

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 như sau: Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 5 min; Bước 2: ủ ở 95 °C trong 30 s; Bước 3: ủ ở 57 °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. Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mỗi đặc hiệu cho chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Bi-05 bằng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* thì có thể chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mỗi 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. 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 mỗi 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: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 164 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 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 hydroclorid* (TT) 5 % (kl/tt) vào 100 ml môi trường ngay trước khi sử dụng.

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

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Tổng số nấm: Không được quá 10^2 CFU/g (Phụ lục 13.6).

Tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic: Không được quá 5×10^3 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.

INTERFERON ALPHA-2

Interferoni alpha-2

Interferon alpha-2 là sinh phẩm ở dạng lỏng hoặc đông khô có chứa interferon alpha-2 người, tái tổ hợp.

Interferon alpha-2 dạng lỏng là dung dịch trong suốt, không màu.

Interferon alpha-2 đông khô có dạng khối xốp, trắng mịn, dễ hòa tan trong nước thành dung dịch trong suốt.

Interferon alpha-2 được dùng để kháng virus, ức chế tăng sinh tế bào ung thư và có chức năng điều hòa miễn dịch.

Sản xuất

Interferon alpha-2 được sản xuất theo công nghệ tái tổ hợp ADN: Gen mã hóa interferon alpha-2 được tách từ tế bào lympho của người và đưa vào vector biểu hiện; Sau đó vector này được đưa vào vi khuẩn. Vi khuẩn này được nuôi cấy trong môi trường đặc biệt để thu sinh khối và sau đó dùng kỹ thuật sinh hóa tách chiết và tinh sạch interferon alpha-2. Sản phẩm được đóng ống hoặc đông khô với hàm lượng interferon alpha-2 khác nhau tùy theo mục đích sử dụng.

Nhận dạng

Interferon alpha-2 được nhận dạng thông qua sự giảm hoạt tính kháng virus của nó trên tế bào nhiễm sau khi trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha-2.

Vật liệu

Interferon alpha-2 thử nghiệm.

Kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha-2.

Tế bào MDBK (Madin-Darby Bovin Kidney - Tế bào thận bò).

Virus gây nhiễm VSV (Vesicular Stomatitis Virus - Virus gây viêm vòm họng) đã chuẩn độ.

Môi trường MEM (Minimum Essential Medium) có chứa huyết thanh bào thai bê (Fetal Bovin Serum, FBS).

Dung dịch trypsin 0,25 %.

Phiên nhựa vô trùng, 96 giếng, đáy bằng.

Phương pháp tiến hành

Ngày thứ 1:

Pha kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha-2 với môi trường MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa 200 IU/ml.

Trộn đều 3 lọ đến 5 lọ mẫu thử nghiệm và pha loãng bằng MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa khoảng 200 IU/ml (tùy vào hàm lượng interferon alpha 2 ghi trên nhãn).

Trung hòa: Trộn đều 1 ml interferon alpha 2 đã pha loãng ở trên với 1 ml kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha-2. Ủ ở 37 °C trong 60 min.

Nhỏ 100 µl môi trường MEM 5 % FBS vào tất cả các giếng.

Nhỏ 100 µl dung dịch mẫu thử nghiệm đã pha loãng ở trên vào giếng thứ nhất của phiên (A1). Pha loãng tiếp bậc 2 cho đến hàng giếng thứ 12 (A12), loại bỏ 100 µl ở giếng A12.

Nhỏ 100 µl dung dịch mẫu thử nghiệm đã trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha 2 vào hàng giếng thứ hai của phiên (B1). Pha loãng tiếp bậc 2 cho đến hàng giếng thứ 12 (B12), loại bỏ 100 µl ở giếng B12.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào MDBK có nồng độ 6×10^5 đến 8×10^5 tế bào/ml vào toàn bộ các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 2:

Kiểm tra sự phát triển của tế bào MDBK ở các giếng tế bào chứng, tế bào phải mọc được một lớp kín.

Loại bỏ nước nổi trong tất cả các giếng của phiên.

Pha dung dịch virus gây nhiễm VSV với môi trường MEM 2 % FBS để có chứa 100 đến 200 CCID₅₀/ml. Nhỏ 100 µl dung dịch virus gây nhiễm VSV này vào tất cả các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 3:

Kiểm tra sự hủy hoại của tế bào nhiễm virus dưới kính hiển vi ở các giếng nhỏ dung dịch interferon alpha-2 sau trung hòa, tỷ lệ hủy hoại tế bào phải đạt trên 90 %.

Nhuộm tế bào với tím gentian: Thêm 50 µl dung dịch tím tinh thể (TT) vào mỗi giếng, trộn đều, để yên 10 min. Loại bỏ dung dịch tím tinh thể còn dư, rửa phiên bằng nước. Để phiên khô ở nhiệt độ phòng. Nhỏ 50 µl 2-methoxyethanol vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ phiên trên máy lắc trong vòng 10 min. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA.

Tiêu chuẩn đánh giá: So sánh độ hấp thụ giữa các giếng tương ứng của 2 loại dung dịch thử nghiệm trước và sau khi trung hòa với kháng thể đơn dòng kháng interferon alpha-2: Độ hấp thụ của các giếng sau trung hòa phải nhỏ hơn.

Hiệu giá

Hiệu giá interferon alpha-2 được xác định bằng chuẩn độ hoạt tính kháng virus của mẫu thử nghiệm trên tế bào MDBK.

Hiệu giá của Interferon alpha-2 thử nghiệm được tính theo mẫu chuẩn quốc tế interferon alpha-2 tái tổ hợp.

Vật liệu

Interferon alpha-2 chuẩn quốc tế.

Interferon alpha-2 thử nghiệm.

Tế bào MDBK.

Virus gây nhiễm VSV đã chuẩn độ.

Môi trường MEM có chứa huyết thanh bào thai bê.

Phiên nhựa vô trùng, 96 giếng, đáy bằng.

Phương pháp tiến hành

Ngày thứ 1:

Pha loãng mẫu chuẩn quốc tế với MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa 100 IU/ml.

Trộn đều 3 lọ đến 5 lọ mẫu thử nghiệm và pha loãng bằng MEM 2 % FBS để có dung dịch chứa khoảng 100 IU/ml (tùy vào hàm lượng interferon alpha-2 ghi trên nhãn).

Nhỏ 100 µl môi trường MEM 5 % FBS vào tất cả các giếng.

Nhỏ 100 µl dung dịch đã pha loãng của mẫu chuẩn quốc tế (MCQT) và mẫu thử nghiệm vào mỗi giếng trong cột thứ nhất của phiên. Đối với MCQT nhỏ 2 giếng (B1, C1) và mẫu thử nghiệm nhỏ 5 giếng (D1, E1, F1, G1, H1).

Pha loãng bậc 2 liên tiếp cho đến cột thứ 12 thì loại bỏ 100 µl.

Nhỏ 100 µl dung dịch tế bào MDBK có nồng độ 6×10^5 đến 8×10^5 tế bào/ml vào toàn bộ các giếng.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 2:

Kiểm tra sự phát triển của tế bào MDBK ở các giếng chứng “tế bào” (giếng A1 đến A6), tế bào phải mọc được một lớp kín.

Loại bỏ nước nổi trong tất cả các giếng của phiên.

Pha dung dịch virus gây nhiễm VSV với môi trường MEM 2% FBS để có chứa 100 đến 200 CCID₅₀/ml. Nhỏ 100 µl dung dịch virus gây nhiễm VSV vào tất cả các giếng trừ giếng chứng “tế bào”.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Phủ giấy dán, đậy nắp phiên và để ở tủ ấm 37 °C, 5 % CO₂ trong vòng 18 h đến 24 h.

Ngày thứ 3:

Kiểm tra sự hủy hoại của virus đối với tế bào dưới kính hiển vi, ở các giếng chứng “virus” (giếng A7 đến A12) tỷ lệ hủy hoại phải đạt trên 90 %.

Nhuộm tế bào với tím gentian: Thêm 50 µl dung dịch tím tinh thể (TT) vào mỗi giếng, trộn đều, để yên 10 min. Loại bỏ dung dịch tím tinh thể còn dư, rửa phiên bằng nước.

Để phiên khô ở nhiệt độ phòng. Nhỏ 50 µl 2-methoxyethanol vào tất cả các giếng. Lắc nhẹ phiên trên máy lắc trong vòng 10 min. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA.

DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM VI

LACTICASEIBACILLUS CASEI

Tính kết quả:

Tính độ hấp thụ 50 % theo công thức:

$$A_{50} = (A_c + A_v)/2$$

Trong đó:

A_c là độ hấp thụ trung bình của các giếng chứng “tế bào”;

A_v là độ hấp thụ trung bình của các giếng chứng “virus”.

Xác định hiệu quả bảo vệ 50 % tế bào của interferon alpha-2 mẫu thử nghiệm và mẫu chuẩn quốc tế theo công thức:

$$N = n + (A_n - A_{50})/(A_n - A_{n+1})$$

Trong đó:

N là số thứ tự của giếng có độ bảo vệ tế bào 50 %;

n là số thứ tự của giếng có độ hấp thụ > 50 %;

A_n là độ hấp thụ của giếng thứ “n”;

A_{n+1} là độ hấp thụ của giếng thứ “n+1”.

Tính hiệu giá theo công thức:

$$\text{Hiệu giá (\%)} = 100 \times 2^{(N_{tn} - N_s)}$$

Trong đó:

N_{tn} là vị trí giếng mà ở đó interferon alpha-2 thử nghiệm bảo vệ được 50 % tế bào;

N_s là vị trí giếng mà ở đó interferon alpha-2 chuẩn quốc tế bảo vệ được 50 % tế bào.

Tiêu chuẩn

Mẫu interferon alpha 2 thử nghiệm chỉ đạt yêu cầu khi hiệu giá tính được phải đạt từ 70 % đến 150 % hàm lượng ghi trên nhãn.

An toàn chung

Với liều tiêm là 15 triệu IU/5 ml đối với 1 chuột lang và 1 triệu IU/0,5 ml đối với 1 chuột nhắt (Phụ lục 15.11).

Chất gây sốt

Mẫu interferon alpha-2 thử nghiệm được pha loãng với nước muối hồi chính, để có nồng độ 600.000 IU/ml (Phụ lục 15.12).

Vô khuẩn

Đạt vô khuẩn (Phụ lục 15.7).

Độ ẩm tồn dư (đối với dạng đông khô)

Không lớn hơn 3 % (Phụ lục 15.35).

pH

7,0 ± 0,5 (Phụ lục 15.33).

Đóng gói, bảo quản

Đóng gói: Hàm lượng interferon alpha-2 được đóng gói tùy theo nhà sản xuất: 3 triệu IU/lọ, 4,5 triệu IU/lọ, 6 triệu IU/lọ; 90 g/lọ, 180 µg/lọ, kèm theo nước hồi chính.

Interferon alpha-2 đông khô phải bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

Nhãn, hộp

Những thông tin đối với nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng quy định hiện hành.

LACTICASEIBACILLUS CASEI

Lacticaseibacillus casei

Định nghĩa

Lacticaseibacillus casei (trước đây gọi là *Lactobacillus casei*) là vi khuẩn sinh acid lactic, Gram dương, hình que, không sinh bào tử, vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí tùy ý, lên men đồng hình. Tế bào không di động, thường thẳng và đứng thành cặp hoặc chuỗi có độ dài khác nhau. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau khi lên men trước khi đông lạnh rồi đông khô sản phẩm đó. Các chất độn hay tá dược pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành có số lượng vi khuẩn sống *Lacticaseibacillus casei* không được ít hơn 100% so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng Lc-11: *Lacticaseibacillus casei* Lc-11 (ATCC SD-5213) là chủng *Lacticaseibacillus casei* đặc hiệu, thuần chủng, sản phẩm lên men có 5 % D-lactat, 95 % L-lactat.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng với chủng *Lacticaseibacillus casei* Lc-11.

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, thẳng, đứng thành cặp hoặc chuỗi có độ dài khác nhau.

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

Các hóa chất, dung môi sử dụng trong kỹ thuật PCR phải đạt chất lượng quy định trong Phụ lục 1.26.

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

Cặp mồi:

Mỗi xuôi (5'-3') TGCCATTAGCATACTGGACC và mỗi ngược (5'-3') ACCCGAGCCTTTGCCAA. Pha loãng mỗi bằng dung dịch đệm đến nồng độ 100 µM, tiếp tục pha loãng bằng dung dịch đệm đến nồng độ 25 µM, bảo quản ở -20 °C.

Mẫu thử: Chuẩn bị dung dịch chứa 12 µL PCR master mix¹, 1 µL dung dịch mỗi xuôi (25 µM), 1 µL dung dịch mỗi ngược (25 µM) và 10 µL nước vô khuẩn, 1 µL mẫu thử 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 mẫu thử bằng 1 µL nước vô khuẩn.

Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 µL khuôn DNA của chủng chuẩn *Lacticaseibacillus casei* Lc-11 hoặc thay thế cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Lacticaseibacillus casei* Lc-11 bằng cặp mồi đặc trưng cho loài *Lacticaseibacillus casei*.

Tiến hành: Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương với cùng máy tạo chu trình