

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

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

Chủng	Mồi đặc hiệu	Trình tự mồi xuôi	Trình tự mồi ngược	Tiêu chuẩn chấp nhận*
HN001	1	(5'-3') CACCTGCGAT-CAAAGCGAAAC	(5'-3') GCTCCCACCGGC-ACATTA	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 340 cặp base.
GG	1	(5'-3') GTGATCGGAACATCTT-TGGCCACTTGTITG	(5'-3') ACTTAATCAAACAA-GGCAAGCTGGACGATG	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 552 cặp base, đối với chủng khác có thể thu được sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khác.
	2	(5'-3') TTCCACATTGCG-CCAAACA	(5'-3') ACAACCTTCACC-ACGACCAA	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 388 cặp base có một đa hình đơn nucleotid - SNP (SNP: <i>Single-nucleotide polymorphism</i>), có thể thu được sản phẩm khuếch đại gen có kích thước tương tự đối với chủng khác. Vị trí SNP này được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 21 cặp base có trình tự như sau: ACCAATGTAA _a CATACCCATC và vị trí SNP này là cặp base thứ 250 tính từ đầu 3' của mồi xuôi. Trình tự của sản phẩm khuếch đại gen này nên được xác định bằng các kỹ thuật giải trình tự đã được thẩm định, ví dụ như phương pháp Sanger.
	3	(5'-3') GCCGGTTGTCAG-TGACCATA	(5'-3') AGACAAATGCC-TGGATGCCT	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 293 cặp base với hai SNP; có thể thu được sản phẩm khuếch đại gen có kích thước tương tự đối với chủng khác. Vị trí SNP đầu tiên được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 21 cặp base có trình tự như sau: TCTTCCCGAC _i TTAGCAGGGA và vị trí SNP này là cặp base thứ 71 tính từ đầu 3' của mồi xuôi 3. Vị trí SNP thứ hai được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 21 cặp base có trình tự như sau: TCAGGCGCA _i TATGAAGATGG và vị trí của SNP này là cặp base thứ 98 tính từ đầu 3' của mồi 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.
	4	(5'-3') TGCAACACATCA-AGCGATTGG	(5'-3') TCATAACCAGCAT-ACGCCGG	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 490 cặp base. Không được có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 367 cặp base, có thể thu được sản phẩm khuếch đại gen có kích thước tương tự đối với chủng khác.

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

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 rhamnosus* 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 rhamnosus* 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 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).

Vĩ 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 đồ đựng 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 theo đơn vị tương đương trên nhãn.

Ghi chú

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

TUBERCULIN PPD

Tuberculinum derivatum proteinosum purificatum

Tuberculin PPD là sinh phẩm chứa chất có hoạt tính gây phản ứng da đặc hiệu đối với bệnh lao, được điều chế từ canh thang nuôi cấy và ly giải của một hay nhiều chủng *Mycobacterium tuberculosis*.

Tuberculin PPD đông khô có dạng khối xốp, mịn, không teo, màu trắng ngà, không mùi, tan nhanh trong nước sôi, hình thành dung dịch trong suốt, không màu.

Dùng tuberculin PPD đông khô là một trong những phương pháp phát hiện các trường hợp bị nhiễm lao hoặc dùng để đánh giá phản ứng quá mẫn muộn đối với lao sau khi tiêm vắc xin BCG.

Sản xuất

Chủng sản xuất được nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Sau 6 tuần, chủng đã phát triển, được thu hoạch và giết chết bằng hơi nóng ở nhiệt độ 100 °C trong 60 min. Hỗn dịch chủng đó được lọc qua màng lọc để loại xác vi khuẩn. Phân đoạn có hoạt tính có trong dung dịch lọc (chủ yếu là protein) được tách chiết bằng kết tủa với amoni sulfat, được rửa và tái hòa tan trong dung dịch đệm phù hợp. Phenol được sử dụng như là chất bảo quản. Sản phẩm được đóng ống vô khuẩn và được đông khô.

Nhận dạng

Thử nghiệm nhận dạng được tiến hành bằng cách tiêm tuberculin thử nghiệm trong da chuột lang đã được gây mẫn cảm trước đó với vắc xin BCG.

Phương pháp tiến hành

Vật liệu:

Vắc xin BCG đông khô 1 mg/ml.

Chuột lang 4 con, khỏe mạnh, âm tính với tuberculin, cân nặng từ 350 g/con đến 400 g/con. Chia chuột ra làm 2 nhóm: Nhóm thử nghiệm được tiêm mẫn cảm với vắc xin BCG đông khô và nhóm chứng không tiêm.

Gây mẫn cảm:

Vắc xin BCG đông khô được hoàn nguyên và pha loãng để có nồng độ 0,5 mg/ml. Tiêm dưới da 0,4 ml cho mỗi chuột lang, tại 4 vị trí khác nhau (0,1 ml/vị trí). Chuột lang được theo dõi sau tiêm từ 5 tuần đến 6 tuần.

Tiêm tuberculin:

Hoàn nguyên mẫu thử nghiệm để có dung dịch chứa 50 IU/ml. Tiêm trong da 0,1 ml (tương đương 5 IU) cho cả 2 nhóm chuột.

Đọc kết quả:

Sau khi tiêm tuberculin 24 h, đo đường kính phản ứng tại các vị trí tiêm.

Phản ứng được coi là dương tính nếu đường kính vết tổn thương da lớn hơn hoặc bằng 6 mm.

Tiêu chuẩn

Tất cả chuột lang đã được gây mẫn cảm với vắc xin BCG đều phải có phản ứng dương tính với tuberculin thử nghiệm. Tất cả chuột lang không được gây mẫn cảm với vắc xin BCG đều phải có phản ứng âm tính với tuberculin thử nghiệm.

Hiệu giá

Hiệu giá của tuberculin PPD được xác định bằng cách so sánh phản ứng quá mẫn muộn trong da chuột lang đã gây mẫn cảm với vắc xin BCG sau khi tiêm các độ pha khác nhau của mẫu thử với mẫu chuẩn.

Phương pháp tiến hành

Vật liệu:

Tuberculin thử nghiệm.

Tuberculin chuẩn quốc tế.

Chuột lang: 6 con, cùng giới, trọng lượng 350 g/con đến 400 g/con.

Gây mẫn cảm chuột lang:

Chuẩn bị 6 chuột lang có lông sáng màu, cùng giới, khỏe mạnh, có trọng lượng từ 350 g/con đến 400 g/con.

Vắc xin BCG đông khô được hoàn nguyên và pha loãng để có nồng độ 0,5 mg/ml. Tiêm dưới da 0,4 ml cho mỗi chuột lang, tại 4 vị trí khác nhau (0,1 ml/một vị trí). Chuột lang được theo dõi sau tiêm từ 5 tuần đến 6 tuần để xác định hiệu giá.

Xác định hiệu giá:

Tuberculin mẫu chuẩn quốc tế và mẫu thử nghiệm được pha loãng với dung dịch đệm PBS ở 3 đến 4 độ pha khác nhau sao cho đường kính phản ứng da sau khi tiêm cho chuột lang đã gây mẫn cảm với liều cao nhất không lớn hơn 25 mm và với liều thấp nhất không nhỏ hơn 6 mm. Tiêm trong da 0,1 ml mỗi độ pha của tuberculin mẫu chuẩn quốc tế và mẫu thử nghiệm ở hai bên sườn chuột lang, mỗi bên 3 điểm. Vị trí nơi tiêm được lựa chọn theo phương pháp hình vuông La tinh.

Sau khi tiêm 24 h, đo đường kính của phản ứng da tại các vị trí tiêm. Phản ứng được coi là dương tính nếu tại nơi tiêm tuberculin có nốt sần đỏ với đường kính lớn hơn hoặc