

BACILLUS CLAUSII

Định nghĩa

Bacillus clausii là vi khuẩn ưa kiềm, Gram dương, hình que, sinh bào tử, di động, hiếu khí tùy ý. *Bacillus clausii* được sản xuất dưới dạng nguyên liệu đơn chủng chứa các bào tử chủng *Bacillus clausii* chỉ định đã được phun sấy khô. Các tá dược như chất độn hay chất pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành phải có số lượng vi khuẩn sống *Bacillus clausii* không ít hơn 100% so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng UBBC07: *Bacillus clausii* UBBC07 là chủng vi khuẩn đặc trưng, thuần chủng thuộc loài *Bacillus clausii*.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng đối với chủng *Bacillus clausii* UBBC07.

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: Tế bào sinh dưỡng hình que. Bào tử hình bầu dục có thể xuất hiện ở cuối tế bào sinh dưỡng tùy thuộc vào điều kiện sinh trưởng.

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

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

Dung dịch mẫu DNA: Lựa chọn khuẩn lạc đặc trưng trên *môi trường thạch BHI* thu được trong mục Định lượng. Lấy 2 ml *dung dịch đệm TE 1X (TT)* cho vào ống li tâm. Dùng que cấy vô khuẩn, cẩn thận lấy các tế bào ra khỏi thạch (chọn 1 khuẩn lạc lớn mọc trên bề mặt, hoặc 2 đến 3 khuẩn lạc nhỏ, trung bình hoặc kéo dài thời gian ủ thêm vài giờ để tạo ra các khuẩn lạc lớn trên bề mặt thạch), và phân tán tế bào trong ống li tâm có chứa *dung dịch đệm TE 1X (TT)*. Tiến hành tách chiết DNA bằng bộ kit tách chiết phù hợp. Trước khi tiến hành thử nghiệm pha loãng dung dịch DNA sau tách chiết bằng nước vô khuẩn để thu được dung dịch mẫu DNA chứa 50 đến 90 ng DNA/ μ L.

Cập môi: Xem Bảng 1.

Bảng 1: Các cặp môi và Tiêu chuẩn chấp nhận

Cặp môi	Trình tự môi	Tiêu chuẩn chấp nhận*
UBBC02	Môi xuôi (5'-3') TGTATCTAATCCAATTGTCGGTTCGTCCAT Môi ngược (5'-3') AGATGTGTATGAATAGTGTTATGGAGAGTGAGA Nhiệt độ biến tính của cặp môi: 64,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 516 cặp base
UBBC03	Môi xuôi (5'-3') ATTTGATGACGACGATTATTATGCACCACTCTA Môi ngược (5'-3') AGACTTAGCTAGGGCTGGAAACCAATGCTTGGTA Nhiệt độ biến tính của cặp môi: 68,7 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 447 cặp base

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

Dung dịch môi: Pha môi đến nồng độ 10 μ M bằng nước vô khuẩn và bảo quản ở nhiệt độ từ -20 °C đến -80 °C.

Mẫu thử: Đối với mỗi cặp mồi đặc hiệu, chuẩn bị dung dịch chứa 10 µL PCR master mix¹, 1 µL dung dịch mồi xuôi (10µM), 1 µL dung dịch mồi ngược (10 µM), 7 µL nước vô khuẩn và 1 µL *dung dịch mẫu DNA* (khoảng 50 - 90 ng)

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

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 clausii* UBBC07 hoặc thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng UBBC07 bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus clausii*.

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 30 s; Bước 3: ủ ở nhiệt độ biến tính của cặp mồi đặc hiệu trong 30 s; Bước 4: ủ ở 72°C trong 30 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. Điện di sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm. **Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Bacillus clausii* UBBC07 bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus clausii* thì phải chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mồi được chọn.**

Sử dụng gel agarose 1,5% (w/v) 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. 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 băng DNA được nhân bản bởi các cặp mồi đặc hiệu khác nhau (Bảng 1). 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.

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.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm phải không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại nào.

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 được quy định ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận (Bảng 1). Nếu sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus clausii*, 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.

Nếu kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm và/hoặc mẫu chứng dương không mong muốn, tiến hành lại phản ứng PCR với mẫu thử, mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Xem Bảng 1.

Định lượng

Dung dịch nước muối sinh lý: Chuẩn bị dung dịch *natri clorid (TT)* 0,9 % (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.

Môi trường thạch BHI (Brain heart infusion agar): Chuẩn bị môi trường có công thức ghi trong Bảng 2 hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 2: Thành phần môi trường thạch BHI

Thành phần	Khối lượng (g)
Dịch chiết HM (Meat infusion)	12,5
Dịch chiết tim não BHI (Brain Heart Infusion)	5,0
Proteose pepton	10,0
Dextrose khan	2,0
Natri clorid	5,0
Dinatri phosphat khan	1,3
Thạch	15,0
pH	7,4 ± 0,2

Hòa các thành phần trên 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 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.

Hỗn dịch mẫu: Trong điều kiện vô khuẩn, cân 1,0 g mẫu probiotic vào bình thủy tinh dung tích 250 ml chứa 200 ml dung dịch nước muối sinh lý và lắc trộn bằng máy trộn đồng nhất mẫu ở tốc độ 12000 - 16000 rpm trong 3 min, thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng $0,5 \times 10^{-2}$. 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 $0,5 \times 10^{-2}$ vào các ống nghiệm vô khuẩn chứa 9,0 ml dung dịch nước muối sinh lý. Tiếp tục pha loãng như trên đến khi thu được hỗn dịch mẫu ở độ pha loãng cuối cùng dự kiến chứa **25 - 250 CFU/ml**. Ủ ống nghiệm chứa hỗn dịch mẫu thử ở độ pha loãng cuối trong bể ổn nhiệt ở 75°C trong 30 min, sau đó làm nguội ngay về nhiệt độ dưới 45°C. Tiến hành trộn môi trường với hỗn dịch mẫu này trong 10 đến 20 phút sau bước chuẩn bị hỗn dịch mẫu. Lắc đều ống nghiệm chứa hỗn dịch mẫu và bình môi trường trước khi tiến hành thử nghiệm.

Tiến hành: Trong điều kiện vô khuẩn, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu vào ba đĩa Petri vô khuẩn kích thước 15 mm x 100 mm, được ghi nhãn thích hợp, sau đó đổ khoảng 15 - 20 ml *môi trường thạch BHI* đã tan chảy vào mỗi đĩa. Đậy nắp đĩa Petri, sau đó xoay nhẹ các đĩa để trộn đều mẫu vào môi trường thạch. Chuẩn bị một đĩa mẫu trắng chỉ chứa *môi trường thạch BHI* và đĩa mẫu trắng thứ hai chứa 1,0 ml dung dịch nước muối sinh lý trộn với *môi trường thạch BHI*.

Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông, lật ngược đĩa và ủ các đĩa ở $40 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 48 h. 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 lượng khuẩn lạc của các đĩa có cùng nồng độ pha loãng sau đó tính số khuẩn lạc theo đơn vị CFU/g.

Các đĩa mẫu trắng không được xuất hiện khuẩn lạc nào.

Giới hạn chấp nhận: Không ít hơn 100 % số lượng vi khuẩn sống so với lượng ghi trên nhãn. Số lượng vi khuẩn được ghi theo đơn vị CFU/g.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 5%.

(1 - 2 g, Phụ lục 9.6, 100 °C, áp suất không quá 133,3 Pa, 4 h).

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

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

Escherichia coli, *Salmonella* (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. Phương pháp phát hiện các vi sinh vật này phải là phương pháp tiêu chuẩn hoặc phương pháp đã được thẩm định.

Đóng gói và bảo quản

Để nơi mát, khô ráo trong đồ đựng kín.

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.

Chú thích:

¹ Dream Taq Green PCR Master mix (2X) của hãng Thermo Fisher (www.thermofisher.com), hoặc tương đương.