Micotoxinas

¿El enemigo nuevo a batir?

Dr. Markus Berleth

10. Octubre 2014

GRUPO SETNA

invivo
Nutrición y Salud Animal

Historia

- 600 a.C. existia en Asiria una tabla de arcilla donde se avisaba del peligro de Cornezuelo (*Claviceps purpurea*) en cereales
- 400 a.C. en Esparta hubo un envenenamiento masivo causado por los alcaloides de Cornezuelo
- A finales del siglo XIX Japón sufre la llamada „Yellow Rice Disease“ causado por las micotoxinas citrinina, esterigmatocistina y citreoviridina (*Penicillium islandicum* y *Penicillium citreoviride*)
- En las décadas 1930 y 1940 en algunas zonas de la antigua Unión Soviética apareció la enfermedad „Aleukia Tóxica Alimentaria“ cuyos responsables son *Fusarium poae* y *Fusarium sporotrichioide*

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Historia

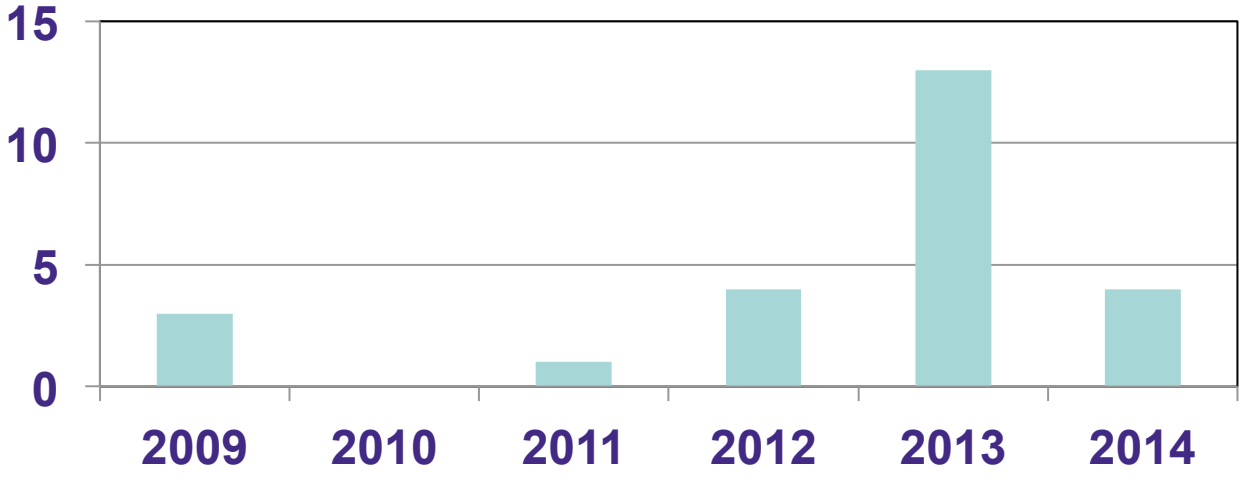
- La “Nefropatía endémica balcánica” (1956) causado por ocratoxina y citrinina como metabolitos secundarios de los generos *Aspergillus* y *Penicillium*
- En Inglaterra (1961) se produjo la muerte de más de 100.000 pavos y patos por contaminación de harina de cacahuetes contaminada por aflatoxinas (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus)*
- ¿ ¿ ¿ Espana 2013 ???

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Alertas del RASFF

Alertas por Aflatoxina B_1 en materias primas



	2009	2010	2011	2012	2013	2014
TOTAL	3			4	13	4
Maíz	2			1	10	3
Girasol (semilla)	1		1	3	3	1
Otros						

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

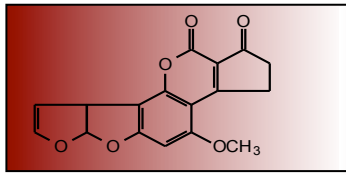
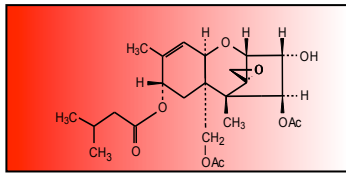
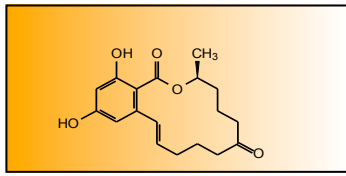
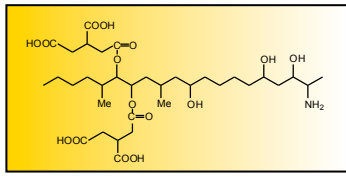
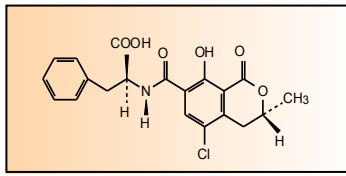
Generalidades

- Micotoxinas son metabolitos secundarios de diferentes especies de hongos
  - Funciones desconocidas
- Más de 350 micotoxinas conocidas
  - ¿Cuántas micotoxinas existen de verdad?
- Complejidad para establecer una clasificación
  - diferentes pesos moleculares y estructuras químicas
- Micotoxinas con importancia actual
  - Aflatoxinas, Vomitoxina (Deoxynivalenol / DON), Zearalenona, Fumonisinas, Ocratoxinas

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Familias de micotoxinas

Toxina(s)	Productor	Estructura química
 **Aflatoxinas (B_1,B_2,G_1,G_2)**	*Aspergillus flavus* *Aspergillus parasiticus*	**GRUPO CUMARÍNICO**
 **Tricotecenos (DON, T_2/HT_2)**	*Fusarium sp.* *Tricotecium sp.*	**GRUPO SESQUITERPENOS**
 **Zearalenona (ZON)**	*Fusarium tricinctum* *Fusarium roseum* *Fusarium graminearum*	**GRUPO LACTONICO**
 **Fumonisinas**	*Fusarium moniliforme*	**GRUPO AMINOALCOHOL**
 **Ocratoxinas (A, B,C)**	*Aspergillus ochraceus* *Penicilium verrucosum*	**GRUPO LACTINICO**

Tricotecenos

	Tricoteceno									
Especie	DON	3-Acetil-DON	Nivalenol	Fusare-non X	DAS	3-Acetil-DAS	DAN	Neo-solaniol	T_2	HT_2
F. graminearum	+	+	+	+						
F. culmorum	+	+								
F. equiseti			+	+	+		+	+		
F. acuminatum					+			+	+	+
F. sporotrichoides					+			+	+	+
F. sulphureum					+	+			+	
F. poae					+			+		
F. oxysporum									+	
F. solani					+					
F. moniliforme					+				+	

DON: Deoxynivalenol
DAN: Diacetilnivalenol
DAS: Diacetoxyscirpenol

Ichinoe y Kurata, 1983

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

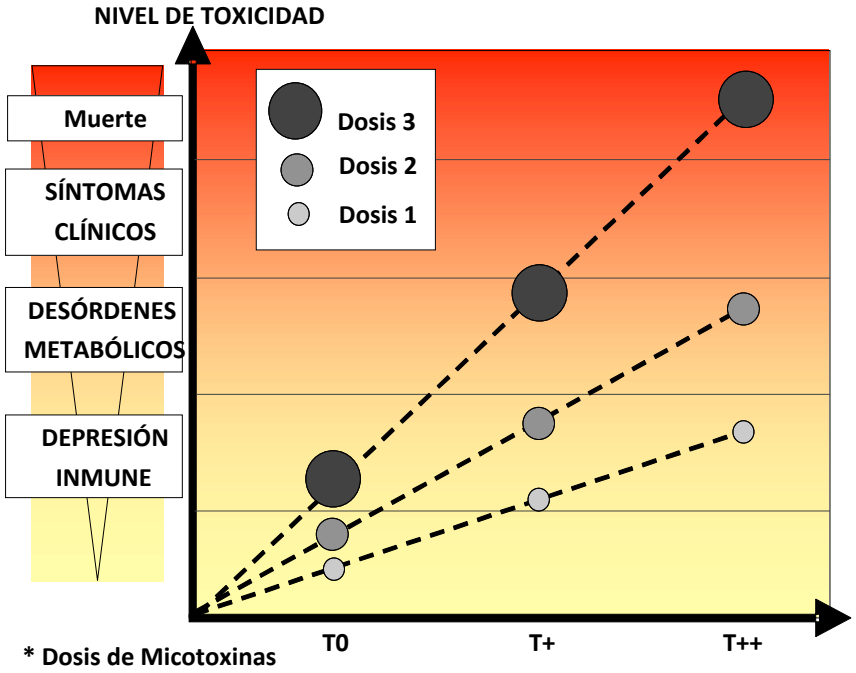
Toxicidad

Micotoxinas	Toxicidad general
Aflatoxinas	Hepatotóxicos y teratogénicos, Inmunomodulación, Genotóxicidad
Tricotecenos	Gastroentéricos, Necrosantes, Hemotoxicidad, Problemas de piel, Inmunomodulación
Zearalenona	Estrogénicos (fertilidad y reproducción)
Fumonisinas	Daños en sistema nervioso central, Hepatotoxicidad, Genotoxicidad, Inmunomodulación, Edema pulmonar
Ocratoxinas	Nefrotóxicos, Inmunomodulación, Genotoxicidad

Toxicidad

- Biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina
- Especie animal, condición (edad, peso), estado nutricional y sanitario
- Dosis y tiempo de exposición
- Efectos combinados con otras mixotoxinas:

  Aditividad, sinergismo o antagonismo



GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Contrariedad

Las micotoxinas existen y son „indestructibles“

- No sensibles al procesado (producción de piensos)
- Resistentes al calor (proceso de granulación)
- No existe un tratamiento químico (excepto contra las aflatoxinas)

Requisitos legislativos

- Reglamento (CE) n° 32/2002 - Aflatoxina B_1
- Reglamento (CE) n° 882/2004 - Controles oficiales
- Reglamento (CE) n° 183/2005 - APPCC
- Recomendación (CE) n° 576/2006 - Otras micotoxinas
- Reglamento (CE) n° 165/2010 - Aflatoxina M_1

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Reglamentos

Reglamento (CE) n° 32/2002: Aflatoxina B_1

			ppm
1.	Aflatoxina B_1 (b)(f)	Materias primas para piensos	0'02
		Piensos complementarios y completos, excepto:	0'01
		- piensos compuestos para vacas lecheras y terneros, ovejas lecheras y corderos, cabras lecheras y cabritos, lechones y aves de corral jóvenes,	0'005
		- piensos compuestos para bovinos (excepto vacas lecheras y terneros), ovinos (excepto ovejas lecheras y corderos), caprinos (excepto cabras lecheras y cabritos), porcinos (excepto lechones) y aves de corral (excepto animales jóvenes)	0'02

Reglamento (CE) n° 165/2010: Aflatoxina M_1 en leche

Establece para leche cruda un límite de Aflatoxina M1 de 50 ppt = 0,05 ppb

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Concentración: ppb o ppm

(1 ppb = 1/1.000 ppm)

(1 ppb = 1 mg/1.000 kg)

1 ppb =

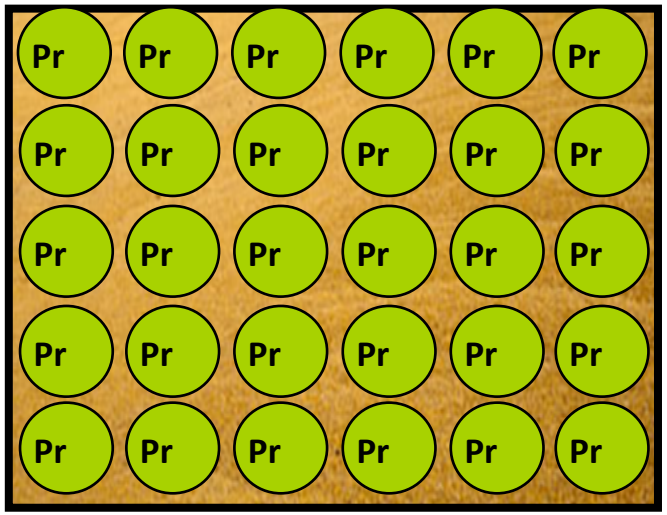
1 segundo cada 32 años

1 gota en 40 piscinas olímpicas

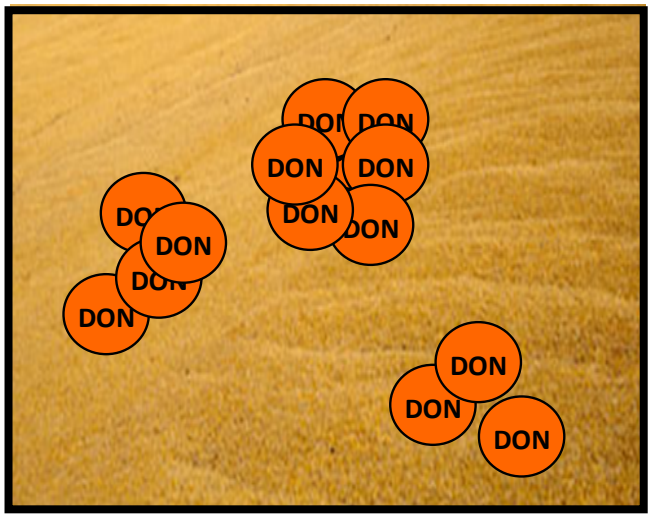
GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas



Proteínas
Distribución homogénea



Micotoxinas
„Hot Spots"

¡Necesidad imperiosa de tener la muestra más representativa!

GRUPO SETNA

invivo
Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Toma de muestras

Batch weight	Number of unitary samples	Weight of each unitary sample	Buck sample	Test sample
< 50 kg	3	300 g	1 kg	500 g
50 - 500 kg	5	200 g	1 kg	500 g
500 kg - 1 T	10	100 g	1 kg	500 g
1 T - 3 T	20	100 g	2 kg	500 g
3 T - 10 T	40	100 g	4 kg	500 g
10 T - 20 T	60	100 g	6 kg	500 g
20 T - 50 T	100	100 g	10 kg	500 g

Batch weight	Sub-batch	Number of unitary samples	Weight of each unitary sample	Buck sample	Test sample
50 T - 300 T	100 T	100	100 g	10 kg	500 g
300 T - 1500 T	3 sub-batches	100	100 g	10 kg	500 g
> 1500 T	500 T	100	100 g	10 kg	500 g

Recomendación (CE) n° 401/2006

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Recomendación (CE) n° 401/2006

- En principio cualquier metodología de análisis puede servir, siempre y cuando haya sido validado para un % de recuperación:
  - ELISA
  - TLC
  - HPLC
  - GC-MS
- HPLC recogido como método oficial por la AOAC (994.08)

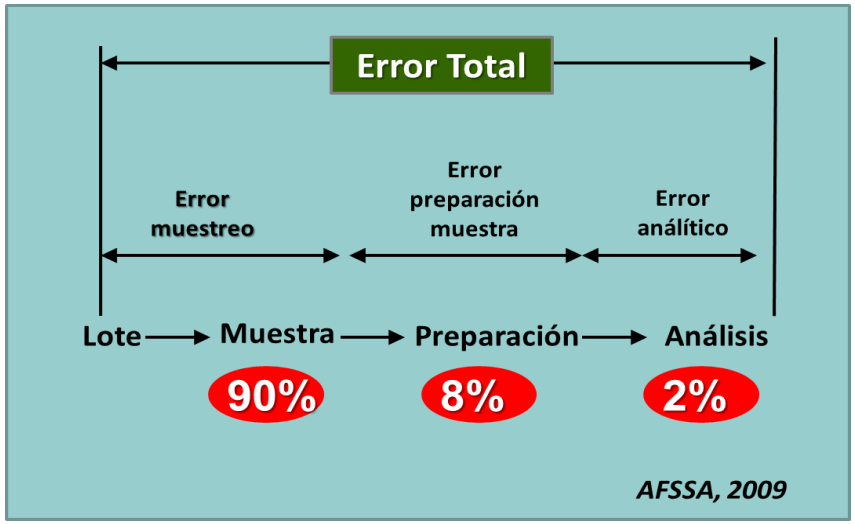
GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

¡Un análisis debe ser fiable, reproducible y práctico!

(coste, tiempo de análisis y capacidad de aplicación)



Métodos de cribado
(ELISA)

- Rápidos, sencillos, económicos
- Pueden ser portables
- Sensibilidad próxima o cercana al LMR legal
- Especificidad suficiente

Métodos de confirmación
(TLC, HPLC,GC-MS)

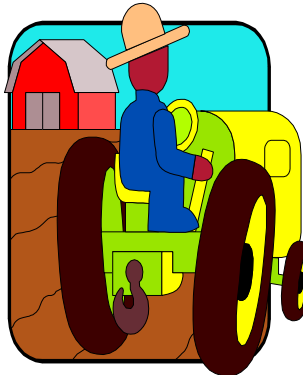
- Suelen ser costosos y difíciles de realizar
- Son muy sensibles (amplio rango de detección)
- Muy específicos

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Producción de micotoxinas



- En el campo por

  Fusarium sp.
  Verticillium sp.
  Alternaria sp.
  Cladosporium sp.

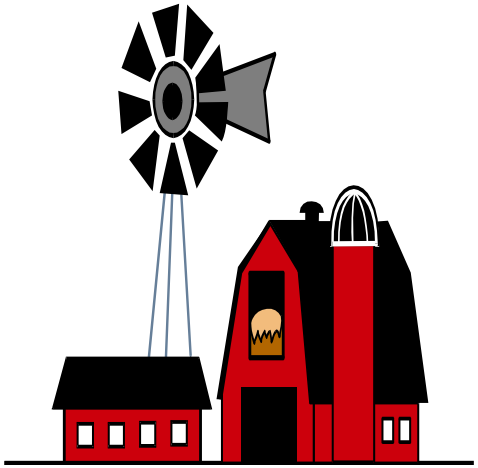
- Crecimiento de hongos con más de 17 % de humedad
- Producción de micotoxinas con más de 22 - 24 % de humedad

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Producción de micotoxinas



- En el almacén por

  Aspergillus sp.
  Penicillium sp.
  Paecilomices sp.
  Wallemia sp.

- Crecimiento de hongos con más de 14 % de humedad
- Producción de micotoxinas con más de 17 % de humedad

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

- Resultados de los años 2012, 2013 y 2014

- Más de 3.200 investigaciones en materias primas de cebada, trigo, centeno, maíz, DDG de maíz, germen de maíz, gluten y palmiste

- Micotoxinas:
  - Vomitoxina
  - Zearalenona
  - Fumonisinas (maíz y sus subproductos)
  - T_2/HT_2
  - Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2
  - Ocratoxinas

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Cebada / Trigo

	Toxina	Presencia [%]	Cantidades [ppb]	Limites de detección [ppb]	Recomendaciones/ Legislación [ppb]
Cebada	Vomitoxina	3,5	300 – 1.500	200	< 8.000
	Zearalenona	1,4	50	50	< 2.000
	Toxina T_2/HT_2	0	---	10	---
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	1,1	10 – 100	10	50
Trigo	Vomitoxina	23,2	200 – 12.000	200	< 8.000
	Zearalenona	10,6	50 – 170	50	< 2.000
	Toxina T_2/HT_2	0	---	10	---
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	1,0	10	10	50

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Centeno / Maíz

	Toxina	Presencia [%]	Cantidades [ppb]	Limites de detección [ppb]	Recomendaciones/ Legislación [ppb]
Centeno	Vomitoxina	16,0	200 – 300	200	< 8.000
	Zearalenona	5,6	50 – 70	50	< 2.000
	Toxina T_2/HT_2	0	---	10	---
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	0	---	10	50
Maíz	Vomitoxina	51,1	200 – 11.400	200	< 8.000
	Zearalenona	23,1	50 – 980	50	< 2.000
	Toxina T_2/HT_2	52,1	10 – 630	10	---
	Fumonisinas	31,3	200 – 4.600	200	< 60.000
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	1,8	10 – 4.400	10	20

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

DDG / Germen de maíz

	Toxina	Presencia [%]	Cantidades [ppb]	Limites de detección [ppb]	Recomendaciones/ Legislación [ppb]
DDG	Vomitoxina	95,7	200 – 4.700	200	< 8.000
	Zearalenona	81,3	50 – 590	50	< 2.000
	Toxina T_2/HT_2	71,4	50 – 80	10	---
	Fumonisinas	60,0	400 – 3.900	200	< 60.000
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	62,5	10 – 30	10	20
Germen de maíz	Vomitoxina	100	1.200 – 2.500	200	< 8.000
	Zearalenona	100	60 – 320	50	< 2.000
	Toxina T_2/HT_2	0	---	10	---
	Fumonisinas	75,0	1.500 – 2.600	200	< 60.000
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	0	---	10	20

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Análisis de micotoxinas

Gluten / Palmiste

	Toxina	Presencia [%]	Cantidades [ppb]	Limites de detección [ppb]	Recomendaciones/ Legislación [ppb]
Gluten	Vomitoxina	100	400 – 7.900	200	< 8.000
	Zearalenona	100	200 – 1.400	50	< 2.000
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	60,7	10 – 40	10	20
Palmiste	Vomitoxina	7,7	200	200	< 8.000
	Zearalenona	0	---	50	< 2.000
	Toxina T_2/HT_2	0	---	10	---
	Fumonisinas	0	---	200	< 60.000
	Aflatoxinas B_1,B_2,G_1,G_2	0	---	10	50

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Conclusiones

- Vomitoxina es la micotoxina más común en cereales de cosecha; la presencia de Vomitoxina nos indica la posibilidad de presencia de otras toxinas de Fusarium sp. (Zearalenona, T_2/HT_2). Si no encontramos Vomitoxina no habrá otras toxinas de Fusarium.
- Maíz y sus subproductos (germen, DDG y gluten) son las materias primas que presentan más contaminación de micotoxinas.
- Ocratoxinas no tienen ninguna importancia en cereales para la producción de piensos.
- Siempre es mejor hacer investigaciones de micotoxinas específicas en las materias primas que en los piensos acabados.

Acciones

Compra de materias primas

Establecimiento de niveles máximos admisibles de micotoxinas en materias primas

Materia prima	Aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2* [ppb]	Vomitoxina [ppb]	Zearalenona [ppb]	Fumonisinas B_1, B_2 [ppb]
Maiz	40	4.000	3.000	60.000
Trigo	100	2.000	2.000	-
Cebada	100	2.000	2.000	-
Sorgo	100	2.000	2.000	-
Tercerillas	100	2.000	2.000	-
Gluten	40	4.000	3.000	60.000
Germen Maiz	40	4.000	3.000	60.000
Alfalfa	100	2.000	2.000	-
Girasol	100	2.000	2.000	-
Soja	100	2.000	2.000	-

* Niveles dos veces más altos que en el Reglamento (CE) n° 32/2002

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Acciones

Compra de materias primas

Proveedores de materias primas

- Confianza
- Contrato
- Certificados de análisis
- Posibilidades de rechazo de los envíos de materias primas
- Auditoría

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Acciones

Selección de materias primas

- Aspecto de la materia prima
  - Suciedad, restos
  - Olor, infestación de hongos
- Analítica rápida de micotoxinas en materias primas de riesgo alto (plan de autocontrol)
  - Maíz
  - Subproductos del maíz (DDG, Gluten, Germen de maíz)
  - ???

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Acciones

Otros requerimientos

Limpieza y higienización de la materia prima en la salida de la piquera

- Eliminación de restos de tierra
- Eliminación de granos rotos y de finos
- Prevención: Tratamiento de cereales y semillas de algodón con antifúngico

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Producción de piensos

- Plan de limpieza
  - Silos
  - Circuitos de producción
  - Camiones
- Control de plagas
- Niveles máximos admisibles de micotoxinas en Porcino
- ¿Uso de captadores de micotoxinas (secuestrantes)?

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Niveles máximos admisibles de micotoxinas en Porcino

		BAJO	MEDIO	ALTO	Riesgo policontaminación
		ppb			
Ocratoxina A	**Lechones**	25	50	>50	Afla
	Cerdos	50	50-100	>100	
	Cerdas	50	50-100	>100	
Aflatoxinas	**Lechones**	<10	10.0-40.0	>40	
	Cerdos				
	Cerdas				
Zearalenona	**Lechones**	50	50-100	>100	
	Cerdos	100	100-300	>300	
	Cerdas	50	50-100	>100	
Vomitoxina	**Lechones**	300	300-500	>500	>1000 ppb
	Cerdos	500	500-1000	>1000	Toxina T2 (avicultura, lechones) Relación (1:5 a 1:10)
	Cerdas	300	500-1000	>1000	Zearalenona (Porcino) Relación (1:10)
Toxina T-2	**Lechones**	10	10.0-50.0	>50	
	Cerdos				
	Cerdas				
Fumonisina	**Lechones**	500	500-1000	>1000	
	Cerdos				
	Cerdas				

Animales muy sensibles a la familia de los tricotecenos /
Atención sinergismo: DON/ZEA/FUM

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Captadores de micotoxinas

En la actualidad las principales moléculas usadas son:

- Glucomananos procedentes de la pared celular de levaduras
- Enzimas bacterianos o de levaduras
- Polímeros de carbono
- Polímeros de sílice

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

Captadores de micotoxinas

	Glucomananos y beta-glucanos	Enzimas bacterianos o de levaduras	Polímeros de carbono	Polímeros de sílice
Productos	Paredes celulares de levaduras (Saccharomyces cerevisae)	Microorganismos y enzimas	Polivinil pirrolidona, carbón activo y el grafito	
Principio en el que se basan	Competencia entre hongos, bacterias y levaduras por preservar la fuente de nutrientes (materia orgánica)		Compuestos de alto peso molecular que captan las micotoxinas mediante interacciones iónicas	
Modo de actuación	forman parte de la estructura de la capa externa de la la membrana celular de las levaduras que conjunto con polisacáridos asociados actuán como método de resistencia a la entrada de las micotoxinas al citoplasma.	Microorganismos que compiten con los hongos productores de micotoxinas	Formación de moléculas de alto peso molecular incapaces de atravesar la barrera intestinal eliminándose con las heces	
		Microorganismos que metabolizan micotoxinas en su citoplasma		
		Enzimas que desactivan la estructura química de las micotoxinas		
		Epoxi-reductasas: Tricotecenos Estearasas: Fumonisinas Peptidasas: Ocratoxina Carbonil-reductasas: Aflatoxinas		
Limitaciones	La capacidad de secuestro depende de la fracción de betaglucanos y el grado de ramificación.	Gran especificidad microorganismo/enzima sobre la micotoxina	La capacidad de secuestro depende de la estructura cristalográfica	
	Gran especificidad glucomanano-micotoxina. Esto implica que el captador debe ser específico de la micotoxina a fijar lo que dificulta el manejo en la plantas productoras de pienso		Capacidad de secuestro de micotoxinas polares o con cierto grado de polaridad	

Captadores de micotoxinas

¿Qué debemos mirar al escoger un secuestrante?

- Rango de micotoxinas sobre las que actúa
- Ensayos de evaluación del producto:

- **Evaluación « in vitro »**

Un buen secuestrante con buenos resultados in vitro no tiene por qué funcionar bien in vivo (muy difícil extrapolar).
Limitaciones: Los pHs de trabajo no son válidos ni para monogástricos ni para poligástricos; no tienen en cuenta enzimas, microbiota, temperatura fisiología, etc..

- **Evaluación « in vivo »**

Imprescindibles si queremos valorar la capacidad del captador y obtener buenos resultados.
Órganos diana: Hígado, útero, mollejas, estudios de evaluación de los distintos niveles de células del sistema inmune.

GRUPO SETNA

invivo Nutrición y Salud Animal

¡Muchas gracias
por
su atención!

GRUPO SETNA

invivo
Nutrición y Salud Animal