

74
2 ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán



DETERMINACION DE MICOTOXINAS COMO
POSIBLES AGENTES CAUSALES DEL
SINDROME ASCITICO EN POLLOS
DE ENGORDA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

LUIS HOCHSTEIN KUMEZ

Asesores: M.V.Z. José Ortega Sánchez de Tagle
Dr. Roberto Cervantes Olivares



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

I N D I C E :

	P A G I N A S
I . INTRODUCCION	1
- Definición de la enfermedad	1
- Importancia económica	2
- Etiología	3
- Micotoxinas	5
- Patogenia	12
- Signos clínicos	14
II . OBJETIVO	15
III . MATERIAL Y METODOS	16
IV . RESULTADOS	23
V . DISCUSION	36
VI . CONCLUSIONES	38
VII . BIBLIOGRAFIA	39

R E S U M E N :

SE TRABAJO CON UNA PARVADA DE 21,289 POLLOS DE ENGORDA,
DE LOS CUALES SE RECOLECTARON 17 HIGADOS PROVENIENTES -
DE POLLOS QUE PRESENTABAN EL SINDROME ASCITICO Y LA ---
MISMA CANTIDAD DE HIGADOS DE POLLOS NO ASCITICOS.-----
ADENAS DE 100 GRAMOS DE ALIMENTO CADA SEMANA, SE PRO---
CEDIO A CUANTIFICAR LOS NIVELES DE AFLATOXINAS EN -----
TODAS LAS MUESTRAS CON EL OBJETO DE DETERMINAR LA -----
CORRELACION EXISTENTE ENTRE LAS AFLATOXINAS Y LA -----
PRESENTACIÓN DEL SINDROME ASCITICO.

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

DEFINICION DE LA ENFERMEDAD:

Al Síndrome Patológico de la Poliserositis en pollo de engorda comúnmente conocido como ascitis ó enfermedad del edema, le han asignado diferentes sinonimias como son: edema aviar, síndrome de las grasas tóxicas, lipoidosis tóxica, edema de las alturas, enteritis no específica, pollo de aguas, ascitis ideopática y bolsa de aguas (Estudillo, 1980).

Debemos recordar que la ascitis es una forma de edema, en la que los líquidos se acumulan en la cavidad peritoneal, el término deriva de la palabra griega "Askites" que significa bolsa de agua (Flores, 1981).

El síndrome de la poliserositis se ha venido reportando en las Explotaciones Avícolas Nacionales desde hace más de 15 años, teniendo una incidencia variable y presentandose durante todo el año, en ocasiones es baja, sin embargo suele alcanzar proporciones epidémicas, afectando numerosas explotaciones sobre todo en los meses de invierno, se sabe que esto está íntimamente relacionado con el consumo de determinados alimentos, ya que en ocasiones los animales de una misma granja reciben diferentes tipos de alimentos y aún estando alojados en la misma caseta con una separación única de una malla de alambre, algunos se ven seriamente afectados, mientras que otros no manifiestan ninguna alteración (Estudillo, 1980).

Las causas de la ascitis en ocasiones se atribuyen a aspectos nutricionales, a uno o varios tóxicos que pueden actuar o interactuar agravando el problema, de aquí las variaciones en los informes de ascitis en el campo (Ortega, 1984).

Ortega, S.J. (1984). Comunicación Personal. F.E.S.C.

En cuanto a la morbilidad y mortalidad cabe señalar que también son muy variables, ya que pueden ir desde muy bajas alrededor del 1 % hasta muy altas, entre un 30 y un 35 %, siendo generalmente aceptado como promedio 4 % (Villaseñor-Rivera Cruz, 1980).

Se conocen factores predisponentes a la enfermedad tales como: altitud sobre el nivel del mar, temperatura, fisiología propia del ave, especie, función zootécnica, raza, sexo y edad. Ha sido observado que la ascitis es mucho más común en los machos y en especial en los más desarrollados y de mayor tamaño (Estudillo, 1980).

En cuanto a la susceptibilidad por especie. en orden decreciente es: pollos de engorda, reproductoras pesadas en las primeras etapas de su vida, hembras de reposición, gallos de pelea, pavos, codornices y faisanes imperiales. Es más común que se presente después de la tercera semana, aunque el rango puede ir desde las 4 hasta las 9 semanas, siendo más frecuente que se presente en las parvadas que han rebasado la séptima semana de edad (López, 1982).

IMPORTANCIA ECONOMICA:

En determinadas épocas del año, la magnitud de las pérdidas económicas debido a las alteraciones sufridas por la parvada sobrepasan las pérdidas debidas a cualquiera de las enfermedades infecto-contagiosas, y, están condicionadas por una serie de variables como son: porcentaje de animales involucrados, mortalidad, edad de los animales etc. Debe considerarse que el problema ha provocado un gran desconcierto no solo en los avicultores, sino en los propios clínicos, debido a la complejidad de los

signos, lesiones, patogenia y etiología, además de observarse irregular pigmentación y conversión alimenticia, peso y emplume deficientes, además de la predisposición existente en la parvada a otro tipo de enfermedades respiratorias y digestivas, sin pasar por alto que estas aves son decomiadas al llegar al rastro (Estudillo, 1979, López, 1982).

Si consideramos lo anterior y le añadimos el hecho de que por lo general la mayor incidencia ocurre en parvadas que están proximas a salir al mercado, además de los altos costos de producción actual, se puede pensar que las pérdidas anuales son de varios millones de pesos. Por último al conocer que el problema puede ser causado por algunos de los ingredientes utilizados en el alimento, la ascitis debe ser considerada como un problema de primera magnitud (Estudillo, 1980).

ETIOLOGÍA:

La poliserositis en pollos de engorda es una entidad patológica relativamente nueva y una gran variedad de factores han sido involucrados como sus causales: *Edwards y cols., en 1918, describen por primera vez el problema, como consecuencia de la intoxicación por sal. *Clover, en 1932, asocia el edema a compuestos mercuriales; *Thomas, en 1937, lo atribuye al envenenamiento por crotalaria; *Damm y Clovind, en 1939, lo ligan a una deficiencia de vitamina E y selenio; *Bullis, en 1944, lo relaciona a la intoxicación por derivados del ácido cresílico; *Hare y Orr, en 1945, lo unen a la intoxicación por zinc; *Shmittle, Edwards y Morris, en 1958, informan que la enfermedad es causada por diferentes ingredientes utilizados en la dieta tales como: un exceso de sal, micotoxinas ó hidrocarburos clorinados; *Allen, en 1961, realiza los primeros estudios en los cuales se describen cambios anatómicos, bioquímicos e histológicos debidos

a la ingestión de alimentos contaminados con sustancias tóxicas, observan do como características importantes: una reducción en el tamaño testicular, inhibición de la espermatogénesis, acumulación de fluidos en el miocardio, incremento de la presión sanguínea del ventrículo derecho y vena cava, va cuolización de células cardiacas, edema pulmonar e infiltración grasa he pática; *Arnalgan y cols., en 1961, la asocian a la intoxicación por afla toxinas; *Wac Cuney y cols., en 1962, la relacionan con la intoxicación por bifenilos clorinados; *Sanger, Edgard y Shmittle, en 1962, la asocian a la ingestión de grasas de origen vegetal y animal, las cuales contienen factores tóxicos y no pueden ser saponificadas (síndrome de las grasa tó xicas) presentando los animales como trastornos importantes: hidropericarditis, acumulación de líquidos toraco-abdominales y trastornos hepato-re nales; *Alexander y cols., en 1962, encuentran una disminución en los ni veles séricos de proteínas, principalmente de albúminas y globulinas, ni veles notablemente más bajos de colesterol en los fluidos de la cavidad abdominal e hidropericardio, además de un edema subcutáneo posterior a la ingesta de grasas tóxicas (* Citados por: Flick, Douglass, Gallo, 1962 y Flores, 1981).

Las grasas tóxicas en México no pueden ser consideradas como una etiología válida ya que debido a su alto costo, no hay gran disponibi lidad en la industria avícola. En cuanto a otros factores como son: deficiencias nutricionales, falta de vitamina E, intoxicación por sal, intoxicación por derivados del ácido cresílico, intoxicación por crota laria y envenenamiento causado por gosispol, tampoco es posible que se puedan considerar como válidos, ya que en caso de que alguno de estos factores fueran la causa del problema, este se presentaría en forma ais lada y no alcanzaría proporciones epizooticas (Estudillo, 1975).

Por otro lado es bien conocido que con el propósito de hacer producir más la tierra y proteger los productos agrícolas de ciertas plagas, han proliferado en el mercado una gran diversidad de productos químicos que han sido utilizados indiscriminadamente trayendo como consecuencia, alteraciones en el equilibrio ecológico, dentro de estos existen tres grupos importantes que son: los hidrocarburos clorinados, los organofosforados y los carbamatos, los cuales en ocasiones son incorporados accidentalmente a la ración de las aves provocando problemas (Gonzalez, Mosqueda y Rosiles, 1981). Estos compuestos deberán ser estudiados en forma más exhaustiva.

Por último se analizarán las micotoxinas, las cuales fueron involucradas en la presentación de la ascitis por vez primera en 1961, siendo estas el objetivo central de la presente tesis.

MICOTOXINAS:

Debido a la continua fluctuación en los precios de los cereales en el mercado, la adquisición de algunos de ellos se ve incrementada en ciertas temporadas, provocando que se almacenen grandes cantidades en condiciones desfavorables, pero que representan un excelente medio de cultivo para algunos hongos y la producción de sus toxinas (temperatura, oxígeno y humedad); existen dos clases de hongos, los llamados "hongos de campo" y los llamados "hongos de bodega", los primeros se caracterizan por infestar a los granos antes de ser cosechados y los segundos, por infestar a los granos en el momento en que se encuentran almacenados (Beltrán 1978). Para los fines de este trabajo, la segunda clase es la que nos interesa.

El interés por el conocimiento de los hongos y sus toxinas en aves se

remonta hasta 1960, año en el cual cerca de 100,000 pavos pequeños murieron en Inglaterra debido al brote de una nueva enfermedad; esta no tenía las características de ser infecciosa, por lo que se consideró como envenenamiento. Sin embargo, al examinarse los alimentos se descartó la posibilidad de que la contaminación se debiera a alcaloides, insecticidas, residuos de solventes o tóxicos vegetales y en virtud de que se desconocía el agente causal de la enfermedad le fué asignado el nombre de "Enfermedad X del pavo"; exámenes posteriores demostraron que existía un común denominador en la presentación de la enfermedad y este era un tóxico localizado en la harina de cacahuete procedente de Brasil utilizado en ciertas raciones (Peraza, 1975).

En el mismo año se describió una enfermedad similar que afectaba a patos y faisanes, lo que determinó que no era una enfermedad específica de pavos; esta se presentaba al momento de consumir proteínas procedentes de nueces brasileñas, esto confirmó que el agente tóxico se encontraba contenido en el alimento (Peraza, 1975).

También se informó que las vacas después de haber consumido alimentos contaminados con micotoxinas, podían liberar sustancias tóxicas a través de la leche, mismas que también fueron detectadas en la orina de ovinos. Las primeras investigaciones sobre alimentos contaminados por Aspergillus flavus han dejado esclarecidas las bases de que al ser ingeridas por mamíferos, peces y aves provocan un síndrome tóxico típico (Carnaghan y Crawford, 1964).

Para que un hongo pueda producir sus toxinas es necesario que existan ciertas condiciones como: temperatura, humedad y sustratos tales como:

almidón y azúcares; en el caso de Aspergillus spp se requiere de una humedad relativa del 85 % y un rango de temperatura ambiente entre 18-30°C (Beltrán, 1978).

Existen cinco géneros de hongos reconocidos como importantes productores de micotoxinas: Claviceps, Fusarium, Penicillium, Phythomyces y Aspergillus. Como micotoxinas importantes debemos señalar las siguientes: Patulina, Rubratoxina, Zeralenona, Ocratoxina, Alcaloides del Cornezuelo de Centeno y Aflatoxinas; de éstas aparentemente las más importantes son las aflatoxinas debido a que son potentes agentes carcinogénicos, teratogénicos y mutogénicos, además de ser las más comúnmente encontradas como contaminantes del alimento (Beltrán, 1978).

Al observarse que la harina de cacahuate no siempre desencadenaba el cuadro se obtuvo evidencia de que existía un microorganismo, al examinar se este punto se identificó que el agente productor de la toxina era un agente saprófito: el Aspergillus flavus. De éste fueron aisladas por primera vez las aflatoxinas y en 1963, se demostró que fueron las responsables de la muerte masiva de pavos (Goldblatt 1969).

El nombre de aflatoxinas es debido a que estas se extrajeron por primera vez del Aspergillus flavus, sin embargo no son producidas exclusivamente por este, ya que también han sido extraídas de otros géneros como; Penicillium y Rhizopus (Beltrán, 1978).

Dentro del género Aspergillus tenemos dos especies que son importantes productoras de micotoxinas: A. flavus y A. parasiticus, el medio más adecuado para la producción de las mismas se presenta en el cacahuate y

productos derivados del mismo, al igual se ven favorecidas por la presencia de diferentes sustratos como: glucosa, fructosa, manitol, aminoácidos y vitamina B (Dalezios, Hsieh y Wogan, 1973).

La mayoría de los ingredientes, excepto el maíz, las nueces y el algodón están libres de aflatoxinas al momento de la cosecha (Mirocha 1978).

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios de los hongos que se sintetizan durante el crecimiento de los mismos, las aflatoxinas son compuestos heterocíclicos pertenecientes al grupo de las bis-furanoisocumarina. Dentro de sus características más importantes se pueden mencionar las siguientes: resistencia a muy altas temperaturas (arriba de 300°C), solubles en disolventes orgánicos (alcohol, éter, benceno etc.), estables en cloroformo, muy sensibles al contacto con el aire, oxígeno, soluciones alcalinas y ácidas e inactivadas por soluciones de hipoclorito de sodio (Pass 1982).

Las aflatoxinas se encuentran dentro de la fracción lipídica de los alimentos, así como la fracción insaponificable del sustrato, al ser identificadas mediante técnicas de cromatografía en capa fina ó en columna, también han sido separadas en placa de sílice gel utilizando soluciones de cloroformo-metanol, su observación se facilita mediante la utilización de luz ultravioleta, debido a que son fluorescentes, se han podido separar dos diferentes toxinas, la "B" y la "G", la determinación de las mismas ha sido en base a su color fluorescente: B=(blue)-azul y G=(green)-verde (Goldblatt 1969).

Todos estos metabolitos contienen un núcleo de dicumarina que en el

caso de la aflatoxina B (AFB) presenta una estructura pentanona, la cual en el caso de la aflatoxina G (AFG) es sustituida por una lactona. Al igual ha sido demostrada la presencia de dos tipos de fracciones que son: AFB₁-AFB₂ y AFG₁-AFG₂, donde los subíndices 1 y 2 indican la posición que ocupan los cromatogramas al realizarse las técnicas de cromatografía (Golblatt 1969).

El Aspergillus parasiticus generalmente produce las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, mientras que el A. flavus produce solamente la AFB₁ y la AFB₂ (Mirocha 1978).

Existen otros derivados de estas aflatoxinas, los cuales generalmente son productos del metabolismo de las mismas y se les ha designado como: AFM₁ y AFM₂, las cuales son producto del metabolismo animal, Carnaghan, en 1967, las detectó por vez primera en la leche (M=milk), AFB_{2a} y AFG_{2a}, las cuales son inestables y se descomponen en presencia de luz y condiciones alcalinas; AFR₀ (aflatoxicol), el cual es un producto de transformación de la AFB₁ a nivel hepático, mediante reacciones enzimáticas; AFP₁, la cual ha sido observada en las preparaciones microsomales de hígado de rata, mono y hombre; Aflatoxicol H₁, el cual ha sido obtenido in vitro en preparaciones de hígado de mono, este por lo general no es tóxico y GM₁, que es un producto hidroxilado de G₁ y análogo de M₁ (Mirocha, 1978 y Rosiles, 1982).

De entre las aflatoxinas la B₁ es la principal por ser la más tóxica y la más frecuentemente encontrada como contaminante de los alimentos. ésta es transformada a nivel hepático en aflatoxicol, el cual es tan solo, un poco menos tóxico que su precursora (Strzelecki, 1978).

El mecanismo de acción de las aflatoxinas es interactuando e interfiriendo en la transcripción del DNA, causando una síntesis deficiente del mismo y como efecto secundario interactuando con el DNA dependiente y la síntesis del RNA nuclear. Se une a los ácidos nucleicos e inhibe la síntesis de proteínas (Kflley y Mora, 1976).

Debemos considerar que las aflatoxinas se metabolizan en el hígado y al encontrarse este afectado, todas sus funciones se encuentran alteradas, el metabolismo de los lípidos se ve disminuido, aunque la concentración de los mismos se encuentra aumentado a nivel hepático, lo que ocasiona que disminuya la concentración de los mismos en sangre y por lo tanto haya deficiencia generalizada en la grasa corporal (Peraza, 1975).

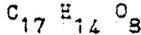
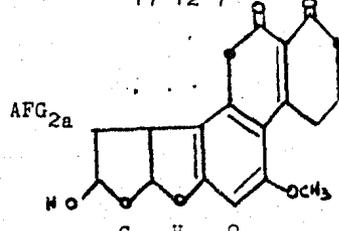
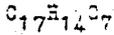
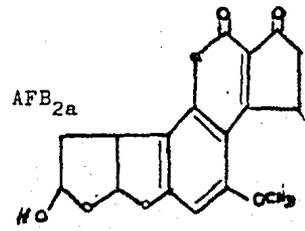
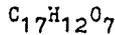
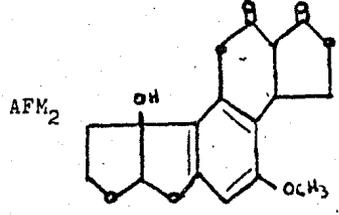
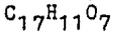
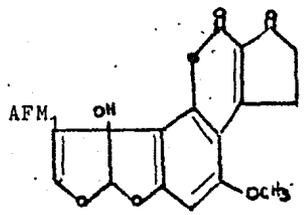
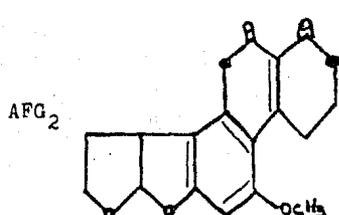
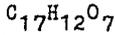
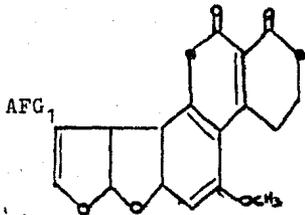
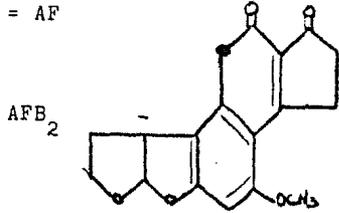
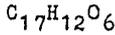
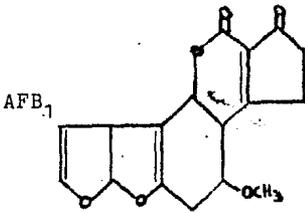
Las aflatoxinas pueden causar disminución en los carotenos del suero y en consecuencia habrá una pobre pigmentación en la piel de las aves. Si consideramos que los carotenos son estrictamente administrados mediante la dieta, debemos pensar que existe una mala absorción a nivel intestinal y por consiguiente una alta concentración de lípidos en heces (Beltrán, 1978).

En los animales intoxicados es frecuente la hipoproteïnemia, disminución de alfa y beta globulinas, lo que se manifiesta sobre el sistema humoral inespecífico de los animales, el complemento no puede actuar adecuadamente debido a que algunos de sus factores no se pueden producir al encontrarse el hígado incapacitado para su síntesis, al igual sucede con el interferón y por consiguiente habrá una inmuno-depresión. También se ha observado una afección sobre los órganos del sistema linfático como médula ósea, bazo, timo y bolsa de Fabricio; existiendo disminución de linfocitos T y B. siendo estas, alteraciones típicas de la presencia de toxinas (Morilla 1980).

Por lo anterior debemos señalar que los animales están predispuestos a enfermedades ocasionadas por agentes oportunistas y a sufrir lesiones más graves por agentes patógenos (Campos Nieto, 1978).

ESTRUCTURAS DE LAS AFLATOXINAS MÁS COMUNES : (Goldblatt 1969)

AFLATOXINA = AF



PATOGENIA :

La ascitis es una forma de edema en la que los líquidos se acumulan en el interior de la cavidad peritoneal, esto es debido a la obstrucción venosa, la dilatación arteriolar y el aumento en la presión capilar. Debido a la obstrucción venosa hay tendencia a la acumulación de metabolitos, con la consecuente hipoxia tisular y aumento en la permeabilidad de la pared capilar hacia el paso de proteínas (Robbins 1974).

Al existir una falla congestiva cardíaca hay disminución en el flujo sanguíneo renal, por lo que los valores de aldosterona plasmática se incrementan, la filtración glomerular se reduce y por lo tanto hay retención de agua y electrólitos (sodio principalmente), aumentando el volumen de líquidos extracelulares (Flores 1981).

Si consideramos que el órgano más afectado es el hígado y que todas sus funciones se encuentran deprimidas, al desarrollarse la hipertensión portal se sucederá una serie de cambios entre los cuales son tres los que predominan: ascitis, formación de vías venosas colaterales y esplenomegalia. Al presentarse cirrosis portal se incrementan las sustancias tóxicas, provocando una incapacidad funcional y alteraciones degenerativas, hay acumulación de sangre, con el consecuente aumento de la presión capilar mesenterica y disminución del volumen de sangre circulante. Como consecuencia de la incapacidad hepática para la detoxicación y síntesis de algunas sustancias, las hormonas antidiurética y aldosterona se incrementan provocando que la retención de líquidos se acentue, los lípidos hepáticos y globulinas aumenten y la concentración de proteínas plasmáticas, albúmina, fibrinógeno y protrombina disminuyan (Robbins, 1974. Kolb, 1976).

Las enzimas hepáticas cuya función es la detoxificación se incrementan en un esfuerzo por detoxicar al organismo, sin embargo si este estímulo es persistente ó de gran intensidad provoca graves trastornos y aun sustancias hepáticas endógenas son inactivadas por grupos enzimáticos. como ejemplo se puede citar a los esteroides, produciendose así trastornos en la regulación endócrina. El hierro liberado de la hemoglobina que bajo condiciones normales se almacena en hígado y bazo, al encontrarse estos lesionados, se pierde, provocando un estado de anemia, además de una baja en la producción de pigmentos biliares. La estasis biliar provoca que las grasas de los alimentos no se emulsifiquen, la acción de las lipasas se ve inhibida, ocasionando que ni los lípidos ni las vitaminas liposolubles puedan ser absorbidas, al haber una deficiencia de vitamina K, disminuye la tasa de protrombina en sangre, retrasandose el tiempo de coagulación. Al igual se presenta una hipoglicemia, disminuye el contenido de glucógeno en hígado y glucosa en sangre, ocasionando un estado de acidosis y un desequilibrio ácido-básico, al no poder ser oxidados los residuos de los aminoácidos, estos no pueden ser absorbidos y se manifiesta con un retraso en el crecimiento y una mala pigmentación en el pollo de engorda (Robbins, 1974, Kolb, 1976 y Flores, 1981).

Por último a manera de descripción del líquido ascítico, cabe señalar que es un trasudado resultante de las presiones elevadas dentro del sistema venoso portal, el cual tiene una consistencia acuosa y esta formado por proteínas principalmente albúmina y solutos como glucosa, sodio y potasio en la misma concentración que en la sangre, al acumularse gran cantidad de dicho líquido se produce la distensión de la cavidad abdominal (Flores, 1981).

SIGNOS CLINICOS:

Depresión parcial de la parvada, postración, respiración toraco-abdominal, posición de pingüino, ataxia, relajación muscular, incoordinación, distención abdominal, palidez, cianosis de cresta y barbillas, plumaje erizado y opaco, arqueamiento al defecar, cloaca tumefacta y hemorrágica, diarrea color verde blanquecino, camas húmedas, sofocamiento al menor movimiento, impactación de las plumas cercanas a la cloaca y por último se debe mencionar que este problema no es específico de animales retrasados, ya que al tener una buena conformación llegan al rastro e incluso son destinados al consumo humano (Estudillo 1980).

LESIONES MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS:

Las lesiones más comúnmente encontradas en los animales ascíticos son: hidropericarditis y edema abdominal con depósitos de fibrina, miocarditis crónica severa con hipertrofia muscular, arterias miocárdicas repletas de linfocitos. Degeneración de túbulos renales, congestión renal y pulmonar, hiperplasia peribronquial y sacos aéreos opacos. El bazo y páncreas se encuentran aumentados de tamaño, atrofia de la bolsa de Fabricio, hematomas subcutáneos. El órgano más afectado es el hígado, observandose en este las siguientes lesiones: engrosamiento de la cápsula de Glisson, pérdida, degeneración y fibrosis del parenquima celular, edema intersticial, metamorfosis e infiltración grasa, retracción y atrofia de los cordones hepáticos, las venas centrales se encuentran engrosadas, con necrosis coagulativa, con depositos de fibrina y material proteinaceo, los núcleos se encuentran en cariorrexis a nivel perisinusoidal. Es común observar hiperplasia y proliferación de ductos biliares con la consecuente estasis biliar (James y Allen, 1964, Estudillo, 1980, Flores, 1981 y López, 1982).

II. OBJETIVO:

CORRELACIONAR LA PRESENCIA DE
AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO - -
DESTINADO AL CONSUMO DEL POLLO
DE ENGORDA COMO FACTOR PREDIS-
PONENTE A LA PRESENTACION DEL
SINDROME ASCITICO.

III. MATERIAL Y METODOS:

El presente trabajo fué realizado en su parte técnica en el Departamento de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (I.N.I.P.) y en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan (F.E.S.C.), la parte biológica se realizó en la granja Avícola localizada en Teometitla Edo. de Tlaxcala, dicha granja tiene como finalidad zootécnica la producción de pollo de engorda, posee 20 casetas con piso de tierra, ventilación natural por medio de cortinas, comederos de tolva y bebederos lineales automáticos con una capacidad para 500,000 aves.

Se trabajó con una parvada de 21,289 pollos, desde el momento de llegada a la granja hasta la novena semana, fecha en la cual salieron al mercado, semanalmente se recolectaron 17 hígados procedentes de pollos ascíticos y la misma cantidad de no ascíticos, este número se debió a que en la primera semana hubo una mortalidad de 18 animales ascíticos y se deseaba trabajar con un número constante de muestras, las cuales fueron seleccionadas al azar, es decir, no se consideró el sexo, la edad o el estado de carne de los animales, la selección fué realizada en base a los hallazgos a la necropsia, dentro de los no ascíticos, se tomaron todos aquellos que hubiesen muerto por cualquier causa, excluyendo a los que presentaban el síndrome ascítico. Además se recolectaron 900 gramos de alimento, 100 gr. cada semana, el alimento que se tomó, se encontraba en los comederos y estaba a disposición de los animales con los cuales se realizó el presente trabajo, con éste se procedió a realizar los siguientes análisis: cuantificación de aflatoxinas, bromatológico proximal y micológico.

MATERIAL :

- 1.- Estándares de aflatoxinas: B₁ , B₂ , G₁ , G₂ y aflatoxicol (Lab. Sigma Chem. Co.).
- 2.- Licuadora de alta velocidad, marca Waring CP-1, con vaso de acero inoxidable con capacidad para 1 litro y tapa.
- 3.- Gabinete para observación, equipado con lámpara de luz ultravioleta de onda larga, con una longitud de 365 nm.
- 4.- Material de vidriería: pipetas de 1 y 10 ml., probetas de 50, 100, 150 y 250 ml., embudo de separación de 125 y 500 ml., vasos de pre cipitado de 100 y 200 ml. y frasquitos con rosca de 20 ml.
- 5.- Molino marca Wiley con malla del número 20.
- 6.- Papel filtro Whatman de los Nos. 1 y 4 o su equivalente.
- 7.- Minicolumnas, estas se hacen con tubo de vidrio de aproximadamente 15 cm. de largo, 6 mm. de diámetro externo y 4 mm. de diámetro interno. Forma de prepararlas: Para empacar las columnas; tapar uno de los extremos con un pedacito de algodón bien apretado, agregar alúmina ácida hasta una altura de 1.5 cm., agregar 1 cm. de sul-fato de sodio anhidro y por último agregar sílica gel hasta una altura aproximada de 12 cm., tapar la columna con otro pedacito de algodón, empacar golpeando en repetidas ocasiones sobre la mesa, apretar bien el algodón. No debe haber ninguna separación en la columna.

REACTIVOS:

A.- PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO:

1.- Disolventes grado reactivo:

Acetonitrilo, benceno, cloroformo, isopropanol y ácido acético.

2.- Disolventes de extracción:

Acetonitrilo	800 ml.
+	
Agua destilada	200 ml.

3.- Disolventes de desarrollo:

Cloroformo	95 ml.
+	
Acetonitrilo	3 ml.
+	
Isopropanol	2 ml.

4.- Solución de acetato de plomo al 20 % :

Acetato de plomo neutro	200 g.
+	
Acido acético	3 ml.
c.b.p.	1 lt.

B.- PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN TEJIDO ANIMAL (HIGADO):

1.- Disolventes grado reactivo:

Benceno, cloroformo, éter de petróleo, hexano, isopropanol y metanol.

2.- Disolventes para extracción:

Metanol	100 ml.
*****	*****
Eter de petróleo	40 ml.
+	
Hexano	20 ml.
• +	
Benceno	40 ml.

3.- Mezcla de disolventes para desarrollo:

Cloroformo	95 ml.
+	
Metanol	5 ml.

4.- Cloruro de sodio.

C.- PARA AMBAS DETERMINACIONES: (ALIMENTO-TEJIDOS):

1.- Alúmina acídica de 80-200 mallas:

Ajustar la actividad a grado II, adicionando 3 % de agua, agitar bien y equilibrar durante toda la noche.

2.- Algodón absorbente:

Agitar en cloroformo caliente, exprimir y dejar que se seque con el aire.

3.- Ayuda filtro:

Celite o Hyflo Super Cel, lavado con ácido (Johns- Mansville Corp).

4.- Sílica gel:

Especial para cromatografía en capa fina (Merck, México 0.063-0.200 mm.). Secar a 110°C por dos horas y almacenar en desecador.

METODOS :

DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO:

Pesar 50 g. de la muestra, molida en molino Wiley que pase por la malla No. 20, depositarlos en un vaso de licuadora, adicionar 150 ml. del disolvente de extracción y 10 g. de ayuda filtro, mezclar en la licuadora durante 3 min. a alta velocidad, filtrar a través de papel filtro Whatman del No. 4 o su equivalente. Recolectar 50 ml. del filtrado, ponerlo en un vaso de precipitado de 250 ml. y adicionar 20 ml. de solución de acetato de plomo y 130 ml. de agua destilada, dejar reposar durante 3 min. para permitir la flocución o precipitación, adicionar 10 g. de ayuda filtro, agitar y filtrar nuevamente (el filtrado habrá de ser claro, si no lo es refiltrar).

Medir 100 ml. del filtrado y depositarlo en un embudo de separación de 125 ml., adicionar 3 ml. de benceno y agitar vigorosamente durante 1 min., al separarse las fases drenar y descartar la fase interior acuosa. Lavar la fase bencénica con 50 ml. de agua destilada, invertir el embudo suavemente 10 veces para evitar emulsiones. Drenar y descartar la fase inferior acuosa, transferir la fase bencénica a un frasquito, adicionar una pizca de sulfato de sodio anhidro y agitar para eliminar cualquier residuo de agua. El extracto debe de ser claro.

Meter la columna dentro del extracto bencénico, permitiendo que por capilaridad ascienda hasta 1 cm. arriba de la capa de alúmina. Sacar la columna, limpiarla por fuera e inmediatamente ponerla en un frasquito que contenga 5 ml. del disolvente desarrollador (4.65 ml. de cloroformo

0.25 ml. de acetonitrilo y 0.10 ml. de isopropanol), desarrollar la columna en dirección ascendente durante 5 min.

Nota: El acetato de plomo elimina la interferencia por clorofila, xantofilas y flavonas, las cuales migran al mismo Rf que las aflatoxinas interfiriendo con su lectura.

(Adaptación a la técnica sugerida por Pons, W.A. y cols., 1973, citada por Tejada I. 1983).

DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN EL TEJIDO ANIMAL (HIGADO):

Pesar 70 g. de la muestra, depositarlos en un vaso de licuadora, adicionar 150 ml. de metanol y 10 g. de ayuda filtro, mezclar en la licuadora durante 4 min. a alta velocidad dejar reposar durante 10 min., para permitir que haya homogenización, filtrar a través de papel filtro Whatman No. 1 o su equivalente, enjuagar el vaso de la licuadora con 35 ml. de metanol y agregarlos al filtrado.

Obtener 150 ml. del filtrado, depositarlos en un embudo de separación de 500 ml., adicionar 70 ml. de agua destilada, 140 ml. de la mezcla de éter petróleo-hexano-benceno (58:26:58) y 7 g. de cloruro de sodio, agitar vigorosamente y dejar que se separen las fases, recolectar la fase inferior (metanol-agua), drenar y descartar la fase superior, adicionar a la fase de metanol agua, 20 ml. de cloroformo para extraer las aflatoxinas, recolectar la fase inferior clorofórmica en un vaso de precipitado y ponerlo en baño maría para evaporar hasta que queden aproximadamente 3 ml. depositarlos en un frasquito con rosca y tapa.

Meter la minicolumna dentro del extracto clorofórmico, permitiendo

que por capilaridad ascienda hasta 1 cm. arriba de la capa de alúmina, sacar la columna, limpiarla por fuera e inmediatamente ponerla en un frasquito que contenga 5 ml. del disolvente desarrollador (4.75 ml. de cloroformo y 0.25 ml. de metanol), desarrollar la columna en dirección ascendente durante 5 min.

(Adaptación a la técnica sugerida por Strzelecki, E.L. , 1978).

En ambas técnicas las columnas desarrolladas serán inmediatamente examinadas bajo la luz ultravioleta de onda larga (365 nm.) y comparadas con columnas que contengan cantidades conocidas de estándares desarrollados de la misma forma, para que sea posible su cuantificación. La presencia de aflatoxinas se evidencia por una banda fluorescente azul (AFB), verde (AFG) o violeta (aflatoxicol), la cual se observa como un anillo, aproximadamente 1 cm. arriba de la capa de alúmina. Las muestras que no contienen aflatoxinas suelen observarse con bandas fluorescentes de color blanco o gris.

I V . R E S U L T A D O S :

De la parvada de 21,289 pollos que fué estudiada, se obtuvieron los siguientes resultados:

En el cuadro y figura # 1, se describen los resultados obtenidos en cuanto a la mortalidad: el promedio por ascitis fue de 0.67 %, con una fluctuación de 0.08 % a 1.91 %, siendo el total de 6.03 %. En los pollos no ascíticos, se observó un promedio de 0.79 %, con una fluctuación de 0.47 % a 1.25 %, siendo el total de 7.19 %.

En el cuadro y figura # 2, se describen los resultados observados en cuanto al consumo de alimento durante el ciclo de engorda. Mientras que en el cuadro # 3 aparecen los resultados obtenidos al realizarse el análisis bromatológico del mismo alimento.

En el cuadro # 4 y la figura # 3, aparecen los resultados obtenidos al realizar las técnicas antes descritas, para la determinación y cuantificación de aflatoxinas en los hígados y el alimento: en los pollos ascíticos hubo un promedio de 60.26 ppb (mcg/kg) de aflatoxina G₁ (AFG₁) y una fluctuación desde 14.2 ppb hasta 114.2 de AFG₁; en los pollos no ascíticos se observó un promedio de 45.57 ppb de AFG₁ y una fluctuación desde 0 ppb hasta 85.7 ppb de AFG₁, mientras que en los alimentos, se mantuvo en cantidades constantes de 28.5 ppb de AFG₁ durante todo el ciclo.

En el cuadro y figura # 5, aparecen los resultados obtenidos al realizar el análisis bioestadístico (Test Student) de los datos obtenidos.

los cuales fueron apareados por semana: se observó una diferencia altamente significativa en los niveles de aflatoxinas en los hígados provenientes de los pollos ascíticos y no ascíticos, siendo esta $t = 4.4393$: se ajustaron los valores obtenidos, para poder determinar los niveles teóricos de aflatoxinas en el alimento y en los hígados de los pollos analizados mediante la regresión polinomial (Figuras # 5 y 6).

C U A D R O N o . 1

"MORTALIDAD DE LOS POLLOS ASCITICOS Y NO ASCITICOS ALIMENTADOS CON RACIONES CONTAMINADAS CON AFLATOXINAS"

SEMANA	DIAS	MORTALIDAD POLLOS ASCITICOS		MORTALIDAD POLLOS NO ASCITICOS	
		No.	%	No.	%
1º	9	18	0.08	266	1.25
2º	16	18	0.08	110	0.52
3º	23	49	0.23	101	0.47
4º	30	55	0.26	152	0.71
5º	37	315	1.48	137	0.64
6º	44	407	1.91	108	0.51
7º	51	185	0.87	188	0.88
8º	58	102	0.48	210	0.99
9º	65	136	0.64	259	1.22
TOTAL		1285	6.03	1531	7.19

C U A D R O N o . 2

" CONSUMO DE ALIMENTO DE LA PARVADA DURANTE EL CICLO DE ENGORDA "

SEMANA	DIAS	ALIMENTO EN Kg SEMANAL	ALIMENTO EN Kg ACUMULADO
1 ^a	9	3500	3500
2 ^a	16	7640	11140
3 ^a	23	7963	19103
4 ^a	30	9100	28203
5 ^a	37	8063*	36266
6 ^a	44	9416*	45682
7 ^a	51	12884	58566
8 ^a	58	17685	76251
9 ^a	65	23437	99688

*Nota: Durante la quinta y sexta semana, se observa un descenso importante en cuanto al consumo de alimento, coincidiendo este con el pico máximo de mortalidad por ascitis.

C U A D R O N o . 3

" COMPOSICION QUIMICA DEL ALIMENTO UTILIZADO DURANTE LA PRUEBA "
(ANALISIS BROMATOLOGICO PROXIMAL)

NUTRIENTE	PORCENTAJE
HUMEDAD	10.1 %
PROTEINA	17.9 %
CENIZAS	5.0 %
GRASA CRUDA	3.4 %
FIBRA CRUDA	4.2 %
ENERGIA	2698.45 cal/ gr.

C U A D R O N o . 4

" CONTENIDO DE AFLATOXINAS "G₁" (ppb (mcg/kg)) EN EL ALIMENTO Y EN EL HIGADO DE POLLOS ASCITICOS Y NO ASCITICOS ALIMENTADOS CON RACIONES CONTAMINADAS CON AFLATOXINAS "

SEMANA	DIAS	EN EL HIGADO DE POLLOS ASCITICOS	EN EL HIGADO DE POLLOS NO ASCITICOS	EN EL ALIMENTO
1º	9	14.2*	00.0*	28.5*
2º	16	28.5*	28.5*	28.5*
3º	23	28.5*	28.5*	28.5*
4º	30	42.8*	28.5*	28.5*
5º	37	71.4*	57.1*	28.5*
6º	44	71.4*	57.1*	28.5*
7º	51	85.7*	71.4*	28.5*
8º	58	85.7*	71.4*	28.5*
9º	65	114.2*	85.7*	28.5*

* ppb = partes por billon de AFG₁ = Aflatoxina G₁

C U A D R O N o . 5

"ANALISIS BIOESTADISTICO"*

"COMPARACION DE MUESTRAS APAREADAS POR SEMANA: (NIVELES DE AFLATOXINAS)"

SEMANA	POLLOS ASCITICOS X ₁	POLLOS NO ASCITICOS X ₂	"d" X ₁ - X ₂	(d - D)
1º	14.2	0.00	14.2	2.3104
2º	28.5	28.5	0.00	160.7824
3º	28.5	28.5	0.00	160.7824
4º	42.8	28.5	14.3	2.6244
5º	71.4	57.1	14.3	2.6244
6º	71.4	57.1	14.3	2.6244
7º	85.7	71.4	14.3	2.6244
8º	85.7	71.4	14.3	2.6244
9º	114.2	85.7	28.5	250.2724
			<u>D= 12.68</u>	<u>587.2696</u>

$$S^2 = \frac{587.2996}{8} = 73.4087$$

$$S = \sqrt{73.4087} = 8.5678$$

$$S_D = \frac{8.5679}{\sqrt{9}} = 2.8559$$

$$t \text{ calculada} = \frac{D}{S_D} = \frac{12.68}{2.8559} = 4.4393$$

DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA EN LOS NIVELES DE AFLATOXINAS ENTRE POLLOS ASCITICOS Y NO ASCITICOS

* La prueba que se utilizó fué la de TEST STUDENT.

Colaboro: ING. Armando Aguilar.

FIGURA No. 1: MORTALIDAD OBSERVADA DURANTE EL
 CICLO DE ENGORDA EN POLLOS ASCITICOS Y NO ASCI
 TICOS EXPRESADO EN PORCENTAJE.

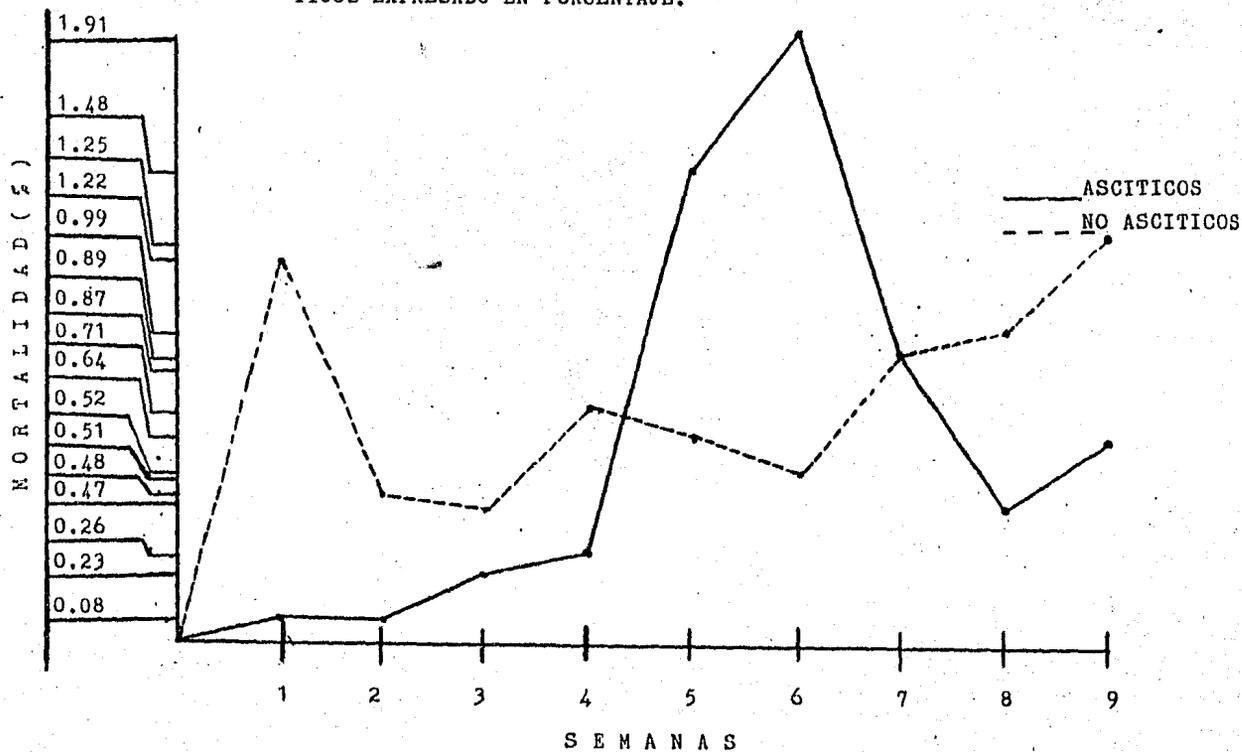
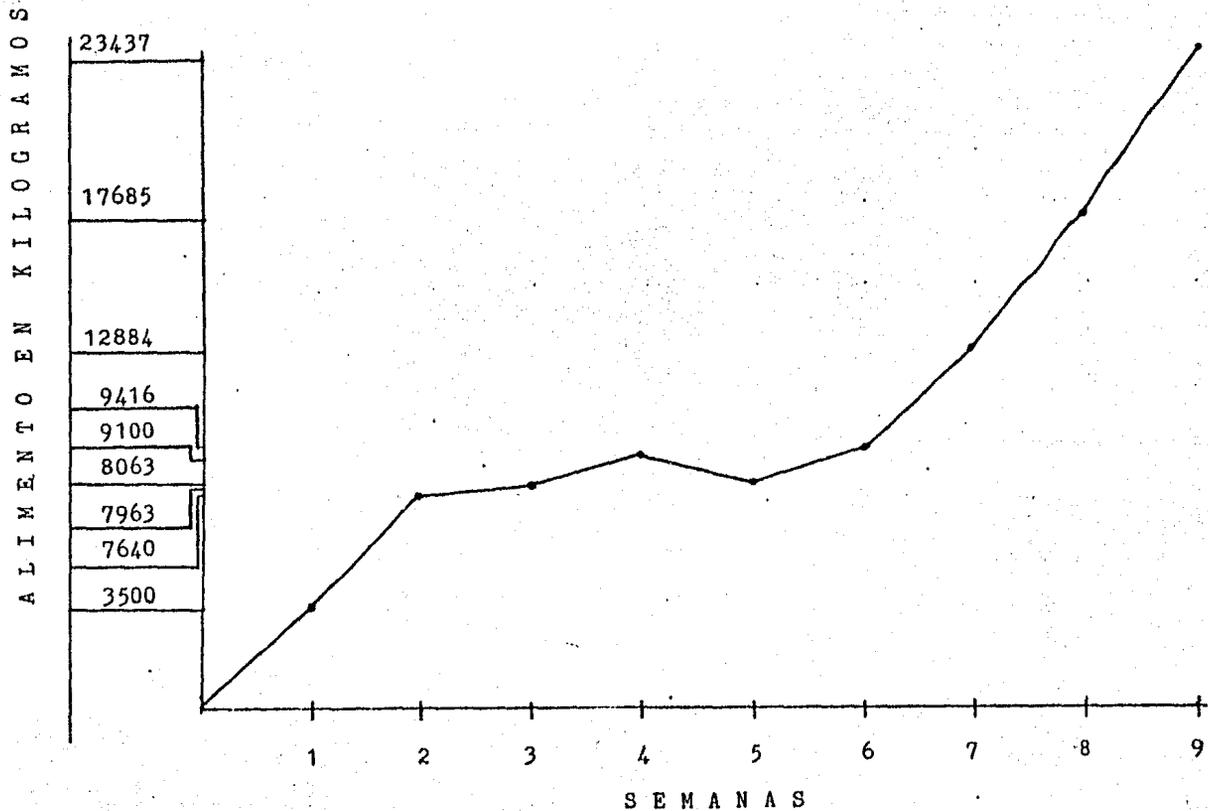
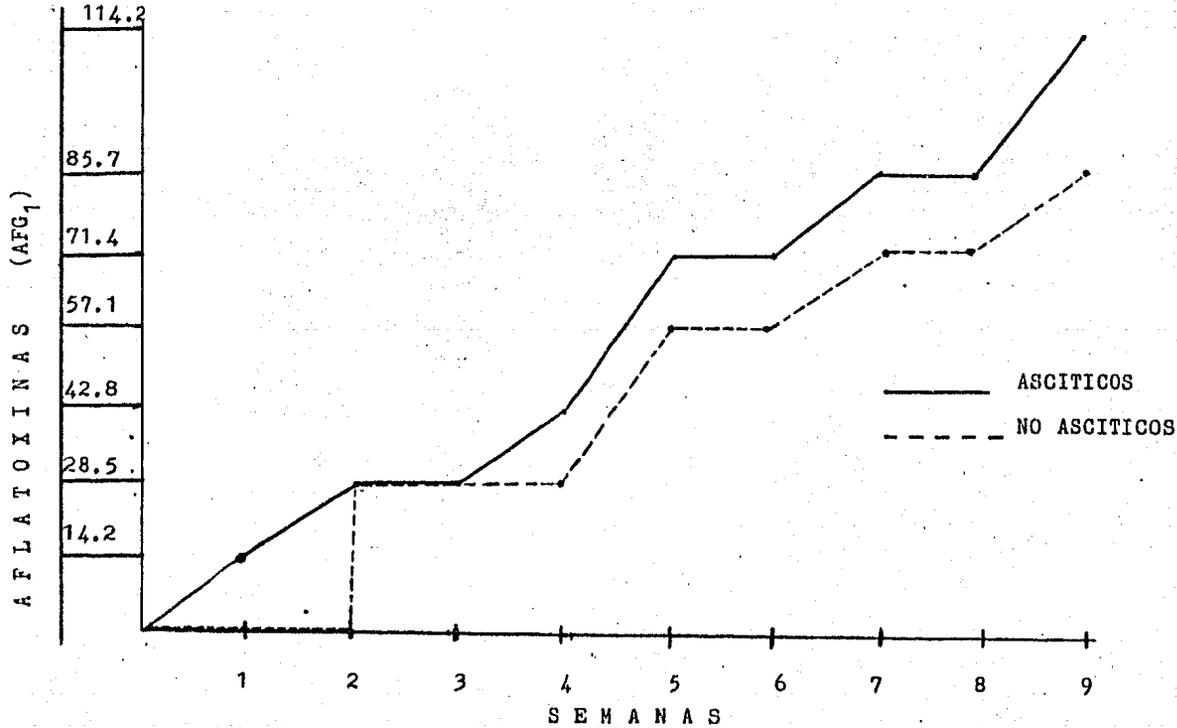


FIGURA No. 2: ALIMENTO CONSUMIDO POR LA PARVADA DURANTE EL CICLO DE ENGORDA.



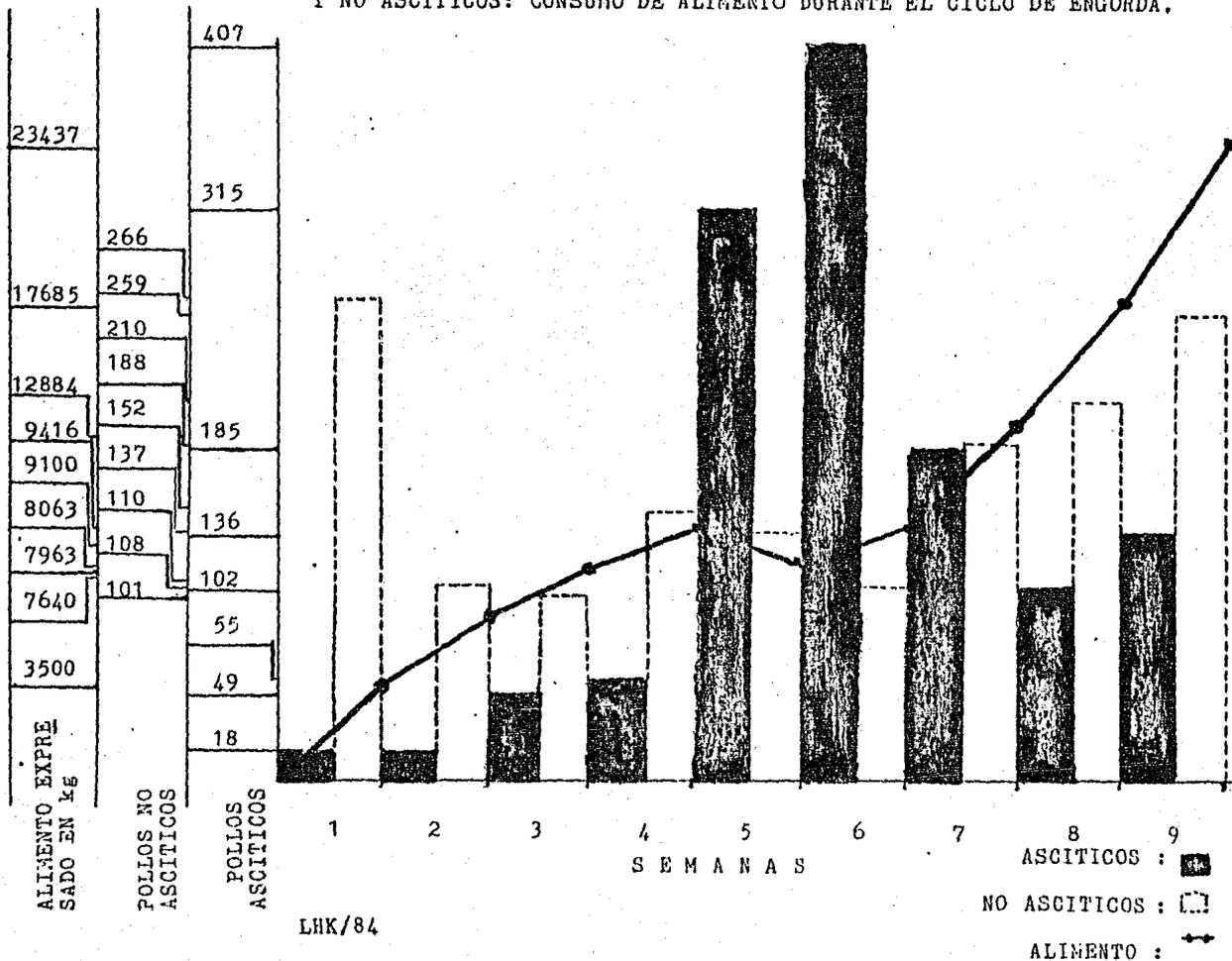
LHK/84

FIGURA No. 3: NIVELES DE AFLATOXINAS DETERMINADOS EN LOS HIGADOS RECOLECTADOS, TANTO DE POLLOS ASCITICOS COMO DE NO ASCITICOS.



LHK/84

FIGURA No. 4: MORTALIDAD OBSERVADA EN POLLOS ASCITICOS
Y NO ASCITICOS: CONSUMO DE ALIMENTO DURANTE EL CICLO DE ENGORDA.



LHK/84

FIGURA No. 5: AJUSTE POR MEDIO DE LA REGRESION POLINOMIAL:
 ACUMULACION TEORICA DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO Y EN LOS
 HIGADOS DE LOS POLLOS ASCITICOS.

$$Y = -5.44362 + 2.72631 X - 0.00354 X^2$$

Donde Y es el nivel de aflatoxinas en el pollo y
 X es el nivel de aflatoxinas acumuladas en el alimento.

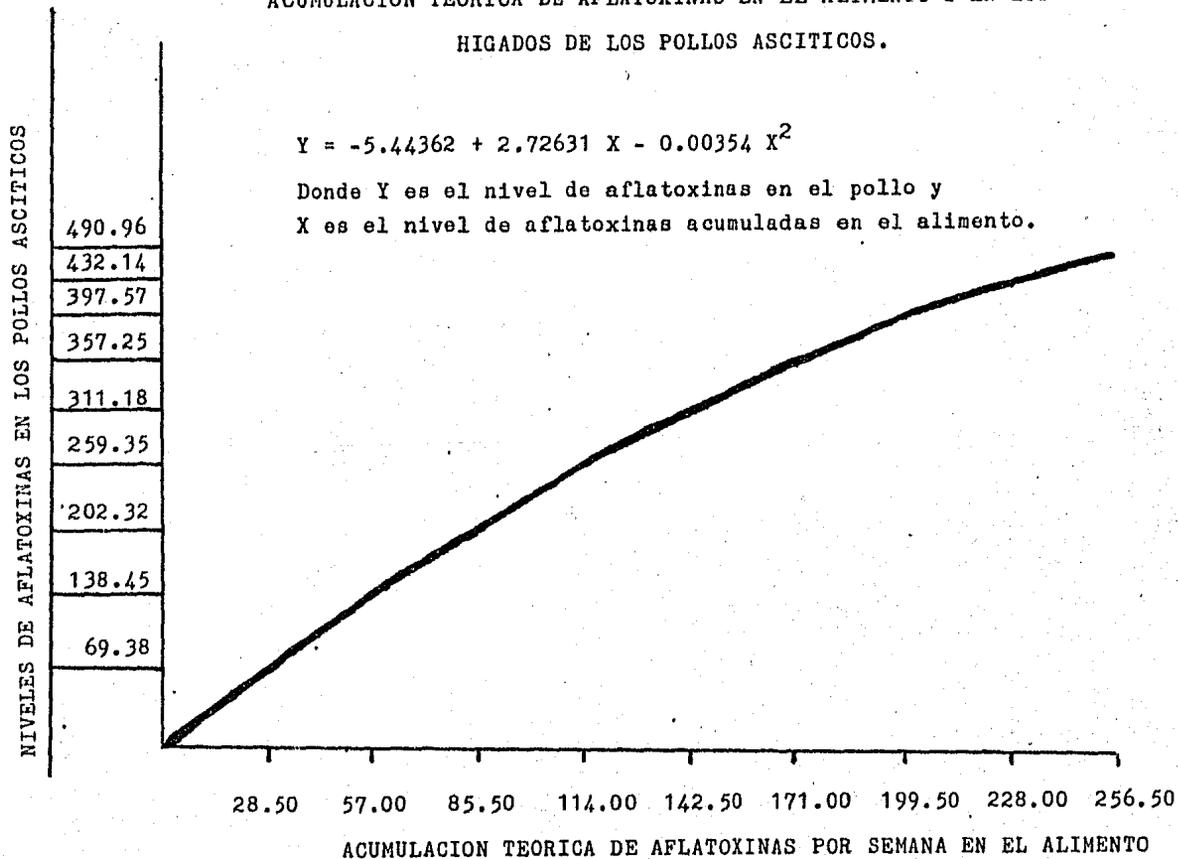
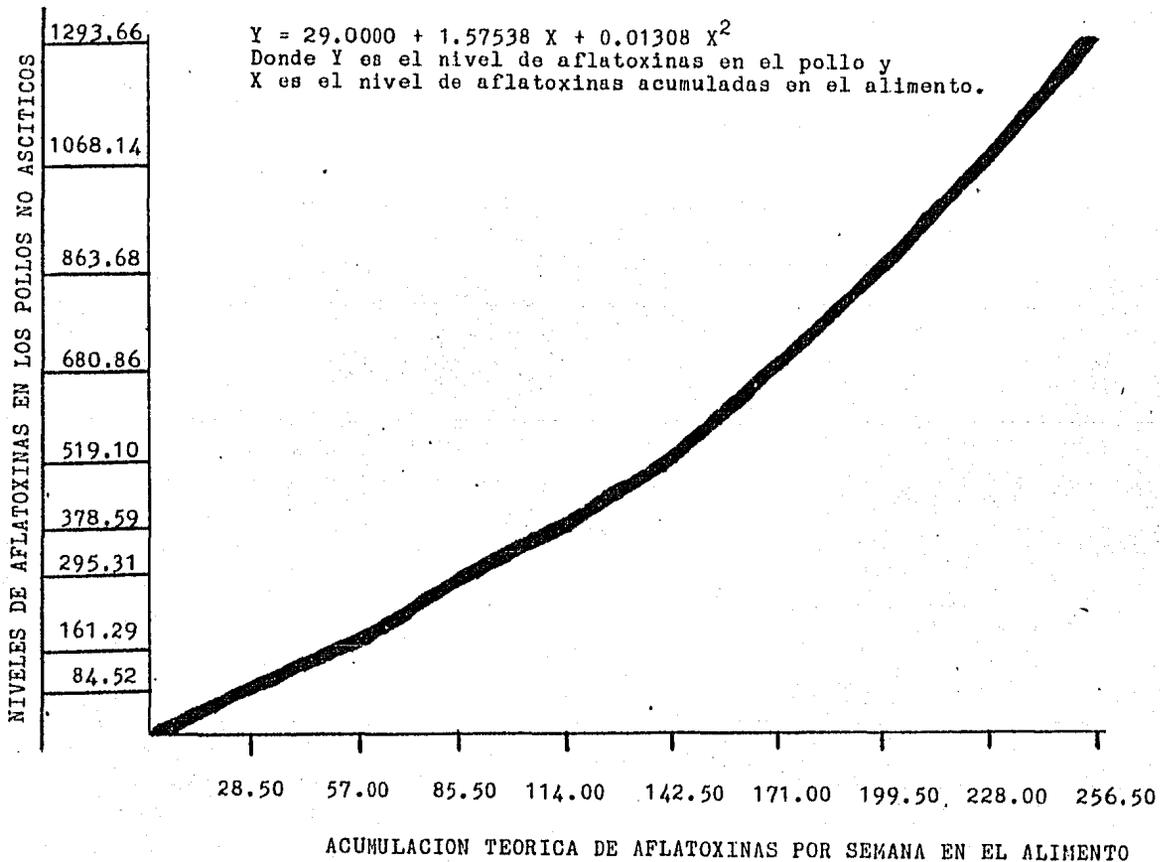


FIGURA No. 6: AJUSTE POR MEDIO DE LA REGRESION POLINOMIAL:
 ACUMULACION TEORICA DE AFLATOXINAS EN EL ALIMENTO Y EN LOS
 HIGADOS DE LOS POLLOS NO ASCITICOS.



V . D I S C U S I O N . :

Al analizar los resultados del presente trabajo se observó lo siguiente:

Una mortalidad variable a través de las semanas en los pollos ascíticos, manteniéndose relativamente baja desde la primera hasta la cuarta semana, para incrementarse drásticamente durante la quinta, sexta y séptima semana, para finalmente mantenerse en un término medio durante las dos últimas semanas (Cuadro # 1).

Estos resultados se apegan a los observados en trabajos previos (Villaseñor-Rivera Cruz, 1980), en los cuales la mortalidad fué variable, fluctuando desde un 1 % hasta un 30-35 %. En otros trabajos, se ha observado que la mortalidad inicia a incrementarse a partir de la tercera semana alcanzando su punto máximo a la séptima semana (Estudillo, 1979 y López, 1982). Sin embargo en este trabajo, el pico máximo se alcanzó entre la quinta y sexta semana de edad.

En lo referente al consumo de alimento se observó una curva ascendente desde la primera hasta la cuarta semana, sin embargo durante la quinta, sexta y séptima semana el consumo fué el más bajo presentado durante todo el ciclo de engorda (Cuadro # 2); hay que hacer mención que esto coincide con las semanas en que se observó una mayor mortalidad como consecuencia del síndrome ascítico.

Al analizarse los resultados obtenidos al cuantificar los niveles de aflatoxinas en el hígado y el alimento por las técnicas descritas se

observó: una variación que fluctuó desde 0 hasta 85.7 ppb de AFG₁ en los pollos no ascíticos y desde 14.2 hasta 114.2 ppb de AFG₁ en los ascíticos (Cuadro # 4); al realizarse el estudio bioestadístico se determinó una diferencia altamente significativa entre ambos animales.

Con estos resultados nos encontramos frente a hallazgos importantes:

Las aflatoxinas se encuentran íntimamente ligadas y podrían ser condicionantes de la presentación del Síndrome Ascítico; esto se asume al observar niveles mucho más elevados en animales ascíticos que en no ascíticos.

En los animales no ascíticos se detectaron cantidades muy elevadas de aflatoxinas hacia la novena semana (85.7 ppb de AFG₁), siendo estos muy superiores a los permitidos por organismos internacionales como son: la O.M.S. y la F.A.O., las cuales permiten un máximo de 30 ppb de aflatoxinas en alimentos destinados al consumo humano (Goldblatt, 1969).

En base a lo anterior habrán de realizarse estudios posteriores para determinar si las aflatoxinas son el factor desencadenante ó bien son un factor que predispone a la presentación del síndrome ascítico; se sugiere que esto se realice proporcionando alimento previamente contaminado con cantidades conocidas de aflatoxinas.

V I . C O N C L U S I O N E S :

Mediante los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

Durante la quinta, sexta y séptima semana de edad se observan los niveles más altos de mortalidad por ascitis, además de una notable baja en el consumo de alimento y una importante concentración de aflatoxinas a nivel hepático.

Las aflatoxinas son un problema de suma importancia debido a la dificultad que existe para poder controlarlas, además de que se exacerba por el hecho de que las materias primas son almacenadas durante largos períodos.

Las aflatoxinas son un factor que se encuentra íntimamente ligado a la presentación del síndrome ascítico, estas tienen un efecto acumulativo a través del tiempo, lo que ocasiona severos daños al animal.

Al considerar que las aflatoxinas son potentes agentes inmunosupresores, debemos pensar que los animales están más expuestos a contraer otro tipo de enfermedades ocasionadas por agentes oportunistas, por lo cual es necesario extremar las medidas de manejo adecuadas a la parvada.

Los animales que son alimentados con dietas contaminadas con aflatoxinas, representan un riesgo potencial en Salud Pública, ya que rebasan ampliamente los niveles permitidos por la O.M.S. y la F.A.O. en los alimentos destinados al consumo humano.

V I I . B I B L I O G R A F I A :

- 1.- Beltrán, B.A. (1978). Efectos de las Aflatoxinas en la alimentación. Avirama 1 (3): 22-29.
- 2.- Campos Nieto, E.G. (1978). Aflatoxicosis en los animales domésticos. Actualidad Veterinaria 2 (5): 2-16.
- 3.- Carnaghan, R.B., Crawford, M. (1964). Relationship between ingestion of aflatoxin and primary liver cancer. British Vet. J. 120 : 201-203.
- 4.- Dalezios, J.I., Hsieh, D.P., Wogan, G.N. (1973). Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin B₁ by Rhesus Monkeys. Fd. Cosmet. Toxicol. 11: 605-616.
- 5.- Estudillo, L.J. (1975). Consideraciones sobre un cuadro de intoxicación múltiple en pollos de engorda. Primera Jornada de Toxicología Aviar. A.N.E.C.A. México.
- 6.- Estudillo, L.J. (1979). Consideraciones sobre la problemática, patogenia, etiología y consecuencias de la llamada ascitis del pollo de engorda. Avirama 1 (11): 22-30.
- 7.- Estudillo, L.J. (1980). Edema Aviar, Ascitis Ideopática, Enteritis no Específica, Síndrome de las Grasas Tóxicas, Lipoidosis Tóxica, Edema de las Alturas, etc. Avirama 11 (15): 10-20.
- 8.- Flick, D.F., Douglass, C.D., Gallo, L. (1962). Studies of the chick edema diseases. I. Body water distribution and effect of diet. Nutrition Research Branch 855-862.
- 9.- Flores, F.R. (1981). Fisiopatología de la Ascitis. Avirama 3 (25): 4-8.

- 10.- Goldblatt, L.A. (1969). "Aflatoxins". Food Science and Technology. A Series of Monographs. Ed. Academic Press, New York and London.
- 11.- Gonzalez, A.Y., Mosqueda, T.A., Rosiles, R. (1981). Determinación de compuestos órgano clorados en alimentos y tejidos corporales en pollos de engorda. Avirama 1 (4): 24-27.
- 12.- James, R., Allen, D. (1964). The role of "Toxic Fat" in the production of hidropericardium an Ascites in Chickens. Am. J. Vet. Reserch 1210-1217.
- 13.- Kffley, V.C., Mora, E.C. (1976). Ultraestructural changes induces by chronic aflatoxicosis in chicken. Poult. Sc. 55: 317-324.
- 14.- Kolb, E. (1976). Fisiología Veterinaria. Ed. Acribia. España.
- 15.- López, C.C. (1982). Reporte de investigaciones recientes sobre el síndrome ascítico en México. VI. Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura. I.N.I.P. 86-91.
- 16.- Mirocha, C.I. (1978). Aflatoxinas: Química, Metabolismo y sus efectos en la Salud Animal. IV Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura. I.N.I.P. 77-83.
- 17.- Norilla, A.G. (1980). Efecto de las Micotoxinas sobre los mecanismos de Inmunidad de los Animales. Avirama 2 (17) ; 19-27.
- 18.- Pass, D.A. (1982). Helioitrine Poisoning of Broiler Chikens; An experimental Clinicopathologic Study of low dose intoxication. Avian Pathology 11 : 81-93.

- 19.- Peraza, C. (1975). La aflatoxicosis en las aves domésticas. Las Memorias de la I Convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. A.N.E.C.A. 2-12.
- 20.- Pons, W.A. (1973). Detección rápida de contaminación por aflatoxinas en alimentos para animales. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 56 (4) : 803-804.
- 21.- Robbins, L.S. (1974). Patología estructural y funcional. Ed. Interamericana. México.
- 22.- Rosiles, M.R. (1982). Daños por aflatoxinas en la avicultura. VI Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura. I.N.I.P. : 99-103.
- 23.- Strzelecki, L.E. (1978). Aflatoxin Determination in Animal Tissues. Zbl. Vet. Med. B. 25 : 194-201.
- 24.- Tejada, I. (1983). Manual de Laboratorio para Analisis de Ingredientes utilizados en la Alimentación Animal. I.N.I.P.:331-333.
- 25.- Villaseñor, J.A., Rivera, C.C. (1980). Qué esta pasando con la ascitis ? Avirama 2 (18): 34-38.