

tục pha loãng bằng dung dịch đệm đến nồng độ 25 μ M, bảo quản ở -20 °C.

Mẫu thử: Chuẩn bị dung dịch chứa 10 μ L PCR master mix¹, 1 μ L dung dịch mỗi xuôi (25 μ M), 1 μ L dung dịch mỗi ngược (25 μ M) và 12 μ L nước vô khuẩn, 1 μ L 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 μ L nước vô khuẩn.

Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 μ L khuôn DNA của chủng chuẩn *Lactocaseibacillus paracasei* LPC-37 hoặc thay thế cặp mỗi đặc hiệu cho chủng chuẩn *Lactocaseibacillus paracasei* LPC-37 bằng cặp mỗi đặc trưng cho loài *Lactocaseibacillus paracasei*.

Tiến hành: Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương với cùng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp. Tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 7 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 30 s. 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 *Lactocaseibacillus paracasei* LPC-37 bằng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài *Lactocaseibacillus paracasei* 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 bộ 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 (TT) 2 % trong dung dịch đệm TAE 1X (TT). Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromid (TT) 0,5 mg/mL và tiếp tục rửa gel bằng nước.

Có thể sử dụng thuốc nhuộm gel 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 được 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.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với cặp base đặc hiệu như ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận nếu sử dụng khuôn DNA của chủng chuẩn. Nếu sử dụng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài, kết quả phản ứng PCR phải có sản phẩm khuếch đại tương ứng với cặp mỗi theo các tài liệu đã công bố.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm phải không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại nào. Nếu kết quả không như mong đợi, tiến hành lại phản ứng PCR với các mẫu thử, mẫu chứng âm, mẫu chứng dương.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 273 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*.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống *Lactocaseibacillus paracasei* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn. Số lượng vi khuẩn được ghi theo đơn vị CFU/g.

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).

Staphylococcus aureus: Không được có trong 1 g (Phụ lục 13.6).

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

Enterococci: Không được quá 10² CFU/g (Phụ lục 1.26).

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

Bảo quản

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

Ghi nhãn

Phải ghi tên chi, loài và chủng và số lượng vi khuẩn dưới dạng CFU/g hoặc CFU/liều hoặc đơn vị tương đương.

Ghi chú

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

LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

Lactobacillus acidophilus

Định nghĩa

Lactobacillus acidophilus là vi khuẩn sinh acid lactic, không di động, không sinh bào tử, lên men đồng hình, trực khuẩn Gram dương hình que, đôi khi xếp thành chuỗi ngắn. 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. 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 *Lactobacillus acidophilus* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng La-14: *Lactobacillus acidophilus* La-14 (mã hóa chủng theo ATCC là SD5212) là chủng vi khuẩn

Lactobacillus acidophilus đặc trưng, thuần chủng, sản phẩm lên men có 60 % L-lactat và 40 % D- lactat.
Chủng NCFM: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (mã hóa chủng theo ATCC là SD5221) là chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* đặc trưng, thuần chủng, sản phẩm lên men có 66 % L-lactat và 34 % D-lactat.
Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng cho chủng *Lactobacillus acidophilus* La-14 và *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

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:
Chủng La-14: Trục khuẩn hình que.
Chủng NCFM: Trục khuẩn hình que, xếp thành chuỗi ngắn.
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 1X (TT) có nồng độ 100 mg/ml.
Mỗi đặc hiệu: xem Bảng 1.
Pha dung dịch mỗi gốc có nồng độ 100 μM bằng dung dịch đệm, tiếp tục pha loãng đến nồng độ 25 μM bằng dung dịch đệm, bảo quản ở -20 °C.
Mẫu thử: Chuẩn bị dung dịch chứa 10 μL PCR master mix¹, 1 μL dung dịch mỗi xuôi (25 μM), 1 μL dung dịch mỗi ngược (25 μM), 12 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 mẫu thử bằng 1 μL nước vô khuẩn.

Bảng 1 - Mỗi đặc hiệu và tiêu chuẩn chấp nhận tương ứng

Chủng	Mỗi đặc hiệu	Trình tự mỗi	Tiêu chuẩn chấp nhận*
La-14	1	Mỗi xuôi (5'-3') AAACTGCAATTTAAGATTAT GAGTTTC Mỗi ngược (5'-3') GGTACCGTCTTGATTATTAGTGTA Nhiệt độ bắt cặp của mỗi: 51,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 184 cặp base. Không được có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 600 cặp base.
		Mỗi xuôi (5'-3') TCGGCAAACCTTAGTTGCAGAAGG Mỗi ngược (5'-3') GGTGCTAAGCTAGGTATGGAAC. Nhiệt độ bắt cặp của mỗi: 57,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 365 cặp base với 2 đa hình đơn nucleotid (SNP: Single-nucleotid polymorphisim). Vị trí SNP đầu tiên được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau GAGTAAATTCATCA, vị trí của SNP này là cặp base thứ 50 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Vị trí SNP thứ hai được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau: TTCAATTGAAGTTTG, vị trí của SNP này là cặp base thứ 242 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Trình tự của sản phẩm khuếch đại gen nên được xác định bằng các kỹ thuật giải trình tự đã được thẩm định, ví dụ như phương pháp Sanger.
		Mỗi xuôi (5'-3') GCTGACGGAGATTATTCAAGCCA Mỗi ngược (5'-3') GCAGAACACATACGCTACCAGA. Nhiệt độ bắt cặp của mỗi: 57,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 433 cặp base với hai SNP. Vị trí SNP đầu tiên được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau: AAGCATTCAATACAC và vị trí SNP này là cặp base thứ 72 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Vị trí SNP thứ hai được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau ATATGGTTCTT ACCT và vị trí SNP này là cặp base thứ 215 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Trình tự của sản phẩm khuếch đại gen nên được xác định bằng các kỹ thuật giải trình tự đã được thẩm định, ví dụ như phương pháp Sanger.
NCFM	2	Mỗi xuôi (5'-3') AAACTGCAATTTAAGATTATGAGTTTC Mỗi ngược (5'-3') GGTACCGTCTTGATTATTAGTGT Nhiệt độ bắt cặp của mỗi: 51,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 600 cặp base. Không được có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 184 cặp base

* Phải đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận đối với mỗi cặp mỗi để đạt yêu cầu định tính đến mức chủng (strain).

Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 µL khuôn DNA của chủng chuẩn *Lactobacillus acidophilus* La-14/NCFM hoặc thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng chuẩn bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus acidophilus*.

Tiến hành: Đối với mỗi cặp mồi, tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương trên cùng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp ở Bảng 2. Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Lactobacillus acidophilus* La-14/NCFM bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus acidophilus* 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.

Phân tích sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu chứng dương, mẫu chứng âm bằng hệ thống điện di tự động kèm bộ 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 (TT) 2 % trong dung dịch đệm TAE 1X (TT). Nhuộm gel bằng dung dịch Ethidium bromid (TT) 0,5 mg/mL hoặc thuốc nhuộm gel phù hợp khác và rửa gel bằng nước.

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 của các sản phẩm khuếch đại, nên đặt thang chuẩn ở làn đầu tiên và làn cuối cùng trên 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 được quy định ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận. Nếu sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus acidophilus* làm chứng dương, 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 nào. Nếu kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm và/hoặc mẫu chứng dương không như mong muốn, tiến hành lại phản ứng PCR với mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Xem Bảng 1.

Định lượng

Tiến hành theo chỉ dẫn trong Phụ lục 1.26, mục Định lượng các loài vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống *Lactobacillus acidophilus* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn. Số lượng vi khuẩn được ghi theo đơn vị CFU/g.

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).

Bảng 2 - Chu trình nhiệt

Chủng	Cặp mồi	Chu trình khuếch đại PCR
La-14	1	Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ ở 51,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 60 s. Lặp lại các bước 2 - 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C.
		Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ ở 57,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 30 s. Lặp lại các bước 2 - 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72°C trong 5 min và giữ ở 4 °C.
NCFM	2	Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ ở 57,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 30 s. Lặp lại các bước 2 – 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C.
	3	Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ 51,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ 72 °C trong 1 min. Lặp lại các bước 2 - 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72°C trong 5 min và giữ ở 4 °C.

LACTOBACILLUS RHAMNOSUS

DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM VI

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 tên chi, loài, chủng và số lượng vi khuẩn theo đơn vị CFU/g hoặc đơn vị tương đương trên nhãn.

Ghi chú

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

LACTOBACILLUS RHAMNOSUS

Lactobacillus rhamnosus

Định nghĩa

Lactobacillus rhamnosus là trực khuẩn Gram dương, lên men dị hình, không sinh bào tử. Tế bào hình que hai đầu vuông, không di động đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi.

Lactobacillus rhamnosus không thủy phân được Arginin. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau khi 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 *Lactobacillus rhamnosus* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn. Chủng HN001: Chủng HN001 là chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* đặc trưng, thuần chủng, có plasmid, không sinh D-lactat.

Chủng GG: Chủng GG là chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* đặc trưng, thuần chủng, không có plasmid, không sinh D-lactat.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng cho chủng *Lactobacillus rhamnosus* HN001 và *Lactobacillus rhamnosus* GG.

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:

Chủng HN001: Trực khuẩn hình que có độ dài khác nhau, thường xếp thành chuỗi ngắn.

Chủng GG: Trực khuẩn nhỏ hình que, có kích thước đồng nhất, xếp thành chuỗi.

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 probiotics trong dung dịch đệm TE IX (TT) có nồng độ 100 mg/ml.

Mỗi đặc hiệu: xem Bảng 1.

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

Mẫu thử: Chuẩn bị dung dịch chứa 12,5 µL PCR master mix¹, 1 µL dung dịch mỗi xuôi (25 µM), 1 µL dung dịch mỗi ngược (25 µM), 9,5 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 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 *Lactobacillus rhamnosus* HN001/GG hoặc thay cặp môi đặc hiệu cho chủng chuẩn bằng cặp môi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus rhamnosus*.

Tiến hành: Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương tương ứng trên cùng một máy tạo chu trình nhiệt thích hợp. Tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt như sau:

Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 10 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 môi đặc hiệu cho chủng *Lactobacillus rhamnosus* HN001/GG bằng cặp môi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus rhamnosus* thì có thể chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp môi 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 bộ 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 (TT) 2 % trong dung dịch đệm TAE IX (TT). Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromid (TT) 0,5 mg/ml hoặc thuốc nhuộm gel phù hợp khác 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 thang chuẩn DNA có kích thước phù hợp để xác định kích thước của sản phẩm khuếch đại thu được. 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 của các sản phẩm khuếch đại, nên đặt thang chuẩn ở làn đầu tiên và làn cuối cùng trên gel.

Nếu sử dụng DNA của chủng đối chiếu làm mẫu chứng dương, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có