



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Förekomst och effekt av mykotoxin i ensilage till mjölkkor

Jonna Gertzell



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 48

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Förekomst och effekt av mykotoxin i ensilage till mjölkkor

Occurrence and effects of mycotoxins in silage for dairy cows

Jonna Gertzell

Handledare:

Rolf Spörndly, SLU, institutionen för husdjurens utfodring och vård

Examinator: Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2014

Omslagsbild: Jonna Gertzell

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 48
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: mykotoxin, ko, mjölk, patulin, roquefortin C, mykofenolsyra, zearalenon, deoxynivalenol, aflatoxin.

Key words: mycotoxin, cow, dairy, patulin, roquefortine C, mycofenolic acid, zearalenone, deoxynivalenol, aflatoxin.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Förekomst, metabolism och effekt av mykotoxin i Ensilage till mjölkkor	4
Definition av mögelsvamp och mykotoxin	4
Förekomst av mykotoxiner i ensilage	4
Penicillium	5
Roquefortin C	5
Mykofenolsyra	6
Patulin.....	7
Fusarium.....	8
Deoxynivalenol	8
Zearalenon	9
Aspergillus	10
Aflatoxin.....	11
Cocktaileffekt	12
Övergång i mjölk.....	13
Diskussion	14
Literaturförteckning	15

SAMMANFATTNING

Mögel förekommer ofta i delar av ensilage som exponerats för syre. Många mögelarter är ofarliga men vissa kan bilda mykotoxiner som har negativa effekter på flera djurarter. Mjölkkor anses vara mer motståndskraftiga mot mykotoxiner än andra djur eftersom mikrofloran i våmmen har förmågan att bryta ned vissa av dessa. Det finns ändå bevis för att vissa toxiner har negativ effekt även på mjölkkor. En del mykotoxiner kan också utsöndras med mjölken och därmed utgöra en fara för konsumenterna.

I den här uppsatsen utreds vilka effekter roquefortine C, mykofenolsyra, patulin, deoxynivalenol, zearalenon och aflatoxin har på mjölkkor och om de utsöndras med mjölken. Mykotoxinernas verkningsmekanismer är mycket komplexa och studierna är för få för att dra några slutsatser om effekterna eller i vilka koncentrationer effekterna uppstår. I fallbeskrivningar om förgiftningar av roquefortine C, patulin och deoxynivalenol beskrivs mycket allvarliga symptom och till och med dödsfall hos mjölkkor. I motsvarande experimentella studier hittas däremot inte lika kraftiga effekter och ibland inga effekter alls.

Flera mykotoxiner tycks ha immunsupprimerande effekt och en del har också negativ effekt på våmmens mikroflora. Det är troligt att flera olika faktorer i miljön samverkar i så kallad ”cocktaileffekt” och framkallar sjukdom hos korna. En immunnedsättning orsakad av mykotoxiner skulle till exempel kunna underlätta för en annan patogen att etablera sig och orsaka sjukdom.

Det enda mykotoxinet som har reglerade gränsvärden i mjölk i EU är aflatoxin. Det är också aflatoxin som har den största förmågan att utsöndras i mjölken. Andra mykotoxiner övergår också i mjölken, bland annat deoxynivalenol och zearalenon, men de övergår i så liten mängd att de troligvis inte utgör någon risk för konsumenten.

SUMMARY

Mold is common in silage that has been exposed to oxygen. Most mold species are harmless but some produces mycotoxins that can be potent pathogens to many animals. Dairy cows are regarded to be more resistant to mycotoxins thanks to the microflora in the rumen and its capability to degrade some of the mycotoxins. There are also mycotoxins that have been proven to be harmful even to cows. Some mycotoxins can be excreted with milk and thereby possess danger to consumers.

In this paper the effects of roquefortine C, mycofenolic acid, patulin, deoxynivalenon, zearalenone and aflatoxin on dairy cows are investigated. The mechanisms of mycotoxins on dairy cows are very complex and the recent studies in the area are too few to make any certain conclusions about the effects and in which amounts they occur. In case studies about roquefortine C, patulin and deoxynivalenon intoxications severe symptoms and even deaths are described. Although in correlative experimental studies few or no effects are found.

Many mycotoxins seems to have negative effects on the immune system and some also have negative effects on the rumen microflora. It is plausible that many different factors in the environment consociates in a so called “cocktail-effect” and induces disease in the cows. Impaired immune system following mycotoxin intoxication could for example make it easier for another pathogen to establish and cause disease.

The only mycotoxin that has regulated limits in milk in the EU is aflatoxin. Aflatoxin is also the toxin that is excreted in milk in the highest percentage. Other mycotoxins are also excreted in milk, for example deoxynivalenon and zearalenone, but the amount excreted toxin is so low it probably does not possesses any risk for the consumers.

INLEDNING

Ensileringsprocessen ska hindra mögel från att växa på fodret genom att bilda en syrefattig miljö med lågt pH. Men om ensileringen inte blir tillräcklig eller det går hål på plasten så att syre kommer i kontakt med fodret är risken för mögeltillväxt stor. Mögel kan i sig vara hälsofarligt och orsaka luftvägssjukdomar (Fink-Gremmels, 2008b). Men mögelsvamparna kan också tillverka mykotoxiner som orsakar sjukdom hos flera olika djurslag. Våmmens mikroflora fungerar som ett första försvar mot mykotoxiner eftersom mikrofloran kan bryta ned en del toxiner. Därför anses idisslare vara mer tåliga mot mykotoxiner än andra djurslag (Kiessling et al., 1984). Samtidigt kan våmmens mikroflora ta skada av mykotoxinerna (Tapia et al., 2002) vilket kan ge andra negativa effekter för idisslarna. Mykotoxiner i foder till mjölkkor är därför en komplex och intressant fråga. I den här uppsatsen är målet att utreda vilka huvudsakliga mykotoxiner som förekommer i svenskt ensilage och vad de kan ha för effekt på mjölkornas hälsa samt om toxinerna kan hamna i mjölken.

MATERIAL OCH METODER

Artikelsökningar gjordes i SLU-bibliotekets söktjänst Primo samt i databaserna Web of science och Google Scholar. Sökningarna har gjorts kontinuerligt under arbetets gång för att kunna hitta komplementärartiklar. För att begränsa resultaten i sökningarna har flera olika ord från olika kategorier kombinerats.

Exempel på kategorier och ord:

Mögel (t.ex. mould, mold, fungi, penicillium, aspergillus, fusarium etc.)

Mykotoxiner (t.ex. mycotoxin, roquefortine, patulin, zearalenon, mycofenolic acid etc.)

Idisslare (t.ex. cow, cattle, bovine, ruminant, heifer, calves etc.)

Effekter (t.ex. mycotoxicosis, health, symptom, diagnosis, effect, milk, diary etc.)

Metabolism (t.ex. metabolism, digestion, absorption, rumen etc.)

Förekomst i ensilage (t.ex. silage, forage, fodder, feed, feedstuff etc.)

Förkortningar med asterisk har använts för att innefatta plural och böjningar av ett och samma ord, t.ex. diagnosis blir diagnos* vilket kan ge orden diagnosis, diagnostic, diagnosed etc.

FÖREKOMST, METABOLISM OCH EFFEKT AV MYKOTOXIN I ENSILAGE TILL MJÖLKKOR

Definition av mögelsvamp och mykotoxin

Mögelsvampar består av trådlika celler (hyfer) som tillsammans bildar långa filament. De förökar sig asexuellt genom att bilda sporer som lätt kan spridas med vinden. För att mögelsvamparna ska kunna växa krävs näring, vatten, syre och passande pH. Mögel som växer på foder använder alltså fodret som näring. Svamparna släpper ut enzymer som bryter ned fodret, sedan absorberar de den frigjorda näringen. Mykotoxiner är giftiga ämnen (toxiner) som bildas av mögelsvampar som sekundära metaboliter. Till skillnad från primära metaboliter är de sekundära metaboliterna inte essentiella för att svampen ska kunna överleva. De sekundära metaboliterna kan därför vara specifika för vissa mögelarter och bara bildas av en art eller flera olika (Yiannikouris och Jouany, 2002). Alla sekundära metaboliter är inte giftiga och vissa mögelarter bildar inte mykotoxiner överhuvudtaget. Vissa mögelarter kan dessutom förekomma i flera olika klimat men bara bilda toxiner i vissa klimat. Till exempel så bildas mykotoxinet aflatoxin bara i varma klimat medan fumonisin framför allt förekommer i tempererade, våta klimat (Driehuis et. al, 2008). Förgiftning med mykotoxiner kallas mykotoxikos.

Det går att analysera foder för förekomst av både mögel och mykotoxiner. Det är dyrare att göra undersökning för mykotoxiner speciellt om sökningen ska göras för flera olika toxiner. Eftersom mögelsvampar kan förekomma utan att bilda toxin behöver en analys av mögelförekomst inte ge en korrekt bild av toxinförekomsten.

Förekomst av mögel och mykotoxiner i ensilage

För att få ett bra ensilage med god hållbarhet finns det vissa optimum att hålla sig till. Ts halten (torrsubstanshalten) får inte vara för låg, helst inte under 35% ts, för att undvika att vissa bakterier ska växa till, exempelvis *Clostridium botulinum*. Den ska inte heller vara för hög, helst inte över 50% ts, för då blir fermenteringsprocessen inte optimal. För att komma upp i minst 35% ts förtorkas grödan innan den packas. Fermenteringsprocessen innebär att naturligt förekommande mjölksyrabakterier bryter ned enkla sockerarter i ensilaget under produktion av mjölksyra och ättiksyra vilket sänker pH i ensilaget. Lågt pH hämmar tillväxten av bakterier, mögel och jäst. Helst ska pH ligga under 4,5 enheter. För att göra miljön gynnsam för mjölksyrabakterierna och ytterligare hämma andra bakterier, jäst och mögel pressas och täcks ensilaget så att miljön blir nästan syrefri (anaerob).

Mögel måste ha tillgång till styre för att kunna växa. Eftersom mögel generellt tål lägre pH och högre ts-halter än bakterier gynnas mögeltillväxten framför bakterietillväxten om ensilaget exponeras för syre.

Schenck et al. (2013) genomförde en undersökning om mögelförekomsten i svenska och norska hösilagebalar. Hösilage är ensilage på vall som torkats till en ts-halt på 50-80%. Enligt Schenck et al. (2013) är hösilage med högre ts-halt mer poröst och syre som kommer i kontakt med hösilaget kan lättare sprida sig långt in i ensilaget till skillnad från i tätt packat ensilage. Andra faktorer Schenck et al. (2013) fann som påverkade mögelförekomsten i hösilage var torkningsmetod, mängden ättiksyra, täckningsgrad, skördenummer och breddgrad.

Förtorkning med bredspridning gav mindre mögel än torkning via strängläggning troligtvis för att bredspridning ger kortare torkperiod (Schenk et al., 2013). Ättiksyra har svamphämmande effekt (Schenk et al. 2013) och därför minskade mängden mögel med högre mängd ättiksyra. Genom att använda minst 9 lager plast vid täckningen av ensilagebalarna minskade också mögelförekomsten. Mögelförekomsten ökade med högre skördenummer och högre breddgrad.

Mögel kan angripa grödorna innan skörd, fältflora, eller vid lagringen av fodret, lagringsflora. Vissa mögelsorter kan vara både fältflora och lagringsflora.

I Sverige är *Penicillium roqueforti* den vanligast förekommande mögelsvampen i hösilage (Schenk et al., 2013) men flera andra arter förekommer också, däribland flera aspergillusarter. I majsensilage är det framför allt fusarium-, penicillium- och aspergillus-arter som är mest frekventa i Sverige (Karlsson, 2010). I Nederländerna undersöktes prover från både majsensilage och gräsensilage (Driehuis et. al. 2008). Det visade sig att toxinerna deoxynivalenol (DON) och zearalenon återfanns i stor utsträckning i majsensilage, 100% av majsensilageproverna innehöll DON. Både prover från majsensilage och gräsensilage innehöll roquefortin C och mykofenolsyra. Även toxinet patulin förekommer ofta i ensilage (Tapia et al., 2006). Zearalenon och DON är toxiner som bildas av fusariumarter medan roquefortin C och mykofenolsyra framför allt bildas av penicilliumarter. Patulin bildas av penicillium-, byssochlamus- och aspergillus-arter.

Utifrån dessa studier ligger fokus i denna uppsats på roquefortin C, mykofenolsyra, patulin, DON och zearalenon. Även aflatoxin utreds eftersom det är det viktigaste toxinet ur humanperspektiv även om kvantiteterna i svenskt ensilage troligtvis är mycket små eller obefintliga.

Penicillium

Det finns flera *Penicillium*-arter som används inom industrin. De mest kända exemplen är antagligen framställning av penicillin och roquefortost. *Penicillium* är inte alltid önskvärd utan är den mögelsvamp som nästan alltid förekommer i mat eller foder som förstörts av mögelangrepp. *Penicillium* förekommer ofta som lagringsflora på ensilage (Mislivec 1977). Arten *Penicillium roqueforti* är bland de vanligaste mögelsvamparna på ensilage eftersom den klarar av att växa vid lågt pH och i syrefattig miljö (Driehuis et al., 2008). Det finns flera toxiner som bildas av *Penicillium* bland annat PR-toxin, citrinin, penicillinsyra och ochratoxin. Utifrån resultaten i den nederländska studien på mykotoxinförekomst i ensilage (Driehuis et. al. 2008) ligger vikten i den här rapporten på roquefortin C och mykofenolsyra.

Roquefortin C

Roquefortin C bildas av flera olika penicilliumarter men i ensilage bildas det framför allt av *Penicillium roqueforti* (Abramson, 1997). Roquefortin C är en alkaloid med neurotoxiska egenskaper (giftet går på nervsystemet) (Wagener et al., 1980).

Effekter av roquefortin C

Roquefortin C har paralyserande effekt hos kycklingar enligt Wagener et al. (1980). De gjorde försök på en dag gamla kycklingar som gavs toxin oralt via intubering. Två timmar efter givan började kycklingarna förlora balansen, sätta sig ner och luta åt en sida. Fem timmar senare dog kycklingarna med huvud och nacke bakåtsträckta samt ben och fötter utsträckta från kroppen.

Tüller et al. (1998) genomförde en studie på 18 får som utsattes för roquefortin C i fodret. Nivåerna skulle spegla normalt förekommande nivåer av toxinet i foder (0-25mg/kg ensilage). Kliniska data, kemiska blodvärden (ASAT, ALAT, glutamatdehydrogenas, bilirubin, blodglukos), blodvärden (antal röda blodkroppar; vita blodkroppar, blodplättar, hemoglobin och hematokrit) samt värden för könshormoner (progesteron, luteniserande hormon och follikelstimulerande hormon) samlades i 34-36 dagar. Eliminationen av roquefortine registrerades genom urin och träckprover. Efter försöket avlivades djuren varpå obduktion och mikroskopisk undersökning genomfördes. Nästan inga skillnader mellan kontrollgruppen och de som fått roquefortin C kunde detekteras. Den enda skillnaden var pH-värdet i våmmen som var lägre hos roquefortin-gruppen (som mest 0,5 enheter lägre). Skillnaden berodde enligt Tüller et al. (1998) troligen på att våmbakterierna *Laktobacillus* och *Clostridium* är mer motståndskraftiga mot roquefortin C än andra grampositiva bakterier i våmmen. *Laktobacillus spp.* och *Clostridium spp.* tillverkar syror som sänker pH-värdet, därav pH-sänkningen i försöket. Tüller et al. (1998) drog därför slutsatsen att roquefortin C inte är giftigt för får i normala doser.

Hägglom (1990) föreslog i motsats till Tüller et al. (1998) att roquefortin C orsakade kraftiga reaktioner hos mjölkkor redan vid koncentrationerna 25mg/kg. Från en gård i norra Sverige rapporterades att korna led av ketos, mastit, paralyt och aborter. Paralyt gick inte att bota med kalcium-behandling. Vid provtagningar av fodret (en blandning av melass och korn) hittades rik växt av *Penicillium roqueforti*. Toxinet roquefortin C beräknades till 25,3mg/kg foder. Symptomen upphörde när korna fick nytt foder som var fritt från roquefortin C.

Mykofenolsyra

Flera olika penicilliumarter kan bilda mykofenolsyra. Den art som främst förekommer i ensilage är *Penicillium roqueforti* (Driehuis et al., 2008). Mykofenolsyra används inom humanmedicinen som immunförsvarshämmare vid organtransplantation. Doserna som används vid sådana tillfällen är dock mycket högre än de som normalt förekommer i ensilage (Mohr et al., 2007).

Enligt (Mohr et al., 2007) sker ingen nedbrytning av mykofenolsyra i våmmen.

Effekter av mykofenolsyra

Mykofenolsyra från danskt ensilage hade enligt Rasmussens et al. (2011) studie bara viss cytotoxisk (cellskadande) effekt på mänskliga cancerceller (caco 2 cellinje). Studien var en in vitro-studie den utfördes alltså i artificiell miljö och inte i levande djur.

Baum et al. (2005) genomförde en studie på 36 bagglamm (6-8 månader gamla) som fick 0, 10, 70 eller 300mg mykofenolsyra dagligen i 44 dagar. Leverenzym och blodvärden (ASAT, ALAT, glutamatdehydrogenas, bilirubin, blodglukos, antal röda blodkroppar; vita blodkroppar, blodplättar, hemoglobin och hematokrit) analyserades genom blodprov två gånger i veckan under studieperioden. Hälsostatusen och

temperaturen registrerades varje dag, tre gånger under studieperioden vägdes fåren (dag 0, 22 och 40). Vid slutet av studien avlivades fåren och undersöktes genom obduktion. Lammen åt bra och ökade i vikt lika mycket i alla grupper. Vid obduktionen visade sig 11 av lammen som utatts för mykofenolsyra ha tecken på lunginflammation.

Vid mikroskopering av lymfatiska organ (ileum, svalglymfknutor, kröslymfknutor, brässen och mjälten) upptäcktes tecken på att immunförsvaret var nedsatt. Det var framför allt förminskning av brässen och lägre nivåer av antikroppsbarande celler i lymfknutor och ileum som kunde kopplas till en eventuell immunnedsättning vid normalt förekommande mängder mykofenolsyra (Baum et al. 2005).

Patulin

Patulin tillhör substansgruppen cykliska laktoner. Som tidigare nämnts produceras toxinet av ett flertal olika mögelsvampar inom *Penicillium*-, *Byssoclamus*- och *Aspergillus*arterna (Sabater-Vilar et al., 2004).

Effekter av patulin

Patulin hämmar mikrofloran i våmmen. Vid 30mg/l våmmvätska minskar mikroorganismernas aktivitet; nedbrytningen av foderämnen och produktionen av bakterieprodukter (bakterieproteiner och flyktiga fettsyror) minskar. 30mg/l våmmvätska motsvarar ungefär en patulinkoncentration på 150mg/kg foder. Sådana mängder kan förekomma i mögliga partier av majsensilage (Tapia et al., 2002).

Tapia et al. (2006) genomförde ett försök med patulin på mjölkfår och köttlamm. Nio köttlamm användes i det första försöket varav 5 fick patulin via intubering (de övriga fyra fungerade som kontrollgrupp). De första tre dagarna utsattes lammen för 3,3mg patulin per kg kroppsvikt sedan följde två dagar då de fick 4,5mg patulin per kg kroppsvikt. Den sjätte dagen fick de 5mg patulin. Alla lammen vägdes innan försöket startade och sedan dagarna 0,3,5,7 och 13. Foderintaget mättes dagligen. Efter tre dagar på köttlammsförsöket togs två av lammen som utsatts för patulin ur försöket eftersom de minskat sitt foderintag för mycket. Det ena av lammen var dessutom nedstämt och ovilligt att äta. De övriga patulinlammen minskade också sitt foderintag så att det dag 6 var 40% lägre än kontrollgruppens foderintag. De ökade inte heller i vikt lika bra som kontrollgruppen (0,2 kg/dag i jämförelse med 0,5kg/dag i kontrollgruppen). Förutom det lammet som hade nedsatt allmäntillstånd så upptäcktes inga kliniska symptom hos resten av gruppen. Tapia et al. (2006) föreslår att det minskade foderintaget beror på patulinets toxiska effekt på våmmfloran. Mikrofloran hämmas och kan då inte bryta ned lika mycket fodermaterial som annars.

Försöket med mjölkfåren genomfördes på samma sätt men utöver det så mättes olika blodvärden och mjölksammansättningen. Till skillnad från den första studien kunde inga effekter av patulinbehandlingen upptäckas hos fåren. Skillnaden mellan effekterna på köttlammen och mjölkfåren beror enligt Tapia et al. (2006) troligtvis på att grupperna fick något olika fodersammansättning och att våmmfloran hos fåren därför var mer motståndskraftig än den hos lammen.

Stec et al. (2008) genomförde ett in vitro-test av patulineffekten på vita blodkroppar (lymfocyter) från nötkreatur. Vita blodkroppar samlades från sex friska kor och förökades sedan i olika lösningar för att framkalla celldelning. Sex olika patulinkoncentrationer från 0,01µg/ml- 10µg/ml blandades i cellösningarna och jämfördes med kontroller utan patulin. Vid 0,10-0,20µg/ml patulin i de olika cellösningar hämmades cellförökningen med 50% jämfört med kontrolllösningarna. Stec et al. (2008) menar att detta är applicerbart på levande djur och att patulin alltså har en negativ effekt på kornas immunförsvar.

Ett utbrott av förgiftning med neurologiska symptom uppstod hos nötkreatur för köttproduktion i flera olika besättningar i Flandern, Belgien (Sabater-Vilar et al., 2004). Symptomen utvecklades från svaghet i bakbenen, ataxi (svårighet att koordinera muskelrörelser) och vaggande bakdel till muskeldarrningar, progressiv förlamning som slutade i fullständig förlamning och eventuellt död. Inom 16 dagar hade 30 djur utvecklat symptom och tio stycken hade dött. Vid obduktion av de tio döda djuren hittades mer eller mindre nervdegeneration (förstörda nervceller) hos nio individer. Det som var gemensamt för de drabbade besättningarna var att de använde ett foder som innehöll drank från den lokala bryggeriindustrin. Vid analys av fodret hittades mögelsvampen *Aspergillus clavatus* som visade sig producera patulin. Med viss osäkerhet återfanns också verruculogen (ett penicilliumtoxin) i proverna. Det gick inte att kvantifiera mängden patulin i fodret och det gick inte heller att utesluta förekomsten av andra mykotoxiner i fodret.

Fusarium

Fusarium kan förekomma på alla spannmålssorter. De delar av grödan som är angripna av fusariumsvampar får ofta en rosa färgskiftning. Regniga, varma somrar ökar risken för fusariumangrepp markant. Fusarium bildar flera viktiga mykotoxiner bland annat ochratoxin, zearalenon och trichothecener. Fusarium angriper spannmål på fälten och bildar toxiner redan då men toxin kan också bildas under lagringen av redan angripen gröda om torkningen eller lagringsförhållandena inte är tillräckligt bra (Berg et al., 2012). Riktlinjer för förekomsten av fusariumtoxiner i foder finns i Europakommissionens rekommendation EG 576 (2006).

Deoxynivalenol

Deoxynivalenol (DON) är en typ B-trichotecen som produceras av fusariumsvampar. Vid försöket Driehuis et al. (2008) genomförde var DON det sammantaget vanligaste mykotoxinet i foder. DON anses vara den minst toxiska trichotecenen för djur (Ingalls, 1996).

DON omvandlas nästan helt och hållet till de-epoxy-DON i våmmen (Dänicke et al. 2005). De-epoxy-DON är betydligt mindre toxiskt än modersubstansen DON eftersom den reaktiva epoxid-gruppen saknas.

Effekter av deoxynivalenol

Vid ett försök på 32 mjölkkor som utsattes för mellan 2,1 och 8 mg DON per kg helfoder hittades inga effekter på foderintag, vikt, våmm pH, mjölmängd eller mjölksammansättning (Ingalls, 1996). Inte heller vid ett mindre försök med sex kor som utsattes för en blandning av fusariumtoxiner, framför allt DON (mellan 2,5 och 8,1 mg DON per 100kg kroppsvikt) kunde någon effekt på mjölmängd eller foderintag visas (Dänicke et al., 2005). Däremot kunde en signifikant ökning av ammoniak i våmmen påvisas inom de fem första timmarna efter utfodring med toxininnehållande foder. Ökningen av ammoniak berodde enligt Dänicke et al. (2005) troligtvis på fusariumangreppet av vetet vilket gav en högre andel ej-proteinbundet kväve i vetet. Högre andel kväve som inte är proteinbundet och mindre andel protein ger en mindre mängd protein i tunntarmen eftersom mikroberna inte hinner bygga upp mer protein. Men mikroberna i våmmen blev också sämre på att bilda nya proteiner. Detta berodde troligen på förändrad våmmflora vilket i sin tur skulle kunna berott på fusariumtoxiner eller på den ändrade sammansättning av vetet på grund av fusariumangreppet (Dänicke et al., 2005).

I en besättning på 90 mjölkkor i Polen upptäcktes ospecifika symptom hos 12 av korna (Marczuk et al., 2012). Symptomen uppstod bara 2-3 timmar innan de dog. Blodprov togs från djur som visades symptom och jämfördes med en kontrollgrupp som inte visade symptom. Blodproverna från de påverkade korna visade nivåer av DON från $18,48 \pm 12,27$ ng/ml till $24,35 \pm 16,09$ ng/ml och zearalenon <5 ng/ml- $14,30 \pm 5,24$ ng/ml. I gruppen med de högsta värdena av DON och zearalenon konstaterades en signifikant höjning av vita och röda blodkroppar. DON kan ändra laddningen hos vita blodkroppar (lymfocyter) vilket är troligt i det här fallet enligt Marczuk et al. (2012). Då utlöses en akut autoimmun respons vilket skulle vara orsaken till att korna avled (Marczuk et al., 2012).

Zearalenon

Zearalenon är liksom patulin en cyklisk lakton. Toxinet förekommer ofta samtidigt som DON eftersom de kan produceras av samma mögelsvampar (*Fusarium graminearum* och *F. culmorum*). Zearalenon kan binda till samma cellreceptorer som östrogen och ger därför östrogena effekter. Det känsligaste djurslaget är svin där man kan se förstörade juver, små kullar och svaga kultingar (Yiannikouris och Jouany, 2002).

Zearalenon omvandlas nästan fullständigt till zearalenol i våmmen. Zearalenol är lika eller ännu mer toxiskt än zearalenon. Samtidigt har zearalenol en mer polär laddning än modersubstansen zearalenon och upptaget från tunntarmen minskar därför (Kießling et al., 1984).

Effekter av zearalenon

I en polsk studie undersöktes effekterna av zearalenon på får av kötttrasblandning (Kostro et al., 2011). 65 djur, 50 tackor och 15 baggar, utfodrades med kontaminerat kraftfoder i ett inomhussystem. Kraftfodret innehöll mellan 4,05-14,49 µg/kg zearalenon. Resterande 135 djur, 100 tackor och 35 baggar, hölls på bete större delen av

året och utfodrades på vintern med kraftfoder som bara innehöll 3,07 µg/kg zearalenon. Flertalet djur i inomhussystemet fick ökad tarmmotorik (peristaltik) vilket ledde till anal- och rektalframfall (prolaps). 35 av djuren dog till följd av rektalprolaps. Blodprov togs på tio djur från vardera grupp och analyserades för zearalenonhalt och proportioner vita blodkroppar (lymfocyter). Man undersökte vilka receptorer som uttrycktes på lymfocyterna (CD8 eller CD4). Hos gruppen som utsatts för zearalenon förekom zearalenon i blodet hos samtligadjur i koncentrationer mellan 4,44-15,68 ng/kg. Även zearalenol förekom hos sju av de tio fåren, i koncentrationerna 4,16-13,78 ng/kg. Värdena hos kontrollgruppen presenteras inte i studien. Både koncentrationerna av CD4-positiva lymfocyter och CD8-positiva lymfocyter i blodet var signifikant lägre hos zearalenongruppen jämfört med kontrollgruppen. Även förhållandet mellan antalet CD4-positiva och CD8-positiva lymfocyter var skevt. Hos zearalenongruppen var kvoten CD4+/CD8+ mellan 1,51-2,76 vilket är högre än normalt. Kontrollgruppens värden låg inom 1,1-1,8 vilket räknas som normala värden. Eftersom lymfocyterna är en viktig del av immunförsvaret innebär minskningen av antalet lymfocyter en försämring av immunförsvaret (Kostro et al., 2011).

Dong et al. (2010) undersökte effekterna av zearalenon på getter efter intravenös injektion av toxinet. Försöket syftade till att ta reda på zearalenonets effekter på cellnivå i vissa organ samt genom PCR-metoden ta reda på om det fanns östrogenreceptorer i de organ som i så fall var affekterade. Tre getter injicerades med 2,4 mg zearalenon per kg kroppsvikt. Lika många getter fungerade som kontrollgrupp. 48 timmar efter injektionen avlivades samtliga djur. Lever, njurar, tunntarm, våm, livmoder och äggstockar togs omhand för mikroskopering och PCR-undersökning. Vid mikroskoperingen av organen från de zearalenonbehandlade djuren hittades cellsvullnad samt infiltration av vita blodkroppar (lymfocyter) i levern. I njurarna hittades vätskeansamlingar i de delar som kallas Bowman's kapsel och även här fanns infiltration av vita blodkroppar. I livmoderslemhinnan fanns också viss infiltratation av vita blodkroppar. I snitten från tunntarm, våm och äggstockar fanns inga signifikanta förändringar. Vid PCR-undersökningen hittades störst mängd östrogenreceptorer i livmödrarna. Det var två olika östrogenreceptorer som undersöktes. Den ena (ER α) fanns i ökad mängd i lever och livmoder hos de djur som behandlats med zearalenon. Den andra (ER β) fanns i ökad mängd i tunntarm hos samma djur. Eftersom inga förändringar hittades vid mikroskopisk undersökning av tunntarmen antog Dong et al. (2010) att zearalenon inte har någon effekt på ER β hos getter. Däremot är det troligt att zearalenon binder till ER α och ger effekter därigenom.

Aspergillus

Aspergillus spp. förekommer både som lagringsflora och fältflora. Enligt Shenck et al. (2013) är *Aspergillus fumigatus* den vanligaste aspergillusarten i svenkt hösilage men även *Aspergillus flavus* som kan bilda aflatoxin förekommer i svenskt hösilage.

Aflatoxin

Aflatoxin är det viktigaste mykotoxinet ur mänskligt perspektiv på grund av den höga toxiciteten för människor.

Aflatoxin bildas av *Aspergillus flavus*, *A. Parasiticus* och *A. Nominus*. Det finns fyra typer av naturligt förekommande aflatoxiner; aflatoxin B₁, B₂, G₁ och G₂. B₁ är mest toxiskt därefter kommer G₁, B₂ och sist G₂ (Smith, 1997). Aflatoxin förekommer i hela världen men i högre andel i tropiska och subtropiska klimat (Moström och Jacobsen, 2011). Aflatoxin kan vara akut toxiska, cancerogena, mutagena, teratogena och immunosuppressiva för de flesta däggdjur. När aflatoxin B₁ metaboliseras kan metaboliten aflatoxin M₁ bildas. Aflatoxin M₁ kan utsöndras med mjölken. Likaså kan metaboliten aflatoxin M₂ bildas ur aflatoxin B₂ och utsöndras med mjölken (Smith, 1997). I den Nederländska studien av majsensilage och gräsensilage hittades inga aflatoxiner (Driehuis et al., 2008).

Aflatoxiner är små fettlösliga partiklar som passerar tarmväggen genom passiv transport. Absorption av aflatoxin kan börja redan i mun och matstrupe och kan detekteras i blodet redan 5 minuter efter oral giva (Gallo et al., 2008). Våmmikroberna har mycket lite effekt på aflatoxin som till stor del passerar våmmen intakt. Däremot påverkar toxinerna våmmikroberna negativt. (Kiessling et al., 1984, Westlake et al., 1989). Toxinerna som absorberas från tarmen transporteras via portavenen till levern där den främsta metabolismen av aflatoxin sker (Kuilman et al., 200). Det mest potenta aflatoxinet, aflatoxin B₁ (AFB₁), omvandlas hos kor främst till aflatoxin M₁ (som är mindre toxisk än moderssubstanten) samt aflatoxin B₁dihydrodiol (AFB₁-dhd) Övriga sekundära metaboliter är också mindre toxiska; aflatoxin M₂ (från AFB₂), aflatoxin Q₁ och aflatoxicol. Neutralisering av de sekundära metaboliterna sker genom att påkoppling av glutation (Kuilman et al., 2000). Aflatoxin elimineras från kroppen via gallan (feces), urin och mjölk (Mostrom and Jacobsen, 2011).

Effekter av aflatoxin

Nötkreatur är mindre känsliga för aflatoxiner än andra men i tillräckligt höga doser drabbas även de av negativa effekter. Unga djur drabbas värre än vuxna (Moström och Jacobsen, 2011). I EU är gränsvärdet för aflatoxin i foder 20 µg/kg och 0,5 µg/kg för helfoder till mjölkkor (2002/32/EG). Gränsvärdena i foder är satta utifrån övergången av aflatoxin till mjölk för att undvika hälsorisker för människor. Det är först vid flera hundra µg/kg som man ser effekter hos korna. Hos mjölkkor är den främsta effekten av aflatoxin minskad mjölmängd. Om korna får i sig stora mängder toxin minskar de foderintaget och unga djur slutar växa. Pågår detta under en längre tid kan kroniska symptom uppstå såsom anorexi (avsaknad av aptit), gulsot och förhöjda nivåer av leverenzymmer (Moström och Jacobsen, 2011).

Fernandez et al. (1996) Gjorde en studie på 23 lamm som de utfodrade med foder som innehöll 2,5mg aflatoxin per kg i 21 dagar. Hälften av lammen i både kontrollgruppen och i gruppen som utsatts för toxinet avlivades efter de 21 dagarna. Resten fick gå åtta dagar till (utan att utsättas för toxin) innan de också avlivades. Blodprover togs med en veckas mellanrum på alla djur under de första 21 dagarna och sedan efter 1, 2, 4 och 8 dagar på de kvarvarande djuren. Lammen som fått aflatoxin ökade inte lika mkt i vikt som kontrollgruppen; kontrollgruppen vägde 22,8±2,4kg och de som fått aflatoxin vägde 17,9±1,8 vid dag 29. Levrarna från lammen som fått aflatoxin var också mindre

än kontrollgruppens och vid mikroskopi hittades viss förfettnig av levern och infiltration av vita blodkroppar.

I Iran insjuknade och dog 35 holsteinkalvar i vad som diagnosticerades som aflatoxicos 2007 (Kaleibar och Helan, 2012). Besättningen hade 200 kalvar varav flertalet led av kroniska diarréer och under fyra månaders tid hade 35 kalvar självdött. Under sex månaders tid hade kalvarna utfodrats med solroskakor som visade sig innehålla 1,13µg aflatoxin per kg. Kalvarna hade behandlats med flera olika antibiotika utan att svara på behandlingarna. Vid undersökning av levande djur fann man feber, anorexi, mild till svår diarré, långsam hjärtrytm, djup andning, blindhet och ataxi. Sjukdomsförloppet slutade i konvulsioner och död. Blodprov från sjuka kalvar visade låga värden av vita blodkroppar samt ökad mängd av enzymerna alkaliskt fosfat och Aspartataminotransferas. De höga enzymvärdena tyder på problem med levern. Obduktionsfynd var ljus, fast lever; mild tarminflammation, vätska i buk och brösthål, förtjockningar av våmmslemhinnan och gulsot. Mikroskopi av lever visade blodstockning, döda leverceller, bindvävsomvandlingar, allvarlig leverförfettnig och förökning av gallgångar. Flera djur var också infekterade med pestivirus vilket enligt Kaleibar och Helan (2012) berodde på aflatoxininducerad immunnedsättning. Kalvarna behandlades genom att byta foder till ett som var fritt från aflatoxin samt ge understödjande behandling med glukos till de som var sjuka (Kaleibar och Helan, 2012).

Det finns än så länge inga botemedel mot aflatoxicos utan det man ska göra är att ersätta kontaminerat foder med foder som är fritt från aflatoxin och eventuellt ge understödjande behandling till påverkade individer (Moström och Jacobsen, 2011).

Cocktaileffekt

Det är vanligt att flera olika mykotoxiner förekommer samtidigt i ett fodermedel dessutom kan de olika fodermedel som ges till korna samtliga innehålla olika mykotoxiner. Effekterna av flera mykotoxiner är svåra att utreda i försök och de additiva effekterna kan bli väldigt komplexa. När det finns flera mykotoxiner kan de samverka så att andra effekter än de vanliga uppstår. Till exempel så kan ett mykotoxin hämma mikrofloran i våmmen så att upptaget av ett annat mykotoxin ökar, detoxifieringen av ett mykotoxin kan hämma detoxifieringen av ett annat etcetera. Det kan desutom finnas additiva effekter mellan mykotoxiner och infektionssjukdomar såsom aflatoxin och hepatit B samverkar till levercancer hos människor (Speijers och Speijers, 2004).

Det finns vissa studier på så kallade cocktaileffekter, framför allt av fusariumtoxiner eftersom de ofta förekommer samtidigt i en produkt. Thuvander et al. (1999) genomförde ett försök med effekterna av fusariumtoxiner DON, T2-toxin, nivalenol (NIV) och diacetoxyscirpenol (DAS) på mänskliga lymfocyter in vitro. Samtliga toxiner hämmade var för sig både lymfocyternas celldelning och produktion av antikroppar. I försöket undersöktes också effekten av olika kombinationer av toxiner. Den sammanlagda koncentrationen av de kombinerade toxiner var samma som när toxiner testades var för sig. Resultaten från de kombinerade toxiner skilde sig mycket beroende på vilka toxiner som kombinerades. När

NIV kombinerades med T2-toxin, DAS eller DON hämmades celledningen av lymfocyterna signifikant mer än när enskilda toxiner testats. Även när DAS och T2-toxin kombinerades ökade den hämmande effekten. Kombinationen av DON med T2-toxin eller DAS gav däremot en minskad eller samma hämmande effekt som när toxinerna testades var för sig.

Övergång i mjölk

För att mykotoxiner ska hamna i mjölken måste de kunna passera blod-mjölckbarriären. Små oladdade partiklar kan passera över barriären fritt. Större eller laddade partiklar kräver aktiv transport genom cellernas transportproteiner för att ta sig över. För att kunna ta sig över barriären måste partiklarna också vara fria i blodet och inte bundna till plasmaproteiner. Ytterligare en faktor som avgör övergången till mjölk är pH i blodet respektive mjölken. Hos en frisk ko är pH-värdet lägre i mjölken än i blodet vilket gör att basiska partiklar har större benägenhet att gå ut i mjölken. Hos en sjuk ko kan pH-värdet i mjölken vara lika högt eller till och med högre än det i blodet, detta påverkar vilka ämnen som tar sig över blod-mjölckbarriären (Fink-Gremmels, 2008b).

Aflatoxin M1 är det enda mykotoxin som har ett reglerat gränsvärde i mjölk i EU. Enligt EG 1881 (2006) får aflatoxin inte överstiga 0,050 µg/kg i mjölk. Eftersom det är så många faktorer som påverkar hur mycket mykotoxin som går över i mjölken, till exempel sjukdom och mjölmängd, är det svårt att beräkna mängden mykotoxin som går över i mjölken. Enligt Fink-Gremmels (2008b) sammanställning övergår 2-6,2% av intaget aflatoxin B1 som aflatoxin M1 i mjölken. Även andra metaboliter av aflatoxiner kan övergå i mjölken till exempel aflatoxin M2 och M4. Även metaboliter av DON och zearalenon övergår i mjölk. Enligt samma sammanställning övergår 0.0004–0.0024% av DON inaget som de-epoxy-DON i mjölk och 0.06–0.08% av intaget zearalenon övergår som zearalenol i mjölken.

DISKUSSION

Mögel och mykotoxiner förekommer ofta i ensilage även om mängderna mykotoxin vanligtvis är låga (Schenk et al., 2013; Driehuis et al., 2008; Karlsson 2010). Den svåra frågan är om dessa låga mängder har några effekter på kornas hälsa. Tyvärr finns det alldeles för få studier för att riktigt kunna besvara frågan. I större mängder har vissa av mykotoxinerna som förekommer i ensilage bevisad negativ effekt på idisslars hälsa (Kostro et al., 2011; Tapia et al., 2006; Fernandez et al. 1996). Flera mykotoxiner tycks ha negativ effekt på immunförsvaret (Stec et al., 2008; Baum et al., 2005; Kostro et al., 2011, Thuvander et al., 1999) vilket eventuellt skulle kunna leda till minskad motståndskraft mot andra sjukdomar. Flera mykotoxiner har också antimikrobiell verkan vilket skulle kunna påverka mikrofloran i våmmen (Tapia et al., 2002; Driehuis et al. 2008) och på så sätt leda till ökad sårbarhet för metabola sjukdomar (Fink-Gremmels, 2008a). Tyvärr är också studierna på hur våmfloran påverkas av mykotoxiner mycket få. Våmfloran utgör samtidigt ett effektivt försvar mot mykotoxiner och gör idisslare generellt mer motståndskraftiga än andra djurslag (Kiessling et al., 1984).

I övrigt är det svårt att bestämma några exakta symptom på någon mykotoxikos hos kor. Symptomen är generellt väldigt diffusa (Häggbloom 1990) och diagnostiken tycks vara genom att utesluta andra alternativ och göra ett foderbyte. Ofta finns det troligtvis flera orsaker till att korna insjuknar. Sinkor är till exempel mer känsliga för mykotoxiner eftersom den negativa energibalansen kan förvärras av mögel och mykotoxiner i fodret (Fink-Gremmels, 2008a).

Förekomsten av mögel som tillkommit under lagringen tyder också på fel i ensileringsprocessen eller att syre kunnat komma in. Detta betyder att andra syrekrävande mikroorganismer också kan förekomma i ensilaget och orsaka sjukdom. Mögelförekomsten i sig kan leda till minskat foderintag eftersom korna undviker foder med mycket mögel (Fink-Gremmels, 2008a).

Det finns inga dokumenterade effekter av mykotoxiner på mjölk. Eftersom flera mykotoxiner har antimikrobiell verkan skulle det vara tänkbart att mykotoxiner försvårar för processning av mjölken till fermenterade produkter exempelvis filmjölk (Fink-Gremmels, 2008b). Med tanke på hur liten del av det intagna mykotoxinet som tar sig ut i mjölken är risken troligtvis liten för att människor ska drabbas av mykotoxikos. Den största hälsorisken är aflatoxiner i mjölk men det är ganska osannolikt att aflatoxiner ska förekomma i foder som är odlat i Sverige tack vare vårt tempererade klimat.

Jag har inte kunnat hitta några uppgifter på om roquefortine C, patulin eller mykofenolsyra övergår i mjölken.

Mykotoxiner i foder och effekter på mjölkkor är ett komplext område som skulle behöva utredas närmare. Det händer att diagnosen mykotoxikos ställs även i Sverige vilket tyder på att toxinerna förekommer i sådana mängder att de kan orsaka sjukdom. Även om de studier som finns inte alltid visar effekter av mykotoxiner är det rimligt att vara försiktig och inte utfodra kor med möjligt foder.

LITERATURFÖRTECKNING

- Abramson, D. 1997. Toxicants of the Genus *Penicillium*. I Mello, J. P. F. (ed.) *Handbook of plant and fungal toxicants*, Boca Raton: Boca Raton : CRC Press. s. 303-317
- Angelo, A., Bellino, C., Alborali, G. L., Biancardi, A., Borelli, A., Capucchio, M. T., Catalano, D., Dellaferrera, G., Maurella, C. & Cagnasso, A. 2007. Neurological signs associated with aflatoxicosis in Piedmontese calves. *Veerinary Recor.*, vol. 160, s. 698-700.
- Berg, G., Börjesdotter, D., Börjesson, T., Gustafsson, G., Happstadius, I., Hartman, E., Ivarsson, K., Klingspor, J., Lerenius, C., Nerbrink, E., Pettersson, H., Rundqvist, J., Yngvesson, N. 2012. Nationella branchriktlinjer för att undvika fusariumtoxiner i spannmål 2013.
- Dong, M., He, X. J., Tulayakul, P., Li, J. Y., Dong, K. S., Manabe, N., Nakayama, H., Kumagai, S. 2010. The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats. *Toxicon*, vol. 55, s. 523-530.
- Dänicke, S., Matthaus, K., Lebzien, P., Valenta, H., Stemme, K., Ueberschar, K. H., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J. 2005. Effects of Fusarium toxin- contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 89, s. 303-315.
- Flachowsky, G., Fernandez, A., Ramos, J. J., Sanz, M. D. C., Saez, T. & Deluco, D. F. 1996. Alterations in the performance, haematology and clinical biochemistry of growing lambs fed with aflatoxin in the diet. *Journal of Applied Toxicology*, vol. 16, s. 85-91.
- Fink-Gremmels, J. 2008a. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, vol. 176, s. 84-92.
- Fink-Gremmels, J. 2008b. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants: Part A*, vol. 25, s. 172-180.
- Gallo, A., Moschini, M. & Masoero, F. 2008. Aflatoxins absorption in the gastro- intestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 7, s. 53-63.
- Häggbloom, P. 1990. Isolation of roquefortine C from feed grain [*Penicillium roqueforti*].
- Ingalls, J. R. 1996. Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. *Animinal Feed Science Technology*, vol. 60, s. 297-300.
- Kaleibar, M. T. & Helan, J. A. 2012. A field outbreak of aflatoxicosis with high fatality rate in feedlot calves in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, s. 1-9.
- Karlsson, M. 2010. Occurrence of mould and mycotoxins in Swedish maize silage-a pilot study. Examensarbete vid institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Uppsala universitet.
- Kiessling, K. H., Pettersson, H., Sandholm, K. & Olsen, M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 47, s. 1070-1073.
- Kostro, K., Gajecka, M., Lisiecka, U., Majer-Dziedzic, B., Obremski, K., Zielonka, Ł., Gajecki, M. 2011. Subpopulation of lymphocytes CD4 + and CD8 + in peripheral blood of sheep with zearalenone mycotoxicosis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, vol. 55, s. 241-246.
- Kuilman, M. E., Maas, R. F., Fink-Gremmels, J. & Fink-Gremmels, J. 2000. Cytochrome P450- mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B(1) in bovine hepatocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, vol. 14, s. 321.

- Lowes, N. R., Smith, R. A. & Beck, B. E. 1992. Roquefortine in the stomach contents of dogs suspected of strychnine poisoning in Alberta. *Canadian Veterinary Journal*, vol. 33, s. 535-538.
- Marczuk, J., Obremski, K., Lutnicki, K., Gajecka, M. & Gajecki, M. 2012. Zearalenone and deoxynivalenol mycotoxicosis in dairy cattle herds. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, vol. 15, s. 365-72.
- Mohr, A. I., Lorenz, I., Baum, B., Hewicker-Trautwein, M., Pfaffl, M., Dzidic, A., Meyer, H. H. D., Bauer, J. & Meyer, K. 2007. Influence of oral application of mycophenolic acid on the clinical health status of sheep. *Journal of Veterinary Medicine, Physiology, pathology, clinical medicine.*, vol. 54, s. 76-81.
- Moström, M. S. & Jacobsen, B. J. 2011. Ruminant Mycotoxicosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 27, s. 315.
- Rasmussen, R. R., Rasmussen, P. H., Larsen, T. O., Bladt, T. T. & Binderup, M. L. 2011. In vitro cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, s. 31-44.
- Sabater-Vilar, M., Maas, R. F. M., De Bosschere, H., Ducatelle, R. & Fink-Gremmels, J. 2004. Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. *Mycopathologia*, vol. 158, s. 419-426.
- Schenck, J., Müller, C and Spöndly, R., 2013. Mögelsvamp i vallfoder inplastat i balar. I Nilsson-Linde m.fl. *Vallkonferens 2014*. s. 101-104, Rapport nr 18, Institutionen för växtproduktionsekologi, SLU, Uppsala
- Smith, J. E. 1997. Aflatoxins. I Mello, J. P. F. (ed.) *Handbook of plant and fungal toxicants*, Boca Raton: Boca Raton : CRC Press. s. 269-285.
- Speijers, G. J. A., Speijers, M. H. M. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, vol. 153, s. 91-98.
- Stec, J., Rachubik, J., Szczotka, M. & Kuzmak, J. 2008. Effects of *Penicillium* mycotoxins: Citrinin, ochratoxin A, and patulin on in vitro proliferation of bovine lymphocytes. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, vol. 52, s. 163-167.
- Tapia, M. O., Giordano, A. F., Soraci, A. L., Gonzalez, C. A., Denzoin, L. A., Ortega, I. O., Olson, W. & Murphy, M. J. 2006. Toxic effects of patulin on sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 5, s. 271.
- Tapia, M. O., Stern, M. D., Koski, R. L., Bach, A. & Murphy, M. J. 2002. Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 97, s. 239-246.
- Thuvander, A., Wikman, C., Gadhasson, I. 1999. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: Individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 37, s. 639-648.
- Tüller, G., Armbruster, G., Wiedenmann, S., Hänichen, T., Schams, D. & Bauer, J. 1998. Occurrence of roquefortine in silage — toxicological relevance to sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 80, s. 246-249.
- Wagener, R. E., Davis, N. D. & Diener, U. L. 1980. Penitrem A and Roquefortine Production by *Penicillium commune*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 39, s. 882.
- Wastlake, K., Mackie, R. I. & Dutton, M. F. 1989. In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 25, s. 169-178.
- Yiannikouris, A., Jouany, J. P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Animal Research*, vol. 51, s. 81-99