

1.26. YÊU CẦU CHUNG ĐỐI VỚI CHẾ PHẨM PROBIOTIC

Chuyên luận này hướng dẫn phương pháp định tính, định lượng, thử Giới hạn nhiễm vi sinh vật và các yêu cầu kỹ thuật đối với chế phẩm Probiotic.

Chế phẩm Probiotic cần đạt các yêu cầu quy định khác trong chuyên luận chung về các dạng bào chế như viên nén, viên nang, viên nang mềm, bột thuốc hoặc gel nhai...

Định nghĩa

Probiotic là những vi sinh vật sống, khi sử dụng với số lượng đủ lớn sẽ đem lại lợi ích cho sức khỏe của người sử dụng.

Probiotic thường được định tính đến cấp độ chủng (strain) vì các đặc tính của chúng là đặc trưng riêng của từng chủng.

Phương pháp sản xuất

Probiotic được sản xuất bằng phương pháp lên men trong các thiết bị chuyên dụng trong điều kiện nuôi cấy nghiêm ngặt. Môi trường lên men được điều chỉnh theo đặc tính của từng loài hoặc từng chủng vi sinh vật và thường chứa các chất dinh dưỡng như protein, carbohydrat, vitamin và khoáng chất. Chủng vi sinh vật được nhân lên và phát triển trong các điều kiện đã được thiết lập cẩn thận. Sau khi vi sinh vật phát triển, tiến hành thu lấy sinh khối, thường sử dụng phương pháp ly tâm. Có thể thêm vào sinh khối Probiotic các chất bảo vệ thích hợp, sinh khối được đông khô hoặc phun sấy lạnh để chuyển thành dạng bột. Nguyên liệu được sản xuất bằng cách trộn một hoặc nhiều sinh khối chủng vi sinh vật với chất độn, chất pha loãng phù hợp. Nguyên liệu tiếp tục được xử lý để sản xuất thành phẩm với các dạng bào chế khác nhau, ví dụ: viên nén, viên nang, viên nang mềm, bột hoặc gel...

Định tính vi sinh vật

Các Probiotic (vi sinh vật sống) trong chuyên luận này được định tính đến cấp độ chi và loài hoặc đến cấp độ chủng theo yêu cầu của các chuyên luận riêng. Dựa trên các thông tin từ việc đánh giá mức độ an toàn và các nghiên cứu trên người mà việc qui định thành phẩm Probiotic phải được bào chế từ các chủng vi sinh vật trở nên phổ biến, do vậy việc định tính vi sinh vật đến cấp độ chủng là cần thiết để xác minh đúng tên chủng được ghi trên nhãn sản phẩm thương mại. Trong chuyên luận này, việc định tính đến cấp độ chủng các Probiotic được thực hiện bằng phản ứng chuỗi polymerase (kỹ thuật PCR) với mỗi đặc hiệu được khuyến khích sử dụng. Qui trình định tính các chủng thuộc chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* bằng kỹ thuật PCR với các môi đặc hiệu được trình bày ở dưới đây.

Định tính các chủng thuộc chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* bằng kỹ thuật PCR với các môi đặc hiệu

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong các chuyên luận riêng, tiến hành định tính theo qui trình chung sau đây. Các hóa chất, thuốc thử phải đạt tiêu chuẩn sử dụng cho sinh học phân tử, xem mục "**Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử**" và Phụ lục 2. Có thể sử dụng các hóa chất, thuốc thử dưới dạng thương phẩm có chất lượng phù hợp.

PCR master mix: Hỗn hợp gồm Taq DNA polymerase (62,5 U/mL), dung dịch đệm 2,5X [kali clorid 125 mM, tris-hydroclorid 75 mM pH 8,3, và maginesi (Mg^{+2}) 4 mM], và 500 μ M của mỗi deoxynucleotid (dNTP)¹.

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

Cặp môi: Sử dụng cặp môi đặc hiệu cho từng chủng vi sinh vật theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng. Pha dung dịch môi gốc có nồng độ 100 μ M bằng dung dịch đệm, tiếp tục pha loãng đến nồng độ 25 μ M bằng dung dịch đệm. Có thể bảo quản dung dịch môi pha loãng có nồng độ 25 μ M ở -20 °C.

Mẫu thử: Đối với mỗi cặp mỗi đặc hiệu chuẩn bị dịch chứa 10 µL PCR master mix, 1 µL dung dịch mỗi xuôi (25 µM), 1 µL dung dịch mỗi ngược (25 µM) và 12 µL nước vô khuẩn, 1 µL **hỗn dịch mẫu**.

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 (nếu có): tương tự như thành phần của mẫu thử, thay **hỗn dịch mẫu** bằng 1 µL mẫu chuẩn tương ứng.

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. Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt như sau:

Chu trình nhiệt: Bước 1: Ủ các mẫu ở 95°C trong 7 min để tách chiết DNA; Bước 2: ủ ở 95 °C trong 30 s; Bước 3: ủ ở nhiệt độ theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng trong 30 s; Bước 4: ủ ở 72 °C trong 30 s. Lặp lại các bước 2 đến bước 4 trong khoảng từ 30 đến 34 chu kỳ, ủ ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C. **Đối với các mẫu Probiotic khó tách chiết DNA cần nghiên cứu quy trình xử lý mẫu phù hợp.** Điện di sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu chứng dương, mẫu chứng âm. Có thể sử dụng hệ thống điện di tự động kèm bộ kit DNA (automated on-chip electrophoresis system) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sử dụng gel agarose 1 % (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**.

Thận trọng: **Ethidium bromid (TT)** là một chất độc hại và có khả năng gây đột biến. 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 phù hợp khác.

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 âm phải không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại gen nào. Nếu mẫu chứng âm xuất hiện sản phẩm khuếch đại gen, tiến hành lại phản ứng PCR với mẫu thử, mẫu chứng âm và **mẫu chứng dương (nếu có)**.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Phải đạt qui định theo chuyên luận riêng.

Định lượng

Chuyên luận này đưa ra qui trình định lượng các loài vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. Các phương pháp thay thế, bao gồm cả các phương pháp tự động, có thể được sử dụng nếu được chứng minh là tương đương.

Định lượng các loài vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, tiến hành định lượng các loài vi khuẩn trong chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* theo qui trình sau:

Môi trường thạch MRS *Lactobacilli*: Chuẩn bị môi trường có công thức như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn.

Thành phần	Khối lượng (g)
Proteose pepton	10,0
Cao thịt bò	10,0
Cao nấm men	5,0
Dextrose	20,0
Polysorbat 80	1,0
Amoni citrat	2,0
Natri acetat	5,0
Magnesi sulfat	0,1
Mangan sulfat	0,05
Dikali hydrophosphat	2,0
Thạch	15,0

Hòa các thành phần *môi trường thạch MRS Lactobacilli* trong 1 lít *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 môi trường hòa tan hoàn toàn, sau đó tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường lỏng MRS Lactobacilli: Chuẩn bị môi trường có công thức như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn.

Thành phần	Khối lượng (g)
Proteose pepton	10,0
Cao thịt bò	10,0
Cao nấm men	5,0
Dextrose	20,0
Polysorbat 80	1,0
Amoni citrat	2,0
Natri acetat	5,0
Magnesi sulfat	0,1
Mangan sulfat	0,05
Dikali hydrophosphat	2,0

Hòa các thành phần *môi trường lỏng MRS Lactobacilli* trong 1 lít *nước tinh khiết* 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 môi trường hòa tan hoàn toàn, sau đó tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

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

Hỗn dịch mẫu: Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, cân khoảng 11,0 g bột mẫu Probiotic vào túi polyetylen vô khuẩn (*túi dập mẫu*). Thêm 99 ml *môi trường lỏng MRS Lactobacilli* đã tiệt khuẩn vào túi (môi trường được để nguội đến nhiệt độ phòng). Trộn bằng máy lắc cơ học đến khi thu được hỗn dịch mẫu đồng nhất hoặc sử dụng máy dập mẫu (Stomacher) với tốc độ 230 rpm trong 30 s. Giữ hỗn dịch mẫu ở nhiệt độ phòng trong 30 min để phân tán mẫu *Probiotic* trong *môi trường lỏng MRS Lactobacilli*, sau đó trộn tiếp với tốc độ 230 rpm trong 30 s thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} . Có thể xử lý mẫu *Probiotic* bằng qui trình khác với hướng dẫn trên nếu được chứng minh là phù hợp.

Trong điều kiện vô khuẩn, sử dụng các đầu pipet vô khuẩn có màng lọc, tiến hành pha loãng bằng cách lấy 1,0 ml hỗn dịch *mẫu* có độ pha loãng 10^{-1} vào chai vô khuẩn chứa 99,0 ml dung dịch pepton pha loãng, thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-3} . Tiếp tục pha loãng như trên đến khi thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng cuối cùng dự kiến chứa 25 đến 250 CFU/ml. Lắc đều các chai hỗn dịch mẫu pha loãng trước khi tiến hành thử nghiệm.

Tiến hành: Trong điều kiện vô khuẩn, sử dụng 3 đầu pipet vô khuẩn có màng lọc, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu đã pha loãng vào ba đĩa Petri vô khuẩn kích thước 15 mm x 100 mm, được ghi nhãn thích hợp, sau đó đổ khoảng 20 - 25 ml *môi trường thạch MRS Lactobacilli* có nhiệt độ khoảng 45°C vào mỗi đĩa. Đậy nắp đĩa Petri sau khi đổ môi trường thạch, sau đó xoay nhẹ các đĩa để trộn đều *hỗn dịch* mẫu vào môi trường thạch. Lặp lại qui trình này với các hỗn dịch mẫu có độ pha loãng khác. Chuẩn bị một đĩa mẫu trắng chỉ chứa *môi trường thạch MRS Lactobacilli* và đĩa mẫu trắng thứ hai chứa 1,0 ml dung dịch pepton pha loãng trộn với *môi trường thạch MRS Lactobacilli*. Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng trên một bề mặt bằng phẳng cho đến khi thạch đông, ủ các đĩa Petri ở 36 °C đến 40 °C trong 3 ngày đến 5 ngày trong điều kiện kỵ khí. *Sau thời gian ủ, đếm số lượng khuẩn lạc ở mỗi đĩa. Lựa chọn các đĩa có 25 đến 250 khuẩn lạc để tính kết quả. Tính giá trị trung bình số khuẩn lạc của 3 đĩa có cùng nồng độ pha loãng và từ đó tính số khuẩn lạc theo đơn vị CFU/g.*

Giới hạn chấp nhận: Phải đạt qui định theo chuyên luận riêng.

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Mức độ tạp nhiễm vi sinh vật, vi sinh vật gây bệnh cần được qui định trong các chuyên luận riêng để đảm bảo chất lượng của chế phẩm Probiotic. Mức Giới hạn nhiễm vi sinh vật được qui định trong *Bảng 1.26.1* và *Bảng 1.26.2*. Có thể sử dụng các qui trình thay thế, bao gồm cả các phương pháp tự động nếu đã được chứng minh là tương đương. Có thể sử dụng các phương pháp thích hợp (ví dụ: pha loãng, dung dịch đệm hoặc màng lọc) để trung hòa các yếu tố ức chế, ví dụ như sản phẩm acid tự do của quá trình tăng sinh các vi sinh vật Probiotic có thể dẫn đến kết quả âm tính giả. Cần tiến hành đánh giá sự phù hợp phương pháp thử Giới hạn nhiễm vi sinh vật. Cần đánh giá lại sự phù hợp của phương pháp khi thay đổi điều kiện thử nghiệm hoặc thay đổi công thức sản phẩm có thể ảnh hưởng đến kết quả của thử nghiệm.

Tổng số vi sinh vật tạp nhiễm

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, phương pháp thử và giới hạn tổng số vi sinh vật tạp nhiễm trong nguyên liệu và thành phẩm Probiotic dùng đường uống được qui định trong *Bảng 1.26.1*.

Bảng 1.26.1. Phương pháp thử và giới hạn tổng số vi sinh vật tạp nhiễm trong nguyên liệu và thành phẩm Probiotic dùng đường uống

Chế phẩm Probiotic	Chỉ tiêu tạp nhiễm	Phương pháp thử	Giới hạn chấp nhận (CFU/g hoặc ml)
Vi khuẩn không sinh bào tử	Vi khuẩn không sinh acid lactic	Xác định tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic	$\leq 5 \times 10^3$
	Tổng số nấm	Phương pháp xác định tổng số vi sinh vật - Phụ lục 13.6	$\leq 10^2$
Vi khuẩn sinh bào tử	Tổng số nấm	Phương pháp xác định tổng số vi sinh vật - Phụ lục 13.6	$\leq 10^2$
Nấm	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	Phương pháp xác định tổng số vi sinh vật - Phụ lục 13.6	$\leq 10^3$

Vi sinh vật gây bệnh

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, phương pháp thử và giới hạn vi sinh vật gây bệnh tạp nhiễm trong nguyên liệu và thành phẩm Probiotic dùng đường uống được qui định trong *Bảng 1.26.2*.

Bảng 1.26.2. Phương pháp thử và giới hạn vi sinh vật gây bệnh tạp nhiễm trong nguyên liệu và thành phẩm Probiotic dùng đường uống

Chế phẩm Probiotic	Chỉ tiêu tạp nhiễm	Phương pháp thử	Tiêu chuẩn chấp nhận (CFU/g hoặc ml)
Vi khuẩn không sinh bào tử; Vi khuẩn sinh bào tử; Nấm	<i>Escherichia coli</i>	Phương pháp xác định vi sinh vật gây bệnh - Phụ lục 13.6	Không được có trong 10 g
	<i>Salmonella</i>	Phương pháp xác định vi sinh vật gây bệnh - Phụ lục 13.6	Không được có trong 10 g

Cần qui định thêm không được có *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* hoặc *Pseudomonas aeruginosa* nếu nguyên liệu hoặc thành phẩm Probiotic có nguy cơ tạp nhiễm các vi

sinh vật này. Đối với các chế phẩm Probiotic dùng cho trẻ sơ sinh cần qui định thêm không được có *Clostridium perfringens* và *Cronobacter sakazakii*. Phương pháp phát hiện *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* và *Cronobacter sakazakii* phải là phương pháp tiêu chuẩn hoặc phương pháp đã được thẩm định.

Xác định tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic

Môi trường nuôi cấy

Điều quan trọng của phương pháp này là không có mặt carbohydrat trong môi trường nuôi cấy.

Thành phần: Chuẩn bị môi trường có công thức như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn.

Thành phần	Khối lượng
Pepton từ casein	7,5 g
Pepton từ gelatin	7,5 g
Natri clorid	5,0 g
Thạch	10 g đến 15 g
Nước	1000 ml

Nếu sử dụng môi trường hoàn chỉnh khô **thương phẩm**: Thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Điều chỉnh pH nếu cần để sau khi tiệt khuẩn pH là $7,5 \pm 0,1$ ở 25°C .

Nếu chuẩn bị môi trường từ các thành phần khô riêng lẻ: Hòa tan các thành phần trong *nước* nóng, theo thứ tự: pepton từ casein, pepton từ gelatin, natri clorid. Thêm thạch và đun đến sôi, vừa đun vừa khuấy đến khi thạch tan hết hoặc đun cách thủy trong 30 min. Điều chỉnh pH nếu cần để sau khi tiệt khuẩn pH là $7,5 \pm 0,1$ ở 25°C .

Chuẩn bị hỗn dịch mẫu: Tiến hành chuẩn bị hỗn dịch mẫu theo phụ lục 13.6, mục “Kiểm tra sự phù hợp phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử”, “Chuẩn bị mẫu thử” sử dụng dung dịch đệm phosphat pH 7,2 hoặc dung dịch phù hợp để pha loãng.

Chuẩn bị các đĩa môi trường: Rót 12 ml đến 15 ml môi trường đã chuẩn bị vào các đĩa Petri, để môi trường đông đặc. Làm khô các đĩa, tốt nhất là sấy nắp và úp ngược đĩa môi trường, ủ trong tủ ẩm ở 50°C trong 30 min.

Tiến hành: Dùng pipet vô khuẩn cho vào mỗi đĩa 0,1 ml hỗn dịch mẫu có độ pha loãng thích hợp, tiến hành 2 đĩa Petri đối với mỗi nồng độ pha loãng. Dùng bộ dàn mẫu vô khuẩn để dàn nhanh dịch cấy một cách cẩn thận lên bề mặt đĩa, chú ý không chạm vào thành đĩa. Sử dụng riêng bộ dàn mẫu vô khuẩn cho mỗi đĩa. Sấy nắp, để yên các đĩa khoảng 15 min trên bàn để cho dịch cấy hấp thụ vào các đĩa. Lật úp đĩa và ủ ở 30°C trong 72 ± 2 h.

Sau khi ủ, đếm số lượng khuẩn lạc. Đếm các khuẩn lạc đặc trưng đối với vi sinh vật tạp nhiễm trong mỗi đĩa chứa không quá 150 khuẩn lạc. Không đếm các khuẩn lạc nhỏ vì chúng không điển hình cho các vi sinh vật tạp nhiễm.

Thông tin về nguồn gốc sự tạp nhiễm có thể thu được bằng cách kiểm tra khuẩn lạc có mặt. Điều này có thể rất giá trị do đó cần ghi lại các loại khuẩn lạc có mặt (ví dụ: nấm men, mốc, *Bacillus sp* ... thuần chủng hay hỗn tạp)

Tính kết quả

Giữ lại các đĩa có từ 10 đến 150 khuẩn lạc đặc trưng ở hai độ pha loãng liên tiếp.

Tính số lượng, N, vi sinh vật tạp nhiễm trên gam mẫu Probiotic, theo công thức sau:

$$N = C / (n_1 + 0,1 \times n_2) \times V \times d$$

Trong đó

C: là tổng số khuẩn lạc đặc trưng đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại;

n_1 : là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất được giữ lại;

n_2 : là số đĩa của độ pha loãng thứ hai được giữ lại;

d: là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

V: Thể tích hỗn dịch mẫu ở độ pha loãng thứ nhất

Biểu thị kết quả

Làm tròn kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Đối với chữ số thứ ba, làm tròn chữ số thứ ba này đến zero gần nhất. Nếu chữ số thứ ba này là 5 thì làm tròn đến số thấp hơn nếu chữ số thứ hai là chẵn và làm tròn đến số cao hơn nếu số thứ hai là số lẻ.

Ví dụ 234 thành 230
 235 thành 240
 225 thành 220
 236 thành 240

Nếu chỉ có số đếm nhỏ hơn 10, thì báo cáo số lượng vi sinh vật trên mỗi gam là “ít hơn 10 -/Vxd” (trong đó d là giá trị tương ứng với độ pha loãng thấp nhất). Cần viết lại công thức.

Kết quả được biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

Ví dụ: Thể tích hỗn dịch mẫu cấy vào môi trường là 1 ml

Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}): 83 khuẩn lạc và 97 khuẩn lạc

Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}): 13 khuẩn lạc và 10 khuẩn lạc

Tính kết quả theo công thức sau:

$$N = C/(n_1 + 0,1 \times n_2) \times V \times d = (83+97+13+10)/(2 + 0,1 \times 2) \times 1 \times 10^{-2} = 9227$$

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa là 9200 hoặc $9,2 \times 10^3$ vi sinh vật tạp nhiễm trong một gam mẫu Probiotic

Listeria

Môi trường tăng sinh *Listeria* (BLEB-Base): Chuẩn bị môi trường có công thức như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn

Thành phần	Khối lượng (g)
Bột khô môi trường lỏng casein đậu tương	30,0
Cao nấm men	6,0
Kali dihydrophosphat, khan	1,35
Dinatri hydrophosphat, khan	9,6
Natri pyruvat	1,11
Nước	1000 ml

Tiệt khuẩn môi trường theo quy trình đã thẩm định. pH môi trường sau khi tiệt khuẩn là $7,3 \pm 0,1$.

Dung dịch chọn lọc: lọc vô khuẩn từng dung dịch sau đây trước khi sử dụng

- Dung dịch acriflavin hydroclorid 0,5 % (kl/tt)
- Dung dịch natri acid nalidixic 0,5 % (kl/tt)
- Dung dịch cycloheximid 1,0 % trong ethanol 40 % (kl/tt)

Chuẩn bị mẫu thử:

Trong điều kiện vô khuẩn, chuẩn bị túi **dập mẫu** chứa 225 mL môi trường tăng sinh *Listeria*, 0,675 ml dung dịch acriflavin, 1,8 ml dung dịch muối natri acid nalidixic và 1,15 mL dung dịch cycloheximid. Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, thêm 25 g mẫu Probiotic và 2,5 ml dung dịch natri pyruvat 10% (kl/tt) đã lọc vô khuẩn vào túi **dập mẫu** và trộn đều bằng máy stomacher trong 2 min. Sau khi trộn, ủ mẫu ở 29 °C đến 31 °C trong 4 h. Sau thời gian ủ, thêm 0,9 ml môi trường tăng sinh *Listeria* vào mẫu thử, tiếp tục ủ ở 29 °C đến 31 °C trong 44 h đến 46 h. Đun nóng mẫu thử ở trên ở 95 °C đến 100 °C trong 15 min, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng. Tiến hành thử nghiệm ngay sau khi chuẩn bị mẫu thử.

Tiến hành

Sử dụng các bộ sinh phẩm chuẩn đoán *Listeria* (kit định danh *Listeria*²) có chất lượng phù hợp, tiến hành thử nghiệm với mẫu chứng dương, mẫu chứng âm và mẫu thử theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu kết quả của mẫu thử dương tính, cần tiến hành thêm các kỹ thuật khác để khẳng định sự có

mặt *Listeria*. Kết quả âm tính được báo cáo trên khối lượng mẫu đem thử (Ví dụ: Không phát hiện trong 25 g).

Có thể sử dụng các phương pháp khác để phát hiện *Listeria* nếu phương pháp được chứng minh là tương đương.

Coliform

Dung dịch pha loãng Butterfield: Hòa tan 34,0 g kali dihydrophosphat (TT) trong khoảng 500 ml nước cất. Điều chỉnh đến pH 7,2 bằng dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT), sau đó bổ sung nước đến 1 lít (dung dịch gốc). Pha loãng 1,25 ml dung dịch gốc vừa đủ 1 lít bằng nước (dung dịch pha loãng). Hấp tiệt khuẩn dung dịch pha loãng trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường lỏng Lauryl tryptose (LST): Chuẩn bị môi trường có thành phần như sau, hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn, pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần	Khối lượng
Tryptose (hoặc trypticase)	20,0 g
Lactose	5,0 g
Dikali hydrophosphat	2,75 g
Kali dihydrophosphat	2,75 g
Natri clorid	5,0 g
Natri lauryl sulfat	0,1 g
Nước	1000 ml

Hòa các thành phần trên trong 1 lít nước (làm ấm nếu cần). Chia 10 ml của dung dịch này vào các ống nghiệm hoặc lọ riêng lẻ có kích thước 20 mm × 150 mm có nắp vặn, mỗi lọ hoặc ống nghiệm chứa một ống lên men kích thước 10 mm × 75 mm đã úp ngược. Mức dung dịch trong ống hoặc lọ phải bao phủ các ống lên men đã úp ngược. Tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. Môi trường sau tiệt khuẩn có pH 6,8 ± 0,1.

Môi trường lỏng xanh brilliant lactose mật (BGLB): Chuẩn bị môi trường có thành phần như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn, pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Thành phần	Khối lượng
Pepton	10,0 g
Lactose	10,0 g
Mật bò khô	20,0 g
Dung dịch xanh brilliant 0,1 % (kl/tt)	13,3 ml
Nước	1000 ml

Hoà pepton và lactose trong 500 ml nước. Thêm 20 g mật bò khô đã hoà tan trong 200 ml nước. Trộn và thêm nước đến 975 ml. Điều chỉnh pH dung dịch đến 7,4. Thêm 13,3 ml dung dịch xanh brilliant (TT) 0,1 %, trộn đều sau đó thêm nước vừa đủ 1 lít. Lọc dung dịch qua vải cotton. Chia 10 ml của dung dịch này vào các ống nghiệm hoặc lọ riêng lẻ có kích thước 20 mm × 150 mm có nắp vặn, mỗi lọ hoặc ống nghiệm chứa một ống lên men kích thước 10 mm × 75 mm đã úp ngược. Mức dung dịch trong ống nghiệm hoặc lọ phải bao phủ các ống lên men đã úp ngược. Tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. Môi trường sau tiệt khuẩn có pH 7,2 ± 0,1.

Hỗn dịch mẫu: Chuyển 25 g mẫu Probiotic vào bình vô khuẩn của máy trộn tốc độ cao. Thêm 225 ml dung dịch pha loãng Butterfield vào bình, trộn đều trong 2 min, thu được hỗn dịch có độ pha loãng 10⁻¹. Có thể xử lý mẫu bằng qui trình khác với hướng dẫn trên nếu được chứng minh là phù hợp với mẫu thử.

Chuyển 1,0 ml hỗn dịch trên vào ống chứa 9 ml dung dịch pha loãng Butterfield vô khuẩn, sau đó trộn kĩ bằng máy lắc xoáy thu được hỗn dịch có độ pha loãng 10⁻². Tiếp tục pha loãng như trên để thu được hỗn dịch có độ pha loãng 10⁻³.

Lưu ý: Tiến hành thử nghiệm coliform trong vòng 15 min sau khi chuẩn bị hỗn dịch mẫu.

Tiến hành: Đối với mỗi nồng độ pha loãng, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu vào 3 ống chứa *môi trường lỏng LST* vô khuẩn đã chuẩn bị (10 ml/ống), được ghi nhãn thích hợp. Chú ý nhỏ từ từ hỗn dịch mẫu vào thành ống môi trường, không chạm đầu tip pipet vào môi trường và tránh tạo bọt khí. Ủ các ống ở 35 °C. Kiểm tra sự sinh khí của các ống sau 24 h ủ, quan sát sự thay đổi môi trường trong ống lên men úp ngược hoặc sủi bọt khí khi lắc nhẹ ống. Ghi lại kết quả ở tất cả các ống, sau đó ủ thêm các ống không sinh khí trong 24 h và ghi lại kết quả sau 48 ± 2 h. Các ống sinh khí được xem là dương tính giả định với coliform.

Thực hiện phép thử khẳng định coliform trên các ống dương tính giả định (có sinh khí). Từ mỗi ống có sinh khí, cấy chuyển một vòng quai cấy sang ống chứa *môi trường lỏng BGLB*, không lấy lớp màng mỏng (nếu có).

Tính số lượng coliform lớn nhất có thể có trong 1 g mẫu dựa trên tỷ lệ ống chứa môi trường lỏng LST sinh khí đã được khẳng định lại trên ba độ pha loãng liên tiếp bằng cách sử dụng Bảng 1.26.3.

Bảng 1.26.3: Số lượng coliform lớn nhất có thể có trong 1 g mẫu dựa trên tỷ lệ ống môi trường lỏng LST sinh khí đã được khẳng định lại trên ba độ pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

Số ống nghiệm có sự phát triển của coliform			Số lượng coliform lớn nhất có thể có trong 1 g	Số ống nghiệm có sự phát triển của coliform			Số lượng coliform lớn nhất có thể có trong 1 g
Độ pha loãng				Độ pha loãng			
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
0	0	0	<3	2	0	0	9,1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2 ^c	6	2	0	2	20
0	0	3 ^c	9	2	0	3 ^c	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6,1	2	1	1	20
1	1	2 ^c	9,2	2	1	2	27
0	1	3 ^c	12	2	1	3 ^c	34
0	2	0	6,2	2	2	0	21
0	2	1 ^c	9,3	2	2	1	28
0	2	2 ^c	12	2	2	2	35
0	2	3 ^c	16	2	2	3 ^c	42
0	3	0	9,4	2	3	0	29
0	3	1 ^c	13	2	3	1	36
0	3	2 ^c	16	2	3	2 ^c	44
0	3	3 ^c	19	2	3	3 ^c	53
1	0	0	3,6	3	0	0	23
1	0	1	7,2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3 ^c	15	3	0	3 ^c	95
1	1	0	7,3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2 ^c	15	3	1	2	120
1	1	3 ^c	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2 ^c	20	3	2	2	210
1	2	3 ^c	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1 ^c	20	3	3	1	460

1	3	2 ^c	24	3	3	2	1100
1	3	3 ^c	29	3	3	3	>1100

^c: Rất hiếm khi xảy ra kết quả này trong thực tế, cho thấy có sự ảnh hưởng đến độ hồi phục và/hoặc xác định các khuẩn lạc nghi ngờ ở các độ pha loãng thấp hơn. Trong những trường hợp này, Số lượng coliform lớn nhất có thể có trong 1 g trong bảng có thể thấp hơn nhiều so với giá trị thực.

Enterococci

Môi trường thạch muối mật Esculin: Chuẩn bị môi trường có công thức như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn.

Thành phần	Khối lượng (g)
Cao thịt bò	3,0
Pepton	5,0
Esculin	1,0
Mật bò	40,0
Sắt III citrat	0,5
Thạch	15,0
Nước	1000 mL

Hòa các thành phần trong lượng nước thích hợp, làm nóng hỗn hợp nếu cần. Tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. pH sau khi tiệt khuẩn là $6,6 \pm 0,2$.

Môi trường lỏng tim nảo: Chuẩn bị môi trường có công thức như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn.

Thành phần	Khối lượng (g)
Dịch tim nảo	6,0
Pepton từ mô động vật	6,0
Natri clorid	5,0
Glucose khan	3,0
Gelatin thủy phân bởi pancreatin	14,5
Dinatri hydrophosphat	2,5
Nước	1000 mL

Hòa các thành phần trong lượng nước thích hợp, đun nóng môi trường đến sôi, vừa đun vừa khuấy. Đun sôi trong 1 min để môi trường tan hoàn toàn. Tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. pH sau khi tiệt khuẩn là $7,4 \pm 0,2$.

Môi trường thạch KF Streptococcus: Chuẩn bị môi trường có công thức như sau hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn.

Thành phần	Khối lượng (g)
Proteose pepton	10,0
Cao nấm men	10,0
Natri clorid	5,0
Natri glycerophosphat	10,0
Maltose	20,0
Lactose	1,0
Natri azid	0,4
Đỏ tía bromocresol	0,015

Thành phần	Khối lượng (g)
Thạch	20
Nước	1000 mL

Hòa các thành phần trong lượng nước thích hợp, đun nóng môi trường đến sôi, vừa đun vừa khuấy. Đun sôi trong 1 min để môi trường tan hoàn toàn. Để môi trường nguội khoảng 45 °C đến 50 °C. Trong điều kiện vô khuẩn, thêm 10 mL dung dịch Triphenyl tetrazolium clorid 1 % đã được lọc vô khuẩn. pH sau khi tiệt khuẩn là $7,2 \pm 0,2$ ở 25 °C.

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

Chuẩn bị hỗn dịch mẫu: Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, trong điều kiện vô khuẩn lấy 25 g (hoặc 25 ml) mẫu Probiotic cho vào 225 mL dung dịch pepton loãng trong túi dập mẫu hoặc chai thủy tinh vô khuẩn. Dùng máy dập mẫu (Stomacher) để phân tán đều mẫu Probiotic hoặc lắc đều nếu chứa mẫu trong chai thủy tinh thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} . Tiếp tục pha loãng mẫu 10 lần để thu được các hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} ...

Tiến hành: Đối với mỗi hỗn dịch mẫu có độ pha loãng thích hợp, trong điều kiện vô khuẩn hút riêng rẽ 1,0 mL hỗn dịch mẫu vào 3 đĩa Petri 15 mm x 100 mm vô khuẩn, thêm khoảng 15 ml *môi trường thạch KF Streptococcus* vào mỗi đĩa, trộn đều. Song song tiến hành một đĩa trắng chỉ chứa *môi trường thạch KF Streptococcus* và một đĩa trắng thứ hai chứa 1,0 ml *dung dịch pepton loãng* đã được trộn với *môi trường thạch KF Streptococcus*. Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông, sau đó ủ các đĩa ở 34 °C đến 36 °C trong 48 ± 2 h. Sau khi ủ, đếm các khuẩn lạc *Enterococci* giả định có màu đỏ và hồng.

Cần khẳng định lại các khuẩn lạc đặc trưng mọc trên đĩa *môi trường thạch KF Streptococcus* thuộc chi *Enterococci* cầu khuẩn Gram dương, xếp thành đôi hoặc chuỗi ngắn). Thực hiện các bước sau, để khẳng định. Với mỗi đĩa *môi trường thạch KF Streptococcus*, chọn ít nhất 3 khuẩn lạc đặc trưng và cấy riêng rẽ vào các ống môi trường lỏng tim nảo, ủ ở 35 °C trong 18 đến 24 h. Với mỗi đĩa *môi trường thạch KF Streptococcus*, chọn ít nhất 3 khuẩn lạc đặc trưng và cấy riêng rẽ vào các ống chứa *môi trường thạch muối mật Esculin*, ủ ở 35 °C trong 18 đến 24 h. Sau khi ủ cả hai bộ ống, thêm vào mỗi ống 1 mL *dung dịch hydrogen peroxyd 3% (TT)*. Với các ống *môi trường lỏng tim nảo*, quan sát sự hình thành khí (có bọt khí tức là phản ứng catalase dương tính). Tiếp tục quan sát các ống *môi trường thạch muối mật Esculin*. Phản ứng catalase âm tính khi môi trường thạch muối mật Esculin bị sẫm màu hoặc có màu đen, xác nhận sự có mặt của *Enterococci*.

Có thể sử dụng các phương pháp khác đã được thẩm định để xác định sự có mặt của *Enterococci*.

Bảo quản

Điều kiện vận chuyển và bảo quản phải phù hợp với từng chủng cụ thể. Trừ khi có quy định khác trong chuyên luận riêng, nguyên liệu Probiotic nên được bảo quản trong túi kín chắc chắn và giữ ở nhiệt độ không quá 4 °C. Các thành phẩm Probiotic nên được bảo quản trong bao bì kín, nơi khô ráo, thoáng mát.

Ghi nhãn

Đối với nguyên liệu Probiotic, phải ghi ký hiệu chủng trên nhãn. Cần ghi tên chi, loài và chủng của các vi sinh vật trên nhãn nguyên liệu hoặc thành phẩm Probiotic. Trong trường hợp có cơ sở khoa học phù hợp, chẳng hạn như bằng chứng khoa học về lợi ích sức khỏe không phải do một chủng cụ thể, thì có thể ghi tên chi và loài trên nhãn thành phẩm Probiotic. Cần ghi rõ công thức tất cả các thành phần lợi khuẩn trong suốt thời hạn sử dụng của sản phẩm theo đơn vị CFU/g, CFU/đơn vị đóng gói, CFU/liều hoặc tương đương.

MỘT SỐ HÓA CHẤT, THUỐC THỬ SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU SINH HỌC PHÂN TỬ

Agarose

Polysaccharid thành phần chứa 1,3-linked β -D-galactopyranose and 1,4-linked 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose. Chất lượng phù hợp cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Dung dịch đệm TAE 1X

Hỗn hợp các chất hòa tan trong nước với nồng độ như sau: *Tris-hydroclorid (TT)* 40 mM, *acid acetic băng (TT)* 1% và *acid ethylenediaminetetra-acetic (EDTA) (TT)* 1 mM.

Dung dịch đệm TBE 1X

Hỗn hợp các chất hòa tan trong nước với nồng độ như sau: *Tris-base (TT)* 100 mM, *acid boric (TT)* 100 mM và *EDTA (TT)* 20 mM

Dung dịch đệm TE 1X

Hỗn hợp các chất hòa tan trong nước với nồng độ như sau: *Tris-hydroclorid (TT)* 10 mM, *EDTA (TT)* 1 mM.

Acid ethylenediaminetetra-acetic (EDTA)

(Ethylenedinitrilo)tetra-acetic acid

$C_{10}H_{16}N_2O_8 = 292,2$

Bột kết tinh màu trắng hoặc hầu như trắng, rất dễ tan trong nước.

Nhiệt độ nóng chảy: Khoảng 250 °C kèm phân hủy.

Dinatri edetat

Dinatri ethylenediaminetetra-acetat

$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O = 372,24$

Chất lượng phù hợp cho nghiên cứu sinh học phân tử

Ethidium Bromid

$C_{21}H_{20}N_3Br = 394,3$

Bột màu tím đến tím đỏ

Nước vô khuẩn

Nước tinh khiết vô khuẩn, không có nuclease, phù hợp cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Tris-hydroclorid

Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydroclorid

$C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl = 157,60$

Tinh thể không màu, chất lượng phù hợp cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Tris-base

Tris(hydroxymethyl)aminomethan

$C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl = 121,1$

Bột kết tinh màu trắng hoặc hầu như trắng, chất lượng phù hợp cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Chú thích

¹ 5 PRIME MasterMix Polymerase của VWR Scientific (www.vwr.com), AmpliTaq Gold DNA Polymerases của ThermoFisher Scientific (www.thermofisher.com) hoặc tương đương.

² Kit định danh *Listeria* của bioMérieux, Inc. (<http://www.biomérieux.com>) hoặc tương đương.

