



Contaminación de alimento comercial seco para perro por *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en Aguascalientes, México



Lizbeth Martínez-Martínez ^a

Arturo Gerardo Valdivia-Flores ^{a*}

Teódulo Quezada-Tristán ^a

Alma Lilián Guerrero-Barrera ^b

Erika Janet Rangel-Muñoz ^a

Karla Isela Arroyo Zúñiga ^a

Fernanda Álvarez-Días ^a

Marcelo Lisandro Signorini-Porchietto ^c

^a Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad 940, Col Cd. Universitaria, 20131, Aguascalientes, Ags, México.

^b Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas. México.

^c Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Rafaela– Santa Fe, Argentina.

* Autor de correspondencia: avaldiv@correo.uaa.mx; gerardo.valdivia@edu.uaa.mx

Resumen:

El alimento comercial seco (ACS) para perro es una ración integral completamente mezclada y troquelada con calor y presión para darle forma de croqueta. El ACS está formulado con diversos ingredientes y subproductos agroindustriales de origen agrícola y pecuario. La contaminación por *Aspergillus flavus* y por aflatoxinas (AFs) en los alimentos se ha demostrado que es un problema global que causa daños a la salud humana y animal. El objetivo fue evaluar la presencia de microbiota fúngica y contaminación por AFs en el ACS.

Una muestra aleatoria (n=77) de ACS comercializado se seleccionó en Aguascalientes, México. Las muestras fueron procesadas y cultivadas por diluciones seriadas, obteniendo aislados monospóricos, los cuales se caracterizaron morfológica, toxigénica (HPLC) y molecularmente (PCR). La concentración de AFs en ACS se cuantificó por HPLC. En el 53.2 % de ACS se observó crecimiento fúngico y 7.8 % superaron el límite máximo permisible (LMP=10⁶ UFC/g). Se encontraron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Alternaria* y *Fusarium* (69.4, 12.9, 9.4, 4.7, 1.7 y 1.1%, respectivamente). Todas las muestras de ACS mostraron contaminación por AFs (14.8 ± 0.3 µg/kg) y el 11.8 % excedió el LMP (20.0 µg/kg) sugerido por la normatividad; la contaminación se asoció significativamente ($P<0.05$) con algunos ingredientes empleados, humedad del ACS e inclusión de fungicidas y secuestrantes. Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de elaboración del ACS no elimina completamente la contaminación por hongos ni por las AFs presentes en los ingredientes empleados para su formulación; en consecuencia, éstos permanecen en el producto terminado poniendo en riesgo la salud de los perros y eficacia de la cadena alimenticia.

Palabras clave: *Aspergillus flavus*, Aflatoxinas, Cadena alimentaria, Croqueta.

Recibido: 17/01/2023

Aceptado: 12/06/2023

Introducción

El alimento comercial seco (ACS) para perro es una ración integral completamente mezclada y troquelada mediante calor y presión en forma de croqueta; está compuesto por diversos productos y subproductos agroindustriales de origen agrícola y pecuario, por lo que son importantes como una salida frecuente de las cadenas de suministro agroindustrial⁽¹⁾. En México se ha popularizado el uso de ACS para lograr la integración de los perros al estilo de vida urbano; también, diversas marcas de ACS han proliferado para satisfacer la variedad de necesidades nutricionales de estas mascotas, según su actividad, raza, edad y algunas condiciones especiales⁽²⁾. En México, el Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal registra 22 fábricas que elaboran anualmente 1.3 miles de toneladas de ACS⁽³⁾ lo cual se ve complementado con una oferta abundante de marcas internacionales⁽⁴⁾.

En la fabricación del ACS se incorporan productos y subproductos agroindustriales de diversa composición bromatológica para cumplir su diseño nutricional⁽⁵⁾. La calidad nutrimental y sanitaria de estos ingredientes se traslada a la formulación final, por lo que se

ha señalado que el ACS presenta riesgos de contaminación por diversos agentes patógenos como los hongos micotoxigénicos⁽⁶⁻⁸⁾. La contaminación fúngica ocurre en varias etapas de la producción de los ingredientes vegetales, como la floración, cosecha, procesamiento o almacenamiento de cereales; además de la permanencia de los residuos metabólicos de las micotoxinas en la carne, los productos lácteos y huevos⁽⁹⁻¹¹⁾.

Los géneros fúngicos toxigénicos encontrados en los ingredientes para formular de ACS son *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp.⁽¹²⁻¹⁴⁾. Así mismo, las micotoxinas frecuentes encontradas en los ingredientes alimenticios son las aflatoxinas (AFs)⁽¹²⁻¹³⁾. La presencia de AFs representa un factor de riesgo para la salud de los animales y pérdidas económicas para la agroindustria, porque reduce el valor nutricional del producto alimenticio⁽¹⁵⁾.

La intoxicación de los perros por AFs ocasiona alteraciones hemodinámicas, digestivas y nerviosas, así como cambios en la bioquímica y capacidad de coagulación de la sangre; los cuales son especialmente sensibles a las AFs porque tienen una actividad reducida de la enzima glutatión S transferasa (GST), primordial para la ruta de detoxificación de xenobióticos⁽¹⁶⁾. Aunque no existen límites máximos permisibles (LMP) específicos para AFs en el ACS para perro⁽⁴⁾, los LMP establecidos para los alimentos destinados a otros animales domésticos se han sugerido emplear⁽¹⁷⁾, especialmente los lineamientos señalados por el *Codex Alimentarius* o por la Comunidad Europea (20.0 ó 5.0 µg/kg, respectivamente)^(17,18).

Los informes de brotes de formas clínicas por intoxicación de AFs en perros son escasos, pero su distribución geográfica es muy diversa: América del Norte, América Latina, Asia y África⁽¹⁹⁻²¹⁾. Esto coincide con una distribución mundial de los hongos toxigénicos tanto en el ACS como en los ingredientes con que se elaboran^(22,23). Además, la forma de expender el ACS en bolsas o sacos usualmente grandes permite potenciar la concentración de AFs, debido a que el perro debe ingerir todo el contenido que se encuentra en cada bolsa, pero las esporas y toxinas fúngicas son resistentes al proceso de fabricación⁽²⁾. En síntesis, la presencia de hongos toxigénicos y sus toxinas puede considerarse un grave problema para que el perro pueda desarrollar adecuadamente su función zootécnica como animal de compañía, guardián o deportivo. Además, la agroindustria nacional e internacional deben de llevar a cabo mejores estrategias para la disminuir la contaminación fúngica y sus micotoxinas en los ACS. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de microbiota fúngica y la contaminación por AFs en el ACS para perro.

Material y métodos

Diseño del estudio

El estudio se realizó en Aguascalientes, México (22°27'35"- 21°37'20" N; 101°50'07" - 102°52'27" O). El clima es semiseco con temperatura media anual de 18 °C; con una precipitación pluvial media de 526 mm y el periodo principal de lluvias en verano⁽²⁴⁾. Se obtuvo una relación de centros comerciales, tiendas de mascotas, veterinarias y tiendas de abarrotes que registraban el expendio de ACS y una visita se realizó para obtener información de las marcas y tipos en los establecimientos. Un total de 145 tipos de ACS (Cuadro 1) se encontraron, los que fueron considerados como un marco de muestreo. El tamaño de la muestra se calculó en 58 tipos de ACS mediante la fórmula siguiente para estimar proporciones en una población finita⁽²⁵⁾:

$$n = \frac{NZ^2pq}{Nd^2 + Z^2pq}$$

Donde: n = tamaño de muestra (58); N= tamaño de la población (145 tipos de ACS); Z = valor distribución normal estándar (1.96); p = prevalencia o proporción esperada de la contaminación con *Aspergillus* spp. o con AFs en el ACS, se utilizó un valor de proporción P= 0.5, q= 1-p; d= precisión deseada (máximo error= 0.10).

Cuadro 1: Características del alimento comercial seco para perro comercializados en el centro de México

Tipo de alimento	Oferta (N)	Muestreo (n)	(n/N%)	Proteína (mín. %)	Humedad (máx. %)	Fibra (máx. %)	Precio *US\$/kg±(EE)
Origen							
Nacional	120	64	53.3	24.0	11.0	4.0	3.9 ^b ± 0.24
Internacional	25	13	52.0	26.0	11.0	4.0	5.9 ^a ± 0.92
Clasificación comercial							
Estándar	87	52	59.8	22.0	12.0	5.0	2.6 ^b ± 0.17
Premium	58	25	43.1	27.0	11.0	4.0	7.7 ^a ± 0.37
Prescripción (Edad)							
Cachorro	55	27	49.1	27.0	11.0	4.0	5.1 ^a ± 0.45
Adulto	90	50	55.6	22.0	11.0	4.0	3.7 ^b ± 0.30
Prescripción (Talla)							
General	72	43	59.7	22.0	12.0	5.0	2.2 ^a ± 0.10
Específica	73	34	46.6	26.0	11.0	4.0	6.8 ^a ± 0.39
Total	145	77	53.1				

*Precio en dólares americanos de referencia (www.banxico.org.mx: enero 2020).

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

La selección de las muestras se realizó mediante la técnica de muestreo bola de nieve⁽²⁶⁾; para lo cual se visitaron sucesivamente los establecimientos en orden alfabético y muestras expendidas de ACS se adquirieron. La adquisición del ACS se suspendió cuando en tres comercios sucesivos se encontraron los mismos tipos que habían sido adquiridos previamente. Finalmente, 77 tipos diferentes de ACS fueron adquiridos (Cuadro 1).

El tipo de ACS se clasificó de acuerdo con la prescripción (edad y talla) e identificación comercial (estándar y premium) declarada por el fabricante. La composición de los ACS fue registrada a partir de la información nutricional informada por el fabricante para identificar los ingredientes empleados. Se clasificaron los ACS por la presencia o ausencia de cereales, oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas, tubérculos, subproductos de origen animal, fungicidas e ingredientes con capacidad secuestrante y tipo de ACS.

Manejo de las muestras

Las muestras se secaron en una estufa con circulación forzada de aire y se pulverizaron (500-800 μm) en un molino universal de funcionamiento continuo y fueron almacenadas dentro de bolsas selladas en refrigeración (4-5 °C) hasta su procesamiento (<2 semanas).

El aislamiento fúngico se realizó mediante la técnica de siembra directa en placa con dilución en serie para el recuento de colonias fúngicas en el ACS. Las muestras se diluyeron (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y las siembras se realizaron en agar rosa de bengala + cloranfenicol y Czapeck. El periodo de incubación en la oscuridad fue entre 27–30 °C durante siete días⁽²⁷⁾. Preparaciones de las colonias fúngicas se hicieron con tinción azul de algodón usando lactofenol para la observación de las características microscópicas⁽²⁸⁾. La identificación de los aislamientos se hizo con las características morfológicas macroscópicas y microscópicas^(29,30).

Análisis molecular

El ADN genómico se extrajo de aislamientos monospóricos congruentes con la morfología de *A. flavus* mediante métodos estandarizados previamente⁽³¹⁾. La técnica de electroforesis en gel de agarosa (1%) se usó para verificar la calidad del ADN obtenido. Las muestras de ADN se depositaron en el gel con buffer de carga (Platinum II Green PCR Buffer 5X Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para colocarlas en la cámara electroforética con buffer de carga (TAE 1X, 95 voltios, 40 min). Las bandas resultantes se observaron en un foto documentador de imágenes (GEL DOC XR, BIO-RAD Molecular Imagen CA, EE.UU.) con el software Quantity One (versión 4.6.7.).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó para amplificar los fragmentos de ADN genómico en la región de los espaciadores internos de la transcripción (ITS1-5.8S-ITS2- RNAr), el gen de la calmodulina (CaM) y el gen iniciador de la vía biosintética de la aflatoxina (*aflR*) siguiendo los protocolos descritos previamente^(32,33). Los siguientes iniciadores se emplearon para ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATG -3'; CMDA7-F: 5'-GCCAAAATCTTCATCCGTAG-3'; CMDA8-R: 5'-ATTTTCGTTCAAGATGCCAGG-3'; *aflR*-F: 5'-GGGATAGCTGTACGAGTTGTGCCAG-3'; *aflR*-R: 5'-TGGKGCCGACTCGAGGAAYGGGT-3' (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La enzima Taq-polimerasa (Platinum Green Hot Start PCR 2X Máster Mix, Thermo Fisher Scientific) se utilizó para la amplificación y las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Labnet, Multigene, EE.UU.). El protocolo de amplificación se introdujo para la región ITS1-5.8S-ITS2 RNAr utilizando un periodo de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94 °C/1 min, alineación a 54 °C/1 min y extensión a 72 °C/1min) y con una extensión final de 9 min a 72 °C. Las condiciones para la amplificación del gen de CaM fueron con un periodo de desnaturalización un ciclo de 1min/94 °C seguido de 30 ciclos (1min/94 °C, para el alineamiento 1 min/53 °C y para la extensión 1min/72 °C) y se agregó un período de extensión final de 10 min a 72 °C. Así mismo para la amplificación del gen *aflR* se utilizó un periodo de pre-desnaturalización de 1 min a 94 °C seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94 °C/1 min, alineamiento 63 °C/1 min y extensión 72 °C/1 min) y con una extensión final de extensión final 10 min a 72 °C. La calidad de los productos de PCR (ITS, CaM y *aflR*) se verificó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En el primer carril del gel se incluyó una escalera con marcador de peso molecular (1.0 µl, escalera de ADN de 100 pb, 0.5 µg/µl. No. 15628019/15628050. Invitrogen ADN Ladder) junto con 1.0 µl del buffer (BlueJuice Gel Loading Buffer 10X). El tamaño en pares de bases (pb) del amplicon para la identificación molecular fue: ITS, 600-800; Calm, 468 y *aflR*, 796. Las bandas se visualizaron en el foto documentador de imágenes con el software Quantity One (versión 4.6.7.). Los productos de PCR se purificaron con el reactivo de limpieza ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Afflymetrix, Thermo Fisher Scientific Inc. Santa Clara, California, EUA).

Cuantificación de micotoxinas

La cuantificación de la concentración de AFs se realizó por duplicado de acuerdo con el método oficial AOAC 990.33⁽³⁴⁾. El contenido de las AFs se extrajo utilizando tubos de fase sólida (SPE; Supelclean™ LC-18 SPE tube, Sigma-Aldrich, USA), metanol:agua, ácido acético, tetrahidrofurano (THF) y hexano. Los extractos derivatizados con ácido trifluoroacético fueron inyectados en un sistema de HPLC con detector de fluorescencia (Varian Pro Star binary pump; FP detector 2020, Varian Associates Inc., Victoria, Australia), columna C18 y protector de columna (LC- 18 and LC-18; Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). Las estimaciones de AFs se obtuvieron con ayuda de un software (Galaxie Ver. 1.9.302.530) y las concentraciones se calcularon utilizando curvas estándar de AFs purificadas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

En el ACS también se cuantificaron las micotoxinas siguientes: zearalenona (ZEA), ocratoxina (OTA), fumonisinas (FUM) y deoxinivalenol (DON) mediante análisis de ELISA indirecta⁽⁴⁾ (Ridascreen Fast: Zearalenon R5502, Fumonisin R5602, Ochratoxin A R5402, Deoxynivalenol R5902, R-Biopharm, Alemania).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron aplicando una prueba de normalidad con el método de Kolmogórov-Smirnov a un nivel de confianza del 95%. La comparación de las medias muestrales para cada variable se realizó mediante la prueba de Tukey (HSD) con un software estadístico (Statgraphics Centurion, versión 16.1.03). Para identificar el riesgo de superar el LMP establecido para la concentración de AFs se realizó la prueba de Ji-cuadrada (χ^2) de la razón de probabilidades o razón de momios (RM), calculando la porción de ACS que excedió el LMP para la concentración de AFs y que estuvo expuesta a un factor específico (formulación con la inclusión de cereales, oleaginosas, aceite vegetal, leguminosas, tubérculos, subproductos de origen animal, fungicidas e ingredientes con capacidad secuestrante y tipo de ACS) dividida entre la porción de ACS que excedió el LMP para la concentración de AFs pero que no estuvo expuesto a ese factor específico. En todos los análisis se consideró un nivel de probabilidad de $P < 0.05$.

Resultados

La mayoría de los ACS adquiridos (82.8 %) fueron elaborados por fabricantes nacionales, mientras que el 17.2 % fueron ACS elaborados por marcas comerciales internacionales (Cuadro 1). Más de la mitad de las muestras de ACS (41/77 = 53.2 %) presentó contaminación fúngica, mientras que el 7.8 % (6/77) contenían una concentración de hongos superior a los niveles máximos recomendados (10^6 UFC/g). Un total de 85 aislamientos fúngicos purificados se obtuvieron, los cuales mostraron características morfológicas correspondientes con los principales géneros toxigénicos siguientes (Figura 1): *Aspergillus* spp. (69.4 %), *Fusarium* spp. (1.1 %) y *Penicillium* spp. (12.9 %). También se identificaron aislados con morfología correspondiente a los géneros *Cladosporium* spp., *Mucor* spp. y *Alternaria* spp (9.4, 4.7 y 1.7 %, respectivamente). De los aislados *Aspergillus* spp., el 40.7 % (24/59) correspondieron a la morfología de *A. flavus*⁽³⁰⁾; en el 75.0 % (18/24) de los aislamientos de *A. flavus* demostró *in vitro* la capacidad de producción de aflatoxinas (9.8 ± 0.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en 7 días) y también expresaron los genes CaM y *aflR* y la región ITS (Figura 2) mediante el análisis de PCR.

Figura 1: Estructura morfológica macroscópica y microscópica (40x) de los aislados monospóricos. Páneos: A) *Aspergillus* spp., B) *Fusarium* spp., C) *Penicillium* spp., D) *Aspergillus* spp., E) *Fusarium* spp. y F) *Penicillium* spp.

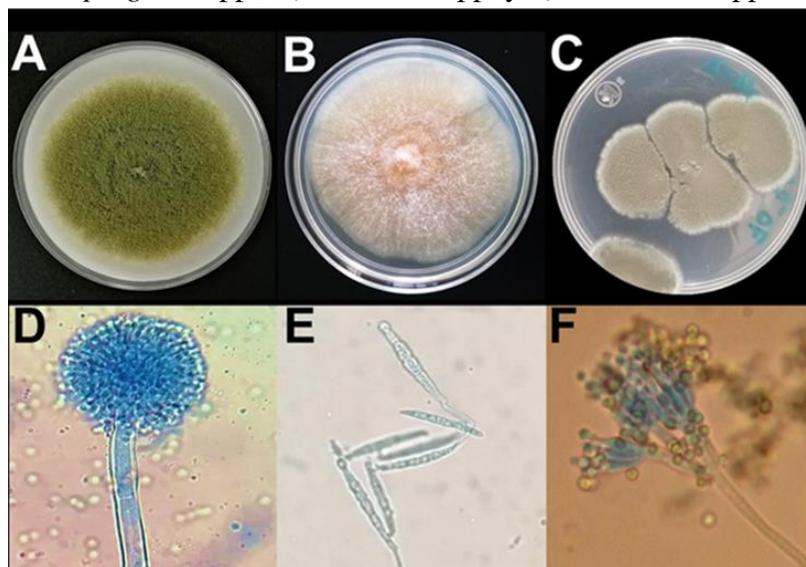
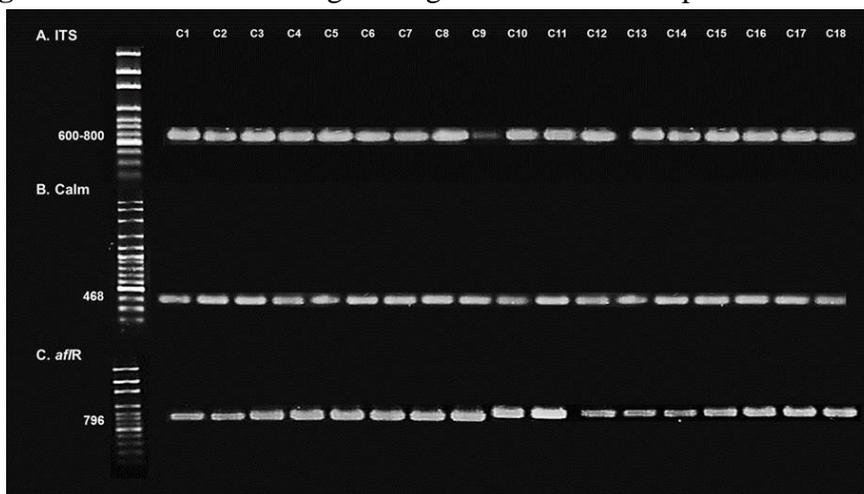


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR

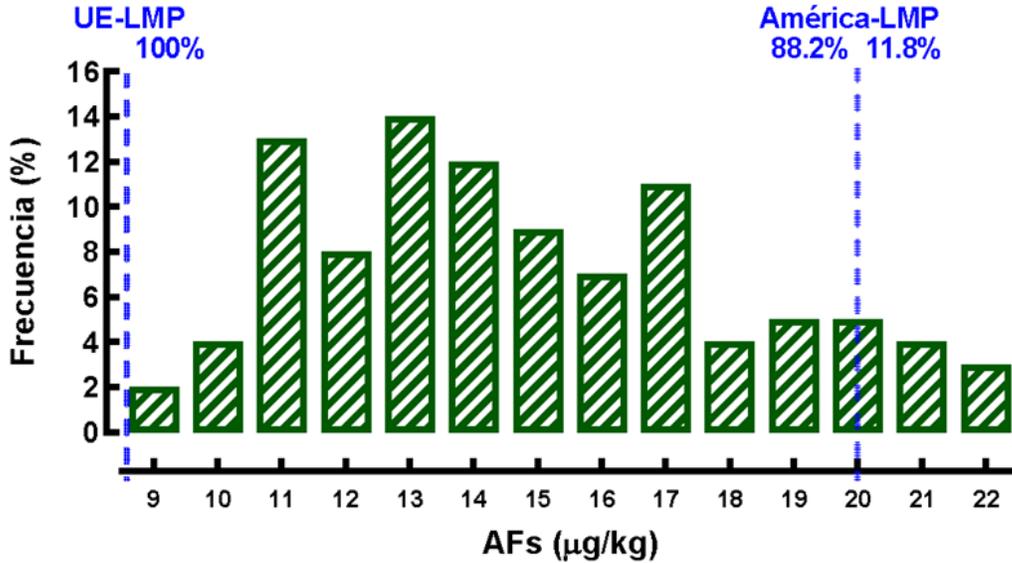


Panel A: amplificación de la región de espaciadores internos de la transcripción (ITS). Panel B: amplificación de Calmodulina (Calm). Panel C: amplificación del gen iniciador de la vía biosintética de la aflatoxina (*aflR*). Primer carril: marcador de peso molecular 100-2000 pares de bases; C1-C18: aislados de *Aspergillus flavus*.

Todas las muestras de ACS presentaron concentraciones detectables de AFs (Figura 3). La frecuencia de la concentración de AFs presentó una aproximación normal ($P=0.14$); la concentración mínima fue de $8.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ y concentración máxima de $22.2 \mu\text{g}/\text{kg}$; una concentración media de $14.8 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ se estimó, con intervalo de confianza al 95.0% de $14.2\text{-}15.4 \mu\text{g}/\text{kg}$. También se detectó que aproximadamente uno de cada diez (11.8 %) de los ACS analizados sobrepasó el LMP de AFs recomendado por la mayoría de las legislaciones

de países de América para el uso de cereales ($20.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)⁽³⁵⁾, mientras que todos los ACS rebasaron las recomendaciones europeas ($5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)⁽¹⁸⁾. Las concentraciones de OTA, FUM y DON estuvieron por debajo de los límites de detección; mientras que las concentraciones estimadas de ZEA ($228 \pm 13.8 \mu\text{g}/\text{kg}$) en ningún caso sobrepasaron el LMP ($400 \mu\text{g}/\text{kg}$) que se sugiere para regular esta micotoxina⁽³⁵⁾.

Figura 3: Frecuencia de la concentración de aflatoxinas (AFs) en alimento comercial seco para perro en el centro de México



LMP= límite máximo permisible: América ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$); Unión Europea ($5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$).

En este estudio no se observó diferencia significativa ($P>0.05$) entre la concentración de AFs y las características generales del ACS, como el origen, la clasificación comercial (estándar o premium) ni la prescripción por edad o talla del perro; tampoco se detectó alguna asociación estadística que permitiera identificar estas características como factores de riesgo que generen concentraciones por arriba del LMP (Cuadro 2).

Cuadro 2: Asociación entre las características del alimento comercial seco para perro y la concentración de aflatoxinas

Tipo de alimento	(n)	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$\pm\text{EE}$	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Origen						
Nacional	64	15.0 ^a	± 0.32	12.5	0.49	1.71
Internacional	13	13.9 ^a	± 0.61	7.7		
Clasificación comercial						
Estándar	52	15.1 ^a	± 0.34	11.5	0.93	0.95
Premium	25	14.2 ^a	± 0.50	12.0		
Prescripción (edad)						
Cachorro	27	15.0 ^a	± 0.48	18.5	0.05	2.6
Adulto	50	14.7 ^a	± 0.35	8.2		
Prescripción (talla)						
General	43	15.3 ^a	± 0.38	14.0	0.32	1.7
Específica	34	14.2 ^a	± 0.42	8.8		

EE= error estándar; LMP= límite máximo permisible (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); $P(\chi^2)$ = Ji cuadrada; RM= razón de momios.

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

La concentración promedio de AFs en los ACS presentó diferencias significativas asociadas con características del ACS y con los ingredientes empleados. El ACS con humedad mayor a 10 % mostró una concentración estimada de AFs significativamente mayor ($P < 0.05$) en comparación a la en los ACS que contenían humedad menor. También se detectó un riesgo significativo (RM $\chi^2 P < 0.05$) tres veces mayor de encontrar concentraciones por arriba del LMP en aquellos ACS que registraron humedad mayor a 10 % (Cuadro 3) en relación con los ACS que tenían humedad menor 10 %. Aunque se detectó un mayor riesgo también para los ACS que en su formulación contenían una mayor concentración de proteína, grasa y cenizas (>22, >12 y >7 %, respectivamente), la asociación estadística no fue significativa ($P > 0.05$).

Cuadro 3: Asociación entre el análisis bromatológico del alimento comercial seco para perro y la concentración de aflatoxinas

Característica	(n)	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$\pm\text{EE}$	>LMP (%)	Valor P (χ^2)	RM
Humedad relativa						
>10%	31	17.4 ^a	± 0.36	19.4	0.01	3.4
$\leq 10\%$	46	13.0 ^b	± 0.29	6.5		
Proteína						
>22%	47	14.9 ^a	± 0.36	14.9	0.12	2.5
$\leq 22\%$	30	14.7 ^a	± 0.46	6.7		
Grasa						
>12%	22	14.9 ^a	± 0.53	18.2	0.11	2.2
$\leq 12\%$	55	14.8 ^a	± 0.34	9.1		
ELN						
Presente	47	14.4 ^a	± 0.52	12.8	0.78	1.1
Ausente	107	15.0 ^a	± 0.34	11.2		
Fibra						
>4%	30	15.2 ^a	± 0.46	13.3	0.61	1.3
$\leq 4\%$	47	14.5 ^a	± 0.36	10.6		
Ceniza						
>7%	38	15.5 ^a	± 0.40	15.8	0.11	2.3
$\leq 7\%$	39	15.1 ^a	± 0.39	7.7		

EE= error estándar; LMP= límite máximo permisible (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$); $P(\chi^2)$ = Ji cuadrada; RM= razón de momios; ELN= extracto libre de nitrógeno.

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

La concentración promedio de AFs en los ACS que contenían trigo fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en comparación a la concentración estimada de AFs en los ACS que no utilizaron este ingrediente (Cuadro 4). Sin embargo, al calcular el riesgo de exceder el LMP no hubo una asociación significativa ($P > 0.05$) entre la proporción de los ACS que contenían trigo y los que no lo incluyeron en su formulación. No se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las medias de concentración de AFs en presencia o ausencia de algún subproducto de origen animal en los ACS. Sin embargo, si se detectó una asociación significativa ($P < 0.05$, χ^2) en la proporción de ACS que excedieron el LMP entre los ACS que presentaron en su formulación harina y aceite de pescado, en comparación con los que no los incluyeron; por lo cual el riesgo (RM) de encontrar concentraciones por arriba del LMP fue más tres veces que en los ACS que registraron ausencia de los ingredientes. La totalidad de las muestras adquiridas emplearon harina de carne y hueso en la formulación del ACS, por lo que no se pudo establecer ninguna asociación con estos ingredientes.

Cuadro 4: Asociación entre la concentración de aflatoxinas y la inclusión de alimentos y subproductos agroindustriales en alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media (µg/kg)	± EE	>LMP (%)	Valor P (χ²)	RM
Trigo						
Presente	47	15.5 ^a	± 0.35	12.8	0.60	1.3
Ausente	30	13.8 ^b	± 0.44	10.0		
Cebada						
Presente	22	15.5 ^a	± 0.53	18.2	0.11	2.2
Ausente	55	14.5 ^a	± 0.33	9.1		
Maíz						
Presente	55	15.0 ^a	± 0.34	9.1	0.11	0.45
Ausente	22	14.3 ^a	± 0.53	18.2		
Arroz						
Presente	38	15.2 ^a	± 0.40	13.2	0.57	1.4
Ausente	39	14.4 ^a	± 0.40	10.3		
Oleaginosas						
Presente	27	15.1 ^a	±0.48	14.8	0.37	1.6
Ausente	50	14.6 ^a	±0.35	10.0		
Aceite vegetal						
Presente	38	14.8 ^a	±0.41	13.2	0.57	1.3
Ausente	39	14.8 ^a	±0.40	10.3		
Leguminosas						
Presente	49	14.8 ^a	±0.36	12.2	0.77	1.1
Ausente	28	14.8 ^a	±0.47	10.7		
Tubérculos						
Presente	45	14.9 ^a	±0.37	13.3	0.45	1.5
Ausente	32	14.7 ^a	±0.44	9.4		
Huevo y leche						
Presente	27	15.1 ^a	±0.48	18.5	0.05	2.6
Ausente	50	14.7 ^a	±0.35	8.0		
Harina y aceite de pescado						
Presente	31	15.3 ^a	±0.45	19.4	0.01	3.4
Ausente	46	14.5 ^a	±0.37	6.5		

EE= error estándar; LMP= límite máximo permisible (20 µg/kg); P(χ²)= JI cuadrada; RM= razón de momios.

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los ACS que contenían fungicidas o agentes secuestrantes minerales de micotoxinas mostraron concentración media de AFs significativamente menor ($P < 0.05$) en comparación a la concentración estimada de AFs en los ACS donde no fueron incluidos estos aditivos (Cuadro 5). Además, se detectó una asociación protectora significativa ($P < 0.05$, χ^2) al

comparar la proporción de ACS que excedieron el LMP pero que no incluyeron estos componentes y aquellos que sí los agregaron a su formulación, por lo cual el riesgo (RM) de presentar concentraciones por arriba del LMP fue menor que en los ACS que incluyeron fungicidas o agentes secuestrantes.

Cuadro 5: Asociación entre la inclusión de fungicidas y agentes secuestrantes con la concentración de aflatoxinas en el alimento comercial seco para perro

Ingrediente	(n)	Media ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	\pm EE	>LMP (%)	Valor de P (χ^2)	RM
Fungicidas						
Presente	46	13.5 ^a	\pm 0.33	6.5	0.01	0.29
Ausente	31	16.7 ^b	\pm 0.40	19.4		
Adsorbentes orgánicos						
Presente	43	14.7 ^a	\pm 0.38	9.3	0.30	0.59
Ausente	34	14.9 ^a	\pm 0.43	14.7		
Secuestrantes minerales						
Presente	43	13.9 ^a	\pm 0.36	7.0	0.04	0.35
Ausente	34	15.9 ^b	\pm 0.41	17.7		

EE= error estándar; LMP= límite máximo permisible; $P(\chi^2)$ = Ji cuadrada; RM= razón de momios.

^{ab} Medias con diferente literal muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Discusión

El alimento comercial seco o croqueta ha representado un importante mercado para diversas industrias que elaboran alimento para perro incorporado al estilo de vida urbano⁽³⁾. Al igual que en otros productos de origen agrícola y animal, la contaminación por microbiota fúngica y por micotoxinas es prácticamente inevitable⁽¹¹⁾. En el presente estudio se detectó la contaminación por *Aspergillus flavus* toxigénico en un tercio ($18/77 = 31.2\%$) de una muestra aleatoria de ACS, así como una concentración detectable de aflatoxinas en la totalidad de las muestras; además, el 11.8 % de los ACS rebasaron el límite máximo permisible de AFs ($20.0 \mu\text{g}/\text{kg}$) sugerido por la normatividad⁽³⁵⁾. Este hallazgo no ha sido reportado previamente en México y la contaminación por AFs pone en riesgo la salud de los perros y el desarrollo adecuado de su función zootécnica (compañía, guardia, trabajo, etc.) por el que son criados⁽³⁶⁾. Así mismo, afecta económicamente a las ramas agroindustriales que proveen los ingredientes, al alterar la inocuidad del producto y deteriorar su valor económico y nutricional⁽¹⁵⁾.

En este estudio se encontró que los ACS presentaron concentraciones bajas a moderadas de otras micotoxinas. Los niveles de OTA, FUM y DON se estimaron por debajo de los límites de detección. La concentración de ZEA alcanzó concentraciones cercanas a la mitad

(57.0 %) del nivel máximo permisible empleado en los países europeos que regulan esta micotoxina (400 µg/kg)⁽³⁵⁾; sin embargo, este hallazgo de ausencia de concentraciones importantes de micotoxinas diferentes a las AFs no garantiza que dichos contaminantes no pudieran estar presentes en otras circunstancias, porque las micotoxinas son contaminantes usuales en los cereales que se emplean como ingredientes comunes en la fabricación de alimento para perros⁽³⁷⁾; lo anterior sugiere que la fabricación de ACS debe tener un manejo adecuado debido a la gravedad de la contaminación por micotoxinas⁽³⁸⁾.

Aunque la información sobre la presencia de *A. flavus* y AFs en diversos ingredientes de la alimentación humana es extensa, los estudios de contaminación en el ACS son escasos, a pesar de estar formulados con ingredientes similares⁽²⁾. En este estudio, *Aspergillus* spp., fue el género detectado con mayor frecuencia (69.4 %) en el ACS, lo cual concuerda con diversos autores^(12,14,39) que identificaron en otros países los mismos géneros fúngicos contaminantes del ACS para perro. En el presente estudio se encontró microbiota fúngica en el 53.2 % de las muestras y el 7.8 % rebasó la concentración máxima de hongos (10⁶ UFC/g), sugerida como máxima permisible⁽⁴⁰⁾. La confirmación de la identidad de los aislamientos con morfología de *A. flavus* se logró mediante la amplificación de los genes y regiones génicas (ITS, CaM y *aflR*) lo cual se ha propuesto como un código de barras predeterminado para la identificación de estos hongos con la capacidad de producción de AFs^(41,42). Estos hallazgos sugieren que la persistencia de formas activas de los hongos con capacidad toxigénica significa un riesgo adicional, ya que si los procesos usuales de elaboración de la croqueta no son capaces de destruir la microbiota fúngica, cuando cambian las condiciones ambientales (actividad del agua y temperatura) por apertura de los sacos donde se almacena el producto terminado, las esporas y esclerocios del *A. flavus* pueden originar formas vegetativas nuevas con capacidad de utilizar los sustratos alimenticios, producir aflatoxinas e incrementar la concentración preexistente en el ACS⁽⁴³⁾. Además, la cantidad usual de ACS contenido en el saco es suficiente para una duración de varios días o semanas en las que el perro tiene que consumir todo el material, independientemente de su calidad e inocuidad⁽⁴⁴⁾.

En este estudio se encontró una asociación significativa entre algunas características del ACS y la concentración detectada de AFs, lo cual fue reforzado con la estimación del incremento en el riesgo de sobrepasar el LPM. Especialmente la humedad relativa superior al 10% mostró tres veces más el riesgo de presentar concentraciones por arriba del LMP en comparación con alimentos con una humedad relativa inferior (Cuadro 3). Este hallazgo coincide con otros estudios que informan que la actividad del agua presente en la matriz alimenticia es un factor relevante para la expresión de los genes reguladores de la ruta de biosíntesis de AFs⁽⁴⁵⁾. Por lo que, si el sustrato contiene mayor humedad o se rehidrata durante su almacenamiento, las concentraciones de AFs pueden aumentar⁽⁴⁶⁾. Este resultado podría atribuirse a que la materia prima extruida para la formulación de ACS presenta en la etapa inicial del proceso un exceso de contenido de humedad relativa (20-25 %) y aunque se reduce por secado hasta niveles bajos (8-12 %), solo se inhibe el crecimiento de las formas vegetativas de la microbiota

fúngica, pero sus esporas y micotoxinas producidas dentro del material procesado permanecen estables⁽⁴⁵⁾.

Los resultados de este estudio también mostraron que hubo mayor contaminación por AFs en presencia de algunos ingredientes empleados en la fabricación del alimento. Los ACS que contenían trigo o harina y aceite de pescado presentaron concentraciones mayores de AFs o un mayor riesgo de sobrepasar el LMP. En el caso de los cereales, la contaminación se ha atribuido a la exposición de los cultivos en varias etapas de la producción (floración, cosecha, transporte, procesamiento o almacenamiento)⁽⁴⁷⁾. Estos ingredientes son ampliamente utilizados como fuente de carbohidratos, fibra, proteínas, grasas, minerales y vitaminas⁽⁴⁸⁾; por otra parte, la harina y el aceite de pescado son productos resultantes del procesamiento de pescados enteros o subproductos (cocción, prensado, deshidratación y molienda) y constituyen una fuente de proteína rica en ácidos grasos de alto valor nutricional (ácido eicosapentaenoico, docosahexaenoico y omega-3)⁽⁴⁹⁾. Estos ingredientes se incluyen en las fórmulas por su bajo costo y porque mantienen un valor nutricional aceptable para la fisiología del perro, además, su inclusión no afecta la palatabilidad y digestibilidad de los nutrientes⁽³⁸⁾. Lo que sugiere que la contaminación por AFs puede ser común en los ACS con presencia de cereales o subproductos de pescado^(50,51). Por lo cual, la calidad de estos ingredientes se debiera garantizar, hacer un manejo adecuado y un manejo proceso eficaz del producto terminado para asegurar la protección contra la contaminación por AFs⁽⁵²⁾.

Los resultados de este estudio mostraron que los ACS que incluyeron fungicidas o secuestrantes minerales en su formulación tuvieron tanto una menor concentración media de AFs como un menor porcentaje de AFs por encima del LMP ($P < 0.05$) en comparación con los que no los incluyeron, lo cual sugiere una asociación protectora de estos agentes contra el riesgo de una contaminación por AFs superior al LMP. Este hallazgo sugiere que el empleo de los agentes fungicidas y secuestrantes son métodos útiles para reducir los efectos tóxicos de las AFs, ya que los fungicidas tienen un efecto inhibitor del crecimiento de los hongos por acidificación de su contenido citoplásmico⁽⁵³⁾; mientras que los secuestrantes minerales ejercen su asociación protectora mediante la quimisorción β -dicarbonilo de las AFs, lo que reduce su biodisponibilidad mediante absorción gastrointestinal^(54,55).

De forma sorprendente, en este estudio no se encontró asociación ($P > 0.05$) entre la concentración de AFs o la proporción que sobrepasaban el LMP sugerido por la normatividad (Cuadro 2) contra algunas características consideradas como evidencia de calidad por los usuarios (alimentos premium, origen internacional o mayor precio). Lo anterior sugiere que la confianza del consumidor se basa en otros criterios diferentes a la inocuidad del ACS, como difusión mercadotécnica, supuesta asociación entre calidad y precio, palatabilidad o apariencia⁽²⁾.

Conclusiones e implicaciones

En el presente estudio, una contaminación considerable por *Aspergillus flavus* toxigénico se detectó, así como una concentración importante de aflatoxinas en la totalidad de las muestras recolectadas en un muestreo aleatorio y representativo de alimento comercial seco para perro. Estos hallazgos sugieren que se encuentra en riesgo la salud de los perros, el desarrollo adecuado de su función zootécnica y también pudiera afectar a las ramas agroindustriales que proveen este pienso, al alterar la inocuidad del producto y deteriorar su valor económico y nutricional. Los resultados del estudio indicaron que algunas características bromatológicas y formulación empleada en la elaboración de los ACS generaron mayor riesgo de contaminación por hongos y por micotoxinas; de lo anterior se deduce que es necesario diseñar y aplicar estrategias más efectivas para verificar la inocuidad de los ingredientes y de los procesos utilizados en la fabricación del ACS. Además, debe fomentarse el establecimiento de niveles máximos permisibles de AF específicos para el ACS y la investigación sobre la exposición prolongada del perro a bajas concentraciones de micotoxinas.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT No. 738906) y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (proyecto No: PIP/SA 22-2).

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés potencial con respecto a la presente investigación, autoría o publicación de este artículo.

Literatura citada:

1. Carranza-Trinidad R, Valdivia-Flores AG. Supply chain: An input-output perspective. An example of application in the dairy products industry. *Int J Supply Chain Oper Resil* 2018;3(3):236-247. doi: 10.1504/IJSCOR.2018.093258.
2. Martínez-Martínez L, Valdivia-Flores AG, Guerrero-Barrera AL, Quezada-Tristán T, Rangel-Muñoz, EJ, Ortiz-Martínez, R. Toxic effect of aflatoxins in dogs fed contaminated commercial dry feed: A Review. *Toxins* 2021;13(1):65. doi:10.3390/toxins13010065.
3. CONAFAB (Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal). Producción pecuaria y alimento balanceado en México. México. 2021. ULR: <https://www.conafab.org/informativos/anuario-estadistico>.

4. Kara K. Comparison of some mycotoxin concentration and prevalence in premium and economic class of adult dog foods. *Ital J Anim Sci* 2022;21(1):1380-1389. doi.org/10.1080/1828051X.2022.2117105.
5. Beloshapka A, Buff PP, Fahey Jr GC, Swanson KS. Compositional analysis of whole grains, processed grains, grain co-products, and other carbohydrate sources with applicability to pet animal nutrition. *Foods* 2016;5(2):23. doi:10.3390/foods5020023.
6. Castaldo L, Graziani G, Gaspari A, Izzo L, Tolosa J, Rodríguez Y, Ritieni A. Target analysis and retrospective screening of multiple mycotoxins in pet food using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS *Toxins* 2019;11(8):434. doi:10.3390/toxins11080434.
7. Fuentes S, Carvajal M, Ruiz S, Martínez N, Gómez A, Rojo F. Presence of mutagens and carcinogens, called aflatoxins, and their hydroxylated metabolites in industrialized food for dogs. *J Microb Biochem Technol* 2018;10(3):76-86. doi:10.4172/1948-5948.1000399.
8. Shao M, Li L, Gu Z, Yao M, Xu D, Fan W. Mycotoxins in commercial dry pet food in China. *Food Addit Contamb* 2018;11(4):237-245. doi:10.1080/19393210.2018.1475425.
9. Signorini M, Gaggiotti M, Molineri A, Chiericatti C, deBasilico M, Basilico J, Pisani M. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chem. Toxicol* 2012;50(2):250-257. doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.036.
10. Ott L, Appleton H, Shi H, Keener K, Mellata M. High voltage atmospheric cold plasma treatment inactivates *Aspergillus flavus* spores and deoxynivalenol toxin. *Food Microbiol* 2021;95:103669. doi:10.1016/j.fm.2020.103669.
11. Alshannaq A, Yu J. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Pub Health* 2017;14(6):632. doi:10.3390/ijerph14060632.
12. Witaszak N, Stępień Ł, Bocianowski J, Wąskiewicz A. Fusarium species and mycotoxins contaminating veterinary diets for dogs and cats. *Microorganisms* 2019;7(1):26. doi:10.3390/microorganisms7010026.
13. Hołda K, Wiczuk W, Hać-szymańczuk E, Głogowski, R. Comprehensive microbiological evaluation of dry foods for growing dogs marketed in Poland. *Anim Sci* 2017;56(1):81-89. doi:10.22630/AAS.2017.56.1.10.
14. Singh SD, Chaturgoon AA. A comparative analysis of mycotoxin contamination of supermarket and premium brand pelleted dog food in Durban, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 2017;88(1):1-6. doi:10.4102/jsava.v88i0.1488.

15. Hernandez-Valdivia E, Valdivia-Flores AG, Cruz-Vazquez C, Martínez-Saldaña MC, Quezada-Tristan T, Rangel-Muñoz EJ, Jaramillo-Juarez F. Diagnosis of subclinical aflatoxicosis by biochemical changes in dairy cows under field conditions. *Pak Vet J* 2021;41(1):33-38.
16. Dereszynski D, Center S, Randolph J, Brooks M, Hadden A, Palyada, K, *et al.* Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005–2006). *JAVMA J Am Vet Med Assoc* 2008;232(9):1329-1337. doi:10.2460/javma.232.9.1329.
17. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations- World Health Organization). General standard for contaminants and toxins in food and feed. *Codex Alimentarius* 2019. Codex stan 193–1995. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf.
18. Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. *Off J Eur Union* 2003; 285:33-37. <https://www.legislation.gov.uk/eudr/2003/100/adopted>.
19. Reis-Gomes A, Marcolongo-Pereira C, Sallis E, Pereira D, Schild A, Faria R, Meireles M. Aflatoxicosis in dogs in Southern Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 2014;34(2):162-166. doi:10.1590/S0100-736X2014000200011.
20. Arnot L, Duncan N, Coetzer H, Botha C. An outbreak of canine aflatoxicosis in gauteng province, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 2012;83(1):1-4. doi:10.4102/jsava.v83i1.2.
21. Bruchim Y, Segev G, Sela U, Bdolah T, Salomon A, Aroch I. Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. *Res Vet Sci* 2012;93(1):279-287. doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.024.
22. Álvarez-Días MF, Torres-Parga B, Valdivia-Flores AG, Quezada-Tristán T, Alejos-De La Fuente JI, Sosa-Ramírez J, Rangel-Muñoz EJ. *Aspergillus flavus* and total aflatoxins occurrence in dairy feed and aflatoxin M1 in bovine milk in Aguascalientes, México. *Toxins* 2022;14(5):292. doi:10.3390/toxins14050292.
23. Rangel-Muñoz EJ, Valdivia-Flores AG, Moreno-Rico O, Hernández-Delgado S, Cruz-Vázquez C, De Luna-López MC, *et al.* Characterization of *Aspergillus flavus* and quantification of aflatoxins in feed and raw milk of cows in Aguascalientes, Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu* 2020;11(2):435-454. doi:10.22319/rmcp.v11i2.5686.

24. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). Anuario estadístico y geográfico de Aguascalientes. INEGI, Aguascalientes, 2017. https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825092078.pdf.
25. Segura-Correa JC, Honhold N. Métodos de muestreo para la producción y salud animal. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 2000. https://www.researchgate.net/publication/273945817_Métodos_de_muestreo_para_la_produccion_y_la_salud_animal.
26. Espinoza P, López R, Lozano S. Muestreo de bola de nieve. En Espinoza P, López R, Lozano S, Técnicas de muestreo. México: UNAM 2018:(2-4). <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-cesar-vallejo/sistemica/pdf-proyectofinal-bola-de-nieve-compress/28006947>.
27. Santibáñez Escobar R, Martínez Ibarra JA, Tapia González JM, Avellaneda Cevallos JH, Hernández Gallardo M, Montañez Valdez OD. Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimento para bovinos. Cienc Tecnol 2011;4(1):19-23. doi:10.18779/cyt.v4i1.96.
28. Leck, A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. Community Eye Health 1999;12(30):24. <https://www.cehjournal.org/article/preparation-of-lactophenol-cotton-blue-slide-mounts/>.
29. Jayawardena RS, Hyde KD, de Farias AR, Bhunjun CS, Fernandez HS, Manamgoda D, Udayanga D, *et al.* What is a species in fungal plant pathogens? Fungal Divers 2021; 109(1):239-266. doi.org/10.1007/s13225-021-00484-8.
30. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. First ed. Louisiana, USA: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; 2002.
31. Fani SR, Moradi M, Probst C, Zamanizadeh H, Mirabolfathy M, Haidukowski M, Logrieco A. A critical evaluation of cultural methods for the identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates for aflatoxin mitigation in pistachio Orchards of Iran. Eur J Plant Pathol 2014;140:631-642. doi:10.1007/s10658-014-0499-1.
32. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomon R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. Appl Environ Microbiol 1996;62(9):3270-3273. doi:10.1128/aem.62.9.3270-3273.1996.
33. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols; Innis MA, *et al*, editors. Academic Press, Inc.: New York, NY, USA, 1990:315-322. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

34. Scott PM. Mycotoxin methodology. *Food Addit Contam* 1995;12(3):395-403. doi:10.1080/02652039509374321.
35. FAO (Food and Agriculture Organization). Worldwide Regulations for mycotoxins in food and feed 2003. FAO Food Nutr paper 81 2003:59. <https://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>.
36. Case L, Carey D, Hirakawa D, Daristotle L. Feeding management throughout the life cycle. In Case L, Carey D, Hirakawa D, Daristotle L. *Canine and feline nutrition*. 3rd ed. USA: Mosby. 2011:191-294. doi.org/10.1016/C2009-0-39175-8.
37. Rodríguez M, Ramos A, Prim M, Sanchis V, Marín S. Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M1 in milk. *Mycotoxin Res* 2019;36(1):11-22. doi:10.1007/s12550-019-00362-y.
38. Tegzes J, Oakley B, Brennan G. Comparison of mycotoxin concentrations in grain versus grain-free dry and wet commercial. *Toxicol- Commun* 2019;3(1):61-66 doi:10.1080/24734306.2019.1648636.
39. Błajet-Kosicka A, Kosicki R, Twarużek M, Grajewski J. Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Addit Contam B Part* 2014;7(4):302-308. doi:10.1080/19393210.2014.933269.
40. GMP (Good Manufacturing Practices + International B.V.). Specific Feed Safety Limits. GMP+ International. The Netherlands, 2021: 1-78. <https://www.gmpplus.org/media/zuwj0gam/ts-1-5-specific-feed-safety-limits.pdf>.
41. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hubka V, Perrone G, Seifert KA, *et al*. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2014;78:141-173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004.
42. Okayo RO, Andika DO, Dida MM, K'Otuto GO, Gichimu BM. Morphological and molecular characterization of toxigenic *Aspergillus flavus* from groundnut kernels in Kenya. *Int J Microbiol* 2020;(2020):8854718. doi:10.1155/2020/8854718.
43. Medina A, Akbar A, Baazeem A, Rodríguez A, Magan N. Climate change, food security and mycotoxins: Dowe know enough?. *Fungal Biol Rev* 2017;31(3):143-154. doi:10.1016/j.fbr.2017.04.002.
44. Bates N. Aflatoxicosis in dogs. *Companion Animal* 2021;26(8):197-202. doi.org/10.12968/coan.2021.0034.

45. Chiewchan N, Mujumdar A, Devahastin S. Application of drying technology to control aflatoxins in foods and feeds: A Review Dry Technol 2015;33(14):1700-1707. doi:10.1080/07373937.2015.1068795.
46. Gallo A, Solfrizzo M, Epifani F, Panzarini G, Perrone, G. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. Int J Food Microbiol 2015;217:162-169. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026.
47. Coppock RW, Christian RG, Jacobsen BJ. Aflatoxins. In Gupta RC. Veterinary toxicology. Basic and clinical principles. 3rd ed. Hopkinsville, Kentucky, USA: Elsevier Inc. 2018:983-994. doi:10.1016/B978-0-12-811410-0.00069-6.
48. Macías A, Rial C, Acosta A, Henríquez L, Almeida M, Rodríguez Á, *et al.* Risk assessment of the exposure to mycotoxins in dogs and cats through the consumption of commercial dry food. Sci Total Environ 2020;708:134592. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134592.
49. Dillon G, Cardinal C, Keegan J, Yiannikouris A, Brandl W, Moran C. The analysis of docosahexaenoic acid (DHA) in dried dog food enriched with an *Aurantiochytrium limacinum* biomass: Matrix extension validation and verification of AOAC method 996.06. J AOAC Int 2021;104(1):68-77. doi:10.1093/jaoacint/qsaa097.
50. Wan J, Chen B, Rao J. Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. Compr Rev Food Sci 2020;19(3):928-953. doi:10.1111/1541-4337.12546.
51. Alshwabkeh K, Alkhalailah NI, Abdelqader A, Al-Fataftah AR, Herzallah SM. Occurrence of aflatoxin B1 in poultry feed and feed ingredients in Jordan using ELISA and HPLC. Am-Eurasian J Toxicol Sci 2015;7(4):316-20. doi:10.5829/idosi.ajejts.2015.7.4.10172.
52. Shad Z, Ghavami M, Atungulu GG. Occurrence of aflatoxin in dairy cow feed ingredients and total mixed ration. Appl Eng Agric 2019;35(5):679-686. doi:10.13031/aea.13454.
53. Atungulu G, Mohammadi-Shad Z, Wilson S. Mycotoxin issues in pet food. In Ricke S, *et al.*, editors. Food and feed safety systems and analysis. 1st ed. Academic Press 2018:25-44. doi:10.1016/B978-0-12-811835-1.00002-6.
54. Di Gregorio M, de Neeff D, Jager A, Corassin C, de Pinho A, de Albuquerque R, *et al.* Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. Toxin Rev 2014;33(3):125-135. doi:10.3109/15569543.2014.905604.

55. Tomašević-Čanović M, Daković A, Rottinghaus G, Matijašević S, Đuričić M. Surfactant modified zeolites–new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous Mat* 2003;61(1-3):173-180. doi:10.1016/S1387-1811(03)00365-2.