

Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM₁ en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México

Total aflatoxins in cows feed and AFM₁ in milk in dairy herds from Jalisco State, Mexico

Waldina Reyes Velázquez^a, Severiano Patricio Martínez^a, Víctor Hugo Isaías Espinosa^a, Martha Adriana Nathal Vera^a, Ernesto De Lucas Palacios^a, Federico Rojo^a

RESUMEN

El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas por animales productores de leche representa un riesgo potencial a la salud pública, particularmente en la población infantil, debido a la eliminación de aflatoxina M₁ (AFM₁) en leche. El objetivo del estudio fue determinar los niveles de aflatoxinas totales (AFT) en alimento y AFM₁ en leche cruda en 40 hatos lecheros del estado de Jalisco. Se obtuvieron muestras de raciones de bovinos (n=40) y se analizó AFT mediante ELISA de tipo competitivo directo. Las muestras de leche (n=40) fueron analizadas para AFM₁ empleando ELISA de inhibición directa. Los resultados mostraron contaminación con AFT en el 92.5 % de las raciones, con niveles entre 4.82 a 24.89 µg Kg⁻¹ (media = 10.84 ± 5.84 µg Kg⁻¹). Del total de las muestras contaminadas, 9.3 % contenían niveles superiores al valor permitido por las Normas Oficiales de Mexicanas (20 µg Kg⁻¹). AFM₁ se presentó en el 80 % de las muestras de leche, los niveles detectados fluctuaron de 0.006 a 0.065 µg L⁻¹ (media = 0.023 ± 0.016 µg L⁻¹). Ninguna de las muestras sobrepasó el nivel permitido por la regulación (0.5 µg L⁻¹). Se concluye que en la región en estudio, se encontró contaminación con AFT en las raciones, si bien los niveles de AFM₁ en leche no representan un riesgo a la salud, es importante continuar realizando estudios considerando diferentes sistemas de explotación animal, épocas del año y áreas geográficas para evaluar los niveles de contaminación en una región más amplia de México.

PALABRAS CLAVE: Aflatoxinas totales, Aflatoxina M₁, Bovinos leche.

ABSTRACT

Consumption of aflatoxin-contaminated feed in dairy cows represents a potential risk for public health, particularly in children, due to the resulting elimination of aflatoxin M₁ (AFM₁) in milk. The aim of this study was done to determine total aflatoxins levels (AFT) in feed and aflatoxin M₁ (AFM₁) levels in raw milk from 40 dairy herds in Jalisco state, Mexico. AFT content in feed samples (n=40) was analyzed by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Raw milk samples (n=40) were analyzed for the presence of aflatoxin M₁ (AFM₁) using direct inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). AFT residues were detected in 92.5 % of the feed samples and ranged from 4.82 to 24.89 µg Kg⁻¹ (mean = 10.84 ± 5.84 µg kg⁻¹). Three samples (9.3 %) were above the maximum level allowed by Mexican federal law (20 µg Kg⁻¹). AFM₁ residues in milk were detected in 80 % of samples that ranged from 0.006 to 0.065 µg L⁻¹ (mean = 0.023 ± 0.016 µg L⁻¹), and were mostly below maximum permitted levels (0.5 µg L⁻¹). Produced feed in this region exhibited AFT contamination, although AFM₁ levels found in the raw milk do not represent health risk. Such widespread AFT contamination highlights the need for extensive research including different animal production systems, geographical areas and seasons to control and prevent AFT contamination in feeds and AFM₁ contamination in milk throughout Mexico.

KEY WORDS: Total aflatoxins, Aflatoxin M₁, Dairy cows, Mexico.

Las aflatoxinas (AFT) son sustancias tóxicas para la salud humana y animal que ocasionan cirrosis y daño agudo en hígado, inducción de tumor con

In human and animals, aflatoxins (AFT) can cause cirrhosis and acute liver damage, as well as induce tumors through their immunosuppressive,

Recibido el 28 de febrero de 2008. Aceptado para su publicación el 19 de septiembre de 2008.

^a Laboratorio de Micotoxicología (Departamento de Salud Pública). Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad de Guadalajara (UDG). Km 15.5 Carretera a Nogales, Predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco. Teléfonos: (33) 36820273. Fax: (33) waldinar@cucba.udg.mx. Correspondencia al primer autor.

efectos inmunosupresivos, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos⁽¹⁾. Las AFT se encuentran como contaminantes naturales de los alimentos siendo producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad en campo, almacenamiento y durante el procesamiento de los alimentos favorecen su desarrollo. Se han identificado 18 tipos de AFT siendo las más frecuentes en los alimentos: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ y AFM₂⁽²⁾. Aflatoxina M₁ (AFM₁) es la forma hidroxilada de AFB₁, secretada en la leche y orina de animales que consumen alimentos contaminados con AFB₁⁽³⁾. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer incluye a las AFB₁ y AFM₁ como compuestos carcinogénicos de grupo 1A⁽⁴⁾. Aunque la AFM₁ es menos potente que AFB₁, el alto consumo de leche y sus derivados incrementa el riesgo de exposición a este tóxico en la población.

La Comunidad Europea establece que la concentración límite de AFB₁ en alimento destinado para animales y AFM₁ en leche no debe ser superior a 10 µg kg⁻¹ y 0.05 µg L⁻¹, respectivamente (Comunidad Europea 466/2001). En México, la NOM-188-SSA1-2002 establece el límite máximo permisible de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal en 20 µg kg⁻¹, así como los lineamientos y requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos. Respecto al nivel de AFM₁ en leche, la NOM-184-SSA1-2002 especifica que el máximo permitido es de 0.5 µg L⁻¹.

Estudios recientes realizados en México por Flores *et al*⁽⁵⁾ demuestran la contaminación con AFB₁ de granos y alimentos destinados a la producción animal. Sus resultados indican que los valores máximos de AFB₁ fueron encontrados en el gluten de maíz en un rango de 8-77 µg kg⁻¹ (promedio 31.42 µg kg⁻¹). Similar presentación fue observada en muestras de alimento terminado con un rango entre 5-61 µg kg⁻¹ de AFB₁ (promedio 15.32 µg kg⁻¹). El nivel promedio de AFB₁ para muestras de maíz y sorgo fue de 5.78 y 9.55 µg kg⁻¹, respectivamente. En México, existen escasos reportes sobre los niveles de AFM₁ en leche y,

mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects⁽¹⁾. In foods, aflatoxins are natural contaminants produced by the *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* when temperature and humidity conditions in the field, during storage and/or processing are propitious. Eighteen types of AFT have been identified, and AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ and AFM₂ are the most frequent⁽²⁾. Aflatoxin M₁ (AFM₁) is the hydroxylated form of AFB₁ and is secreted in the milk and urine of animals that consume feed contaminated with AFB₁⁽³⁾. The International Agency for Research on Cancer classifies AFB₁ and AFM₁ as 1A carcinogenic compounds⁽⁴⁾. Although AFM₁ is less potent than AFB₁, high intake of milk and its derivatives increases exposure risk among human consumers.

The European Union has established an AFB₁ concentration limit in animal feeds of no higher than 10 µg kg⁻¹, and an AFM₁ concentration limit in milk of no higher than 0.05 µg L⁻¹ (European Commission 466/2001). In Mexico, the law NOM-188-SSA1-2002 establishes a maximum allowable aflatoxin limit in cereals for human or animal consumption of 20 µg kg⁻¹, as well as stating sanitation requirements for product transport and storage. The law NOM-184-SSA1-2002 specifies maximum allowable AFM₁ levels in milk to be 0.5 µg L⁻¹, and the regulation NMX-F-712-COFOCALEC-2005 states that AFM₁ levels must be determined using reverse-phase high pressure liquid chromatography with a fluorescence detector (RP-HPLC-FLD).

In a recent study in Mexico, Flores *et al*⁽⁵⁾ reported AFB₁ contamination in grain and feeds for animal production. In corn gluten the range of maximum AFB₁ values was 8-77 µg kg⁻¹ (average = 31.42 µg kg⁻¹), in finished feed it was 5-61 µg kg⁻¹ (average = 15.32 µg kg⁻¹), and in corn and sorghum samples it was 5.78 and 9.55 µg kg⁻¹, respectively. Milk is widely consumed in Mexico and used in myriad derivative forms, yet very little data exist on AFM₁ levels in milk in Mexico.

The present study objective was to determine AFT levels in cow feeds and AFM₁ levels in

adicionalmente, la normativa vigente NMX-F-712-COFOCALEC-2005 especifica la metodología necesaria para la determinación de AFM₁ por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa con detector de fluorescencia (RP-HPLC-FLD) dando, por tanto, relevancia y antecedentes que sustentan la necesidad de evaluar la contaminación por AFM₁.

El objetivo del presente estudio fue determinar los niveles de AFT en raciones de bovinos y AFM₁ en leche cruda de los principales municipios productores de leche de la región de los Altos y Ciénega, Jalisco, México. Se recolectaron 40 muestras de raciones para bovinos y 40 de leche cruda durante el período de mayor producción anual de leche (septiembre-octubre 2007). Los establos seleccionados correspondieron a los municipios con mayor producción de leche de los Altos (Acatic, Jalostotitlán, San Juan de los Lagos, Tepatitlán, Valle de Guadalupe y Zapotlanejo) y Ciénega (Ocotlán, Tototlán), Jalisco, los cuales se caracterizaron por disponer de ordeña mecánica y tanque enfriador. La recolección de la leche (2 L/establo) se realizó directamente de la válvula principal del tanque enfriador. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis, siendo el mismo en un plazo no mayor a 72 h. Así mismo, en cada establo se determinó la contaminación por AFT tomando un mínimo de 30 muestras elementales (100 g cada una) de diferentes puntos dentro del comedero, las cuales fueron integradas en una muestra global (3 kg) y conservadas a 4 °C hasta su análisis.

La cuantificación de las AFT presentes en el alimento fue realizada mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo-directo (Agraquant, Romer Labs®). Las muestras globales de alimento fueron reducidas de manera representativa por la técnica de cuarteo. A partir de 20 g de muestra se realizó la extracción de AFT con 100 mL de metanol:agua (70:30 v v⁻¹). De manera independiente, se agregaron 200 µL del conjugado a cada pocillo conteniendo los estándares y las muestras (100 µL) previamente filtradas. Luego de mezclar, se transfirieron 100 µL a los pocillos con los anticuerpos e incubaron durante 15 min. Luego de eliminar el contenido, los pocillos

raw milk in eight municipalities in the milk producing regions of Los Altos and Ciénega, Jalisco state, Mexico.

A total of 40 feed ration samples and 40 raw milk samples were collected during the period of highest annual milk production (September – October 2007). Dairy farms were selected in the main milk producing municipalities in the regions of Los Altos (Acatic, Jalostotitlán, San Juan de los Lagos, Tepatitlán, Valle de Guadalupe and Zapotlanejo) and Ciénega (Ocotlán, Tototlán) in the State of Jalisco. All sampled farms used mechanical milking and a cooling tank. Two liters of milk were collected at each farm directly from the main valve of the cooling tank. Samples were kept refrigerated until analysis, which was done within no more than 72 h of collection. At each farm, 30 feed samples (100 g each) were taken at different points in the trough, pooled into an overall sample (3 kg) and stored at 4 °C until analysis.

Quantification of AFT in the feeds was done by direct competitive ELISA (Agraquant, Romer Labs®). The overall feed samples were reduced in size by quartering. Using 20 g of sample, AFT extraction was done with 100 mL methanol:water (70:30 v v⁻¹). Independently, 200 µL of conjugate mixture were added to each well containing standards and previously filtered samples (100 µL). After mixing, 100 µL were transferred to wells containing antibodies and incubated for 15 min. Then, the content was eliminated, and the wells were washed five times with deionized water. Any excess of water was discarded and the wells dried. Substrate (100 µL) was then added to each well, incubated for 5 min and the reaction stopped by adding 100 µL stop solution. Optic density (OD) of results was read with an ELISA reader (Biotek 800) using a 450 nm filter. Concentrations were calculated by extrapolating the OD with the respective calibration curve.

Concentration of AFM₁ in milk was determined following two methodologies: direct inhibition ELISA (Agraquant M₁, Romer Labs®); and RP-HPLC-FLD using immunoaffinity columns (Aflastar M₁, Romer Labs®) and following protocol

se lavaron con agua desionizada (cinco veces). Se descartó el exceso de agua y se secaron los pocillos. Se adicionaron 100 μL de sustrato a cada pocillo y luego se incubó durante 5 min deteniendo la reacción por adición de 100 μL de la solución stop. Los resultados de densidad óptica (DO) se obtuvieron en un lector de Elisa (Biotek 800) utilizando el filtro de 450 nm. Las concentraciones fueron calculadas por extrapolación de la DO con la respectiva curva de calibración.

Para determinar la concentración de AFM_1 en leche se emplearon dos metodologías. En primera instancia se utilizó la técnica de ELISA de inhibición directa (Agraquant M_1 , Romer Labs®) y se confirmó mediante RP-HPLC-FLD empleando columnas de inmunoafinidad (Aflastar M_1 , Romer Labs®) según el protocolo AOAC2000.08.

Para la detección y cuantificación de AFM_1 por ELISA, la leche se homogenizó manualmente a 37 °C en baño María; posteriormente se centrifugaron 50 mL durante 10 min a 3000 xg previo enfriamiento de la muestra a 4 °C durante 30 min. Se procedió a filtrar la leche para separar la grasa. Posteriormente, se adicionaron a los pocillos 100 μL de los estándares y de las muestras de leche se incubaron en agitación a 100 rpm durante 60 min a temperatura ambiente. Después de lavar (tres veces), se adicionaron 50 μL del conjugado a cada pocillo e incubó nuevamente en agitación a 100 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de descartar el contenido, se lavaron nuevamente los pocillos y se agregaron 100 μL de solución de sustrato en cada pocillo e incubó en oscuridad durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 μL de la solución stop y se procedió a determinar la densidad óptica (OD) en un lector de Elisa (Biotek 800) utilizando los filtros de 450 y 630 nm para lectura y referencia, respectivamente. Las concentraciones fueron calculadas por extrapolación de la DO con la respectiva curva de calibración.

Para la confirmación de los niveles de AFM_1 en leche se procedió a calentar la leche a 37 °C para separar la grasa mediante centrifugación a 2000 xg. La fase acuosa se filtró en papel Whatman N°

AOAC2000.08. For the ELISA, the milk was manually homogenized at 37 °C in a water bath, 50 mL centrifuged at 3000 xg for 10 min and then cooled to 4 °C for 30 min. The milk was filtered to remove the fat. For the analysis, 100 μL each of the standards and the milk samples were placed in wells, and incubated under agitation at 100 rpm for 60 min at room temperature. After washing three times, 50 μL of conjugate mixture were added to each well, and incubated under agitation at 100 rpm for 30 min at room temperature. The contents were discarded, and the wells were washed again. Substrate solution (100 μL) was added to each well, and incubated in darkness for 40 min at room temperature. After incubation, 100 μL stop solution was added and OD was determined in an ELISA reader (Biotek 800) with a 450 nm reading filter and a 630 nm reference filter. Concentrations were calculated by extrapolating the OD with the respective calibration curve.

Confirmation of AFM_1 levels with RP-HPLC-FLD was done by first heating the milk to 37 °C and separating the fat by centrifuging at 2000 xg. The aqueous phase was filtered through Whatman No. 2 filter paper and 50 mL were transferred to the immunoaffinity column reservoir (Aflastar M_1 , Romer Labs). The column was washed with water and dried with nitrogen. The AFM_1 was eluted with 4 mL acetonitrile and evaporated under a nitrogen flow at 45 °C. The resulting residue was resuspended in 200 mL water:acetonitrile (75:25 v v⁻¹), and a 50 μL aliquot injected into the RP-HPLC-FLD system. This system consisted of a pump with a programmable fluorescence detector (Agilent 1100, Palo Alto, CA, USA) connected to a work station (Agilent ChemStation Rev. A.10.01). Chromatographic separation was done in a reverse-phase column (C18, 250 mm x 4.6 mm., 5 μm) (Beckman Coulter, Ultrasphere) connected to a pre-column (C18, 20 mm x 4.6 mm., 5 μm , Phenomenex). The mobile phase was water:acetonitrile (3:1) at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹, the excitation and emission longitudes were 365 nm and 435 nm respectively. A six-point calibration curve (0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.4, 0.8 $\mu\text{g L}^{-1}$) was built using pure AFM_1 solutions (Biopure AFM_1 , Romer Labs®). Concentrations were

2 y se transfirieron 50 mL al reservorio de la columna de inmunoafinidad (Aflastar M₁, Romer Labs). La columna fue lavada con agua y secada bajo nitrógeno. AFM₁ fue eluida con acetonitrilo (4 mL) y evaporada a sequedad bajo flujo de nitrógeno a 45 °C. El residuo fue resuspendido en 200 µL de agua:acetonitrilo (75:25 vol vol⁻¹). Una alícuota de 50 µL del extracto fue inyectada en el sistema RP-HPLC-FLD. El sistema consistió de una bomba Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) y un detector de fluorescencia programable AGILENT 1100, conectados a una estación de trabajo Agilent (ChemStation Rev. A.10.01). Las separaciones cromatográficas fueron realizadas en una columna de fase reversa (C18, 250 mm x 4.6 mm., 5 µm) (Beckman Coulter, Ultrasphere), conectada a una precolumna (C18, 20 mm x 4.6 mm., 5 µm, Phenomenex). La fase móvil empleada fue agua:acetonitrilo (3:1), a un flujo de 0.8 mL min⁻¹. Las longitudes de excitación y emisión fueron 365 y 435 nm, respectivamente. Se construyó una curva de calibración con seis puntos (0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.4, 0.8 µg L⁻¹) utilizando soluciones puras de AFM₁ (Biopure AFM₁, Romer Labs®). Las concentraciones fueron obtenidas por extrapolación del área debajo de la curva. Los resultados se presentan mediante parámetros estadísticos descriptivos para cada municipio de estudio.

calculated by extrapolation from the area below the curve and results presented using descriptive statistical parameters for each studied municipality.

Initial monitoring had positive total AFT (AFB₁+ AFB₂+ AFG₁+ AFG₂) results in 95.2 % of the samples taken in the eight studied municipalities (Table 1). AFT levels ranged from 4.82 to 24.89 µg kg⁻¹ (mean = 10.84 ± 5.84 µg kg⁻¹), with the highest contamination levels in feed samples from Tepatitlán municipality. Three of the forty samples (9.3 %) contained AFT levels above than that allowed in Mexico.

Sampling was done systematically, however, in a number of cases samples had to be collected from the corral or at the production plant. In addition, some producers used totally mixed rations whereas others administered the dairy concentrate while milking. These factors contributed to variability in AFT's and AFM₁ levels in the samples. Feed manufacture, feed ration administration, degree of mechanization and aspects related to milking area sanitation were extremely variable between farms and prevented them from being grouped descriptively. The farms were sampled in the August-October trimester, which is the period of maximum milk production in Mexico⁽⁶⁾.

Cuadro 1. Presencia natural de aflatoxinas en raciones de bovinos y AFM₁ leche cruda en los establos del estado de Jalisco

Table 1. Natural aflatoxins incidence in cow feed and AFM₁ content in raw milk from eight municipalities in Jalisco State, Mexico

Municipalities	Total AFT's (µg kg ⁻¹)				AFM ₁ (µg L ⁻¹)			
	(%)	Range	Average	± SD	(%)	Range	Average	± SD
Acatic	100	5.83 - 13.11	10.15	2.88	100	0.014 – 0.065	0.035	0.020
Jalostitlán	60	4.95 - 9.91	6.90	2.65	100	0.015 – 0.055	0.030	0.017
Ocotlán	100	6.61 - 8.30	7.57	0.68	60	0.006 – 0.030	0.016	0.013
San Juan	80	4.82 - 13.95	8.23	4.04	80	0.017– 0.061	0.031	0.021
Tepatitlán	100	17.99 - 24.90	22.04	2.84	40	0.006 – 0.009	0.008	0.002
Tototlán	100	4.89 - 7.22	5.99	1.00	60	0.009 – 0.012	0.010	0.002
Valle de Guadalupe	100	5.99 - 18.35	12.89	5.53	100	0.006– 0.027	0.014	0.009
Zapotlanejo	100	6.40 - 17.13	10.85	4.30	100	0.010 – 0.046	0.027	0.014

AFM₁ quantification limit = 0.005 µg L⁻¹. AFT quantification limit = 4 µg kg⁻¹. SD=standard deviation.

Los resultados de las muestras positivas para AFT en la raciones de bovinos de los ocho municipios se presentan en el Cuadro 1. El monitoreo inicial sobre el alimento de los establos productores de la región de los Altos y Ciénega (Jalisco) permitió detectar aflatoxinas totales ($AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$) en el 92.5 % de las raciones. Los niveles fueron de $4.82 - 24.89 \mu\text{g kg}^{-1}$ (media = $10.84 \pm 5.84 \mu\text{g kg}^{-1}$). La mayor contaminación por aflatoxinas en las muestras de alimento recolectadas se presentó en el municipio de Tepatitlán. Del total de muestras analizadas para AFT, 3/40 (9.3 %) presentaron niveles superiores al permitido por la legislación en México.

Si bien se empleó un método de muestreo sistemático para recolectar las raciones en cada establo, fue necesario en numerosas ocasiones obtener la muestra global directamente del corral o en su defecto en la planta de producción. Algunos productores empleaban raciones totalmente mezcladas (RTM) mientras que otros administraban el concentrado lechero al momento de la ordeña. Estos factores contribuyeron a la variabilidad de los niveles de AFT y AFM_1 . La manufactura y administración de la ración, el grado de tecnificación y aspectos relacionados con la higiene de la sala de ordeña presentó innumerables variantes entre los establos, que impiden agrupar de manera descriptiva los mismos. Estos establos fueron muestreados durante el trimestre comprendido de agosto-octubre, periodo en el que se alcanza el pico máximo de producción de leche reportado en el territorio de México⁽⁶⁾.

Los estudios realizados por Buccio *et al*⁽⁷⁾ indican que la contaminación del maíz con aflatoxina en México se asocia principalmente con el almacenamiento y no en el cultivo. Otros estudios⁽⁸⁾ relacionan las condiciones ambientales que favorecen la síntesis de aflatoxinas en etapas pre-cosecha. Se destacan la prevalencia de altas temperaturas y periodos de sequía durante el desarrollo del cultivar. Durante el almacenamiento se destaca el daño causado por roedores e insectos que afectan la integridad de los granos y tejidos, favoreciendo la colonización y desarrollo de especies potencialmente productoras de aflatoxinas⁽⁹⁾. En condiciones

In Mexico, AFT contamination in corn is mainly associated with storage and not with cultivation⁽⁷⁾. Environmental conditions are also reported to favor pre-harvest AFT synthesis, particularly high temperatures and drought conditions during crop development⁽⁸⁾. Rodent and insect damage experienced by grain during storage can also affect grain and tissue integrity, favoring colonization and development of AFT-producing microorganisms⁽⁹⁾. Sub-standard storage conditions, including high temperature, high humidity and gas tension, can also promote AFT synthesis and accumulation⁽⁷⁾. The farms studied in the Los Altos and Cienega regions are generally not highly mechanized and receive little technical assistance, meaning feed manufacture and storage in these farms may favor mycotoxin (AFT, AFB_1) contamination.

In terms of AFM_1 contamination, 80 % of the samples had levels between 0.006 a $0.065 \mu\text{g L}^{-1}$ milk (mean = $0.023 \pm 0.016 \mu\text{g L}^{-1}$), which are below the maximum permitted level ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) in Mexico. As average AFM_1 concentration increased by municipality, the results were more variable (Table 1). Only three samples (9.4 %) were above the $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ maximum level allowed by the European Union. AFM_1 levels vary widely in different countries due to variations in feed systems, animals, environmental conditions and analytical procedures⁽¹⁰⁾. For example, in Brazil^(11,12) high AFM_1 incidences were reported (79.9 and 80 %, respectively), while AFM_1 levels in milk samples taken in the province of Leon, Spain, contained 3.3 %, with average levels of $20.5 \pm 5.0 \text{ ng L}^{-1}$ (ELISA) and $17.3 \pm 3.1 \text{ ng L}^{-1}$ (HPLC)⁽¹³⁾. In Korea, Kim *et al*⁽¹⁴⁾ reported AFM_1 incidence is 55.7 %, which is similar to European countries such as Portugal⁽¹⁵⁾. The present results are comparable to AFM_1 levels reported in Europe. Finally, AFM_1 levels may also be influenced by milk production, with greater AFM_1 elimination in highly productive cows *versus* low production cows⁽¹⁶⁾.

The aflatoxin contamination in feed and aflatoxin M_1 contamination in raw milk observed here are natural. Most of the detected AFM_1 levels were below maximum levels permitted by Mexican law,

deficientes de almacenamiento que incluyen temperatura, humedad y tensión de gases pudiera ocurrir la síntesis y acumulación de aflatoxinas⁽⁷⁾. Debido a que los establos estudiados de la región de los Altos y Ciénega (Jalisco) cuentan con poca tecnificación y asesoramiento, las prácticas de manufactura y almacenamiento de los alimentos podrían favorecer la contaminación por micotoxinas (AFT, AFB₁).

Respecto a la contaminación con AFM₁, el 80 % de las muestras analizadas presentaron niveles de 0.006 a 0.065 µg L⁻¹ de leche (media 0.023 ± 0.016 µg L⁻¹), todos por debajo del nivel máximo permitido (0.5 µg L⁻¹). Se observó que a medida que se incrementó la concentración promedio de AFM₁ en los municipios los resultados mostraron mayor variabilidad (Cuadro 1). Sólo tres muestras (9.4 %) estuvieron sobre el nivel permitido por la Comunidad Europea (0.05 µg L⁻¹).

Reportes sobre los niveles de AFM₁ detectados en otros países muestran amplias diferencias, debido a los sistemas de alimentación, a factores propios de los animales y condiciones ambientales, así como por los procedimientos analíticos utilizados⁽¹⁰⁾. En Brasil^(11,12), encontraron alta incidencia de AFM₁ (79.9 y 80 %, respectivamente), en contraste con otro estudio⁽¹³⁾ en donde reportaron una incidencia de AFM₁ del 3.3 % en muestras de leche obtenida de establos de la provincia de León, España. Los niveles promedios fueron de 20.5 ± 5.0 ng L⁻¹ (Elisa) y 17.3 ± 3.1 ng L⁻¹ (HPLC). En Korea⁽¹⁴⁾ encontraron una incidencia de AFM₁ del 55.7 %, similar a la reportada en otros países europeos como Portugal⁽¹⁵⁾. Los resultados del presente estudio son comparables a los reportados en países europeos. Por otra parte, el estudio de Masoero *et al*⁽¹⁶⁾ sugiere que la presencia de AFM₁ está influenciada por la producción de leche, encontrando mayor eliminación de AFM₁ en vacas altas productoras comparativamente con las de baja producción.

Se concluye que existió contaminación natural con aflatoxinas en las raciones de bovinos productores de leche y de aflatoxina M₁ en leche cruda. Todos los niveles detectados de AFM₁ fueron inferiores al límite máximo permitido por la Norma Oficial

meaning the product is apt for consumption. Nonetheless, further research is needed to evaluate aflatoxin incidence in different livestock systems, producing regions and seasons. This is required to ensure animal and consumer health by preventing and controlling aflatoxin presence in feeds for milk-producing animals.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Universidad de Guadalajara (Project P3e No. 70067) through the Public Health Department, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, UDG (2007).

End of english version

Mexicana, indicando la aptitud para consumo de este producto. No obstante, es necesario realizar estudios que permitan evaluar la incidencia de aflatoxinas en diferentes sistemas de explotación pecuaria, regiones productoras y épocas del año, a fin de proteger la salud animal y del consumidor mediante estrategias de prevención y control de la presencia de aflatoxinas en alimentos para consumo de animales productores de leche.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con el apoyo de la Universidad de Guadalajara a través del Proyecto P3e No. 70067, del Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, UDG (2007).

LITERATURA CITADA

1. Deshpande SS. Fungal toxins. In: Deshpande SS editor. Handbook of food toxicology. New York: Marcel Decker; 2002:387-456.

2. Klich MA, Mullaney EJ, Daly CB, Cary JW. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;(53):605-609.
3. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Review. *Toxicology* 2001;(167):101-134.
4. IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 2002;82.
5. Flores OC, Portilla L, Medrano J. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Tec Pecu Méx* 2006;44(2):247-256.
6. SIAP – SAGARPA - DIM BOL 04-07. Boletín de leche. ISSN 1405-681X. 2007.
7. Bucio-Villalobos CM, Guzmán-de-Peña D, Peña-Cabriaes JJ. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, Mexico. *Rev Iberoam Micol* 2001;(18):83-87.
8. Widstrom NW, McMillan WW, Beaver RW, Wilson DM. Weather associated changes in aflatoxin contamination of preharvest maize. *J Prod Agric* 1990;(3):196-199.
9. Fortnum BA. Effect of environment on aflatoxin development in preharvest maize. En: Zuber MS, Lillehoj EB, Renfro BL editors. *Aflatoxin in Maize: Proceed Workshop*. Mexico, CIMMYT. 1987:145-151.
10. Galvano F, Galofaro V, Galvano G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: A Worldwide Review. *J Food Protect* 1996;(59):1079-1090.
11. Garrido NS, Iha MH, Santos OMR, Duarte FRM. Occurrence of aflatoxins M (1) and M (2) in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit Contam* 2003;(20):70-73.
12. Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soares CR, Velosa T. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk consumed in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, August 1998 to April 1999. *Ciênc Tecnol Aliment, Campinas* 1999;(19):420-423.
13. Rodríguez Velasco ML, Calonge Delso MM, Ordoñez Escudero D. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw cow's milk. *Food Addit Contam* 2003;(20):276-280.
14. Kim EK, Shon DY, Ryu D, Park JW, Hwang HJ, Kim YB. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit Contam* 2000;(17):59-64.
15. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M₁ in raw and ultrahigh temperatura – treated milk commercialized. *Food Addit Contam* 2000;(17):871-874.
16. Masoero F, Galloa A, Moschinia M, Pivaa G, Diaza D. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal* 2007;(1):1344-1350.