

## PENETRACIÓN DE FOSFOMICINA EN EXPLANTES INTESTINALES

MARTÍNEZ G<sup>1,2</sup>, PÉREZ DS<sup>1,2</sup>, SORACI AL<sup>1,2</sup>, TAPIA MO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Toxicología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)

<sup>2</sup> CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

**RESUMEN:** Fosfomicina (FOS) es un antibiótico utilizado en producción porcina para el tratamiento y prevención de infecciones causadas por bacterias resistentes durante el post destete. En la dieta de los animales es frecuente encontrar antibióticos y concentraciones subtóxicas de micotoxinas como el deoxinivalenol (DON). Estos compuestos pueden establecer interacciones en el tracto intestinal afectando y/o modificando la penetración de FOS a los enterocitos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un cultivo de explantes de intestino procedentes de yeyuno de cerdos y aplicar este modelo para estudiar la penetración intracelular de FOS en presencia o ausencia de DON. El uso de explantes intestinales disminuye el sacrificio de animales por experimento y preservan la estructura histológica intestinal normal en condiciones *in vitro*. Los resultados mostraron que no existieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración intracelular de FOS entre los explantes incubados con 580 ppm FOS y los explantes incubados con 580 ppm FOS y 1 ppm DON. Se obtuvo un  $C_{max}$  de 12 ppm y  $t_{max}$  de 2 h. Nuestro estudio demostró que solo el 2% del antibiótico se acumula intracelularmente y que la concentración intracelular de FOS no es afectada por la presencia de concentraciones subtóxicas de DON.

**PALABRAS CLAVES:** fosfomicina, deoxinivalenol, explantes intestinales, cerdos

## PENETRATION OF FOSFOMYCIN IN INTESTINAL CULTURE EXPLANTS

**ABSTRACT:** Fosfomicin (FOS) is an antibiotic used in pig farms for treatment and prevention of infections caused by resistant bacteria during post-weaning period. Antibiotics and non-toxic concentrations of such mycotoxins as deoxynivalenol (DON) are frequently found in the diet of animals. These compounds can establish interactions in the intestinal tract which affect and/or modify the penetration of FOS to enterocytes. The aim of this study was to culture intestinal explants from jejunum of pigs and to apply this model to the study of intracellular penetration of FOS in presence or absence of DON. The use of intestinal explants reduces the number of animals sacrificed per experiment and preserves normal intestinal histological structure *in vitro*. The results showed that there was no statistically significant difference in the intracellular concentration of FOS between explants incubated with 580 ppm FOS and explants incubated with 580 ppm FOS and 1 ppm DON. The  $C_{max}$  was 12 ppm and the  $t_{max}$  was 2 h. Our study proved that only the 2% of the antibiotic is intracellularly accumulated and that the intracellular concentration of FOS is not affected by the presence of non-toxic concentrations of DON.

**KEY WORDS:** fosfomicin, deoxynivalenol, intestinal explants, pigs

Fecha de recepción: 28/10/12

Fecha de aprobación: 13/01/13

**Dirección para correspondencia:** Martínez Guadalupe. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, CP 7000, Buenos Aires, Argentina.

**E-mail:** [guadam@vet.unicen.edu.ar](mailto:guadam@vet.unicen.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

Fosfomicina (FOS) es un antibiótico bactericida de amplio espectro utilizado en producción porcina para el tratamiento y prevención de infecciones causadas por bacterias resistentes durante el post destete, período crítico del lechón. Presenta una estructura química particular, no relacionada con otras clases de agentes antimicrobianos (1). Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana al interferir con la primera etapa de producción de peptidoglicano (2, 3). Cuando es comparada con otros antibióticos, FOS tiene un mayor espectro de acción que penicilinas y cefalosporinas semi-sintéticas (1), y no se ha reportado resistencia cruzada con otros antimicrobianos (4). FOS es empleada tanto en animales como en humanos debido a que posee una baja toxicidad y potencial eficacia (5). Su uso en producción animal se debe al rápido efecto, buena tolerancia y ausencia de efectos secundarios (6, 7). Se encuentra disponible como sales por poseer una naturaleza ácida. La sal cálcica de FOS es utilizada para la vía oral, mientras que la sal disódica al ser más hidrosoluble puede ser empleada por vía endovenosa. FOS – trometamol es altamente hidrosoluble y ofrece una buena biodisponibilidad al ser utilizado por vía oral (3, 8, 9, 10). Se ha demostrado que además de presentar un efecto bactericida, FOS ofrece otras propiedades tales como impedir la adhesión bacteriana a células epiteliales, penetrar bien en las biopelículas de los exopolisacáridos y promover la fagocitosis. Además ejerce protección frente a la nefrotoxicidad causada por algunos fármacos como polimixinas, anfotericina B, aminoglucósidos, ciclosporina, vancomicina, teicoplanina y cisplatino (11).

Como previamente se ha indicado, el destete es considerado un período crítico para el lechón debido a que los animales se exponen a múltiples factores estresantes tales como nutricionales, fisiológicos, microbiológicos, ambientales e inmunológicos (12, 13). En esta etapa se desarrolla una reducción transitoria de la ingesta de alimentos y esto se produce en parte por el pasaje de una dieta líquida a base de leche a una dieta sólida, existiendo así cambios en la composición nutricional en lo que se refiere a las propiedades físicas y químicas de la dieta (14). Sumado a este importante cambio, la presencia de componentes antinutricionales en la dieta, como son las micotoxinas, afecta de manera negativa la performance productiva. En cuanto a las micotoxinas, el deoxinivalenol (DON) es un tricoteceno producido por *Fusarium* sp., hongos patógenos de diversas plantas y con mayor frecuencia afectan los cultivos de maíz, trigo, avena y cebada. El mecanismo de acción de DON es inhibir la síntesis proteica en las células y ejer-

cer una actividad citotóxica en tejidos de rápido crecimiento. Contaminaciones en la dieta con altas concentraciones de DON (10 ppm) producen evidentes signos clínicos en los cerdos tales como disminución en la ingesta de alimentos, rechazo al alimento, vómitos, inmunosupresión y hemorragias (15, 16). Por el contrario, concentraciones tan bajas de DON como 1 ppm generan reducción de la ingesta de alimentos y de la ganancia de peso (17). Es frecuente encontrar en el alimento la presencia conjunta de aditivos que favorecen el rendimiento porcino tales como antibióticos y concentraciones subtóxicas de compuestos antinutricionales como son las micotoxinas. Tras ser ingeridos, el intestino puede quedar expuesto a la interacción de ambos compuestos. A su vez, el resultado de esta interacción podría afectar negativamente la efectividad de los antibióticos al interferir con la penetración del antibiótico a los enterocitos o influir en su absorción intestinal. Bajo este contexto y para reducir el número de animales a utilizar por experimento, los explantes intestinales representan un potente modelo debido a que preservan la estructura histológica intestinal normal en condiciones *in vitro*. Se pueden preparar una gran cantidad de explantes a partir de un solo animal, reduciendo así el número de animales necesarios para llevar a cabo el estudio (18, 19). El objetivo de este trabajo fue desarrollar el cultivo de explantes intestinales procedentes de yeyuno de cerdos y aplicar este modelo para estudiar la penetración intracelular de FOS en presencia o ausencia de DON.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CULTIVO DE EXPLANTES INTESTINALES

Cuatro lechones de destete de 25-28 días de edad ( $10 \pm 1.5$  kg PV) y clínicamente sanos fueron utilizados en nuestro ensayo. Por cada animal utilizado, se obtuvieron tres grupos de explantes. Uno de ellos fue incubado con FOS, el segundo grupo fue incubado con FOS y DON y el tercer grupo control incubado con solución fisiológica. El estudio se desarrolló de acuerdo a las normas de aprobación ética otorgadas por el comité de bienestar animal de la facultad de Ciencias Veterinarias, UNICEN, Tandil, Argentina. Después de que los animales fueran sacrificados, el intestino delgado fue extraído en forma inmediata y el contenido intestinal fue removido con solución fisiológica. Las muestras fueron transportadas en forma refrigerada ( $2-4^{\circ}\text{C}$ ) al laboratorio de Toxicología de la UNCPBA. El modelo utilizado para producir cultivos de explantes intestinales fue una adaptación del método de Nietfeld y cols. en 1991 (18), como lo describe Zhu y cols. en 1995 (20) con algunas modificaciones. Las muestras de yeyuno fueron cortadas en fragmentos de 3 cm de longitud y abiertas a lo largo del borde

mesentérico. El tejido se colocó en placas de petri de 60 mm y fue lavado dos veces con solución fisiológica por agitación durante un período de 10 min cada uno, con el fin de eliminar el mucus y el contenido intestinal remanente. La mucosa fue cortada en piezas circulares de 1.3 cm<sup>2</sup> (0.1 g), las cuales fueron denominadas explantes y fijadas con las vellosidades hacia arriba sobre esponjas. En cada pocillo de una placa de cultivo de seis pocillos se introdujo una esponja con su respectivo explante. En el centro del pocillo de la placa de cultivo se adicionó 1 ml de DMEM con GlutaMAX™-I (Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose, Gibco®) y 1 ml de F-12 Nutrient Mixture (Gibco®). Por acción capilar, el medio cubrió las vellosidades y mantuvo viable el tejido. A cada explante se le adicionó 20 µl de FOS o la combinación FOS y DON. Las placas fueron mantenidas en agitador (seis ciclos/min) a una temperatura constante de 37 °C durante un período de 6 h. Todas estas operaciones se llevaron a cabo en menos de una hora luego de que los animales fueran sacrificados.

## 2. TRATAMIENTO DE LOS EXPLANTES INTESTINALES

Los explantes procedentes de lechones de destete fueron expuestos a 580 ppm (µg/ml) de FOS cálcica (98,9 % de pureza; Laboratorio Bedson, Pilar, Buenos Aires, Argentina). Esta concentración fue estimada tras considerar que *in vivo* la FOS cálcica se administra a razón de 30 mg/kg PV en lechones post destete, el 80 % de la droga permanece en el intestino (10) y el volumen intestinal de un lechón de 15 kg es de 622 ml (21). Por otro lado, otro grupo de explantes fue expuesto a 1 ppm (µg/ml) de DON (Sigma-Aldrich®) con 580 ppm de FOS cálcica. La concentración de la micotoxina fue determinada a partir de una concentración subtóxica de DON (menos de 3 ppm DON en la dieta) (15), asumiendo que un lechón de 15 kg consume 800 g de alimento/día y tiene un volumen intestinal de 622 ml.

Las concentraciones de antibiótico y micotoxina fueron diluidas en solución fisiológica e incorporadas sobre los explantes. El grupo control fue incubado con 20 µl de solución fisiológica. Los explantes intestinales fueron mantenidos a 37 °C en agitación a tiempos preestablecidos (30 min y 1, 2, 3, 4 y 6 h).

## 3. HISTOPATOLOGÍA

La histopatología se realizó con el fin de verificar la integridad de la mucosa intestinal. Los explantes incubados con FOS, con FOS y DON, y el grupo control fueron examinados al microscopio óptico. Para ello, los explantes de cada grupo incubados durante 6 h fueron fijados en medio Bouin. Después de ser embebidos en parafina, los explantes fueron seccionados en cortes de 4

µm paralelos al eje de las vellosidades. Posteriormente los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y observadas al microscopio óptico con objetivo de 100 X.

## 4. EXTRACCIÓN DE FOSFOMICINA

Culminada la incubación, los explantes fueron lavados con solución fisiológica para remover el antibiótico extracelular (el antibiótico que no ingresó a los enterocitos). Los explantes lavados fueron colocados en tubos de polipropileno junto con 1 ml de metanol HPLC para precipitar las proteínas. Estos tubos fueron sonicados durante 30 min con el objetivo de producir la lisis celular y liberar el antibiótico intracelular. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 6 min a 4 °C y 10.000 rpm. El sobrenadante de cada muestra fue evaporado a seco a 60 °C. El extracto seco fue disuelto en 200 µl de agua HPLC y se incorporó 1 ml de hexano-etanol 1:0.2 (reactivo Folch) para la eliminación de los lípidos presentes. Las muestras fueron colocadas en agitador rotativo durante 20 min y centrifugadas nuevamente para el posterior descarte de la fase de hexano. De cada muestra se tomaron 40 µl y se llevaron a 800 µl con agua HPLC. Posteriormente, las muestras fueron filtradas con filtros de jeringa (13 mm x 0,22 µm nylon, 100 pK Restek, Restek U.S., 110 Benner Circle, Bellefonte, PA 16,823), incorporadas en viales y analizados por cromatografía líquida de alta performance masa-masa (HPLC MS/MS) según el método determinado por Soraci y cols. en 2011 (10).

Por otro lado, el volumen de agua intracelular fue determinado por un método gravimétrico (22). Para ello, los explantes fueron pesados, incorporados en crisoles y secados en estufa a 100°C hasta peso constante. El agua intracelular fue determinada por diferencia entre el peso inicial y el peso final. El volumen intracelular de los explantes fue de 200 µl y este valor fue considerado en la determinación de concentración de FOS intracelular.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio se llevó a cabo con cuatro repeticiones y cada una de ellas por duplicado. Las diferencias entre explantes incubados con FOS y explantes incubados con FOS y DON fueron evaluadas por los promedios y los desvíos estándares de las medias. Los resultados fueron analizados por una prueba t de Student y los valores p fueron calculados para determinar si existieron o no diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

## RESULTADOS

La histopatología de los explantes incubados con FOS y con FOS y DON durante 6 h no

mostró cambios morfológicos comparados con el grupo control (foto I). Los explantes permanecieron viables durante todo el tiempo de incubación. No se observó degeneración, necrosis, fusión de las vellosidades ni cambios morfológicos en las criptas de Lieberkühn.

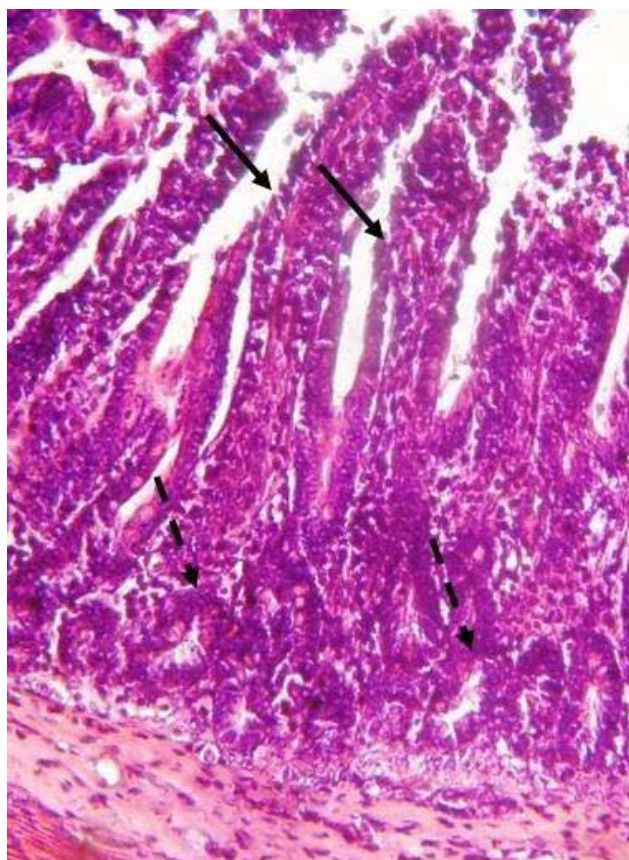


Foto I. Morfología de explantes intestinales.  
 → Vellosidad intestinal, ----> cripta de Lieberkühn.

La tabla I indica la concentración intracelular de FOS en los dos grupos de explantes durante los distintos tiempos de incubación. La concentración de antibiótico intracelular en los explantes incubados con 580 ppm FOS se mantuvo en un rango entre 5,84 y 12,99 µg/ml en los diferentes tiempos de incubación. La

concentración máxima ( $C_{max}$ ) fue de 12,99 µg/ml a un tiempo ( $t_{max}$ ) de 2 h. Se puede observar que solo el 2 % del antibiótico incubado en los explantes intestinales logró ingresar en los enterocitos y la mayor concentración del antibiótico permaneció en el espacio extracelular. Por otro lado, los explantes incubados con 580 ppm FOS y 1 ppm DON mostraron una concentración intracelular de FOS que osciló entre 9,14 y 12,72 µg/ml. Este grupo presentó un comportamiento similar a lo observado en los explantes yeyunales incubados sin micotoxina en lo que respecta al  $C_{max}$  y  $t_{max}$  de FOS. Así, el  $C_{max}$  de FOS intracelular fue de 12,72 ppm con un  $t_{max}$  de 2 h. No existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el ingreso de FOS a los enterocitos entre ambos grupos (gráfico I). Es importante destacar la variabilidad individual observada en los animales con pesos similares y clínicamente saludables que fueron la fuente de la producción de los explantes.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo demostró que los explantes de yeyuno procedentes de cerdos son un modelo útil para estudiar la concentración de antibiótico intracelular en condiciones *in vitro*. A su vez, la utilización de los explantes reduce el número de animales a utilizar por tiempo de muestreo y esto es de gran importancia cuando se trabaja con tóxicos como son las micotoxinas. La morfología observada en los explantes hasta las 6 h sugiere que la arquitectura tisular se encuentra bien preservada. Trabajos previos (23, 24) demostraron que los explantes se mantienen en cultivo por periodos de hasta 8 h sin presentar modificaciones histológicas. Luego de 12 y 24 h de cultivo del órgano comienzan a surgir cambios histológicos tales como degeneración, particularmente en las células epiteliales de las criptas y en algunos enterocitos, donde se observa que la posición del núcleo se modifica desde su posición

Tabla I. Concentración intracelular de fosfomicina en explantes incubados con 580 ppm FOS y explantes incubados con 580 ppm FOS y 1 ppm DON. Estas concentraciones fueron determinadas como se describe en la sección de materiales y métodos. Cada valor es el promedio de cuatro ensayos por duplicado. Los valores SD se presentan entre paréntesis.

Tiempo (h)	Concentración intracelular de fosfomicina (µg/ml)	
	Explantes incubados con antibiótico	Explantes incubados con antibiótico y micotoxina
0,5	9,31 (±1,33)	9,14 (±2,17)
1	5,84 (±1,72)	9,30 (±4,69)
2	12,99 (±4,61)	12,72 (±4,74)
3	11,96 (±4,05)	12,62 (±4,98)
4	10,85 (±6,70)	12,14 (±6,14)
6	11,06 (±5,26)	12,51 (±4,56)

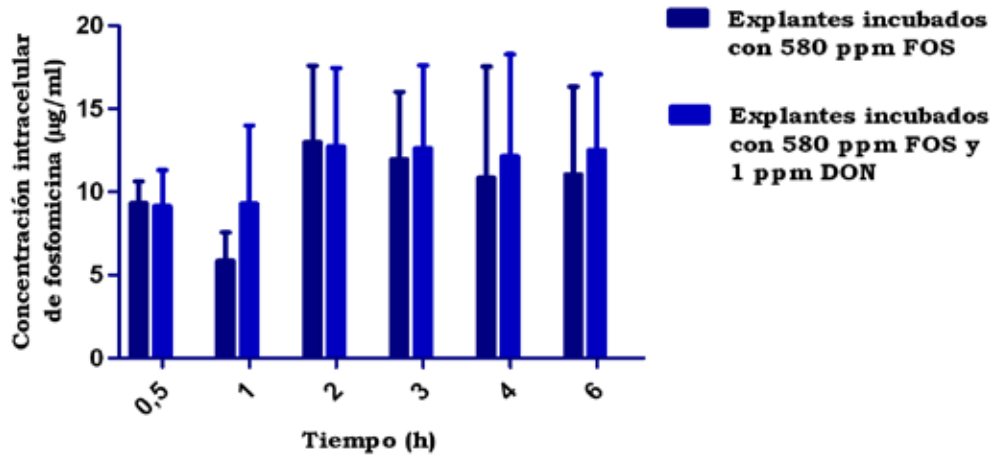


Gráfico I, Concentración intracelular de fosfomicina en explantes incubados con 580 ppm FOS y explantes incubados con 580 ppm FOS y 1 ppm DON.

normal y basal a una localización apical de la célula. En adición, Kolf-Clauw y cols. en 2009 (19) observaron que los explantes procedentes de yeyuno de animales jóvenes (lechones de destete) preservaron su estructura normal dentro de las 8 h de cultivo.

Nuestro estudio indicó que una baja concentración de antibiótico ingresa a los enterocitos. Ello podría ser atribuido a la naturaleza hidrosoluble de FOS (4) que interfiere con el pasaje de difusión pasiva de la molécula a través de la membrana celular. Existen trabajos que determinan la acumulación de FOS en la bacteria por un sistema de transporte activo L- $\alpha$ -glicerol-3-fosfato. Bajo ciertas condiciones, el sistema D-glucosa-6-fosfato, que puede ser inducido externamente, representa en consecuencia un segundo mecanismo de transporte que utiliza FOS (2, 3, 4, 25). En el presente estudio se demostró la presencia de FOS en el interior de los enterocitos y ello podría deberse a la co-participación de mecanismo de difusión y algún mecanismo de transporte activo similar al descrito para las bacterias. Debido a que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, la concentración subtóxica de DON no interfirió con la entrada de FOS a los enterocitos y ello se debe a que DON no afectó el mecanismo de transporte activo utilizado por el antibiótico. Cabe remarcar, la importancia de la acumulación del antibiótico en células intestinales porque puede ejercer actividad bactericida contra microorganismos intracelulares como *Lawsonia intracellularis*.

Por otro lado, la concentración de 1 ppm (1  $\mu$ g/ml) DON no generó toxicidad sobre la mucosa intestinal. Esto coincide con lo observado por Kolf-Clauw y cols. en 2009 (19), donde concentraciones de 10  $\mu$ mol/L DON producen necrosis dentro de las 4 h de incubación. En cambio, bajas concentraciones de DON como 5  $\mu$ mol/L (1.5

$\mu$ g/ml) generan lesiones histológicas después de las 4 h de incubación. Este punto es importante porque al trabajar con bajas concentraciones de DON se puede mantener la integridad de la barrera epitelial intestinal y no interferir con la absorción de los antibióticos.

Es conocido que DON afecta la síntesis de proteínas y función epitelial (25, 26). Es por ello que DON interfiere con proteínas de transporte como la proteína transportadora glucosa/galactosa dependiente de sodio SGLT1, transportadores facilitadores de azúcares GLUT y transportadores de aminoácidos (27). Maresca y cols. en 2002 (28) reportaron que bajas concentraciones (<10  $\mu$ mol/L) de DON en células epiteliales del intestino humano modulan selectivamente las actividades de transportadores intestinales específicos, incluyendo SGLT-1. Estos transportadores podrían ser utilizados por FOS como un mecanismo de transporte activo a los enterocitos y afectarse cuando se trabaja con concentraciones potencialmente tóxicas de DON.

## BIBLIOGRAFÍA

- Mata J, Rodríguez A, Gallego A. Fosfomicina: in vitro activity. *Chemotherapy* 1977; 23 (suppl 1): 23-24.
- Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomicina (phosphonomycin). *Ann NY Acad Sc* 1974; 235: 364-386.
- Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomicina: an old, new friend? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29 (2): 127-142.
- Gobernado M. Fosfomicina. *Rev Esp Quimioter* 2003; 16 (1): 15-40.
- Gallego A, Rodríguez A, Mata JM. Fosfomicina: farmacológica studies. *Drugs Today* 1974; 10: 161-168.
- Aramayona JJ, Bregante MA, Solans C, Rueda S, Fraile LJ, García MA. Pharmacokinetics of fosfomicina in chickens after a single intravenous dose and tissue

## G. Martínez y col.

- levels following chronic oral administration. *Vet Res* 1997; 28 (6): 581-588.
7. Carraminana JJ, Rota C, Agustin I, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonellae* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Microbiol* 2004; 104: 133-139.
8. Borsa F, Leroy A, Fillastre JP, Godin M, Moulin B. Comparative pharmacokinetics of tromethamine fosfomycin and calcium fosfomycin in young and elderly adults. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 938-941.
9. Patel SS, Balfour JA, Bryson HM. Fosfomycin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs*, 1997; 53: 637-656.
10. Soraci AL, Perez DS, Martinez G, Dieguez S, Tapia MO, Amanto F, Harkes R, Romano O. Disodium-fosfomycin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Res Vet Sci* 2011; 90: 498-502.
11. Pakhomova S, Bartlett S, Augustus A, Kuzuyama T, Newcomer M. Crystal structure of fosfomycin resistance kinase FomA from *Streptomyces wedmorensis*. *J Biol Chem*. 2008; 283(42): 28518-26.
12. Dirkzwager A, Veldman B, Bikker P. A nutritional approach for the prevention of post weaning syndrome in piglets. *Anim Res* 2005; 54: 231-236.
13. Soraci AL, Amanto F, Hartes R, Pérez D, Martínez G, Diéguez SN, Tapia MO. Uso estratégico de aditivos: impacto sobre el equilibrio y salud gastrointestinal del lechón. *Analecta Vet* 2010; 30 (1): 42-53.
14. Nabuurs MJA. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. *Vet quart* 1998; 20 (3): 42-45.
15. Lawlor P, Brendan Lynch P. Mycotoxins in pig feeds 2: clinical aspects. *Ir Vet J* 2001; 54 (4): 172-176.
16. Pestka JJ. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim Feed Sci Technol* 2007; 137: 283-298.
17. Rotter BA, Thompson BK, Lessard M, Trenholm HL, Tryphonas H. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fund Appl Toxicol* 1994; 23: 117-124.
18. Nietfeld JC, Tyler DE, Lenn RH, Cole JR, Latimer KS, Wayne AC. Culture and morphologic features of small intestinal mucosal explants from weaned pigs. *A J Vet Res* 1991; 52 (7): 1142-1146.
19. Kolf-Clauw M, Castellote J, Joly B, Bourges-Abella N, Raymond-Letron I, Pinton P, Oswald I. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. *Toxicol in Vitro* 2009; 23: 1580-1584.
20. Zhu Ch, Harel J, Jacques M, Fairbrother JM. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* 045 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* 1995; 59: 118-123.
21. Ruckebusch Y. *Physiologie Pharmacologie Therapeutique animals*. 2nd. Ed. Maloine S.A., 1981.
22. Isengard HD. Rapid water determination in food-stuffs. *Trends in Food Science & Technology* 1995; 6 (5): 155-162.
23. Danielsen EM, Sjöström H, Norén O, Bro B, Dabelsteent E. Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. *Biochem J* 1982; 202: 647-654.
24. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Relative deficiency in IgA production by duodenal explants from German shepherd dogs with small intestinal disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 76: 25-43.
25. Höger PH, Seger RA, Schaad UB, Hitzig WH. Chronic granulomatous disease: uptake and intracellular activity of fosfomycin in granulocytes. *Pediatr Res* 1985; 19 (1): 38-44.
26. Goyarts T, Dänicke S. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol Lett* 2006; 163 (3): 171-182.
27. Awad WA, Aschenbach JR, Setyabudi FMCS, Razzazi-Fazeli E, Böhm J, Zentek J. In vitro effects of Deoxynivalenol on small intestinal D -glucose uptake and absorption of Deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens. *Poult Sci* 2007; 86: 15-20.
28. Maresca M, Mahfoud R, Garmy N, Fantini J. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J Nutr* 2002; 132: 2723-2731.