

Aflatoxina M₁ en queso duro blando, comercializado en centros minoristas municipales en cuatro localidades de El Salvador



Universidad Doctor Andrés Bello
Dirección Nacional de Investigación
y Proyección Social.
Área: Salud

Aflatoxina M₁ en queso duro blando, comercializado en centros minoristas municipales en cuatro localidades de El Salvador.

ÁREA DE SALUD

2018



Dirección Nacional de Investigación y Proyección Social

UNIVERSIDAD DOCTOR ANDRÉS BELLO

Universidad Doctor Andrés Bello

Dirección Nacional de Investigación y Proyección Social

Laboratorio de Inocuidad Alimentaria

Aflatoxina M₁ en queso duro blando, comercializado en centros minoristas municipales en cuatro localidades de El Salvador.

©2019, Universidad Doctor Andrés Bello

Primera Edición 2019

Código institucional: 4SR/INV/C/2018

Investigadores:

Oscar Peña Rodas ^{a†}, Roxana Martínez López ^{a‡}, Roberto Hernández Rauda ^{b*}

^a Laboratorio de Inocuidad de Alimentos, Universidad Doctor Andrés Bello, San Salvador, El Salvador. 1a Calle Poniente y 41a Avenida Norte, 2128, Colonia Flor Blanca, San Salvador, El Salvador, América Central.

† E-mail: oscar.pena@unab.edu.sv

‡ E-mail: roxana.martinez@unab.edu.sv

^b Dirección de Investigación y Proyección Social, Universidad Doctor Andrés Bello. 1a Calle Poniente y 41a Avenida Norte, 2128, Colonia Flor Blanca, San Salvador, El Salvador, América Central. Fax: +503 22608541

* E-mail: roberto.rauda@unab.edu.sv

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	4
1. Introducción.....	7
2. Tipo de estudio y Métodos.....	13
2.1 Preparación de las muestras y extracción.....	13
2.2 Método analítico de Aflatoxina M ₁	16
3. Resultados.....	19
4. Discusión.....	24
5. Conclusiones.....	25
6. Reconocimientos.....	27
7. Referencias.....	28
8. Apéndices.....	32

Resumen

Introducción: La Aflatoxina M₁ (AFM₁) es un posible agente carcinogénico excretado a través de la leche de un organismo afectado, con efectos inmunosupresores, daños teratógenos y mutagénicos tanto en humanos (en especial infantes, mujeres embarazadas o personas inmunosuprimidas) como en ganado lechero. El consumo asiduo de leche contaminada con AFM₁ tiene frecuentemente como resultado enfermedades cutáneas, alteraciones hepáticas, así como deficiencias nutricionales y daño metabólico en la población que la ingiere, a su vez ha sido clasificada como agente carcinógeno “tipo 2”, para humanos. La AFB₁ tiene su origen en cereales y semillas contaminadas por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, mientras que la AFM₁ tiene sus orígenes como metabolito resultantes de la degradación hepática de la Aflatoxina B₁ –AFB₁– de vacas lecheras.

La presencia de AFM₁ en queso está ligada indudablemente a leche contaminada que luego se usa para manufacturar los derivados lácteos o incluso debido a moho creciendo en el queso. Los niveles de AFM₁ en queso casi siempre son más altos que en leche fluida, probablemente por la afinidad de la toxina por las proteínas de caseína en Leche y derivado también al tipo de alimento consumido por las vacas lecheras. Este vínculo intrínseco entre la toxina y la caseína en la leche establece una estrecha relación en los niveles de AFM₁ en queso, al ser la proteína por la que está constituido dicho derivado lácteo. Es por ello que, países con niveles de referencia o valores límites ya establecidos para AFM₁ en leche, han buscado implementar valores específicos para queso, pues su concentración suele ser mucho más alta. Un caso en particular es el de la Unión Europea, que ha fijado como límite 0.250 ppb para quesos.

Resultados:

La prevalencia de muestras positivas a la AFM₁ (>0.005 µg/kg), fue levemente más alta en el periodo de muestreo noviembre-diciembre, comparado con julio-agosto, con una diferencia de sumatorio total de 0.031 µg/kg entre ambos periodos de muestreo. En promedio, las muestras de origen nacional tuvieron un porcentaje más alto de valores positivos a AFM₁, frente a las muestras de origen nicaragüense, con una diferencia de 0.063 µg/kg en los resultados totales, entre ambas categorías. Los valores promedio entre periodo de muestreo y categoría nacional y nicaragüense, variaron entre si significativamente, a excepción de la localidad de San Miguel, en cuyo caso la variación es menos delimitada.

Conclusiones:

La prevalencia de contaminación de AFM₁ en quesos de origen nacional y nicaragüense, es de carácter constante, encontrándose valores promedio significativos entre cada periodo de muestreo, ninguno superando la norma europea de 0.250 µg/kg. Esto indica que, aunque hay variación en los valores promedio en virtud del origen de la muestra, estos pueden variar además en el periodo en que se acceda a estas, encontrando valores agudos entre cada lote. Dado que estudios anteriores en El Salvador sobre leche fluida, encontraron valores significativos en localidades similares a las del presente estudio, se comprobó que existe compaginación en cuanto a la contaminación de AFM₁ en queso. Se comprueba entonces que la cadena de infección que inicia con la AFB₁ en alimento para ganado y que luego de ser metabolizada en el hígado de las vacas lecheras, tiene como destino los derivados lácteos, en este caso los denominados “Duros blandos”, esperando niveles de cuantificación aún más altos, por la naturaleza de la toxina de adherirse a la proteína láctica, o en este caso, Caseína.

Abreviaturas

AFM₁: Aflatoxina M₁

AFB₁: Aflatoxina B₁

AFs: Aflatoxinas totales (B₁+B₂+G₁+G₂)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

DER: Desviación Estándar Relativa

Compuestos químicos estudiados en esta investigación:

Aflatoxina M₁ (PubChem: 15558498)

Aflatoxinas Totales, mezcla de origen natural de:

Aflatoxina B₁ (PubChem: 14403)

Aflatoxina B₂ (PubChem: 2724360)

Aflatoxina G₁ (PubChem: 14421)

Aflatoxina G₂ (PubChem: 2724362)

Abstract

Introduction:

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is a possible carcinogenic agent excreted through milk, with immunosuppressive, teratogenic and mutagenic damage effects in humans (especially infants, pregnant women or immunosuppressed persons) and dairy cattle. The frequent consumption of milk contaminated with AFM₁ might result in cutaneous diseases, liver alterations, as well as nutritional deficiencies and metabolic damage in the population that ingests it, in has been classified as a type 2 carcinogen for humans. AFB₁ has its origin in cereals and seeds contaminated by the fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. While AFM₁ has its origins as a metabolite resulting from the degradation of Aflatoxin B₁ –AFB₁– in the liver of dairy cows.

The presence of AFM₁ in cheese is undoubtedly linked to contaminated milk that is then used to manufacture dairy products or even due to mold growing in cheese. The levels of AFM₁ in cheese are almost always higher than in fluid milk, perhaps because of the affinity of the toxin for the casein proteins in milk and also derived to the type of food consumed by dairy cows. This intrinsic link between the toxin and the caseins in milk establishes a close relationship in the levels of AFM₁ in cheese, since it is the protein by which said milk derivative is constituted. That's why, countries with reference levels or limit values already established for AFM₁ in milk, have sought to implement specific values for cheese, as its concentration is usually much higher. One case in particular is that of the European Union, which has set a limit of 0.25 ppb for cheese.

Results:

The prevalence of AFM₁-positive samples ($> 0.005 \mu\text{g} / \text{kg}$) was slightly higher in the November-December sampling period, compared to July-August, with a total sum difference of $0.031 \mu\text{g} / \text{kg}$ between both periods. Sampling On average, samples of Nicaraguan origin, with a difference of $0.063 \mu\text{g} / \text{kg}$ in the total results, between both categories. The average values between the sampling period and the national and Nicaraguan category, the variation between the environment, an exception of the San Miguel locality, in which case the variation is less delimited.

Conclusions:

The prevalence of contamination of AFM₁ in cheeses of national and Nicaraguan origin, is of a constant nature, finding significant average values between each sampling period, some exceeding the European standard of $0.250 \mu\text{g}/\text{kg}$. This indicates that although there is variation in the average values by virtue of the origin of the sample, these can also vary in the period in which they are accessed, finding acute values between each lot. Given that previous studies in El Salvador on fluid milk, found significant values in localities similar to those of the present study, it was found that there is a combination of contamination of AFM₁ in cheese. It is then verified that the chain of infection that starts with AFB₁ in cattle feed and that after being metabolized in the liver of dairy cows, is destined for dairy derivatives, in this case the so-called "duro blando", waiting for levels of quantification even higher, by the nature of the toxin adhering to the lactic protein, or in this case, Casein.

Abbreviations

AFM₁: Aflatoxin M1

AFB₁: Aflatoxin B1

AFs: Total Aflatoxins (B1+B2+G1+G2)

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

RSD: Relative Standard Deviation

Chemical compounds studied in this article:

Aflatoxin M1 (PubChem: 15558498)

Total Aflatoxins, naturally occurred mixture of:

Aflatoxin B1 (PubChem: 14403)

Aflatoxin B2 (PubChem: 2724360)

Aflatoxin G1 (PubChem: 14421)

Aflatoxin G2 (PubChem: 2724362)

1. Introducción

La Aflatoxina M₁ (AFM₁) es un posible agente carcinogénico excretado a través de la leche, con efectos inmunosupresores, daños teratógenos y mutagénicos tanto en humanos (en especial infantes, mujeres embarazadas o personas inmunosuprimidas) como en organismos que dependen de la lactancia, como lo es el ganado lechero. El consumo asiduo de leche contaminada con AFM₁ tiene frecuentemente como resultado enfermedades cutáneas, alteraciones hepáticas, así como deficiencias nutricionales y daño metabólico en la población que la ingiere, a su vez ha sido clasificada como agente carcinógeno tipo 2 para humanos [1, 2, 3, 19] La Aflatoxina B₁-AFB₁- tiene su origen en cereales y semillas contaminadas por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, y es considerado el compuesto más tóxico, producido por estos mohos. Mientras que la excreción de AFM₁ en leche, tiene sus orígenes como metabolito resultantes de animales lactantes alimentados con componentes contaminados con Aflatoxina B₁ -AFB₁- [11,12,15]

Existe una correlación indiscutible entre la variabilidad meteorológica (Ausencia o presencia de lluvia, humedad relativa) y la presencia de AFM₁ en leche. Esto se debe posiblemente a que, en regiones tropicales, en ausencia de lluvia y por ende de las condiciones necesarias para pastizales, los productores lecheros se ven obligados a proveer de concentrado y forraje al ganado. Debido a que este tipo de alimento es susceptible a contaminación por hongos y por ende AFB₁, las condiciones de esta proliferación se ven beneficiadas por la temperatura y humedad en este periodo en particular (en especial en las condiciones de almacenaje poco convenientes por parte de los productores lecheros en la gran mayoría de países en vías de

desarrollo), esto tiene como consecuencia que los niveles de AFB₁ se vean incrementados en el forraje, así mismo los de AFM₁ en leche. [4,5,6]

En El Salvador existen datos sobre la presencia de AFB₁ en maíz y de AFM₁ en leche cruda fluida [11,12] Donde se cumple una correlación indiscutible entre la variabilidad meteorológica y los niveles de Micotoxinas respectivamente, existiendo una tendencia al alza en las localidades con condiciones meteorológicas adversas [12,30,31], en respecto al resto de localidades muestreadas, donde las condiciones son más estables o tienden a ser menos severas. Los efectos meteorológicos en los niveles de AFM₁ y AFB₁ son diversos, fenómenos como “El Niño” y “La Niña” pueden llegar a tener efectos considerables, incluso la posición geográfica respecto a otras regiones, tienen un factor de afectación, como lo es la posición de El Salvador en el corredor seco de Centroamérica. [11,12]. En cuanto a niveles de prevalencia, una tendencia de valores mico-toxicológicos al alza en periodos de sequía, es frecuente en diferentes latitudes, similares a la situación salvadoreña [Apéndice C, tabla 3].

La presencia de AFM₁ en queso está ligada indudablemente a leche contaminada que luego se usa para manufacturar los derivados lácteos [4,7,8,9, 15] Los niveles de AFM₁ en queso casi siempre son más altos que en leche fluida, ligado a la afinidad de la toxina por las proteínas de caseína en Leche y derivado también al tipo de alimento consumido por las vacas lecheras. Este vínculo intrínseco entre la toxina y las caseínas en la leche, establece una estrecha relación en los niveles de AFM₁ en queso, al ser la proteína por la que está constituido dicho derivado lácteo. Esta tendencia al alza en los valores promedio de los derivados lácteos, pueden oscilar entre 4 y 5 veces más que en la leche que se utilizó como materia prima y de 2 a 3 veces más en derivados de origen industrial. [15,16,17] Es por ello que, países con niveles de referencia o valores límites ya establecidos para AFM₁ en leche,

han buscado implementar valores específicos para queso, pues su concentración suele ser mucho más alta. Un caso en particular es el de la Unión Europea, que ha fijado como límite 0.25 ppb para quesos. [2,3,15]. Dado que los límites establecidos para AFM₁ en productos lácteos derivados son menos frecuentes que en leche cruda fluida como tal, algunos países (consientes de la importancia de establecer parámetros) han establecido sus propios valores de referencia [15]. Como son los casos de Holanda (200 ng/kg) ó Suiza, Austria y Turkia (250 ng/kg) [15]. El impacto que las condiciones meteorológicas adversas tiene sobre el alza de afectaciones micotoxicológicas, es un hecho que podemos ver reflejado en resultados de estudios previos [11,12], un ejemplo muy claro del impacto desastroso que puede tener esta correlación es lo ocurrido en 2012 en Serbia, donde una sequía que se prolongó bastante más de lo usual, tuvo repercusiones considerables en la leche fluida exportada a toda Europa. [16] Esta cadena de sucesos tuvo tal repercusión que incluso provoco una reconsideración en los Niveles Máximos Permisibles, volviéndolos más permisibles, buscando dar un margen de maniobra al sector lechero, pero sin tomar mucho en cuenta el nivel de afectación que esto podría llegar a tener [16]. La sequía produce tal efecto en el acrecentamiento de actividad mico-toxicológica, que esta puede percibirse en periodos muy extensos, después de ocurrir [16,17].

La concentración de las micotoxinas varía también en función del tipo de queso, refiriéndose a la variedad extensa de quesos que existen y condiciones geográficas específicas al lugar de producción. Cada una de esos tipos de queso, poseen diferentes métodos de manufacturación que tienen como consecuencia mayor o menor concentración de caseína y en su defecto de AFM₁ [5,6,7]. Diversos estudios demuestran que la concentración de AFM₁ es de 3 a 5 veces

más alta en quesos suaves y duros que en la leche que se usó como manufactura. [4,12]. En Líbano, un total de 12% de las muestras recolectadas de pequeñas industrias locales, presentaron valores que excedían los valores establecidos por la Unión Europea, mientras que ninguno de los quesos importados o pertenecientes a las grandes industrias lácteas sobrepasaban los límites. Este contraste tan severo, puede deberse a que controles técnicos disponibles en grandes industrias o de carácter extranjero, surten como una ventaja en cuanto a control de calidad e inocuidad de los mismos [2,5,14].

Existe evidencia y reportes que indican que agregar los denominados “secuestrantes de micotoxinas”, al forraje o alimento para vacas lecheras, tienen una alta tasa de éxito en la disminución de los valores de AFM₁. Sin embargo, la puesta en marcha de estos secuestrantes genera un impacto negativo en el valor nutricional del forraje y en consecuencia de la leche y sus derivados. [7,14,19] Es por ello que, diversos análisis concluyen que el método de prevención de las buenas prácticas agrícolas, parece ser el más efectivo. Debido a que existe un vínculo directo entre la contaminación de granos utilizados para alimento agrícola, cortar este suministro o vía de infección desde su origen es sumamente viable, en especial para países en vías de desarrollo. [8,9,17]

Dada la afinidad de AFM₁ por la caseína en la leche, y que los quesos están constituidos por dichos derivados, se considera el queso como la fuente más potente de contaminación por micotoxinas entre los derivados lácteos. En el caso de El Salvador los derivados lácteos, así como la leche misma, están presentes en la dieta básica de todos los estratos, su consumo es considerado incluso integral para el buen desarrollo y crecimiento de los infantes. Recientemente su consumo se ha visto aumentado debido a programas sociales por parte del gobierno salvadoreño o como complemento nutricional junto a los alimentos estándar.

[11,12,20] El Queso tradicional y de anaquel o comercial, está ampliamente distribuido en todo el país, ya sea producido artesanalmente o por industrias nacionales o internacionales, su consumo se encuentra distribuido virtualmente en todo el territorio salvadoreño. Un gran número de estos productos provienen de Nicaragua, en cuyo caso, los orígenes de materia prima para forraje, modo de producción y almacenamiento de los quesos, es desconocido para la población salvadoreña. Debido a la gran importancia que conlleva la relación afectación-beneficio, la salud pública y a que no existen reportes analíticos sobre AFM₁ en quesos en El Salvador, el presente estudio tuvo como propósito la prevalencia de dicha toxina en el queso “Duro blando” de cuatro localidades a nivel nacional, por medio de dos fases de muestreo con tres meses de por medio entre cada fase, para un total de 66 muestras en la 1ra. Fase y 74 en la 2^a. Dichas muestras adquiriéndose en los mercados municipales respectivos, haciéndose de las muestras en locales comerciales especializados en su distribución, constando de 1 lbs por punto de venta.

Tabla 1. Niveles promedio de AFM₁ por año, localidad, estación climática y numero de muestras

Año y localidad	N° de Muestras	Valores	Estación*	Referencia
2007, Portugal	128	>0.05 $\mu\text{ kg}^{-1}$	Lluviosa	[18]
2011, Brasil	48	0.04 \pm 0.31 $\mu\text{ kg}^{-1}$	Seca	[18]
2011, Albacete, España	82	0.52 (único) $\mu\text{ kg}^{-1}$	Seca	[15]
2012, Ecuador	30	0.16 (único) $\mu\text{ kg}^{-1}$	--	[18]
2014, Turquía	166	0.02-2.1 $\mu\text{ kg}^{-1}$	Lluviosa	[18]
2015, Irán	39	0.004-0.023 $\mu\text{ kg}^{-1}$	Seca	[18]
2016, Isparta, Turquía	100	0.21 (único) $\mu\text{ kg}^{-1}$	Seca	[20]
2016, Corea	108	0.02-0.14 $\mu\text{ kg}^{-1}$	--	[18]
2016, México	30	0.01-3.4 $\mu\text{ kg}^{-1}$	Seca	[18]
2017, Kermashan, Irán	29	0.179 $\mu\text{ kg}^{-1}$	Lluviosa/Seca	[19]
2018, El Salvador	140	0.08-0.071 $\mu\text{ kg}^{-1}$	Lluviosa/Seca	Este Estudio

*Datos obtenidos en base al periodo de muestreo, expresados en los informes.

2. Tipo de estudio y métodos.

El tipo de estudio utilizado fue observacional descriptivo con diseño longitudinal, con una muestra total por conveniencia de 140 libras de queso duro blando, ejecutado en dos periodos de tiempo, la primera ronda se inició en julio-agosto de 2018 y la segunda fue desde octubre a diciembre del mismo año y que corresponde a la transición de época seca a lluviosa con lo cual se pretende la detección de casos de Aflatoxina M₁ en queso duro blando de leche que es destinada para la realización de estos productos derivados de la misma.

Los sitios de muestreos fueron selecciones por criterios de estudios anteriores en leche cruda de vaca buscando AFM₁, realizados en 2016-2017, en el cual se cuantificó los niveles y determinó la prevalencia asociada a la sequía.

Las unidades de análisis fueron tomadas en centros de comercialización minoristas municipales de lácteos de El Salvador, las muestras totales analizadas por localidad y ronda fueron: 24 para el área metropolitana de San Salvador, 8 para Sonsonate, 8 para Chalatenango y 26 para San Miguel en la primera ronda, en cuanto a la segunda ronda las muestras incrementaron en dos departamentos de la siguiente manera: 24 en San Salvador, 12 en Sonsonate, 12 en Chalatenango y 26 en San Miguel (Tabla 2).

2.1 Preparación de las muestras y extracción de la toxina

Cada muestra de queso duro blando pesó 0.454 kg, colectadas un día previo al día de realizar la extracción y analizar las muestras mediante el método ELISA para Aflatoxina M₁. El día uno se colectaba la muestra en cada mercado según programación, inmediatamente después de hacer la colecta, se trasladaban al laboratorio de inocuidad alimentaria en cadena de frío,

para iniciar con el proceso de una de las fases que consiste en rayar, cortar y/o picar el queso, primero mediante un tajador, luego por una tipo guillotina y por último un extractor de alimentos específicamente Nutribullet® o Magic Bullet® a una velocidad aproximadamente de 600 vatios de potencia, el propósito principal de todo es para asegurar que la muestra sea homogénea, muy fina y de calidad para el procedimiento correspondiente.

Seguidamente el día dos, con la muestra ya tratada previamente se inicia con la fase de extracción de la toxina, pesando 2 gramos de queso y colocando en un tubo de 50 ml, luego se debe adicionar 10 ml de diclorometano al 100% a cada tubo, utilizando un agitador tipo vórtex agitar por 1 minuto, luego los tubos se colocaron en un agitador rotatorio por 15 minutos, seguidamente las muestras se incuban a 50 °C durante 30 minutos, terminado ese tiempo las muestras se colocan en la centrifuga refrigerada a 10 °C durante 15 minutos a 3500 rpm, del tubo recién centrifugado retirar 5 ml de sobrenadante de diclorometano y colocar en tubo de vidrio, en un baño de maría ajustado a 60 °C se colocan los tubos para evaporar totalmente el reactivo además para acelerar este paso se utilizó una bomba de aire y así obtener una capa de residuo grasoso, seguidamente al residuo obtenido por tubo se le agregaban 500 ml de metanol al 100%, 500 ml de agua destilada, por último se depositaban 4 ml de hexano al 100%, inmediatamente agitar con vórtex por 1 minuto, para continuar con otra centrifugación en frío a 10 °C por 10 minutos y 3500 rpm, luego remover la capa superior de hexano con pipeta según la conveniencia (Automática), preparar tubos limpios para transferir 500 ul de la capa agua-metanol; seguidamente agregar 2 ml de diluyente de la muestra (incluido en cada kit de AFM₁), finalmente homogenizar las muestras mezclando con vórtex por 1 minuto, ahora la muestra esta reconstituida para ser usada en el Ensayo.

Tabla 2. Origen de las muestras de queso, obtenidas para la detección de Aflatoxina M₁ de julio a diciembre 2018.

Departamento	Mercado	Municipio	Ronda 1	Ronda 2	N° de muestras por mercado
San Salvador	Central	San Salvador	6	7	13
	San Miguelito		4	4	8
	San Antonio Abad		2	1	3
	Merliot	Antiguo Cuscatlán	4	4	8
	Zacamil	Mejicanos	4	4	8
	Santa Tecla	Nueva San Salvador	4	4	8
Chalatenango	Municipal de Chalatenango	Chalatenango	4	4	8
	Puestos periféricos al mercado		4	8	12
Sonsonate	Municipal de Sonsonate	Sonsonate	4	6	10
	Municipal de Izalco		4	6	10
San Miguel	Municipal de San Miguel	San Miguel	21	20	41
	Puestos periféricos al mercado		5	6	11
Total			66	74	140

2.2 Método analítico de Aflatoxina M₁ (ELISA Competitivo) en queso duro blando.

Las muestras fueron analizadas con kits VERATOX[®] de NEOGEN[®] Corporation, específico para Aflatoxina M₁ y se emplearon conforme a lo estipulado por la compañía fabricante. Las muestras en este procedimiento se analizan por duplicado para que la prueba logre determinar la repetibilidad del método.

Previo a iniciar el ensayo, el reactivo debe de estar a temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), para evitar errores de lectura en las muestras, se inicia colocando la cantidad de 6 micropocillos color rojo que son los de mezclado; más la cantidad de muestras a analizar por duplicado, en los primero 6 pocillos se colocan 250 ul de controles o estándar según orden ascendente (0, 0.005, 0.015, 0.030, 0.060 y 0.100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente) después se colocan los 250 ul de extractos de muestras según orden estipulado, seguidamente colocar en la placa la cantidad a utilizar de los micropozos con anticuerpos y transferir 100 ul de controles y muestras, continuar situando la placa con micropozos en un agitador a 600 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente ($18\text{-}30^{\circ}\text{C}$), luego la placa se trasladó a un lavador automático de microplacas en la cual cada pocillo se lavó por cinco veces continuas con buffer diluido en 1000 ml agua destilada y preparado antes de iniciar el ensayo, inmediatamente después con pipeta de 12 canales colocar 100 ul de la solución de conjugado a los micropocillos, se agita la microplaca a 600 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se vuelven a lavar los micropozos en el lavador automático por cinco veces consecutivas, se adiciono 100 ul de sustrato a micropocillos, a continuación la placa fue agitada durante 15 minutos a 600 rpm y temperatura ambiente, finalmente se pipeteó 100 ul de solución stop a los micropozos, cuidadosamente y deslizando la placa sobre la mesa se mezcló de arriba

hacia abajo y se hizo la lectura en un equipo de microplacas ELISA con filtro de 650 nm. Las densidades ópticas obtenidas se calculaban mediante un software NEOGEN VERATOX Software v. 3.0.1 para convertirlas en valores de contenido expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$. [22,23]

Validación de los métodos de análisis.

Los análisis de validación fueron realizados cuatro días consecutivos para mejorar el rendimiento de los procesos ejecutados, se analizaron ocho muestras sobrecargando solo siete con un Estándar de referencia para uso analítico, provisto por NEOGEN® Corporation, la octava fue una muestra sin sobrecarga. La solución madre de AFM_1 utilizada se preparó según las instrucciones correspondientes del proveedor, además hubo implementación de baño ultrasónico y se realizó mediante la frecuencia prefijada a 40 Khz y un tiempo máximo de 10 minutos, proceso de la extracción que facilitó la disrupción. Los resultados de la validación de método de análisis de la AFM_1 se exponen en la Tabla 3 y la descripción completa del procedimiento utilizado se presenta en el Apéndice A.

Niveles máximos de Aflatoxina M_1

En El Salvador, no existe una normativa que especifique el valor máximo para AFM_1 en quesos de ningún tipo, por lo que se toma el valor establecido por el Codex Alimentarius, para Leche fluida, el cual es $0.500 \mu\text{g}/\text{kg}$ [23,24,25]. Sin embargo, en Europa se ha establecido un límite para queso en $0.250 \mu\text{g}/\text{kg}$, por lo que este estudio lo ha tomado como valor de referencia, en pro de una protección más integra de la salud humana [23,24,25].

Tabla 3. Parámetros de la eficacia del método para cuantificar Aflatoxina M₁ (AFM₁) en muestras sobrecargadas de queso duroblando.

Nivel sobrecarga µg/kg	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Reproducibilidad intralaboratorio (n=20 por nivel)		Valores recomendados ¹	
	Repetibilidad (n=4 por nivel)	RSD	Repetibilidad (n=4 por nivel)	RSD	Repetibilidad (n=4 por nivel)	RSD	Repetibilidad (n=4 por nivel)	RSD	Repetibilidad (n=4 por nivel)	RSD	Repetibilidad (n=4 por nivel)	RSD	Rango de recuperación media (%)	Precisión RSD _r (%)
0.100	112.73	6.59	129.95	5.10	140.75	1.11	140.73	1.96	95.30	3.33	123.89	3.62	70 a 110	≤ 14.93
0.200	89.84	13.49	84.98	15.71	93.29	7.75	93.91	7.63	112.90	12.38	94.98	11.39		≤ 13.45
0.300	75.45	1.18	113.53	2.91	80.28	1.25	80.27	1.44	101.21	1.64	90.15	1.68		≤ 12.66
0.400	119.30	1.57	85.47	3.03	83.71	1.58	83.87	1.75	82.99	1.89	91.07	1.97		≤ 12.12
0.500	119.33	6.14	112.04	4.91	84.93	2.70	84.01	1.70	90.87	5.45	98.23	4.18		≤ 11.72
0.600	44.54	2.85	121.29	0.73	89.62	1.26	89.47	0.45	70.97	1.67	83.18	1.39		≤ 11.40

¹ La precisión RSD_r se calcula multiplicando el factor 0.66 por la reproducibilidad (RSD_R) a una concentración de interés, $RSD_R = 2^{(1-0.5 \text{Log}_{10} \text{Valor de concentración})}$ [1]

¹ The Commission of the European Communities, Commission regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006, Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, OJ L70 (2006) 12-34, Available at <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es401-2006.pdf>. Accessed 27 Oct 2017.

3. Resultados

La prevalencia de valores por arriba del límite máximo de AFM₁ para muestras de queso en los periodos julio-agosto y noviembre-diciembre 2018, en cuatro zonas de muestreo en El Salvador se presenta en la Figura 1.

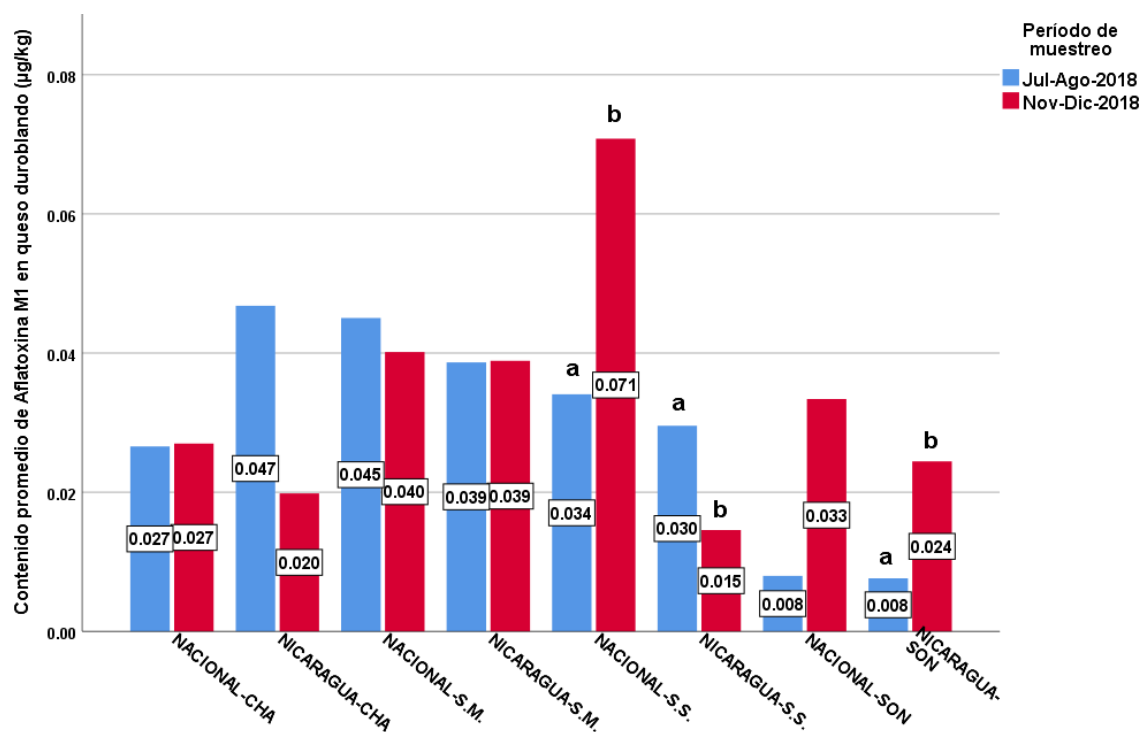


Figura 1. Contenido promedio en las 4 Localidades. Chalatenango, San Miguel, San Salvador y Sonsonate. Divididos por origen, nacional o nicaragüense.

La prevalencia de muestras positivas a la AFM₁ (>0.005 µg/kg), fue levemente más alta en el periodo de muestreo noviembre-diciembre, comparado con julio-agosto, con una diferencia de sumatorio total de 0.031 µg/kg entre ambos periodos de muestreo. En promedio, las muestras de origen nacional tuvieron un porcentaje más alto de valores positivos a AFM₁, frente a las muestras de origen nicaragüense, con una diferencia de 0.063 µg/kg en los

resultados totales, entre ambas categorías. Los valores promedio entre periodo de muestreo y categoría nacional y nicaragüense, variaron entre si significativamente, a excepción de la localidad de San Miguel, en cuyo caso la variación es menos delimitada.

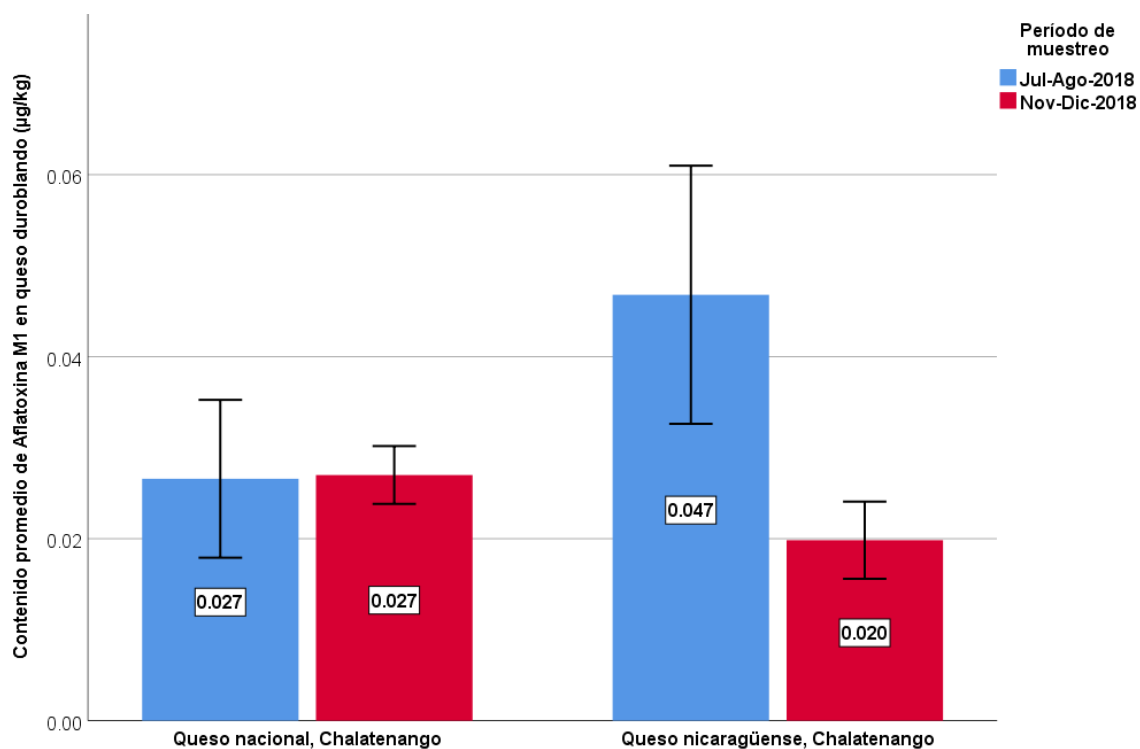


Figura 2. Promedios AFM1 Chalatenango

En el caso de Chalatenango, hubo resultados promedio equitativos en el queso nacional para ambos periodos de muestreo, caso contrario en el queso nicaragüense con una diferencia de 0.027 µg/kg entre ambos periodos. Referente a esta última categoría en el periodo referente a julio-agosto, podemos ver un aumento abrupto en el nivel promedio de AFM₁, el cual contrasta de manera significativa con todos los demás promedios de ese mismo periodo de tiempo, y por ende el caso de nivel promedio más alto para las muestras de origen nicaragüense.

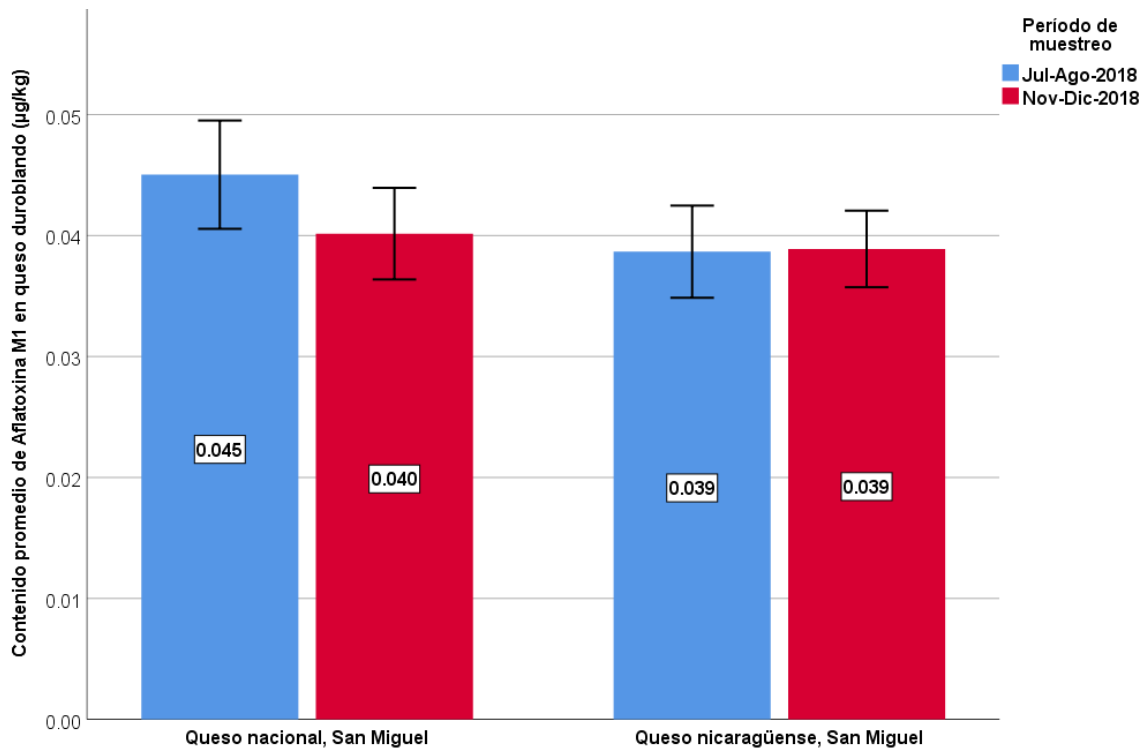


Figura 3. Promedios AFM1 San Miguel

Para el caso de San Miguel, la variabilidad en los promedios se hizo evidente en la categoría de Queso nacional con una diferencia de $0.005 \mu\text{g}/\text{kg}$, por el contrario, en muestras de origen nicaragüense donde el promedio en AFM₁ fue prácticamente el mismo. De las 4 localidades, esta tendencia de resultados no tan dispares uno del otro, ocurrió solo en San Miguel. En el periodo de julio-agosto, la diferencia promedio entre las categorías nacional y nicaragüense fue de $0.006 \mu\text{g}/\text{kg}$, una diferencia no tan significativa en comparación de las otras tres localidades.

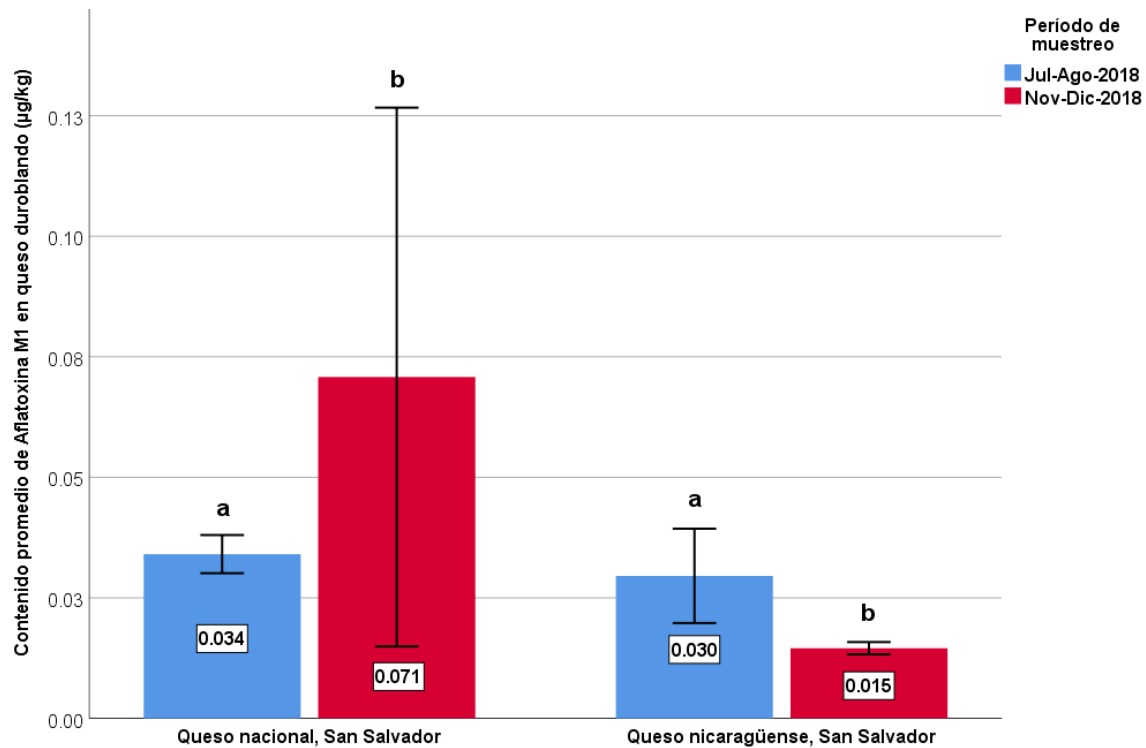


Figura 4. Promedios de AFM1 San Salvador

Los niveles promedio para San Salvador fueron constantes en el primer periodo de muestreo, con una leve diferencia de $0.004 \mu\text{g}/\text{kg}$, para ambas categorías (Nacional-nicaragüense). Al analizar el segundo periodo de muestreo, podemos ver una diferencia significativa en los valores promedio, con un alza para el caso de la categoría Nacional y con datos que superaron los valores de referencia. De manera inversa, para la categoría nicaragüense, donde los valores se mantuvieron bajos, la diferencia entre ambas categorías en el mismo periodo de muestreo fue de $0.056 \mu\text{g}/\text{kg}$. Esta tendencia de diferencias marcadas entre las categorías, es similar a lo ocurrido con las muestras de Chalatenango.

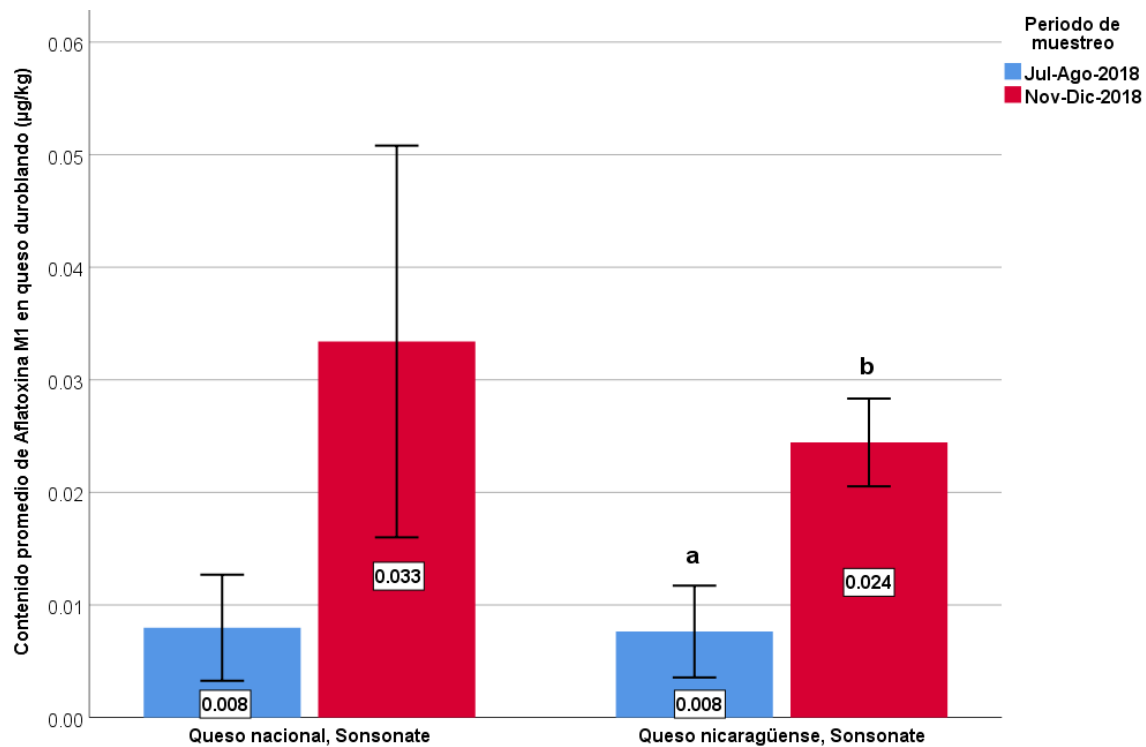


Figura 5. Promedios de AFM1 Sonsonate

Concomitantemente, la tendencia de valores diferenciados entre Periodo de muestreo, se repite para Sonsonate. Para el queso Nacional, existe una clara tendencia a valores más altos para el segundo periodo, con un diferencial de 0.025 µg/kg entre ambos. Caso similar en cronología ocurre para el queso nicaragüense, con un diferencial de 0.016 µg/kg.

4. Discusión

Existe una marcada diferencia en la prevalencia de AFM₁, según el periodo de muestreo, existiendo variaciones considerables entre el primer periodo y el segundo, en al menos tres de las cuatro localidades exploradas, esto ligado al hecho de que los orígenes de los lotes a analizar tuvieron cambios en los tres meses de intervalo entre cada jornada. Si bien es conspicuo que hubo variación entre cada periodo, son aún más notorios las alzas en niveles promedio para los segundos periodos de muestreo de las localidades de San Salvador y Sonsonate que, en el resto de localidades, donde si bien hubo variaciones, no fue tan marcada como en los mencionados anteriormente. Una tendencia similar ocurre en el caso de las categorías por origen, existiendo una diferencia bastante perceptible entre los quesos de origen nacional y nicaragüense, de manera bastante notoria en el caso de la localidad de San Salvador, donde los promedios de las muestras de origen nacional para el segundo periodo, superaron con creces los demás promedios, incluyendo los de las otras localidades estudiadas.

En cuanto a la prevalencia categorizada por Origen, es decir nacional o nicaragüense, la prevalencia es equitativa. En el caso de los Quesos de origen Nacional, los niveles promedio experimentaron un alza en el primer periodo de muestreo solo en el caso de San Miguel, donde el resto de localidades, dicha alza ocurrió en el segundo periodo, de manera significativa para San Salvador y Sonsonate y de manera menos marcada para Chalatenango.

Para el caso de las muestras de origen nicaragüense, los valores promedio obtenidos variaron entre cada periodo y localidad, de manera menos uniforme que en el caso de muestras de origen nacional. De tal forma que, las localidades de Chalatenango y San Salvador,

compartieron el alza en los promedios de AFM₁, se percibieron más notorios para el primer periodo de muestreo, ocurriendo lo contrario en la localidad de Sonsonate, donde el alza tuvo lugar durante el segundo periodo. En el caso de San Miguel, las muestras de origen nicaragüense, obtuvieron valores promedio exactamente iguales para ambos periodos de muestreo.

Estos niveles se encuentran en el rango de los cuantificados en las muestras tomadas en El Salvador, para los estudios de leche fluida [11] donde las localidades a muestrear concurren con las que utilizó este estudio y cuyos resultados son congruentes a los hallazgos de este estudio, al menos para la categoría de muestras nacionales. Si bien San Salvador fue el sitio donde se encontraron los niveles promedio más alto para el segundo periodo de muestreo (Fig. 3), la localidad de San Miguel, sigue teniendo los niveles promedio más alto en las categorías de origen nacional o nicaragüense y para uno de los 2 periodos, siendo esta localidad la que niveles más altos tuvo en los estudios de leche fluida [11,12].

5. Conclusiones

La prevalencia de contaminación de AFM₁ en quesos de origen nacional y nicaragüense, es de carácter constante, encontrándose valores promedio significativos entre cada periodo de muestreo, algunos superando la norma europea de 0.050 µg/kg. Esto indica que, aunque hay variación en los valores promedio en virtud del origen de la muestra, estos pueden variar además en el periodo en que se acceda a estas, encontrando valores agudos entre cada lote. Dado que estudios anteriores en El Salvador sobre leche fluida [11], encontraron valores significativos en localidades similares a las del presente estudio, se comprobó que existe compaginación en cuanto a la contaminación de AFM₁ en queso. Se comprueba entonces que

la cadena de infección que inicia con la AFB₁ en alimento para ganado [11,12] y que luego de ser metabolizada en el hígado de las vacas lecheras [11,15], tiene como destino los derivados lácteos, en este caso los denominados “Duros blandos”, esperando niveles de cuantificación aún más altos, por la naturaleza de la toxina de adherirse a la proteína láctica, o en este caso, Caseína [12, 15,18]. Es un hecho de que los granos y materia prima que se utilizan para exportación reciben un escrutinio bastante asiduo y preciso, es muy recomendable aplicar ese mismo empeño para con tales componentes a utilizar localmente [15,16]. Dado que la contaminación mico-toxicológica es bastante frecuente y evitarlo en su totalidad resulta difícil en alimentos y materia prima, cuantificar estos valores mediante análisis de AFB's y AFM₁ en leche fluida y derivados lácteos, como en quesos dura blando, es de suma importancia para la seguridad alimentaria de la población [16, 17]. Como se ha establecido en estudios previos [11,19] las condiciones climáticas afectan considerablemente la proliferación en contaminación de materia prima por agentes micotoxicológicos [11,12] Estas condiciones están fuera del control de los Agricultores y Productores de compuestos para Alimentos. Sin embargo, las condiciones del almacenamiento y manejo de estos compuestos, tiene una importante repercusión en el alza de toxigenocidad, esto a diferencia de las condiciones climáticas, si está bajo el control de los productores y debe implementarse. Razones como esta, ante un conocimiento prácticamente nulo o escaso por parte de los productores lácteos y niveles en alza, vuelven el monitoreo del presente estudio, de tan gran importancia. [18,19]

6. Reconocimientos

Los autores expresan su agradecimiento a los profesionales en Laboratorio Clínico: Lic, Mario Ernesto Pineda, Licda. Marta Rodríguez de Guzmán, Licda. Karen Alexandra Turcios y Lic. José Emérito Ávila por su valiosa cooperación con el procesamiento y los análisis de las muestras. Agradecen también a Licda. Marcela Doradea, Lic. Deysi Alejandra Escobar, Lic. Josué Noé Monterrosa, Lic. William Montoya, Lic. Samuel Cano, Mae. José Domingo Romero Licda. Nancy Rodríguez de Rugamas e Ing. Juan Escuintla, por su valioso apoyo con la logística para la recolección de muestras.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado completamente por la Universidad Dr. Andrés Bello, a través de fondos específicos para investigación.

7. Referencias

1. Amir Ismail, Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. ISSN: 1040-841X
2. Hamid Reza, Occurrence of Aflatoxin M1 in White cheese samples from Tehran, Iran. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.024>
3. Sezgin Bakirdere, Determination of trace aflatoxin M1, levels in milk and milk products consumed in Turkey by using enzyme-linked immunosorbent assay.
4. Reza Kazemi Darsanaki, Aflatoxin M1 Contamination in Dairy Products. ISSN 2322-326X
5. Aziz A. Fallah, Seasonal variation of Aflatoxin M1 Contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. doi <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.03.024>
6. A.M Fernandes Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing and storage of Minas Frescal cheese <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.010>
7. Amir Rahimirad , Aflatoxin M1 Concentration in Various Dairy Products: Evidence for Biologically Reduced Amount of AFM1 in Yoghurt : PMID: [2592704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2592704/)
8. A.A Meryem, Determination of Aflatoxin M1 Levels in Some Cheese Types Consumed in Erzurum – Turkey 16:S87-S91
9. Ma Jose Barrios, Occurrence of Aflatoxin M1 in Cheeses from the South of Spain P 898-900
10. M.H. Iha, C.B. Barbosa, I.A. Okada, M.W. Trucksess, Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yogurt and cheese, Food Control 29 (2013) 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.058>

11. O.A Peña, R.I Martínez, J.R Hernández Rauda Aflatoxina M1 en leche cruda de vaca: prevalencia de contaminación y su relación con Aflatoxinas totales en alimentos complementarios del ganado. ISBN: 978-99961-65-09-2
12. A. Cruz, R. Martínez, R. Hernández-Rauda, Aflatoxinas y Ocratoxinas totales en maíz (*Zea mays* L.) para autoconsumo: prácticas de preparación y almacenamiento del grano, asociadas a la prevalencia de contaminación. El Salvador, Universidad Doctor Andrés Bello, San Salvador, El Salvador, 2014.
13. S.S. Omar, Aflatoxin M1 levels in raw milk, pasteurized and infant formula, Ital. J. Food Saf. 5 (2016) 3, <http://dx.doi.org/10.4081/ijfs.2016.5788>
14. N. Sohrabi, H. Gharahkoli, A seasonal study for determination of aflatoxin M1 level in dairy products in Iranshahr, Iran, Curr. Med. Mycol. 2 (2016) 27-31, <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.3.27>
15. Rubio R, Short communication: Occurrence of aflatoxin M1 in the Manchego cheese supply chain. DOI: 10.3168/jds.2010-4017
16. Bozidar Udovickil, Overview on the Mycotoxins Incidence in Serbia in the Period 2004–2016 DOI: [10.3390/toxins10070279](https://doi.org/10.3390/toxins10070279)
17. Becker-Algeri TA, Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. doi: 10.1111/1750-3841.13204
18. Rojas-Marín V, Presence of Aflatoxin Carcinogens in Fresh and Mature Cheeses, DOI: 10.4172/2153-2435.1000581
19. M.J. Lombard, Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: What do we know? Ann. Nutr. Metab. 64 (2014) 42–52, <https://doi.org/10.1159/000365126>

20. Yasser Shahbazi, Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M₁ in Iranian traditional cheeses. DOI: [10.1016/j.foodcont.2017.04.021](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.021)
21. Ezgi Özgören, Aflatoxin M₁ contaminations in mouldy cheese, DOI: [10.15567/mljekarstvo.2016.0208](https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2016.0208)
22. NEOGEN Corporation, Instructions of VERATOX[®] for Aflatoxin M₁ quantitative test, NEOGEN Corporation Customer Service, Lansing, Michigan, 2013.
23. NEOGEN Corporation, Serial dilution method for VERATOX[®], NEOGEN Corporation Customer Service, Lansing, Michigan, n.d.
24. Comisión del Codex Alimentarius, Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos, Codex Stan 193-1995, FAO, Roma, Italy, 2015, Available at www.fao.org/input/download/standards/17/CXS_193s_2015.pdf
25. Codex Alimentarius Commission, Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M₁ in milk, Agenda item 15a. CX/FAC 01/20, FAO, Rome, Italy, 2001, Available at <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/Y0474E/y0474e0s.htm>
26. MARN Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Cuatro años continuos de sequía en El Salvador: 2012 – 2015, Dirección General del Observatorio Ambiental, San Salvador, El Salvador, 2016, Available at <http://www.marn.gob.sv/descarga/docuemnto-sequia-meteorologica-edc2016-web-pdf/?wpdmdl=29861>

27. MARN Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Boletín climatológico anual 2015, Dirección General del Observatorio Ambiental, San Salvador, El Salvador, 2016.

8. Apéndices

Apéndice A

Procedimiento para realizar la validación de los métodos de extracción y analítico de la AFM₁ en queso duroblando. (22,23)

1. Preparación de la solución “madre” de AFM₁ (AFM₁ reference solution)
 - 1.1. Del vial de 2 ml de la solución de referencia que contiene 1 µg/ml o 1000 ng/ml, extraer 1 ml con pipeta.
 - 1.2. Verter ese volumen de 1 ml en un matraz volumétrico (balón de aforamiento) de 250 ml y completar hasta la marca con Acetonitrilo grado reactivo.
 - 1.3. Agitar la solución con vortex durante **un minuto**.
 - 1.4. Verter dentro de un frasco de **vidrio ámbar** con boca ancha y rotular, identificando el contenido de la solución en 4 nanogramos/ml y consignando la fecha de elaboración de la solución madre.
 - 1.5. La solución deberá conservarse en frío y dejar que alcance la temperatura ambiente (atemperar), antes de utilizarla para los análisis de cada día.
2. Extraer 1400 µl de la solución madre de AFM₁, verter en un vial o microtubo cónico tipo Eppendorf y agitarlo con vortex por 10 segundos, este volumen será extraído diariamente y servirá para hacer la sobrecarga de las muestras de queso.
3. Cada día, pese dos (2) gramos del pool de quesos (mezcla de nacional y nicaragüense), previamente rallado y colóquelos en un tubo de centrifuga de 50 ml y repita ese procedimiento hasta tener siete (7) tubos de centrifuga de 50 ml, más un tubo adicional con los dos (2) gramos de muestra que no serán sobrecargados, al que se denominará

Muestra sin sobrecarga.

4. Sobrecarga. Del microtubo Eppendorf con la solución madre (4 ng/ml de AFM₁):
 - 4.1. Extraer 300 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del primer tubo de centrifugado de 50 ml. **No agitar el tubo**, rotularlo con la sobrecarga 0.600 µg/kg
 - 4.2. Extraer 250 µl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del segundo tubo de centrifugado de 50 ml. **No agitar el tubo**, rotularlo con la sobrecarga 0.500 µg/kg

- 4.3. Extraer 200 μl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del tercer tubo de centrifugado de 50 ml. **No agitar el tubo**, rotularlo con la sobrecarga 0.400 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 4.4. Extraer 150 μl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del cuarto tubo de centrifugado de 50 ml. **No agitar el tubo**, rotularlo con la sobrecarga 0.300 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 4.5. Extraer 100 μl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del quinto tubo de centrifugado de 50 ml. **No agitar el tubo**, rotularlo con la sobrecarga 0.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 4.6. Extraer 50 μl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del sexto tubo de centrifugado de 50 ml. **No agitar el tubo**, rotularlo con la sobrecarga 0.100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 4.7. Extraer 25 μl y añadirlo justo sobre la muestra de queso del séptimo tubo de centrifugado de 50 ml. **No agitar el tubo**, rotularlo con la sobrecarga 0.050 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 4.8. La muestra de queso del octavo tubo no llevará sobrecarga de AFM₁, y se deberá rotular *Muestra sin sobrecarga*.
5. Después de sobrecargar cada uno de los tubos con las diferentes concentraciones de AFM₁, dejar evaporar el solvente (Acetonitrilo) a temperatura ambiente por 30 minutos, dentro de la cámara de extracción, solo bajando la placa de vidrio, pero **sin activarla**.
6. Transcurridos los 30 minutos y considerando que se ha evaporado el solvente (Acetonitrilo), adicionar 10 ml de Diclorometano al 100%, a cada uno de los siete tubos de 50 ml sobrecargados.
 - 6.1. Adicionar también 10 ml de Diclorometano al 100% a la muestra dentro del tubo denominado *Muestra sin sobrecarga*.
7. Agitar cada uno de los ocho tubos de centrifugado con vortex durante 1 minuto.
8. Mientras se procede con los pasos 4, 5 y 6, llenar hasta el límite funcional la cubeta del baño ultrasónico.
9. Los siete tubos de centrifugado, debidamente rotulados, con las muestras de queso sobrecargada más el tubo con la *Muestra sin sobrecarga (en total 8 tubos)*, deben colocarse dentro del rack del baño ultrasónico, teniendo cuidado de distribuirlos uniformemente, asegurando así la mayor simetría posible en la aplicación del tratamiento de extracción por ultrasonido (frecuencia prefijada de 40 Khz).
10. Fijar la perilla de control de tiempo en 10 minutos, encender el baño ultrasónico y comenzar con el tratamiento de disrupción.

11. Finalizados los 10 minutos, colocar los ocho tubos en un agitador rotatorio y accionarlo durante 15 minutos para hacer la extracción de la Aflatoxina M₁.
12. Finalizados los 15 minutos, trasvasar la solución de los tubos de 50 ml a tubos de vidrio con capacidad de 15 ml (tubos de trasvase).
13. Incubar los tubos a 50°C durante 30 minutos.
14. Centrifugar los tubos de trasvase a 3500 rpm durante 15 minutos, fijando la temperatura del interior del equipo a 10°C.
15. Retire por pipeteo 5 ml del supernadante de Diclorometano y coloque en un tubo de vidrio (tubo de trasvase).
16. Evaporar el Diclorometano hasta secarlo, utilizando un baño de maría (hotplate + beaker + agua), a una temperatura de 60°C, utilice flujo de aire impelido por bombeo eléctrico para acelerar la evaporación.
17. El residuo grasoso u oleoso que queda de la evaporación, vuelva a disolverlo en 0.5 ml de Metanol al 100% y 0.5 ml de agua destilada, a continuación, añada 4 ml de Hexanos al 100%.
18. Agitar cada tubo durante 1 minuto.
19. Vuelva a centrifugar los tubos con la solución de Metanol+Agua+n-Hexanos a 3500 rpm durante 10 minutos, a una temperatura de 10°C.
20. Remover completamente la capa superior que corresponde a los Hexanos, utilizando pipeta tipo Pasteur.
21. Tome una alícuota de 0.5 ml de la capa que quedó después de remover los Hexanos de cada tubo y que corresponde a la mezcla de Metanol+Agua y disuélvala en 2 ml del diluyente de la muestra que viene en cada kit de Aflatoxina M₁.
22. Agitar nuevamente cada tubo durante 1 minuto.
23. Extraiga de cada tubo, un volumen de 100 µl de la mezcla reconstituida (Metanol+Agua+Diluyente de la Muestra) y ensaye directamente vertiéndolo en cada pocillo del kit Veratox® de Aflatoxina M₁.

24. Validación:

24.1. Primer día

- 24.1.1. **Cuatro** pocillos del kit de AFM₁ (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.1.2. Otros **cuatro** pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,
- 24.1.3. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.1.4. Otros **cuatro** con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.1.5. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,
- 24.1.6. Otros **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.1.7. A **cuatro** pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.
- 24.1.8. Los últimos **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar
- 24.1.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM₁ (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.
- 24.1.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM₁.

24.2. Segundo día

- 24.2.1. **Cuatro** pocillos del kit de AFM₁ (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.2.2. Otros **cuatro** pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,

- 24.2.3. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.2.4. Otros **cuatro** con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.2.5. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,
- 24.2.6. Otros **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.2.7. A **cuatro** pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.
- 24.2.8. Los últimos **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar
- 24.2.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM₁ (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.
- 24.2.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM₁.

24.3. Tercer día

- 24.3.1. **Cuatro** pocillos del kit de AFM₁ (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.3.2. Otros **cuatro** pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,
- 24.3.3. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.3.4. Otros **cuatro** con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.3.5. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,

- 24.3.6. Otros **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.3.7. A **cuatro** pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.
- 24.3.8. Los últimos **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar
- 24.3.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM₁ (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.
- 24.3.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM₁.

24.4. Cuarto y último día

- 24.4.1. **Cuatro** pocillos del kit de AFM₁ (4) se les pipeteará 100 µl de la mezcla (Metanol+Agua+Diluyente) sobrecargada con 0.600 µg/kg,
- 24.4.2. Otros **cuatro** pocillos con 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.500 µg/kg,
- 24.4.3. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.400 µg/kg,
- 24.4.4. Otros **cuatro** con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.300 µg/kg,
- 24.4.5. **Cuatro** más con 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.200 µg/kg,
- 24.4.6. Otros **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sobrecargada con 0.100 µg/kg
- 24.4.7. A **cuatro** pocillos se les pipeteará 100 µl cada uno de la mezcla sobrecargada con 0.050 µg/kg.
- 24.4.8. Los últimos **cuatro** pocillos del kit se les pipeteará 100 µl de la mezcla sin sobrecargar

24.4.9. Se ensayarán los 32 micropocillos sobrecargados junto con los controles de 0, 5, 15, 30, 60 y 100 ppt de AFM₁ (un pocillo por control), completando así los 38 micropocillos del kit.

24.4.10. Registrar las densidades ópticas y convertir a valores de concentración de AFM₁.

En total, para la prueba de validación se necesitarán:

- I. Cuatro libras de queso duroblando, comprado durante la víspera, procesadas (ralladas) el mismo día, pero por separado y almacenadas en frío hasta aplicarles el tratamiento de extracción y de análisis.
- II. Cuatro kits completos de Aflatoxina M₁ más uno para compensar pérdidas por cualquier fallo en la prueba de validación.
- III. 250 ml de solución madre de AFM₁, a una concentración de 4 nanogramos/ml.
- IV. Sobrecargar las muestras de queso diariamente, extrayendo los volúmenes correspondientes de la alícuota de Solución Madre de AFM₁ (4 ng/ml), vertida en un microtubo Eppendorf, correspondientes a las concentraciones finales:
 - a. 300 µl para alcanzar la sobrecarga de 0.600 µg/kg,
 - b. 250 µl para llegar a la sobrecarga de 0.500 µg/kg,
 - c. 200 µl para lograr la sobrecarga de 0.400 µg/kg,
 - d. 150 µl para obtener la sobrecarga de 0.300 µg/kg,
 - e. 100 µl para conseguir la sobrecarga de 0.200 µg/kg,
 - f. 50 µl para alcanzar la sobrecarga de 0.100 µg/kg,
 - g. 25 µl para tener la sobrecarga de 0.050 µg/kg.
- V. Los volúmenes residuales de cada microtubo con la solución madre, descartarlos al final del día de uso

2018

Aflatoxina M₁ en queso duro blando, comercializado en centros minoristas municipales en cuatro localidades de El Salvador



Universidad Doctor Andrés Bello
Dirección Nacional de Investigación
y Proyección Social.
Área: Salud