

**Bảng 4 - Thành phần môi trường thạch nấm men
Dicloran Glycerol 18 % (DG - 18)**

Thành phần	Khối lượng
Pepton	5,0 g
D-glucose	10,0 g
Kali dihydrophosphat	1,0 g
Magnesi sulfat	0,5 g
Dung dịch Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilin) 0,2 % trong ethanol	1,0 ml
Thạch	15,0 g
Cloramphenicol	0,1 g
Nước	800 ml

Hòa các thành phần trên trong 800 ml nước trong bình nón hoặc cốc có dung tích phù hợp. Đun đến sôi, vừa đun vừa khuấy trên bếp nóng cho đến khi môi trường tan hoàn toàn. Thêm nước vào môi trường đến thể tích 1000 ml. Thêm 220 g glycerol (TT), sau đó tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. Môi trường sau tiệt khuẩn có pH 5,6. Môi trường được giữ ổn nhiệt ở khoảng 45 °C trước khi sử dụng. Môi trường sau khi tiệt khuẩn nếu không sử dụng ngay có thể để nguội môi trường và bảo quản ở 2 °C đến 8 °C.

Chuyển 25 g mẫu probiotic vào túi dập mẫu (stomacher) vô khuẩn. Thêm 225 ml dung dịch pepton vô khuẩn vào túi và trộn đều với tốc độ khoảng 150 rpm đến 200 rpm trong 2 min, thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} . Có thể xử lý mẫu probiotic bằng quy trình khác với hướng dẫn trên nếu được chứng minh là phù hợp.

Chuyển 1,0 ml hỗn dịch mẫu trên vào ống nghiệm vô khuẩn chứa 9 ml dung dịch pepton, trộn kỹ bằng máy lắc xoay thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-2} . Tiến hành trộn môi trường với hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} và 10^{-2} , thử nghiệm trong 10 min đến 20 min sau bước chuẩn bị hỗn dịch mẫu.

Tiến hành: Với mỗi nồng độ pha loãng, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu vào 3 đĩa petri vô khuẩn kích thước 15 mm × 100 mm, được ghi nhãn thích hợp, sau đó đổ khoảng 20 ml đến 25 ml môi trường thạch nấm men đã tan chảy và giữ ổn nhiệt ở khoảng 45 °C vào mỗi đĩa. Đậy nắp đĩa petri, sau đó xoay nhẹ các đĩa để trộn đều hỗn dịch mẫu vào môi trường thạch. Chuẩn bị một đĩa mẫu trắng chỉ chứa môi trường thạch nấm men và đĩa mẫu trắng thứ hai chứa 1,0 ml dung dịch pepton trộn với môi trường thạch nấm men.

Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông, lật ngược đĩa và ủ các đĩa (trong tối) ở 25 °C trong 5 ngày. Đếm số lượng các khuẩn lạc nấm mọc trên đĩa. Nếu sau 5 ngày chưa xuất hiện khuẩn lạc, ủ tiếp các đĩa thêm 48 h và đếm số lượng khuẩn lạc. Trên môi trường thạch nấm men, khuẩn lạc nấm hình đĩa mọc riêng lẻ. Nếu số lượng khuẩn lạc lớn hơn 150 CFU, tiến hành thử nghiệm ở độ pha loãng

cao hơn để thu được số đếm chính xác. Cả hai đĩa trắng không được có bất kỳ khuẩn lạc nào. Tính giá trị trung bình số lượng khuẩn lạc của các đĩa có cùng nồng độ pha loãng, sau đó tính số khuẩn lạc theo đơn vị CFU/g.

Nếu tất cả các đĩa ở cả hai độ pha loãng không có khuẩn lạc, báo cáo số lượng là < 10 CFU/g.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Tổng số nấm men không được quá 100 CFU/g.

Coliform

Không được quá 10 CFU/g (Phụ lục 1.26).

Vi sinh vật gây bệnh

Escherichia coli: Không được có trong 25 g (Phụ lục 13.6).

Salmonella sp.: Không được có trong 25 g (Phụ lục 13.6).

Staphylococcus aureus: Không được có trong 50 g (Phụ lục 13.6).

Bảo quản

Bảo quản trong đồ đựng kín, tránh ánh sáng và độ ẩm cao, để nơi khô ráo, thoáng mát.

Ghi nhãn

Phải ghi đầy đủ tên chi, loài và chủng kèm theo số lượng vi khuẩn theo đơn vị CFU/viên.

Ghi chú

¹ Applied Biosystems PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent của Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com) hoặc tương đương.

² New England Biolabs Phusion® High-Fidelity PCR master mix với đệm GC của hãng New England Biolabs (http://www.neb.com) hoặc tương đương.

BIFIDOBACTERIUM LONGUM SUBSP. INFANTIS *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Định nghĩa

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* là vi khuẩn kỵ khí, Gram dương, không sinh bào tử, sinh acid lactic, lên men dị hình hexose tùy ý. Chúng có hình dạng khác nhau như trực khuẩn hình que, đầu tròn, ngắn; trực khuẩn hình chùy; trực khuẩn hình que chia nhánh hình chữ Y. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau quá trình lên men trước khi tiến hành đông lạnh rồi đông khô. Các chất đệm hay chất pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành phải chứa số lượng vi khuẩn sống *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng Bi-26: *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Bi-26 (ATCC SD-6720) là chủng vi khuẩn đặc trưng, thuần chủng, không sinh D-lactat thuộc loài *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng cho chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Bi-26.

Định tính

A. Định tính bằng kính hiển vi.
Tiến hành như chỉ dẫn trong mục Định lượng và nhuộm soi dưới kính hiển vi.
Tiêu chuẩn chấp nhận: trực khuẩn hình que, đầu tròn, ngắn; trực khuẩn hình chùy và trực khuẩn hình que chia nhánh hình chữ Y.
B. Định tính bằng phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic.
Nước vô khuẩn, dung dịch đệm TE 1X, dung dịch đệm TAE 1X: Xem Phụ lục 1.26, mục “Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử”.
Hỗn dịch mẫu: Chuẩn bị hỗn dịch mẫu probiotics trong dung dịch đệm TE 1X (TT) có nồng độ 100 mg/ml.
Cặp mồi 1:
Mồi xuôi (5’-3’) GTCACGATGTCTCCTTTGATATCAGCATG và mồi ngược (5’-3’) CCTTTTGCGTCTCCCCCG. Pha dung dịch mồi gốc có nồng độ 100 µM bằng dung dịch đệm TE 1X (TT), tiếp tục pha loãng đến nồng độ 25 µM bằng dung dịch đệm TE 1X (TT), bảo quản ở -20 °C.
Cặp mồi 2:
Mồi xuôi (5’-3’) TCGCCGACATGCGAGACGAA và mồi ngược (5’-3’) TCCAGGCTCAGCGTGCGA. Pha dung dịch mồi gốc có nồng độ 100 µM bằng dung dịch đệm TE 1X (TT), tiếp tục pha loãng đến nồng độ 25 µM bằng dung dịch đệm TE 1X (TT), bảo quản ở -20 °C.
Mẫu thử: Đối với mỗi cặp mồi đặc hiệu, chuẩn bị dịch chứa 12 µL PCR master mix¹, 1 µL dung dịch mồi xuôi (25 µM), 1 µL dung dịch mồi ngược (25 µM), 10 µL nước vô khuẩn và 1 µL hỗn dịch mẫu hoặc pha theo khuyến cáo của master mix thương mại khác được sử dụng.
Mẫu chứng âm: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 µL hỗn dịch mẫu bằng 1 µL nước vô khuẩn.
Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 µL hỗn dịch mẫu bằng 1 µL dung dịch DNA của chủng đối chiếu *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Bi-26 hoặc thay thế cặp mồi đặc hiệu cho chủng đối chiếu bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis*.
Tiến hành: Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương bằng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp. Tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt ghi trong Bảng 1. Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Bi-26 bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* thì có thể chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mồi được chọn. Chu trình nhiệt trong nhân bản DNA có thể được thực hiện theo quy trình của master mix hoặc theo yêu cầu của enzym sử dụng.

Bảng 1 - Chu trình nhiệt

Cặp mồi đặc hiệu	Chu trình nhiệt
Cặp mồi 1	Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 7 min; Bước 2: ủ ở 95 °C trong 30 s; Bước 3: ủ ở 59 °C trong 30 s; Bước 4: ủ ở 72 °C trong 1 min. Lặp lại các bước 2 - 4 trong 34 chu kỳ. Ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C.
Cặp mồi 2	Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 7 min; Bước 2: ủ ở 95 °C trong 30 s; Bước 3: ủ ở 61 °C trong 30 s; Bước 4: ủ ở 72 °C trong 1 min. Lặp lại các bước 2 - 4 trong 34 chu kỳ. Ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C.

Phân tích sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu chứng dương, mẫu chứng âm bằng hệ thống điện di tự động kèm kit DNA (automated on-chip electrophoresis system). Tiến hành điện di theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngoài ra, có thể tiến hành phương pháp điện di gel. Sử dụng gel agarose 2 % (kl/tt) trong dung dịch đệm TAE 1X (TT). Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromid (TT) 0,5 mg/mL và rửa gel bằng nước. Có thể sử dụng thuốc nhuộm phù hợp khác.
Thận trọng: *Ethidium bromid* (TT) là một chất độc hại và có khả năng gây đột biến nên ở bước rửa gel bằng nước thì nước sau khi rửa phải thu hồi và xử lý theo hướng dẫn xử lý hóa chất độc hại. Sử dụng thiết bị bảo hộ cá nhân thích hợp (đeo găng tay nitril) khi tiếp xúc thuốc thử này.
Sử dụng thang chuẩn DNA phù hợp để xác định kích thước của sản phẩm khuếch đại. Để thuận lợi cho việc so sánh kích thước các sản phẩm khuếch đại gen, nên đặt thang chuẩn ở làn đầu tiên và làn cuối cùng trên bản gel.
Nếu sử dụng DNA của chủng đối chiếu làm mẫu chứng dương, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với số cặp base đặc hiệu như quy định ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận. Trong trường hợp mẫu chứng dương sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với số cặp base đặc hiệu như trong các tài liệu đã công bố. Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm phải không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại gen nào. Nếu kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm và/hoặc mẫu chứng dương không như mong muốn, cần tiến hành lại phản ứng PCR với mẫu thử, mẫu chứng dương và mẫu chứng âm.
Tiêu chuẩn chấp nhận:
Cặp mồi 1: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 105 cặp base.
Cặp mồi 2: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 181 cặp base.
Định lượng
Tiến hành theo chỉ dẫn trong Phụ lục 1.26, mục Định lượng các loài vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* ngoại trừ một số thay đổi sau.

Môi trường thạch MRS Lactobacilli: Chuẩn bị môi trường có công thức chỉ dẫn trong Phụ lục 1.26 và thêm 1 ml dung dịch vô khuẩn *cystein hydrochlorid* (TT) 5 % (kl/tt) vào 100 ml môi trường ngay trước khi sử dụng.

Dung dịch đệm pepton: Thành phần như trong Bảng 2 hoặc có thể sử dụng dung dịch thương phẩm có sẵn.

Bảng 2 - Dung dịch đệm pepton

Thành phần	Khối lượng
Pepton	10,0 g
Natri clorid	5,0 g
Dinatri hydrophosphat, khan	1,9 g
Kali dihydrophosphat	1,5 g
Dung dịch sau khi pha có pH 7,2 ± 0,2	

Hòa các thành phần trên trong 1 L nước trong bình nón hoặc cốc có dung tích phù hợp. Đun đến sôi, vừa đun vừa khuấy trên bếp nóng. Đun sôi trong không quá 1 min để hóa chất hòa tan hoàn toàn và có thể phân phối môi trường vào các bình có thể tích phù hợp. Tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. Môi trường được giữ ổn nhiệt ở 45 °C trước khi sử dụng. Môi trường sau khi tiệt khuẩn nếu không sử dụng ngay có thể để nguội môi trường và bảo quản ở 2 °C đến 8 °C. Nên để dung dịch đệm đến nhiệt độ phòng trước khi dùng.

Chuẩn bị hỗn dịch mẫu: Tiến hành theo chỉ dẫn trong Phụ lục 1.26, thay thế môi trường lỏng MRS *Lactobacilli* bằng dung dịch đệm pepton.

Giới hạn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Tổng số nấm: Không được quá 10² CFU/g (Phụ lục 13.6).

Tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic: Không được quá 5 × 10³ CFU/g (Phụ lục 1.26).

Vi sinh vật gây bệnh

Escherichia coli: Không được có trong 10 g (Phụ lục 13.6).

Salmonella sp.: Không được có trong 40 g (Phụ lục 13.6).

Listeria: Không được có trong 25 g (Phụ lục 1.26).

Bảo quản

Bảo quản trong bao bì có chất liệu phù hợp, kín, bền chắc, không quá 4 °C.

Ghi nhãn

Phải ghi đầy đủ tên chi, loài và chủng kèm theo số lượng vi khuẩn theo đơn vị CFU/g hoặc đơn vị tương đương.

Ghi chú

¹ AmpliTaq Gold 360 Master Mix của ThermoFisher Scientific (www.thermoFisher.com) hoặc tương đương.

BIFIDOBACTERIUM LONGUM SUBSP. LONGUM
Bifidobacterium longum subsp. *longum*

Định nghĩa

Bifidobacterium longum subsp. *longum* là vi khuẩn kỵ khí, Gram dương, không sinh bào tử, sinh acid lactic, lên men dị hình hexose tùy ý. Chúng có hình dạng khác nhau như trực khuẩn hình que, đầu tròn, ngắn; trực khuẩn hình chùy; trực khuẩn hình que, chia nhánh hình chữ Y. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau quá trình lên men trước khi tiến hành đông lạnh rồi đông khô. Các chất độn hay chất pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành phải chứa số lượng vi khuẩn sống *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng BI-05: là chủng vi khuẩn đặc trưng, thuần chủng thuộc loài *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*.

Ghi chú: Chuyên luận này chỉ áp dụng với chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Bi-05.

Định tính

A. Định tính bằng kính hiển vi.

Tiến hành như chỉ dẫn trong mục Định lượng và nhuộm soi dưới kính hiển vi.

Tiêu chuẩn chấp nhận: trực khuẩn hình que, đầu tròn, ngắn; trực khuẩn hình chùy và trực khuẩn hình que, chia nhánh hình chữ Y.

B. Định tính bằng phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic

Nước vô khuẩn, dung dịch đệm TE 1X, dung dịch đệm TAE 1X: Xem Phụ lục 1.26, mục “Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử”.

Hỗn dịch mẫu: Chuẩn bị hỗn dịch mẫu probiotic trong dung dịch đệm TE 1X (TT) có nồng độ 100 mg/ml.

Cặp môi:

Mỗi xuôi (5'-3') ATCACCGCAATCGTTGGAATAGC và mỗi ngược (5'-3') TTGCAACCACCACTAGAATCTGC.

Pha dung dịch mỗi gốc có nồng độ 100 μM bằng dung dịch đệm TE 1X (TT), tiếp tục pha loãng đến nồng độ 25 μM bằng dung dịch đệm TE 1X (TT), bảo quản ở -20 °C.

Mẫu thử: Chuẩn bị dịch chứa 12,5 μL PCR master mix¹, 1 μL dung dịch mỗi xuôi (25 μM), 1 μL dung dịch mỗi ngược (25 μM), 9 μL nước vô khuẩn và 1 μL hỗn dịch mẫu hoặc pha theo khuyến cáo của master mix thương mại khác được sử dụng.

Mẫu chứng âm: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 μL hỗn dịch mẫu bằng 1 μL nước vô khuẩn.

Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 μL hỗn dịch mẫu bằng 1 μL dung dịch DNA của chủng đối chiếu *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Bi-05 hoặc thay thế cặp môi đặc hiệu cho chủng đối chiếu bằng cặp môi đặc hiệu chung cho loài *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*.