

hấp theo quy trình đã được thẩm định. Môi trường sau tiết khuẩn có pH 5,6. Môi trường được giữ ổn nhiệt ở khoảng 45 °C trước khi sử dụng. Môi trường sau khi tiết 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 đập 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 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 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.

Đề 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: Tổng số nấm men không được quá 100 CFU/g.

Tổng số nấm

Không quá 10^2 CFU/g (chỉ áp dụng đối với chủng *Bacillus coagulans* Unique IS-2) (Phụ lục 13.6).

Vì sinh vật gây bệnh

Escherichia coli, *Salmonella* sp.: Không được có trong 10 g (Phụ lục 13.6).

Cần thêm quy định không được có *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Bacillus cereus* nếu nguyên liệu có nguy cơ tạp nhiễm các vi sinh vật này. Phương pháp phát hiện các vi sinh vật này phải là phương pháp tiêu chuẩn hoặc phương pháp đã được thẩm định.

Bảo quản

Bảo quản trong đồ đựng kín, để nơi khô ráo, thoáng mát.

Ghi nhãn

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

Ghi chú

¹ Applied Biosystem 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 (<http://www.neb.com>), Dream Taq PCR master Mix (2x) (<http://www.thermofisher.com>) hoặc tương đương.

NANG BACILLUS COAGULANS

Capsulae Bacilludis coagulandis

Định nghĩa

Viên nang *Bacillus coagulans* chứa số lượng vi khuẩn sống *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Định tính

Phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic.

Nước vô khuẩn, dung dịch đệm TBE 0,5X, dung dịch đệm TAE 1X: Xem Phụ lục 1.26, mục “Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử”.

Thuốc thử pha mẫu: Sử dụng thuốc thử PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent¹. Có thể sử dụng phương pháp chiết DNA trực tiếp hoặc bộ kit tách chiết DNA vi khuẩn phù hợp khác.

Dung dịch mẫu DNA: Lựa chọn khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch BC cao nấm men glucose (Glucose Yeast Extract BC agar) thu được trong mục Định lượng.

Lấy 100 µl thuốc thử pha mẫu vào ống ly tâm 2,0 ml có nắp vặn. (Lưu ý: Quá trình lấy thuốc thử pha mẫu được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Dùng que cấy vô khuẩn lấy các tế bào từ một khuẩn lạc bề mặt và phân tán vào thuốc thử pha mẫu trong ống. Đậy nắp ống và trộn đều bằng máy lắc xoay trong 10 s đến 30 s hoặc cho đến khi tế bào phân tán thành hỗn dịch đồng nhất trong thuốc thử pha mẫu. Ủ hỗn dịch trong bể ổn nhiệt ở 100 °C trong 10 min, sau đó ly tâm hỗn dịch trên ở $16.000 \times g$ trong 3 min. Chuyển phần dịch nổi phía trên sang một ống ly tâm mới. Dung dịch này chứa DNA của *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. Trước khi tiến hành thử nghiệm, pha loãng dung dịch DNA sau tách chiết bằng nước vô khuẩn (1 : 100, tt/tt) thu được dung dịch mẫu DNA.

Cập mỗi : Xem Bảng 1.

Bảng 1 - Các cặp mồi và tiêu chuẩn chấp nhận

Chủng	Cặp mồi	Trình tự mồi	Tiêu chuẩn chấp nhận*
	Cặp mồi 301	Mồi xuôi (5'-3') AAGAAGTGGATGTGGGCGTTC Mồi ngược (5'-3') CTTTGGCATGCCAGCATCC Nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi: 65,0 °C.	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 376 đến 399 cặp base.
GBI - 30, 6086	Cặp mồi 210243	Mồi xuôi (5'-3') GCCTGATGCAGGGCTTTTCCT Mồi ngược (5'-3') CCGTCCGCTTCCGTTAAGCCG Nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi: 70,0 °C.	Không được có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 1253 đến 1331 cặp base.
	Cặp mồi 31125	Mồi xuôi (5'-3') TTATAGGCGGTAGCAGGGATC Mồi ngược (5'-3') CGATTGTTTTCCGAAGCA. Nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi: 61,0 °C.	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 329 đến 339 cặp base.

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

Dung dịch mồi:** Pha mồi đến nồng độ 0,3 µM bằng nước vô khuẩn và bảo quản ở -20 °C đến -80 °C. Ngay trước khi sử dụng, pha loãng mồi với nước vô khuẩn (1 : 5, t/t).

** Nồng độ mồi trong thành phần phản ứng PCR có thể được tối ưu hóa tùy thuộc vào điều kiện thử nghiệm của từng phòng thí nghiệm.

Mẫu thử: Đối với mỗi cặp mồi đặc hiệu, chuẩn bị dung dịch chứa 7,5 µL PCR master mix², 1 µL dung dịch mồi xuôi** (khoảng 0,06 µM), 1 µL dung dịch mồi ngược** (khoảng 0,06 µM), 4,5 µL nước vô khuẩn và 1 µL dung dịch mẫu DNA (khoảng 10 ng đến 100 ng), hoặc pha theo khuyến cáo của master mix thương mại khác được sử dụng.

Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 µL dung dịch mẫu DNA bằng 1 µL dung dịch DNA của chủng đối chiếu *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086, hoặc thay các cặp mồi đặc hiệu cho chủng đối chiếu bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus coagulans*.

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

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.

Chu trình nhiệt: Bước 1: ủ ở 98 °C trong 30 s; Bước 2: ủ ở 98 °C trong 10 s; Bước 3: ủ ở nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi đặc hiệu trong 10 s; Bước 4: ủ ở 72 °C trong 45 s. Lặp lại các bước 2 đến 4 trong 30 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 mồi đặc hiệu cho chủng *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus coagulans* 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 âm và mẫu chứng dương 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 (TT) 2,0 % (kl/tt) trong dung dịch đệm TAE 1X (TT) hoặc trong dung dịch đệm TBE 0,5X (TT).

Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromid (TT) 0,5 mg/ml 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. Có thể sử dụng thuốc nhuộm gel phù hợp khác.

Sử dụng thang chuẩn DNA phù hợp để xác định kích thước của các 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 có số cặp base đặc hiệu như quy định ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận (Bảng 1). Nếu sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus coagulans*, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại có 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 dương và mẫu chứng âm.

Định lượng

Dung dịch pepton: Chuẩn bị dung dịch pepton (TT) 0,1 % và điều chỉnh pH 7,0 bằng dung dịch acid lactic (TT). Hấp tiệt khuẩn dung dịch trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Dung dịch khoáng vi lượng (Trace mineral solution): Chuẩn bị dung dịch có thành phần như Bảng 2, pha trong nước trao đổi ion hoặc sử dụng dung dịch thương phẩm có sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 2 - Dung dịch khoáng vi lượng

Thành phần	Nồng độ (mg/ml)
Natri clorid	10,0
Sắt (II) sulfat	18,0
Mangan sulfat	16,0
Kẽm sulfat	1,6
Đồng sulfat	1,6
Cobalt (II) sulfat	1,6

Lưu ý: Dung dịch có màu hơi hồng, bảo quản lạnh trong không quá 2 tháng. Có thể dùng các muối có dạng ngâm nước khác miễn là nồng độ muối khoáng được duy trì đúng trong dung dịch cuối cùng.

Môi trường thạch BC cao nấm men glucose: Chuẩn bị môi trường có thành phần như Bảng 3, hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 3 - Môi trường thạch BC cao nấm men glucose

Thành phần	Khối lượng
Cao nấm men	5,0 g
Pepton	5,0 g
D-glucose khan	5,0 g
Dikali hydrophosphat	0,5 g
Kali dihydrophosphat	0,5 g
Magnesi sulfat	0,3 g
Dung dịch khoáng vi lượng	1,0 ml
Nước	1000 ml

Hòa các thành phần trên trong 1 L nước trong bình nón hoặc cốc có dung tích phù hợp. Bỏ sung 15,0 g thạch (TT). Điều chỉnh pH 6,3 bằng dung dịch acid lactic (TT). Đun hỗn hợp đến sôi, vừa đun vừa khuấy trên bếp nóng cho đến khi môi trường tan hoàn toàn và có thể phân phối môi trường vào các bình có thể tích phù hợp. Hấp tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. 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.

Chuẩn bị và tiến hành thử nghiệm trên 2 hỗn dịch mẫu độc lập.

Hỗn dịch mẫu: Cân lượng bột mẫu probiotic của không ít hơn 20 viên nang và xác định khối lượng trung bình bột trong nang. Chuyển 1,0 g bột mẫu probiotic vào túi polyetylen vô khuẩn (túi dập mẫu). Thêm 199 ml dung dịch pepton đã tiệt khuẩn vào túi. Trộn bằng máy lắc cơ học đến khi thu được hỗn dịch đồng nhất hoặc sử dụng máy dập mẫu (stomacher) với tốc độ 150 rpm đến 200 rpm trong 5 min. Kiểm tra pH của hỗn dịch. Nếu pH dưới 7,0, điều chỉnh pH đến 8,5 ± 0,2 bằng dung dịch natri hydroxyd 5 N (TT). Nếu pH trên 8,7, điều chỉnh pH đến 8,5 ± 0,2 bằng dung dịch acid lactic (TT) 5 N. Chuyển 20 đến 30 ml hỗn dịch đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml vô khuẩn có nắp. Ủ ống trong bể ổn nhiệt ở 75 °C trong đúng 30 min, sau đó làm nguội xuống 45 °C. Chuyển 1,0 ml hỗn dịch này vào ống nghiệm vô khuẩn chứa 9 ml dung dịch pepton. Trộn kỹ bằng máy lắc xoáy, thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 0,5 × 10⁻³. Tiếp tục pha loãng như trên đến khi thu được hỗn dịch mẫu ở độ pha loãng cuối cùng dự kiến chứa khoảng 25 CFU/ml. Tiến hành thử nghiệm với hỗn dịch mẫu ở 3 nồng độ pha loãng cuối. Cần trộn hỗn dịch mẫu với môi trường trong 10 đến 20 min sau bước chuẩn bị hỗn dịch mẫu.

Lưu ý: Có thể xử lý mẫu probiotic bằng quy trình khác với hướng dẫn trên nếu được chứng minh là phù hợp.

Tiến hành: Với mỗi nồng độ pha loãng, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu vào ba đĩa petri vô khuẩn kích thước 15 mm × 100 mm, được ghi nhãn thích hợp, sau đó đổ khoảng 15 ml đến 20 ml môi trường thạch BC cao nấm men glucose 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 BC cao nấm men glucose và đĩa mẫu trắng thứ hai chứa 1,0 ml dung dịch pepton trộn với môi trường thạch BC cao nấm men glucose. Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông, lật ngược đĩa và ủ các đĩa ở 38 °C đến 42 °C trong 48 h. Sau thời gian ủ, đếm số lượng khuẩn lạc trên các đĩa mẫu và các đĩa mẫu trắng. Lựa chọn các đĩa có 25 đến 250 khuẩn lạc để tính kết quả. Chỉ đếm các khuẩn lạc có đặc điểm hình thái như sau: khuẩn lạc trên bề mặt có đường kính từ 1 mm đến 5 mm, màu trắng đến kem, lồi, có bờ đều và bề mặt nhẵn; khuẩn lạc bên trong thạch có đường kính 0,5 mm đến 1 mm, giống các chấm nhỏ màu kem. 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.

Tính số lượng vi sinh vật sống trong viên nang tính theo đơn vị CFU/viên.

Sự có mặt của bất kỳ khuẩn lạc nào không phù hợp với mô tả này cho thấy mẫu có thể bị tạp nhiễm và cần điều tra nguyên nhân. Dựa trên kết quả điều tra nguyên nhân, có thể loại bỏ kết quả hoặc tiến hành thử nghiệm lại. Cả hai đĩa trắng phải hoàn toàn không có bất kỳ loại khuẩn lạc nào. Trường hợp các đĩa trắng xuất hiện khuẩn lạc, toàn bộ quy trình phải được lặp lại, bao gồm cả việc chuẩn bị dung dịch pha loãng và môi trường phụ thuộc vào đĩa trắng nào bị tạp nhiễm.

Giới hạn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Độ rã

Phải đạt quy định (Phụ lục 11.6).

Độ đồng đều khối lượng

Phải đạt quy định (Phụ lục 11.3).

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Tổng số nấm men

Dung dịch pepton: Chuẩn bị dung dịch pepton (TT) 0,1 % (kl/tt) và điều chỉnh pH 7,0 bằng dung dịch acid hydrochloric (TT). Tiệt khuẩn dung dịch trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch nấm men (Yeast agar medium): Chuẩn bị môi trường có thành phần như bảng 4, hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

**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.