

УДК 577.27:577.112.825:612.017.1

**В.О. Кітам<sup>1</sup>, Д.С. Янковський<sup>1</sup>, В.П. Широбоков<sup>2</sup>, Г.С. Димент<sup>1</sup>,  
О.В. Літовченко<sup>1</sup>, Л.М. Шевченко<sup>1</sup>, Т.В. Шевченко<sup>1</sup>**

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

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

<sup>2</sup>Національний 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. Китам<sup>1</sup>, Д.С. Янковский<sup>1</sup>, В.П. Широбоков<sup>2</sup>, Г.С. Димент<sup>1</sup>, А.В. Литовченко<sup>1</sup>, Л.М. Шевченко<sup>1</sup>, Т.В. Шевченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ООО фирма «О.Д. Пролісок», с. В. Ольшанка, Киевская обл., Украина

<sup>2</sup>Национальный 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 невпинно 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<sup>®</sup>» 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 працевитратними. 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 молокозмісних 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<sup>®</sup> форте-М», «Симбітер<sup>®</sup> форте омега» та «Симбітер<sup>®</sup> 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 VQ1 (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'-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'-ACAAAGTGCCTTGCTCCCT-3'	288
<i>B. longum</i>	F 5'-TTTCTATTGAACAGACACAGGTTTGCC-3' R 5'-AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3'	268
<i>B. longum subsp. infantis</i>	F 5'- TGGGGTATTATCAACCCGGC -3' R 5'- CGTCAACGATTCCAACCACG -3'	284
<i>L. acidophilus</i>	F 5'-TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC-3' R 5'-CCTTCCCTCACGGTACTG-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'- CAGCATCGGCTTATTCCGC-3'	258
<i>L. fermentum</i>	F 5'-AAGAATCAGGTAGTCGAAGTG-3' R 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCTC-3'	147
<i>L. helveticus</i>	F 5'-GAAGTGATGGAGATGAGATA-3' R 5'-CTCTTCTCGGTCCGCTTG-3'	179 та 429
<i>L. gasseri</i>	F 5'-GAGTGCGAGAGCACTAAAG-3' R 5'-CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT-3'	198 та 423
<i>L. plantarum</i>	F 5'-GCCGCCTAAGGTGGACAGAT-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.

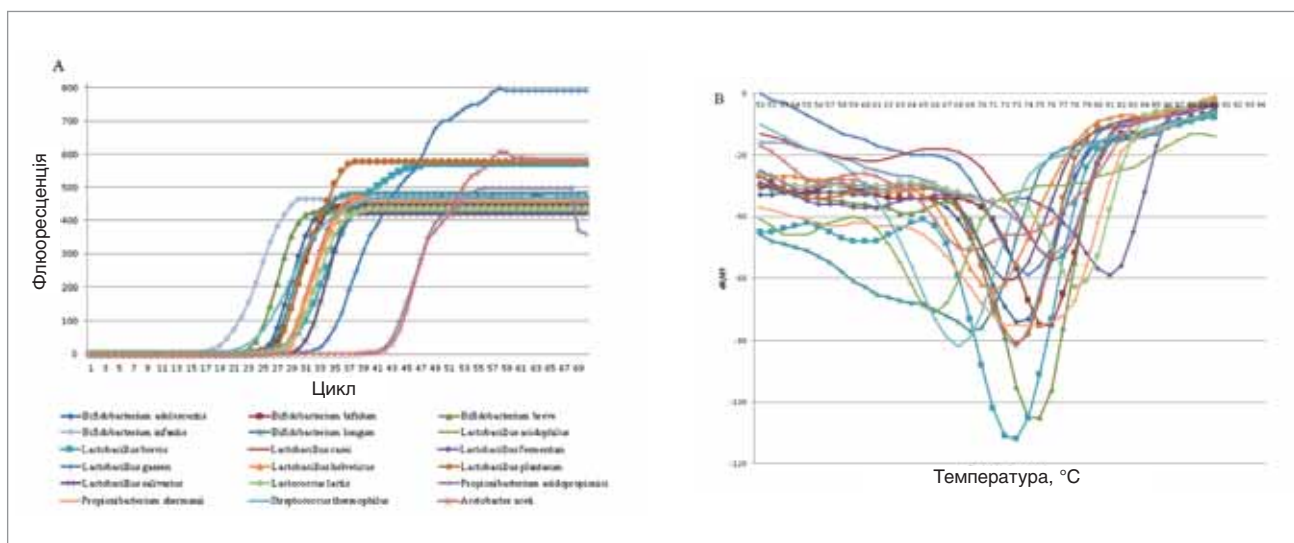
Праймери підбирали за допомогою програми PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) згідно з правилами молекулярного дизайну, ґрунтуючись на даних повного секвенування геномів, взятих з бази даних GenBank. Так, для створення видоспецифічних праймерів (табл.) до *Lactobacillus casei*, *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.

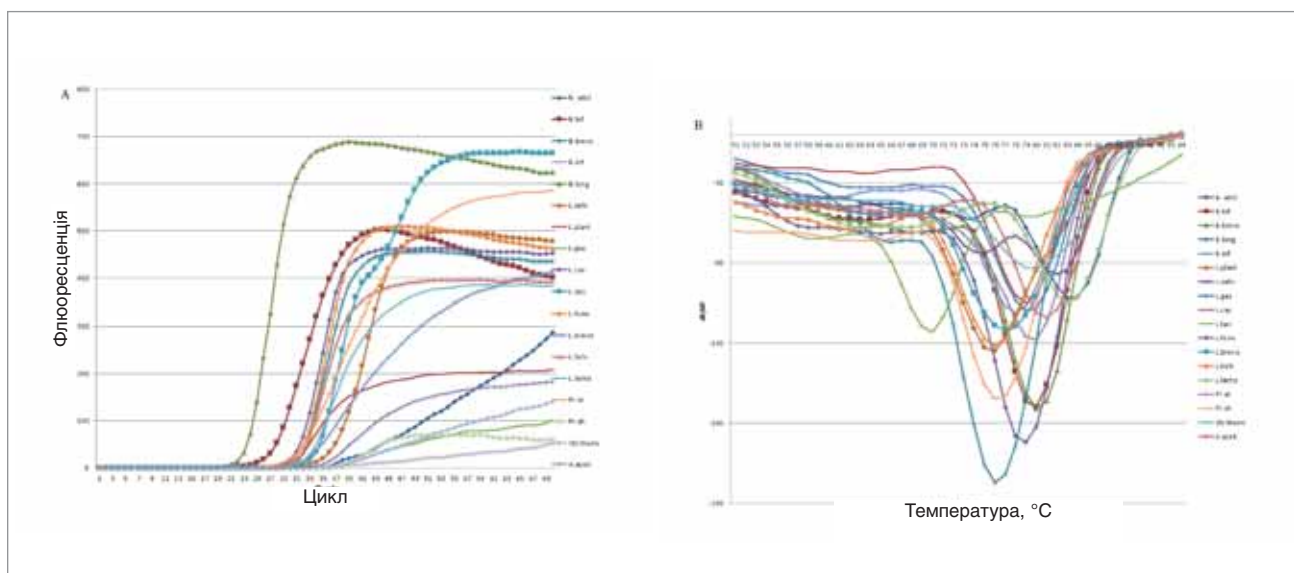
Порівняльний аналіз вибраних олігонуклеотидних праймерів здійснювали за допомогою програми Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) для виключення фрагментів, гомологічних до ДНК споріднених та неспоріднених видів. Даний аналіз проводився за повними послідовностями геномів бактерій, доступних в GenBank.

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

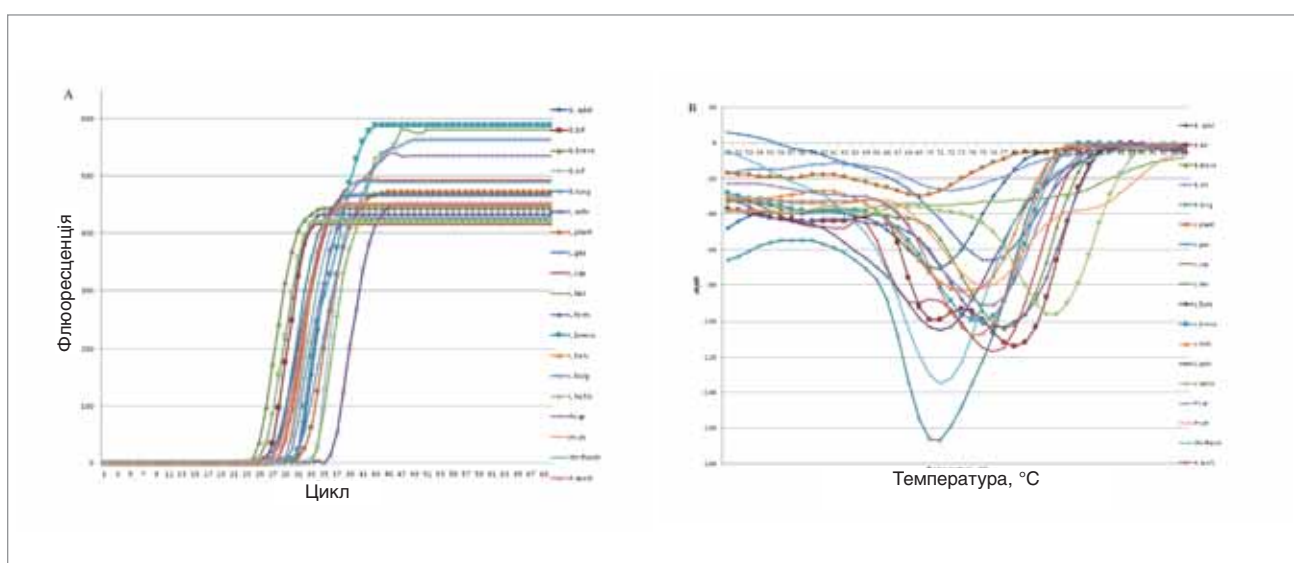
Кількісний аналіз складу мультипробиотиків проводили методом ПЛР-РЧ за допомогою ампліфікатора ДТ-322 («ДНК-Технологія», Росія). Склад суміші для ПЛР: ПЛР буфер



**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 1x. 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 високотомологічними [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. Ширококов 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. Ширококов 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. Ширококов ВП, Янковський ДС, Димент ГС. (2014). Микробы в биогеохимических процессах, эволюции биосферы и существовании человека. — Киев: ФЛП Верес ОИ: 464.
6. Ширококов ВП, Янковський ДС, Димент ГС. (2015). Оздоровительные средства на основе смектита. *Лікарська справа*. 1(2): 3–9.
7. Янковський ДС, Ширококов ВП, Димент ГС. (2011). Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека. Киев: Червона Рута-Турс: 169.
8. Янковський ДС, Ширококов 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. 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

### 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>

**Ширококов 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.