree que la vía natural de infección es la vía oral. Por medio de pruebas de inmunofluorescencia y aislamiento se ha encontrado al virus en el tracto digestivo durante las 12 primeras horas postinfección; a las 24 horas hay viremia temporal, observándose una mayor concentración de virus en bazo, bolsa de Fabricio y riñón. La patología primaria de la IBF involucra al sistema linfoide como resultado de la infección directa del VIBF sobre los linfocitos de la bolsa de Fabricio, que son las células blanco para la replicación viral (Santivart y col. 1980; Ley y col. 1983). Al inocular pollitos directamente en la bolsa de Fabricio, las cepas muy patógenas producen signos a las 12 horas y muerte a las 30 horas; la replicación viral inicial ocurre en el citoplasma de las células linfoides y de los macrófagos, a las 6 horas ya hay numerosas partículas virales de 52 a 58 nm, arregladas en forma de cristales, sin ninguna membrana alrededor; a las

7 horas se forma una membrana que segrega a los grumos de virus y que después forma vacuolas que contienen partículas virales y restos celulares. Dentro de las vacuolas ocurre cierta degradación viral, aunque en la mayoría de las células infectadas, especialmente en las linfoides, ocurre lisis celular, liberación viral y difusión de la infección hacia otras células de la bolsa. A las 18 horas los folículos linfoides de la bolsa de Fabricio están casi sin células linfoides. El virus también puede replicarse en heterófilos, células reticulares y células reticulares epiteliales de la bolsa (Correa, 1981). Naqi y Millar (1979), inoculando pollos de un día de edad por vía oral, observaron a las 48 horas reducción en el número y en el tamaño de las microvellosidades de las células epiteliales, acompañado de involución gradual de los folículos de la bolsa; a las 96 horas observaron erosiones superficiales en la mucosa por pérdida de células epiteliales, que finalmente permitieron a los folículos exponerse a la luz bursal, donde finalmente se observó necrosis linfoide extensa.

Las cepas de VIBF muy virulentas pueden afectar además a los linfocitos del timo, bazo, tonsilas cecales y glándula de Harder (Correa, 1981), algunos autores asocian la presencia de lesiones en tejidos no linfoides a la presencia de complejos inmunes circulantes durante la enfermedad (Ley y col., 1979).

LESIONES MACROSCOPICAS

Las lesiones macroscópicas de las aves muertas en el transcurso de la enfermedad incluyen deshidratación, músculos pectorales de aspecto marmoleado por congestión y hemorragias, hemorragias subcutáneas en alas, muslos y piernas, aumento en el contenido de moco en el intestino y hemorragias en el proventrículo; los riñones están aumentados de tamaño y los tubulos renales son claramente visibles, a causa de su distensión por la acumulación de uratos, los ureteres también se encuentran distendidos y llenos de uratos, estas lesiones renales sólo se encuentran en los últimos estadios de la enfermedad, si las aves son observadas en el transcurso de la enfermedad, los riñones permaneces esencialmente normales (Hitchner, 1978, Craig y col., 1980b; Correa, 1981, Gillespie y Timoney, 1983; Ley y col., 1983)).

La bolsa de Fabricio es el órgano blanco de la infección y aquí se observan las lesiones más evidentes. Es muy importante que la secuencia de los cambios sea comprendida cuando se examinan aves para el diagnóstico de la enfermedad. En el 3er día de la infección, la bolsa empieza a aumentar su tamaño y peso debido a hiperemia y edema, alcanza el doble de su tamaño normal al 4to día y después tiende a reducirse; hacia el 5to día postinfección la bolsa regresa a su tamaño normal, y después el órgano continua atrofiandose rapidamente y del día 8 en adelante es de un peso aproximado de un tercio del peso normal (Hitchner, 1978).

En el 2do-3er día postinfección, la bolsa posee un trasudado gelatinoso amarillento, que cubre la superficie serosa. Las estriaciones longitudinales de la superficie empiezan a ser prominentes, y el color blanco normal del órgano se vuelve cremoso. Cuando la bolsa regresa a su tamaño normal, el trasudado desaparece y durante el período de atrofia el órgano adquiere una apariencia grisácea (Hitchner, 1978, Correa, 1981, Gillespie y Timoney, 1983; Ley y col., 1983).

Las bolsas infectadas frecuentemente muestran focos necróticos y a veces petequias y equimosis en la superficie mucosa. Ocasionalmente se han observado hemorragias extensas en todo el órgano, en esos casos las aves pueden evacuar sangre en sus deyecciones (Hitchner, 1978; Craig y col., 1980b).

El bazo puede estar aumentado de tamaño, con focos grisáceos pequeños en la superficie, y se pueden observar hemorragias y atrofia del timo (Gillespie y Timoney, 1983).

LESIONES MICROSCOPICAS

El padecimiento se considera una enfermedad infecciosa linfocida y las lesiones histológicas aparecen en el tejido linfoide de la bolsa de Fabricio, donde son más severas, así como en el bazo, timo, glándula de Harder y tonsilas cecales (Naqi y col. 1979).

La secuencia en la variación de las lesiones

microscópicas permite ubicarlas en tempranas (2-5 días postinfección), intermedias (entre 6 y 11 días) y tardías o crónicas (más de 12 días) (Paasch, 1983).

Los cambios histopatológicos en la bolsa son detectables 36 horas postinfección como necrosis individual de linfocitos en la zona medular de los folículos linfoides; a las 48 horas hay en algunos folículos necrosis linfoide medular y en otros proliferación marcada de células reticulares pálidas. Entre el 3er y 4o día postinfección hay edema en el tejido conjuntivo interfolicular e infiltración heterófila; en el bazo también hay necrosis de las vainas linfoides periarteriolas. A los 6 días en la bolsa de Fabricio hay formación de vacuolas en la zona medular y proliferación de tejido conjuntivo interfolicular. A los 9 días se aprecia cuboidalización del epitelio corticomedular y en el bazo se observa regeneración linfoide de las vainas periarteriolas. A partir de los 12 días epitelio corticomedular de la bolsa adquiere forma columnar dando al órgano un aspecto glandular (Paasch, 1983).

Las lesiones de la bolsa de Fabricio no son exclusivas de la IBF, se puede observar reducción de la población linfoide y atrófia folicular en la enfermedad de Marek, en la reticuloendoteliosis, en la enfermedad de Newcastle, en la deficiencia de Acido pantoténico, en la intoxicación por nitrofurazona y en la intoxicación por aflatoxinas (Paasch, 1983; Rosiles, 1987).

Diferentes autores han agrupado las lesiones microscópicas de la IBF en un sistema único de clasificación de acuerdo a su grado de severidad (Naqi y Miller 1979; Craig y col., 1980b; Ley y col., 1983).

LA INFECCION SUBCLINICA Y EL ESTADO DE INMUNODEPRESION

Como ya se mencionó, si las aves son infectadas durante la primera semana de vida, la enfermedad clínica no ocurre y el cuadro subclínico que se presenta es más común y económicamente importante que la forma clínica (Giambrone, 1983). Aunque los animales aparentemente no presentan alteraciones, tienen un daño extenso en la bolsa de Fabricio, lo que genera un daño permanente en el sistema de producción de anticuerpos (Giambrone, 1983; Luckert, 1983).

La inmunodepresión producida por el VIBF constituye un problema particularmente serio en parvadas jóvenes, sobre todo con bajos niveles de anticuerpos maternos, que llegan a exponerse tempranamente al virus (Sharma, 1989); la replicación viral se lleva a cabo selectivamente en los linfocitos B de la bolsa de Fabricio durante los primeros días después del nacimiento, resultando en una lesión permanente en el sistema inmune del animal (Naqi y col., 1979).

La respuesta inmune humoral es la más severamente afectada, la infección reduce la concentración de IgG (IgY) sérica y la IgM se produce sólo en su forma monomérica y

carece del marcador halotópico MIa que normalmente se presenta en la IgM de los pollos (Sharma, 1987).

La inmunodeficiencia resultante y permanente es el resultado de la siembra periférica de células B defectuosas (Gillespie y Timoney, 1983).

Aparentemente la inmunidad celular también puede afectarse, aunque en menor intensidad; experimentalmente se ha demostrado que el VIBF reduce la respuesta de fitohemaglutinina en linfocitos de bazo a los 5 y 8 días postinfección, pero no a los 14, 28 o 42; también se ha demostrado que se interfiere con la respuesta hacia el virus herpes del pavo para proteger contra la enfermedad de Marek, que depende de la inmunidad celular. Se requieren todavía muchos estudios para comprender la inmunodepresión resultante por la IBF (Hitchner, 1978; Sharma, 1989).

La inmunodepresión resultante de la exposición temprana al VIBF interfiere con el desarrollo de una respuesta inmune adecuada con las vacunas utilizadas rutinariamente en pollitos recién nacidos (Olbers, 1983; Sharma, 1987), además de que incrementa la susceptibilidad a diversos agentes como *Clostridium* spp, *Staphylococcus* spp, hepatitis con cuerpos de inclusión,, enfermedad de Marek (Santivart y col., 1980; Calnek, 1983), *Eimeria* spp (Mc Douglad y col., 1980), *Salmonella* spp y *E. coli* (Wyeth, 1975).

Las parvadas que padecen el cuadro subclínico de IBF generalmente tienen un rango de conversión alimenticia mayor

que las no infectadas y en las plantas procesadoras son llamadas "parvadas desastrosas". Estas parvadas desastrosas tienen una alta incidencia de enfermedades normalmente "no comunes" como dermatitis gangrenosa, enteritis necrótica y ulcerativa, aereosaculitis y coccidiosis, así como síndrome de baja absorción (Giambrone, 1983).

RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VIBF

Resulta interesante el hecho de que, aún cuando el VIBF produce una inmunodepresión generalizada, las aves infectadas desarrollan una respuesta de anticuerpos muy marcada contra el mismo virus. Los anticuerpos antiIBF pueden ser medidos mediante diversas pruebas serológicas, entre las cuales se encuentran las de virus neutralización, inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) e inmunodifusión en agar (Correa, 1981; Gillespie y Timoney, 1983; Castelló y col., 1987).

Los anticuerpos son detectables 3-4 días después de la infección, alcanzan sus niveles máximos en una o dos semanas y pueden persistir por muchos meses. Las pruebas de virus neutralización y ELISA detectan considerablemente niveles de anticuerpos más altos que la prueba de precipitación en agar, la prueba de ELISA detecta niveles de anticuerpos más elevados antes que la prueba de virus neutralización, sin embargo, la prueba de virus neutralización detecta niveles elevados de anticuerpos por más tiempo (García, 1985; Castelló y col., 1987).

DIAGNOSTICO

Desde el punto de vista clinico-patológico, para el diagnóstico de la IBF se debe tomar en cuenta que las aves se enferman y se recuperan rápidamente, y que la mortalidad ocurre en un período muy corto, o sea que se eleva y disminuye subitamente. Las lesiones de la bolsa de fabricio son bastante características. En los casos subclínicos, al hacer necropsias también se pueden encontrar lesiones en la bolsa de Fabricio de animales que no tuvieron signos manifiestos (Correa, 1981; Hitchner, 1978).

Para confirmar el diagnóstico se procede a aislar al virus a partir de riñón o bolsa de Fabricio, inoculando embriones de pollo SPF de 9-11 días de edad, en la membrana corioalantoidea, dando varios pases ciegos seriados (Correa, 1981).

El diagnóstico también puede ser confirmado mediante las técnicas serológicas que se mencionaron anteriormente.

PREVENCIÓN Y CONTROL

Además de las medidas usuales de desinfección e higiene de las granjas localizadas en áreas enzooticas de la enfermedad, la protección de las parvadas comerciales se logra mediante programas de vacunación (Sharma, 1987).

Existen en la actualidad dos métodos para el control de la IBF. 1) vacunación a las gallinas reproductoras para generar niveles altos de inmunidad materna, que sea

transmitida a la descendencia, para proteger a los pollitos durante las dos primeras semanas de edad, o 2) vacunación a la progenie de las gallinas al primer día de edad para prevenir la infección primaria (Giambrone, 1983; Olbers, 1983).

La estrategia más popular en el control de la infección en pollo de engorda consiste en vacunar a las gallinas reproductoras, así los pollitos serán capaces de resistir a la infección con cepas de campo durante los primeros días de su vida y, cuando los anticuerpos maternos disminuyan a niveles subprotectores, se vacuna a los animales con vacunas de virus activo (Olbers, 1983; Sharma, 1989).

El establecimiento de un calendario de vacunación con fechas adecuadas es crítico para establecer una protección óptima de la parvada. Si la vacunación se efectúa con la presencia de anticuerpos maternos, éstos interfieren con la eficacia de la vacuna. Sin embargo, si por el contrario, la vacunación se retrasa hasta después de que los anticuerpos maternos llegan a niveles demasiado bajos, existe el riesgo de que se presente un brote de enfermedad antes de que la protección conferida por la vacuna llegue a ser efectiva (Giambrone, 1983; Sharma, 1989).

Se deben establecer calendarios de vacunación específicos para cada granja, dependiendo de los calendarios de vacunación de las gallinas reproductoras, así como de la verificación serológica de la parvada; se considera que los

anticuerpos detectados por virus seroneutralización con un título de 1100 tienen un efecto protector en el 40% de la parvada y que títulos superiores a 1:600 protegen al 100% de la parvada (García, 1985). Estos factores hacen muy complicado el establecimiento de un programa de vacunación para pollo de engorda y polla de reemplazo (Olbers, 1983).

En las gallinas reproductoras se usa una serie de vacunaciones con vacunas de virus vivo seguida de vacunaciones con productos inactivados, antes de romper postura; este calendario asegura un nivel alto y uniforme de anticuerpos, que es transferido a la progenie, protegiéndola durante las primeras semanas de vida (Giambrone, 1983; Olbers, 1983).

Cuando los títulos de anticuerpos son bajos (menores de 1:64 por virus neutralización) o dispares entre las gallinas reproductoras, se debe aplicar vacunación a los pollitos lo más temprano posible, con el fin de proteger activamente a la mayoría de la parvada. Esto se logra con el uso de vacunas de virus vivo modificado, que son capaces de estimular rápidamente al sistema inmunológico (García, 1985).

Existen diferentes cepas vacunales de virus vivo, las cuales por su virulencia se han clasificado de la siguiente manera (Lukert, 1983): cepas altamente atenuadas no inmunodepresoras, cepas intermedias que pueden causar algunas lesiones en los animales que son vacunados, pero que en

presencia de anticuerpos maternos no producen lesiones ni inmunodepresión, y cepas virulentas que se utilizan con escasa frecuencia porque producen lesiones bursales e inmunodepresión.

Lukert (1983) menciona que las vacunas "suaves" de IBF tienen escasa invasividad hacia la bolsa de Fabricio, pero pueden ser neutralizadas por niveles elevados de anticuerpos maternos. las vacunas altamente patógenas de IBF (calientes) son sumamente invasivas, aunque no interfieren con ellas los anticuerpos maternos. Una vacuna altamente deseable es aquella que tenga propiedades de invasividad intermedia y que no se interfiera por los anticuerpos maternos; siempre se debe tomar en cuenta que algunas vacunas de virus vivo pueden producir efectos detrimentales en los animales vacunados (García, 1985).

La vacunación no es sinónimo de inmunización, cuando se usan vacunas vivas a edad temprana, algunas aves no responden adecuadamente por factores de estres medioambiental, deficiencias nutricionales, consumo de micotoxinas, enfermedad de Marek o bien porque fueron aplicadas cuando estaba presente un brote subclínico de IBF. El virus vacunal generalmente desaparece de la parvada en un periodo muy corto y algunas de las aves permanecen susceptibles a la infección (Giambrone, 1983; Lukert, 1983).

O B J E T I V O

Evaluación de los efectos del consumo de 2.5 ppm (ug/g) de aflatoxinas totales, en el comportamiento productivo, clínico, hematológico, patológico y en la capacidad inmunológica del pollo de engorda, sometido a un programa de vacunación con una cepa comercial de virus vivo de la Infección de la bolsa de Fabricio a los 5 días de edad.

MATERIAL Y METODOS

1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Para el presente estudio fueron utilizados 200 pollos de engorda de un día de edad de extirpe comercial Pilch existente en el mercado, no sexados, sin antecedentes conocidos del estado inmunológico de sus progenitores.

Los animales fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de 50 aves y fueron alojados en corraletas separadas de 2.0 m x 2.0 m en una caseta aislada del Centro de Producción Agropecuaria de la F.E.S. Cuautitlán.

Los animales fueron mantenidos con agua y alimento a libre acceso en bebederos invertidos y comederos de tolva. La dieta consistió en alimento comercial balanceado para pollo de engorda de iniciación* con 22% de proteína, hasta la tercera semana, y en alimento comercial para pollo de engorda de finalización** con 20% de proteína, hasta el final del experimento; los alimentos utilizados fueron certificados libres de micotoxinas en el Laboratorio de Micología de la Unidad de Posgrado de la F.E.S. Cuautitlán. El análisis bromatológico de los alimentos utilizados se muestra en el Cuadro 7.

* Caporina 1, La Hacienda, M.R.

* Caporina 2, La Hacienda, M.R.

Cuadro 7.- Analisis bromatologico de los alimentos utilizados en los animales de experimentacion

ALIMENTO DE INICIACION		ALIMENTO DE FINALIZACION	
Humedad max.	12%	Humedad max.	12%
Proteina min.	22%	Proteina min.	20%
Fibra max.	5%	Fibra max.	5%
Grasa min.	3%	Grasa min.	4.5%
E.L.N. max.	51%	E.L.N. max.	51.5%
Cenizas max.	7%	Cenizas max.	7%

Los animales fueron mantenidos durante 7 semanas. La temperatura de las corraletas se mantuvo constante con el uso de criadoras de gas; la temperatura inicial de cada corraleta fué de 28 oC y fue reducida gradualmente cada semana; el piso de las corraletas fue cubierto con cama de paja de avena de 20 cm de grosor.

2.- PRODUCCION DE LAS AFLATOXINAS

A).- Cultivo e inóculo.- Para el presente estudio se utilizó una cepa de *Aspergillus flavus* J.M.I. 91019, caracterizada por producir AFB1 en el sustrato adecuado. La cepa utilizada fué amablemente proporcionada por la Dra. Irma Tejada, del I.N.I.F.A.P., S.A.R.H., México.

La cepa de *A. flavus* fué cultivada en tubos inclinados con 10 ml de agar de papa (ADP)* por el método convencional en picadura; los tubos fueron incubados a 28 oC por 5 días. La identificación de la cepa se realizó por las técnicas convencionales descritas en la literatura (Raper y Fennell, 1970) y los subcultivos frescos fueron usados en todo el experimento

La preparación del inóculo se realizó sembrando la cepa por el método convencional de estria en tubos con 10 ml de ADP que fueron incubados a 28 oC por 5 días en una estufa bacteriológica. La recolección de esporas se realizó con una solución de medio Tween 80 al 1% en solución salina fisiológica. El conteo de esporas se realizó por el método de hemocitómetro utilizando una cámara de Neubauer y una pipeta de Thoma para glóbulos blancos,

como ha sido descrito previamente (Valladares, 1986). La suspensión de esporas fué ajustada a una concentración de 1×10^6 esporas/ml y la viabilidad de las esporas fué determinada por el cultivo de 0.5 ml de la suspensión en placas con ADP, que fueron incubadas a 37 °C por 24 horas.

* Lab. Bioxón, México, M.R.

B).- Producción de aflatoxinas.- El método utilizado para la producción de aflatoxinas fué una adaptación al método descrito por Shotwell y col. (1966) para la producción de aflatoxinas por fermentación sólida en arroz (Fig. 5).

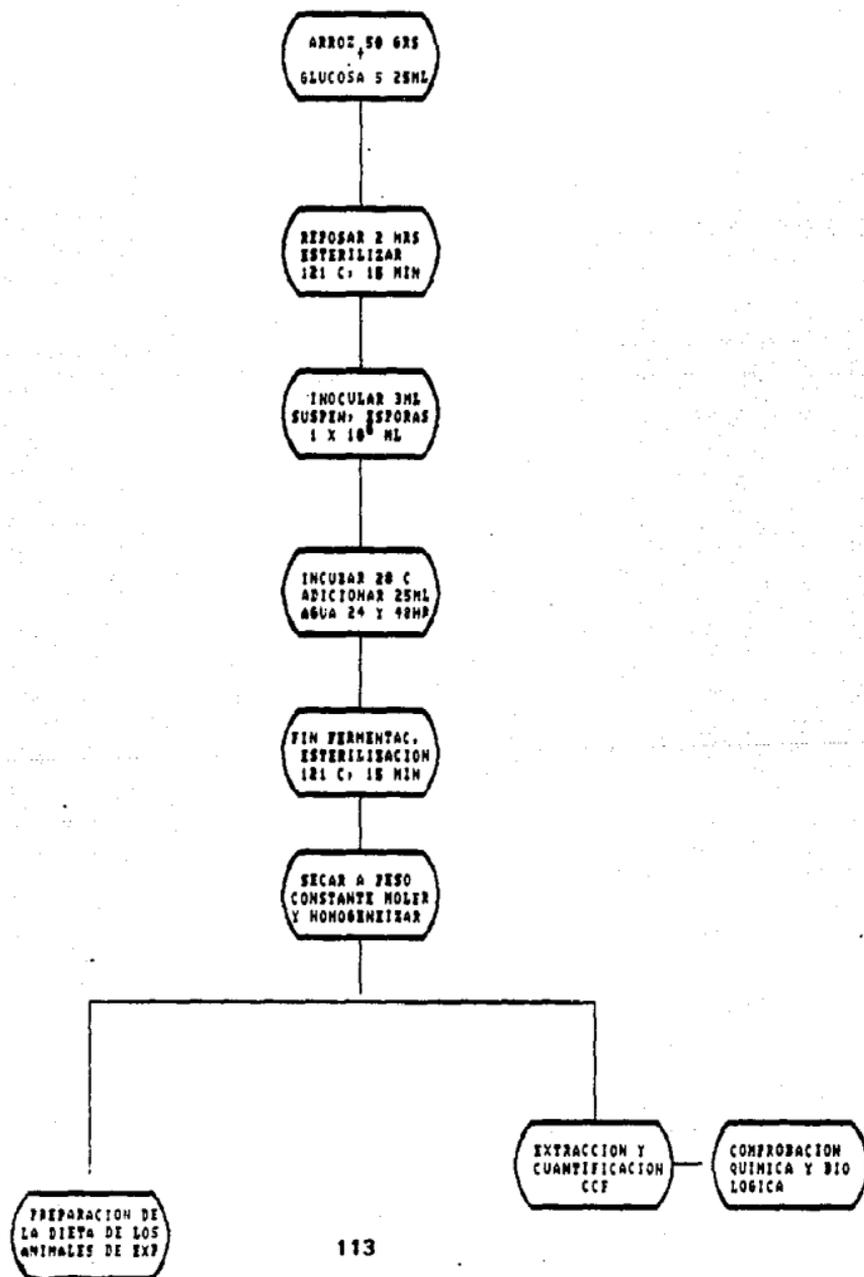
El cultivo del hongo se realizó en matraces erlenmeyer de 500 ml. En cada matraz fueron colocados 50 g de arroz pulido* y 25 ml de una solución de glucosa al 5% en agua destilada, permaneciendo en un periodo de mezcla de dos horas, después del cual fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 lbs por 15 minutos, y finalmente enfriados a temperatura ambiente.

Posteriormente cada matraz fué inoculado con 3 ml de la suspensión de esporas, agitando suavemente. Los matraces inoculados fueron incubados a 28 °C en una estufa bacteriológica. A las 24 y 48 horas de incubación, cada matraz fué agitado suavemente y fue adicionado con 25 ml de agua destilada estéril.

La fermentación fué terminada después del periodo de incubación por esterilización de los matraces en autoclave a 121 °C y 15 lbs, por 15 minutos.

* Valle Verde, México, M.R.

FIGURA 5.- Diagrama de producción de aflatoxinas *in vitro*



C).- Preparación de las muestras para la cuantificación de aflatoxinas.- El contenido de cada matraz inactivado fué colocado en charolas de aluminio y secado en un horno de convección forzada a peso constante a 60 oC por 24 horas. Posteriormente el material obtenido fué molido y homogeneizado en una licuadora convencional de tres velocidades.

D).- Extracción de las aflatoxinas.- La tecnica de extracción de las aflatoxinas utilizada fué una adaptación a los métodos descritos por Pons (1973) y por Stahr (1980) en experimentos anteriores.

Se seleccionaron 50 g del material molido y homogeneizado procedente de los matraces inoculados, que fueron molidos dos veces con 150 ml del solvente de extracción acetonitrilo:agua (8:2) y 10 g de ayuda filtro (tierras diatomeas), por 3 minutos a alta velocidad, en una licuadora convencional; la mezcla obtenida fué entonces filtrada a través de un embudo de cristal con papel filtro Whatman # 4; el filtrado obtenido fué colectado en matraces erlenmeyer de 500 ml.

Posteriormente a cada filtrado se le adicionaron 20 ml de acetato de plomo al 20% y 130 ml de agua destilada; la mezcla se dejó reposar por tres minutos, se adicionaron 10 g de ayuda filtro y se agitó y filtró nuevamente a través de papel filtro Whatman # 4.

El filtrado recolectado se colocó en un embudo de separación de 500 ml y se realizó una extracción secuencial con 50 ml de

cloroformo, tres veces, colectando las fases clorofórmicas en un sólo matraz. Finalmente el extracto clorofórmico se lavó con 100 ml de agua destilada en un embudo de separación, invirtiéndolo suavemente por 10 veces, colectando la fase clorofórmica en un vaso de precipitado; se adicionó al extracto final 1 g de sulfato de sodio anhidro, para eliminar cualquier residuo de agua.

El extracto clorofórmico fué evaporado casi a sequedad en un rotavapor en baño María a 70 °C y fué redisoluto en un volumen final de 5 ml de cloroformo. El extracto purificado y concentrado fué utilizado para la cuantificación de las aflatoxinas.

E).- Cuantificación de las aflatoxinas.- Las aflatoxinas producidas fueron separadas y cuantificadas por cromatografía en capa fina, de acuerdo al método de Goldblatt (1969) utilizando placas cromatográficas preparadas con 30 g de sílica Gel 60 G disueltos en 64 ml de agua destilada, obteniendo un grosor de 0.25 mm; las placas fueron activadas a 100 °C por una hora y posteriormente enfriadas a temperatura ambiente.

En cada placa se aplicaron 3 μ l de una solución de 10 μ g/ml de AFB1* y 3 μ l de una serie de diluciones dobles del extracto muestra, de 1:1 hasta 1:260.

Las placas fueron desarrolladas en una cámara de desarrollo previamente saturada con el solvente desarrollador cloroformo:acetona:agua; (88:12:1.5), de acuerdo a lo descrito previamente por Moreno y Hernández (1987); el tiempo de

* Sigma Chemical Co. N.Y., M.R.

desarrollo de las placas fué de 30 minutos.

Una vez desarrolladas, las placas fueron reveladas bajo luz UV de onda larga; la concentración de aflatoxinas de los extractos muestras se realizó por comparación visual de la intensidad de la fluorescencia de la solución estandar con la intensidad de la fluorescencia de las diluciones del extracto muestra colocadas en la misma placa.

Finalmente las placas fueron rociadas con una solución acuosa de hidróxido de potasio al 20%, para comprobar la presencia de aflatoxinas, de acuerdo a lo descrito por Stahr (1980).

F).- **Ensayo biológico de las aflatoxinas producidas.**- Para el ensayo de la actividad biológica de las aflatoxinas se utilizó el método reportado por Rosiles (1977), utilizando patos de raza Pekines de 5 días de edad, que fueron mantenidos en jaulas convencionales con agua y alimento a libre acceso. Se utilizó alimento comercial balanceado para pollo de engorda* certificado como libre de micotoxinas en el Laboratorio de Micología de la Unidad de Estudios de Posgrado de la F.E.S. Cuautitlán. la dieta basal de los patos fué adicionada con un 10% del material obtenido después de la fermentación del cultivo de *A. flavus* en arroz. Los animales fueron observados hasta la presentación de los signos clínicos y muerte de los mismos; posteriormente se

* Caporina 1, La Hacienda, México, M.R.

realizaron estudios de necropsia e histopatología de hígado y riñón para detectar la presencia de lesiones compatibles con intoxicación por aflatoxinas.

F).- Determinación de la cinética de producción de las aflatoxinas in vitro: Para determinar la cinética de producción de las aflatoxinas y el tiempo óptimo de producción de las mismas se procedió al cultivo de la cepa de *A. flavus* en arroz, como se describió previamente, finalizando la fermentación a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 268 horas después del cultivo. Para cada uno de los tiempos de evaluación de la producción los matraces fueron sembrados por triplicado. Todas las muestras de los matraces inoculados fueron extraídas y cuantificadas como se describió previamente

Una vez que fué conocida la cinética de producción de las aflatoxinas y la concentración de las mismas en el material cosechado, se procedió a su producción masiva para ser utilizado en los experimentos porterioros.

El material obtenido fué almacenado a -20 oC hasta su uso.

3.- PREPARACION DE LA DIETA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION

El material obtenido de la fermentación, secado y homogeneizado, fué añadido a la dieta basal de los animales de experimentación, hasta obtener una concentración final de 2.5 ppm (ug/g) de aflatoxinas, y fué administrado a los lotes según el

diseño experimental que se presenta en el Cuadro 8. El alimento de los lotes que consumieron aflatoxinas fué adicionado aproximadamente con un 10% del material cosechado. El alimento de los lotes que no consumieron aflatoxinas fué adicionado con la misma cantidad de arroz procesado de manera similar para la producción de las tóxicas, pero sin el inóculo del hongo.

4.- VACUNAS

Para el presente estudio se utilizaron las siguientes vacunas comerciales, que fueron aplicadas según el diseño experimental que se presenta en el Cuadro 8, de acuerdo a las indicaciones recomendadas por el fabricante:

A) Newcavac nobilis*: vacuna de virus inactivado, elaborada con la cepa Clone 30 del virus de la enfermedad de Newcastle, inactivada con formol y suspendida en una emulsión oleosa, a una dosis de 0.5 ml/ave por vía subcutánea.

B) Vacuna Newcastle La Sota**: Vacuna a virus activo cepa La Sota de la enfermedad de Newcastle, liofilizada, con un estabilizador, elaborada en embriones de pollo SPF, con un título de 1×10^7 DIE 50, a una dosis de una gota/ave por instilación ocular.

C) Gumboro VAC D 78 Nobilis***: Vacuna a virus vivo, cepa clonada

* Lab. Intervet; México Reg SARH No B-0273-012

** Lab. Intervet, México Reg. SARH No B-0273-013

*** Lab. Intervet, México Reg SARH No B-0273-036

D 78 del virus de la Infección de la bolsa de Fabricio, liofilizada, con un estabilizador, elaborada en embriones de pollo SPF, con un título de 1×10^4 DICT 50, a una dosis de una gota/ave por instilación ocular.

5.- PARAMETROS PRODUCTIVOS

Los parámetros productivos que fueron evaluados en los animales de experimentación fueron la mortalidad natural, el consumo de alimento, la ganancia de peso y la conversión alimenticia.

La mortalidad natural por semana y la mortalidad acumulada fueron registradas para cada uno de los lotes.

Los animales fueron pesados individualmente en una balanza granataria los días 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50 del experimento, por la mañana, antes de llenar los comederos de alimento.

El consumo de alimento fué medido semanalmente, con base en el lote, por la diferencia entre la cantidad de alimento administrada en la semana, menos la cantidad de alimento restante al final de la semana.

La conversión alimenticia (alimento/ganancia de peso) fué calculada semanalmente y para todo el periodo (1-50 días) y fué ajustada tomando en cuenta las pérdidas de peso de la mortalidad natural y el peso de los animales sacrificados experimentalmente.

6.- PARAMETROS HEMATOLOGICOS

Para las pruebas hematológicas, cuatro animales de cada uno de los lotes, tomados al azar, fueron sagrados por punción intracardiaca, los días 8, 15, 22, 29, 36, 42 y 49 del experimento, colectándose 1 ml de sangre en viales con EDTA como anticoagulante. En cada una de las muestras se realizaron las pruebas de hematocrito (como microhematocrito), hemoglobina (como oxihemoglobina), número de glóbulos rojos por cm, número de glóbulos blancos por cm, conteo diferencial de glóbulos blancos y proteínas totales, según las técnicas descritas por Natt y Harrick (1952), Olson (1959) y Tello (1987).

7.- PARAMETROS INMUNOLOGICOS

Para evaluar la capacidad del sistema inmunológico de las aves, se realizaron las siguientes pruebas:

A).- Inmunidad humoral

- Anticuerpos anti newcastle: los anticuerpos séricos contra el virus de la enfermedad de Newcastle fueron cuantificados a partir del suero obtenido de tres ml de sangre que fue colectada en tubos de ensaye sin anticoagulante, a partir de los cuatro animales tomados al azar de cada uno de los lotes, para las pruebas hematológicas, los días 15, 22, 29, 36, 43 y 50 del experimento. Una vez obtenido el suero, se procedió a su titulación por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI), utilizando el procedimiento Beta en microcajas con fondo en

V, usando 10 unidades hemaglutinantes, de acuerdo a lo descrito por Morilla y Bautista (1986).

-Anticuerpos antiIBF: los anticuerpos séricos contra el virus de la Infección de la bolsa de Fabricio fueron cuantificados a partir del suero de los 4 animales seleccionadas al azar para las pruebas hematológicas, los días 15, 22, 29, 36, 43 y 50 del experimento, por la técnica de ELISA, según el Sistema comercial Agritech, dilución 1:500.

B).- Inmunidad celular

- Intradermoreacción (DH): la cuantificación de la respuesta inmune celular fué realizada mediante una prueba de intradermoreacción inespecifica con fitohemaglutinina (PHA) adaptada del procedimiento descrito por Giambrone y col. (1985b) en experimentos anteriores.

La prueba de DH se realizó en 8 animales de cada lote, tomados al azar, el día 50 del experimento.

El día 50 se midió el grosor de la cresta de cada uno de los animales seleccionados, con un vernier, considerando la medida como dato basal; posteriormente se inoculó en el área 0.05 ml de buffer salino de fosfatos (PBS) como control ó 0.05 ml de fitohemaglutinina (PHA)*; en ambos casos se midió el grado de induración de la cresta 24 horas después. El índice DH fué calculado en base a la diferencia del grosor de la cresta entre los animales inoculados con PHA y con PBS.

* Difco Labs., N.Y., M.R.

C).- Resistencia inespecífica

- Fagocitosis: la evaluación de la capacidad fagocitaria se realizó con leucocitos adherentes de sangre periférica, en 4 animales de cada lote, tomados al azar, el día 50 del experimento, utilizando levaduras de *Candida albicans* inactivadas como partículas a fagocitar, según la técnica descrita por Palomar (1988) en experimentos anteriores.

8.- ESTUDIO PATOLOGICO

Para el examen patológico, los cuatro animales tomados al azar para los muestreos hematológicos y serológicos, fueron sacrificados por inhalación de cloroformo en una cámara previamente saturada, los días 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50 del experimento.

Los animales sacrificados fueron pesados y necropsiados para la observación y registro de los cambios patológicos aparentes; el hígado, la bolsa de fabricio, el bazo y el timo de cada animal fueron disecados y fueron pesados individualmente para obtener los pesos absolutos y relativos, en relación al peso del animal. Posteriormente se seleccionaron muestras representativas de cada uno de los órganos mencionados, que fueron fijadas en formalina amortiguada al 10% por 24 horas, incluidas en parafina, cortadas a 4 u de espesor y coloreadas con la técnica convencional de hematoxilina-eosina, para la observación y registro de los cambios microscópicos de los tejidos.

9.- DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente experimento se utilizó un diseño experimental completamente al azar 2 x 2 factorial, con cuatro lotes de 50 animales cada uno, realizandose el siguiente manejo (Cuadro 8).

- El lote 1 fué el lote Testigo: los animales recibieron una dieta basal sin aflatoxinas y fueron vacunados contra la enfermedad de Newcastle el día 8 por vía ocular y subcutánea, y el día 28 por vía ocular y subcutánea.

- El lote 2 recibió una dieta con 2.5 ug/g de aflatoxinas y fué vacunado contra la enfermedad de Newcastle el día 8 por vía ocular y subcutánea, y el día 28 por vía ocular y subcutánea.

- El lote 3 recibió una dieta basal sin aflatoxinas y fué vacunado contra la infección de la bolsa de Fabricio el día 6 por vía ocular, y contra la enfermedad de Newcastle el día 8 por vía ocular y subcutánea y el día 28 por vía ocular y subcutánea.

- El lote 4 recibió una dieta con 2.5 ug/g de aflatoxinas y fué vacunado contra la infección de la bolsa de Fabricio el día 5 por vía ocular y contra la enfermedad de Newcastle el día 8 por vía ocular y subcutánea y el día 28 por vía ocular y subcutánea.

10.- ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos de los experimentos con repeticiones fueron analizados en la Unidad de Procesamiento Electrónico del Centro de Estadística y Cálculo del Colegio de Posgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo, México, mediante análisis de varianza y las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey con $p \leq .05$

Cuadro 8.- Diseño Experimental

OBJETIVO	LOTE	NUMERO DE ANIMALES	AFLATOXINAS ¹ 2.5 ppm	VAC VIBF ² V VIVO	VAC NEWCASTLE ³
TESTIGO ⁴	1	50	-	-	+
AFLA ⁵	2	50	+	-	+
IBF ⁶	3	50	-	+	+
AFLA-IBF ⁷	4	50	+	+	+

- Consumo de 2.5 ppm (2.5 ug/g) de aflatoxinas durante 7 semanas
- Vacuna con virus vivo de IBF: Gumboro Vac D 78, título 1×10^8 DICT 50, dosis 1 gota/ave por instilación ocular, aplicación día 5.
- Vacuna con virus de la Enf. de Newcastle: Newcavac Nobilis virus inactivado, dosis 0.5 ml/ave vía subcutánea y Vacuna Newcastle La Sota, título 1×10^7 DICE 50, dosis 1 gota/ave por instilación ocular, aplicación días 8 y 28.
- Lote testigo, observación de respuesta normal.
- Lote AFLA, observación del efecto de las aflatoxinas.
- Lote IBF, observación del efecto de la cepa vacunal de VIBF
- Lote AFLA-IBF, observación del efecto simultáneo de las aflatoxinas y de la cepa vacunal de VIBF

RESULTADOS

A)- PRODUCCION DE LAS AFLATOXINAS

1.- CINETICA DE PRODUCCION.- La cinética de la producción de aflatoxinas por fermentación sólida de arroz inoculado con *A. flavus* JMI 91019 se observa en el Cuadro 9.

La AFB1 se empezó a producir en cantidades detectables por CCF a partir de las 72 horas de fermentación, incrementándose con el tiempo hasta un pico máximo a las 192 horas, obteniéndose una producción promedio de 26.6 ppm (ug/g) de material cosechado; después de este periodo de fermentación, la concentración de AFB1 fué disminuyendo gradualmente con el tiempo.

La AFG1 se empezó a producir a las 192 horas de fermentación, y su concentración se incrementó gradualmente con el tiempo. Cantidades traza de AFB2 Y AFG2 se empezaron a detectar a partir de las 216 horas de fermentación.

2.- COMPROBACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LAS AFLATOXINAS.- Para la comprobación de la actividad biológica de las toxinas producidas se utilizó un total de 8 patos de raza Pekines de 5 días de edad.

Los animales inoculados presentaron un desarrollo corporal muy pobre durante el periodo de observación. Todos los animales murieron entre 6 y 20 días después del inicio de la ingestión del alimento contaminado, con un tiempo promedio de sobrevivencia de

Cuadro 9.- Resultados de la cinetica de
produccion de aflatoxinas
in vitro

TIEMPO DE INCUBACION (horas)	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
24	--	--	--	--
48	--	--	--	--
72	0.13ppm	--	--	--
96	0.53ppm	--	--	--
120	1.50ppm	--	--	--
144	7.00ppm	--	--	--
168	10.60ppm	--	--	--
192	26.60ppm	0.50ppm	--	--
216	9.30ppm	4.00ppm	trazas	trazas
268	10.60ppm	13.30ppm	trazas	trazas

Promedio de tres extracciones de 50g de material cosechado y secado a peso constante.

14.6 días.

Los estudios de necropsia e histopatología de los animales intoxicados mostraron un pobre estado de carnes, deformación de los huesos del tarso, hemorragias subcutáneas en las patas, enteritis mucosa con hemorragias en duodeno y yeyuno, degeneración grasa difusa, necrosis multifocal, hiperplasia biliar y hemorragias en hígado, degeneración tubular renal y congestión de bazo. Todas estas lesiones son compatibles con un cuadro de intoxicación aguda por aflatoxinas.

Los animales utilizados como grupo TESTIGO (4 animales) no presentaron signología clínica y en los estudios postmortem no mostraron cambios patológicos.

3.- PRODUCCION.- La producción masiva de AFB1 se realizó por fermentación sólida de arroz usando un periodo de fermentación de 192 horas.

Se obtuvo un total de 28 kg de material cosechado, secado a peso constante, molido y homogeneizado, con una concentración final de 24.6 ppm (ug/g) de AFB1.

Para los lotes que no consumieron aflatoxinas se obtuvo un total de 31 kg de arroz sin inocular, secado a peso constante, molido y homogeneizado.

B).- PARAMETROS PRODUCTIVOS

1.- MORTALIDAD NATURAL.- El registro de la mortalidad natural observada durante el periodo de ingestión de las aflatoxinas se observa en el Cuadro 10. El lote donde se observó un mayor índice

de mortalidad fué el 2, seguido por el 4, el 1 y el 3.

2.- PESO CORPORAL.- Los promedios de peso corporal semanal de los animales de experimentación se observan en el Cuadro 11 y el comportamiento de la ganancia de peso en la Figura 6. Los animales del lote 3 fueron los que tuvieron una mayor ganancia de peso. Los animales del lote 4 presentaron un promedio de peso menor durante las dos primeras semanas del experimento, mientras que los animales del lote 2 fueron los de menor peso en las últimas semanas del mismo.

3.- CONSUMO DE ALIMENTO.- El consumo de alimento semanal acumulado de los animales de experimentación se observa en el Cuadro 12 y en la Figura 7. Los animales de los lotes 2 y 4 tuvieron un consumo de alimento/lote menor que los animales de los lotes 1 y 3.

4.- CONVERSION ALIMENTICIA.- Los índices de conversión alimenticia semanal y total, de los animales de experimentación se observan en el Cuadro 13. Los animales del lote 3 presentaron el menor índice de conversión alimenticia.

La Figura 8 muestra el comportamiento productivo general de los animales de experimentación durante todo el estudio.

C).- PARAMETROS HEMATOLOGICOS

1.- HEMATOCRITO.- Los resultados de la evaluación del hematocrito de los animales de experimentación se observan en el Cuadro 14 y en la Figura 9. Los valores obtenidos en los animales de los

Cuadro 10.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en la mortalidad natural del pollo de engorda

LOTE	AFIATOXINAS	IBF	MORTALIDAD							TOTAL
			1	2	3	4	5	6	7	
1	-	-	0	2	1	2	5	0	2	12
2	+	-	3	5	6	2	1	1	1	19
3	-	+	1	1	0	0	0	0	2	4
4	+	+	10	1	3	0	0	1	1	16

Cuadro 11.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el peso corporal (gms) del pollo de engorda

LOTE	dia 1	dia 8	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	39.7 ^{A, B}	105.2 ^A	202.3 ^B	401.7 ^{A, B}	600.0 ^{A, B}	1031.0 ^{A, B}	1410.0 ^{A, B}	1845.8 ^{A, B}
2	39.0 ^B	103.2 ^A	201.2 ^B	403.2 ^C	623.0 ^B	948.2 ^B	1205.8 ^B	1597.7 ^B
3	40.6 ^A	112.0 ^A	223.2 ^A	411.1 ^A	720.6 ^A	1135.4 ^A	1506.9 ^A	1929.2 ^A
4	38.8 ^B	97.6 ^B	200.4 ^B	363.3 ^{B, C}	661.7 ^{A, B}	985.5 ^B	1368.9 ^B	1734.6 ^{A, B}

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes
 P=0.05

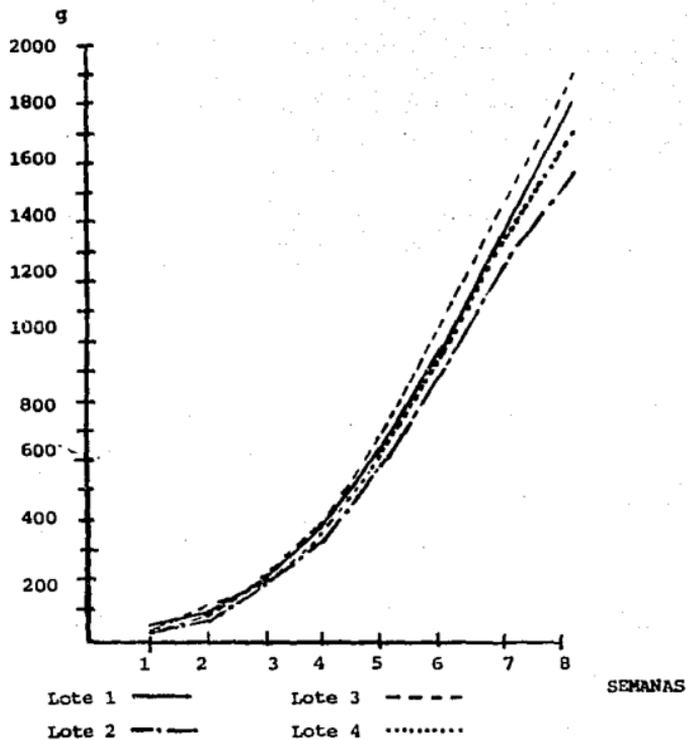


Figura 6.- Efectos del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con i2F en la ganancia de peso del pollo de engorde.

Cuadro 12.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el consumo de alimento del pollo de engorda

LOTE	dia 8	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	6500.0	12885.5	23812.4	38674.4	55552.4	72761.9	88951.9
2	6500.0	12844.5	21945.9	32190.9	45030.9	58200.9	70195.9
3	6500.0	14100.7	24638.7	42573.9	67838.7	96664.4	119769.4
4	6500.0	8675.4	16689.8	29405.8	44829.8	58969.8	74759.9

gramos acumulados/semana

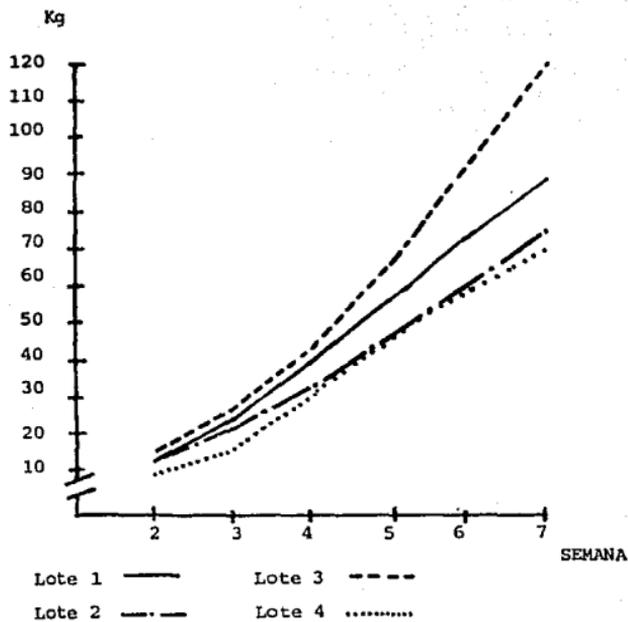


Figura 7.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el consumo de alimento del pollo de engorde.

Cuadro 13.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en la conversion alimenticia del del pollo de engorda.

LOTE	1-15	16-22	23-29	30-36	37-43	44-50	TOTAL 1-50
1	1.79	1.46	1.84	3.25	2.27	4.50	2.26
2	1.88	3.22	1.69	2.70	2.27	5.07	2.45
3	1.76	1.43	1.65	1.88	2.67	3.11	2.07
4	1.52	1.97	1.66	2.04	2.58	4.04	2.18

Conversion promedio del periodo (dias).

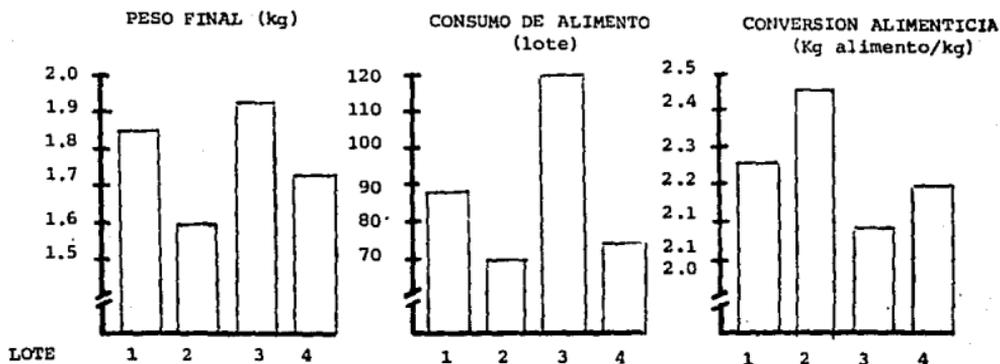


Figura 6.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con *16F* en los principales parámetros productivos del ciclo de engorda.

lotes 2 y 4 fueron menores a los obtenidos en los lotes 1 y 3, sin embargo, en la mayoría de las observaciones las diferencias no son estadísticamente significativas.

2.- HEMOGLOBINA.- Los resultados de la evaluación de la concentración sanguínea de hemoglobina de los animales de experimentación se observan en el Cuadro 15 y en la Figura 10. Los valores obtenidos en los animales del lote 4 son menores a los obtenidos en los animales de los otros lotes, sin embargo diferencias estadísticamente significativas sólo se observaron en la tercera semana del experimento

3.-No. DE GLOBULOS ROJOS.- Los resultados de la determinación del número de glóbulos rojos de los animales de experimentación se observan en el Cuadro 16 y en la Figura 11. Los animales de los lotes 4 y 2 presentaron un menor número de células que los animales de los lotes 1 y 3, observándose diferencias estadísticamente significativas en la 3a, 4a, 5a y 7a semanas; no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los lotes 2 y 4 ni entre los lotes 1 y 3.

4.- No DE GLOBULOS BLANCOS.- Los resultados de la determinación del número de glóbulos blancos de los animales de experimentación se observan en el Cuadro 17 y en la Figura 12. El número de glóbulos blancos observado en los lotes, salvo en la 3a y en la 7a semanas del lote 4, están dentro del rango que se considera normal para el pollo de engorda, aunque se observan algunas diferencias estadísticamente significativas en la 1a y en la 6a semanas.

5.- PROTEINAS PLASMATICAS.- Los resultados de la determinación de las proteínas plasmáticas de los animales de experimentación se observan en el Cuadro 18 y en la Figura 13. Los animales del lote 4 tuvieron una menor concentración de proteínas plasmáticas, estadísticamente significativa, en la 5a y 7a semanas del experimento.

6.- CONTEO DIFERENCIAL DE GLOBULOS BLANCOS.- El comportamiento del número relativo de leucocitos circulantes se observa en la Figura 14 (linfocitos), Figura 15 (heterófilos), Figura 16 (monocitos), Figura 17 (eosinófilos) y Figura 18 (basófilos). El comportamiento de los leucocitos circulantes fué similar en los cuatro lotes, observandose un incremento en la proporción de linfocitos en las dos primeras semanas y un incremento en la proporción de heterófilos en las semanas restantes, en el lote 4 los cambios en la proporción de células circulantes fué más evidente, sin ser las diferencias estadísticamente significativas. La proporción de monocitos, eosinófilos y basófilos circulantes de los cuatro lotes permaneció esencialmente constante.

D).- PARAMETROS INMUNOLOGICOS

1.- INMUNIDAD HUMORAL

a) Anticuerpos antinewcastle.- Los resultados de la titulación de los anticuerpos séricos contra la enfermedad de Newcastle en los animales de experimentación se observan en el Cuadro 19 y en la Figura 19. No se observaron diferencias estadísticamente

Cuadro 14.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el Hematocrito (%) del pollo de engorda.

LOTE	% DE HEMATOCRITO						
	dia 8	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	26.80 ^a	34.30 ^{a,a}	37.37 ^a	39.25 ^a	35.27 ^a	39.75 ^a	39.37 ^a
2	29.90 ^a	29.80 ^b	33.00 ^a	35.75 ^a	36.50 ^a	35.00 ^{a,b}	35.37 ^a
3	29.50 ^b	35.40 ^a	37.50 ^b	35.00 ^a	38.12 ^a	37.37 ^{a,b}	34.82 ^a
4	26.10 ^b	31.70 ^{a,b}	29.12 ^b	30.87 ^b	37.17 ^a	28.50 ^b	32.50 ^b

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes $P=0.05$

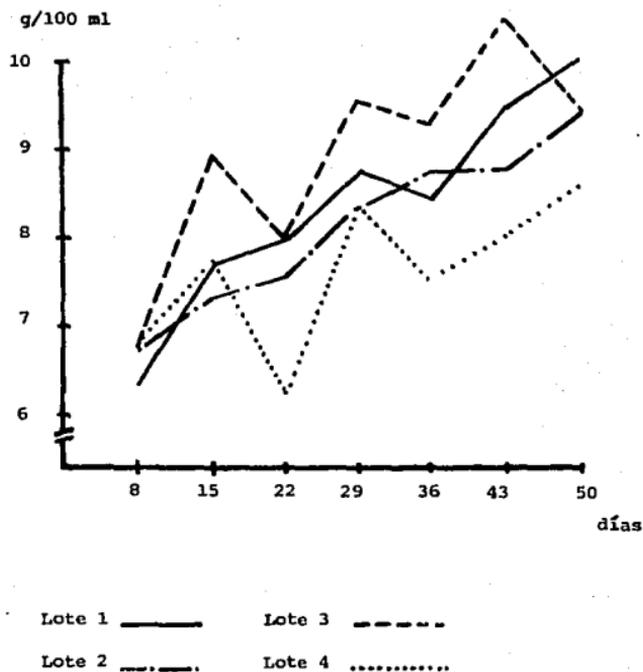
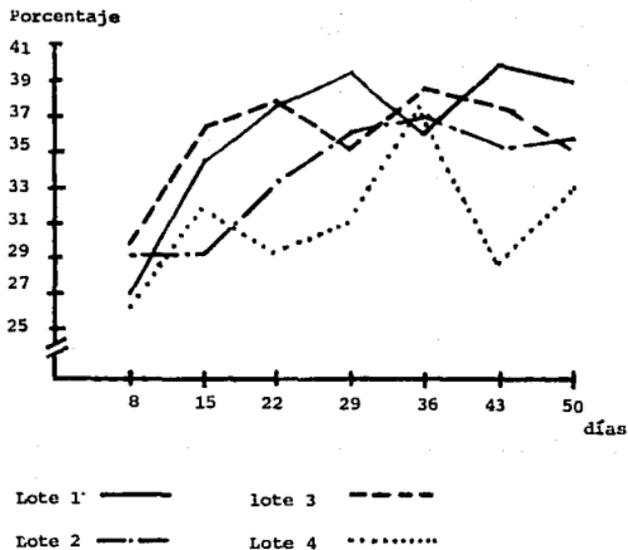


Figura 10.— Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBP en la concentración de hemoglobina (g/100 ml) del pollo de engorda.



8 **Figura 9.-** Efecto del consumo de eritrorinas y de la vacunación con ISF en el hematocrito (%) del pollo de engorde.

Cuadro 15.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en la concentracion de Hemoglobina (g/100 ml) del pollo de engorda.

LOTE	HEMOGLOBINA (g /100 ml)						
	dia 8	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	6.635 ^m	7.732 ³	7.955 ^A	8.778 ^A	8.482 ^A	9.402 ^A	10.060 ^A
2	6.785 ^A	7.259 ³	7.561 ^{A, 3}	8.381 ^A	8.745 ^A	8.810 ^A	9.337 ^A
3	6.580 ^A	8.940 ^A	8.822 ^A	9.580 ^A	9.283 ^A	10.556 ^A	9.468 ^A
4	6.785 ^A	7.835 ^{A, 3}	6.246 ³	8.219 ^A	7.364 ^A	7.973 ^A	8.673 ^A

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes P=0.05

Cuadro 16.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el No de globulos rojos (Millones/mm 3) del pollo de engorda.

LOTE	No DE GLOBULOS ROJOS						
	dia 8	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	1.452 ^A	2.014 ^A	2.778 ^A	2.964 ^A	3.244 ^A	2.778 ^A	3.116 ^A
2	1.653 ^A	2.069 ^A	2.388 ^{A, B}	2.681 ^{A, B}	2.745 ^{A, B}	2.529 ^A	2.492 ^{A, B}
3	1.711 ^A	1.199 ^A	2.787 ^A	2.463 ^{A, B}	2.471 ^{A, B}	2.628 ^A	2.982 ^A
4	1.429 ^A	2.367 ^A	2.872 ^B	2.161 ^B	2.153 ^B	2.174 ^A	2.195 ^B

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes P=0.05

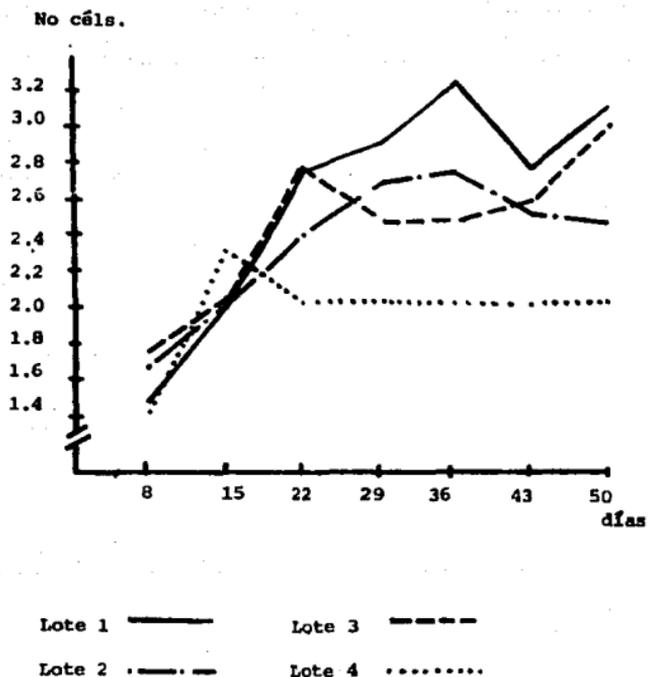


Figura 11.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con i:IF en el No de glóbulos rojos (millones/ mm³) del pollo de engorda.

Cuadro 17.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el No de Globulos Blancos (Miles/mm³) del pollo de engorda.

LOTE	No DE GLOBULOS BLANCOS						
	dia 0	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	23.52 ^{A, B}	20.80 ^A	26.45 ^B	33.70 ^A	36.30 ^A	20.40 ^{A, B}	20.60 ^A
2	23.70 ^A	21.46 ^A	24.47 ^B	27.70 ^A	30.12 ^A	30.00 ^A	27.50 ^A
3	16.40 ^C	29.60 ^A	24.60 ^B	26.00 ^A	31.45 ^A	17.50 ^B	26.52 ^A
4	19.04 ^{B, C}	29.10 ^A	42.10 ^A	26.95 ^A	27.40 ^A	17.60 ^B	32.60 ^A

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes F=0.05

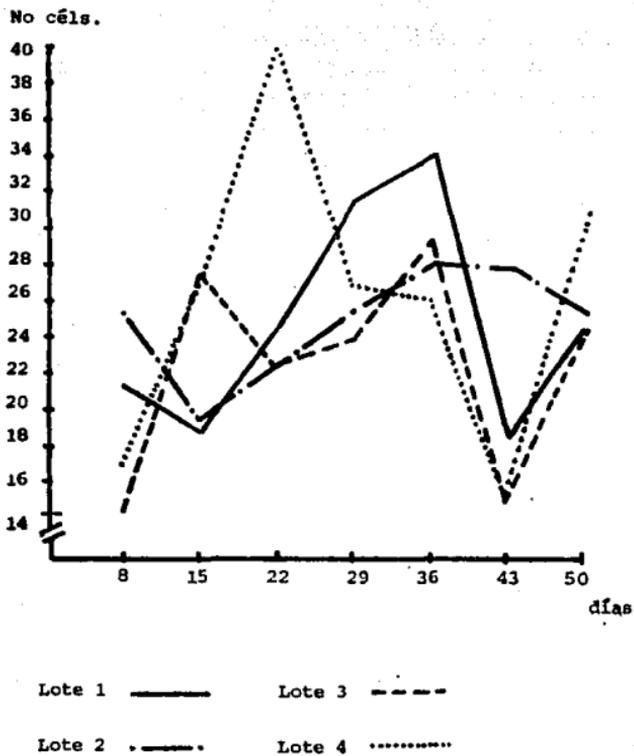


Figura 12.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con IBF en el No de glóbulos blancos (miles/mm³) del pollo de engorda.

Cuadro 18.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en la concentracion de Proteinas Plasmaticas (g/100 ml) del pollo de engorda.

LOTE	PROTEINAS PLASMATICAS						
	dia 8	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	3.940 ^A	4.180 ^A	3.950 ^A	4.025 ^A	3.975 ^{A,3}	4.180 ^A	5.375 ^A
2	3.600 ^A	3.440 ^A	4.275 ^A	3.675 ^A	3.687 ^{A,3}	3.525 ^A	3.750 ^{A,3}
3	4.100 ^A	4.160 ^A	4.425 ^A	4.175 ^A	4.450 ^A	4.100 ^A	4.275 ^A
4	3.720 ^A	4.180 ^A	3.575 ^A	3.350 ^A	3.450 ^B	4.300 ^A	3.475 ^B

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes $P=0.05$

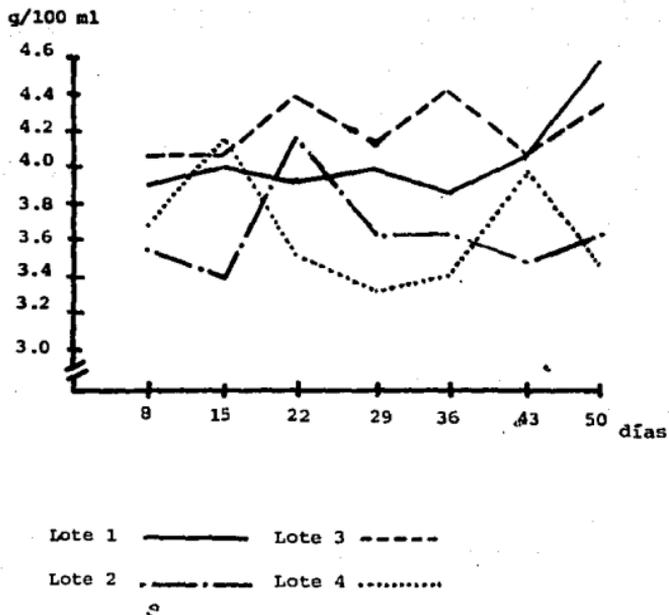


Figura 13.- Efecto de consumo de aflatoxinas y de la vacunación con *Br* en la concentración de proteínas pesadas (g/100 ml) del pollo de engorde.

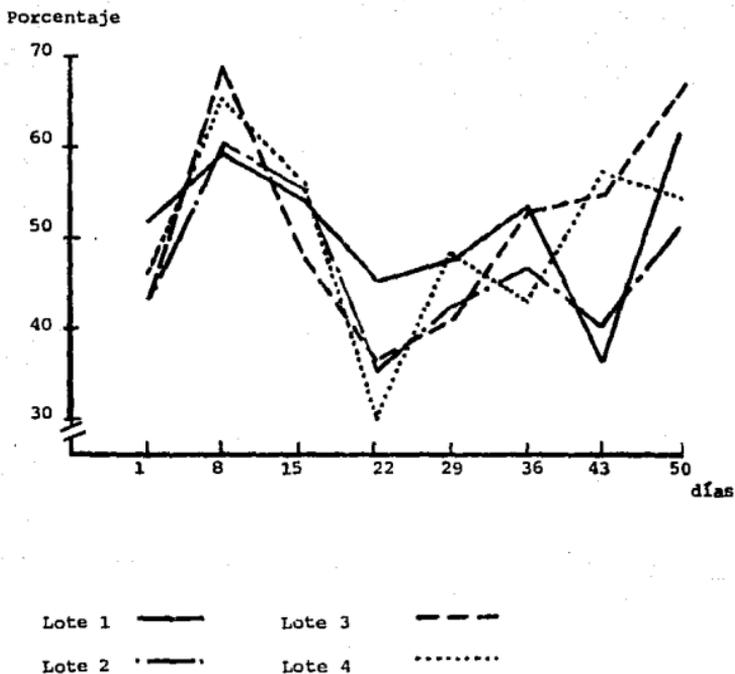
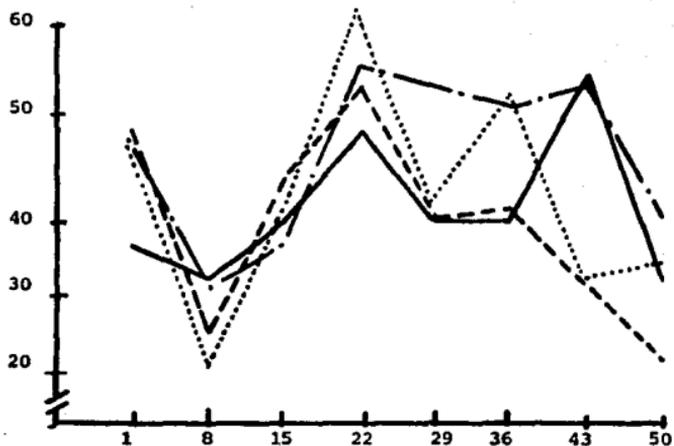


Figura 14.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con *Br. an. ex. No.* relativo de linfocitos circulantes (%) del pollo de engorda.

Porcentaje



Lote 1 ———

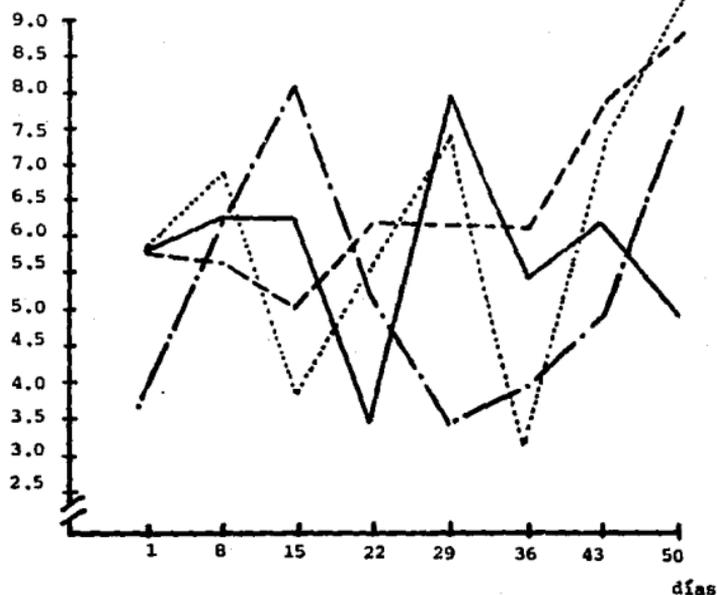
Lote 3 - - - - -

Lote 2 . - . - .

Lote 4

Figura 15.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con Ibr en el no relativo de heterófilos circulantes (%) del pollo de engorde.

Porcentaje



Lote 1 ———

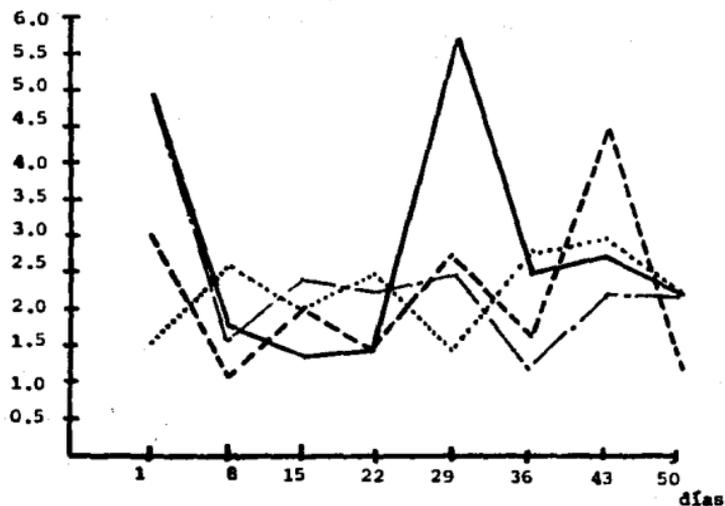
Lote 3 - - - - -

Lote 2
.....

Lote 4 - . - . - .

Figura 16.- Efecto del consumo de arriatocinas y de la vacunación con *Coli* en el No relativo de monocitos circulantes (%) del pollo de engorda.

Porcentaje



Lote 1 —————
Lote 2 - . - . - .
Lote 3 - - - - -
Lote 4

Figura 17.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con Ier en el No relativo de eosinófilos circulantes (%) del pollo de engorde.

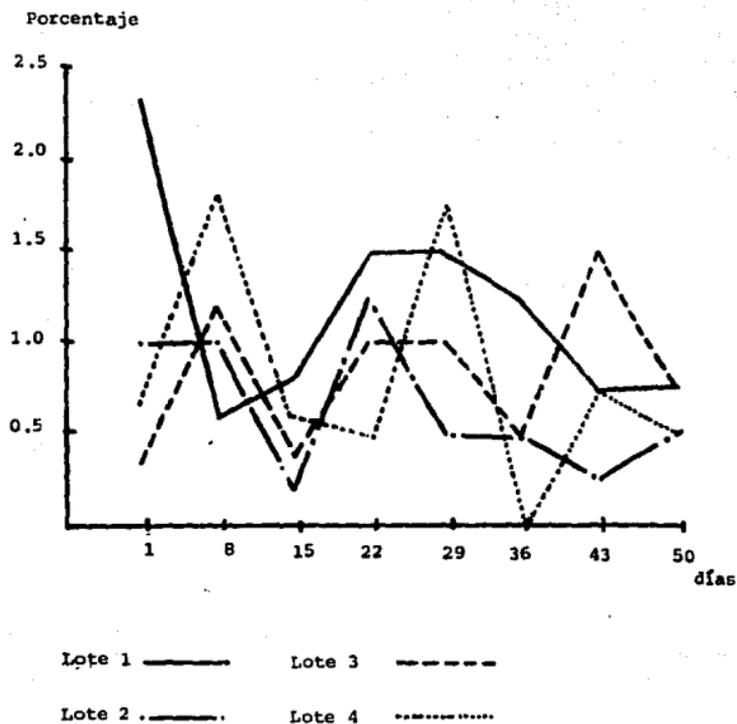


Figura 18.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunación con ISF en el No relativo de basófilos circulantes (%) del pollo de engorda.

significativas en el título de anticuerpos entre los lotes, salvo en la primera semana, en la que el lote 1 tuvo un mayor título de anticuerpos.

b) Anticuerpos antiIBF.- Los títulos de los anticuerpos séricos anti IBF no pudieron ser medidos debido a fallas técnicas en método de titulación y a la contaminación bacteriana de las muestras.

2.- INMUNIDAD CELULAR

Intradermoreacción.- Los resultados de la prueba de intradermoreacción inespecífica en los animales de experimentación se observan en el Cuadro 20. El índice de intradermoreacción (DH) fué menor para el lote 4, seguido del 2, 1 y 3, siendo estadísticamente diferente entre los lotes 3 y 4 y estadísticamente similar entre los lotes 1, 2 y 3 y entre los lotes 1, 2 y 4.

3.- RESISTENCIA INESPECIFICA

Fagocitosis.- Los resultados de la prueba de fagocitosis de leucocitos adherentes de sangre periférica con *Candida albicans* en los animales de experimentación se observa en el Cuadro 21. El porcentaje de células fagocitarias fué menor en el lote 4, seguido del 2, 1 y 3. El índice fagocítico (# levaduras/célula) fue similar entre los cuatro lotes.

E).- ESTUDIO PATOLOGICO

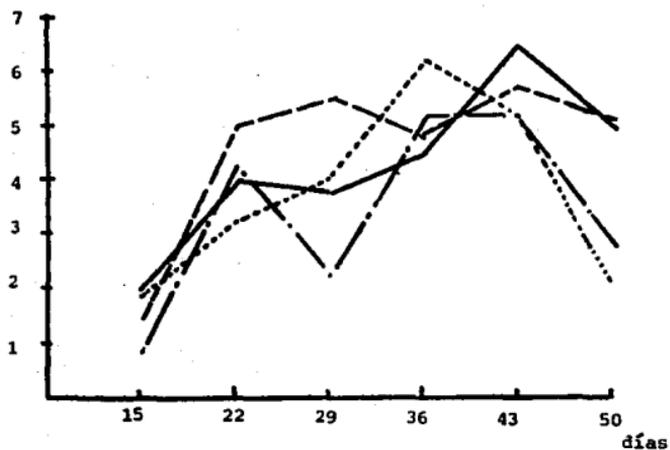
1.- PESO DE LOS ORGANOS.- El promedio semanal de peso del hígado, bolsa de Fabricio, bazo y timo se observan en el Cuadro 22,

Cuadro 19.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en la produccion de Ac contra el virus de la enfermedad de Newcastle (inhibicion de la hemaglutinacion).

LOTE	TITULO DE ANTICUERPOS					
	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	2.000 ^A	4.000 ^A	3.750 ^A	4.500 ^A	6.500 ^A	5.000 ^A
2	0.800 ^B	4.250 ^A	2.250 ^A	5.250 ^A	5.250 ^A	2.750 ^A
3	1.400 ^{A,B}	5.000 ^A	5.500 ^A	4.750 ^A	5.750 ^A	5.250 ^A
4	1.000 ^{A,B}	3.250 ^A	4.000 ^A	6.250 ^A	5.250 ^A	2.250 ^A

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes P=0.05

TITULO Ac



Lote 1 ——— Lote 3 - - - -
Lote 2 ····· Lote 4 ·····

Figura 19

vacunación con IBF en la producción de Ac contra el virus de la enfermedad de Newcastle (inicio de la nemiaglutinación).

Cuadro 20.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en la respuesta de intradermoreaccion a PHA del pollo de engorda.

LOTE	INDICE PHA-55F (vca)
1	1.135 ^{a, B}
2	0.875 ^{a, B}
3	1.875 ^a
4	0.583 ^a

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferente P=0.05

Cuadro 2 .- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el porcentaje de fagocitosis y en el indice fagocitico del pollo de engorda.

LOTE	% DE CELULAS FAGOCITARIAS	INDICE FAGOCITICO
1	43.7% ^A	1.38 ^A
2	34.4% ^{A, B}	1.18 ^A
3	41.4% ^A	1.11 ^A
4	38.8% ^B	1.21 ^A

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes $P=0.05$

Cuadro 23, Cuadro 24 y Cuadro 25 respectivamente.

El peso relativo del hígado de los animales de los lotes 4 y 2 fué ligeramente mayor al de los lotes 1 y 3, siendo las diferencias estadísticamente significativas únicamente en la 3a semana.

No se observaron diferencias de peso estadísticamente significativas en la bolsa de Fabricio y en el bazo de los animales de experimentación.

El peso relativo del timo de los animales de los lotes 4 y 2 fué gradualmente menor al de los lotes 1 y 3, siendo las diferencias estadísticamente significativas para el lote 4 en las dos últimas semanas del experimento.

2.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS ORGANOS

a) HIGADO

Lote 1.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 1 presentaron el hígado de color café amarillento, de consistencia firme y bordes biscelados; microscópicamente se observaron pequeñas vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos; en uno de los animales muestreados se observó un foco de tejido mieloides en el parénquima hepático. En el día 15 los animales tenían el hígado de color café amarillento y de consistencia firme; permaneciendo sin cambios patológicos hasta el día 35. En los días 43 y 50 del experimento, el órgano se observó café rojizo y de consistencia firme; histológicamente presentó proliferación discreta de tejido conjuntivo alrededor de la vena central.

Cuadro 22.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el peso relativo (%) del higado del pollo de engorda.

LOTE	% DEL PESO CORPORAL						
	dia 8	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	4.16 ^A	4.82 ^{A, B}	3.65 ^C	4.31 ^A	5.13 ^A	3.93 ^A	3.21 ^A
2	3.84 ^A	5.37 ^A	8.21 ^A	5.94 ^A	3.81 ^A	4.58 ^A	3.45 ^A
3	4.53 ^A	4.64 ^{A, B}	4.52 ^{B, C}	4.78 ^A	4.45 ^A	3.73 ^A	3.32 ^A
4	4.04 ^A	4.25 ^B	5.64 ^B	5.08 ^A	4.53 ^A	4.34 ^A	3.93 ^A

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes P=0.05

Cuadro 23.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el peso relativo (%) de la bolsa de Fabricio del pollo de engorda.

LOTE	% DEL PESO CORPORAL						
	dia 0	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	0.21 ^A	0.24 ^A	0.29 ^A	0.24 ^A	0.28 ^A	0.16 ^A	0.22 ^A
2	0.21 ^A	0.22 ^A	0.12 ^A	0.13 ^A	0.32 ^A	0.25 ^A	0.22 ^A
3	0.18 ^A	0.28 ^A	0.27 ^A	0.32 ^A	0.23 ^A	0.17 ^A	0.16 ^A
4	0.18 ^A	0.14 ^A	0.15 ^A	0.18 ^A	0.26 ^A	0.18 ^A	0.17 ^A

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes $P=0.05$

Cuadro 24.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el peso relativo del bazo del pollo de engorda.

LOTE	x DEL PESO CORPORAL						
	dia 9	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	0.09 ^a	0.08 ^a	0.09 ^a	0.07 ^a	0.17 ^a	0.09 ^a	0.11 ^a
2	0.08 ^a	0.12 ^a	0.25 ^a	0.08 ^a	0.17 ^a	0.11 ^a	0.10 ^a
3	0.11 ^a	0.09 ^a	0.12 ^a	0.13 ^a	0.16 ^a	0.10 ^a	0.10 ^a
4	0.11 ^a	0.06 ^a	0.15 ^a	0.13 ^a	0.13 ^a	0.14 ^a	0.10 ^a

Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes $P < 0.05$

Cuadro 25.- Efecto del consumo de aflatoxinas y de la vacunacion con IBF en el peso relativo del timo (%) del pollo de engorda.

LOTE	X DEL PESO CORPORAL						
	dia 0	dia 15	dia 22	dia 29	dia 36	dia 43	dia 50
1	0.46 ^a	0.85 ^a	0.76 ^a	0.51 ^a	0.77 ^a	2.54 ^{a,1}	0.52 ^{a,2}
2	0.53 ^a	0.78 ^a	0.27 ^b	0.49 ^a	0.79 ^a	0.56 ^{a,1}	0.37 ^{a,2}
3	0.35 ^a	0.67 ^a	0.77 ^a	0.63 ^a	0.68 ^a	0.92 ^a	0.59 ^a
4	0.33 ^a	0.35 ¹	0.88 ^a	1.06 ^a	0.93 ^a	0.37 ^b	0.12 ^b

Notas: con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes $P < 0.05$

Lote 2.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 2 presentaron el hígado de color café amarillento, de consistencia firme y con salida de sangre al corte; microscópicamente se observó congestión moderada, presencia de pequeñas vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos y varios nódulos de tejido meloide entre el perénquima hepático. En el día 15, el hígado era amarillo pálido y tenía consistencia suave, con los bordes levemente redondeados; microscópicamente se observó congestión moderada y pequeñas áreas focales de degeneración y necrosis de los hepatocitos, con infiltración discreta de heterófilos en algunas vénulas, observándose además algunos focos de tejido meloide entre el perénquima. Para el día 21 del experimento, el hígado de los animales muestreados era de color amarillento y de consistencia suave, con zonas rojizas de congestión y pequeñas hemorragias; microscópicamente los hepatocitos presentaron degeneración vacuolar de moderada a severa, a nivel centrolobulillar. En el día 28 el hígado era café amarillento y de consistencia suave; microscópicamente se observó degeneración vacuolar difusa moderada de los hepatocitos, con algunos focos de degeneración severa y necrosis centrolobulillar, con proliferación de tejido conjuntivo y células mononucleares alrededor de las vénulas; en uno de los animales se observó un foco de tejido meloide en un espacio portal. En los días 35 y 43 del experimento, el hígado se observó de color café amarillento y de consistencia firme, con los lobulillos muy aparentes; microscópicamente se observó congestión moderada y en los

hepatocitos Áreas irregulares de degeneración y necrosis, también se observó infiltración de heterófilos y células mononucleares en algunas vénulas. En el día 50 el órgano continuaba amarillento y de consistencia firme; microscópicamente se observó degeneración vacuolar difusa moderada de los hepatocitos, uno de los animales presentó hiperplasia moderada de los conductos biliares y otro, un foco de tejido mieloide entre el parénquima hepático.

Lote 3.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 3 presentaron el hígado de color café amarillento, de consistencia firme y bordes biscelados, microscópicamente se observó la presencia de pequeñas vacuolas en los hepatocitos; en uno de los animales se observó un nódulo de tejido mieloide en el parénquima. En el día 15, el hígado presentó un color café rojizo y consistencia firme, microscópicamente se observaron vacuolas pequeñas en el citoplasma de los hepatocitos. A partir del día 22 y hasta el final del experimento, no se observaron cambios patológicos en el hígado de ningún animal del lote 3.

Lote 4 .- En el día 8 del experimento, los animales del lote 4 presentaron el hígado de color café amarillento, con zonas rojizas en la superficie, la consistencia del órgano era firme y los bordes biscelados; microscópicamente se observó congestión difusa moderada y vacuolización discreta de los hepatocitos; en todos los animales muestreados se observaron varios focos de tejido mieloide en el parénquima hepático. Para el día 15 del experimento, el hígado tenía una coloración café muy pálida con zonas rojizas de distribución irregular, la consistencia del

órgano era suave; microscópicamente se observaron zonas de congestión moderada y en los hepatocitos degeneración vacuolar de moderada a severa, con infiltración discreta de heterófilos y células mononucleares alrededor de las vénulas, así como algunos focos de tejido mieloide en el parénquima hepático. En el día 21 del experimento, el hígado era de color amarillento y de consistencia suave; microscópicamente los hepatocitos presentaron degeneración vacuolar severa a nivel centrolobulillar, observándose además infiltración heterófila y proliferación de tejido conjuntivo alrededor de las venas centrales. En el día 28 el órgano continuaba de color amarillento y de consistencia suave; microscópicamente se observó degeneración vacuolar difusa de moderada a severa en los hepatocitos, con zonas irregulares de necrosis y desorganización de los cordones de hepatocitos, así como proliferación de tejido conjuntivo alrededor de las venas. En los días 36 y 43 del experimento, el hígado se observó de color amarillento, de consistencia moderadamente firme y con los lobulillos muy aparentes; microscópicamente se observaron zonas de degeneración y necrosis severas a nivel centrolobulillar y periportal; en dos animales se observaron además varios focos de tejido mieloide entre el parénquima hepático. En el día 50 del experimento, el hígado presentó una coloración café amarillenta y consistencia firme; microscópicamente se observó degeneración vacuolar difusa moderada de los hepatocitos, así como de degeneración severa y necrosis hepatocítica, de distribución centrolobulillar, con proliferación de tejido conjuntivo

alrededor de las venas centrales; uno de los animales muestreados presentó un foco de tejido mieloides entre el parénquima hepático.

b) Bolsa de Fabricio

Lote 1.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 1 presentaron la bolsa de Fabricio de color amarillo pálido, de forma redondeada y de consistencia suave; microscópicamente se observó que los folículos linfoides estaban compuestos por células grandes, basófilas, con núcleo central de cara abierta, sin distribución clara entre las zonas cortical y medular. Hacia el día 15 del experimento, la bolsa era redondeada y amarillenta, de consistencia suave; microscópicamente se observó que las zonas cortical y medular de los folículos linfoides empezaban a ser aparentes. Entre los días 22 y 36 del experimento, los animales del lote 1 no presentaron cambios patológicos en la bolsa de Fabricio; en el día 43, uno de los animales muestreados presentó en la bolsa congestión moderada y depleción linfoides discreta en algunos folículos. En el día 50 del experimento, la bolsa de Fabricio era de color rosa claro y de consistencia firme; microscópicamente se observó que los folículos linfoides estaban levemente disminuidos de tamaño y había un aumento moderado en el grosor de las travéculas interfoliculares de tejido conjuntivo.

Lote 2.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 2 presentaron la bolsa de Fabricio de forma redondeada, de color amarillo pálido y de consistencia suave; microscópicamente se observó que los folículos linfoides estaban compuestos por células grandes, basófilas, con núcleo central de cara abierta;

la lámina propia de la mucosa bursal presentó edema discreto y en uno de los animales muestreados se observó infiltración heterófila moderada. En el día 15 del experimento, la bolsa de Fabricio se observó ligeramente disminuida de tamaño, redondeada, de color rosa claro y consistencia suave; microscópicamente se observó falta de diferenciación entre las zonas cortical y medular de los folículos linfoides, así como depresión linfoide central discreta en algunos folículos; uno de los animales muestreados presentó necrosis linfoide multifocal discreta. Hacia el día 22 del experimento, la bolsa continuaba pequeña, rosa pálido y de consistencia suave; microscópicamente presentaba depresión y necrosis linfoide moderada de los folículos, y en uno de los animales se observó infiltración heterófila moderada alrededor de algunos folículos. Entre los días 29 y 43 del experimento, el órgano era redondeado, de color rosado y de consistencia suave; microscópicamente se observó edema discreto, depresión y necrosis linfoides de leves a moderadas, y engrosamiento moderado de las travéculas por tejido conjuntivo. En el día 50 del experimento, la bolsa era redondeada, rosada y suave, con depresión linfoide de leve a moderada en los folículos y con engrosamiento travecular por tejido conjuntivo.

Lote 3.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 3 presentaron la bolsa de Fabricio de color rosa claro, de forma redondeada y de consistencia suave; microscópicamente se observó que los folículos linfoides estaban compuestos por células basófilas, grandes, con núcleo central de cara abierta; se

observaron claras evidencias de diferenciación entre las zonas cortical y medular de los folículos. En el día 22 del experimento, la bolsa continuaba rosada, redondeada y de consistencia suave; microscópicamente se observó clara diferenciación entre las zonas cortical y medular de los folículos linfoides, en algunos folículos linfoides las zonas centrales mostraron una leve reducción en la densidad celular; un animal presentó exudado serofibrinoso en la luz bursal. A partir del día 29 y hasta el final del experimento, la bolsa de Fabricio no presentó cambios patológicos, observándose rosada, redonda y suave, con folículos linfoides de aspecto homogéneo con definición de las zonas cortical y medular.

Lote 4.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 4 presentaron la bolsa de Fabricio de color rosa, de forma redondeada, de consistencia suave y ligeramente disminuida de tamaño; microscópicamente se observó falta de diferenciación entre las zonas cortical y medular de los folículos linfoides, con necrosis moderada de los linfocitos centrales de los folículos; en dos de los animales se observó infiltración heterófila moderada en los folículos. En el día 15 del experimento, la bolsa era rosa pálido, pequeña y de consistencia firme, con congestión moderada; microscópicamente se observó en los folículos depresión linfoide moderada y necrosis linfoide de moderada a severa. Hacia el día 22 la bolsa era de color rosa intenso, de consistencia firme y presentaba congestión moderada; microscópicamente en los folículos linfoides se observó depresión

moderada; uno de los animales muestreados presentó depresión linfoide severa, edema interfolicular y vacuolización del epitelio superficial. Entre los días 29 y 36 del experimento, la bolsa fué observada de color rosa, con congestión moderada; microscópicamente se observó en los folículos depresión linfoide de leve a moderada. En las observaciones realizadas en los días 43 y 50, la bolsa era rosa pálido, pequeña y de consistencia firme; microscópicamente se observó depresión linfoide severa en los folículos y engrosamiento severo de las travéculas interfoliculares por tejido conjuntivo; en tres de los cuatro animales muestreados en el día 49 se observó además infiltración heterófila moderada.

c) Timo

Lote 1.- Los animales del lote 1 no presentaron cambios patológicos en el timo durante el experimento.

Lote 2.- Los animales del lote 2 no presentaron cambios patológicos aparentes en la observación macroscópica del timo durante el experimento; microscópicamente se observó que a partir del día 29 y hasta el día 50, había una ligera reducción en el grosor de la zona cortical del órgano, con una menor densidad de las células linfoides del tejido.

Lote 3.- Los animales del lote 3 no presentaron cambios patológicos en el timo durante el experimento.

Lote 4.- Los animales del lote 4 no presentaron cambios patológicos aparentes en la observación macroscópica del timo durante el experimento. Microscópicamente se observó que uno de

los animales muestreados el día 15 presentó infiltración heterófila leve en la zona cortical; a partir del día 22 y hasta el día 43 se observó ligera reducción en el grosor de la zona cortical del timo, con disminución de la densidad celular de los linfocitos corticales. La observación microscópica del día 50 reveló que la zona cortical del timo estaba disminuida de grosor, con baja población de células linfoides y proliferación abundante de tejido conjuntivo (atrofia).

d) Bazo

Lote 1.- Los animales del lote 1 no presentaron cambios patológicos en el bazo durante el experimento.

Lote 2.- En el día 8 del experimento, los animales del lote 2 no presentaron cambios patológicos macroscópicos en el bazo; en la observación microscópica se detectó que las zonas linfoides estaban mal definidas; uno de los animales presentó infiltración heterófila multifocal. En el día 15 del experimento el bazo era redondeado y de color rojizo; microscópicamente se observó congestión difusa leve, nódulos linfoides aparentes pero con escaso número de células y con algunos linfocitos en necrosis. A partir del día 21 y hasta el final del experimento el bazo era de color rojizo; microscópicamente presentó congestión leve y los nódulos linfoides aparentes pero con reducción en el número de células en áreas mal definidas.

Lote 3.- Los animales del lote 3 no presentaron cambios patológicos en el bazo durante el experimento.

Lote 4 .- En el día 8 del experimento, los animales del lote 4

presentaron el bazo de color rojizo; microscópicamente se observó congestión difusa moderada y las zonas linfoides mal definidas. A partir del día 15 y hasta el final del experimento, el bazo presentó congestión leve y los nódulos linfoides mal definidos, en algunos casos con una menor densidad celular y necrosis linfoide discreta.

3.- CARACTERISTICAS CLINICAS

El comportamiento clínico de los animales de experimentación fué diferente entre los lotes 1 y 3, que no presentaron signología clínica evidente, del observado en los lotes 2 y 4, que presentaron reducción en el consumo de alimento y en la velocidad de crecimiento, apatía, estornudos ocasionales, erizamiento de plumas y deformación de los tarsos en algunos animales.

En el lote 1 la mortalidad natural fué baja y constante, muriendo un total de 11 animales; la mortalidad natural se asoció principalmente a Síndrome Ascítico.

En el lote 2 la mortalidad natural fué de 19 animales, y se observó principalmente en las tres primeras semanas del experimento; en las dos primeras semanas las muertes fueron debidas a infección del saco vitelino, en las dos siguientes se asoció a Enfermedad Crónica Respiratoria, y al final del experimento se presentaron casos de Síndrome Ascítico.

En el lote 3 la mortalidad natural fué muy baja, 4 animales, presentándose Enfermedad Crónica Respiratoria y Síndrome Ascítico

al final del experimento.

En el lote 4 la mortalidad natural fué de 16 animales, presentándose principalmente en la primera semana, donde murieron 10 animales de infección del saco vitelino; los casos observados posteriormente correspondieron a Enfermedad Crónica Respiratoria y a Síndrome Ascítico.

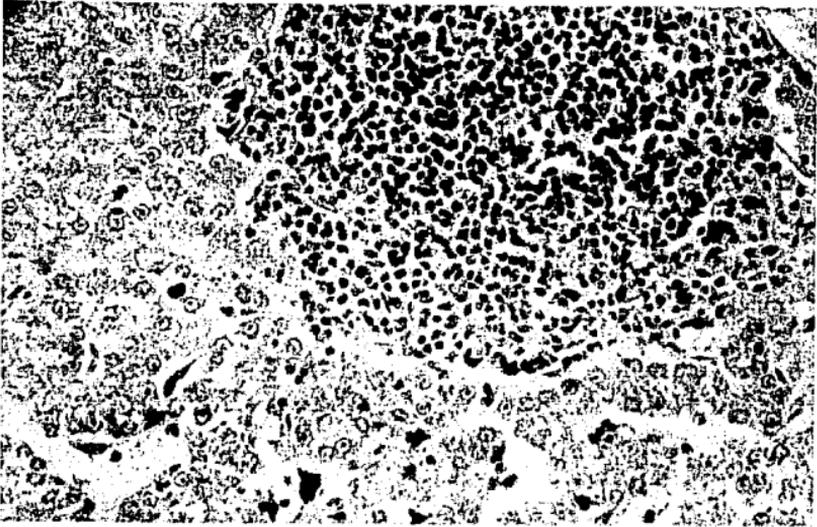


FIGURA 20

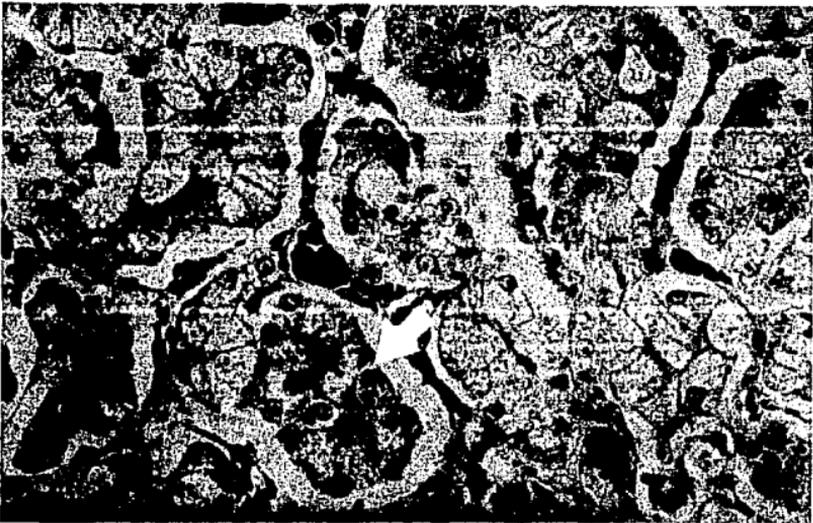


FIGURA 21

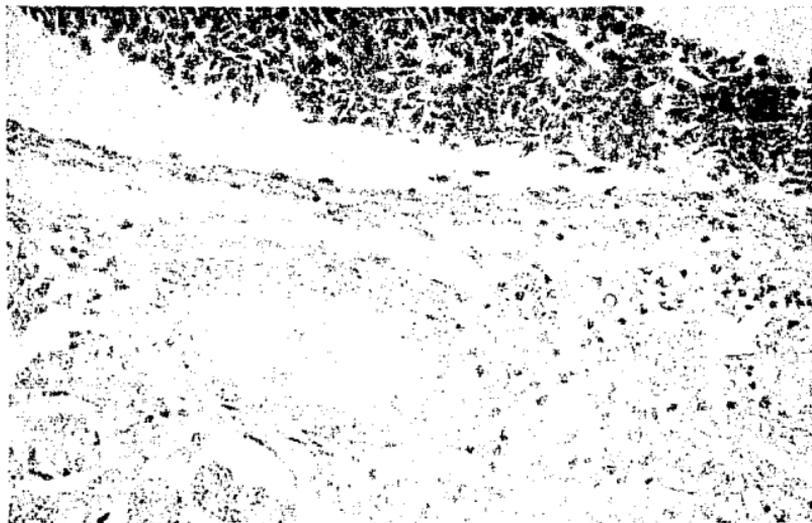


FIGURA 22

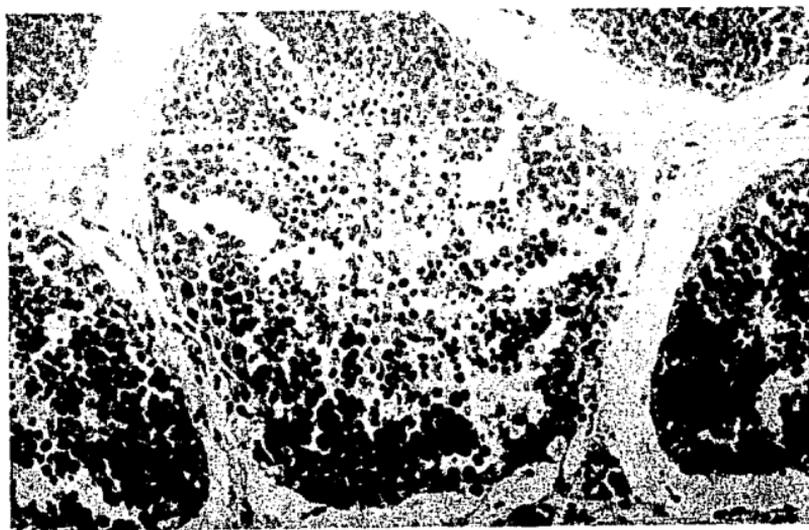


FIGURA 23

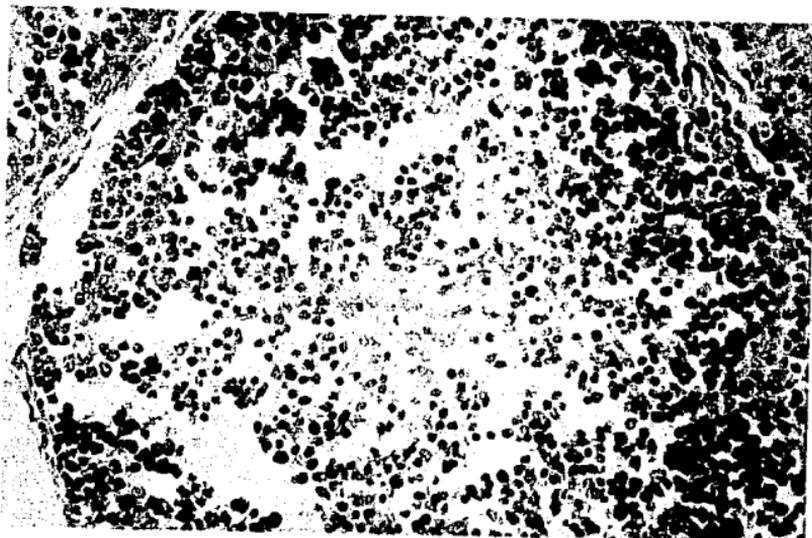


FIGURA 24

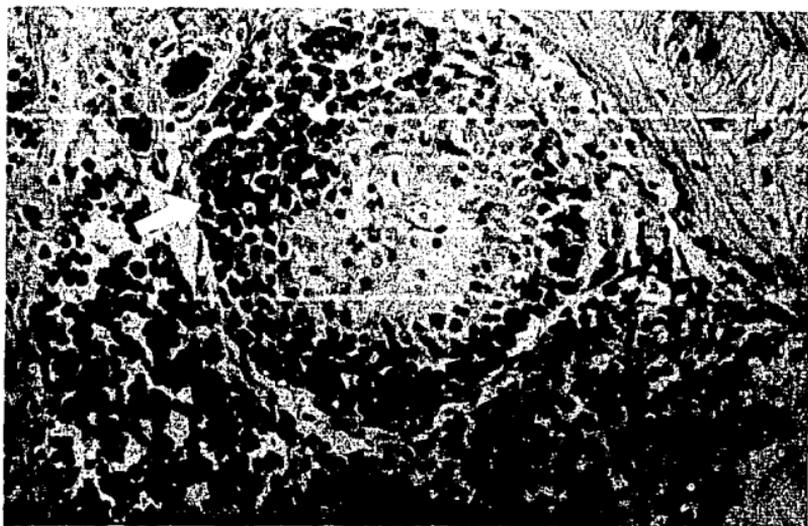


FIGURA 25

- Figura 20.-** Foco de metaplasia mieloide y degeneración grasa discreta en hepatocitos. Lote 4 (AFLA-IBF), 2ª semana (X100).
- Figura 21.-** Degeneración grasa hepatocítica con gotas hialinas en el citoplasma (flecha). Lote 4 (AFLA-IBF), 3ª semana (X400).
- Figura 22.-** Hiperplasia biliar (flecha) y degeneración grasa hepatocítica. Lote 4 (AFLA-IBF), 7ª semana (X400).
- Figura 23.-** Necrosis linfoide central en nódulo de Bolsa de Fabricio. Lote 2 (AFLA), 2ª semana (X400).
- Figura 24.-** Depleción linfoide central en nódulo de Bolsa de Fabricio. Lote 4 (AFLA-IBF), 2ª semana (X400).
- Figura 25.-** Depleción linfoide central e infiltración heterófila (flecha) en nódulo linfoide de Bolsa de Fabricio. Lote 4 (AFLA-IBF), 3ª semana (X400).

DISCUSION

OBTENCION DE AFLATOXINAS

La producción de aflatoxinas *in vitro* es variable según la cepa utilizada, el sustrato, la temperatura, la humedad y el sistema de fermentación utilizado (Reddy y col., 1971; Osorio, 1976).

En el presente estudio, utilizando una fermentación sólida en arroz a 28 °C, la cinética de producción mostró que las aflatoxinas se empiezan a producir en cantidades detectables por cromatografía en capa fina a las 72 horas de incubación, y que la producción máxima de AFB1 fué a las 192 horas, con una producción de 26.6 ppm (ug/g), utilizando una cepa de *A. flavus* JMI 91019. La eficiencia en la producción de aflatoxinas por éste sistema fué menor a la reportada por Shotwell y col. (1966) bajo condiciones de rotación constante, utilizando una cepa de *A. flavus* NRRL-2999 logrando obtener una producción máxima de 1 mg de AFB1 por gramo de material cosechado, encontrando además, cantidades detectables de aflatoxinas a las 48 horas de incubación.

Las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden variar enormemente en su capacidad para producir aflatoxinas, y la capacidad genética de una cepa en particular es determinante para el nivel de producción y el tipo de metabolitos tóxicos

producidos (Goldblatt, 1969; Pier, 1981). La diferencia entre los niveles de producción obtenidos en este estudio con los reportados en la literatura puede deberse, en gran medida, al tipo de cepa utilizada, la cepa NRRL-2999 utilizada por Shotwell y col. (1966) es una cepa que fué seleccionada cuidadosamente y es una cepa de referencia recomendada por la literatura internacional para la producción de aflatoxinas in vitro (Goldblatt, 1969), y al sistema de fermentación utilizado, donde la agitación constante del cultivo favorece la aireación de las colonias y la formación de las toxinas.

El paso final en un procedimiento de identificación de aflatoxinas es la comprobación de su actividad biológica, y en este sentido, el pato pekinés recién nacido es el animal de elección para la reproducción de las lesiones; las lesiones hepáticas más características incluyen degeneración grasa de los hepatocitos, hiperplasia biliar y necrosis multifocal (Rosiles, 1977); todos estos cambios fueron observados en los animales utilizados en el presente estudio para la comprobación de la actividad biológica de las aflatoxinas producidas, presentándose la muerte de los animales utilizados a los 14.6 días promedio después del inicio de la ingestión de las toxinas.

EFFECTOS DEL CONSUMO DE AFLATOXINAS Y DE LA VACUNACION CON IBF EN EL POLLO DE ENGORDA

La productividad de la industria avícola depende en gran medida del estado de salud y del manejo sanitario que se lleve a cabo en las parvadas comerciales y en este sentido la presencia de un sistema inmunológico funcional es esencial. Modificaciones en los mecanismos de resistencia natural y de inmunidad pueden ser causados por un número importante de factores que se encuentran en el medio ambiente, lo que incrementa la susceptibilidad hacia las enfermedades infecciosas y el desempeño productivo de los animales disminuye (Tizard, 1982; Stites y col., 1983); entre los factores con capacidad inmunodepresora comprobada se incluyen a las micotoxinas y a algunos virus aviarios (Sharma, 1987).

Las aflatoxinas son las micotoxinas más difundidas en la naturaleza y las condiciones de almacenamiento y comercialización de alimentos y productos destinados a consumo avícola en nuestro país favorecen en gran medida su producción; la aflatoxicosis aviar es uno de los problemas más graves que incide sobre la producción avícola (Rosiles, 1977).

Asimismo, existen algunos virus aviarios en los que se ha demostrado actividad inmunodepresora, tal es el caso del virus de la Infección de la bolsa de Fabricio, cuya presencia es enzoótica en las zonas productoras de aves y las parvadas comerciales se exponen de manera temprana a ambientes contaminados (Sharma, 1987), incluso, algunas cepas vacunales del VIBF son capaces de

producir efectos detrimentales en el sistema inmunológico de las aves (García, 1985).

La posibilidad de que estos factores inmunodepresores se presenten de manera simultánea en el pollo de engorda es considerable y existen reportes en la literatura que indican un incremento importante en las pérdidas producidas por el VIBF cuando se presenta contaminación por aflatoxinas en la dieta (Chang y Hamilton, 1982). Giambrone y col. (1978b) demostraron experimentalmente estos efectos utilizando una cepa patógena del VIBF y 2.5 ug/g de aflatoxinas en la dieta.

No existen estudios que analicen los efectos de las cepas vacunales del VIBF cuando son inoculadas en animales que consumen aflatoxinas, situación que es muy probable bajo las condiciones de producción nacional y que puede incidir negativamente en el comportamiento productivo y en el desarrollo de la capacidad inmunológica del pollo de engorda. El planteamiento del presente estudio esta apoyado en la premisa de que el consumo de aflatoxinas modifica la respuesta del pollo de engorda hacia los efectos de una cepa vacunal del VIBF.

Los efectos del consumo de aflatoxinas en la mortalidad natural del pollo de engorda dependen de la dosis ingerida y del tiempo de ingestión de las toxinas, así como de la raza, edad y sexo de los animales afectados (Reddy y col., 1984; Defalla y col., 1987). Smith y Hamilton (1970) reportan que una dosis de 2.5 ug/g de aflatoxinas afecta la mortalidad natural, mientras

que Pier (1981) afirma que esta dosis no afecta significativamente la mortalidad.

Por otra parte, la vacunación de las aves en la primera semana de vida con una cepa atenuada de IBF, puede tener efectos detrimentales en los animales vacunados, dependiendo de la cepa vacunal utilizada y del nivel de inmunidad materna presente en los animales (García, 1985), sin embargo, no existen reportes en la literatura que mencionen que la vacunación con IBF a edad temprana incida sobre los índices de mortalidad natural del pollo de engorda.

Chang y Hamilton (1982) reportaron que una cepa de campo del VIBF que bajo condiciones experimentales no producía la muerte de los animales causó cerca de un 50% de pérdidas cuando se presentó contaminación con aflatoxinas en la dieta. Giambrone y col. (1978b) estudiaron el sinergismo de las aflatoxinas y una cepa patógena del VIBF, encontrando un significativo aumento de la mortalidad y una menor ganancia de peso corporal, en comparación con los animales que recibieron tratamientos individuales de aflatoxinas o VIBF.

La mortalidad natural de los animales de experimentación del presente estudio fué mayor en los lotes 2 y 4, que consumieron aflatoxinas, a la observada en los lotes 1 y 3, que no las consumieron. Los animales del lote 4, que consumieron aflatoxinas y fueron vacunados contra IBF, tuvieron una mortalidad más elevada durante la primera semana de vida (Cuadro 10) disminuyendo el nivel de mortalidad posteriormente, en cambio,

los animales del lote 2, que sólo consumieron aflatoxinas, tuvieron una mortalidad constante sobre todo en las primeras tres semanas.

Aparentemente los animales de los lotes que consumieron aflatoxinas tuvieron una mortalidad más elevada porque las aflatoxinas alteran los mecanismos de defensa de las aves. La inmunodepresión es uno de los aspectos más importantes de las aflatoxinas ya que producen una disminución en la capacidad de respuesta contra agentes externos (Hamilton, s.a.; Pier, 1981; Giambrone 1985a) y la mortalidad observada puede explicarse por el incremento en la susceptibilidad a microorganismos medioambientales en los animales intoxicados. La mortalidad observada en los animales del lote 4 en la primera semana de edad es muy sugestiva de que existe un efecto aditivo en la intensidad de los efectos detrimentales de las aflatoxinas y de la cepa vacunal del VIBF utilizada, estos hallazgos son compatibles con los obtenidos por Giambrone y col. (1987b) y por Chang y Hamilton (1982) con cepas de campo, aparentemente el efecto de la cepa vacunal sólo se observa en un lapso muy breve, de unos cuantos días después de recibir la cepa vacunal, ya que el nivel de mortalidad disminuye posteriormente. Desafortunadamente el desconocimiento del origen de los animales utilizados y de su estado inmunológico con respecto al VIBF no nos permite considerar la influencia de la inmunidad materna en este efecto.

Uno de los hallazgos de campo más importante de la aflatoxicosis es la reducción en los niveles de ganancia de peso

(Newberne, 1973) y diversos autores han reproducido experimentalmente este efecto (Smith y Hamilton, 1970; Reddy y col., 1984; Giambrone y col., 1985a; Huff y col., 1986) utilizando dosis que van de 0.7 a 10 ug/g de aflatoxinas.

En el presente experimento, los animales de los lotes 2 y 4 tuvieron una ganancia de peso significativamente inferior a la de los animales de los lotes 1 y 3; estos hallazgos son similares a los reportados anteriormente por Reddy y col. (1984) y por Ubosi y col. (1985a).

Los animales del lote 4 tuvieron un promedio de peso ligeramente menor a los del lote 2 en las dos primeras semanas del experimento y posteriormente los pesos del lote 2 fueron ligeramente menores a los del lote 4, sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes, que sugiriera un efecto sinérgico entre las aflatoxinas y la cepa vacunal del VIBF para deprimir la ganancia de peso, como lo mencionado por Giambrone y col. (1978b) en sus hallazgos con una cepa patógena del VIBF, posiblemente las diferencias entre estos resultados sean debidas a las diferencias en la virulencia de las cepas utilizadas.

Al igual que para la ganancia de peso, las observaciones de campo y los estudios experimentales indican que la ingestión de aflatoxinas disminuye el consumo de alimento (Edds y Bortell, 1983; Ubosi y col. 1985a). En el presente estudio, los lotes 2 y 4 tuvieron un consumo de alimento/lote menor al de los lotes 1 y 3, siendo el lote 4 el que consumió menor cantidad de alimento

hasta la 5ª semana (Cuadro 12). En este experimento, el consumo de alimento fué medido en base al lote, por lo que se debe considerar que los lotes 2 y 4, al tener una mortalidad natural mayor, tuvieron menos animales para consumir alimento, y en gran medida las diferencias entre los lotes pueden explicarse por este factor.

El último de los parámetros productivos a considerar fué la conversión alimenticia, que indica el grado de eficiencia en la utilización del alimento para producir ganancia de peso. La literatura también reporta que la ingestión de aflatoxinas incide negativamente en la conversión alimenticia (Smith y Hamilton, 1970), incluso a partir de los 14 días de edad, y se ha observado que la ganancia de peso y el consumo de alimento se afectan con niveles de aflatoxinas más bajos que los necesarios para afectar la conversión alimenticia (Ubosi y col., 1985a; Defalla y col., 1987). En el presente estudio, el mejor índice de conversión alimenticia fué obtenido en el lote 3, seguido del lote 4, lote 1 y lote 2. La conversión alimenticia del lote 2 (2.45) es similar a la reportada por Smith y Hamilton (1970) para los casos de aflatoxicosis crónica. El lote 4 presentó una conversión alimenticia similar (2.18) a la de los lotes 3 y 1 (2.07 y 2.26 respectivamente), este efecto es posiblemente debido a la marcada disminución en el consumo de alimento del lote 4 y no a una realmente eficiente conversión alimenticia. La afección de los parámetros productivos es de gran importancia económica y es necesario evaluar en conjunto a todos los parámetros existentes,

ya que el nivel de conversión alimenticia puede ser modificado por un bajo consumo de alimento si no se toma en cuenta la ganancia de peso, como lo observado en el lote 4, que a pesar de tener muy buen nivel de conversión alimenticia, tuvo un consumo de alimento muy bajo y una ganancia de peso muy pobre, sin llegar a obtener un promedio de peso requerido para salir al mercado (2.1 kg a las 7 semanas).

La conversión alimenticia deficiente representa la suma de muchas influencias, pero en sentido práctico representa una falla en la utilización de los nutrientes de la dieta (Richardson y col., 1987). Cavalheiro (1983) menciona como una posible explicación en la disminución de la eficiencia de la conversión alimenticia la falta de absorción de nutrientes, representada por un aumento en la concentración de lípidos fecales, aparentemente debida a una disminución en la lipasa pancreática y en la concentración de sales biliares necesarias para la absorción de nutrientes. Se debe tomar en cuenta que la composición de la dieta es un factor determinante para la observación de los efectos de las aflatoxinas, la concentración de proteínas de la ración es un factor biológico a considerar, así como la interacción de las aflatoxinas con algunas vitaminas (Pier, 1981).

Asimismo, se ha reportado que las aflatoxinas tienen un efecto depresor sobre los tejidos hematopoyéticos y esto se ve reflejado en la sangre, tanto en el suero como en sus elementos celulares (Mohiuddin y col., 1986). Las aflatoxinas producen

anemia caracterizada por disminución en los valores del hematocrito (ht), del número total de glóbulos rojos (GR) y de la concentración de hemoglobina (Hb), aún en dosis muy bajas (Tung y col., 1975; Lanza y col., 1977; Campbell y col., 1983; Mohiuddin y col., 1985; Huff y col., 1986), sin embargo, el origen de la anemia no ha sido bien determinado.

Por otra parte, no existen reportes que indiquen que el VIBF, ni con cepas de campo o vacunales, alteren las características de la serie roja del hemograma del pollo de engorda.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el porcentaje de ht y la concentración de Hb fueron menores en los lotes 2 y 4, en comparación con los lotes 1 y 3, sin ser las diferencias estadísticamente significativas. El número de GR fué menor en los lotes 2 y 4 en comparación con los lotes 1 y 3, observándose diferencias estadísticamente significativas en la 3a, 4a, 5a y 7a semanas; no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los lotes 1 y 3 ni entre los lotes 2 y 4.

Aunque los valores de la serie roja de los lotes 2 y 4 muestran una tendencia a la anemia, estos resultados no son completamente concluyentes para la generación de un cuadro de anemia detectado por procedimientos rutinarios de hematología clínica, posiblemente porque la dosis de aflatoxinas utilizada no fué lo suficientemente elevada para generar el cuadro; por otro lado, los animales de los lotes 2 y 4 presentaron lesiones en hígado y en riñón (ver resultados) indicativos de anemia y de una

respuesta de adaptación por parte del animal.

Tung y col. (1975) observaron una disminución en los valores de ht, Hb y GR, con hiperplasia mieloide y disminución de la cantidad de tejido adiposo de la médula ósea, observando además esplenomegalia y una leve respuesta macrocítica en dosis bajas de aflatoxinas que no modificaron el ht ni la Hb, pero que sí reducen el número de GR, sugiriendo fuertemente el origen hemolítico de la anemia. Los resultados obtenidos en el presente estudio son muy similares a los anteriores.

La vacunación con VIBF no tuvo ningún efecto detectable en los valores de la serie roja de los animales de experimentación, presentandose un comportamiento muy similar entre el lote 1 (testigo) y el 3 (vacunado con VIBF) y entre el lote 2 (sólo aflatoxinas) y el lote 4 (Aflatoxinas + VIBF).

También está reportado que dosis elevadas de aflatoxinas producen un aumento en el número total de glóbulos blancos (GB), que se cree es debido a hiperplasia medular de células progranulocíticas, la leucocitosis está determinada por un incremento en la proporción de heterófilos, cursando con linfocitopenia que indica además efecto inmunosupresor (Tung y col., 1975; Chang y Hamilton, 1979a; Chang y Hamilton, 1979b; Mohiuddin y col., 1986). Los casos de IBF cursan con linfocitopenia al ser los linfocitos B las células blanco para la replicación viral (Luckert, 1983; Giambrone, 1983). Estos cambios, sin embargo, son transitorios y la cuenta linfocitaria regresa a niveles normales en una semana. No existen reportes que

mencionen que las cepas vacunales del VIBF produzcan cambios en la cuenta leucocitaria del pollo de engorda.

Los resultados de la determinación del número de GB de los animales de experimentación tienen un comportamiento similar entre los lotes y están incluidos dentro de los niveles reportados como normales para el pollo de engorda (Olson, 1959), salvo en los valores de la 3a semana del lote 4 y de la 5a semana del lote 2, donde hay una marcada leucocitosis estadísticamente significativa.

El comportamiento de la proporción de leucocitos circulantes también fué similar entre los 4 lotes durante el estudio, observándose un incremento en la proporción de linfocitos en las dos primeras semanas, y un incremento en la proporción de heterófilos en las semanas restantes, sin embargo, los cambios más drásticos en el tipo celular predominante en la serie blanca se observaron en el lote 4 en la 3a semana con intensa leucocitosis neutrofilica y linfocitopenia marcada, y en los lotes 2 y 4 con neutrofilia moderada en las semanas restantes.

La evaluación de los cambios en el conteo total de GB y en el conteo diferencial de los mismos es difícil ya que existen muchos otros factores que pueden modificar el número y el tipo de leucocitos circulantes en las aves, como por ejemplo infecciones intercurrentes o estres medioambiental; los cambios observados en el lote 4 sugieren que la población de linfocitos fué la más afectada por el efecto combinado de las aflatoxinas y la cepa

vacunal del VIBF; la heterofilia que se observó en los lotes 2 y 4 pudiera ser explicada por efecto directo de las aflatoxinas o porque el estado inmunodepresor que éstas generan incrementa la frecuencia de presentación de infecciones secundarias, provocando una consecuente respuesta leucocitaria, sin embargo, no existe un respaldo estadístico adecuado que apoye estas observaciones.

Los hallazgos de química sanguínea incluyen una disminución significativa de las proteínas plasmáticas totales, prealbúmina, albúmina, alfa y beta globulinas (Campbell y col., 1983; Pegram y Wyatt, 1986; Huff y col., 1986; Defalla y col., 1987); los estudios sobre los efectos del VIBF no mencionan cambios en la concentración de proteínas plasmáticas en la enfermedad natural o por efectos de la vacunación con cepas de virus atenuado.

En los resultados de la cuantificación de las proteínas plasmáticas de los animales de experimentación, se observó una tendencia a una menor concentración de las mismas en los animales de los lotes 2 y 4, en comparación con los valores de los lotes 1 y 3, sin embargo, en la mayoría de las observaciones no hay diferencias estadísticamente significativas entre los lotes. Posiblemente la dosis de aflatoxinas utilizadas no fué lo suficientemente elevada como para provocar los cambios que otros autores mencionan para los valores de proteínas plasmáticas; la vacunación con VIBF no afectó la concentración de proteínas plasmáticas en el presente estudio.

El más intenso, pero a la vez más sutil efecto de las

aflatoxinas es su capacidad para alterar la funcionalidad del sistema inmunológico (Morilla, 1980; Pier y Mc Loughlin, 1985); se menciona que las aflatoxinas alteran la inmunogénesis sin suprimir la formación de anticuerpos, deprimen la formación de complemento e interferón, la fagocitosis de los macrófagos y la hipersensibilidad retardada cutánea (Pier y Mc Loughlin, 1985) sin embargo, los mecanismos exactos de la inmunodepresión permanecen oscuros.

Las investigaciones para evaluar la inmunidad humoral específica arrojan resultados contradictorios, Thaxton y col. (1984) mencionan que existe una marcada depresión en la formación de anticuerpos (Ac) contra eritrocitos de carnero (ERC), sin embargo, Campbell y col. (1983) con ERC y *Brucella abortus*, Giambrone y col. (1978b) utilizando vacunas de Newcastle y Bronquitis infecciosa, Tadeu (1982) con vacuna de Newcastle, Uboš y col. (1985b) con ERC y Giambrone y col. (1985a) con Newcastle y *Pasteurella multocida*, no lograron demostrar una disminución en la producción de Ac específicos por el consumo de aflatoxinas, a diferentes dosis y en diferentes periodos.

Por otra parte, la infección por el VIBF, sobre todo a edad temprana y con niveles bajos de Ac maternos, genera un daño permanente en el sistema de producción de Ac del animal (Giambrone, 1983; Luckert, 1983). La inmunodepresión resultante interfiere con el desarrollo de una respuesta inmune adecuada con las vacunas utilizadas rutinariamente en pollitos recién nacidos (Olbers, 1983; Sharma, 1989). Las cepas vacunales atenuadas del

VIBF también pueden ser capaces de producir lesiones considerables en los animales vacunados, y aunque no generen un cuadro de enfermedad clínica, los animales vacunados pueden persistir con lesiones en la bolsa de Fabricio que afecten la capacidad del sistema inmune humoral (García, 1985); la gravedad de las lesiones producidas y la intensidad de la inmunodepresión resultante dependen de la virulencia de la cepa utilizada, del título de Ac maternos y de la edad de los animales vacunados (Sharma, 1987).

En el estudio realizado por Giambrone y col. (1978b) para demostrar el sinergismo entre el consumo de 2.5 ug/g de aflatoxinas y una cepa patógena de VIBF inoculada en la 3a semana de edad, a pesar de que se observó un significativo aumento de la mortalidad y una menor ganancia de peso corporal, no se observaron modificaciones en la producción de Ac contra una cepa vacunal del virus de la enfermedad de Newcastle, y los animales tratados resistieron la exposición a una cepa patógena del virus de la enfermedad de Newcastle.

En el presente estudio no se encontraron diferencias en la producción de Ac contra la enfermedad de Newcastle entre los lotes de los animales de experimentación, los animales alcanzaron títulos que se consideran protectores (Tadeu, 1982) después de la 3a semana de edad.

Estos resultados son coincidentes con la mayoría de los experimentos anteriores donde no se demostró la disminución en la producción de Ac utilizando cepas vacunales del virus de

Newcastle, aparentemente la inmunogenicidad de las cepas vacunales utilizadas, así como los calendarios de vacunación establecidos, son lo suficientemente efectivos como para estimular un nivel adecuado de protección aún en presencia de factores inmunodepresores en el animal, como el consumo de aflatoxinas o la vacunación con VIBF a edad temprana, sin embargo hay que considerar que la prueba de inhibición de la hemaglutinación para la detección de anticuerpos contra el virus de Newcastle es una prueba poco sensible para detectar diferencias en los niveles de producción de anticuerpos.

Debido a que las pruebas serológicas para evaluar la producción de Ac estimulada por la cepa vacunal de VIBF utilizada no fueron realizadas adecuadamente, en el presente estudio no se pudo determinar el efecto que el consumo de aflatoxinas, o la propia cepa vacunal, tuvieron sobre el desarrollo de una respuesta de Ac anti VIBF. Estos datos son muy importantes para poder evaluar las modificaciones en el comportamiento de una cepa vacunal de VIBF cuando es inoculada en animales que están bajo los efectos de algún agente inmunodepresor, como la ingestión de aflatoxinas, por lo tanto, se requieren estudios posteriores sobre este punto para dilucidar los posibles efectos de una interacción entre las aflatoxinas y las cepas vacunales del VIBF.

La Inmunidad Mediada por Células (IMC) es el componente del sistema inmunológico más severamente afectado por la ingestión de aflatoxinas; diversos autores han reportado que la ingestión de aflatoxinas cursa con una inhibición de la respuesta de

hipersensibilidad cutánea retardada, con una inhibición de la liberación de interleucina II y con una disminución de la respuesta de injerto contra hospedador (Morilla, 1980; Giambrone y col. 1978a). Giambrone y col. (1985a y 1985b) encontraron que la depresión en la IMC es dosis dependiente y se observa a partir de la ingestión de 200 ppb por 5 semanas, encontrando que los efectos más severos se observan en las pruebas de hipersensibilidad cutánea retardada con fitohemaglutinina y de linfoblastogénesis con concanavalina A.

La relación del VIBF con una disminución en la actividad de la IMC es mucho menos clara, experimentalmente se ha demostrado que el VIBF reduce la respuesta a fitohemaglutinina en linfocitos de bazo a los 5 y 8 días de la infección, pero no a los 14, 28 o 42 días (Sharma, 1989), también se ha demostrado que el VIBF interfiere en la respuesta hacia el virus Herpes del pavo para proteger contra la enfermedad de Marek, que depende de la inmunidad celular (Calnek, 1983), sin embargo, se requieren más estudios para comprender la relación entre el VIBF y la IMC.

No existen reportes que analicen los posibles efectos de las cepas vacunales del VIBF sobre la capacidad del sistema inmune celular del pollo de engorda.

En el presente estudio, la capacidad de respuesta de la inmunidad celular se realizó con una prueba de hipersensibilidad cutánea retardada inespecífica con fitohemaglutinina. El índice de intradermoreacción fué menor para el lote 4, seguido del 2, 1 y 3, siendo estadísticamente diferente entre los lotes 4 y 3 y

estadísticamente similar entre los lotes 1, 2 y 3 y entre los lotes 1, 2 y 4. Estos datos indican que el efecto depresor más severo se observó en el lote 4, que recibió aflatoxinas y VIBF al mismo tiempo; las aflatoxinas solas tienen un efecto menos severo que el anterior, sin ser la diferencia estadísticamente significativa; el VIBF sólo no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de la IMC de los animales de experimentación.

Estos resultados son coincidentes con los datos que apoyan que la inmunidad celular se ve seriamente afectada por las aflatoxinas, el efecto del VIBF vacunal no es muy claro, aunque el hecho de que existan diferencias significativas entre los lotes 3 y 4 sugiere que en presencia de aflatoxinas, una cepa vacunal de VIBF puede afectar de manera importante la capacidad de respuesta del sistema de IMC, sin embargo, se requieren estudios más profundos para dilucidar este efecto.

Al igual que para la IMC, ha sido demostrado que la ingestión de aflatoxinas reduce la capacidad fagocitaria de heterófilos, monocitos y macrófagos, pero no de trombocitos, con efecto dosis dependiente (Chang y col., 1976; Chang y Hamilton 1978a y 1978b; Mohiuddin y col., 1986), mientras que los efectos del VIBF sobre el sistema de fagocitosis no han sido estudiados, aunque se sabe que las cepas patógenas del VIBF se pueden replicar en heterófilos y células reticulares (Correa, 1981).

En el presente estudio, la capacidad de fagocitosis fue evaluada en un ensayo in vitro a partir de células adherentes de sangre periférica, los resultados obtenidos indican que los

animales del lote 4 tienen un menor porcentaje de células adherentes con capacidad fagocitaria, seguidos por los animales de los lotes 2, 1 y 3, sin embargo, el número de partículas ingeridas por cada célula con capacidad fagocitaria (índice fagocítico) es muy similar entre los cuatro lotes.

Estos resultados, como en el caso de la IMC, también indican un efecto evidente de las aflatoxinas sobre el sistema de fagocitosis sobre los leucocitos adherentes de sangre periférica, coincidiendo con reportes anteriores, y aunque el efecto de la cepa vacunal del VIBF no es muy claro, las diferencias entre los lotes 3 y 4 pudieran indicar un efecto simultáneo de las aflatoxinas y el VIBF vacunal para deprimir la capacidad fagocitaria de los leucocitos. El hecho de que el índice fagocítico observado haya sido similar entre los cuatro lotes es incierto, aunque pudiera sugerir que los fagocitos no afectados mantiene todavía una respuesta adecuada en su capacidad fagocitaria. También en este punto se requieren estudios más profundos para determinar los efectos de las aflatoxinas y las cepas vacunales del VIBF en el sistema de resistencia inespecífica del pollo de engorda.

Las lesiones que se presentan en los pollos durante la aflatoxicosis son variables y dependen de la dosis y del tiempo de ingestión de las tóxicas; el hígado es el principal órgano afectado (Pier, 1981). En el caso de la IBF, la bolsa de Fabricio es el órgano blanco para la replicación viral y aquí es donde se desarrollan las lesiones más evidentes (Lukert, 1983); las cepas

vacunales del VIBF producen lesiones bursales que sólo pueden ser detectadas por histopatología (García, 1985).

El consumo de aflatoxinas incrementa significativamente el peso relativo del hígado, aún con dosis bajas, y éste incremento es debido a una acumulación progresiva de lípidos (Reddy y col., 1984), sin embargo, Huff y col. (1986) mencionan que la atrofia hepática y no la hepatomegalia, es el cambio inicial en las etapas tempranas de la intoxicación. En el presente estudio, los animales de los lotes 2 y 4 presentaron un ligero incremento en el peso relativo del hígado, con significancia estadística únicamente en la 3a semana, comparado con el peso relativo del hígado de los animales de los lotes 1 y 3; la incapacidad para generar hepatomegalia en los lotes 2 y 4 posiblemente se debió a que la dosis de aflatoxinas ingerida no fué lo suficientemente elevada; aparentemente la vacunación con VIBF a edad temprana no modifica el peso relativo del hígado.

Las lesiones hepáticas por la ingestión de aflatoxinas consisten en congestión, coloración amarillenta por degeneración grasa de los hepatocitos, puntilleo blanquecino por necrosis centrolobulillar, fibrosis y proliferación de conductos biliares, éstas lesiones se incrementan en intensidad según la dosis y el tiempo de ingestión (Eds y Bortell, 1983; Giambrone y col., 1985a; Nibbclinck, 1987; Defalla y col., 1987). El VIBF no produce directamente cambios patológicos en el hígado.

En el presente estudio, los animales de los lotes 1 y 3 no presentaron cambios patológicos importantes durante el

experimento, mientras que los animales de los lotes 2 y 4 presentaron cambios patológicos compatibles con los reportados en la literatura en los casos de aflatoxicosis leve y subaguda; en ambos lotes los cambios fueron incrementandose en severidad conforme transcurrió el experimento; un hallazgo importante que no es reportado con frecuencia es la presencia de focos de tejido mieloides en el hígado de los animales intoxicados, y probablemente refleja un intento del organismo animal de compensar un estado de anemia (Jubb y col., 1985).

La vacunación con VIBF a edad temprana, aparentemente no tuvo influencia en el desarrollo de las lesiones hepáticas, ya que los cambios observados fueron muy similares en los lotes 2 y 4.

En el caso de la bolsa de Fabricio,, algunos autores mencionan que el consumo de aflatoxinas puede generar reducción en el peso relativo y diversos grados de atrofia, con necrosis linfocítica leve (Campbell y col., 1983; Defalla y col., 1987; Rosiles, 1987); Ubosi y col. (1985b) reportaron que una dosis de 996 ppb durante 6 semanas causó disminución en el tamaño de la bolsa, aunque Reddy y col. (1984) con una dosis de 6 ppm por 28 días, no encontraron alteraciones en el peso relativo del órgano. Las cepas patógenas claramente afectan el tamaño y la morfología de la bolsa de Fabricio, aumentando al doble de su tamaño normal al 4o día de la infección y atrofiándose rápidamente después de éste tiempo, presentando necrosis linfocítica e infiltración heterófila al principio, y atrofia fibrosa al final (Hitchner,

1978; Naqi y col., 1979; Craig y col. 1980a y 1980b; Ley y col., 1983; Paasch, 1983). Las cepas vacunales del VIBF no producen cambios patológicos aparentes en la bolsa de Fabricio, sin embargo, han sido descritos diversos grados de lesiones microscópicas que incluyen necrosis linfoide, depleción linfoide, fibrosis, infiltración heterófila y quistes epiteliales; la intensidad de éstas lesiones depende de la virulencia de la cepa vacunal, la edad y el grado de inmunidad materna que posean los animales vacunados (Giambrone, 1983; Lukert, 1983; Garcia, 1985).

En el presente estudio, no se observaron diferencias en el peso relativo de la bolsa de Fabricio en ninguno de los lotes de los animales de experimentación. Los animales de los lotes 1 y 3 no presentaron cambios patológicos importantes en la bolsa de fabricio durante el experimento, lo que es indicativo de que la cepa vacunal del VIBF utilizada (D 78) no es capaz de producir lesiones bursales en los animales vacunados. En los animales del lote 2 se presentaron lesiones bursales leves consistentes principalmente en depleción linfoide leve y necrosis linfoide leve, hallazgos similares a los reportados por Cambell y col. (1983) y por Defalla y col. (1987).

En los animales del lote 4 la bolsa de Fabricio presentó lesiones microscópicas que incluyeron depleción linfoide de leve a moderada, necrosis linfoide de moderada a severa, infiltración heterófila de leve a moderada y tendencia a la fibrosis moderada al final del estudio. Estos datos sugieren que la susceptibilidad de los animales vacunados hacia la cepa vacunal del VIBF se

incrementó cuando consumieron aflatoxinas en la ración durante el periodo de crecimiento, aún con una dosis relativamente baja; no existen reportes previos que analicen esta situación. Se requiere de una serie de investigaciones posteriores sobre este punto, ya que la posibilidad de que más de uno de los factores inmunodepresores del pollo de engorda se presenten al mismo tiempo en el medio ambiente de los animales es considerable, y eventualmente una medida de protección hacia la parvada como lo es la vacunación contra la IBF, puede generar efectos detrimentales en las aves. Los mecanismos por medio de los cuales dos factores con tendencias inmunodepresoras puedan tener sinergismo permanecen desconocidos y su importancia justifica la realización de estudios más profundos.

En el caso del bazo, la ingestión de aflatoxinas se puede asociar con aumento de tamaño, congestión y reducción de la población de linfocitos de la pulpa blanca (Morilla, 1980; Huff y col., 1986; Defalla y col., 1987). El virus patógeno de IBF puede causar también congestión, infiltración heterófila y necrosis linfoide en los centros germinales (Naqi y col., 1979; Craig y col., 1980a; Ley y col., 1983), por otra parte, no se ha reportado que las cepas vacunales del VIBF generen lesiones esplénicas.

En el presente estudio, no se encontraron diferencias entre el peso relativo del bazo entre los lotes de los animales de experimentación. Los animales de los lotes 1 y 3 no presentaron cambios patológicos en el bazo, mientras que en los animales de

los lotes 2 y 4 se observaron cambios patológicos muy discretos, como congestión y ocasionalmente disminución leve en la densidad de la población linfoide de la pulpa blanca; los cambios en ambos lotes fueron muy similares en intensidad y, aparentemente fueron debidos al efecto del consumo de aflatoxinas, como ha sido descrito previamente, sin que la vacunación con el VIBF haya influido en la presentación o en la intensidad de las lesiones esplénicas.

Finalmente, el consumo de aflatoxinas se ha asociado a una disminución en el peso relativo del timo, con depleción linfoide (Morilla, 1980; Ubsi y col. 1985b; Rosiles, 1987), aunque este hallazgo puede no ser observado en las reproducciones experimentales de la enfermedad (Reddy y col., 1984). Las cepas patógenas muy virulentas del VIBF pueden generar hiperemia del timo, así como necrosis linfoide y una definitiva disminución de la densidad de los timocitos corticales (Naqi y col., 1979; Craig y col. 1980b; Ley y col., 1983). No ha sido reportado que las cepas vacunales del VIBF generen lesiones morfológicas en el timo de los animales vacunados.

El peso relativo del timo de los animales de experimentación fué ligeramente menor en los lotes 2 y 4, en comparación con los lotes 1 y 3, aunque únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los animales del lote 4 durante las dos últimas semanas del estudio. Los animales de los lotes 1 y 3 no presentaron cambios patológicos en el órgano durante el experimento; los animales del lote 2 presentaron una

disminución muy discreta de la densidad de los timocitos corticales a partir de la 4a semana de edad; en los animales del lote 4 se observó una reducción en la densidad de los timocitos corticales a partir de la 3a semana de edad, mientras que en la última semana el órgano mostraba una marcada tendencia a la atrofia. Estos resultados sugieren que la ingestión de aflatoxinas incrementa la susceptibilidad del timo para ser lesionado por una cepa vacunal del VIBF, por lo que se requieren estudios posteriores para detectar la significancia de estos hallazgos.

Los cuadros de la aflatoxicosis suelen cursar con una inmunodepresión que se manifiesta por un incremento en la susceptibilidad a microorganismos que en condiciones normales son de escasa virulencia en el pollo de engorda, las infecciones que se asocian con mayor frecuencia son enfermedad crónica respiratoria, enteritis inespecífica y coccidiosis (Giambrone y col., 1978a; Pier y Mc Loughlin, 1985). Al parecer, el daño inmunológico es sólo temporal y únicamente ocurre durante el periodo en el cual las toxinas se están ingiriendo (Morilla, 1980; Pier y Mc Loughlin, 1985).

La infección por VIBF, sobre todo cuando es subclínica, también genera un problema particularmente serio de inmunodepresión en las parvadas afectadas, y también se asocia a un incremento en la susceptibilidad hacia diversos agentes del medio como *Clostridium* spp, *Salmonella* spp, *Eimeria* spp, y *E. coli*, (Wyeth y col., 1975; Santivart y col., 1980; Olbers, 1983;

Sharma, 1987).

No está muy bien aclarado el hecho de que las cepas vacunales del VIBF puedan generar también inmunodepresión; aunque particularmente las cepas poco atenuadas pueden generar lesiones bursales que producen daños permanentes en el sistema inmunológico de los animales (Lucketr, 1983; Giambrone, 1988).

En el presente estudio, el comportamiento clínico de los animales de experimentación fué diferente entre los cuatro lotes utilizados.

El lote 3, vacunado con VIBF a los 5 días de edad y sin consumo de aflatoxinas, fué el que tuvo el mejor comportamiento productivo durante el experimento, observandose una mayor ganancia de peso y un mayor consumo de alimento, con una conversión alimenticia muy eficiente; sus parámetros productivos están incluidos dentro de los rangos normales que la literatura reporta para el pollo de engorda (Gordon, 1985), no presentó ninguna signología y la mortalidad fué muy baja, sugierendo un efecto protector de las vacunas utilizadas (IBF y Newcastle), sus parámetros hematológicos fueron normales y los parámetros inmunológicos evaluados fueron los mejores de los cuatro lotes, no presentaron lesiones morfológicas importantes durante el experimento.

El lote 1, que fué el lote Testigo, no recibió ni aflatoxinas ni vacunación con VIBF; su comportamiento productivo fué adecuado, aunque menor al del lote 3. La mortalidad natural fué moderada y constante, asociandose principalmente a Síndrome

Ascítico, síndrome patológico asociado a la capacidad respiratoria del pollo de engorda, presentó parámetros hematológicos normales y parámetros inmunológicos ligeramente menores a los del lote 1, no presentó lesiones morfológicas importantes durante el experimento.

El lote 2 recibió 2.5 ug/g de aflatoxinas en la ración durante todo el experimento. Fue el lote que tuvo una mortalidad natural acumulada mayor durante el estudio (19 animales) observándose principalmente en las tres primeras semanas del mismo; los animales presentaron reducción marcada en el consumo de alimento y en la velocidad de crecimiento, apatía, estornudos ocasionales, erizamiento de plumas y deformación de los tarsos en algunos casos. Estos animales tuvieron evidencias químico clínicas e histológicas de anemia leve y lesiones histológicas moderadas en hígado y leves en la bolsa de Fabricio; los parámetros inmunológicos evaluados fueron menores a los de los lotes anteriores y la mortalidad natural se asoció a infección del saco vitelino en la 1ª semana, a enfermedad crónica respiratoria en el período intermedio y a síndrome ascítico al final del estudio. Todos estos hallazgos son compatibles con un cuadro de aflatoxicosis moderado.

Los animales del lote 4, que recibieron 2.5 ug/g de aflatoxinas en el alimento durante todo el estudio, y fueron vacunados con VIBF al 5 día de edad, tuvieron un comportamiento productivo muy deficiente con un menor consumo de alimento y una velocidad de crecimiento muy lenta, situación que fue

particularmente evidente en las dos primeras semanas del estudio; la mortalidad natural también fué elevada (16 animales) y se observó sobre todo en la la semana del estudio (10 muertes), asociada a infección del saco vitelino, posteriormente se presentó enfermedad crónica respiratoria y síndrome ascítico. Los animales de este lote también presentaron apatía, con episodios ocasionales, erizamiento de plumas y deformación de los tarsos en algunos casos; los parámetros químico clínicos y hematológicos evidenciaron anemia leve; los parámetros de inmunidad humoral fueron similares a los de los otros lotes, pero los parámetros de inmunidad celular y de resistencia inespecífica fueron menores a los de los otros lotes. Estos animales presentaron lesiones hepáticas compatibles con un cuadro de aflatoxicosis moderado y presentaron además lesiones histológicas moderadas en la bolsa de Fabricio y cierta tendencia a la atrofia del timo. Estos hallazgos son sugestivos de que el consumo de aflatoxinas en el pollo de engorda incrementa la susceptibilidad de los animales hacia las cepas vacunales de virus vivo de IBF utilizadas rutinariamente en la industria avícola, lo que puede incidir de manera negativa en el comportamiento productivo y en el desarrollo de la capacidad inmunológica del pollo de engorda. Aparentemente este efecto es muy severo durante los primeros días de vida de los animales, cuando son vacunados contra IBF, disminuyendo posteriormente con el tiempo, aunque las lesiones producidas en los órganos del sistema inmunológico producidas pueden ser persistentes.

Se requieren estudios posteriores que profundicen sobre los efectos simultáneos de las aflatoxinas y de las cepas vacunales atenuadas del VIBF en el sistema inmunológico del pollo de engorda, para detectar la significancia de los hallazgos del presente estudio.

LITERATURA CITADA

- Beljars, P., Verhúlsdonk, C., Poolsch, W. and Liem, D.: Collaborative study of two dimensional thin-layer chromatographic analysis of aflatoxin B1 in peanut butter extracts using the antidiagonal spot application technique. J.A.O.A.C. 56: 1444-1451 (1973).
- Beuchat, L. and Lechowich, R.: Biochemical alterations in *Bacillus megaterium* as produced by aflatoxin B1. Applied Microbiol. 21: 119-123 (1971a).
- Beuchat, L. and Lechowich, R.: Morphological alterations in *Bacillus megaterium* as produced by aflatoxin B1. Applied Microbiol. 21: 124-131 (1971b).
- Bienenstock, J.: The local immune response. Am. J. Vet. Res. 36: 488-491 (1975).
- Blount, W.: Turkey "X" disease. Turkeys 9: 55-58 (1961).
- Boonchuvit, B. and Hamilton, P.: Interaction of aflatoxins and paratubercular infections in broiler chickens. Poultry Sci. 54: 1556-1573 (1975).
- Buchanan, R., Jones, S., Gerasimowicz, W., Zaika, L., Stahl, H. and Ocker, L.: Regulation of aflatoxin biosynthesis: assessment of the role of cellular energy status as a regulator of the induction of aflatoxin production. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1224-1231 (1987).
- Calnek, B.: Marek's disease and immunosuppression. Poultry Digest Nov.: 526-527 (1983).
- Campbell, C. and Stewart, J.: The Medical Mycology Handbook, 1 Ed. John Wiley and Sons. U.S.A. 1980.
- Campbell, M., May, J., Huf, W. and Doerr, J.: Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. Poultry Sci. 62: 2138-2144 (1983).
- Castelló, M., Lucio, B. y Hernández, R.: Comparación de las pruebas de precipitación en agar, neutralización viral e inmunoadsorción enzimática en la determinación de anticuerpos contra la Infección de la bolsa de Fabricio. Vet. Mex. 18:317-323 (1987).
- Carpentier, P.: Inmunología y Serología, 2 Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, 1982.

Cavalheiro, A.: Aflatoxinas y aflatoxicosis: revisión. Rev. Avicultura 27: 77-81 (1983).

Clarke, R., Doerr, J. and Ottinger, M.: Relative importance of dietary aflatoxin and feed restriction on reproductive changes associated with aflatoxicosis in maturing White Leghorn male. Poultry Sci. 65: 2239-2245 (1986).

Correa, P.: Enfermedades Virales de los Animales Domésticos Monogástricos. Editorial F. H. México 1981.

Cosgrove, A.: An apparently new disease of chickens avian nephrosis. Avian Dis. VI: 385 (1962).

Craig, W., Brewer, A. and Edgar, S.: Studies on infectious bursal disease in chickens: I Effect of infectious bursal disease in gnotobiotic and battery raised White Leghorns. Poultry Sci. 59: 506-515 (1980a).

Craig, W., Brewer, A. and Edgar, S.: Studies on infectious bursal disease in chickens: II Scoring microscopic lesions in in the bursa of Fabricius, thymus, spleen and kidney in gnotobiotic and battery raised White Leghorns experimentally infected with infectious bursal disease virus. Poultry Sci. 59: 1006-1017 (1980b).

Chang, Ch., Hamilton, P. and Weeks, B.: Impairment of leukocyte chemiotaxis and phagocytosis during aflatoxicosis. Annu. Meet Am. Soc. Microbiol. 181: 276-281 (1976).

Chang, Ch. and Hamilton, P.: Refractory phagocytosis by chicken trombocytes during aflatoxicosis. Poultry Sci. 58: 559-561 (1979a).

Chang, Ch. and Hamilton, P.: Impairment of phagocytosis in chicken monocytes during aflatoxicosis. Poultry Sci. 58: 562-566 (1979b).

Chang, Ch. y Hamilton, P.: Severidad incrementada y nuevos síntomas de subraza infecciosa durante la aflatoxicosis en pollos de rostizar. Cien. Avícola 61: 1061-1068 (1982).

Chen, C., Pearson, A., Coleman, T., Gray, J. and Wolzak, A.: Broiler aflatoxicosis with replacement of the contaminates diet. British Poultry Sci. 26: 65-71 (1985).

Dalvi, R. and Mc Gowan, C.: Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B1 and its reversal by activated charcoal, phentobarbital and reduced glutathione. Poultry Sci 63: 485-491 (1984).

Defalla, A., Yabi, A. and Adam, S.: Experimental aflatoxicosis in hybro-type chicks: secuential changes in growth and serum constituens and histopathological changes. *Vet. Hum. Toxicol.* 29: 222-225 (1987).

Degen, G. and Newmann, H.: The major metabolite of aflatoxin B1 in the rat is a glutathione conjugate. *Chem. Biol. Interact.* 22: 239-255 (1978).

Diebold, G.: Laser fluorometric determination of aflatoxin B1 in corn. *J.A.O.A.C.* 62: 564-569 (1979).

Diebold, G. and Zare, R.: Laser fluorimetry: subpicogram detection of aflatoxin using high pressure liquid chromatographic. *Science* 196: 1439-1441 (1977).

Dutton, M.: Enzymes and aflatoxins byosynthesis. *Microb. Rev.* 52: 274-295 (1988).

Edds, G. and Bortell, B.: Biological Effects of Aflatoxin Poultry, in *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*. Edited by U. Diener, R. Asquith and J. Dickens. Southern Cooperative Series Bulletin 279. U.S.A. 1983.

Edds, G., Nair, K. and Simpson, C.: Effect of aflatoxin B1 on resistance in poultry against cecal coccidiosis and Marek's disease. *Am. J. Vet. Res.* 34: 819-826 (1973).

Ehrich, M. Drissol, C. and Gross, W.: Effects of dietary exposure to aflatoxin B1 on resistance of young chickens to organophosphate pesticide challenge. *Avian Dis.* 29: 715-720 (1985).

Essigmann, J., Croy, R., Nadzan, A., Bosby, W., Reinhold, V., Büchi, G. and Wogan G.: Interaction beetwen DNA and aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1870-1879 (1977).

Furtado, R., Pearson, A., Hogberg, M., Miller, E., Gray, J. and Aust, S.: Withdrawal time required for clearance of aflatoxins from pig tissues. *J. Agric. Food Chem.* 30: 101-105 (1982).

Garcia, O.: Aspectos clinicos e histopatológicos en la prevención de la infección de la bolsa de Fabricio. Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán, U.N.A.M. Cuautitlán, México 1985.

Gardner, H., Koltun, S., Dollear, T. and Rayner, E.: Inactivation of aflatoxin in peanut and cottonseed meals by ammoniation. *J. Am. O. Chem. Soc.* 48: 70-73 (1971).

Gardiner, M. and Oldroy, B.: Avian aflatoxicosis. *Aust. Vet. J.* 41: 272-276 (1965).

Ghazilkhanian, G.: Aspergillosis: not a mystery. Poultry Digest 8: 396-400 (1982).

Giambrone, J.: Gumboro vaccines: hard-hitting advice!. Broiler Industry october: 80'87 (1983).

Giambrone, J., Ewert, D., Wyatt, R. and Edison, C: Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune systems of the chicken. Am. J. Vet. Res. 39: 305-308 (1978a).

Giambrone, J., Partadireoja, M., Edison, C. and Kleven, S.: Interaction of aflatoxin with infectious bursal disease virus infection in young chickens. Avian Dis. 22: 431-439 (1978b).

Giambrone, J., Diener, U., Davis, N., Panangala, V. and Hoerr, F.: Effects of purified aflatoxins on broiler chickens. Poultry Sci. 64: 852-858 (1985a).

Giambrone, J., Diener, U., Davis, N., Panangala V. and Hoerr F.: Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. Poultry Sci. 64: 1678-1684 (1985b).

Gillespie, J. y Timoney, J.: Hagan y Bruner. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos, 4 Ed. en español. Ed. La Prensa Medica Mexicana. México 1983.

Goldblatt, L.: Aflatoxin: Scientific Background, Control and Implications, 1 Ed. Academic Press. New York 1969.

Goldblatt, L.: Learning to live with mycotoxins: aflatoxins-a case history. Pure Appl. Chem. 35: 223-238 (1973).

González, P.: Control de la producción de aflatoxinas. Boletín Informativo. Purina México S.A de C.V. s/a.

Gordon, R.: Enfermedades de las Aves, 2 Ed. Editorial El Manual Moderno. México 1985.

Hamilton, P.: Efectos y control de las micotoxinas. Boletín del U.S. Feed Grains Council. Raleigh, Carolina del Norte, s/a.

Hamilton, P. and Harris, J.: Interaction of aflatoxicosis with Candida albicans infection and other stresser in chickens. Poultry Sci. 50: 906-912 (1971).

Harland, E. and Cardeilhac, P.: Excretion of Carbon-14-labeled aflatoxin B1 via bile, urine and intestinal contents of the chicken. Am. J. Vet. Res. 36: 909-912 (1975).

Hitchner, S.: Infectious Bursal Disease, in Diseases of Poultry, 7th Ed. Edited by Hofstad, M. The Iowa State University Press. Ames, Iowa 1978.

Hofstad, M.: Diseases of Poultry, 8 Ed. The Iowa State University Press. Ames, Iowa 1984.

Hsieh, D., Wong, Z., Wong, J., Michas, C. and Ruebner, B.: Mycotoxins in human and animal health. Edited by J. Rodericks. Pathotux. Publ. Park Forest South, Il. 1977.

Huff, W., Doerr, J., Wabeck, C., Chaloupka, G., Hay, J. and Merkley, J.: The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. Poultry Sci. 63: 2153-2161 (1984).

Huff, L., Kubena, R., Harvey, D., Corrier, R. and Mollenhaver, H.: Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. Poultry Sci. 65:1891-1899 (1986).

Jawets, E., Melnick, J. y Adelberg, E.: Microbiologia Médica, 11 Ed. El Manual Moderno. México 1985.

Jordan, F.: Immunosuppressive disease in poultry, in The Veterinary Annual. Edited by C. Grunsell, F. Hill and M Raw. Jhon Wright and Sons, LTD. Bristol, England 1986.

Jubb, K., Kennedy, P. and Palmer, N.: Pathology of domestic animals, 3 Ed. Academic Press Inc. New York 1985.

Kramer, T.: Cell mediated immunity. Am. J. Vet. Res: 36: 492-493 (1975).

Krogh, P.: Mycotoxicosis of animals. Mycopathology 65: 43-45 (1983).

Lanza, G., Washburn, K. and Wyatt, R.: Interaction of age with PCV and body weight response to dietary aflatoxin. Poultry Sci. 56: 1352 (1977).

Larsen, C., Ehrich, M. Driscoll, C. and Gross, W.: Aflatoxin-antioxidant effects on grown of young chicks. Poultry Sci. 64: 2287-2291 (1985).

Leslie, G.: Ontogeny of the chicken humoral immune mechanism. Am. J. Vet. Res: 36: 482-485 (1975).

Ley, D., Yamamoto, R. and Bickford, A.: Immune-complex involvement in the pathogenesis of infectious bursal disease virus in chickens. Avian Dis. 23: 219'224 (1979).

Ley, D., Yamamoto, R. and Bickford, A.: The pathogenesis of infectious bursal disease: serologic, histopathologic and clinical chemical observations. *Avian Dis.* 27:1060-1084 (1983).

Lukert, P.: Effects of bursal disease. *Poultry Digest nov.*: 546 (1983).

Mc Dougald, L. Karlson, T. and Reid, W.: Interaction of infectious bursal disease and coccidiosis in layer replacement chicken. *Avian Dis.* 24: 999-1005 (1980).

Mirocha, C.: Aflatoxinas: química, metabolismo y sus efectos en salud animal, en *Memorias del VI Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura.* INIP México, México 1982.

Mohiuddin, S., Reddy, M. Reddy, M. and Ramakrishna, K.: Studies on phagocytic activity and haematological changes in aflatoxicosis in poultry. *Indian Vet. J.* 63: 442-445 (1986).

Moreno, C. y Hernández. I.: Implementación de técnicas de cuantificación de aflatoxinas. Tesis de licenciatura. F.E.S. Cuautitlán, U.N.A.M. Cuautitlán, México 1988.

Moreno, E. y Zamora, J.: Guía para evitar problemas causados por hongos en semillas y granos almacenados. *Boletín informativo.* M.S.D.-A.G.V.E.T. México 1986.

Morilla, A.: Efecto de las micotoxinas sobre los mecanismos de inmunidad de los animales. *Avirama* 2:19'27 (1980).

Morilla, A. y Bautista, C.: *Manual de Inmunología.* Ed Diana, México 1986.

Naqi, S. and Millar, D.: Morphological changes in the bursa of Fabricius of chicken after inoculation with infectious bursal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1134-1139 (1979).

Natt, M. and Herrick, C.: A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Sci* 31: 735-738 (1952).

Newberne, P.: Chronic aflatoxicosis. *J.A.V.M.A.* 163: 1262-1267 (1973).

Nibbclink, S.: Aflatoxicosis in food animals: a clinical review. *Iowa State University Vet.* 48: 28-31 (1987).

Obioha, W., Stahr, H and Kraft, A.: Effect of sodium nitrite on aflatoxin production in pork sausage at different temperatures and the effect of nitrite on growth of *Aspergillus parasiticus* in culture. *J. Agric. Food Chem.* 31: 1039-1042 (1983).

Olbers, K. Prevención de la infección de la bolsa de Fabricio (enfermedad de Gumboro) por medio de vacunas inactivadas, en Memorias del Primer Seminario sobre la Prevención y Control de la Infección de la Bolsa de Fabricio, ANECA-UNAM, México 1983.

Olson, C.: Avian Hematology, in Diseases of Poultry 4 Ed, Edited by L. Schuarzt. Iowa State Press, Ames, Iowa 1959.

Osorio, M.: Producción de aflatoxinas por *Aspergillus* sp en diferentes medios de cultivo. Tesis de licenciatura. Esc. Cien. Biol.-U.A.G. Chilpancingo, México 1976.

Palomar, L.: Fagocitosis en cerdos alimentados con diferentes niveles de aflatoxina B1 en la dieta. Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán-U.N.A.M., Cuautitlán, México 1988.

Paasch, L.: Secuencia en la presentación de lesiones histopatológicas en bolsas de Fabricio de aves afectadas con IBF, en Memorias del 1 Seminario sobre la Prevención y Control de la Infección de la bolsa de Fabricio. ANECA-UNAM, MEXICO 1983.

Pegram, R. and Wyatt. R.: The relationship of certain blood parameters to aflatoxin resistance in Japanese quail. Poultry Sci. 65: 1652-158 (1986).

Peterson, R.: The ontogeny of the immune system. Am. J. Vet. Res. 36: 486-487 (1975).

Pier, A.: Effects of aflatoxin on immunity. J.A.V.M.A. 163: 1268-1269 (1973).

Pier, A.: Mycotoxicosis and animal health. Advances in Vet. Sci. and Comp. Med. 25: 186-240 (1981).

Pier, A. and Mc Loughlin, M.: Mycotoxic suppression of immunity, Chapter 46 in Trichotecenes and other mycotoxins. Edited by J. Lacey. Jhon Miller and Sons LTD. Bristol, England, 1985.

Pons, W.: Rapid detection of aflatoxin contamination on animal foodstuff. J. Ass. Agr. Chem. 56: 803-804 (1973).

Pons, W. and Franz, A.: High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin in peanut product. J.A.O.A.C. 61: 793-800 (1978).

Purchase, I.: Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co. New York 1974.

Rao, D., Naiudu, N. and Rao, P.: Observation on the concomittant incidence of aflatoxicosis and aspergillosis (brooder pneumonia) in Khakhi Campbell duckling. Indian Vet. J. 62: 461-464 (1985).

- Raper, K. and Fennell, D.: The genus *Aspergillus*. Edited by R. Krisger. R. Krisger Publishing Company Huntington, New York 1970.
- Reddy, T., Viswanathan, L. and Venkitasubramanian, T.: High aflatoxins productions on a chemical defined medium. *Appl. Microb.* 22: 393-396 (1971).
- Reddy, N., Rao, P., Reddy, V. and Yadgiri, B.: Effect of selected levels of dietary aflatoxin on the performance of broiler chicken. *Indian J. Anim. Sci.* 54: 68-73 (1984).
- Richardson, K., Nelson, L. and Hamilton, P.: Interaction of dietary protein level on dose response relationships during aflatoxicosis in young chickens. *Poultry Sci.* 66: 969-976 (1987).
- Richardson, K. and Hamilton, P.: Enhanced production of pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis in egg-type chickens. *Poultry Sci.* 66: 640-644 (1987).
- Romer, T.: Methods of detecting mycotoxins in mixed feeds and feed ingredients. *Feedstuffs* april: 19-22 (1976).
- Romer, T., Ghouri, N. and Boling, T.: Minicolumn screening methods for detecting aflatoxin: state of the art. *J.A.O.A.C.* 56: 795-796 (1979).
- Rosiles, R.: Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas, en *Memorias del I Curso de Toxicología Veterinaria. F.M.V.Z.-U.N.A.M. México 1977.*
- Rosiles, R.: Mecanismos fisiopatológicos de las toxinas en el sistema inmunocompetente, en *Memorias del Curso de Fisiopatología Sistémica de la Gallina Doméstica. F.M.V.Z.-U.N.A.M. y A.N.E.C.A. México 1987.*
- Sandoval, A., Carrera, J., Floreschapa, I. y Jardel, E.: Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sp productoras de aflatoxinas en alimentos de consumo humano en México. *Rev. Inv. Salud Pública México* 36: 161-166 (1976).
- Santivart, D., Maheswaeen, S., Newman, J. and Pomeroy, B.: Effects of infectious bursal disease virus infection on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by mononuclear phagocytic cells of susceptible and resistant strains of chickens. *Avian Dis.* 25: 303-310 (1980).
- Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R. and Allcroft, R.: The assay of a toxic principle in certain groundnut meal. *Vet. Rec.* 73: 1219-1223 (1961).

Schuller, P., Horwitz, W. and Stoloff, L.: A review of sampling plans on collaborative studied method of analysis for aflatoxins. J.A.O.A.C. 59: 1315-1343 (1976).

Sharby, T.: Hongos y micotoxinas. *Progresos en nutrición-Suplemento Dawe's* 297: 1160-1164 (1977).

Sharma, J.: Fisiopatología del sistema inmunológico y efectos de la infección viral sobre las células inmunológicas, en *Memorias del Curso sobre Fisiopatología Sistémica de la Gallina Doméstica*. F.M.V.Z.-U.N.A.M. y A.N.E.C.A. México, 1987.

Sharma, J.: La prevención y control de la Infección de la Bolsa de Fabricio. *Boletín informativo. Sanofi*. México, 1989.

Shotwell, O. and Stubblefield, R.: Collaborative study of three creening methods for aflatoxins in corn. J.A.O.A.C. 54: 808-812 (1973).

Shotwell, O., Hesseltine, C., Stubblefield, R. and Sorenson, W.: Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428 (1966).

Siegel, H.: Mecanismos fisiológicos de los efectos ejercidos por el medio ambiente sobre el sistema inmunológico de las aves, en *Memorias del Curso de Fisiopatología Sistémica de la Gallina Doméstica*. F.M.V.Z.-U.N.A.M. y A.N.E.C.A. México 1987.

Smith, J. and Hamilton, P.: Aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Sci.* 49: 207-215 (1970).

Stahr, H.: *Analytical Toxicology Methods Manual*, Edited by H. Stahr. Iowa State University Press. Ames, Iowa 1980.

Stewart, R., Skeeles, J., Wyatt, R., Brown, J., Russell, I. and Lukert, P.: The effect of aflatoxin on complement activity in broiler chickens. *Poultry Sci.* 64: 616-619 (1985).

Stites, D., Stobo, J., Funderberg, H. y Wells, J.: *Inmunología Básica y Clínica* 4 Ed. *El Manual Moderno*, México 1983.

Stubblefield, R.: Thin-layer and high performance liquid chromatographic methods for the analysis of aflatoxins in animal tissues and fluids, Chapt 22, in *Diagnosis of Mycotoxicosis*, Edited by J. Richard and J. Thurston. Martinus Nishoff Publishers U.S.A. 1986.

Stubblefield, R. and Shotwell, O.: Determination of aflatoxins in animal tissues. J.A.O.A.C. 64: 964-968 (1981).

Thaxton, J., Tung, H. and Hamilton, P.: Immunosuppression in

chickens by aflatoxin. Poultry Sci. 53: 721-725 (1974).

Tadeu, P.: Influencia de diferentes niveles de aflatoxina B₁ en el comportamiento de pollos White Leghorn y su respuesta inmunológica al virus de la enfermedad de Newcastle. Tesis de Doctorado. F.M.V.Z.-U.N.A.M., México 1979.

Tadeu, P., Antillon, A. y Rosiles, R.: Aflatoxicosis en aves domésticas, en Memorias del I Curso de Toxicología Veterinaria. F.M.V.Z.-U.N.A.M. México 1977.

Tello, J.: Manual de Laboratorio Clínico Veterinario. Tesis de Licenciatura. F.E.S.C.-U.N.A.M. Cuautitlán, México 1987.

Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana, México 1982.

Tung, H., Cook, F., Wyatt, R. and Hamilton, P.: The anemia caused by aflatoxins. Poultry Sci. 54: 1962-1969 (1975).

Ubosi, C., Hamilton, P., Dunnington E. and Siegel P.: Aflatoxin effects in White Leghorn chickens selected for response to sheep erythrocyte antigen. I Body weight, feed conversion and temperature responses. Poultry Sci. 64: 1065-1070 (1985a).

Ubosi, C., Gross, W., Hamilton, P., Ehrich, M. and Siegel, P.: Aflatoxin effects in White Leghorn chickens selected for response to sheep erythrocytes antigen. II Serological and organ characteristic. Poultry Sci. 64: 1071-1076 (1985b).

Valladares, J.: Establecimiento de la técnica de inmunoperoxidasa para el estudio de la distribución pulmonar de esporas de *Aspergillus fumigatus*. Tesis de licenciatura. F.E.S.C.-U.N.A.M., Cuatitlán, México 1986.

Velasco, J. and Whitcon, M.: Evaluation of fluorisil tubes in detection of aflatoxin. J.A.O.C.S. 50:120-121 (1973).

Villegas, P.: Las cepas "variantes" de Gumboro. Avicultura Profesional 4: 114 (1986).

Wang, T. and Cerutti, P.: Spontaneous reactions of aflatoxin B₁ modified deoxyribonucleic acid in vitro. Biochemistry 19: 1692-1698 (1980).

West, S., Wyatt, R. and Hamilton, P.: Improved yield of aflatoxins by incremental increases of temperature. Appl. Microbiol. 25: 1018-1019 (1973).

Winterfield, R. and Hitchner, S.: Etiology of infectious nephrosis-nephrosis syndrome of chickens. Am. J. Vet. Res: 23: 1273-1279 (1973).

Wogan, G.: Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriology Rev.* 30: 460-469 (1966).

Wyatt, R.: Análisis de micotoxinas... los pasos clave. *Avicultura Profesional* 1: 76-77 (1983a).

Wyatt, R.: Detección de micotoxinas: la lampara ultravioleta. *Avicultura Profesional* 1: 4-6 (1983b).

Wyatt, R.: Análisis de micotoxinas. Detección y cuantificación de micotoxinas por medio de cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta presión. *Avicultura Profesional* 1: 152-154 (1983c).

Wyatt, R.: Inhibidores de hongos: la pura verdad. *Avicultura Profesional* 3: 63-64 (1985).

Wyatt, R.: Comparación de las técnicas de luz ultravioleta y ELISA para la contaminación de aflatoxinas en el maíz. *Avicultura Profesional* 6: 109-111 (1988a).

Wyatt, R.: Detoxificación de los granos con aflatoxinas. *Avicultura Profesional* 6: 159-160 (1988b).

Wyatt, R. and Ruff, M.: Interaction of aflatoxins with *Eimeria tenella* infection and monesin in young broiler chickens. *Avian Dis.* 19: 730-740 (1975).

Wyeth, P.: Effect of interaction of infectious bursal disease on the responses of chickens to *S. thyphymurium* and *E. coli* infection. *Vet. Res.* 96: 238-243 (1975).

Yabe, K., Ando, Y., Ito, M. and Terakado N.: Simple method for screening aflatoxin-producing molds by UV photography. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 230-234 (1987).