

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Impacto de las aflatoxinas B1/M1 sobre el bienestar de las vacas lecheras y su presencia en productos lácteos<sup>1</sup>

*Derling José Pichardo-Matamoros<sup>2</sup>, Jorge Alberto Elizondo-Salazar<sup>3</sup>*

## RESUMEN

La aflatoxina B1 (AFB1) es la aflatoxina más tóxica y prevalente a nivel mundial, causa aflatoxicosis aguda, tiene efecto carcinogénico y citotóxico en animales y humanos. La AFB1 es un metabolito secundario producido por especies de *Aspergillus*, particularmente, en regiones tropicales y subtropicales. Por lo general, los cereales son los alimentos que representan el riesgo más significativo de exposición para los animales y son los más utilizados en la formulación de alimentos balanceados para las explotaciones lecheras. Las vacas que ingieren alimentos contaminados con AFB1 excretan aflatoxina M1 (AFM1) a través de la leche, a una tasa de transferencia que va desde 0,30 a 7,26%. La AFM1 tiene efecto carcinogénico, pero menos potente que el de la AFB1. La AFM1 es estable a los procesos de pasteurización de la leche empleados en la industria láctea. El consumo de productos lácteos contaminados con AFM1 aumenta el riesgo para padecer cáncer en humanos, lo que la convierte en uno de los problemas más importantes de inocuidad alimentaria. Considerando el impacto en seguridad alimentaria de las AFB1/AFM1 para los animales y el hombre, en este trabajo se proporciona una perspectiva sobre la relación entre AFB1 y los alimentos para las vacas lecheras, la transferencia de AFB1 a AFM1 en la leche y derivados lácteos, efectos sobre los rendimientos productivos y reproductivos en el animal, importancia en la salud pública, así como, las estrategias más convenientes para controlar los niveles de AFB1 y AFM1 en la cadena de producción de la industria láctea. El control del impacto de las AFB1/AFM1 en las lecherías debería incluir un plan de vigilancia y monitoreo en la finca empleando técnicas analíticas confiables sobre muestras de leche provenientes del tanque *in situ* que ayuden a fortalecer las medidas de control sobre los alimentos para garantizar el bienestar de las vacas y la inocuidad alimentaria.

**Palabras clave:** micotoxinas, alimentos balanceados, ganado lechero, leche, salud pública

<sup>1</sup>Este trabajo formó parte del proyecto No. 737-B5-188, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y ED-2746, inscrito en la Vicerrectoría de Acción Social. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

<sup>2</sup>Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Candidato a Doctorado Académico en Ciencias Agrícolas, Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. San José, Costa Rica. [derling.pichardo@ucr.ac.cr](mailto:derling.pichardo@ucr.ac.cr) (<https://orcid.org/0000-0002-5358-0470>).

<sup>3</sup>Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Estación Experimental Alfredo Volio Mata. Cartago, Costa Rica. Autor para correspondencia: [jorge.elizondosalazar@ucr.ac.cr](mailto:jorge.elizondosalazar@ucr.ac.cr) (<https://orcid.org/0000-0003-2603-9635>).

Recibido: 26 junio 2022    Aceptado: 13 noviembre 2020

Esta obra está bajo licencia internacional Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0.



## ABSTRACT

### **Impact of aflatoxins B1/M1 on the welfare of dairy cows and their presence in dairy products.**

Aflatoxin B1 (AFB1) is the most toxic and prevalent aflatoxin worldwide, it causes acute aflatoxicosis, has a carcinogenic and cytotoxic effect in animals and humans. AFB1 is a secondary metabolite produced by *Aspergillus* spp., particularly in tropical and subtropical regions. Generally, cereals are the most significant risk of exposure for animals and are the most widely used in the formulation of feedstuffs for dairy farms. Cows that ingest feedstuffs contaminated with AFB1 excrete aflatoxin M1 (AFM1) through the milk, at a transfer rate from 0.30 to 7.26%. AFM1 has a carcinogenic effect, but is less potent than AFB1. AFM1 is stable to the milk pasteurization processes used in the dairy industry. The consumption of AFM1-contaminated dairy products increases the risk of cancer in humans, making it one of the most important food safety problems. Considering the impact of AFB1/AFM1 on food safety for animals and humans, this paper provides an insight into the relationship between AFB1 and food for dairy cows, the transfer of AFB1 to AFM1 in milk and dairy products, effects on production and reproductive performance in the animal, importance on public health, as well as, the most convenient strategies to control AFB1 and AFM1 levels in dairy industry production chain. Control of the impact of AFB1/AFM1 in dairy farms should include a surveillance and monitoring plan in the farm using reliable analytical techniques, on tank milk samples, on-site that help strengthen feedstuffs control measures to ensure cow welfare and food safety.

**Key words:** mycotoxins, feedstuffs, dairy cattle, milk, public health.

## INTRODUCCIÓN

La aflatoxina B1 (AFB1) forma parte de las aflatoxinas (AFs) dentro de un grupo conocido como micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de origen fúngico, con bajo peso molecular (<1000 kDa), naturales y prácticamente inevitables (Escrivá, Font, Manyes y Berrada, 2017; Medina, González-Jartín y Sainz, 2017). Las AFs B1, B2, G1 y G2 son las micotoxinas con mayor potencial tóxico, producidas principalmente por *Aspergillus* spp. De estas, la AFB1 es la más tóxica y prevalente a nivel mundial, tiene potencial carcinogénico y citotóxico en animales y humanos (Marchese et al., 2018; Barac, 2019; Mohammedi-Ameur, Dahmane, Brera, Kardjadj y Ben-Mahdi, 2020; Amin, Zakaria, El-Naga y Ahmed, 2020).

La ingesta de alimentos contaminados con AFB1 causa aflatoxicosis. Los bovinos que ingieren elevadas concentraciones de AFs (600-33.500 µg/kg) presentan aflatoxicosis aguda. En vacas lecheras puede presentarse reducción de la ingesta de alimento, ganancia de peso, motilidad del rumen, producción de leche y capacidad reproductiva, provoca inmunosupresión,

hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y la muerte (Adams, Kephart, Ishler, Hutchinson y Roth, 2016; Kemboi et al., 2020). Sin embargo, en vacas que consumen alimentos contaminados con 15-40µg de AFB1/kg de materia seca (MS) podría ocurrir una intoxicación crónica con problemas reproductivos erróneamente asociados con infecciones comunes en el hato o alteraciones metabólicas subclínicas (Amin et al., 2020; Wang et al., 2020).

Además, el consumo de alimentos contaminados con AFB1 por vacas lactantes genera AFM1 como producto de la hidroxilación hepática de la AFB1 (Gonçalves et al., 2017; Seid y Mama, 2019; Rodríguez-Blanco, Ramos, Prim, Sanchis y Marín, 2019a). La producción de leche y la tasa de transferencia de AFB1 desde el alimento contaminado a AFM1 en la leche (desde 0,30 hasta 7,26%) están altamente correlacionados de manera positiva (Agus, Khuluq, Sumantri, Noviandi y Nuryono, 2010; Britzi et al., 2013; Intanoo et al., 2020). Por tanto, el fracaso en la vigilancia y monitoreo de la inocuidad de los alimentos e ingredientes para alimentos balanceados conduce al consumo de productos lácteos nocivos, que incrementan el daño causado por la AFB1 en la salud pública (Gonçalves et al., 2017; Mahato et al., 2019).

La AFM1 es clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como un carcinógeno del grupo 2B, lo cual la califica como posible carcinógeno para humanos (Barac, 2019). La AFM1 se mantiene estable en los procesos de pasteurización utilizados en la manufactura de productos lácteos (Shahbazi, 2017; Chen et al., 2019), por lo que, la exposición del ser humano a la AFM1 por medio del consumo de estos productos representa uno de los problemas de inocuidad alimentaria más significativos en la industria láctea y está estrictamente regulado (Shahbazi, 2017; Chen et al., 2019; Seid y Mama, 2019).

La contaminación de los alimentos con AFB1 y de los productos lácteos con AFM1 son problemas universales que impactan negativamente la salud de los animales y el rendimiento productivo, así como, la salud pública. Esta revisión describe la relación entre AFB1 y los alimentos para vacas lecheras, la transferencia de AFB1 a AFM1 en la leche e impacto sobre los derivados lácteos, efectos de la AFB1 sobre la salud de las vacas lecheras, importancia en salud pública, así como, las estrategias más prometedoras para el control y reducción de los niveles de AFB1 y AFM1 en la cadena de producción de la industria láctea.

### **Impacto de la AFB1 sobre los alimentos para vacas lecheras**

La incidencia de AFs varía desde 2,0 hasta 82,0% a nivel mundial (Biomin, 2019). La prevalencia de la AFB1 es más elevada en países de la región tropical y subtropical debido al clima cálido y húmedo favorable para el crecimiento de hongos aflatoxigénicos (Seidy Mama, 2019; Mahato et al., 2019). La contaminación de los alimentos puede ocurrir dentro o fuera de la finca. En primer lugar, la infestación con *Aspergillus* de los ingredientes primarios es

elemental para la producción de AFs, aunque su presencia no indica contaminación con AFs (Molina, Zamora-Sanabria y Granados-Chinchilla, 2017; Ogunade et al., 2018).

La exposición de los animales a las AFs ocurre principalmente por medio del consumo de cereales, subproductos de cereales, yuca, maní, soya, subproductos de frutas o verduras, alimentos balanceados y sus ingredientes contaminados (Granados-Chinchilla et al., 2017a). El grado de contaminación dependerá principalmente del crecimiento y cepas de hongos aflatoxigénicos, tipo de estrés que experimenta el hongo, tipo de alimento, condiciones de almacenamiento, temperatura, humedad ambiental y cantidad de agua presente en el alimento (Molina et al., 2017; Favaretto-Variante et al., 2018; Peles et al., 2019); entre otras características inherentes a la región geográfica, al tipo de finca (Hashemi, 2016; Makau, Matofari, Muliro y Bebe, 2016; Mongkon, Sugita-Konishi, Chaisri y Suriyasathaporn, 2017) y a la microbiota presente en el alimento (Yin, Yan, Jiang y Ma, 2008; Ehrlich, 2014; Carvalho et al., 2016; García-Díaz, Gil-Serna, Vázquez, Botia y Patiño, 2020).

En general, la concentración máxima permisible de AFs en los alimentos balanceados y sus ingredientes siguen los lineamientos propuestos por la Unión Europea (UE) o por la Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (Kemboi et al., 2020). Así, el límite máximo de AFB1 establecido por la UE fue de 5  $\mu\text{g}$  de AFB1/kg de alimento, pero el fijado por la FDA fue de 20  $\mu\text{g}$  de AFs/kg de alimento balanceado para ganado lechero (Food and Drug Administration, 2000; European Union, 2010; Ogunade et al., 2018; Kemboi et al., 2020) debido a que los alimentos contaminados con una concentración  $\leq$  20  $\mu\text{g}$  de AFB1/kg de MS difícilmente excederán el límite máximo de AFM1 en leche establecido por la FDA (0,5  $\mu\text{g}$  de AFM1/kg de leche) (Xiong, Wang, Zhou y Liu, 2018; Intanoo et al., 2020). En Costa Rica, el límite máximo de las AFs en los alimentos balanceados y sus ingredientes se fijó en 20  $\mu\text{g}$ /kg de alimento (Granados-Chinchilla et al., 2017a).

A nivel mundial, la incidencia de AFs es baja en ensilados conservados de forma adecuada; sin embargo, Ogunade et al. (2018) describe un rango desde 0 hasta 156  $\mu\text{g}$  de AFs/kg de MS en ensilados de maíz, cuya concentración de AFs varía según la región intercontinental y la calidad del maíz para ensilar. Además, el maíz es el cereal con la más alta prevalencia de AFs y el ensilado de maíz u otros alimentos pueden contener una mezcla de micotoxinas (Amigot, Fulgueira, Bottai y Basílico, 2006; Reyes-Velázquez et al., 2008; Biomin, 2019; Borutova, 2019; García-Díaz et al., 2020; Rodríguez-Blanco, Ramos, Sanchis y Marín, 2019b).

Cuando el manejo agronómico de los pastos y el ensilaje se realizan adecuadamente, la contaminación por micotoxinas no es significativa (Bernardes et al., 2018; Ogunade et al., 2018). En ambientes con temperaturas de 15 a 25°C predominan las bacterias heterolácticas, aunque un inoculante adicional con bacterias heterolácticas puede ayudar a mantener la

estabilidad aeróbica por más tiempo para evitar el crecimiento de hongos micotoxigénicos (Bernardes et al., 2018). No obstante, *Aspergillus flavus* puede infectar los pastos en el campo y durante el almacenamiento, con frecuencia, cuando las temperaturas son mayores a 32°C y la humedad relativa mayor a 80%. Por ejemplo, en Brasil se demostró la presencia de *Aspergillus spp.*, en 20,3% de las muestras de maíz almacenado en bolsas herméticas durante el invierno, mientras, un 83,3% de las muestras fueron afectadas durante el verano. La concentración máxima de AFs en invierno fue de 14,5 µg/kg de alimento y en verano fue de 197,5 µg/kg de alimento. En general, la temperatura ambiental osciló entre 15-22°C y la humedad relativa entre 60-90% durante los ensayos de ensilaje de maíz, lo que indica que ensilar en verano aumenta el riesgo de contaminación con AFB1 para el ensilado (Domenico et al., 2016).

En América, la región con mayor incidencia de AFs es América del Sur (30%) (Biomin, 2019). En los países donde la prevalencia de AFs es elevada, la concentración de AFB1 ingerida en animales dependerá de la tasa de arrastre de AFs en todos los puntos de la obtención y fabricación de los alimentos (Molina et al., 2017). Conocer el escenario sobre la incidencia de AFB1 en los alimentos permite identificar las regiones de mayor riesgo para importar materias primas, con el propósito de reducir la exposición de las vacas lecheras a la AFB1 en las fincas (Cuadro 1).

La prevalencia de AFs en alimentos balanceados para vacas lecheras en Latinoamérica varía desde 0,01-290,0 µg/kg, donde el maíz como ingrediente representa el riesgo más elevado (Cuadro 1). Por su parte, en la región anglosajona se informó una incidencia de 0% (Borutova, 2019) (Cuadro 1), mientras Biomin (2019) describe un 4% y Gruber-Dorninger, Jenkins y Schatzmayr (2019) reportaron un 10,5% (574/5471) de muestras positivas para la presencia de AFB1 con una media de 8,7 µg de AFB1/kg de alimento.

Con respecto a los hatos lecheros de Costa Rica, estos son muy diversos y los sistemas de producción se diferencian principalmente por el nivel de intensificación, piso altitudinal y la orientación productiva. En general, la alimentación del ganado incluye forraje, alimento balanceado y suplementos (Vargas-Leitón, Solís-Guzmán, Sáenz-Segura y León-Hidalgo, 2013). Los pastos más utilizados son estrella africana (*Cynodon nlemfuensis* Vanderyst), kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst), raigrás (*Lolium perenne* L.) (Granados-Chinchilla, 2017b), avena (*Avena sativa*) (Sánchez-Ledezma y Hidalgo-Ardón, 2018), maíz criollo (*Zea mays*), sorgo negro forrajero (*Sorghum almum*), Taiwán (*Pennisetum purpureum*) (Elizondo-Salazar, 2017), Tifa (*Typhadomingensis*) (WingChing-Jones y Leal-Rivera, 2018) y Camerún (López-Herrera, Rojas-Bourrillon y Zumbado-Ramírez, 2017). Por su parte, Arce-Ramírez, Rojas-Bourrillon y Campos-Granados (2020) amplían la lista de especies forrajeras utilizadas para la alimentación del ganado en Costa Rica con el Ratana, Mulato y Mombaza.

También, producto del programa de vigilancia para AFs desde el 2010 al 2016 en Costa Rica, se logró determinar una prevalencia de 24,0% (233/970) para la presencia de AFs en los alimentos balanceados y sus ingredientes (rango de 0,01 a 290,0 $\mu$ g/kg de alimento), pero sólo el 2,5% (24/970) de las muestras no cumplieron con el límite máximo de AFs (20  $\mu$ g/kg). El ingrediente mayormente afectado fue el maíz, no obstante, gran parte del maíz fue importado de regiones con alta prevalencia de AFs (AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2) (Granados-Chinchilla et al., 2017a; Molina, Chavarría, Alfaro-Cascante, Leiva y Granados-Chinchilla, 2019). Por su parte, en alimento balanceado para ganado lechero se estimó una prevalencia de 23,6% (58/246), en ensilado+heno [7,6% (25/330)], en heno [7,8% (25/322)] y en forrajes [0,0% (0/31)], en conjunto, sólo el 1,8% (17/929) de las muestras positivas para la presencia de AFs superaron el límite máximo de 20 $\mu$ g de AFs/kg de alimento comúnmente empleado en el ganado (Granados-Chinchilla et al., 2017a).

### Transferencia de AFB1 a AFM1 en la leche e impacto sobre los productos lácteos

Las vacas que consumen alimentos con AFB1 muestran residuos de AFM1 en la leche dentro de 12-24 horas después de ingerir el alimento contaminado y hasta el quinto día después de retirar el alimento contaminado con AFB1, a una tasa de transferencia desde 0,30 hasta 7,26% (Agus et al., 2010; Marchese et al., 2018; Seid y Mama, 2019; Intanoo et al., 2020; Kemboi et al., 2020; Vaz, Cabral-Silva, Rodrigues y Venâncio, 2020). La transferencia de AFB1 a AFM1 en la leche está correlacionada con la producción de leche, siendo las vacas con mayor producción las que secretan los niveles más altos de AFM1. Además, la transferencia de AFB1 a AFM1 en la leche también dependerá de factores intrínsecos del animal (Agus et al., 2010; Britzi et al., 2013; Wang et al., 2019; Mohammedi-Ameur et al., 2020); por ejemplo, la microflora del rumen degrada la AFB1 en metabolitos menos tóxicos, en particular, bacterias dentro del género *Streptococcus* o *Lactobacillus* degradan la AFB1 a aflatoxicol, AFB2a y AFD1 no tóxica (Loh, Ouwerkerk, Klieve, Hungerford y Fletcher, 2020).

En general, el límite máximo de AFM1 en la leche y productos lácteos, según lo estipulado por las autoridades sanitarias a nivel internacional, oscila desde 0,0 hasta 1,0  $\mu$ g de AFM1/kg de producto lácteo (Becker-Algeri et al., 2016; Gonçalves et al., 2017). La UE estableció un límite máximo muy estricto de 0,05  $\mu$ g de AFM1/kg para adultos y 0,025  $\mu$ g de AFM1/kg de fórmula para niños (European Union, 2010), mientras, la FDA estableció un límite máximo de 0,50  $\mu$ g de AFM1/kg (Food and Drug Administration, 2000; Frazzoli, Gherardi, Saxena, Belluzzi y Mantovani, 2017; Molina et al., 2017; Negash, 2018; Kemboi et al., 2020; Vaz et al., 2020). Por su parte, en Costa Rica se estableció un límite máximo de 0,50  $\mu$ g de AFM1/kg (Chavarría, Granados-Chinchilla, Alfaro-Cascante y Molina, 2015).

**Cuadro 1.** Ocurrencia de aflatoxinas en alimento balanceado, forrajes y ensilados para vacas lecheras en América.

País	Alimento	Aflatoxina	Prevalencia	Rango (µg/kg)	Técnica	Referencia
USA	Maíz y ensilado de maíz	AF	0,0% (0/48)	ND	LC MS/MS <sup>a</sup>	Borutova, 2019
México	Ensilado de maíz	AF	ND	12,5-15,7	ELISA	Reyes-Velázquez et al., 2008
México	Alfalfa, sorgo y pasto bufel	AF	49,0%(59/120)	0,5-2,7	ELISA	Huerta-Treviño et al., 2016
Argentina	Alfalfa, maíz y sorgo	AF	43,0%(42/98)	0,5-80,0	ELISA	Amigot et al., 2006
Argentina	Ensilado de maíz	AFB1	17,0%(6/35)	1,4-155,8	HPLC	González-Pereyra et al., 2008
Brasil	Concentrado, ensilado de maíz o sorgo, semilla de algodón o soya	AF	17,0%(17/98)	>2,0-29,0	TLC	Sassahara et al., 2005
Brasil	Ensilado de maíz	AFB1	13,0%(15/116)	2,0-61,0	TLC/HPLC	Keller et al., 2013
Brasil	Ensilado de maíz	AFB1	0,9%(3/327)	1,0-6,0	LC-MS/MS	Schmidt et al., 2015
Uruguay	Ensilado de trigo	AF	ND	6,1-23,3	ELISA	Del Palacio et al., 2016
Costa Rica	Concentrado, ensilado, heno, forraje, otros	AF	23,6% (233/970)	0,01-290,0	ELISA/HPLC	Granados-Chinchilla et al., 2017a

<sup>a</sup> Límite de detección fijado en 20 µg de aflatoxinas/kg; (ND) no detectado; (ELISA) ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas; (TLC) cromatografía de capa fina; (HPLC) cromatografía líquida de alta eficiencia; (LC-MS/MS) cromatografía líquida y espectrometría de masas.

La tasa de transferencia de AFB1/AFM1 es muy variable dentro de un mismo hato. Britzi et al. (2013) determinaron en vacas Holstein de Israel una tasa de transferencia de 5,8% y 2,5% a las 8-20 semanas y 33-46 semanas de la lactancia, respectivamente. Rodríguez-Blanco et al. (2019a) describieron una tasa de transferencia de AFB1/AFM1 de 0,6-6,0%. Por su parte, Adams et al. (2016) reportaron que los niveles de AFM1 en la leche exceden el máximo legal establecido por la FDA (0,5 µg/kg) dentro de cuatro a seis días en dietas (ración total) con más de 40 a 50 µg de AFs/kg de MS y que las concentraciones de AFM1 disminuyen en dos a cuatro días cuando la dieta es baja en AFs.

En tal sentido, van derFels-Klerx y Camenzuli (2016) realizaron un ensayo de cálculo computacional que mostró un aumento sustancial de AFM1 en la leche en las semanas en las que se incluyó maíz contaminado en la dieta. El cambio en la dieta ayudó a superar el límite máximo establecido por la UE (0,05 µg de AFM1/kg). También observaron que el aumento de la producción de leche tiene un efecto mínimo en la superación del umbral de AFM1 debido a un efecto de dilución. Por lo que, para estimar el riesgo de contaminación de la leche con AFM1 y evitar la producción de leche nociva, debería considerarse el régimen de alimentación, la composición de la contaminación de los alimentos compuestos con AFB1 y los forrajes para las vacas lecheras.

Con base en lo anterior, si la leche es un recurso con gran valor nutricional e indispensable en neonatos, aporta macro y micronutrientes que favorecen el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la salud en seres humanos (Seid y Mama, 2019) y las vacas metabolizan la AFB1 a AFM1, la cual es secretada en la leche durante la lactancia, los seres humanos consumidores de productos lácteos estarán expuestos a altos niveles de AFM1 debido a que es resistente a la pasteurización y al congelamiento (Molina et al., 2017; Chen et al., 2019; Barac, 2019).

Por tanto, la evaluación del riesgo de exposición a la AFM1 a través del consumo de leche y productos lácteos, es útil para medir el riesgo de cáncer de hígado. Esto es estimado por la determinación de índices como la ingesta diaria (ID, expresada en ng de AFM1/kg de peso corporal/día) y el índice de peligro (IP) para indicar el riesgo en seres humanos (un valor de  $IP > 1$  indica riesgo para los consumidores) (Nejad, Heshmati y Ghiasvand, 2019). Además, se necesita el valor de Kuiper-Goodman sobre la ingesta diaria tolerable ( $IDT=2$  ng de AFM1/kg de PV/día) para estimar el  $IP=ID/IDT$  (Quevedo-Garza, Amador-Espejo, Salas-García, Ramos-Peña y Trujillo, 2020). Por ejemplo, en Italia, Brasil y Jordania el consumo de leche no representa un riesgo, mientras, en México ( $IP=7,0$ ) e Indonesia ( $IP=2,6$ ) los infantes y niños están en riesgo cuando consumen leche con el nivel máximo de ID reportado para la AFM1 (Cuadro 2). Por esta razón, la exposición de los niños a la AFM1 por medio del consumo de



productos lácteos es relevante el control de la exposición a la AFM1 en seres humanos es estrictamente regulado (Becker-Algeri et al., 2016; Frazzoli et al., 2017).

Conocer el panorama mundial de la incidencia de AFM1 en productos lácteos ayuda a disminuir la exposición de los consumidores a los riesgos que esto representa. En muestras evaluadas en Costa Rica, Indonesia, Pakistán, Nigeria y Egipto se determinó al menos una muestra de leche con un nivel máximo superior al establecido por la FDA (0,50  $\mu\text{g}$  de AFM1/kg o 500 ng de AFM1/kg) (Cuadro 2). Además, la incidencia de AFM1 en la leche genera pérdidas económicas cada vez más significativas, particularmente en la UE debido al incumplimiento del límite máximo establecido por las autoridades (0,05  $\mu\text{g}$  de AFM1/kg o 50 ng de AFM1/kg), que es difícil de lograr en comparación al establecido por la FDA, pero brinda mayor protección al consumidor (Wu y Turna, 2019). Por ejemplo, en una fórmula de leche infantil de dos países de América, Ishikawa et al. (2016) describen un límite máximo de 0,046 ng de AFM1/kg, mientras Quevedo-Garza et al. (2020) determinaron en un 20% (11/55) de las muestras, concentraciones desde 40 hasta 450 ng de AFM1/kg, por lo que, estas últimas fórmulas de leche infantil no cumplen con el límite establecido por la UE (25 ng de AFM1/kg).

En Costa Rica, se determinaron concentraciones desde 19 hasta 629 ng de AFM1/kg de leche, y en queso fresco los niveles oscilaron entre 31 y 276 ng de AFM1/kg. En 30 muestras de leche y 10 muestras de queso, las concentraciones de AFM1 superaron los umbrales de concentración establecidos por la UE (50 ng de AFM1/kg) (Chavarría et al., 2015). La tasa de transferencia de AFM1 desde la leche al queso fue de 383 a 961%, mientras, en el suero fue de 57 a 78% (Krstović, Popović-Vranješ, Kasalica, Jevtić y Jajić, 2018). Costamagna et al. (2019) reportaron una tasa de transferencia de la leche al queso y suero de 40 y 60%, respectivamente. Las diferencias en la tasa de transferencia de AFM1 a los distintos productos lácteos se deben al contenido de AFM1 en la leche empleada para su fabricación (Krstović et al., 2018), a la tecnología empleada para su elaboración (por ejemplo, el proceso fermentativo del yogurt reduce la concentración de AFM1) (Rahimirad, Malekinejad, Ostadi, Yeganeh y Fahimi, 2014; Mozafari, Mohsenzadeh y Mehrzad, 2017) y al proceso de coagulación de la leche debido a la unión de la AFM1 con la caseína de la leche en un 81%, como resultado, la AFM1 se concentra a un alto nivel en el queso (Chavarría et al., 2017; Frazzoli et al., 2017). No obstante, la maduración del queso reduce los niveles de AFM1 posiblemente por la unión de la AFM1 con la  $\alpha$ -lactoalbúmina en un 88% durante el drenaje del suero y por la presencia de bacterias ácido lácticas, las cuales son factores asociados con la reducción de la AFM1 (Chavarría et al., 2017; Panwar, Kumar, Kashyap, Ram y Kapila, 2019).



**Cuadro 2.** Incidencia de AFM1 en leche y productos lácteos a nivel mundial.

País	Tipo de muestra	Número de Muestras	Incidencia (%)	Rango AFM1 (ng/kg)	Técnica	ID <sup>a</sup> (ng AFM1/kg PV/día)	Referencia
Brasil	Fórmula leche infantil	16,0	43,8	ND - 0,046	HPLC	0,078-0,306	Ishikawa et al., 2016
Uruguay	Leche	18,0	100,0	5,0- 80,0	ELISA	ND	Capelli et al., 2019
México	Formula leche infantil	55,0	20,0	40,0- 450,0	HPLC-FLD	1560-14000	Quevedo-Garza et al., 2020
El Salvador	Leche	157,0	73,0	5,0 - >50,0	ELISA	ND	Peña-Rodas et al., 2018
Costa Rica	Leche, queso	140,0	66,4	20,0 - >500,0	HPLC-FLD	ND	Chavarría et al., 2015
Indonesia	Leche	42,0	92,5	24,0- 570,0	ELISA	1230-5260	Sumantri et al., 2019
Italia	Leche	31702,0	ND	2,6 - 21,9	ELISA HPLC-FLD	0,025-0,328	Serraino et al., 2019
Jordania	Fórmula leche infantil	120,0	48,3	<5,0 - 213,8	ELISA	1,554	Awaisheh et al., 2019
Turquía	Leche, queso y yogurt	150,0	29,3	0,8 - 130,9	ELISA	ND	Temamogullari y Kanici, 2014
China	Leche	1207,0	4,6	25,5 - 60,0	ELISA	ND	Li S et al., 2018
Irán	Leche, queso, crema y yogurt	300,0	ND	15,0- 211,0	HPLC	ND	Rahimirad et al., 2014
Pakistán	Leche	240,0	53,0	230,0- 1180,0	ELISA	ND	Akbar et al., 2020
India	Leche	150,0	45,3	4,0- 48,0	ELISA HPLC	ND	Nile et al., 2016
Nigeria	Leche, queso, nono y yogurt	100,0	38,0	10,9 - 1530,2	HPLC	ND	Makun et al., 2016
Egipto	Leche, crema y mantequilla	60,0	26,6	27,0- 593,0	HPLC	ND	Homouda et al., 2016

<sup>a</sup> Ingesta diaria de AFM1; (ND) no detectado, (ELISA) ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas; (HPLC) cromatografía líquida de alta eficiencia; (HPLC-FLD) cromatografía líquida de alta eficiencia con detector fluorescente.

Finalmente, es elemental dilucidar la naturaleza real del riesgo de consumir productos lácteos con AFM1 para la salud pública debido a que se generan falsas percepciones sobre la asociación entre AFs con el retraso en el crecimiento y la diferenciación entre el potencial tóxico de la AFB1 versus la AFM1, que pueden conducir al rechazo de los productos lácteos por parte de los consumidores y a la parálisis de la industria láctea (Wu y Turna, 2019).

### **Metabolismo de la AFB1 e intoxicación**

Las AFs pueden causar retraso en el crecimiento, inmunosupresión, aflatoxicosis aguda o carcinoma hepatocelular. En humanos y animales susceptibles, las AFs son metabolizadas por el citocromo P450 (CYP450). El metabolismo de la AFB1 ocurre en el hígado por medio de la acción enzimática de las isoformas CYP1A2 y CYP3A4. Ambas isoenzimas catalizan la biotransformación de AFB1-exo-8-9-epóxido, una especie de oxígeno reactivo que puede unirse a las proteínas y causar aflatoxicosis aguda o al ADN formando aductos AFB1-8-9 epóxido-N7-guanina que altera el ADN e induce cáncer. El CYP1A2 también puede catalizar la biotransformación de AFB1 a AFB1-endo-8-9-epóxido y la hidroxilación de la AFB1 para formar AFM1 en bovinos (Marchese et al., 2018) y en humanos (Eaton, Beima, Bammler, Riley y Voss, 2010). Además, existen otros medios enzimáticos que generan metabolitos tóxicos y proteínas de unión para favorecer la desintoxicación de AFB1, sin embargo, la alquilación de la guanina por la AFB1 es muy fuerte y se produce AFB1-exo-8,9-epóxido en mayor cantidad (Peles et al., 2019; Seid y Mama, 2019). En mamíferos lactantes, la AFB1 puede ser biotransformada a AFM1 en el hígado y se excreta a través de la orina, bilis, heces y la leche. No obstante, parte de la AFB1 se bioacumula en el hígado y también puede excretarse como AFB1 u otros metabolitos tóxicos a través de la leche, orina y heces (Becker-Algeri et al., 2016; Pate, Paulus-Compart y Cardoso, 2018; Barac, 2019).

### **Efectos sobre el bienestar y rendimiento productivo del animal**

Aunque el impacto negativo de las AFs sobre el bienestar de las vacas, rendimiento productivo y reproductivo es controvertido, se reconoce que las AFs inducen toxicidad aguda en el ganado lechero cuando se ingiere a un nivel superior a 100 µg/kg, en dependencia del peso y de la edad (Adams et al., 2016; Kemboi et al., 2020). Los rumiantes muestran mayor resistencia a ciertas micotoxinas en comparación con los animales monogástricos, lo cual se atribuye a la actividad microbiana del rumen para modificar la estructura química de las micotoxinas en compuestos menos tóxicos. Por lo que, los terneros son más susceptibles que los adultos (Bertin, Jouany y Yiannikouris, 2009; Molina et al., 2017; Intanoo et al., 2018; Wang et al., 2019; Kemboi et al., 2020).

La aflatoxicosis aguda se ha asociado con la ingesta de elevadas concentraciones de AFs (600-33.500 µg/kg). En ganado lechero se presenta con hiporexia; reducción de la ganancia de peso,

motilidad del rumen, producción de leche y capacidad reproductiva; además, aumenta la incidencia de laminitis, provoca inmunosupresión, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y la muerte (Adams et al., 2016; Molina et al., 2017; Kemboi et al., 2020).

Se han realizado algunos estudios experimentales para fortalecer las evidencias sobre el impacto de la AFB1 en la salud de los rumiantes. Naseer et al. (2017) determinaron en búfalos de 6 a 12 meses de edad, mediante el suministro de una dieta contaminada con 0,6 hasta 1,0 mg de AFB1/kg de alimento, que la ganancia de peso disminuye de manera dependiente de la dosis con mayor intensidad a partir de la segunda semana de intoxicación; mientras que la reducción del consumo de MS fue más significativa en animales alimentados con 1,0 mg de AFB1/kg de alimento durante los 28 días de duración del experimento de forma dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. También se ha determinado en vacas Holstein lactantes una reducción sérica de  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa y de la capacidad total antioxidante; alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos (por ejemplo: aumento de la fenilalanina en el fluido ruminal, en consecuencia, su reducción en plasma y la leche), ácidos grasos volátiles y  $\text{NH}_3\text{-N}$  en el fluido del rumen, empleando una dieta contaminada con AFB1 (20 o 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en vacas Holstein lactantes por siete (Wang et al., 2019) y catorce días (Wang et al., 2020).

Por su parte, Amin et al. (2020) determinaron en vacas y búfalos alimentados con una dieta contaminada con un promedio de 15,0 y 120,6  $\mu\text{g}$  de AFB1/kg de alimento, la manifestación de problemas reproductivos como abortos, nacimientos de terneros con bajo peso, natimortos y reabsorción fetal con mayor incidencia para la dosis más alta. Aunque no hubo asociación significativa entre la AFB1 con la producción de leche, conteo de células somáticas, contenido de proteínas y grasa en la leche. Asimismo, Rodrigues et al. (2019) y Wang et al. (2019) no encontraron evidencias significativas sobre cambios en la ingesta de alimento, en la composición de la leche, conteo de células somáticas e inmunidad en vacas que ingirieron 106,5  $\mu\text{g}$  de AFs/kg de MS y 20 o 40  $\mu\text{g}$  de AFB1/kg de alimento, respectivamente. Es probable, que sea más frecuente la aflatoxicosis crónica causada por la exposición a niveles bajos de AFs a lo largo del tiempo. Este hecho, plantea un problema de salud mucho más común para los animales y una preocupación de seguridad alimentaria en la salud pública (Kemboi et al., 2020).

### **Efecto de la AFB1 en la salud pública**

La ingestión de AFs por medio de alimentos contaminados es un serio problema de inocuidad alimentaria en humanos (Mahato et al., 2019). De las AFs, la AFB1 es la más abundante y potente, está considerada como un hepatocarcinógeno del grupo I en humanos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Wu, Groopman y Pestka, 2014; Chhonker, Rawat, Naik y Koiri, 2018; Mohammedi-Ameur et al., 2020). Además, el riesgo de exposición media a las AFs a

través de la dieta es muy bajo en países desarrollados (<1ng/kg de peso corporal al día) en comparación con regiones en vías de desarrollo; por ejemplo, la región de África subsahariana (>100 ng/kg de peso corporal al día) y la exposición con AFM1 rara vez ha superado dosis de 1ng/kg de peso corporal al día (WorldHealthOrganization, 2018).

El impacto real de la AFM1 en la salud es muy difícil de estimar debido al efecto múltiple de AFs e interacciones con otras micotoxinas, equivalentes tóxicos u otros agentes con efecto similar que contaminan los alimentos (Dellafiora, Dall'Asta y Galaverna, 2018; Peles et al., 2019; García-Díaz et al., 2020), además la dosis letal de AFs en humanos y animales varía desde 0,02 a 20,0 mg/kg de peso vivo (Benkerroum, 2020). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasifica a la AFM1 como un carcinógeno del grupo 2B (posible carcinógeno para humanos). Además, los humanos que consumen productos lácteos con AFM1 también pueden ingerir otros alimentos que contienen AFB1 y las madres pueden transferir AFM1 a los infantes lactantes a través de la leche (Makun et al., 2016; Marchese et al., 2018; Barac, 2019).

Los humanos se exponen a la AFM1 mediante el consumo de productos lácteos contaminados y se reconoce que los niños tienen mayor predisposición a los efectos tóxicos de la AFM1 mediante el consumo de fórmula de leche infantil. La AFM1 es tóxica como la AFB1, pero es diez veces menos potente como sustancia carcinogénica en comparación con la AFB1 (Favaretto-Variante et al., 2018; Serraino et al., 2019).

Por lo señalado, se ha tratado de estimar el efecto de la AFM1, asumiendo que haya sido el único factor determinante sobre afecciones multifactoriales como el desarrollo de cáncer y el retraso en el crecimiento. Ahlberg, Grace, Kiarie, Kirino y Lindahl (2018) determinaron que el riesgo general para el cáncer fue de 0,004 casos por cada 100.000 habitantes, mientras los niños mostraron una reducción promedio del crecimiento de -0,340 del puntaje-z de talla para la edad o HAZ (height-for-age z-score). La exposición a AFM1 desde leche con 46,0 ng/día, provoca una exposición en niños de 3,5 ng de AFM1/kg PV/día y en adultos apenas 0,8 ng/kg PV/día. Serraino et al. (2019) determinaron una ingesta diaria de 0,025 a 0,328 ng de AFM1/kg PV/día y un IP en niños de 1,40 y 1,64; también estimaron la incidencia de cáncer de hígado atribuida a la ingesta de AFM1 considerando la incidencia del virus de la hepatitis B, el resultado mostró una incidencia de 0,004 y 0,005 casos por 100.000 niños en riesgo. Aun considerando todas las AFs, Watson et al. (2018) encontraron un efecto pequeño pero significativo de la exposición a AFs en el crecimiento de los bebés gambianos, pero no se asoció con cambios en el eje del factor de crecimiento insulínico. Por lo que, se necesitan más datos para dilucidar el mecanismo de acción y confirmar el efecto real de la AFM1 en la salud pública debido al consumo de productos lácteos nocivos (Ahlberg et al., 2018; Li H., Xing, Zhang, Wang y Zheng, 2018; Marchese et al., 2018; Wu y Turna, 2019).

## Control de las concentraciones de AFB1 en alimentos balanceados para el consumo animal y de AFM1 en la leche

Dado que, la contaminación de los alimentos balanceados para la alimentación animal con ingredientes con AFB1 es un problema mundial e inevitable (Gruber-Dorninger et al., 2019), es importante implementar estrategias de control o de descontaminación de AFs para garantizar el suministro de alimentos sin AFs a las vacas lecheras o con concentraciones menores de AFs a las establecidas por las autoridades sanitarias (Molina et al., 2017; De Freitas, Gonçalves y da Silva-Nascente, 2018; Ogunade et al. 2018). El fracaso de este aspecto, puede conducir al consumo de productos lácteos nocivos que incrementan el daño causado por la AFB1 en la salud pública (Assaf et al., 2019; Mahato et al., 2019).

Para evitar la exposición de los consumidores de productos lácteos, a niveles peligrosos de AFM1, los productores deberían estimar el riesgo real para superar el límite máximo de AFM1 en la leche (por ejemplo, en la UE=50 ng/kg o en los Estados Unidos=500 ng/kg) cuando se suministra a los animales alimentos contaminados con AFB1. Para lograrlo, es elemental valorar muestras de leche del tanque de refrigeración (Gonçalves et al., 2017; Rodríguez-Blanco et al., 2019a), lo que resulta muy práctico para conocer los niveles de AFB1 en los alimentos, orienta el uso y manejo de descontaminantes, permite calcular cuánto debería consumir una vaca para extrapolarlo a nivel de hato y estimar *a priori* el nivel de AFM1 en la leche.

No obstante, cumplir con el límite máximo de AFB1 en los alimentos (UE=5 µg/kg o FDA=20 µg/kg) destinados para vacas lecheras no es garantía para obtener niveles de AFM1 en la leche por debajo del límite requerido (Becker-Algeri et al., 2016; Rodríguez-Blanco et al., 2019a). Por lo que, en las fincas lecheras y en las fábricas de productos lácteos es necesario implementar algunas medidas adicionales de control y reducción de las concentraciones de AFs, orientada sobre la base de un buen diagnóstico (Giovati et al., 2015).

### Detección y cuantificación de aflatoxinas

Muchas de las técnicas desarrolladas para cuantificar AFs en muestras de alimentos balanceados y productos lácteos, como: los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS) y cromatografía líquida de alta eficiencia con detector fluorescente (HPLC-FLD) son ensayos muy costosos, utilizan equipos muy complejos, demandan mucho tiempo y personal especializado (Chen et al., 2019; Vaz et al., 2020). Por lo que, el inmunoensayo de flujo lateral (LFI) para detectar AFM1 (Wang et al., 2018) y la detección de AFM1 en muestras de leche utilizando un dispositivo analítico basado en papel microfluídico (µPAD)

(Kasojuet al., 2020) son soluciones novedosas para monitorear la concentración de AFM1 en muestras de leche, además, son pruebas de bajo costo y fáciles de realizar en campo (Chen et al., 2019; Kasoju et al., 2020).

### Estrategias de mitigación de aflatoxinas

La degradación o inactivación de las AFs en los alimentos balanceados y la leche puede realizarse por métodos físicos, químicos o biológicos y su propósito es reducir la biotransformación de la AFB1 a AFM1 en el animal para disminuir la transferencia hacia la leche o bien sobre la leche para reducir las concentraciones de AFM1 (Giovati et al., 2015; Ogunade et al., 2018; Intanoo et al., 2020; Kemboi et al., 2020). Las estrategias tecnológicas más prometedoras son el uso de adsorbentes (bentonita) más levaduras (Jiang et al., 2018), el biocontrol (levaduras y *Lactobacillus spp.*) (Ren, Zhang, Zhang, Mao y Li, 2020) y la vacunación contra AFs (Kemboi et al., 2020), las cuales se describen a continuación.

### Control mixto por adsorbentes y levaduras

El uso de bentonita (200 g/cabeza/día) con *Saccharomyces cerevisiae* (35 g/cabeza/día) en el alimento contaminado con 1725.0 µg de AFB1/cabeza/día mostró una tasa de transferencia de AFM1 a la leche de 0,94% en vacas tratadas versus 1,65% para el grupo de vacas que no recibieron adsorbentes mediante la dieta. El tratamiento disminuyó la concentración de AFM1 en la leche a 0,40 µg/kg, mientras, en el grupo no tratado fue de 0,75 µg/kg. Ese resultado, demostró que el tratamiento redujo la concentración de AFM1 en la leche a un valor inferior al recomendado por la FDA (0,5 µg/kg) (Jiang et al., 2018). Rodrigues et al. (2019) determinaron en vacas expuestas a 106,5 µg de AFB1/kg de MS no suplementadas con arcilla + *S. cerevisiae* inactivado y en vacas que ingirieron 107,6 µg/kg de MS suplementadas con arcilla + *S. cerevisiae* inactivado, una tasa de transferencia de 2,7 y 1,0% en el grupo no tratado versus el grupo de vacas tratadas, respectivamente. Las vacas que recibieron el adsorbente mineral + *S. cerevisiae* mostraron una concentración de AFM1 en leche de 0,2 µg/kg, mientras el grupo no tratado presentó 0,6 µg/kg, lo que excedió el límite máximo fijado por la FDA.

### Control biológico

Las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Pichiakudriavzevii* mostraron una capacidad desintoxicadora de la AFB1 del 85,0%; mientras, las bacterias *Enterococcus faecium*, *Corynebacterium phoceense* y *Corynebacterium vitae ruminis* del 60,0%. Todos estos microorganismos fueron aislados del rumen y son activos en ambientes anaeróbicos y aeróbicos (Intanoo et al., 2018). Posteriormente, se confirmó en vacas alimentadas con alimentos



contaminados con 22,2µg de AFB1/kg de la ración mixta total y suplementados con *Kluyveromyces* spp., y *Pichiakudriavzevii* YSY2 [levaduras suministradas a razón de 2 g/día (1 x 10<sup>9</sup> UFC/g) en la ración mixta total] una disminución de la concentración de AFM1 en la leche ≤0,50µg/kg en vacas tratadas, mientras que las vacas no suplementadas mostraron 1,54 µg/kg de AFM1 en la leche, además la tasa de transferencia de AFB1 a AFM1 en la leche fue menor al 2,0% en las vacas suplementadas y en las vacas no tratadas fue de 7,2% (Intanoo et al., 2020).

Por su parte, una de las bacterias antagonistas de cepas de *Aspergillus* aflatoxigénicos, son las *Lactobacillus*. Estas bacterias ácido lácticas (BAL) son unas de las más importantes en el control de las AFs porque su inclusión en los alimentos no presenta problemas de palatabilidad o descomposición indeseada del alimento en toda la cadena alimentaria. Las BAL pueden emplearse en el campo y la industria láctea, se unen a la AFM1 en la leche, inhiben el crecimiento de los hongos y la producción de AFs (Assaf et al., 2019; Ren et al., 2020). Gomaa, Abdelall y El-Mahdy (2018) describieron que el uso de *L. brevis* mostró un gran impacto sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y redujo en un 96,3 y 90,4% la producción de AFB1, respectivamente. Además, otro estudio determinó en productos lácteos que la eficiencia de unión de AFM1 por BAL varió de 21,0 a 92,0% para las bacterias viables y de 26,0 a 94,0% para las bacterias inactivadas (Kuharić et al., 2018). El ensayo permitió determinar que el *L. plantarum* KM viable e inactivado mostró la mejor efectividad para unirse con la AFM1, también se observó que el tratamiento térmico en combinación con filtración y centrifugación produjo una eliminación de hasta el 96,0% de la AFM1 (Kuharić et al., 2018), asimismo, Marrez, Shahy, El-Sayed y Sultan (2018) demostraron que *L. acidophilus* logró una reducción del 77,6% de AFB1 en la leche dentro de 24 horas a 37°C, mientras *L. plantarum* fue favorecido por el almacenamiento en frío a 4°C para reducir el 85,2% del contenido de AFB1 después de una semana y Kim et al. (2017) observaron que *L. rhamnosus* GG eliminó eficientemente la AFB1 de leche descremada y leche entera en un 26,6 y 36,6%, respectivamente.

Estudios In vitro han demostrado la efectividad de las BAL, por ejemplo, *Lactobacillus* spp. mostraron alta tasa de desintoxicación al reducir en 60,0% los niveles de AFB1 (Chlebicz y Ślizewska, 2020). Por su parte, las BAL se unen a la AFM1 mediante estructuras de la pared celular (peptidoglicanos y polisacáridos) sin causar la degradación de la AFM1, aunque si reduce la bioaccesibilidad en 32,6 y 52,8% de la AFM1 en leche descremada (Panwar et al., 2019).

### Control por vacunación contra aflatoxinas

La vacunación permite reducir la toxicidad causada por la AFB1 y la transferencia de AFM1 a la leche. Polonelli et al. (2011) y Kemboi et al. (2020) reportaron niveles de AFM1 en la leche desde 46,0 a 74,0% en vacas vacunadas en comparación con las vacas no vacunadas expuestas a la AFB1. La

concentración de AFM1 en la leche fue de 0,137 y 0,134  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en vacas vacunadas, así como de 0,171 y 0,154  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en vacas no vacunadas para el primer y segundo periodo evaluado, respectivamente. Giovati et al. (2014) realizaron una vacunación utilizando una aflatoxina B1 conjugada con hemocianina de lapa californiana, junto con agua y aceite como adyuvante, la vacuna generó la producción de anticuerpos anti-AFB1, lo que permitió lograr una concentración de AFM1 en leche de 0,031  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en vacas vacunadas y 0,118  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en vacas no vacunadas al reducir la disponibilidad de la AFB1 en las vacas que consumieron  $102,0 \pm 0,1 \mu\text{g}$  de AFB1/vaca/día durante 11 días, además la tasa de transferencia de la AFB1 a AFM1 en la leche fue de 0,77% para las vacas vacunadas y de 3,40% para las vacas no vacunadas. No obstante, la ingesta de 144,0-145,0  $\mu\text{g}$  de AFB1/vaca/día o la exposición  $>20 \mu\text{g}$  de AFB1/kg de MS aparentemente siempre superará el límite en la leche de 0,05  $\mu\text{g}$  de AFM1/kg en vacas vacunadas (Polonelli et al., 2011).

## CONSIDERACIONES FINALES

Un alto porcentaje de los cereales empleados como ingredientes para alimentos balanceados, en especial el maíz, están contaminados con AFB1. De estos, un alto porcentaje también está co-contaminado con otras micotoxinas, por lo que, el impacto negativo sobre el rendimiento productivo de las vacas podría deteriorarse aun con dietas que contengan una concentración de AFB1 por debajo del límite máximo (UE=5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o FDA=20  $\mu\text{g}$  de AFB1/kg de alimento) debido a un efecto sinérgico entre las micotoxinas presentes en la ración final. El análisis múltiple de micotoxinas tiene un costo elevado, pero el conocimiento del grado de contaminación de los alimentos permite elegir la mejor estrategia de control de las AFs o de la co-contaminación. Así, se reduce la exposición de las vacas lecheras a la AFB1 y la de los consumidores de productos lácteos a la AFM1.

La vigilancia y monitoreo a partir de muestras de leche pueden proporcionar algunas ventajas porque es fácil de muestrear y no sería preciso analizar los alimentos con respecto a la presencia de ciertas micotoxinas si la exposición de las vacas no ocurre o no es significativa; además, permitiría establecer aspectos epidemiológicos (por ejemplo, hatos expuestos a los mismos niveles de AFs podrían mostrar una transferencia de AFB1 a AFM1 en la leche de tanque diferente o bien mostrar alteraciones de salud distintas), orientaría el uso de descontaminantes y se podría evaluar la eficiencia del límite máximo en los piensos, ya que concentraciones  $\leq 20 \mu\text{g}$  de AFB1/kg de materia seca difícilmente provocan una transferencia de AFM1 en la leche superior a 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

En Costa Rica no se han evaluado los contenidos de micotoxinas en los forrajes y ensilajes bajo condiciones de manejo regional. En lecherías del trópico, el ensilaje de forrajes puede realizarse empleando un inoculante con bacterias heterolácticas para mantener la estabilidad aeróbica por más tiempo y evitar el crecimiento de hongos micotoxigénicos, el empleo de arcilla como absorbente junto con *Saccharomyces cerevisiae* es una buena opción para secuestrar AFB1 en la

ración. La vacunación contra la AFB1 permite disminuir la concentración de AFM1 en la leche, lo cual es favorecido por la ingesta de concentraciones inferiores a 100 µg de AFB1/día, pero en vacas que ingieren dietas con una concentración superior a 144 µg de AFB1/día la vacunación no será suficiente y deberá combinarse con otras estrategias de control para evitar superar el límite máximo para la AFM1 propuesto por la FDA (0,5 µg/kg).

Los estudios realizados para valorar los efectos tóxicos de la AFB1 sobre la salud de las vacas lecheras muestran mucha variabilidad. Aparentemente, la ingesta de alimentos con una concentración de 15 a 40 µg de AFB1/kg de materia seca podría causar problemas reproductivos, ciertas alteraciones del metabolismo de los aminoácidos y capacidad total antioxidante, pero sin alterar significativamente la composición de la leche, aunque la exposición a concentraciones superiores a 100 µg de AFB1/kg de materia seca están asociados con distintos grados de deterioro de la salud en dependencia de la edad y de otros factores intrínsecos del animal. Por su parte, el efecto tóxico de la AFM1 en humanos expuestos a niveles nocivos por medio del consumo de productos lácteos necesita mayor investigación para determinar exactamente cuánto es la contribución de la AFM1 en el desarrollo del cáncer hepático y otras alteraciones con las cuales se ha asociado.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan un sincero agradecimiento al Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales (PPCARN), a la Estación Experimental Alfredo Volio Mata de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica; por el apoyo económico brindado al primer autor con el propósito de promover su formación académica. También, nuestro agradecimiento al Dr. Carlos Jiménez Sánchez por su apoyo a la investigación y formación profesional.

## LITERATURA CITADA

Adams, R.S., Kephart, K. B., Ishler, V. A., Hutchinson, L. J., & Roth, G.W. (2016). Mold and mycotoxin problems in livestock feeding. <https://extension.psu.edu/mold-and-mycotoxin-problems-in-livestock-feeding>

Agus, A., Khuluq, I., Sumantri, I., Noviandi, C. T., & Nuryono, N. (2010). *Aflatoxin M1 excretion in the milk of tropical dairy cow fed contaminated aflatoxin B1 in the diet*. [The 5<sup>th</sup> International Seminar

on Tropical Animal Production, Community Empowerment and Tropical Animal Industry], Yogyakarta, Indonesia. <https://journal.ugm.ac.id/istaproceeding/article/view/30487/0>

Ahlberg, S., Grace, D., Kiarie, G., Kirino, Y., & Lindahl, J. (2018). A risk assessment of aflatoxin M1 exposure in low and mid-income dairy consumers in Kenya. *Toxins*, *10*(9), Article 348. doi:10.3390/toxins10090348

Akbar, N., Nasir, M., Naeem, N., Ahmad, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Iqbal, S., Imran, M., Tufail, T., Shah, F., & Atif, M. (2020). Assessment of aflatoxin in milk and feed samples and impact of seasonal variations in the Punjab, Pakistan. *Food Science & Nutrition* *00*, 1-11. doi:10.1002/fsn3.1557

Amigot, S. L., Fulgueira, C. L., Bottai, H., & Basílico, J. C. (2006). New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biology and Technology*, *41*(2), 215-224. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.03.009

Amin, Y.A., Zakaria, A. M., El-Naga, E. M. A., & Ahmed, A. E. (2020). A comprehensive survey on the effects of aflatoxin B1 in birth outcomes and milk yield of pregnant cows and buffaloes. *Bioscience Research*, *17*(1), 489-498. [https://www.researchgate.net/publication/341106776\\_A\\_comprehensive\\_survey\\_on\\_the\\_effects\\_of\\_aflatoxin\\_B1\\_in\\_birth\\_outcomes\\_and\\_milk\\_yield\\_of\\_pregnant\\_cows\\_and\\_buffaloes](https://www.researchgate.net/publication/341106776_A_comprehensive_survey_on_the_effects_of_aflatoxin_B1_in_birth_outcomes_and_milk_yield_of_pregnant_cows_and_buffaloes)

Arce-Ramírez, W., Rojas-Bourrillon, A., & Campos-Granados, C. M. (2020). Determinación del contenido energético de materiales forrajeros a través de la relación entre la técnica de producción de gas in vitro y la ecuación mecanicista del NRC (2001). *Nutrición Animal Tropical*, *14*(1), 13-35. doi:10.15517/nat.v14i1.41475

Assaf, J.C., Nahle, S., Chokr, A., Louka, N., Atoui, A., & El-Khoury, A. (2019). Assorted methods for decontamination of aflatoxin M1 in milk using microbial adsorbents. *Toxins* *11*(6), Article 304. doi:10.3390/toxins11060304

Awaisheh, S. S., Rahahleh, R. J., Algroom, R. M., Al-Bakheit, A. A., Al-Khaza'leh, J. M., & Al-Dababseh, B. A. (2019). Contamination level and exposure assessment to aflatoxin M1 in Jordanian infant milk formulas. *Italian Journal of Food Safety*, *8*(3), 8263. doi:10.4081/ijfs.2019.8263

Barac, A. (2019). Mycotoxins and human disease. In E. Presterl (Eds.), *Clinically Relevant Mycoses* (pp. 213-225). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92300-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92300-0_14)

Becker-Algeri, T.A., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Drunkler, D. A., & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in bovine milk and dairy products: a review. *Journal of Food Science* *81*(3), R544-R552. doi:10.1111/1750-3841.13204

Benkerroum, N. (2020). Aflatoxins: producing-molds, structure, health issues and incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), Article 1215. doi:10.3390/ijerph17041215

Bernardes, T.F., Daniel, J. L. P., Adesogan, A. T., McAllister, T. A., Drouin, P., Nussio, L. G., Huhtanen, P., Tremblay, G. F., Bélanger, G., & Cai, Y. (2018). Silage review: unique challenges of silages made in hot and cold regions. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4001-4019. doi:10.3168/jds.2017-13703

Bertin, G., Jouany, J. P., & Yiannikouris, A. (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. In T. G. Papachristou, Z. M. Parissi, H. Ben Salem, & P. Morand-Fehr. (Eds.). *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats* (pp. 205-224). Zaragoza: CIHEAM/FAO/NAGREF. <https://om.ciheam.org/om/pdf/a85/00801009.pdf>

Biomin. (2019). World mycotoxin survey 2019: annual report No. 6. [https://cdn2.hubspot.net/hubfs/5480243/BIOMIN/Downloads/MAG\\_MTXSurveyReport\\_2019\\_EN.pdf](https://cdn2.hubspot.net/hubfs/5480243/BIOMIN/Downloads/MAG_MTXSurveyReport_2019_EN.pdf)

Borutova, R. (2019). Adisseo: United States of America 2019 mycotoxin survey in corn and corn silage. <https://www.adisseo.com/wp-content/uploads/2020/02/mycotoxin-survey-in-corn-and-corn-silage-usa-2019-sa-mm036-00-usa.pdf>

Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J. A., Soback, S., Ashkenazi, R., Armer, S., & Shlosberg, A. (2013). Carry-over of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 in high yielding israeli cows in mid- and late-lactation. *Toxins*, 5(1), 173-183. doi:10.3390/toxins5010173

Carvalho, B.F., Avila, C. L. S., Krempser, P. M., Batista, L. R., Pereira, M. N., & Schwan, R. F. (2016). Occurrence of mycotoxins and yeasts and moulds identification in corn silages in tropical climate. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1181-1192. doi:10.1111/jam.13057

Capelli, A., Suárez, G., & García-Santos, C. (2019). Aflatoxins in food and cow milk from 18 commercial farm in the south-central and eastern regions of Uruguay. *Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*, 55(212), 52-56. doi:10.29155/VET.55.212.2

Chavarría, G., Granados-Chinchilla, F., Alfaro-Cascante, M., & Molina, A. (2015). Detection of aflatoxin M1 in milk, cheese and sour cream samples from Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. *Journal Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(2), 128-135 doi:10.1080/19393210.2015.1015176

Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Mendez, G., Wong-Gonzalez, E., Cortes-Muñoz, M., Rodríguez, C., & Granados-Chinchilla, F. (2017). Distribution, stability, and protein interactions of aflatoxin M1 in fresh cheese. *Food Control*, 73(B), 581-586. doi:10.1016/j.foodcont.2016.09.005

Chen, W., Huang, Z., Hu, S., Peng, J., Liu, D., Xiong, Y., Xu, H., Wei, H., & Lai, W. (2019). Invited review: advancements in lateral flow immunoassays for screening hazardous substances in milk and milk powder. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 1887-1900. doi:10.3168/jds.2018-15462

Chhonker, S.K., Rawat, D., Naik, R. A., & Koiri, R. K. (2018). An overview of mycotoxins in human health with emphasis on development and progression of liver cancer. *Clinics in Oncology*, 3, Article 1408. <http://www.remedypublications.com/open-access/an-overview-of-mycotoxins-in-human-health-with-emphasis-on-development-and-progression-of-liver-cancer-1571.pdf>

Chlebicz, A., & Ślizewska, K. (2020). In vitro detoxification of aflatoxin B1, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 289-301. doi:10.1007/s12602-018-9512-x

Costamagna, D., Gaggiotti, M., Chiericatti, C. A., Costabel, L. Audero, G. M. L., Taverna, M., & Signorini, M. L. (2019). Quantification of aflatoxin M1 carry-over rate from feed to soft cheese. *Toxicology Reports*, 6, 782-787. doi:10.1016/j.toxrep.2019.07.004

De Freitas, C.H., Gonçalves, C. L., & da Silva-Nascente, P. (2018). Aflatoxins B1 and M1: risks related to milk produced in Brazil. *Annals of Microbiology*, 68, 793-802. doi:10.1007/s13213-018-1395-2

Dellafiora, L., Dall'Asta, C., & Galaverna, G. (2018). Toxicodynamics of mycotoxins in the framework of food risk assessment - an in silico perspective. *Toxins*, 10(2), Article 52. doi:10.3390/toxins10020052

Del Palacio, A., Bettucci, L., & Pan, D. (2016). *Fusarium* and *Aspergillus* mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 1000-1005. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.004

Domenico, A.S., Busso, C., Hashimoto, E. H., Frata, M. T., Christ, D., & Coelho, S. R. M. (2016). Occurrence of *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, and aflatoxins in corn hybrids with different systems of storage. *Acta Scientiarum*, 38(1), 111-121. doi:10.4025/actasciagr.v38i1.25621

Eaton, D. L., Beima, K. M., Bammler, T. K., Riley, R. T., & Voss, K. A. (2010). Hepatotoxic Mycotoxins. In C. A. McQueen (Eds.), *Comprehensive Toxicology* (pp. 527-569). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01023-X>

Ehrlich, K.C. (2014). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, Article50. doi: 10.3389/fmicb.2014.00050

Elizondo-Salazar, J. (2017). Producción de biomasa y calidad nutricional de tres forrajes cosechados a dos alturas. *Agronomía Mesoamericana* 28(2), 329-340. doi:10.15517/ma.v28i2.23418

Escrivá, L., Font, G., Manyes, L., &Berrada, H. (2017). Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: an overview. *Toxins*, 9(8), Article 251. doi:10.3390/toxins9080251

European Union. (2010, November). Guidance document for competent authorities for the control of compliance with EU legislation on aflatoxins.[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_contaminants\\_catalogue\\_alfatoxins\\_guidance-2010\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_alfatoxins_guidance-2010_en.pdf)

Favaretto-Variane, A.C., dos Santos, F. C., de Castro, F. F., Barbosa-Tessmann, I. P., dos Santos, G. T., &Pozza, M. S. S. (2018). The occurrence of aflatoxigenic *Aspergillus spp.* in dairy cattle feed in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 919-928. doi:10.1016/j.bjm.2018.05.005

Food and Drug Administration(2000). Guidance for industry: action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed#afla>

Frazzoli, C., Gherardi, P., Saxena, N., Belluzzi, G., &Mantovani, A. (2017). The hotspot for (global) one health in primary food production: aflatoxin M1 in dairy products. *Frontiers in Public Health*, 4, Article 294. doi:10.3389/fpubh.2016.00294

García-Díaz, M., Gil-Serna, J., Vázquez, C., Botia, M. N., &Patiño, B. (2020). A comprehensive study on the occurrence of mycotoxins and their producing fungi during the maize production cycle in Spain. *Microorganisms* 8(1), Article 141. doi:10.3390/microorganisms8010141

Giovati, L., Gallo, A., Masoero, F., Cerioli, C., Ciociola, T., Conti, S., Magliani, W., &Polonelli, L. (2014). Vaccination of heifers with anaflatoxin improves the reduction of aflatoxin B1 carry over in milk of lactating dairy cows. *PLoS ONE*, 9(4), Article e94440. doi:10.1371/journal.pone.0094440

Giovati, L.,Magliani, W., Ciociola, T., Santinoli, C., Conti, S., &Polonelli, L. (2015). AFM1 in milk: physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination. *Toxins*, 7(10), 4330-4349. doi:10.3390/toxins7104330

Granados-Chinchilla, F., Molina, A., Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Bogantes-Ledezma, D., & Murillo-Williams, A. (2017a). Aflatoxins occurrence through the food chain in Costa Rica: applying the one health approach to mycotoxin surveillance. *Food Control*, *82*, 217-226. doi:10.1016/j.foodcont.2017.06.023

Granados-Chinchilla, F. (2017b). A Focus on aflatoxin in feedstuffs: new developments in analysis and detection, feed composition affecting toxin contamination, and interdisciplinary approaches to mitigate it (pp. 251-280). INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69498>

Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., & Schatzmayr, G. (2019). Global mycotoxin occurrence in feed: a ten-year survey. *Toxins*, *11*(7), Article 375. doi:10.3390/toxins11070375

Gomaa, E.Z., Abdelall, M. F., & El-Mahdy, O. M. (2018). Detoxification of aflatoxin B1 by antifungal compounds from *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus paracasei*, isolated from dairy products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10*(2), 201-209. doi:10.1007/s12602-017-9350-2

Gonçalves, L., Dalla-Rosa, A., Gonzales, S. L., Feltes, M. M. C., Badiale-Furlong, E., & Dors, G. C. (2017). Incidence of aflatoxin M1 in fresh milk from small farms. *Food Science and Technology*, *37*, 11-15. doi:10.1590/1678-457X.06317

González-Pereyra, M.L., Alonso, V. A., Sager, R., Morlaco, M. B., Magnoli, C. E., Astoreca, A. L., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., Dalcero, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(4), 1034-1041. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03634.x

Hashemi, M. (2016). Aflatoxin B1 levels in feedstuffs from dairy cow farms in south of Iran. *Food and Agricultural Immunology* *27*(2), 251-258. doi:10.1080/09540105.2015.1086319

Homouda, S.N., Hasanin, M. E., Abdelghaffar, A. A., & Elekhawy, E. (2016). Correlation between aflatoxin M1 in milk and milk products in dairy animals fed on aflatoxin B1 contaminated ration. *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health*, *2*(2), 475-489. <http://cehea.org/wp-content/uploads/2017/01/41-.pdf>

Huerta-Treviño, A., Dávila-Aviña, J. E., Sánchez, E., Heredia, N., & García, S. (2016). Occurrence of mycotoxins in alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) moench], and grass (*Cenchrus ciliaris* L.) retailed in the state of Nuevo León, México. *Agrociencia*, *50*, 825-836. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v50n7/1405-3195-agro-50-07-825.pdf>



Intanoo, M., Kongkeitkajorn, M. B., Pattarajinda, V., Bernard, J. K., Callaway, T. R., Suriyasathaporn, W., & Phasuk, Y. (2018). Isolation and screening of aflatoxin-detoxifying yeast and bacteria from ruminal fluids to reduce aflatoxin B1 contamination in dairy cattle feed. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(6), 1603-1613. doi:10.1111/jam.14060

Intanoo, M., Kongkeitkajorn, M. B., Suriyasathaporn, W., Phasuk, Y., Bernard, J. K., & Pattarajinda, V. (2020). Effect of supplemental *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* on aflatoxin M1 excretion in milk of lactating dairy cows. *Animals*, *10*(4), Article 709. doi:10.3390/ani10040709

Ishikawa, A.T., Takabayashi-Yamashita, C. R., Ono, E. Y. S., Bagatin, A. K., Rigobello, F. F., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., & Itano, E. N. (2016). Exposure assessment of infants to aflatoxin M1 through consumption of breast milk and infant powdered milk in Brazil. *Toxins*, *8*(9), Article 246. doi:10.3390/toxins8090246

Jiang, Y., Ogunade, I. M., Kim, D. H., Li, X., Pech-Cervantes, A. A., Arriola, K. G., Oliveira, A. S., Driver, J. P., Ferraretto, L. F., Staples, C. R., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018). Effect of adding clay with or without a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on the health and performance of lactating dairy cows challenged with dietary aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 3008-3020. doi:10.3168/jds.2017-13678

Kasoju, A., Shahdeo, D., Khan, A. A., Shrikrishna, N. S., Mahari, S., Alanazi, A. M., Bhat, M. A., Giri, J., & Gandhi, S. (2020). Fabrication of microfluidic device for aflatoxin M1 detection in milk samples with specific aptamers. *Scientific Reports*, *10*, Article 4627. doi:10.1038/s41598-020-60926-2

Kemboi, D.C., Antonissen, G., Ochieng, P. E., Croubels, S., Okoth, S., Kangethe, E. K., Faas, J., Lindahl, J. F., & Gathumbi, J. K. (2020). A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: challenges for food safety and dairy production in Sub-Saharan Africa. *Toxins*, *12*(4), Article 222. doi:10.3390/toxins12040222

Keller, L.A.M., González-Pereyra, M. L., Keller, K. M., Alonso, V. A., Oliveira, A. A., Almeida, T. X., Barbosa, T. S., Nunes, L. M. T., Cavaglieri, L. R., & Rosa, C. A. R. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, *52*, 42-47. doi:10.1016/j.jspr.2012.09.001

Kim, S., Lee, H., Lee, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y., Yoon, Y., & Choi, K. H. (2017). Invited review: microbe-mediated aflatoxin decontamination of dairy products and feeds. *Journal of Dairy Science*, *100*(2), 871-880. doi:10.3168/jds.2016-11264

Krstović, S., Popović-Vranješ, A., Kasalica, A., Jevtić, M., & Jajić, I. (2018). Aflatoxin M1 transfer rate from milk into cheese and whey during the production of hard cheese. *The Serbian Journal of Agricultural Sciences*, 67(3-4), 215-220. doi:10.1515/contagri-2018-0031

Kuharić, Ž., Jakopović, Ž., Čanak, I., Frece, J., Bošnjir, J., Pavlek, Ž., Ivešić, M., & Markov, K. (2018). Removing aflatoxin M1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69(4), 334-339. doi:10.2478/aiht-2018-69-3160

Li, S., Min, L., Wang, G., Li, D., Zheng, N., & Wang, J. (2018). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk from manufacturers of infant milk powder in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), Article 879. doi:10.3390/ijerph15050879

Li, H., Xing, L., Zhang, M., Wang, J., & Zheng, N. (2018). The toxic effects of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 on kidney through regulating L-proline and downstream apoptosis. *BioMed Research International*, 2018, Article 9074861. doi:10.1155/2018/9074861

Loh, Z. H., Ouwerkerk, D., Klieve, A. V., Hungerford, N. L., & Fletcher, M. T. (2020). Toxin degradation by rumen microorganisms: a review. *Toxins*, 12(10), Article 664. doi:10.3390/toxins12100664

López-Herrera, M., Rojas-Bourrillon, A., & Zumbado-Ramírez, C. (2017). Características nutricionales y fermentativas de ensilados de pasto Camerún con plátano Pelipita. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 629-642. doi:10.15517/ma.v28i3.25237

Mahato, D.K., Lee, K. E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K. N., Kumar, P., & Kang, S. G. (2019). Aflatoxins in food and feed: an overview on prevalence, detection and control strategies. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 2266. doi:10.3389/fmicb.2019.02266

Makau, C. M., Matofari, J. W., Muliro, P. S., & Bebe, B. O. (2016). Aflatoxin B1 and deoxynivalenol contamination of dairy feeds and presence of aflatoxin M1 contamination in milk from smallholder dairy systems in Nakuru, Kenya. *International Journal of Food Contamination*, 3, Article 6. doi:10.1186/s40550-016-0033-7

Makun, A.H., Apeh, D. O., Mwanza, M., Shittu, T. O., Nneji, J. F., Omotosho, T., Egbe, O. S., Yusuf, O. U., Oshotse, B. R., Abdulrahim, I., Yusuf, O. H., Eneche, B., Abdulrahman, U., Ochai, D. O., & Adejumo, A. (2016). Aflatoxin M1 in breast milk, cow milk and milk products in Minna, Nigeria and their predisposing factors. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 5(4), Article 303. doi:10.4172/2161-1009.1000303

Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, *10*(6), Article 214. doi:10.3390/toxins10060214

Marrez, D.A., Shahy, E. M., El-Sayed, H. S., & Sultan, Y. Y. (2018). Detoxification of aflatoxin B1 in milk using lactic acid bacteria. *Journal of Biological Sciences*, *18*(3), 144-151. doi:10.3923/jbs.2018.144.151

Medina, Á., González-Jartín, J. M., & Sainz, J. M. (2017). Impact of global warming on mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, *18*, 76-81. doi:10.1016/j.cofs.2017.11.009

Mohammedi-Ameur, S., Dahmane, M., Brera, C., Kardjadj, M., & Ben-Mahdi, M. H. (2020). Occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in raw cow milk collected from different regions of Algeria. *Veterinary World*, *13*(3), 433-439. doi:10.14202/vetworld.2020.433-439

Molina, A., Zamora-Sanabria, R., & Granados-Chinchilla, F. (2017). A focus on aflatoxins in feedstuffs: levels of contamination, prevalence, control strategies, and impacts on animal health (pp. 115-152). INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69468>

Molina, A., Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Leiva, A., & Granados-Chinchilla, F. (2019). Mycotoxins at the start of the food chain in Costa Rica: analysis of six *Fusarium* toxins and ochratoxin a between 2013 and 2017 in animal feed and aflatoxin M1 in dairy products. *Toxins*, *11*(6), Article 312. doi:10.3390/toxins11060312

Mongkon, W., Sugita-Konishi, Y., Chaisri, W., & Suriyasathaporn, W. (2017). Aflatoxin B1 contamination of dairy feeds after storage in farm practice in tropical environment. *Biocontrol Science*, *22*(1), 41-45. doi:10.4265/bio.22.41

Mozafari, S., Mohsenzadeh, M., & Mehrzad, J. (2017). Seasonally feed-related aflatoxins B1 and M1 spread in semiarid industrial dairy herd and its deteriorating impacts on food and immunity. *Journal of Food Quality*, *2017*, Article 4067989. doi:10.1155/2017/4067989

Naseer, O., Khan, J. A., Khan, M. S., Omer, M. O., Naseer, J., Sohail, M. L., Saleem, M. U., Ahmad, W., & Ahmad, A. S. (2017). Effect of dietary aflatoxins (AFB1) on hematological and biochemical indices of male buffaloes. *Indian Journal of Animal Research*, *52*(5), 718-723. doi:10.18805/ijar.v0iOF.9128

Negash, D.A. (2018). A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, *8*(2), 190-197. doi:10.15406/jnhfe.2018.08.00268

Nejad, A.S.M., Heshmati, A., &Ghiasvand, T. (2019). The occurrence and risk assessment of exposure to aflatoxin M1 in ultra-high temperature and pasteurized milk in Hamadan province of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 10(4), 228-233. doi:10.24171/j.phrp.2019.10.4.05

Nile, S. H., Park, S. W., &Khobragade, C. N.(2016). Occurrence and analysis of aflatoxin M1 in milk produced by indian dairy species. *Food and Agricultural Immunology*, 27(3), 358-366. doi:10.1080/09540105.2015.1104655

Ogunade, I.M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., &Adesogan, A. T. (2018). Silage review: mycotoxins in silage: occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4034-4059. doi:10.3168/jds.2017-13788

Panwar, R., Kumar, N., Kashyap, V., Ram, C., &Kapila, R. (2019). Aflatoxin M1 detoxification ability of probiotic *Lactobacilli* of indian origin in In vitro digestion model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 460-469. doi:10.1007/s12602-018-9414-y

Pate, R.T., Paulus-Compart, D. M., &Cardoso, F. C. (2018). Aluminosilicate clay improves production responses and reduces inflammation during an aflatoxin challenge in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 11421-11434. doi:10.3168/jds.2018-15024

Peles, F., Sipos, P., Gyori, Z., Pfliegler, W. P., Giacometti, F., Serraino, A., Pagliuca, G., Gazzotti, T., &Pócsi, I. (2019). Adverse effects, transformation and channeling of aflatoxins into food raw materials in livestock. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article2861. doi:10.3389/fmicb.2019.02861

Peña-Rodas, O., Martínez-López, R., & Hernández-Rauda, R.(2018). Occurrence of aflatoxin M1 in cow milk in El Salvador: results from a two-year survey. *Toxicology Reports*, 5, 671-678. doi:10.1016/j.toxrep.2018.06.004

Polonelli, L.,Giovati, L., Magliani, W., Conti, S., Sforza, S., Calabretta, A., Casoli, C., Ronzi, P., Grilli, E., Gallo, A., Masoero, F., &Piva, G. (2011). Vaccination of lactating dairy cows for the prevention of aflatoxin B1 carry over in milk. *PLoS ONE*, 6(10), Articlee26777. doi:10.1371/journal.pone.0026777

Quevedo-Garza, P. A., Amador-Espejo, G. G., Salas-García, R., Ramos-Peña, E. G., &Trujillo, A. J. (2020). Aflatoxin M1 determination in infant formulae distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins*, 12(2), Article 100. doi:10.3390/toxins12020100

Rahimirad, A., Malekinejad, H., Ostadi, A., Yeganeh, S., &Fahimi, S. (2014). Aflatoxin M1 concentration in various dairy products: evidence for biologically reduced amount of AFM1 in

yoghurt. *Iranian Journal Public Health*, 43(8), 1139-1144. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411911/pdf/IJPH-43-1139.pdf>

Ren, X., Zhang, Q., Zhang, W., Mao, J., & Li, P. (2020). Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. *Toxins*, 12(1), Article 24. doi:10.3390/toxins12010024

Reyes-Velázquez, W.P., Espinoza, V. H. I., Rojo, F., Jiménez-Plasencia, C., Palacios, E. L., Hernández-Góbor, J., & Ramírez-Álvarez, A. (2008). Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(3), 182-185. doi:10.1016/S1130-1406(08)70043-3

Rodrigues, R. O., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Borutova, R., Averkieva, O., & McFadden, T. B. (2019). Feed additives containing sequestrant clay minerals and inactivated yeast reduce aflatoxin excretion in milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6614-6623. doi:10.3168/jds.2018-16151

Rodríguez-Blanco, M., Ramos, A. J., Prim, M., Sanchis, V., & Marín, S. (2019a). Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M1 in milk. *Mycotoxin Research*, 36(1), 11-22. doi:10.1007/s12550-019-00362-y

Rodríguez-Blanco, M., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2019b, August 21). Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.08.006>

Sánchez-Ledezma, W., & Hidalgo-Ardón, C. (2018). Potencial forrajero de nueve híbridos de maíz en la zona alta lechera de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 153-164. doi:10.15517/ma.v29i1.27732

Sassahara, M., Netto, D. P., & Yanaka, E. K. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná State. *Food and Chemical Toxicology*, 43(6), 981-984. doi:10.1016/j.fct.2005.02.003

Schmidt, P., Novinski, C. O., Junges, D., Almeida, R., & de Souza, C. M. (2015). Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: a farm survey using infrared thermography. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6609-6619. doi:10.3168/jds.2014-8617

- Seid, A., & Mama, A. (2019). Aflatoxicosis and occurrence of aflatoxin M1 (AFM1) in milk and dairy products: a review. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 6(1), Article 1054. <https://austinpublishinggroup.com/april-2019/published-articles-3.php>
- Serraino, A., Bonilauri, P., Kerekes, K., Farkas, Z., Giacometti, F., Canever, A., Zambrini, A. V., & Ambrus, Á. (2019). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk marketed in Italy: exposure assessment and risk characterization. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 2516. doi:10.3389/fmicb.2019.02516
- Shahbazi, Y. (2017). Aflatoxin M1 contamination in milk and dairy products: implications on human health. In R. R. Watson, R.J. Collier, & V. R. Preedy (Eds), *Nutrients in dairy and their implications on health and disease* (pp. 237-250). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00019-X>
- Sumantri, I., Purwanti, F., Nuryono, N., & Agus, A. (2019). Estimation of aflatoxin M1 exposure through consumption of various dairy milk products in Yogyakarta, Indonesia. *Jurnal Veteriner*, 20(1), 58-64. doi:10.19087/jveteriner.2019.20.1.58
- Temamogullari, F., & Kanici, A. (2014). Short communication: aflatoxin M1 in dairy products sold in Sanliurfa, Turkey. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 162-165. doi:10.3168/jds.2012-6184
- Van derFels-Klerx, H.J., & Camenzuli, L. (2016). Effects of milk yield, feed composition, and feed contamination with aflatoxin B1 on the aflatoxin M1 concentration in dairy cows' milk investigated using Monte Carlo Simulation Modelling. *Toxins*, 8(10), Article 290. doi:10.3390/toxins8100290
- Vargas-Leitón, B., Solís-Guzmán, O., Sáenz-Segura, F., & León-Hidalgo, H. (2013). Caracterización y clasificación de hatos lecheros en Costa Rica mediante análisis multivariado. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 257-275. [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v24n02\\_257.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v24n02_257.pdf)
- Vaz, A., Cabral-Silva, A. C., Rodrigues, P., & Venâncio, A. (2020). Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products. *Microorganisms*, 8(2), Article 246. doi:10.3390/microorganisms8020246
- Wang, C., Peng, J., Liu, D. F., Xing, K. Y., Zhang, G. G., Huang, Z., Cheng, S., Zhu, F. F., Duan, M. L., Zhang, K. I., Yuan, M. F., & Lai, W. H. (2018). Lateral flow immunoassay integrated with competitive and sandwich models for the detection of aflatoxin M1 and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 8767-8777. doi:10.3168/jds.2018-14655
- Wang, Q., Zhang, Y., Zheng, N., Guo, L., Song, X., Zhao, S., & Wang, J. (2019). Biological system responses of dairy cows to aflatoxin B1 exposure revealed with metabolomic changes in multiple biofluids. *Toxins*, 11(2), Article 77. doi:10.3390/toxins11020077

Wang, Q., Zhang, Y., Zheng, N., Zhao, S., Li, S., & Wang, J. (2020). The biochemical and metabolic profiles of dairy cows with mycotoxins-contaminated diets. *PeerJ*, *8*, Article e8742. doi:10.7717/peerj.8742

Watson, S., Moore, S. E., Darboe, M. K., Chen, G., Tu, Y-K., Huang, Y-T., Eriksen, K. G., Bernstein, R. M., Prentice, A. M., Wild, C. P., Xu, Y., Routledge, M. N., & Gong, Y. Y. (2018). Impaired growth in rural Gambian infants exposed to aflatoxin: a prospective cohort study. *BMC Public Health*, *18*, Article 1247. doi:10.1186/s12889-018-6164-4

World Health Organization (2018). Food Safety Digest: aflatoxins. [https://www.who.int/foodsafety/FSDigest\\_Aflatoxins\\_EN.pdf](https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_EN.pdf)

WingChing-Jones, R., & Leal-Rivera, J. C. (2018). Conservación del forraje de la *Typhadomingensis* (Typhaceae): ensilaje y henificación. *UNED Research Journal*, *10*(1), 107-114. doi:10.22458/urj.v10i1.2013

Wu, F., Groopman, J. D., & Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *The Annual Review of Food Science and Technology*, *5*, 351-372. doi:10.1146/annurev-food-030713-092431

Wu, F., & Turna, N. S. (2019). Aflatoxin M1 occurrence in dairy products worldwide: summary of literature review and policy implications. <https://www.canr.msu.edu/fsp/publications/research-papers/RP%20153.pdf>

Xiong, J. L., Wang, Y. M., Zhou, H. L., & Liu, J. X. (2018). Effects of dietary adsorbent on milk aflatoxin M1 content and the health of lactating dairy cows exposed to long-term aflatoxin B1 challenge. *Journal of Dairy Science*, *101*(10), 8944-8953. doi:10.3168/jds.2018-14645

Yin, Y., Yan, L., Jiang, J., & Ma, Z. (2008). Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B*, *9*(10), 787-792. doi:10.1631/jzus.B08