

猪源乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 在猪肠道上皮细胞 IPEC-J2 上粘附的影响

倪学勤^{1*} Joshua Gong^{2*} 曾东¹ Hai Yu² Weido Si² 周小秋³

(1. 四川农业大学动物医学院 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 雅安 625014)

(2. Food Research Program, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada)

(3. 四川农业大学动物营养研究所 雅安 625014)

摘要: 采用猪肠道上皮细胞株 IPEC-J2 体外培养模型, 考察 9 株猪源乳酸杆菌对 IPEC-J2 细胞的粘附特性, 以及对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的竞争、排斥、置换和抗侵袭作用。结果显示, 9 株乳酸杆菌均能粘附 IPEC-J2 细胞, 粘附率在 0.1%~10% 之间, 具有菌株特异性和浓度效应。乳酸杆菌和沙门氏菌同时加入细胞培养, 能竞争性抑制沙门氏菌的粘附, 并具有浓度效应, 高浓度 (10^9 CFU/mL) 添加 K30、K67 和 K16 时, 抑制率可达 80% 以上。乳酸杆菌预处理细胞后再加入沙门氏菌, 高浓度乳酸杆菌可降低沙门氏菌粘附率 40%~70%, 而中浓度 (10^8 CFU/mL) 乳酸杆菌能抑制 23%~33% 沙门氏菌对细胞的侵入。但是, 只有高浓度添加乳酸杆菌能置换已经粘附的沙门氏菌, 置换率在 12%~84% 之间。该结果为临床上筛选乳酸杆菌, 有效防治猪沙门氏菌病提供了一条新的途径。

关键词: 粘附, 乳酸杆菌, 鼠伤寒沙门氏菌, IPEC-J2 细胞

Ability of Pig *Lactobacilli* Strains to Inhibit *Salmonella typhimurium* DT104 Adhesion and Invasion on Pig Intestinal Epithelial IPEC-J2 Cells

NI Xue-Qin^{1*} GONG Joshua^{2*} ZENG Dong¹ YU Hai² SI Weido² ZHOU Xiao-Qiu³

(1. College of Animal Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

(2. Food Research Program, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada)

(3. Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract: The adhesion of 9 pig *Lactobacillus* strains on IPEC-J2 cell line and the effect of 5 *Lactobacillus* strains on the competitive, exclusive, displacement of adhesion and invasion of *Salmonella typhimurium* DT104 to IPEC-J2 cells were investigated. The 9 pig *Lactobacillus* strains exhibited dose- and strain-dependent adherence to intestinal epithelial cells by 0.1%~10%. The ability to inhibit the competitive adhesion of *Salmonella typhimurium* DT104 appeared to depend on the dose and *Lactobacilli* tested. *Sal-*

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(No. IRT0555)

* 通讯作者: 倪学勤: Tel: 86-835-2886037; Fax: 86-835-2885675; 邮箱: xueqinni@yahoo.com

Joshua Gong: Tel: 1-519-780-8027; Fax: 1-519-829-2600; 邮箱: gongj@agri.ca

收稿日期: 2007-12-20; 接受日期: 2008-03-13

http://journals.im.ac.cn

monella typhimurium adhesion was reduced above 80% by 10^9 CFU/mL K30, K67 and K16 strains. Adhesion percent of *S. typhimurium* DT104 was reduced 40%~70% by pre-treating the cells with 10^9 CFU/mL *Lactobacillus* prior to adhesion to IPEC-J2 monolayers, while invasion percent was reduced 23%~33% by 10^8 CFU/mL *Lactobacillus*. However, no inhibition of displacement was detected at low concentration of *Lactobacillus*, while 12%~84% displacement was detected with high concentration. Therefore, the observed inhibition of *S. typhimurium* adhesion and invasion to IPEC-J2 monolayers with *Lactobacillus* could be efficient for preventive or curative probiotic therapy in pigs with *S. typhimurium* disease.

Keywords: Adhesion, *Lactobacillus* spp., *Salmonella typhimurium*, IPEC-J2 cells

乳酸杆菌是人和动物肠道内的重要生理性细菌, 它粘附于肠道粘膜上皮细胞后, 定殖形成稳定的菌群, 具有拮抗病原菌、营养和免疫等作用, 对维持肠道菌群的结构及功能起主要作用^[1]。目前对其生物屏障功能的认识较为深入, 据此研制的益生菌制剂(Probiotics)在肠道感染性疾病的生态防治上取得了很好的效果, 并已应用于临床治疗。现在认为, 粘附是细菌与宿主之间存在的一种普遍现象, 它是细菌定殖于宿主细胞并发挥生理作用的首要条件^[2]。有关乳酸杆菌粘附的特点和机制正成为益生菌研究的热点, 很多研究报道了乳酸杆菌、双歧杆菌对人体细胞的粘附作用^[3-6], 以及应用乳酸杆菌改善肠道生物屏障, 减少细菌性感染的发生^[7,8]。但国内外均未见采用猪肠道上皮细胞研究猪源乳酸杆菌粘附作用的报道。鼠伤寒沙门氏菌是引起猪发病和食物源性污染的重要微生物^[9], 每年的感染数量大约占全世界沙门氏菌感染量的 17%^[10], 其耐药性的增加, 给该病的防治带来更大的难度^[11], 日益受到养殖业和食品业的重视。为了系统地探讨乳酸杆菌粘附后的生物保护作用, 本研究采用猪肠道上皮细胞 IPEC-J2 为实验模型, 探讨乳酸杆菌粘附特点, 以及是否具有抑制鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附和侵袭的作用, 为乳酸杆菌对肠粘膜屏障的生物保护作用提供实验依据, 并为养猪生产中有效控制沙门氏菌病提供新的思路。

1 材料方法

1.1 菌株及细胞

猪源乳酸杆菌 9 株, 分离自健康仔猪粪样, 体外培养时对致病性大肠杆菌和沙门氏菌有抑制作用, 16S rRNA 测序鉴定为乳酸杆菌属(另文报道)。鼠伤寒沙门氏菌 DT104 加拿大农业部食品研究所保存。

IPEC-J2 是出生后 24 h 内仔猪的空肠上皮细胞, 堪萨斯州立大学 Bruce 博士赠送, 试验中使用 44~60 代细胞。

1.2 细胞培养

在 75 cm² 细胞培养瓶(Corning Inc., Corning, NY, USA)中, 采用含 10% 小牛血清(Gibco-BRL)和 1% 抗生素的 DMEM:F12(Gibco)培养液培养 IPEC-J2, 隔 1 天换 1 次培养液, 80% 融合时用 0.1% 胰酶-EDTA(Gibco)消化传代到 12 孔细胞培养板(Corning Inc., Corning, NY, USA), 每孔加 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 个细胞, 培养液中除不含抗生素外, 其它成分同传代细胞培养液, 37℃、5% CO₂、95% 湿度的二氧化碳培养箱中培养 24 h 备用。

1.3 细菌培养

乳酸杆菌活化 2 代后接种 MRS 培养液(Difco), 厌氧培养 18 h, 用 PBS(pH 7.4) 缓冲液(Gibco)洗一次, 然后用不含抗生素的 DMEM:F12 培养液 10 倍系列稀释成 10^9 CFU/mL、 10^8 CFU/mL 和 10^7 CFU/mL 的菌液待用。活化的鼠伤寒沙门氏菌接种于含 40 mmol/L NaHCO₃ (Sigma)的 BHI 培养液(Difco), 37℃ 培养 16 h~18 h 备用。

1.4 不同浓度乳酸杆菌的粘附作用

培养 24 h 的细胞用 PBS(pH 7.4)缓冲液洗 1 次, 每孔加入稀释的乳酸杆菌培养液 0.5 mL, 37℃ 培养 1 h, 用 PBS 缓冲液洗 5 次, 去除未粘附的细菌, 然后每孔加入 0.5 mL 含 0.05% Triton X-100(Sigma)的 PBS(pH 7.4)缓冲液, 室温下作用 5 min, 用吸管反复吹打, 分散细菌。10 倍系列稀释后用 MRS 平板计数乳酸杆菌活菌数。同时将另一部分细胞用 70% 甲醇固定 10 min, 然后用 4% 姬姆萨氏染液染色, 倒置显微镜下观察细胞形态和细菌粘附状态。每个菌株做 3 个重复, 并在 3 个不同代的细胞中重复 3 次试验。以下试验均同样做 3 次重复。

1.5 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的竞争作用

每孔细胞中同时加入 0.5 mL 含不同浓度乳酸杆菌的细胞培养液和 10^7 CFU 鼠伤寒沙门氏菌, 同时设只加鼠伤寒沙门氏菌的对照组, 37 °C 培养 1 h 后, 采用 1.4 方法, 用 TSB(Difco) 平板计数鼠伤寒沙门氏菌活菌数。乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌粘附的抑制率: (对照组鼠伤寒沙门氏菌数-乳酸杆菌组鼠伤寒沙门氏菌数)/对照组鼠伤寒沙门氏菌数 $\times 100$ 。

1.6 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的排斥作用

每孔细胞中加入 0.5 mL 含不同浓度乳酸杆菌的细胞培养液, 同时设不加乳酸杆菌对照组, 37 °C 培养 1 h, 用 PBS 缓冲液洗 3 次, 去除没有粘附的乳酸杆菌, 然后每孔加入含 10^7 CFU 鼠伤寒沙门氏菌的细胞培养液, 再培养 1 h, 采用 1.5 方法, 计数鼠伤寒沙门氏菌活菌数。计算乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌粘附的排斥率。

1.7 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的置换作用

每孔细胞中加入 0.5 mL 细胞培养液和 10^7 CFU 鼠伤寒沙门氏菌, 37 °C 培养 1 h, 用 PBS 缓冲液洗 3 次, 去掉没有吸附的鼠伤寒沙门氏菌, 然后每孔加入 0.5 mL 含不同浓度乳酸杆菌的细胞培养液, 同时设不加乳酸杆菌对照组, 再培养 1 h, 采用 1.5 方法, 计数鼠伤寒沙门氏菌活菌数。计算乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌粘附的置换率。

1.8 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 侵入作用的影响

采用 1.6 方法先后加入 0.5 mL 含 10^8 CFU 乳酸杆菌或 10^7 CFU 沙门氏菌的细胞培养液, 培养结束, 去除表面未粘附的细菌, 每孔细胞中加入 0.5 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素(Sigma)的细胞培养液, 再培养 1 h, 杀灭细胞表面粘附的细菌。洗涤去除抗生素后采用 1.5 方法, 计数细胞内鼠伤寒沙门氏菌活菌数。计算乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌侵入作用的抑制率。

1.9 数据处理

所得数据用 Excel 和 SPSS10.0 进行计算和分析。两组间比较采用 t 检验, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 乳酸杆菌的粘附作用

所有 9 株乳酸杆菌对 IPEC-J2 细胞的粘附特性

都不完全相同, 显微镜下观察发现 S66、S20 和 S8 菌株对 IPEC-J2 细胞有一定的破坏作用, 其余菌株对细胞的完整性没有任何影响。但是, 各菌株的粘附菌数均依赖于加入的乳酸杆菌浓度, 随着添加浓度的提高, 粘附细菌数量增加(图 1), 粘附率在 0.1%~10% 之间。其中 S65 的粘附效果最好, 即使只加入 10^7 CFU/孔, 粘附细菌数量也可达到 10^6 CFU 以上。

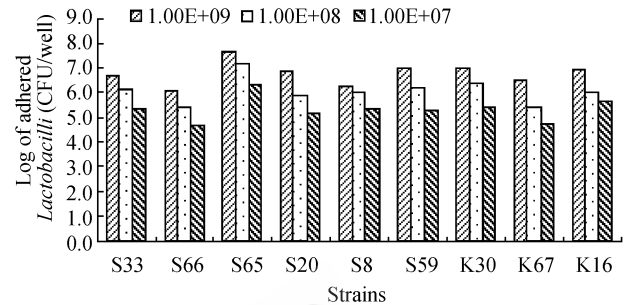


图 1 乳酸杆菌对 IPEC-J2 细胞的粘附

Fig. 1 Adhesion of 9 *Lactobacillus* strains to IPEC-J2 cell cultures

2.2 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的竞争作用

9 株乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌的竞争粘附作用都具有浓度效应, 高浓度 10^9 CFU/孔添加量的竞争效果最好, 尤其是 K30、K67、K16 三个菌株, 对鼠伤寒沙门氏菌粘附作用的抑制率在 80% 以上(图 2)。S33、S65 菌株在中、低浓度添加时也具有较好的竞争效果, 抑制率在 30% 以上。所以后续试验选择这 5 株菌进行。

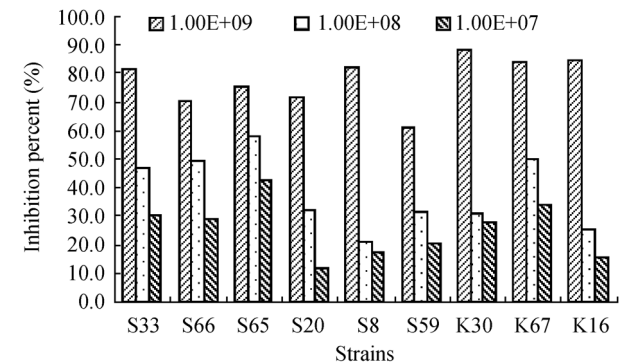


图 2 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的竞争作用

Fig. 2 Competitive inhibition percent of *Salmonella typhimurium* DT104 adhesion to IPEC-J2 cells by the *Lactobacillus* strains at different concentrations

2.3 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的排斥作用

除 K16 外, 其余 4 株乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌细胞粘附的排斥效应均有浓度依赖性(图 3)。高浓度 S33 菌株的排除率达到 70%, 其余 4 株菌排除率在 40% 左右。随着浓度降低, 乳酸杆菌 S33、K30 和 K67 的排斥作用显著下降。不同浓度的乳酸杆菌 S65 和 K16 的排斥作用差异不显著。

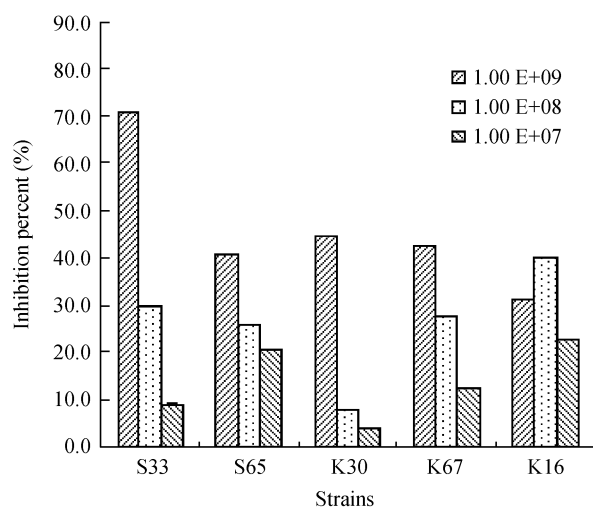


图 3 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的排斥作用

Fig. 3 Exclusive inhibition percent of *Salmonella typhimurium* DT104 adhesion to IPEC-J2 cells by the *Lactobacillus* strains at different concentrations

2.4 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的置换作用

5 株乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌的置换作用具有浓度效应(图 4)。高浓度 S33 和 K30 对沙门氏菌的粘附具有较好的置换作用, 置换率分别为 84% 和 45%, 但是, 低浓度添加时, 对沙门氏菌不仅没有置换作用, 反而增加了沙门氏菌的粘附率。高、中、低 3 个浓度的 K67 和 K16 均对沙门氏菌有一定的置换作用, 置换率在 7%~65% 之间, 而不同浓度的 S65 菌株对沙门氏菌的置换率均低于 15%, 标准差很大。

2.5 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 侵入作用的影响

按乳酸杆菌与沙门氏菌 10:1 比例将乳酸杆菌与沙门氏菌先后添加到 IPEC-J2 细胞上孵育, 受试乳酸杆菌对沙门氏菌侵入细胞的能力均有一定的抑制作用, 抑制率在 23%~33% 之间(图 5)。而单独加入沙门氏菌 10^7 CFU/孔, 侵入细胞内的细菌数量是粘附于细胞上的细菌数量的 10%。

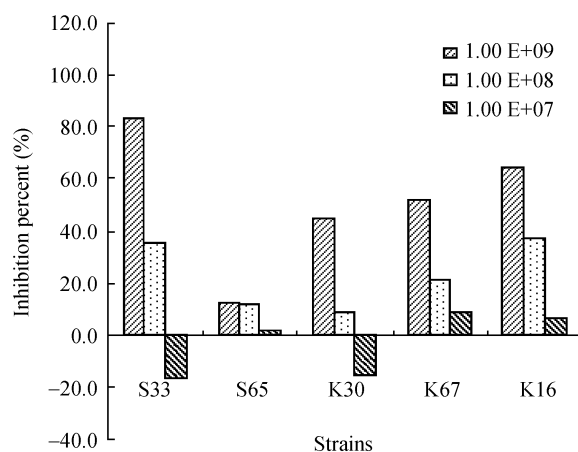


图 4 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 粘附的置换作用

Fig. 4 Displacement of *Salmonella typhimurium* DT104 adhesion to IPEC-J2 cells by the *Lactobacillus* strains at different concentrations.

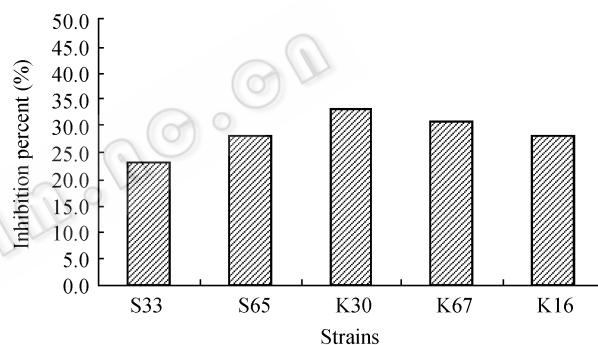


图 5 乳酸杆菌对鼠伤寒沙门氏菌 DT104 侵入作用的影响

Fig. 5 Inhibition of *Salmonella typhimurium* DT104 invasion to IPEC-J2 cells by 5 *Lactobacillus* strains at a multiplicity of infection (MOI) of 10

3 讨论

因为直接研究细菌在体内的粘附过程比较困难, 所以, 肠道细胞的体外培养模型通常用于评价细菌的粘附特性。很多研究报道了乳酸杆菌对人体细胞的粘附作用, 如 Caco-2、Lovo、T84、HCT-8、Intestine-407 等细胞^[3-6]。但是, 因为种属的不同, 采用人体细胞系研究猪源有益微生物和病原菌粘附作用, 与其在猪体内的状态可能存在一定差异。2006 年 Schierack 等采用猪肠道上皮细胞 IPEC-J2 作为实验模型, 系统地研究了病原菌的感染过程, 证明 IPEC-J2 细胞能够很好地反映猪消化道的感染和反应过程, 是目前模拟猪体内试验的最佳体外模型^[12]。本研究率先采用该细胞考察猪源乳酸杆菌对肠上皮

细胞的粘附作用,可以更加准确地反映乳酸杆菌在猪体内的粘附过程。

乳酸杆菌对肠上皮细胞的粘附作用具有种属和菌株特异性。在本试验中发现,9株猪源乳酸杆菌均能粘附于肠上皮细胞 IPEC-J2 表面,但各菌株的粘附力存在差异,这与 Gueimonde 等的研究结果相似^[13]。该结果表明,在选择乳酸杆菌菌株时,有必要建立适当的方法,筛选具有高粘附力的菌株。现在已知,正常菌群定植在上皮细胞表面,主要是通过细胞膜上纤维状多糖体或脂蛋白的作用实现的。本研究中9株乳酸杆菌的粘附机制尚需要进一步研究。

同时,粘附也是感染性细菌致病的第一步,对病原菌粘附的抑制可干扰细菌对细胞的侵袭。乳酸杆菌与鼠伤寒沙门氏菌同时加入细胞孵育时,9株乳酸杆菌对病原细菌的粘附均具有很好的竞争抑制作用,高浓度乳酸杆菌抑制率在61%~88%之间,抑制效果与乳酸杆菌菌株有关。Gueinonde等将3株乳酸杆菌分别与艰难梭菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、单核李氏杆菌等同时加入Caco-2细胞培养液中孵育,也发现抑制作用与乳酸杆菌和病原菌菌株相关^[13]。Bernet等用同位素标记肠道病原菌,分别和不同浓度的双歧杆菌竞争粘附CaCo-2细胞,发现双歧杆菌能抑制ETEC、EPEC、弥散性粘附的大肠杆菌(DAEC)、假结核耶菌及伤寒杆菌对CaCo-2细胞的粘附,这种抑制作用具有浓度效应,他们还发现双歧杆菌能抑制EPEC、假结核耶菌及伤寒杆菌对CaCo-2细胞的破坏和入侵^[14]。Blomberg等发现,乳杆菌耗尽上清中含有一种蛋白质样物质,能抑制EPEC K88株对猪回肠粘液的粘附^[15]。另有研究表明,乳杆菌或其细胞壁成分粘附于人类泌尿道上皮细胞后,能竞争性地抑制大肠杆菌、肺炎杆菌及绿脓杆菌的粘附,由于这些细菌的粘附素受体不同,乳杆菌可能是通过妨碍受体的空间结构而发挥抑制作用^[16]。本研究中乳酸杆菌竞争抑制沙门氏菌粘附的作用机理尚需要深入研究。

有益细菌对病原菌粘附的抑制作用还具有时间效应。Lee和Sherman等分别报道了乳酸杆菌对病原细菌粘附的排斥和置换作用^[17,18]。我们也进一步研究了IPEC-J2粘附体系加入乳酸杆菌孵育1h后再加入沙门氏菌共同孵育,以及按相反顺序加入两种细菌,观察粘附抑制效果。发现先加入高浓度乳酸杆

菌,后加入沙门氏菌,其粘附数降低31%~71%,相反顺序加入时下降12%~84%,证明高浓度的乳酸杆菌无论先后加入均能抑制沙门氏菌对IPEC-J2细胞的粘附。有趣的是低浓度乳酸杆菌S33和K30对沙门氏菌不仅没有置换作用,反而增加了沙门氏菌的粘附率。Tuomola和Collado等也分别报道过乳酸杆菌和双歧杆菌对病原菌粘附的促进作用^[19,20]。具体原因尚不清楚。

鼠伤寒沙门氏菌DT104是先粘附于细胞表面,然后再侵入细胞造成损害^[21]。本试验中乳酸杆菌不仅能降低沙门氏菌对IPEC-J2细胞的粘附作用,而且还能抑制其对细胞的侵入,先加入乳酸杆菌对沙门氏菌的侵入抑制率为23%~33%。Boudeau等在研究非致病性大肠杆菌Nissle1917对具有粘附和侵入功能的致病性大肠杆菌的抑制作用时,发现先加大肠杆菌Nissle1917,侵入抑制率为97.2%~99.9%,同时加入时抑制率78%~99.9%^[22]。但是,在本试验中同时加入沙门氏菌和乳酸杆菌时,沙门氏菌侵入率反而增加(数据未列出),具体原因尚不清楚。该结果提示我们,在乳酸杆菌制剂使用过程中应尽早并大剂量使用,才能取得更好的防治效果。

Skjolaas等新近报道,鼠伤寒沙门氏菌DT104能够刺激IPEC-J2细胞,提高IL8、CCL20和TNF α 的mRNA表达水平,经地衣芽孢杆菌预处理细胞,可以降低沙门氏菌刺激细胞产生的IL8含量,而受试罗伊氏乳酸杆菌没有该功能^[23]。本试验中的乳酸杆菌是否会影响细胞抗炎性因子产生?对鼠伤寒沙门氏菌DT104的体内感染过程是否有抑制作用等问题都是下一步研究的方向。

本研究证实,受试乳酸杆菌均能粘附IPEC-J2细胞,并在一定程度上抑制鼠伤寒沙门氏菌DT104的粘附和侵袭,是具有潜在应用价值的益生菌菌株,为临床上防治猪沙门氏菌病、减少食物源性污染和提高食品安全提供了一个新的思路。

参 考 文 献

- [1] Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*, 1991, 32: 439-442.
- [2] Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82: 279-289.
- [3] Candela M, Perna F, Carnevali P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with

- human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*, 2008, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012.
- [4] Bogovic BM, Narat M, Zoric MP, *et al.* Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pigs' jejunal tissue. *Int J Food Microbiol*, 2006, **107**: 92–96.
- [5] Coconnier MH, Bernet MF, Kerneis S, *et al.* Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **110**: 299–306.
- [6] Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, *et al.* Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor ganglioside GM1 on the cell surface. *Int J Food Microbiol*, 2001, **67**: 97–106.
- [7] Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, *et al.* *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 1994, **35**: 483–489.
- [8] Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, *et al.* Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immun Med Microbiol*, 2005, **43**: 197–204.
- [9] Rugbjerg H, Wingstrand A, Hald T, *et al.* Estimating the number of undetected multi-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 infected pig herds in Denmark. *Prev Vet Med*, 2004, **14**: 147–171.
- [10] Helms M, Ethelberg S, Molbak K. The DT104 Study Group. International *Salmonella typhimurium* infections, 1992–2001. *Emerg Infect Dis*, 2005, **11**: 859–67.
- [11] Molbak K, Baggesen DL, Aarestrup FM, *et al.* An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *New Engl J Med*, 1999, **341**: 420–425.
- [12] Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, *et al.* Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol*, 2006, **125**: 293–305.
- [13] Gueimonde M, Jalonen L, He F, *et al.* Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected *Lactobacilli*. *Food Res Int*, 2006, **39**: 467–471.
- [14] Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, *et al.* Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 4121–4128.
- [15] Blomberg L, Henriksson A, Conway PL. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 34–39.
- [16] Chan RC, Reid G, Irvin RT, *et al.* Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect Immun*, 1985, **47**: 84–89.
- [17] Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, *et al.* Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by *Lactobacilli*. *J Med Microbiol*, 2003, **52**: 925–930.
- [18] Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, *et al.* Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*, 2005, **73**: 5183–5188.
- [19] Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immun Med Microbiol*, 1999, **26**: 137–142.
- [20] Collado MC, Gueimonde M, Hernandez M, *et al.* Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *J Food Protect*, 2005, **68**: 2672–2678.
- [21] Schmidt LD, Kohrt LJ, Brown DR. Comparison of growth phase on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) and mucosal explants from porcine small intestine. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 2008, **31**: 63–69.
- [22] Boudeau J, Glasser AL, Julien S. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharm Therap*, 2003, **18**: 45–56.
- [23] Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, *et al.* Effects of *Salmonella enterica* serovar typhimurium, or serovar choleraesuis, *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus licheniformis* on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2. *Vet Immunol Immunop*, 2007, **115**: 299–308.