

Количественный выход жизнеспособных микроорганизмов *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (*L. casei* DG®) после пассажа через желудочно-кишечный тракт у здоровых взрослых

Stefania Arioli¹⁺, Ranjan Koirala¹⁺, Valentina Taverniti¹, Walter Fiore^{1,2} и Simone Guglielmetti^{1*}

Подразделение пищевой микробиологии и биопроцессов, кафедра изучения пищевых продуктов, окружающей среды и питания (DeFENS), Миланский университет, Милан, Италия, 2 «Софар С.п.А», Трещано-Роза, Италия

Пробиотики – это живые микроорганизмы, а их жизнеспособность после транзита через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) рассматривается в качестве характерного свойства пробиотиков, обуславливающего пользу для здоровья. Цель настоящего исследования заключалась в количественном определении нагрузки жизнеспособных клеток, а также общей нагрузки клеток *Lactobacillus paracasei* DG после их пассажа через ЖКТ после употребления здоровыми взрослыми пробиотического препарата Энтеролактис (*L. casei* DG®; *L. paracasei* CNCM I-1572; *L. paracasei* DG) из питьевых флаконов. Мы разработали новый метод дифференцировки и подсчета культивируемых клеток *L. paracasei* DG на основании уникального клейкого, нитевидного фенотипа данного штамма на агаре MRS, содержащем ванкомицин и канамицин. Подлинность DG также подтверждали при помощи специфичных для штамма праймеров методом ПЦР колонии. Этот метод использовался в изучении выхода штамма DG при количественном определении жизнеспособных клеток в образцах кала 20 добровольцев на протяжении 1-недельного периода употребления, а также 1-недельного последующего наблюдения. Мы выделяли *L. paracasei* DG по крайней мере из одного образца кала у всех добровольцев. Наибольшая концентрация жизнеспособных клеток DG [в количестве от 3,6 до 6,7 log₁₀ колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм кала] в кале отмечалась в период от 4 до 8 дней с момента начала приема препарата Энтеролактис, а также на протяжении до 5 дней после прекращения приема. Как и ожидалось, общее количество DG, определяемое при помощи количественной ПЦР в режиме реального времени (кПЦР), по большей части оказалось выше, чем количество обнаруженных жизнеспособных клеток DG. Эксперименты по подсчету жизнеспособных клеток, проводимые при сочетании ситуационных дискриминационных условий, связанных с культурой, а также специфичных для штамма молекулярных биологических протоколов, четко показали, что клетки *L. paracasei* DG могут выживать в ЖКТ здоровых взрослых после приема внутрь в составе препарата Энтеролактис из питьевых флаконов, содержащих не менее 1 млрд. КОЕ в конце срока годности.

Ключевые слова: пробиотик, энтеролактис, экзополисахариды/экзопалисахаридный (EPS), кПЦР, выделение

ОТКРЫТЫЙ ДОСТУП

Редактор:

Giovanna E. Felis,

Веронский университет, Италия

Рецензент:

Petra Foerst, Мюнхенский технический университет, Германия

Lucilla Iacumin, Университет Удине, Италия

***Автор, которому следует направлять корреспонденцию:**

Simone Guglielmetti

simone.guglielmetti@unimi.it

+ Эти авторы внесли равный вклад в настоящую работу.

Специализация раздела:

Данная статья была представлена в разделе пищевой микробиологии журнала *Frontiers in Microbiology*.

Получено: 11 марта 2018 г.

Принято к публикации: 10 июля 2018 г.

Опубликовано: 02 августа 2018 г.

Цитирование:

Arioli S, Koirala R, Taverniti V, Fiore W and Guglielmetti S (2018) Quantitative Recovery of Viable *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (*L. casei* DGR) After Gastrointestinal Passage in Healthy Adults. *Front. Microbiol.* 9:1720.

doi: 10.3389/fmicb.2018.01720

ВВЕДЕНИЕ

Пробиотики – это «живые микроорганизмы, которые при приеме в достаточном количестве обеспечивают пользу для здоровья организму» (Hill и соавт., 2014). Таким образом, согласно определению, термин «пробиотик» ограничен живыми клетками микроорганизмов. В соответствии с положениями многочисленных стран реальное количество микробных колониобразующих единиц (КОЕ) в пробиотическом препарате не может быть ниже значения, указанного на маркировке, до конца срока годности препарата. Следовательно, производители и компетентные общественные органы постоянно оценивают число жизнеспособных клеток коммерческих пробиотических препаратов для обеспечения их соответствия заявленным спецификациям. Одновременно предпринимается множество технических усилий, направленных на поиск стратегий сохранения жизнеспособных бактериальных клеток на различных этапах производства, а также в готовом продукте до окончания его срока годности. Данные стратегии включают выбор соответствующих питательных сред, использование защитных препаратов в процессе лиофилизации, микрокапсуляцию и улучшения систем упаковки (da Cruz и соавт., 2007; Savini и соавт., 2010; Goderska, 2012; Mai и соавт., 2017).

Несмотря на постоянный мониторинг жизнеспособности микробных клеток для каждого имеющегося в продаже пробиотического препарата, в настоящее время имеются ограниченные сведения о способности определенного микробного штамма в конкретной лекарственной форме пробиотика выживать в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) после его приема внутрь. Вместе с тем, жизнеспособность обычно рассматривается в качестве обязательного условия для реализации полезных свойств пробиотика. Таким образом, жизнеспособные пробиотики показали большую эффективность по сравнению с не жизнеспособными пробиотиками с точки зрения определенных эффектов по укреплению здоровья (Lahtinen, 2012). В этом контексте в первом документе «Консультация экспертов WHO/ FAO (Всемирная продовольственная организация) по оценке эффектов в отношении здоровья, а также пищевых свойств пробиотиков» сообщалось, что

способность сохранять жизнеспособные в целевом участке следует проверять для каждого потенциального штамма (FAO/WHO, 2001).

Обычный процесс выбора новых потенциальных штаммов пробиотиков включает оценку *in vitro* способности штаммов выживать при низких значениях pH, в имитированном желудочном соке, а также в присутствии желчных кислот. Однако оценка жизнеспособность пробиотиков *in vivo* – это более сложная задача, возможно в связи со сложностями организации интервенционных исследований у добровольцев, а также по причине технических ограничений. Использование биоптатов человека – это неосуществимая возможность, поэтому способность пробиотических микроорганизмов выживать в ЖКТ оценивалась путем анализа образцов кала. Однако обычные селективные и/или дискриминационные питательные среды с трудом позволяют отличить конкретный штамм пробиотика от других представителей тесно связанных видов, которые содержатся в образце в естественном виде. Разработка молекулярных подходов на основании создания праймеров для конкретного штамма может решить проблему селективности, хотя протоколы ПЦР могут не обладать селективностью, и что самое главное, не позволяет оценить жизнеспособность пробиотических клеток. По этим причинам для достижения адекватной чувствительности и специфичности культуральные методы сочетали с молекулярными подходами (Dommels и соавт., 2009; Poutsika и соавт., 2017). Вместе с тем, оценка *in vivo* способности выживать в процессе транзита по желудочно-кишечному тракту к настоящему времени проведена только в отношении ограниченного количества известных, представленных в продаже пробиотиков (Verna and Lucak, 2010; Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015).

Lactobacillus paracasei CNCM I-1572 (коммерческое название *L. casei* DG1®; *L. paracasei* DG) – это штамм бактерий, представленный в продаже в виде линейки продуктов Энтеролактис®. Энтеролактис – самая продаваемая в настоящее время пищевая добавка в Италии – стране с самым крупным рынком пробиотиков в мире. Показано, что *L. paracasei* DG обладает способностью изменять микробные экосистемы кишечника здоровых взрослых (Ferrario и соавт., 2014), а также влияет на иммунный ответ организма – хозяина (Balzaretти и соавт., 2015; Cremon и соавт., 2017) посредством уникальной полисахаридной капсулы (Balzaretти и соавт., 2017). Также показано, что *L. paracasei* DG обладает терапевтическим потенциалом в отношении нескольких вариантов дисфункций и патологических состояний, например, язвенного колита (D'Inca и соавт., 2011), дивертикулярной болезни (Tursi и соавт., 2013; Turco и соавт., 2017), избыточного бактериального роста в тонкой кишке (Rosania и соавт., 2013), а также синдрома раздраженной кишки (Compare и соавт., 2017; Cremon и соавт., 2017).

В данном исследовании мы представили разработку стратегии, которая совмещает культуральные и молекулярные методы в отношении селективного для данного штамма подсчета жизнеспособных клеток *L. paracasei* DG в образце кала. В результате мы приняли данный протокол, чтобы показать способность *L. paracasei* DG выживать в процессе транзита по желудочно-кишечному тракту при употреблении здоровыми взрослыми в составе пробиотической лекарственной формы, содержащей не менее 1 млрд. бактериальных КОЕ в 10 мл суспензии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

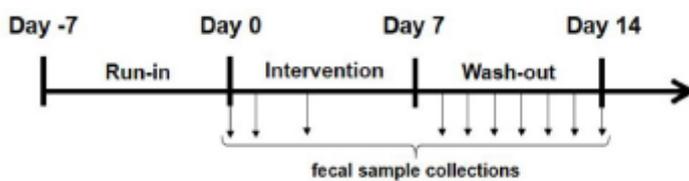
Штаммы бактерий и селективная среда

Lactobacillus paracasei DG (CNCM I-1572) обычно культивировали в анаэробных условиях при температуре 37°C на протяжении 24 ч в бульоне MRS, либо в агаре vk-MRS («Дифко Лабораториз Инк», Детройт, шт. Мичиган, США) с добавлением 1 мкг/мл ванкомицина и 10 мкг/мл канамицина («Сигма-Олдрич», Штайнхайм, Германия). Содержание используемых в

исследовании культивируемых бактерий на флакон определяли путем растворения не менее 5 г лиофилизированной биомассы *L. paracasei* DG в растворителе для максимального выделения микроорганизмов (MRD) («Шарлаб», Милан, Италия). Затем эту первоначальную суспензию клеток гомогенизировали в стерильном пакете «Стомахер» при помощи инструмента Colworth Stomacher 400 («Сьюард», Западный Суссекс, Великобритания) в течение 3 мин. В растворителе MRD готовили последовательные 10-кратные разбавления, а общее содержание микроорганизмов определяли при помощи поверхностного метода на агаре vk-MRS.

Интервенционные методы исследования у человека

Название исследования: исследование выхода *L. casei* DG® (Энтеролакис®) после их употребления в виде питьевых флаконов у здоровых взрослых добровольцев (REVENANT-DG). *Дизайн исследования:* открытое пилотное микробиологическое исследование (рисунок 1).



Подписи:

День -7	День 0	День 7	День 14
Вводный период	Вмешательство	Отмывочный период	
	Взятие образцов кала		

РИСУНОК 1. Дизайн исследования. Вертикальные стрелки указывают на день взятия образца кала (при его наличии) у добровольца.

Количество участников: 20 добровольцев (таблица 1). Популяция исследования: здоровые (без заболеваний) взрослые добровольцы обоих полов, возрастом 18-55 лет, которые предоставили подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии невключения перечислены ниже: (i) использование антибиотиков в течение месяца до начала исследования; (ii) употребление антацидов или прокинетики препаратов в отношении желудочно-кишечного тракта; (iii) хронические воспалительные заболевания кишечника; (iv) заболевания кишечника инфекционной этиологии; (v) эпизоды вирусного или бактериального энтерита в течение 2 месяцев до исследования; (vi) эпизоды язвенной болезни желудка или двенадцатиперстной кишки в последние 5 лет; (vii) беременность или кормление грудью; (viii) данные анамнеза о злоупотреблении алкоголем или заподозренном использовании наркотических препаратов в недавнем прошлом; (ix) любое тяжелое заболевание, которое может повлиять на лечение. Исследуемая лекарственная форма пробиотика: Энтеролакис® («Софар», Трещано-Роза, Италия) в питьевых флаконах, которые представляют собой пластиковые флаконы, содержащие 10 мл 2% раствора фруктозы (наполнители: лимонная кислота в качестве вещества для контроля кислотности, а также бензоат натрия и бензоат калия в качестве консервантов), а также пластиковый/алюминиевый колпачок с кнопкой (технология DryCap); флаконы содержат не менее 1 млрд. КОЕ/флакон лиофилизированной биомассы *L. paracasei* DG. Протокол исследования: во время исходного визита каждый доброволец предоставил подписанное информированное согласие и был обучен всей процедуре. Затем исследование включало фазу, предшествующую

набору (вводный период, 1 неделя), во время которой добровольцы соблюдали свою обычную диету с отказом от молочных продуктов, ферментированных пробиотиком (использование традиционного йогурта в этой фазе разрешалось), а также пищевых продуктов и биодобавок на основе пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков. В конце этого периода добровольцев приглашали для приема внутрь содержимого одного флакона препарата Энтеролактис в день в течение 1 недели. Препарат принимался на голодный желудок утром, не менее чем за 10 минут до завтрака, либо вечером (если участник забыл принять его утром), перед сном, но не менее 2 ч после последнего приема пищи.

ТАБЛИЦА 1. Основные характеристики участников исследования

Участник (n = 20)	Пол (8 Ж/12 М)	Возраст (22-53 года)
S01	М	53
S02	Ж	46
S03	Ж	47
S04	Ж	27
S05	Ж	27
S06	Ж	28
S07	М	25
S08	Ж	23
S09	М	23
S10	Ж	27
S11	М	24
S12	М	28
S13	Ж	31
S14	М	31
S15	М	31
S16	Ж	26
S17	М	26
S18	Ж	26
S19	Ж	42
S20	М	22

После 7 дней приема добровольцы проходили последующее наблюдение в течение 1 недели, которое было идентично периоду, предшествующему набору в исследование. Взятие образцов: в начале исследования добровольцев обучали собирать и доставлять образцы кала следующим образом. Каждый образец кала (не менее 2 г) брали в специальные стерильные контейнеры, хранимые при комнатной температуре, и доставляли в лабораторию в течение 24 ч. Предварительные эксперименты показали, что штамм DG может выживать в кале человека при комнатной температуре и при 37°C не менее 48 ч без значимого снижения числа жизнеспособных клеток (не представлено). Для проверки способности штамма DG выжить в процессе пассажа через ЖКТ собранные образцы кала немедленно подвергали подсчету количества жизнеспособных бактерий. Для получения числа бактерий в кале образцы кала массой 1 г разбавляли в MRD, гомогенизировали в стерильном пакете «Стомахер», размещали на агаре *vk-MRS* и инкубировали в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 48 ч. Во время периода исследования оценивали частоту и консистенцию стула в соответствии с валидированной системой оценка кала (Бристольская шкала стула). Заявление по этике: протокол исследования одобрен научным этическим комитетом Миланского университета (решение № 37/16, 15 декабря 2016 г). У всех участников перед включением в исследование было получено письменное информированное согласие. Соблюдение схемы лечения добровольцами: соблюдение схемы

лечения добровольцами, определяемое в результате словесной оценки, составило почти 100%. Добровольцы предоставили все запланированные образцы кала, за исключением участника S1, у которого добровольно прекратили взятие образцов кала на 12-й день.

Выделение ДНК

После микробного анализа образцы кала хранили при температуре -80°C до момента экстракции ДНК. Образцы, взятые у каждого участника в различные дни ($n = 9$; T0-T8), размораживали во льду и тщательно перемешивали в течение 2-3 мин с использованием стерильной лопатки. Затем 250 мг каждого образца взвешивали и обрабатывали реактивами из набора DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® («Квиаген» (Qiagen), Хильден, Германия) с последующими изменениями. Пробирки, содержащие образцы, инкубировали при температуре 65°C в течение 10 мин после добавления раствора C1. Перед экстракцией ДНК проводили механический лизис клеток с использованием гомогенизатора с шариками Precellys 24 («Бертин Текнолоджиз», Монтиньи-ле-Бретоннэ, Франция). Затем проводили экстракцию в соответствии со спецификациями производителя. ДНК, выделенную из образцов кала, оценивали количественно при помощи набора NanoDrop («БиоТек Инструментс, Инк», шт. Калифорния, США). Наконец, ДНК хранили при температуре -80°C до молекулярного анализа.

Количественное определение *L. paracasei* DG при помощи кПЦР

Протоколы количественной ПЦР (кПЦР) в режиме реального времени адаптировали для количественного определения *L. paracasei* DG в метагеномной ДНК кала путем воздействия на ген гликозилтрансферазы *welF* при помощи праймеров *rtWELFf* (5'-ТАСТАААГАААТТАГСТТТТГТ-3') и *rtWELFr* (5'-АГТААТГТСТГСАТСТССА-3') (Ferrario и соавт., 2014). Финальный объем смеси составил 15 мкл; он содержал 7,5 мкл реактива EvaGreen® Supermix («Био-Рад Лабораториз», Сеграте, Италия) и 0,5 мкМ каждого праймера; в каждой реакции использовали 50 нг образца матрицы ДНК. Амплификацию выполняли с использованием представленной ниже температурной программы: сначала смесь выдерживали при температуре 95°C в течение 3 мин с последующим выполнением 39 циклов при температуре 95°C в течение 30 сек, при 58°C в течение 30 сек и при 72°C в течение 30 сек. Стандартную кривую калибровки для абсолютного количественного определения общего числа клеток *L. casei* DG1® готовили путем смешивания различных образцов кала (различной консистенции), собранных до употребления пробиотиков. К 250 мг образцов кала добавляли различное количество клеток *L. casei* DG1® ($n = 10$; $1-1 \times 10^9$); один образец кала использовали в качестве контроля (без добавления бактериальных клеток). Все образцы подвергали процессу выделения ДНК в соответствии с описанными выше принципами. Стандартную кривую получали путем построения графика средних значений C_q относительно \log_{10} числа добавленных клеток к каждому образцу кала. Кривые размораживания анализировали при помощи программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1 для подтверждения специфичности продуктов амплификации.

Методика ПЦР колоний для идентификации колоний *L. paracasei* DG

Для подтверждения подлинности колоний DG мы проводили ПЦР колонии в конечной точке с использованием случайно отобранных колоний с клейким, нитевидным фенотипом. В качестве отрицательного контроля всегда включали колонии с различными фенотипами. ПЦР выполняли в реакционной смеси объемом 25 мкл; каждая содержала одну колонию (собранную при помощи стерильной деревянной палочки) с добавлением 2,5 мкл 10х рабочего буферного раствора, 200 мкмоль/л dNTP, 0,5 ммоль/л MgCl_2 , 0,5 мкмоль/л каждого праймера (*rtWELFf* и *rtWELFr*), 0,5 Ед полимеразы ДНК DreamTaq™ («Термо Фишер Сайнтифик Инк», Монца, Италия).

Амплификацию проводили с использованием оборудования Mastercycler 96 («Эппендорф», Милан, Италия). Смеси ПЦР подвергали воздействию следующих температурных циклических условий: сначала выдерживали при 95°C в течение 3 мин, затем 39 циклов при температуре 95°C в течение 30 сек, при 58°C в течение 30 сек, а также при 72°C в течение 30 сек. Продукты амплификации отделяли при помощи электрофореза в 2% геле агарозы (массо-объемные проценты) (с добавлением 0,2 мкг/мл этидия бромид) в 1x буфере TAE (40 ммоль/л Трис-ацетата, 1 ммоль/л EDTA, pH = 8,0), после чего фотографировали. В качестве маркера размера использовали смесь 1-kb GeneRuler DNA Ladder.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка метода подсчета живых клеток *L. paracasei* DG

При разработке условий посева для селективного и дифференциального роста *L. paracasei* DG мы использовали протокол культивации, предложенный Итальянским высшим институтом здоровья (ISS) для подсчета гетероферментативных лактобактерий в пробиотических препаратах (ISSN 1123-3117 ISTISAN 08/36; доступно по адресу: http://www.iss.it/binary/publ/cont/08-36_web.1229959899.pdf, доступ осуществлен 10 февраля 2018 г). В протоколе ISSN предлагалось использование 1 мкг/мл ванкомицина для селективного подсчета гетероферментативных лактобактерий; однако во время предварительного эксперимента использование такой среды привело к росту множества колоний, не относящихся к DG, что замедляло идентификацию и подсчет исследуемого штамма пробиотика.

ТАБЛИЦА 2. Минимальные ингибирующие концентрации (MIC) *Lactobacillus paracasei* DG и эталонного штамма EFSA *L. paracasei* LMG 12586 по данным исследования микроразведения.

Молекула антибиотика	ISO10932 (мкг/мл)*	MIC (мкг/мл) LMG 12586	MIC (мкг/мл) <i>L. paracasei</i> DG
Ампициллин	0,5-2	1	1
Ванкомицин	Не требовалось	>16	>16
Гентамицин	1-4	4	4
Канамицин	16-64	32	256
Стрептомицин	8-32	16	32
Эритромицин	0,062-0,25	0,125	0,125
Клиндамицин	0,062-0,25	0,125	0,125
Тетрациклин	1-4	2	8
Хлорамфеникол	4-8	4	4

Результаты сравнивали с пограничными значениями, определенными EFSA (*) для разделения резистентных штаммов от чувствительных штаммов при помощи таксономной группы *Lactobacillus casei/paracasei* (Европейское управление безопасности пищевых продуктов [EFSA], 2012).

По этой причине на основании профиля резистентности к антибиотикам *L. paracasei* DG (таблица 2) мы также добавляли к среде 10 мкг/мл канамицина (среда vk-MRS), что приводило к явному снижению числа фоновых колоний без влияния на рост штамма DG в сравнении с ростом данного штамма на обычной среде MRS или на среде MRS с добавлением только ванкомицина. Использование более высоких концентраций антибиотиков приводило к снижению числа жизнеспособных клеток штамма DG. Кроме того, мы отмечали, что колонии DG на агаре vk-MRS характеризовались особым клейким, нитевидным фенотипом, что позволяло отличить этот штамм от колоний близко родственных лактобактерий, которые типично имеют кремообразную консистенцию (Рисунок 2 и дополнительный файл S1).

Наконец, чтобы четко подтвердить принадлежность колоний, выделенных на чашках агара vk-MRS, к штамму DG мы провели анализ данных ПЦР колонии в конечной точке с использованием специфичных для штамма праймеров в случайно выбранных колониях. Результаты подтвердили, что к *L. paracasei* DG принадлежат только колонии с клейким, нитевидным фенотипом. Этот метод позволил нам четко отличить колонии DG от других микроорганизмов кала, а также провести селективный подсчет исследуемых колоний штамма пробиотика.

Число жизнеспособных клеток *L. paracasei* DG в образцах кала здоровых взрослых

Для оценки числа жизнеспособных клеток *L. paracasei* DG в образцах кала 20 взрослых добровольцев на протяжении 1 недели использования пробиотиков и 1 недели последующего наблюдения мы использовали протокол на основе среды vk-MRS в сочетании со специфичной для штамма ПЦР выделенных колоний. Соблюдение режима лечения участниками было очень хорошим; все 20 участников завершили исследование. Кроме того, на протяжении всей продолжительности лечения пробиотиками нежелательные явления не регистрировались. На основании результатов специфичной для штамма ПЦР (дополнительный рисунок S1) сделан вывод, что 100% анализируемых колоний с клейким, нитевидным фенотипом принадлежали к *L. paracasei* DG, что подтверждает пригодность среды vk-MRS для селективного подсчета этого штамма. Примечательно, что, хотя мы обнаружили широкую межиндивидуальную вариабельность, мы выделили *L. paracasei* DG не менее чем из одного образца кала от всех 20 добровольцев. Это показало, что данная пробиотическая бактерия может выжить в процессе транзита по желудочно-кишечному тракту после приема внутрь в виде препарата Энтеролактис в составе питьевых флаконов. В целом, мы обнаружили, что наибольшая концентрация жизнеспособных штаммов *L. paracasei* DG в образцах кала была получена в период от 4 до 8 дней после начала приема препарата Энтеролактис. Наибольшая концентрация DG, выделенная от одного участника, варьировала от 3,6 до 6,7 log₁₀ КОЕ / грамм кала (среднее: 6,1 log₁₀ КОЕ/г). В частности, мы отмечали выраженную межиндивидуальную вариабельность с точки зрения кинетики сохранения бактерий. В действительности, хотя у некоторых участников (например, S1) клетки DG были получены в ходе первой дефекации после приема пробиотического препарата, у других участников (например, S2 и S9), жизнеспособные клетки DG выделялись только после завершения недельного периода приема пробиотиков (рисунок 3). В целом, однако, жизнеспособные клетки DG выделяли из кала добровольцев на протяжении 5 дней после прекращения приема препарата Энтеролактис (рисунок 3).

Общее количество *L. paracasei* DG в образцах кала здоровых взрослых

Образцы кала, собранные во время 2-недельного исследования, также использовались для количественного определения общего количества клеток *L. paracasei* DG при помощи кПЦР с использованием специфичных для штамма праймеров. Как и ожидалось, общее количество клеток DG, определяемое методом кПЦР, по большей части было выше, чем число жизнеспособных клеток DG (рисунок 3). Таким образом, наибольшая концентрация клеток DG, выделенных у каждого участника при расчете по методу кПЦР, варьировала от 5,4 до 7.6 log₁₀ клеток на грамм кала (среднее значение – 7,1 log₁₀ клеток/г). Однако у некоторых участников отмечалось очень сходное общее число клеток и число жизнеспособных клеток (например, S1, S15, S17 и S20), тогда как у других участников общее число клеток значительно превышало число жизнеспособных клеток с точки зрения концентрации клеток и их устойчивости (например, участники S2, S5 и S19; рисунок 3). В целом, хотя выход культивируемых клеток DG был возможен на протяжении до 5 дней после периода приема препарата, обнаружение клеток DG по методу кПЦР было возможным в среднем в течение до 7 дней.

Характер дефекации и выход DG

Бристольская шкала стула не выявила каких-либо значимых изменений характера дефекации, а отклонения со стороны ЖКТ добровольцами в ходе исследования не сообщались. И хотя время транзита по кишке и характер дефекации могут обоснованно определить различия у отдельных добровольцев, данные в отношении типа кала и количества дефекаций в день не коррелировали с результатами выхода жизнеспособных клеток или общего выхода клеток DG (дополнительный рисунок S2).



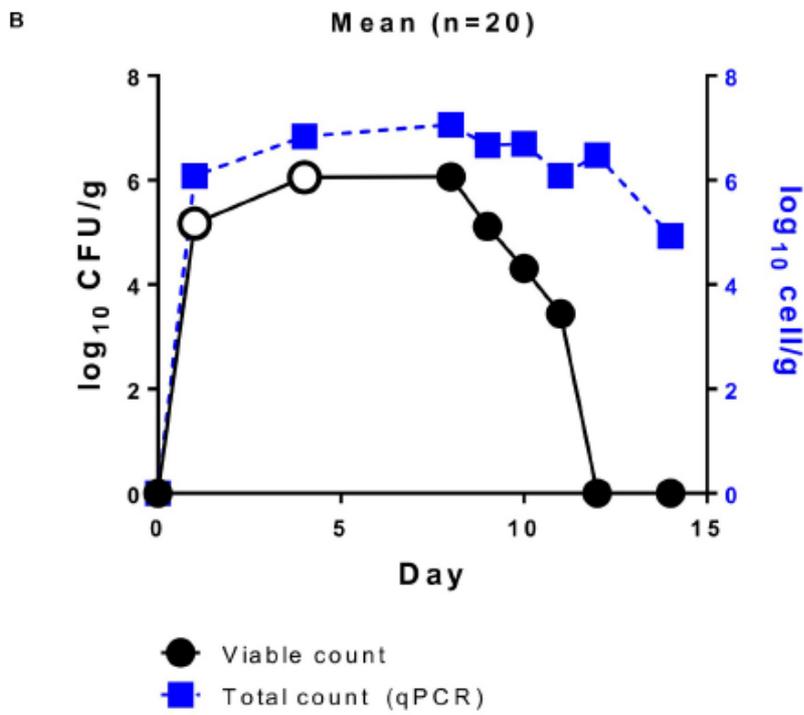
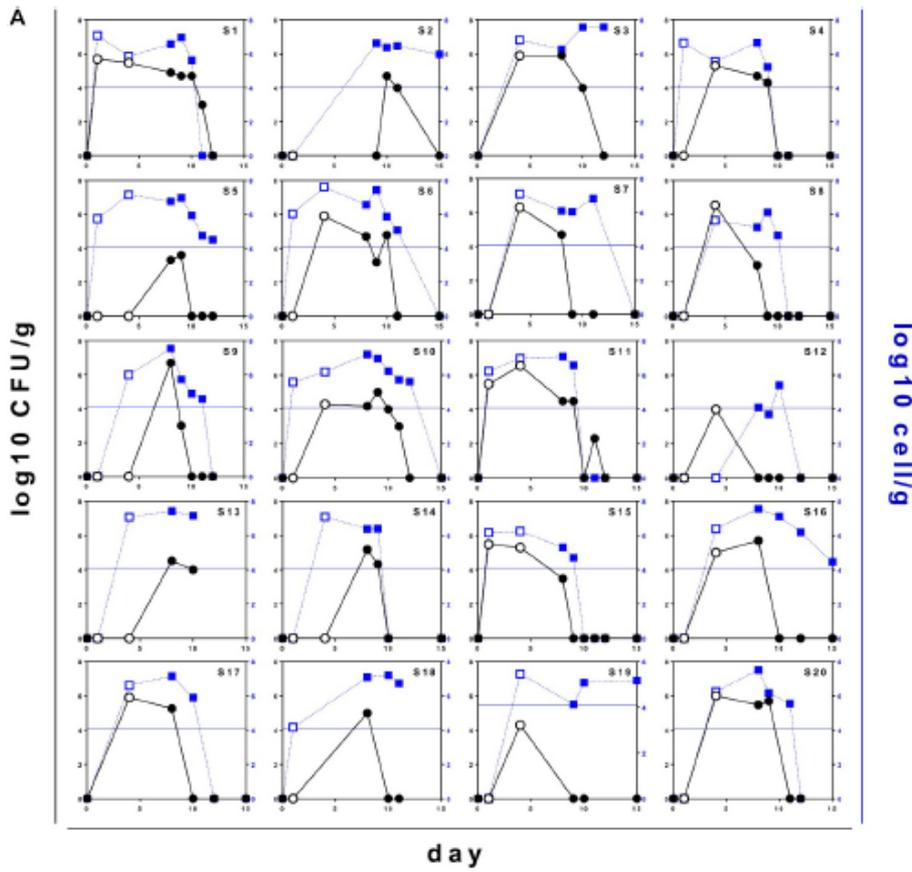
Рисунок 2. Клейкая, нитевидная структура колоний *Lactobacillus paracasei* DG, выращенных на чашках с агаром vk-MRS.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выживаемость клеток после транзита по желудочно-кишечному тракту указывали в качестве одного из критериев, на основании которого микроорганизм мог расцениваться в качестве пробиотика (Borchers и соавт., 2009; Verna и Lucak, 2010). Исследования жизнеспособности пробиотиков у человека после приема внутрь в первую очередь основывались на количественном определении в кале; данные исследования также называли в качестве исследований «устойчивости» или «выхода». Оценка выхода жизнеспособных клеток пробиотика с калом является сложной технической задачей, поскольку кал представлен очень сложным микробным составом, включающим тысячи различных видов микроорганизмов. Кроме того, пробиотики преимущественно принадлежат к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, которые в естественных условиях населяют кишку человека и могут выделяться совместно с представляющими интерес штаммами пробиотика. Согласно сообщениям, для решения данной проблемы и облегчения селективной идентификации колоний, принадлежащих к специфическим исследуемым штаммам, использовали антибиотики, а также морфологию колоний (Larsen и соавт., 2006; Mai и соавт., 2017; Poutsiaка и соавт., 2017). Кроме того, самые надежные результаты были получены при

сочетании молекулярных подходов с обычным выделением на чашках с агаром. Например, Tuohy и соавт. (2007) подсчитывали количество клеток *L. paracasei* штамма *Shirota* с использованием агара лактитол-LBS-ванкомицин в сочетании с гель-электрофорезом в пульсирующем поле для подтверждения подлинности колоний. В другом исследовании штамм *Shirota* количественно и селективно определяли в кале при помощи чашек с агаром для селекции лактобактерий с лактитолом и ванкомицином; для подтверждения подлинности колоний использовали метод ELISA (Wang и соавт., 2015). Кроме того, для выявления роста колоний, напоминающих *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis BB-12*, на агаре MRS с добавлением цистеин-HCl и тетрациклина использовали флуоресцентную гибридизацию клеток (Larsen и соавт., 2006). Также для подтверждения подлинности штамма использовался молекулярный метод «отпечатков пальцев» (rep-PCR, RAPD-PCR или AP-PCR) в отношении колоний, выделенных из кала (Songisepp и соавт., 2005; Prilasnig и соавт., 2007; Verdenelli и соавт., 2009; Pino и соавт., 2017).

В настоящей работе мы создали эффективный и надежный протокол для селективного подсчета жизнеспособных клеток *L. paracasei* DG в кале человека с использованием экзополисахаридной (EPS) капсулы данной бактерии (DG EPS) (Balzaretти и соавт., 2017). В соответствии с анализом полного генома (хромосом и плазмид) *L. paracasei* DG не содержит гены резистентности к любому антибиотику (Balzaretти и соавт., 2015). Таким образом, умеренное увеличение резистентности клеток штамма DG в отношении некоторых антибиотиков может обоснованно объясняться наличием EPS капсулы, которая способна частично нарушить проникновение антибиотика в клетку.



A.

По оси X: день

По оси Y слева: log10 КОЕ/г

По оси Y справа: log10 клеток/г

В.

Подпись сверху: среднее (n=20)

По оси Y слева: log10 КОЕ/г

По оси Y справа: log10 клеток/г

Надписи на рисунке снизу:

- Количество жизнеспособных клеток
- Общее количество клеток (кПЦР)

РИСУНОК 3. Количество жизнеспособных клеток (черные линии и круги) и общее количество клеток (синие линии и квадраты) *Lactobacillus paracasei* DG в образцах кала здоровых взрослых добровольцев после приема внутрь препарата Энтеролактис в питьевых флаконах один раз в день. (А) Данные по участникам; (В) Средние данные (n = 20). Незаштрихованные символы обозначают образцы кала, полученные в течение недели применения пробиотика.

Кроме того, сообщалось, что у многих штаммах лактобактерий отмечается высокая естественная резистентность к аминогликозидам (например, гентамицину и канамицину). Мы использовали отмеченную умеренную резистентность штамма DG к определенным антибиотикам, что является природной характеристикой и не связано с горизонтально передаваемыми генетическими элементами, путем добавления антибиотиков ванкомицина и канамицина к среде, разработанной в данном исследовании для подсчета штамма DG. Кроме того, EPS DG обуславливает клейкую, нитевидную структуру колоний, что позволяет легко отличить клетки DG от других лактобактерий. Наконец, генетический регион, кодирующий DG EPS, имеет уникальную последовательность ДНК (Balzaretти и соавт., 2017), что позволяет создать специфичные для штамма праймеры (Balzaretти и соавт., 2015). Все обнаруженные на чашках колонии с клейким, нитевидным фенотипом по данным ПЦР колоний с использованием специфичных для штамма праймеров были определены как относящиеся к штамму DG. Это показало, что разработанный протокол пригоден для селективного подсчета штаммов DG.

Очевидно, что в литературе приводятся противоречивые данные в отношении способности пробиотических микроорганизмов выживать в процессе транзита по желудочно-кишечному тракту. В действительности, предыдущие исследования показали, что выход живых клеток пробиотических микроорганизмов после транзита по желудочно-кишечному тракту у человека является слабым (Hamilton-Miller и соавт., 1999; Temmerman и соавт., 2003). В последующем исследовании при анализе 6 различных имеющихся в продаже продуктов только *Escherichia coli* Nissle 1917 и *Enterococcus faecium* SF 68 последовательно обнаруживались в кале человека, тогда как принятые внутрь бифидобактерии и лактобактерии (включая штамм *L. paracasei*) не обнаруживались в стуле (Prilassnig и соавт., 2007). Вместе с тем, большее число исследований сообщали об успешном выходе различных пробиотиков с калом человека после их приема внутрь (Verdenelli и соавт., 2009; Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015). В целом, результаты оказались

неубедительными, в первую очередь по той причине, что выход пробиотиков с калом человека зависит от нескольких базовых факторов: (i) дозы принятых внутрь живых микробных клеток; (ii) внутренней способности микроорганизмов противостоять химическим и физическим стрессовым воздействиям в желудке и в кишке (например, кислая среда и желчные кислоты); а также (iii) состава продукта с точки зрения его вспомогательных веществ и/или лекарственных субстанций. Таким образом, к примеру, *Lactobacillus fermentum* ME-3 обнаружили в кале всех добровольцев ($n = 16$), которые получали пробиотик в виде ферментированного козьего молока, однако они не обнаруживались у добровольцев после приема пробиотических клеток в составе желатиновых капсул ($n = 12$) (Songisepp и соавт., 2005). Результаты другого исследования показали, что по сравнению с капсулами и йогуртом употребление сыра негативно влияют на содержание в кале человека *Propionibacterium freudenreichii* подвид *shermanii* JS и *B. animalis* подвид *lactis* BB12, тогда как влияния матрикса на *Lactobacillus rhamnosus* GG и LC705 не отмечалось (Saxelin и соавт., 2010). Таким образом, выход с калом должен изучаться для конкретных штаммов пробиотиков в конкретных лекарственных формах продукта. Тем не менее надежные исследования проводились только для нескольких хорошо известных и представленных в продаже пробиотиков, например, *L. paracasei* Shirota, *L. rhamnosus* GG и *B. animalis* подвид *lactis* BB12. К примеру, Wang и соавт. Выделили жизнеспособные клетки штамма *Shirota* из кала всех добровольцев ($n = 25$) после 7 и 14 дней употребления напитка пробиотика на основе молока (соответствует ежедневному приему около 10 млрд. КОЕ). Вместе с тем, через 7 дней после прекращения применения препарата штамм *Shirota* обнаруживался в кале только 3 участников из 25 (Wang и соавт., 2015). В другом исследовании штамм *Shirota* выделяли из кала 9 здоровых взрослых добровольцев через 7, 14 и 21 день ежедневного употребления ферментированного молочного напитка, что соответствовало общему приему около 50 млрд. КОЕ в день. Через 7 дней после прекращения употребления ферментированного молока штамм *Shirota* продолжал выделяться с калом 6 участников, хотя и в гораздо более низкой концентрации (Tuohy и соавт., 2007). Более длительное сохранение пробиотика в подгруппе добровольцев по данным исследования Tuohy и соавт. (2007) в сравнении с исследованием REVENANT-DG могло объясняться более длительным лечением (3 недели) и гораздо более высоким общим суточным потреблением клеток пробиотика (50 млрд.) в исследовании Tuohy с соавт. (2007).

Недавно хорошо известные штаммы пробиотиков *B. animalis* подвид *lactis* BB12 и *L. rhamnosus* GG были успешно выделены в живом виде в стуле 16 из 19 здоровых добровольцев, каждый из которых принимал оба штамма в количестве 1 млрд. КОЕ в день на протяжении 3 недель в виде порошка в саше. Вместе с тем, количественный эксперимент на основе методики посева не позволил выделить штамм BB12 или GG через 28 дней после завершения периода употребления данной добавки (Poutsiaika и соавт., 2017). В частности, клетки *L. rhamnosus* GG и *B. animalis* подвид *lactis* BB-12 были выделены в кале здоровых участников и пациентов после их употребления внутрь в составе различных лекарственных форм, включая различные фармацевтические формы и пищевые продукты (Larsen и соавт., 2006; Ahlroos and Tynkkynen, 2009; Dommels и соавт., 2009; Saxelin и соавт., 2010; Granata и соавт., 2013). Вместе с тем, для большинства представленных в продаже пробиотиков эта информация не доступна.

В нашем исследовании мы изучали выход живых клеток *L. paracasei* DG из ЖКТ здоровых участников после приема внутрь препарата Энтеролактис – пробиотической добавки, содержащей не менее 1 млрд. КОЕ бактериальных клеток в дозе и растворенной в 10 мл раствора фруктозы в питьевых флаконах. Вмешательство продолжалось только 1 неделю и основывалось на приеме одной дозы (1 млрд. КОЕ) клеток пробиотика в день. Вместе с тем, вмешательство было достаточно эффективным, чтобы привести к выходу жизнеспособных клеток *L. paracasei* DG от

20 добровольцев, набранных в исследование. Это четко показало, что Энтеролактис в питьевых флаконах, содержащий не менее 1 млрд. КОЕ, пригоден для успешной доставки пробиотических клеток в кишку человека.

Указанные выше исследования показали, что колонизация кишечника человека принятыми внутрь пробиотическими микроорганизмами носит транзитный характер. После прекращения приема пробиотик быстро достигает предела выявления посредством кинетических механизмов, которые могут зависеть от дозы принятых клеток микроорганизмов. В частности, результаты нашего исследования в отношении *L. paracasei* DG согласуются с литературой с точки зрения *L. paracasei* штамма *Shirota*. Показано, что персистенция данного штамма в кишке здоровых взрослых прекращалась в течение недели после прекращения приема пробиотика (Tuohy и соавт., 2007; Wang и соавт., 2015).

В данном исследовании мы предлагали добровольцам применять пробиотик на голодный желудок, не менее чем за 15 мин до завтрака. В настоящее время в научной литературе отсутствует убедительная информация о том, следует ли принимать пробиотики с пищей или на голодный желудок. Однако этот фактор может влиять на выживаемость микроорганизмов в желудке и кишке после их приема внутрь, что требует проведения будущих исследований по данной теме.

Итак, в настоящем отчете мы представили результаты подробного исследования выхода пробиотического штамма *L. paracasei* DG. Эксперименты по подсчету жизнеспособных клеток, проводимые при сочетании связанных с культурой ситуационных селективных/дискриминационных условий, а также специфичных для штамма молекулярных биологических протоколов, четко показали, что клетки *L. paracasei* DG могут выживать в результате транзита по ЖКТ здоровых взрослых после приема внутрь в составе препарата Энтеролактис из питьевых флаконов. Данная лекарственная форма включает 10 мл питьевой суспензии, содержащей не менее 1 млрд. КОЕ. Исследования выхода, направленные на оценку жизнеспособности микроорганизмов после транзита по желудочно-кишечному тракту, должны быть обязательным этапом в процессе изучения любого пробиотического препарата. Наше исследование показало возможность проведения надежной проверки выживаемости микроорганизмов в кале с соблюдением строгой специфичности в отношении штамма микроорганизма. Это достигнуто в результате разработки протоколов подсчета жизнеспособных клеток на основании специфических генетических и фенотипических характеристик представляющих интерес пробиотических микроорганизмов.

ВКЛАД АВТОРОВ

SG и WF предложили и спланировали интервенционное исследование. SG и SA разработали протокол для выделения специфичного штамма бактерий *L. paracasei* DG. SA, VT и RK провели эксперименты. SG руководил написанием рукописи. Все авторы обсудили результаты и обеспечили вклад в создание заключительной рукописи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим компанию «Софар С.п.А» за предоставление финансовой поддержки в данном исследовании.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Дополнительный материал для данной статьи может быть найден он-лайн по адресу: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01720/full#supplementary-material>

ССЫЛКИ НА ЛИТЕРАТУРЕ

- Ahluos, T., and Tynkkynen, S. (2009). Quantitative strain-specific detection of *Lactobacillus rhamnosus* GG in human faecal samples by real-time PCR. *J. Appl Microbiol.* 106, 506-514. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04018.x
- Balzaretti, S., Taverniti, V., Guglielmetti, S., Fiore, W., Minuzzo, M., Ngo, H. N., et al. (2017). A novel rhamnose-rich hetero-exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus paracasei* DG activates THP-1 human monocytic cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e02702-16. doi: 10.1128/AEM.02702-16
- Balzaretti, S., Taverniti, V., Rondini, G., Marcollegio, G., Minuzzo, M., Remagni, M. C., et al. (2015). The vaginal isolate *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) is suitable for oral administration. *Front. Microbiol.* 6:952. doi: 10.3389/fmicb.2015.00952
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *J. Gastroenterol.* 44, 26-46. doi: 10.1007/s00535-008-2296-0
- Compare, D., Rocco, A., Coccoli, P., Angrisani, D., Sgamato, C., Iovine, B., et al. (2017). *Lactobacillus casei* DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: an ex-vivo organ culture model of post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* 17:53. doi: 10.1186/s12876-017-0605-x
- Cremon, C., Guglielmetti, S., Gargari, G., Taverniti, V., Castellazzi, A. M., Valsecchi, C., et al. (2017). Effect of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 on symptoms, gut microbiota, short chain fatty acids, and immune activation in patients with irritable bowel syndrome: a pilot randomized clinical trial. *UnitedEur. Gastroenterol. J.* 6, 604-613. doi: 10.1177/2050640617736478
- da Cruz, A. G., Faria, J. D. A. F., and Van Dender, A. G. F. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res. Int.* 40, 951-956. doi: 10.1016/j.foodres.2007.05.003
- Derrien, M., and van Hylekama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 23, 354-366. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.002
- D'Inca, R., Barollo, M., Scarpa, M., Grillo, A. R., Brun, P., Vettorato, M. G., et al. (2011). Rectal administration of *Lactobacillus casei* DG modifies flora composition and toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 56, 1178-1187. doi: 10.1007/s10620-010-1384-1
- Dommels, Y. E., Kemperman, R. A., Zebregs, Y. E., Draaisma, R. B., Jol, A., Wolvers, D. A., et al. (2009). Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6198-6204. doi: 10.1128/AEM.01054-09
- European Food Safety Authority [EFSA] (2012). Outcome of the public consultation on the draft guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Support. Publ.* 9: EN-316.
- FAO/WHO (2001). *Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Cordoba: Argentina.
- Ferrario, C., Taverniti, V., Milani, C., Fiore, W., Laureati, M., De Noni, I., et al. (2014). Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J. Nutr.* 144, 1787-1796. doi: 10.3945/jn.114.197723
- Goderska, K. (2012). "Different Methods of Probiotics Stabilization," in *Probiotics*, ed. P. E. Rigobelo (Rijeka: InTech).
- Granata, M., Brandi, G., Borsari, A., Gasbarri, R., and Gioia, D. D. (2013). Synbiotic yogurt consumption by healthy adults and the elderly: the fate of bifidobacteria and LGG probiotic strain. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, 162-168. doi: 10.3109/09637486.2012.718742

- Hamilton-Miller, J. M., Shah, S., and Winkler, J. T. (1999). Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutr.* 2, 223-229. doi: 10.1017/S1368980099000282
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506-514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
- Lahtinen, S. J. (2012). Probiotic viability - does it matter? *Microb. Ecol Health Dis.* doi: 10.3402/mehd.v23i0.18567
- Larsen, C. N., Nielsen, S., Kaestel, P., Brockmann, E., Bennedsen, M., Christensen, H. R., et al. (2006). Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL- 341 in healthy young adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60, 1284-1293. doi: 10.1038/sj. ejcn.1602450
- Mai, V., Waugh, S., Byrd, D., Simpson, D., and Ukhanova, M. (2017). Novel encapsulation improves recovery of probiotic strains in fecal samples of human volunteers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 1419-1425. doi: 10.1007/s00253- 016-7915-8
- Pino, A., Van Hoorde, K., Pitino, I., Russo, N., Carpino, S., Caggia, C., et al. (2017). Survival of potential probiotic Lactobacilli used as adjunct cultures on pecorino siciliano cheese ripening and passage through the gastrointestinal tract of healthy volunteers. *Int. J. Food Microbiol.* 252, 42-52. doi: 10.1016/j. ijfoodmicro.2017.04.012
- Poutsiaka, D. D., Mahoney, I. J., Mcdermott, L. A., Stern, L. L., Thorpe, C. M., Kane, A. V., et al. (2017). Selective method for identification and quantification of *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12 (BB-12) from the gastrointestinal tract of healthy volunteers ingesting a combination probiotic of BB-12 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Appl Microbiol.* 122, 1321-1332. doi: 10.1111/jam.13436
- Prilassnig, M., Wenisch, C., Daxboeck, F., and Feierl, G. (2007). Are probiotics detectable in human feces after oral uptake by healthy volunteers? *Wien. Klin. Wochenschr.* 119, 456-462. doi: 10.1007/s00508-007-0808-1
- Rosania, R., Giorgio, F., Principi, M., Amoroso, A., Monno, R., Di Leo, A., et al. (2013). Effect of probiotic or prebiotic supplementation on antibiotic therapy in the small intestinal bacterial overgrowth: a comparative evaluation. *Curr. Clin. Pharmacol.* 8, 169-172. doi: 10.2174/15748847113089990048
- Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., and Cresci, A. (2010). Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients* 2, 330-339. doi: 10.3390/ nu2030330
- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., et al. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 293-300. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.009
- Songisepp, E., Kals, J., Kullisaar, T., Mandar, R., Hutt, P., Zilmer, M., et al. (2005). Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutr. J.* 4:22. doi: 10.1186/14752891-4-22
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., and Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1-10. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00162-9
- Tuohy, K. M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A. L., and Gibson, G. R. (2007). Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1026-1032.

Turco, F., Andreozzi, P., Palumbo, I., Zito, F. P., Cargioli, M., Fiore, W., et al. (2017). Bacterial stimuli activate nitric oxide colonic mucosal production in diverticular disease. Protective effects of *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572). *United Eur. Gastroenterol. J.* 5, 715-724. doi: 10.1177/2050640616684398

Tursi, A., Brandimarte, G., Elisei, W., Picchio, M., Forti, G., Pianese, G., et al. (2013). Randomised clinical trial: mesalazine and/or probiotics in maintaining remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease—a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 38, 741-751. doi: 10.1111/apt.12463

Verdenelli, M. C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., and Cresci, A. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur. J. Nutr.* 48, 355-363. doi: 10.1007/s00394-009-0021-2

Verna, E. C., and Lucak, S. (2010). Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap. Adv. Gastroenterol.* 3, 307-319. doi: 10.1177/1756283X10373814

Wang, R., Chen, S., Jin, J., Ren, F., Li, Y., Qiao, Z., et al. (2015). Survival of *Lactobacillus casei* strain *Shirota* in the intestines of healthy Chinese adults. *Microbiol. Immunol.* 59, 268-276. doi: 10.1111/1348-0421.12249

Заявление о конфликтах интересов: автор WF – сотрудник компании «Софар С.п.А», которая обеспечивала финансовую поддержку исследования. Используемый в исследовании пробиотический препарат продает компанией, которая обеспечивала финансирование исследования.

Остальные авторы заявили, что исследование проводилось при отсутствии каких-либо коммерческих или финансовых взаимосвязей, которые могут расцениваться в качестве потенциального конфликта интересов.

Охраняется авторским правом © 2018 года. Arioli, Koirala, Taverniti, Fiore и Guglielmetti. Эта статья с открытым доступом распространяется в соответствии с требованиями лицензии Creative Commons («с указанием авторства»). Использование, распространение или воспроизведение статьи в других формах разрешается при условии упоминания оригинального(ых) автора(ов) и владельца(ев) авторских прав и цитирования оригинальной публикации данного журнала в соответствии с принятой академической практикой. Использование, распространение или воспроизведение, не соответствующее данным условиям, не разрешается.