

UDC 577.27:577.112.825:612.017.1

**V.O. Kitam¹, D.S. Yankovsky¹, V.P. Shirobokov², G.S. Dymant¹,
O.V. Litovchenko¹, L.M. Shevchenko¹, T.V. Shevchenko¹**

Using real-time polymerase chain reaction for taxonomic and quantitative analysis of multicomponent probiotics that are used in pediatrics

¹Ltd Company OD Prolosok, village V. Vilshanka, Kyiv oblast, Ukraine

²Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Modern Pediatrics.Ukraine.2020.2(106):69-82; doi 10.15574/SP.2020.106.69

For citation: Kitam VO, Yankovsky DS, Shirobokov VP, Dymant GS, et al. (2020). Using real-time polymerase chain reaction for taxonomic and quantitative analysis of multicomponent probiotics that are used in pediatrics. *Modern Pediatrics.Ukraine.2020.2(106):69-82.* doi 10.15574/SP.2020.106.69

The methods for determining the qualitative and quantitative composition of multicomponent probiotics play an important role in their development and investigation. Both taxonomic identification and quantitative analysis of such multisymbiosis components can be significantly accelerated with application of modern methods based on the detection and identification of DNA sequences by polymerase chain reaction (PCR). One of the main requirements for this method is the purity of the isolated DNA and the absence of polymerase chain reaction inhibitors in its content.

In the course of study, we developed a method for using polymerase chain reaction in real time for qualitative and quantitative determination of the species composition in multicomponent probiotic preparations containing representatives of 18 species of genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Acetobacter*. This method allows rapid and accurate research of samples in the presence of various inhibitors of polymerase chain reaction.

No conflict of interest was declared by the authors.

Key words: real-time polymerase chain reaction, DNA, multicomponent probiotic preparations, microorganism.

Introduction

Last years, there has been persistent interest of the scientific community to the exploration of the human microbiome (the totality of microbiocenoses colonizing all human body surfaces that contact with the environment, including skin, respiratory system, gastrointestinal tract and urogenital system) [5,7,8]. Large number of evidences show that the microbiome influences different processes of the human organism, including behavior and brain biochemistry [7,13,20].

The microbiome is playing a special role in the child health. It is well known that microflora created on the first year of life forms a fundament for maintaining child health with normal growth and development. It should be noted that the progress in the field of the microbiome study changed deep-rooted notions about its role in maintaining children health. It turned out that the microbiome formation may begin still before the childbirth due to specific placental microbiome, which includes microorganisms from different female biotopes [8,16,21].

Therefore, the great importance of microbiota for the child health is convincingly proven; however, under present-day conditions, the pattern of initial microbe colonization critically changed. This, on a large scale, led to the worsening of reproductive health of the young generation, heightened contingent of women with perinatal

risk factors, unreasonable medicamentous therapy and so on [5,7,8,20,21]. That is why prophylactic measures, which promote formations of healthy microbiome and prevent its pathological changes in both woman and her child, play a fundamental role in establishing and maintaining child health.

Recognition of the microbiome importance for the child vital functions has led to a wide usage of probiotics in the practice of neonatology, pediatrics and gynecology; living microorganisms of probiotics positively influence human health due to rehabilitation of microflora.

In particular, for today a great positive medio-prophylactic experience has been accumulated in the usage of multiprobiotics of Symbiter[®] series for prophylaxis and elimination of dysbiotic disturbances in women during pregnancy and puerperal period, as well as in all-age children beginning from neonate period. Long-standing practice of using multiprobiotics showed their good tolerance and safety, even when applied to small premature infants [8,21].

The development and manufacture of multicomponent probiotics require continual control of their quality and quantity composition. Standard microbiological approaches, such as isolation of separate cultures and their taxonomic identification based on morphological and biochemical properties, do not always allow correctly appreci-

ating various microbial taxa in the content of multisymbioses. Moreover, to a large degree such methods are time-consuming and labor-intensive. Not only taxonomic identification but also quantitative analysis of such multisymbiosis components can be significantly accelerated with application of modern methods based on the detection and identification of DNA sequences by polymerase chain reaction (PCR), and especially its modification – quantitative polymerase chain reaction in real time (RT-PCR).

One of the main requirements for accurate quantitative evaluation of the microbiological composition of various sour-milk products, as well as multisymbioses cultivated in milk-rich nutrient media, is the purity of the isolated DNA and the absence of polymerase chain reaction inhibitors in its content. The presence of proteases, calcium ions (Ca^{2+}) and various polysaccharides [1] complicates the reaction, and makes it impossible to carry out in some cases.

Recently, the authors developed a new series of multicomponent probiotics of the series Symbiter® forte that contain, besides probiotic biomass, also smectite gel (bentonite) [2–4]. High smectite adsorptive activity is an additional factor that also complicates the application of the method.

In the course of our work, a method for qualitative and quantitative evaluation of the taxonomic composition of multicomponent symbioses of probiotic bacteria was developed. Such multicomponent symbioses are the basis of multispecies probiotics, including the multiprobitics «Symbiter® Forte-M», «Symbiter® Forte-omega» and «Symbiter® Forte with Propolis» (manufactured by Scientific-production company OD Proli-sok). For this purpose, because of high content of polysaccharides, smectite and other PCR inhibitors in samples, the method of DNA separation and purification from bacterial cells was modified. In addition, an approach for quantitative estimation of the species composition of multiprobitics was developed with the use the RT-PCR method [6].

Materials and methods

To isolate DNA from bacterial cells, the last were previously washed from the casein remnants, calcium ions, smectite and exopolysaccharides. Thereto, the contents of a single package /sachet of the multiprobitic were diluted in a 2:3 ratio with 0.1N NaOH solution, and 450 μl of the sample were then centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. (MiniSpin Eppendorf, Germany). The precipitate

was diluted in 0.5 ml of TE buffer (pH 8.0) and as well centrifuged. The washed precipitate was again diluted with 250 μl of TE buffer (pH 8.0) with addition of lysozyme (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and incubated for 1 hour at 37°C. The bacterial cell lysis was performed by adding 0.5 ml of lysis buffer BQ1 (Macherey-Nagel, Germany) and incubating for 1 hour at 70°C. Then the equal volumes of chloroform were added to the samples that were left for 15 minutes with gentle periodical mixing. Phase separation was carried out by centrifugation for 10 minutes at 10,000 rpm. The upper transparent phase was carefully sampled in a clean tube and equal volume of isopropanol was added. After careful mixing and incubation for 15 minutes at room temperature DNA was sedimented by centrifugation (10 minutes at 10,000 rpm). The precipitate was successively washed with 100% and 70% ethyl alcohol solution, with respective centrifugation for 10 minutes at 10,000 rpm. The washed precipitate was further dried and stored at -20°C; it was diluted in 200 μl of TE buffer immediately before analysis.

Primers were selected using PrimerBlast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) in accordance with the rules of molecular design, based on complete genome sequencing data from the GenBank database. Thus, species-specific primers (Table) for *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium bifidum* were created against the *dnaA* region (1..1500). This gene encodes the chromosome replication initiation protein, characterized by high species-specificity, is present in all strains and has no repeats in genome. This allowed us to precisely quantitatively analyze bacterial cells of the above species.

The species-specific primers (Table) for *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* were created against the β -galactosidase gene (400500..402500). The absence of this gene repeats in the bacterial genome allowed us to perform precise quantitative analyzes of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* cells in the sample.

Using Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), comparative analysis of the selected oligonucleotide primers was performed to exclude fragments that were homologous to DNA of related and unrelated species. This analysis was performed against the full bacteria genome sequences available in GenBank.

To identify all other indicated species (Table) we used primers made during our previous studies [5].

Table

Used primers and sizes of appropriate amplification products for every tested species in multisymbiosis

Species	Pair of primers	Amplicons (bp)
<i>B. adolescentis</i>	F 5'-GTGGCTGATAACACGACAACAGATCC-3' R 5'-TTTTGAAGGCGGGGAAGATGTCCT-3'	268
<i>B. bifidum</i>	F 5'-ACAAGAGCTGGCTTGAAGGAGTCGTA-3' R 5'-ATGTAGGATTCCTGAGCCAGATCG-3'	304
<i>B. breve</i>	F 5'-CCGGATGCTCCATCACAC-3' R 5'-ACAAAGTGCCCTTGCTCCCT-3'	288
<i>B. longum</i>	F 5'-TTTCTATTGAACAGACACAGGTTTGCCC-3' R 5'-AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3'	268
<i>B. longum subsp. infantis</i>	F 5'-TGGGGTATTATCAACCCGCGC-3' R 5'-CGTCAACGATTTCAACCACG-3'	284
<i>L. acidophilus</i>	F 5'-TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC-3' R 5'-CCTTTCCCTCACGGTACTG-3'	207
<i>L. brevis</i>	F 5'-TTTGACGATCACGAAGTGACCG-3' R 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCTC-3'	495
<i>L. casei</i>	F 5'-GAAACGTGGACCTGCTGTTG-3' R 5'-CAGCATCGGCTTTATTCCGC-3'	258
<i>L. fermentum</i>	F 5'-AAGAATCAGGTAGTCGAAGTG-3' R 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCTC-3'	147
<i>L. helveticus</i>	F 5'-GAAGTGATGGAGAGTAGAGATA-3' R 5'-CTCTTCTCGGTCGCCTTG-3'	179 та 429
<i>L. gasseri</i>	F 5'-GAGTGCAGAGACTAAAG-3' R 5'-CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT-3'	198 та 423
<i>L. plantarum</i>	F 5'-GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT-3' R 5'-TTACCTAACGGTAAATGCGA-3'	283 та 512
<i>L. salivarius</i>	F 5'-TTCTCGCTTAAATGGGGGCT-3' R 5'-GCTGGATTTGCCACTGACTTT-3'	271
<i>L. lactis</i>	F 5'-GTACTTGTACCGACTGGA-3' R 5'-GGGATCATCTTTGAGTGAT-3'	163
<i>P. acidopropionici</i>	F 5'-CTGGAAGCTGGCCGTCG-3' R 5'-CTTGCAACACAACACATTAC-3'	304
<i>P. freudenreichii ssp. shermanii</i>	F 5'-GACTCGGGCTACAGACAGTG-3' R 5'-TTCTCGCGCGTGTAGTCATT-3'	171
<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	F 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3' R 5'-CGAACAGCATTGATGTTA-3'	968
<i>A. aceti</i>	F 5'-TGGTACGGCATTCCGGG-3' R 5'-ACGCTCAATGGACACTG-3'	285

Quantitative analysis of the multiprobiotic composition was performed with real-time PCR using DT-322 amplifier (DNA-technology, Russia). Composition of the PCR mixture: PCR buffer (Amplisens, Russia) – 10 µl, nucleotide mixture – 2.5 µl, forward and reverse primers – 1 µl, Taq polymerase (Amplisens, Russia) – 2.5 µl, DNA – 8 µl. The reaction was visualized by addition of ZUBRgreenI (Belarus) to the PCR buffer at a final concentration of 1x. The reaction was carried out according to the following program:

- 1 cycle: 94°C – 5 minutes;
- 70 cycles: 94°C – 15 s
58°C – 30 s (fluorescence was read)
72°C – 1 minute 30 s;
- 1 cycle: 72°C – 5 minutes;
- Melting curve (from 94°C to 50°C in a 1°C step and 45s delay for fluorescence read);
- Storage at 10°C.

Results and discussions

Correct methods for determining the qualitative and quantitative composition of multispecies symbioses play an important role in their development and investigation. Such methods are particularly important for controlling the manufacture of both probiotic and multiprobiotic products that contain a broad spectrum of bacteria with declared probiotic effects. Our long-term studies have shown that close symbiotic relationships between members of multicomponent probiotics greatly complicate the possibility of using standard microbiological methods for the identification and quantification of different bacterial species that frequently form common colonies on nutrient medium [2,4,7,8]. Moreover, differential cultivation and microscopy are time-consuming methods and do not always allow to carry out precise quantitative analysis and fully

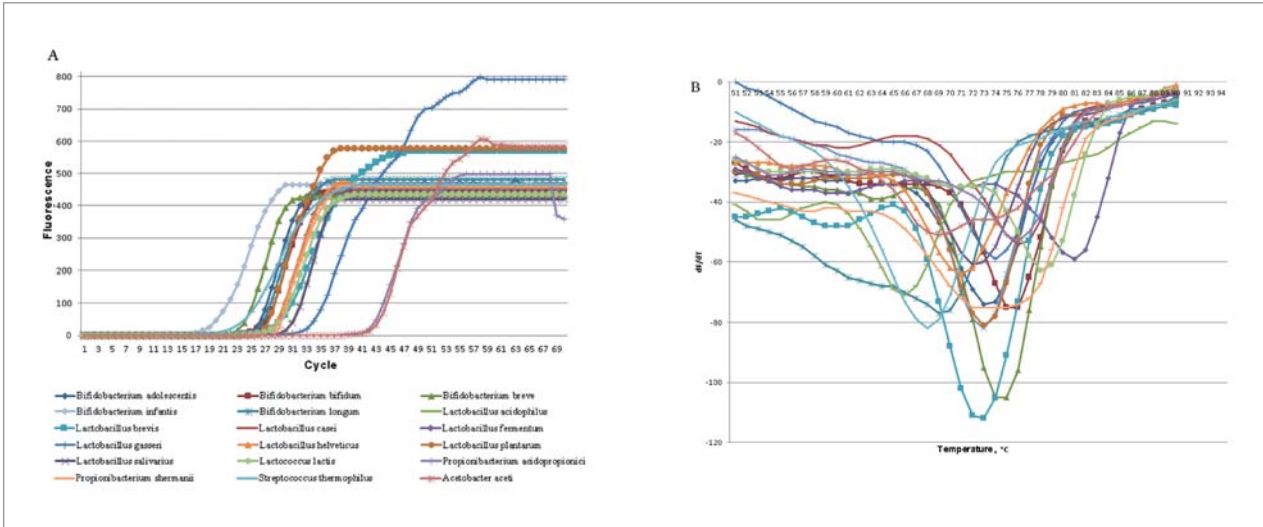


Fig. 1. Results of RT- PCR for Symbiter® Forte-M. A — Fluorescence dependence on cycle. B — Melting curves of amplification products (dependence of rate of fluorescence change on temperature)

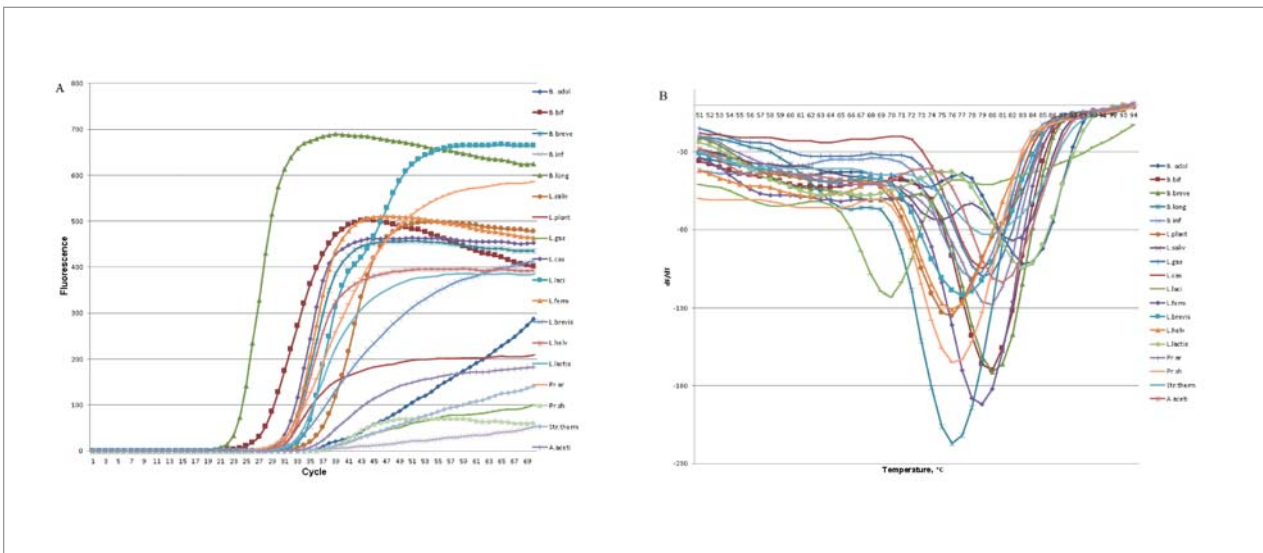


Fig.2. Results of RT- PCR for Symbiter® Omega. A — Fluorescence dependence on cycle. B — Melting curves of amplification products (dependence of rate of fluorescence change on temperature)

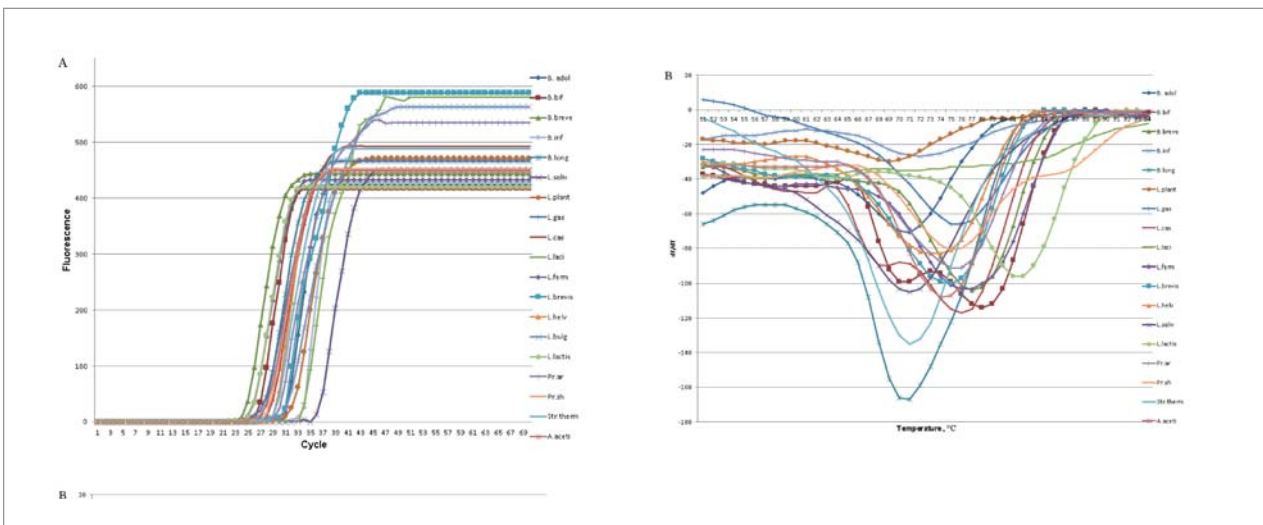


Fig. 3. Results of RT- PCR for Symbiter® Forte with propolis. A — Fluorescence dependence on cycle. B — Melting curves of amplification products (dependence of rate of fluorescence change on temperature)

separate members of a persistent mutualistic symbiosis into definite species, and, furthermore, strains. A perspective possibility for solving this problem is in using molecular biology methods, such as PCR and its modifications.

Studies *in vitro* showed that polymerase chain reaction is based on multiple selective replication of specific DNA regions by specific enzymes [6]. Thus, only the area, which satisfies the given conditions, is copied (even when present in the sample in extremely low concentrations). Such selectivity and specificity of PCR can be achieved through carefully selected primers (usually short, chemically synthesized DNA molecules, 20–30 nucleotide residues in length) that limit the multiplied / copied / amplified sequence on both sides. Nowadays this method is widely used to identify and detect species-specific genes. However, it should be noted that used enzymes require accurate maintenance of physical and chemical conditions for their effective functioning. Thus, the polymerase chain reaction itself is extremely sensitive to the presence of a wide range of inhibitors such as, for example, calcium ions, phenols, alcohols, polysaccharides, some proteins etc. Such sensitivity imposes certain requirements not only to the purity of DNA obtained but in total to the process its isolation.

Multiprobitics «Symbiter® Forte», used in this study, are complex preparations characterized by the rational combination of living biomass of probiotic bacteria with smectite gel of deep cleaning and other biologically active products of natural origin. Introduction of smectite gel into the multiprobitic reasonably supplements all spectrum of its properties with new physiological activities and significantly increases shelf life of the live probiotic preparation due to protective effect on anaerobic bacteria [3,7,8]. The bacterial base of this probiotic series is the multispecies symbiosis of the following bifidobacteria species: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis*, *V. adolescentis*; lactobacillus species: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. salivarius*; lactic acid streptococci species: *Lactococcus lactis* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*; and propionic acid bacteria species: *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* and *P. acidipropionici*. As mentioned above, these preparations contain a number of other biologically active products of natural origin. Thus, Symbiter® Forte-M additionally contains the suspension of wheat germs, Symbiter®

Omega contains flaxseed oil and wheat germ oil, and Symbiter® Forte with propolis includes propolis [3,7].

The presence of sorbent, suspension of wheat germs, fats and propolis in the multiprobitics of the Symbiter® forte series greatly complicates the processes of bacterial cells washing with further separation and purification of DNA. In addition, smectite was shown to increase significantly synthesis of exopolysaccharides by the multisymbiosis members.

The primary task of our work was to develop a unified method for washing microbial cells and isolating pure DNA suitable for subsequent PCR. Some of the main components of multiprobitic preparations may complicate DNA extraction and /or act as PCR inhibitors. Therefore, the presence of milk and high level of polysaccharides, including those associated with the bacterial cell wall, almost eliminates the separation of this cells from the nutrient medium by centrifugation. In addition, the high content of short chain fatty acids in the multiprobitics «Symbiter® Forte» causes casein to precipitate. In order to dissolve such milk proteins we increased pH of the sample to 8.5–9.5. Subsequently, the calcium ions were bound with EDTA and pH level was adjusted to 8.0.

Bacterial cells are characterized by a high content of polysaccharides, which complicates both further cell lysis and DNA extraction. During our previous studies, DNA was isolated usually in a mixture with these polysaccharides, making it impossible to perform PCR. The problem was solved by additional processing of the sample with lysozyme, which enzymatically separated the polysaccharides from the cell wall, so that further centrifugation allowed separating bacterial cells. During further extraction of DNA from bacterial cells, it is advisable to use chloroform for additional purification (not obligatory) of the protein residue lysate (including lysozyme itself) and polysaccharides. Obtained purified DNA has been subsequently used for qualitative and quantitative evaluation of the bacterial composition of multiprobitic preparations.

There are approaches for identifying representatives of genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Acetobacter* with PCR methods. They are mainly based on the amplification of specific regions of the gene cluster encoding 5S, 16S, 23S subunits of the bacterial ribosome, spacers between them and *lacZ* gene [9–14]. High conservatism of the ribosomal operon allowed develo-

ping primers to identify not only certain species and subspecies, but also the genera of probiotic bacteria. At the same time, such conservatism may lead to false-positive results for some strains, and different copy numbers of these genes not only in different species, but also in different strains, complicate their use for reliable quantitative analysis of bacterial cells in samples.

Previously, we proposed a method based on polymerase chain reaction for determining DNA in probiotic bacteria of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Acetobacter*. This method used primers against the region of ribosomal operon coding 16S sub-particles of ribosomal RNA [15]. Disadvantage of this method is high conservatism of 16S rRNA gene, which may complicate the process of species identification and accurate quantitative analysis of the bacterial content. Genotypes of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* are highly homologous [16]. This makes almost impossible using highly conservative ribosomal operon genes as targets for PCR identification. Proposed in the literature primers for identifying *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium bifidum* were also ineffective, especially for quantitative analysis. Therefore, for the above bacterial species, we have designed and synthesized appropriate pairs of specific primers (see Methods and Table for more details).

The results of Real-Time PCR for Symbiter® Forte-M, Symbiter® Omega and Symbiter® Forte with propolis are shown in Figures 1, 2 and 3, respectively. The figures show the dependence of fluorescence on cycles (A) and melting curves

of amplification products (B). Polymerase chain reaction passed successfully for all samples with sufficient efficiency. The proposed method for DNA obtaining from these samples allows unifying such studies. It has high repeatability and corresponds to the basic requirements to standard qualitative, and quantitative analyzes of multi-symbiosis components in samples with high content of PCR inhibitors. In the case of Symbiter® Omega, PCR efficiency was somewhat worse (Fig. 2), which can be explained by the presence of oil in the samples. However, the results obtained for this preparation were reliable and characterized by high experimental repeatability.

Quantitative calculation of the content of individual members of multisymbioses in the studied samples was carried out using the methods we developed earlier [5]. The results obtained by the PCR method are in full agreement with the data obtained by microbiological research methods.

Conclusions

Thus, in the course of study, we developed a method for using polymerase chain reaction in real time for qualitative and quantitative determination of the species composition in multi-component probiotic preparations containing representatives of 18 species of genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Acetobacter*. This method allows rapid and accurate research of samples in the presence of various inhibitors of polymerase chain reaction.

No conflict of interest was declared by the authors.

REFERENCES/ЛІТЕРАТУРА

1. Kitam VO, Litovchenko OV, Korobka VL, Shevchenko LM, Shevchenko TV, Yankovskiy DS, Dymont GS, vynakhidnyky; TOV firma «O.D. Prolisok», patentovlasnyk. Sposib yakisnogo ta kilkinsnogo vyznachennya vydovogo skladu bagatokomponentnyh bakterialnyh preparativ za dopomogoyu specyfichnyh praymeriv metodom polimeraznoi lancyugovoi reakciy realnogo chasu. Patent Ukrainy No. 115774. 2017, Apr 25.
2. Shirobokov VP, Yankovsky DS, Dymont GS. The method of making probiotic Symbiter forte. Patent No. 34782 Ukraine A61K35/74, A23C9/12, C12N1/20. Application 07.03.2008, published 26.08.2008, Bulletin No. 16.
3. Shirobokov VP, Yankovsky DS, Dymont GS. (2008). Perspective of using bentonite on creation of a new type of multiprobitotics. *Sovremennaya Pediatriya*. 4(21): 143–154.
4. Yankovsky DS, Zaets VN, Zvorych VA, Kitam VO, Dymont GS. (2012). Using Polymerase chain reaction for identifying bacterial content of multicomponent probiotics. *Sovremennaya pediatriya*. 6(46): 65–68.
5. Shirobokov VP, Yankovsky DS, Dymont GS. (2014). Microbes in biogeochemical processes, biosphere evolution, and existence of humankind. Kyiv: FOP Veres Ol : 464.
6. Shirobokov VP, Yankovsky DS, Dymont GS. (2015). Creation of health-improving agents of new generation on basis of smectite. *Vrachebnoe delo*. 1(2): 3–9.
7. Yankovsky DS, Shirobokov VP, Dymont GS. (2011). Integral role of symbiotic microflora in human physiology. Kyiv: Limited company Chervona Ruta-Typc: 169.
8. Yankovskyy DS, Shyrobokov VP, Dymont GS. (2017). *Microbiome*. Kyiv: Veres Ol: 640.
9. Blajotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F, Andolfi R. (2002). 16S-23S rDNA inter-genic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. *System. Appl. Microbiol.* 25: 520–527.
10. Hyuk-Sang Kwon, Eun-Hee Yang, Seung-Hun Lee, Seung-Woo Yeon et al. (2005). Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 250(1): 55–62.

11. Lick S, Keller M, Bockelmann W, Heller KJ. (1996). Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. *System. Appl. Microbiol.* 19: 74–77.
12. Markiewicz L, Biedrzycka E. (2005). Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. *Pol J Food Nutr Sci.* 14/55(4): 359–365.
13. Reid G, Gadir AA, Dhir R. (2019). Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. *Front Microbiol.* 10: 424. doi 10.3389/fmicb.2019.00424.
14. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487–491.
15. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. (2012). PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology.* 113(5): 1014–26.
16. Stinson LF, Boyce MC, Payne MC, Keelan JA. (2019, Jun 04). The Not-so-Sterile Womb: Evidence That the Human Fetus Is Exposed to Bacteria Prior to Birth. *Frontiers in Microbiology.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01124>.
17. Srutkova D, Spanova A, Spano M, Drab V et al. (2011). Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *Journal of Microbiological Methods.* 87(1): 6–10.
18. Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T. (2001). Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR. *Int J Food Microbiol.* 68: 45–52.
19. Tokunaga H, Tanaka H, Hashiguchi K, Nagano M et al. (2009). Rapid detection of acetic acid bacteria in the traditional pot-fermented rice vinegar Kurozu. *Food Sci. Technol. Res.* 15(6): 587–590.
20. Yankovsky DS, Shirobokov VP, Dyment GS. (2018). Innovation Technologies For Human Microbiome Improvement. *Sci innov.* 14(6): 11–21.
21. Yankovsky DS, Shirobokov VP, Dyment GS. (2019). The role of microbiome in the formation of child health (literature review). *Modern Pediatrics Ukraine.* 5(101): 64–111. doi 10.15574/SP.2019.101.64.

Information about authors:

Kitam Volodymyr Olegovych — Master in Biology, researcher of the Scientific center of Scientific-production Company OD Prolisok. <https://orcid.org/0000-0002-4596-7755>.

Yankovsky Dmytro Stanislavovich — Doctor of biological sciences, Professor, General Director of Scientific-production Company OD Prolisok. <https://orcid.org/0000-0003-2780-5194>.

Shyrobokov Volodymyr Pavlovych — Doctor of Medicine, Professor, Member of the NAS of Ukraine, Member of the NAMS of Ukraine, Head the Department of microbiology, virology and immunology of the Bogomolets National Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-7474-5895>.

Dyment Gaiyna Semenivna — Candidate of technical sciences, Director of the Scientific center of Scientific-production Company OD Prolisok; <https://orcid.org/0000-0002-7474-5895>.

Litovchenko Oleksandr Viktorovych — bachelor in biotechnology, senior laboratory assistant of the Scientific center of Scientific-production Company OD Prolisok, <https://orcid.org/0000-0003-0020-8920>.

Shevchenko Lyubov Mykolajivna — Master in Biotechnology, researcher of the Scientific center of Scientific-production Company OD Prolisok. <https://orcid.org/0000-0001-8745-0837>.

Shevchenko Tetiana Viktorivna — bachelor in biotechnology, laboratory assistant of the Scientific center of Scientific-production Company OD Prolisok. <https://orcid.org/0000-0003-4128-1980>

Article received: Dec 02, 2019. Accepted for publication: Mar 11, 2020.

УВАГА! ВАЖЛИВА ІНФОРМАЦІЯ!

Зміни в оформленні списку літератури

Перший (основний) варіант наводиться одразу після тексту статті, джерела подаються в алфавітному порядку. Список літератури наводиться латиницею. Джерела українською та російською мовами наводяться у перекладі на англійську мову, але так, як вони показані та реєструються на англійських сторінках сайтів журналів. Якщо джерело не має аналога назви на англійській мові — воно наводиться у транслітерації. Таке оформлення списку літератури необхідне для аналізу статті та посилань на авторів у міжнародних наукометричних базах даних, підвищення індексу цитування авторів.

Другий варіант повторює перший, але джерела українською та російською мовами подаються в оригінальній формі. Цей варіант необхідний для оформлення електронних версій журналу на українській і російській сторінках, цитованості у кирилических наукометричних базах.

Приклади оформлення джерел літератури

Журнальна публікація

Author AA, Author BB, Author CC. (2005). Title of the article. Title of Journal. 10(2);3:49-53.

Книжка

Author AA, Author BB, Author CC. (2006). Title of the book. City: Publisher: 256.

Розділ у книжці

Author AA, Author BB, Author CC. (2006). Title of the chapter(s) of the book. In book Author(s). Title of the book. Eds. Name. City: Publisher: 256.

Інтернет-ресурс

Author AA, Author BB, Author CC. (2006). Title of article. Title of Journal/book. URL-address.

УДК 577.27:577.112.825:612.017.1

**В.О. Кітам¹, Д.С. Янковський¹, В.П. Широбоков², Г.С. Димент¹,
О.В. Літовченко¹, Л.М. Шевченко¹, Т.В. Шевченко¹**

Використання методу полімеразної ланцюгової реакції реального часу для оцінки таксономічного складу мультикомпонентних пробіотиків, які використовуються у педіатрії

¹ТОВ фірма «О.Д. Пролісок», с. В. Вільшанка, Київська обл., Україна

²Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Modern Pediatrics.Ukraine.2020.2(106):69-82; doi 10.15574/SP.2020.106.69

Для цитування: Кітам ВО, Янковський ДС, Широбоков ВП, Димент ГС та інш. (2020). Використання методу полімеразної ланцюгової реакції реального часу для оцінки таксономічного складу мультикомпонентних пробіотиків, які використовуються в педіатрії. Сучасна педіатрія.Україна.2020.2(106):69-82. doi 10.15574/SP.2020.106.69

Важливу роль у розробці та дослідженні багатокомпонентних пробіотиків відіграють методи визначення їх якісного та кількісного складу. Як таксономічна ідентифікація, так і кількісний аналіз компонентів таких мультисимбіозів можуть бути значно прискорені із застосуванням сучасних методів, заснованих на виявленні та ідентифікації послідовностей ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Однією з основних вимог до даного методу є чистота виділеної ДНК та відсутність інгібіторів ПЛР у її вмісті.

У ході роботи розроблено метод використання ПЛР в реальному часі для якісного та кількісного визначення видового складу в багатокомпонентних пробіотичних препаратах, що містять представників 18 видів родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter*. Цей метод дозволяє швидко і точно досліджувати зразки в присутності різних інгібіторів ПЛР.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція реального часу, праймери, ДНК, мультикомпонентні пробіотики, бактерії.

Применение метода полимеразной цепной реакции реального времени для оценки таксономического состава мультикомпонентных пробиотиков, которые используются в педиатрии

В.О. Кітам¹, Д.С. Янковський¹, В.П. Широбоков², Г.С. Димент¹, О.В. Літовченко¹, Л.М. Шевченко¹, Т.В. Шевченко¹

¹ООО фирма «О.Д. Пролісок», с. Б. Ольшанка, Киевская обл., Украина

²Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Важную роль в разработке и исследовании многокомпонентных пробиотиков играют методы определения их качественного и количественного состава. Как таксономическая идентификация, так и количественный анализ компонентов такого мультисимбиоза могут быть значительно ускорены с применением современных методов, основанных на выявлении и идентификации последовательностей ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Одним из основных требований к данному методу является чистота выделенной ДНК и отсутствие ингибиторов ПЦР в ее содержимом.

В ходе работы был разработан метод использования ПЦР в реальном времени для качественного и количественного определения видового состава бактерий в многокомпонентных препаратах пробиотиков, которые содержат представителей 18 видов родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Acetobacter*. Этот метод позволяет быстро и точно исследовать образцы в присутствии разных ингибиторов ПЦР.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция реального времени, праймеры, ДНК, мультикомпонентные пробиотики, бактерии.

Вступ

Останніми роками непинно зростає інтерес наукової спільноти до досліджень мікробіома людини (сукупності мікробіоценозів, що колонізують усі поверхні людського тіла, які контактують з навколишнім середовищем, у тому числі шкіру, дихальну систему, шлунково-кишковий тракт і сечостатеву систему) [5,7,8]. Отримано безліч переконливих доказів значного впливу мікробіома на різні процеси функціонування організму людини, включаючи поведінку і біохімію мозку [7,13,20].

Особливе значення мікробом відіграє в здоров'ї дитини. Як відомо, становлення мікро-

флори, що відбувається на першому році життя, закладає фундамент для підтримки здоров'я дітей, їх нормального росту і розвитку. Слід зазначити, що прогрес у галузі вивчення мікробіома істотно змінив укорінені уявлення про його роль у підтримці здоров'я дитини. Виявилось, що мікробіом може формуватися ще до народження дитини за рахунок специфічного мікробіома плаценти, до складу якого входять мікроорганізми різних біотопів жінки [8,16,21].

Попри доведене надзвичайно важливе значення мікробіоти в становленні здоров'я дитини, в сучасних умовах характер первинної

мікробної колонізації зазнав критичних змін, що великою мірою пов'язано з погіршенням репродуктивного здоров'я молодого покоління, збільшенням контингенту жінок з перинатальними чинниками ризику, нераціональним медикаментозним лікуванням тощо [5,7,8,20,21]. Тому використання профілактичних заходів, спрямованих на оптимізацію становлення здорового мікробіома і попередження його патологічних змін, як у жінки, так і у її дитини, грають величезну роль у формуванні і збереженні здоров'я дітей.

Усвідомлення значущості мікробіома в життєдіяльності дитини привело до широкого впровадження в практику неонатології, педіатрії та гінекології пробіотиків — живих мікроорганізмів, що позитивно впливають на здоров'я людини за рахунок оздоровлення її мікрофлори.

Зокрема, на сьогодні накопичений досить великий позитивний досвід лікувально-профілактичного застосування мультипробіотиків серії «Симбітер[®]» з метою профілактики та усунення дисбіотичних порушень у жінок протягом всього періоду вагітності і в післяпологовому періоді, а також у дітей різного віку, починаючи з періоду новонародженості. Багаторічна практика використання мультипробіотиків показала їх хорошу переносимість і безпеку при використанні навіть у глибоко недоношених дітей [8,21].

Створення та виробництво мультикомпонентних пробіотиків потребує постійного якісного та кількісного контролю їх складу. Стандартні мікробіологічні підходи, такі як виділення окремих культур та ідентифікація їх таксономічного положення на основі вивчення морфологічних та біохімічних властивостей, не завжди дають можливість точно оцінити вміст представників різних мікробних таксонів в складі мультисимбіозу. Крім того, такі методи є значною мірою часо- та працезатратними. Використання сучасних методів, заснованих на детекції та ідентифікації послідовностей ДНК із використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а особливо її модифікації — кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ), дозволяє значно прискорити не лише таксономічну ідентифікацію, але й кількісний аналіз складових мультисимбіозів.

Однією з умов проведення точної кількісної оцінки мікробіологічного складу різноманітних кисломолочних продуктів, а також мультисимбіозів, що культивуються на молоковісних поживних середовищах, є чистота виділеної

ДНК та відсутність у ній інгібіторів полімеразної ланцюгової реакції. Так, наявність у зразках протеаз, іонів кальцію (Ca^{2+}) та різноманітних полісахаридів [15] значно ускладнює, а подекуди — й унеможлиблює проведення реакції.

Нещодавно авторами розроблена нова серія мультикомпонентних пробіотиків «Симбітер форте», що містять, крім пробіотичної біомаси, гель смектиту (бентоніту) [2–4]. Висока адсорбційна активність смектиту є додатковим фактором, що ускладнює реалізацію методу.

У ході роботи нами було розроблено методику якісної та кількісної оцінки таксономічного складу мультикомпонентних симбіозів пробіотичних бактерій, що складають основу полівидових пробіотиків, у тому числі мультипробіотиків «Симбітер[®] форте-М», «Симбітер[®] форте омега» та «Симбітер[®] форте з прополісом» (виробник НВК «О.Д. Пролісок»). Для цього було модифіковано метод виділення та очищення ДНК з бактеріальних клітин з урахуванням високого вмісту полісахаридів, смектиту та інших інгібіторів ПЛР у зразках, а також розроблено метод кількісної оцінки видового складу мультипробіотиків методом ПЛР-РЧ [14].

Матеріал і методи дослідження

Для виділення ДНК бактеріальні клітини попередньо відмивали від залишків казеїну, іонів кальцію, смектиту та екзополісахаридів. Для цього вміст одного пакету/саше мультипробіотика розводили у співвідношенні 2:3 0.1н. розчином NaOH та відбирали 450 мкл зразка з подальшим центрифугуванням протягом 10 хв при 10 тис. об/хв. (MiniSpin Eppendorf, Німеччина). Надалі отриманий осад розводили в 0,5 мл ТЕ-буфера (рН 8,0) і так само центрифугували. Відмитий осад знову розводили 250 мкл ТЕ-буферу (рН 8,0) із додаванням лізоциму у співвідношенні 5 мкг на 1 мл буферу та інкубували в термостаті 1 годину при 37°C. Лізис бактеріальних клітин проводили, додаючи 0,5 мл лізисного буфера BQ1 (Machegey-Nagel, Німеччина) та інкубуючи в термостаті 1 годину при 70°C. Надалі додавали до пробірок рівний об'єм хлороформу та залишали на 15 хв, час від часу м'яко перемішуючи. Розподіл фаз проводили центрифугуванням 10 хв при 10 тис. об/хв. Верхню прозору фазу обережно відбирали в чисту пробірку, додавали рівний об'єм ізопропанолу, ретельно перемішували, інкубували 15 хв при кімнатній температурі та центрифугували 10 хв при 10 тис. об/хв.

Перелік використаних праймерів та розміри відповідних продуктів ампліфікації для кожного досліджуваного виду, що міститься в мультисимбіозі

Вид	Пара праймерів	Амплікони (п.н.)
<i>B. adolescentis</i>	F 5'-GTGGCTGATAACACGACAACAGATCC-3' R 5'-TTTTGAAGGCGGGGAAGATGCCT-3'	268
<i>B. bifidum</i>	F 5'-ACAAGAGCTGGCTTGAAGGAGTCGTA-3' R 5'-ATGTAGGATTCCTGAGCCAGATCG-3'	304
<i>B. breve</i>	F 5'-CCGGATGCTCCATCACAC-3' R 5'-ACAAAGTGCCTTGCTCCCT-3'	288
<i>B. longum</i>	F 5'-TTTCTATTGAACAGACACAGTTTGTCCC-3' R 5'-AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3'	268
<i>B. longum subsp. infantis</i>	F 5'-TGGGGTATTATCAACCCGGC-3' R 5'-CGTCAACGATCCAACCACG-3'	284
<i>L. acidophilus</i>	F 5'-TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC-3' R 5'-CCTTTCCCTCACGGTACTG-3'	207
<i>L. brevis</i>	F 5'-TTTGACGATCACGAAGTGACCG-3' R 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCCTC-3'	495
<i>L. casei</i>	F 5'-GAAACGTGGACCTGCTGTTG-3' R 5'-CAGCATCGGCTTTATTCCGC-3'	258
<i>L. fermentum</i>	F 5'-AAGAATCAGGTAGTCGAAGTG-3' R 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCCTC-3'	147
<i>L. helveticus</i>	F 5'-GAAGTGATGGAGAGTAGAGATA-3' R 5'-CTCTTCTCGGTGCGCCTTG-3'	179 та 429
<i>L. gasseri</i>	F 5'-GAGTGCAGAGCAATAAG-3' R 5'-CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT-3'	198 та 423
<i>L. plantarum</i>	F 5'-GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT-3' R 5'-TTACCTAACGGTAAATGCGA-3'	283 та 512
<i>L. salivarius</i>	F 5'-TTCTCGCTTAAATGGGGGCT-3' R 5'-GCTGGATTTGCCACTGACTTT-3'	271
<i>L. lactis</i>	F 5'-GTAATTGTACCGACTGGA-3' R 5'-GGGATCATCTTTGAGTGAT-3'	163
<i>P. acidopropionici</i>	F 5'-CTGGAAGCTGGCCGTCG-3' R 5'-CTTGCAACACAACACATTAC-3'	304
<i>P. freudenreichii ssp. shermanii</i>	F 5'-GACTCGGGCTACAGACAGTG-3' R 5'-TTCTCGCGCGTGTAGTCATT-3'	171
<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	F 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3' R 5'-CGAACAGCATTGATGTTA-3'	968
<i>A. aceti</i>	F 5'-TGGTACGGCATTCCGGG-3' R 5'-ACGCTCAATGGACCACTG-3'	285

Осад послідовно промивали за допомогою 100% та 70% розчинів етилового спирту, відповідно центрифугуючи 10 хв при 10 тис. об/хв. Промитий осад надалі висушували та зберігали при -20°C, розводячи в 200 мкл ТЕ-буфера безпосередньо перед аналізом.

Праймери підбирали за допомогою програми PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) згідно з правилами молекулярного дизайну, ґрунтуючись на даних повного секвенування геномів, взятих з бази даних GenBank. Так, для створення видоспецифічних праймерів (табл.) до *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis* та *Bifidobacterium bifidum* було вибрано ділянку dnaA (1..1500). Даний ген кодує білок ініціації реплікації хромосоми та характеризується високою видоспецифічністю, присутній у всіх штаммах та не має повторів у геномі. Це дозволяє точно аналізувати кількість клітин бактерій вказаних видів у зразку.

Для створення видоспецифічних праймерів (табл.) до *Bifidobacterium longum subsp. infantis* було вибрано ділянку гена β-галактозидази (400500..402500). Відсутність повторів цього гена в бактеріальному геномі дозволяє точно аналізувати кількість клітин *Bifidobacterium longum subsp. infantis* у зразку.

Порівняльний аналіз вибраних олігонуклеотидних праймерів здійснювали за допомогою програми Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) для виключення фрагментів, гомологічних до ДНК споріднених та неспоріднених видів. Даний аналіз проводився за повними послідовностями геномів бактерій, доступних в GenBank.

Для ідентифікації всіх інших вказаних видів було використано праймери, підібрані під час проведення попередніх наших досліджень (табл.) [1].

Кількісний аналіз складу мультисимбіотиків проводили методом ПЛР-РЧ за допомогою ампліфікатора ДТ-322 («ДНК-Технологія», Росія). Склад суміші для ПЛР: ПЛР буфер

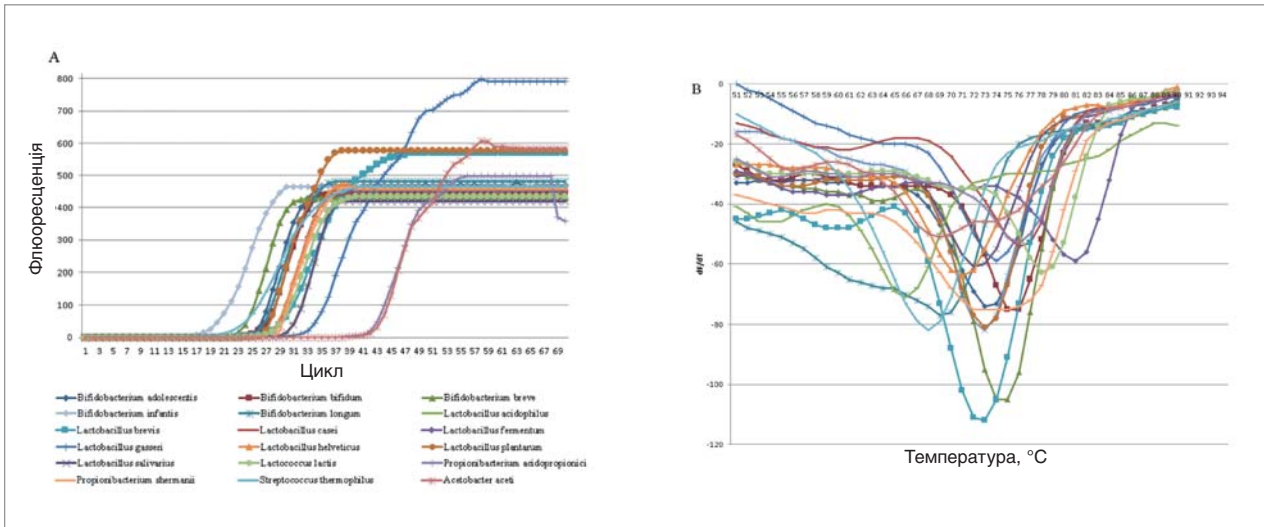


Рис.1. Результати ПЛР-РЧ для «Симбітер® форте-М»: А — графік залежності рівня флюоресценції від циклу; В — крива плавлення продуктів ампліфікації (графік залежності швидкості зміни рівня флюоресценції від температури)

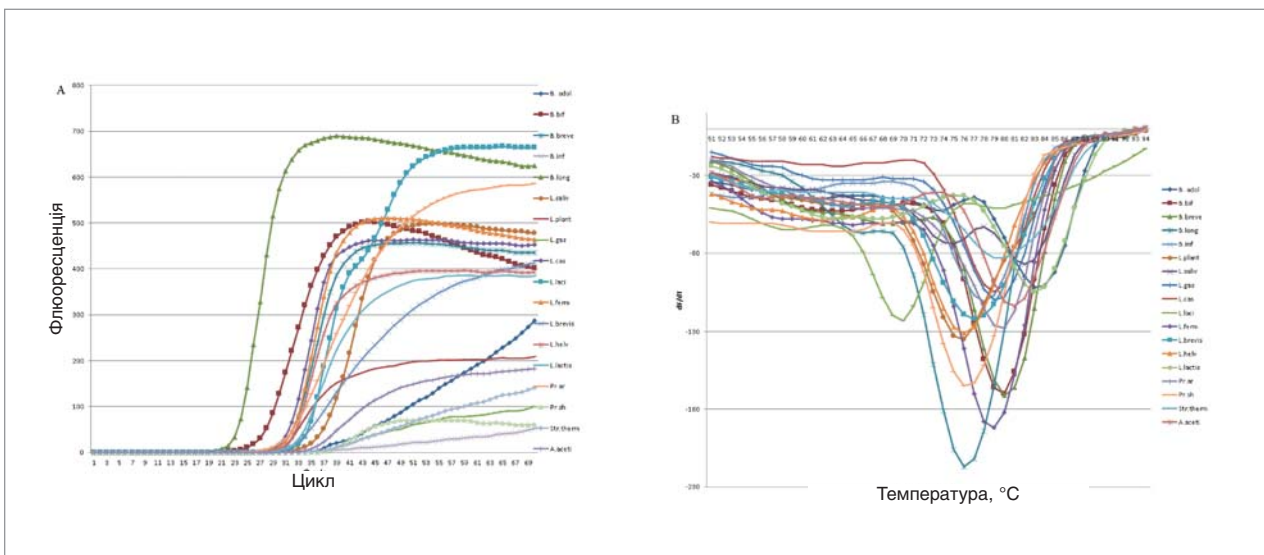


Рис.2. Результати ПЛР-РЧ для «Симбітер® омега»

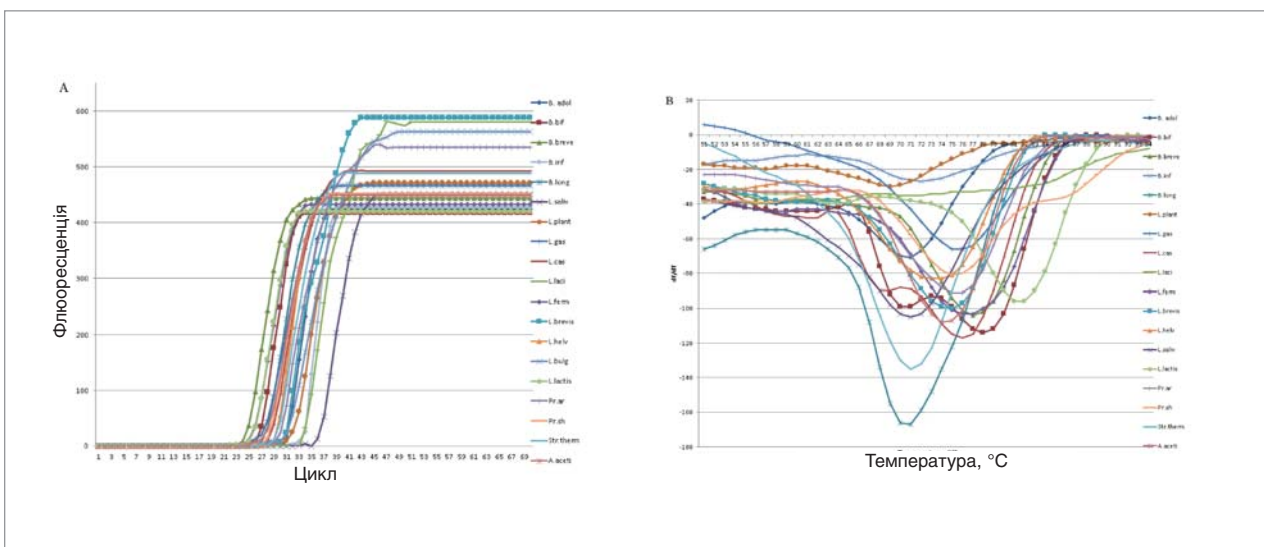


Рис.3. Результати ПЛР-РЧ для «Симбітер® форте з прополісом»

(Amplisens, Росія) — 10 мкл, суміш нуклеотидів — 2,5 мкл, прямий та зворотний праймери — по 1 мкл, Taq-полімераза (Amplisens, Росія) — 2,5 мкл, ДНК — 8 мкл. Візуалізували реакцію додаванням ZUBRgreenI (Білорусь) до ПЛР буфера в кінцевій концентрації 1х. Реакцію проводили за наступною програмою:

- 1) 1 цикл: 94°C — 5 хв;
- 2) 70 циклів: 94°C — 15 с
58°C — 30 с (знімали флюоресценцію)
72°C — 1 хв 30 с;
- 3) 1 цикл 72°C — 5 хв;
- 4) Крива плавлення (з 94°C до 50°C із кроком 1°C та затримкою 45 с для зняття флюоресценції);
- 5) Зберігання при 10°C.

Результати дослідження та їх обговорення

При конструюванні полівидових симбіозів та їх дослідженні важливу роль відіграє наявність коректного методу визначення якісного та кількісного складу таких багатокомпонентних культур. Особливу актуальність це питання набуває для контролю виробництва мультипробіотиків та пробіотичних продуктів, що містять широкий видовий спектр бактерій із заявленим пробіотичним ефектом. Наші багаторічні дослідження довели, що тісні симбіотичні зв'язки між членами мультикомпонентних пробіотиків значно ускладнюють використання стандартних мікробіологічних методів ідентифікації та оцінки кількості бактерій різних видів, які в багатьох випадках формують на поживних середовищах спільні колонії [3,5–7]. Крім того, диференційне культивування та мікроскопія є досить часозатратними методами та не завжди дозволяють провести точний кількісний аналіз та в повній мірі розділити членів стійкого мутуалістичного симбіозу до окремих видів, а тим паче — штамів. Одним із перспективних напрямків вирішення цієї проблеми є використання методів молекулярної біології, зокрема таких як ПЛР та її модифікації.

Як відомо, ПЛР ґрунтується на багаторазовому виборчому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою специфічних ферментів в умовах *in vitro* [14]. При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка відповідає заданим умовам, і лише в тому випадку, якщо вона є у досліджуваному зразку, навіть в надзвичайно малих концентраціях. Така вибірковість та специфічність ПЛР досягається завдяки ретельно підібраним праймерам (зазвичай короткі, хімічно синтезовані молекули ДНК

довжиною 20–30 нуклеотидних залишків), які обмежують з двох боків послідовність, що розмножується/копіюється/ампліфікується. На сьогодні цей метод широко використовується для ідентифікації та детекції видоспецифічних генів. Проте необхідно відмітити, що використання ферментів потребує чіткого підтримання фізичних та хімічних умов для їх ефективного функціонування. Так сама ПЛР є надзвичайно чутливою до впливу широкого класу інгібіторів, таких як, наприклад, іони кальцію, феноли, спирти, полісахариди, деякі білки тощо. Така чутливість ставить певні вимоги не тільки до чистоти власне ДНК, яка використовується в дослідженнях, а загалом до самого процесу виділення цієї ДНК.

Мультипробіотики «Симбітер® форте», що були використані в даній роботі, є комплексними препаратами з раціональним поєднанням оздоровчих потенціалів живої біомаси пробіотичних бактерій і гелю смектиту глибокого очищення, а також інших біологічно активних продуктів природного походження. Введення гелю смектиту до складу мультипробіотика раціонально доповнює арсенал його властивостей новими фізіологічними активностями і значно збільшує термін зберігання живого пробіотичного препарату за рахунок протекторної дії на анаеробні бактерії [2,6,7]. Бактеріальною основою пробіотиків цієї серії є полівидовий симбіоз біфідобактерій видів: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. longum ssp. infantis*, *B. adolescentis*, лактобацил видів: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, молочнокислих стрептококів видів: *Lactococcus lactis* і *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, пропіоновокислих бактерій видів: *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* і *P. acidipropionici*. Як було вказано раніше, дані препарати містять ряд інших біологічно активних речовин природного походження. Так, «Симбітер® форте-М» додатково містить суспензію зародків пшениці, «Симбітер® омега» містить масло льону та масло зародків пшениці, а «Симбітер® форте з прополісом» — прополіс [2,8].

Наявність сорбенту, шроту, жирів та прополісу в складі мультипробіотиків серії «Симбітер® форте» значно ускладнює процеси відмивання бактеріальних клітин та подальшого виділення та очистки ДНК. Крім того, встановлено, що смектит індукує помітне підвищення синтезу екзополісахаридів членами мультисимбіозу.

Таким чином, у ході нашої роботи першочерговим завданням було розробити уніфіковану методику відмивання клітин та виділення чистого препарату ДНК, придатного для подальшого проведення ПЛР. Деякі з основних компонентів мультипробіотика можуть ускладнювати виділення ДНК та/або виступати інгібіторами ПЛР. Так, виявилось, що наявність молока та висока кількість полісахаридів, у тому числі асоційованих з клітинною стінкою бактерій, майже унеможливує розділення клітин та окремих компонентів поживного середовища методом центрифугування. До того ж високий вміст у складі мультипробіотиків «Симбітер® форте» коротколанцюгових жирних кислот сприяє тому, що казеїн випадає у нерозчинний осад. Переведення білків молока в розчинну форму проводили шляхом підвищення рН до 8,5–9,5. Надалі іони кальцію зв'язували за допомогою EDTA та доводили рівень рН зразка до 8,0.

Відмита таким чином маса бактеріальних клітин характеризується високим вмістом полісахаридів, що ускладнює як подальший лізис клітин, так і виділення ДНК. Так, в ході попередніх досліджень вона майже завжди виділялась у суміші з цими полісахаридами, унеможливаючи проведення ПЛР. Проблему вдалося вирішити шляхом додаткової обробки зразка лізоцимом, який ферментативно відділив полісахариди від клітинної стінки, а подальше центрифугування вже дозволило відокремити бактеріальні клітини. Слід зазначити, що в ході подальшого виділення ДНК із бактеріальних клітин бажаною, проте не обов'язковою, є додаткова очистка лізату хлороформом від залишків білків (у тому числі власне лізоциму) та полісахаридів. Очищену ДНК в подальшому використовували для якісної та кількісної оцінки бактеріального складу мультипробіотичних препаратів.

Існують способи ідентифікації представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter* методами ПЛР. Вони ґрунтуються, переважно, на ампліфікації специфічних ділянок кластеру генів, які кодують 5S, 16S, 23S субодиниці бактеріальної рибосоми, спейсери між ними та ген *lacZ* [10–13,18,19]. Висока консервативність рибосомального кластеру генів дозволила розробити праймери для ідентифікації не тільки окремих видів та підвидів, але й загалом родів пробіотичних бактерій. Водночас така консервативність може спричинювати

появу хибно-позитивних результатів для деяких штамів, а різна копійність цих генів не тільки у різних видів, але й у різних штамів ускладнює їх використання для достовірного аналізу кількості бактеріальних клітин у дослідних зразках.

Раніше нами було запропоновано спосіб визначення наявності ДНК пробіотичних бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter*, який ґрунтується на ПЛР, з використанням праймера до ділянки одного з генів рибосомального оперону, що кодує синтез 16S субчастинки рибосомальної РНК [4]. До недоліків вказаного способу слід віднести високу консервативність гена 16S рРНК, що може ускладнювати процес видової ідентифікації та точну кількісну оцінку бактеріального складу.

Генотипи *Bifidobacterium longum subsp. longum* та *Bifidobacterium longum subsp. infantis* є високогомологічними [17]. Це майже унеможливує використання висококонсервативних генів рибосомального оперону в якості мішеней для ідентифікації методом ПЛР. Ідентифікація бактерій видів *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis* та *Bifidobacterium bifidum* за допомогою праймерів, запропонованих у літературі, також була малоефективною, особливо для кількісного аналізу. Тому для вищевказаних видів бактерій нами було спроектовано та синтезовано відповідні пари специфічних праймерів (детальніше див. методи та табл.).

Результати ПЛР-РЧ для «Симбітер® форте-М», «Симбітер® омега» та «Симбітер® форте з прополісом» наведено на рис. 1, 2 та 3 відповідно. На рисунках представлено графік залежності рівня флюоресценції від циклу (А) та графік кривої плавлення продуктів ампліфікації (Б). Полімеразна ланцюгова реакція для всіх зразків проходить успішно з достатнім рівнем ефективності. Запропонований нами метод отримання ДНК із вказаних зразків дозволяє уніфікувати подібні дослідження та характеризується високим рівнем повторюваності, відповідаючи основним вимогам проведення регулярних якісних та кількісних аналізів вмісту компонентів мультисимбіозів у зразках із високим вмістом інгібіторів ПЛР. Слід зазначити, що у випадку «Симбітер® омега» спостерігались дещо гірші рівні ефективності ПЛР (рис.2), що можна пояснити наявністю олії у зразках. Проте результати отримані для цього препарату є достовірними та так само характе-

ризуються високим рівнем повторюваності в ході повторних експериментів.

Кількісний розрахунок вмісту окремих членів мультисимбіозів у досліджених зразках проводили з використанням розроблених нами раніше методів [1]. Результати, отримані методом ПЛР, у повній мірі узгоджувались із даними, отриманими мікробіологічними методами дослідження.

Висновки

Таким чином, у ході нашої роботи було розроблено спосіб якісного та кількісного

визначення видового складу мультикомпонентного пробіотика, що містить представників 18 видів бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter* за допомогою специфічних праймерів методом ПЛР у режимі реального часу. Даний метод дозволяє проводити швидко та точну оцінку зразків в умовах присутності різноманітних інгібіторів ПЛР.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

REFERENCES/ЛІТЕРАТУРА

1. Кітам ВО, Літовченко ОВ, Коробка ВЛ, Шевченко ЛМ, Шевченко ТВ, Янковський ДС, Димент ГС. Спосіб якісного та кількісного визначення вмісту видового складу багатокомпонентних бактеріальних препаратів за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції реального часу. Патент № 115774. Україна (корисна модель), МПК С12Н1/20, С12Р1/01. — Дата подання заявки: 17.11.2016.
2. Широбоков ВП, Янковський ДС, Димент ГС. Спосіб одержання пробіотика Симбітер-форте. Патент № 34782 Україна (корисна модель) А61К35/74, А23С9/12, С12Н1/20 — Заявл. 07.03.2008, опубл. — 26.08.2008, Бюл. №16.
3. Широбоков ВП, Янковський ДС, Димент ГС. (2008). Перспективи використання бентоніта в створенні нових видів мультипробиотиків. Современная педиатрия. 4(21): 143–154.
4. Янковський ДС, Заець ВН, Зварич ВА, Кітам ВО, Димент ГС. (2012). Использование метода полимеразной цепной реакции для идентификации бактериального состава мультикомпонентных пробиотиков. Современная педиатрия. 6(46): 65–68.
5. Широбоков ВП, Янковський ДС, Димент ГС. (2014). Микробы в биогеохимических процессах, эволюции биосферы и существовании человечества. — Киев: ФЛП Верес ОИ: 464.
6. Широбоков ВП, Янковський ДС, Димент ГС. (2015). Оздоровительные средства на основе смектита. Лікарська справа. 1(2): 3–9.
7. Янковський ДС, Широбоков ВП, Димент ГС. (2011). Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека. Киев: Червона Рута-Турс: 169.
8. Янковський ДС, Широбоков ВП, Димент ГС. (2017). Микробиом. Киев: ФЛП Верес ОИ: 640.
9. Blajotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F, Andolfi R. (2002). 16S-23S rDNA inter-genic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. System. Appl. Microbiol. 25: 520–527.
10. Нуук-Санг Квон, Еун-Хеє Янг, Сеунг-Хун Лее, Сеунг-Вуо Yeon et al. (2005). Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 250(1): 55–62.
11. Lick S, Keller M, Bockelmann W, Heller KJ. (1996). Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. System. Appl. Microbiol. 19: 74–77.
12. Markiewicz L, Biedrzycka E. (2005). Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. Pol J Food Nutr Sci. 14/55(4): 359–365.
13. Reid G, Gadir AA, Dhir R. (2019). Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. Front Microbiol. 10: 424. doi: 10.3389/fmicb.2019.00424
14. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487–491.
15. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. (2012). PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. Journal of applied microbiology. 113(5): 1014–26.
16. Stinson LF, Boyce MC, Payne MC, Keelan JA. (2019, Jun 04). The Not-so-Sterile Womb: Evidence That the Human Fetus Is Exposed to Bacteria Prior to Birth. Frontiers in Microbiology. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01124>.
17. Srutkova D, Spanova A, Spano M, Drab V et al. (2011). Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. Journal of Microbiological Methods. 87(1): 6–10.
18. Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T. (2001). Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR. Int J Food Microbiol. 68: 45–52.
19. Tokunaga H, Tanaka H, Hashiguchi K, Nagano M et al. (2009). Rapid detection of acetic acid bacteria in the traditional pot-fermented rice vinegar Kurozu. Food Sci. Technol. Res. 15(6): 587–590.
20. Yankovsky DS, Shirobokov VP, Dymment GS. (2018). Innovation Technologies For Human Microbiome Improvement. Sci innov. 14(6): 11–21.
21. Yankovsky DS, Shirobokov VP, Dymment GS. (2019). The role of microbiome in the formation of child health (literature review). Modern Pediatrics Ukraine. 5(101): 64–111. doi 10.15574/SP.2019.101.64

Відомості про авторів:

Кітам Володимир Олегович — магістр біологічних наук, н.с. наукового центру НВК «О.Д. Пролісок». Адреса: вул. Софіївська, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл. <https://orcid.org/0000-0002-4596-7755>

Янковський Дмитро Станіславович — д.б.н., проф., генеральний директор НВК «О.Д. Пролісок». Адреса: вул. Софіївська, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл. <https://orcid.org/0000-0003-2780-5194>

Широбоков Володимир Павлович — д.мед.н., проф., акад. НАН та НАМН України, зав. каф. мікробіології, вірусології і імунології НМУ імені О.О. Богомольця. Адреса: м. Київ, просп. Перемоги, 34. <https://orcid.org/0000-0002-7474-5895>

Димент Галина Семенівна — к.тех.н., директор наукового центру НВК «О.Д. Пролісок». Адреса: вул. Софіївська, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл. <https://orcid.org/0000-0002-6187-0152>, 067-249-01-44

Літовченко Олександр Вікторович — бакалавр біотехнології, ст. лаборант наукового центру НВК «О.Д. Пролісок». Адреса: вул. Софіївська, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл. <https://orcid.org/0000-0003-0020-8920>

Шевченко Тетяна Вікторівна — бакалавр біотехнології, лаборант наукового центру НВК «О.Д. Пролісок». Адреса: вул. Софіївська, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл. <https://orcid.org/0000-0003-4128-1980>

Стаття надійшла до редакції 02.12.2019 р.; прийнята до друку 11.03.2020 р.