

### *Lactobacillus rhamnosus*

<b>Tipo de Publicación</b>	Boletín de Revisión
<b>Fecha de Publicación</b>	18-dic-2020
<b>Fecha Oficial</b>	1-may-2021
<b>Comité de Expertos</b>	Suplementos Dietéticos No Botánicos

De conformidad con las Reglas y Procedimientos del Consejo de Expertos, el Comité de Expertos en Suplementos Dietéticos No Botánicos ha revisado la monografía de *Lactobacillus rhamnosus*. El propósito de esta revisión es hacer una corrección en los *Criterios de aceptación para Identificación A. Identificación Microscópica*.

Antes de este Boletín de Revisión, se publicó una revisión de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 en *USP 2021 Número 1* (que será oficial a partir del 1 de mayo de 2021) para unificar la cepa HN001 y la nueva cepa GG. Además, el nombre de la monografía se cambió a *Lactobacillus rhamnosus*.

El Boletín de Revisión de *Lactobacillus rhamnosus* reemplaza la monografía oficial vigente y será incorporado en una próxima publicación.

Para cualquier pregunta, por favor contactar a Maria Monagas, Enlace Científico (301-230-7422 o [mjm@usp.org](mailto:mjm@usp.org)).

**Cambio en la redacción:**

***Lactobacillus rhamnosus***<sup>▲</sup>▲ (USP 1-may-2021)

Para ver el Aviso del Comité de Expertos que fue publicado junto con esta revisión acelerada, hacer clic en <https://www.uspnf.com/rb-lactobacillus-rhamnosus-20201218-esp>.

**DEFINICIÓN**

**Cambio en la redacción:**

▲ *Lactobacillus rhamnosus* es una bacteria heterofermentadora y gram-positiva, en forma de bastón, que no forma esporas. Las células son bacilos sin motilidad, a menudo con extremos cuadrados, que se presentan de forma individual o en cadenas. La arginina no es hidrolizada. Se pueden agregar crioprotectores adecuados a la bacteria concentrada después de la fermentación, después de lo cual el producto se congela y luego se liofiliza. El producto formulado puede mezclarse con diluyentes y/o agentes de volumen adecuados. Contiene no menos de 100% del recuento declarado de células viables de la cepa apropiada de *Lactobacillus rhamnosus*.

- **Cepa HN001:** La cepa HN001 es una cepa pura y específica de *Lactobacillus rhamnosus*. Es una cepa no productora de D-lactato. ▲ Contiene plásmidos.▲ (BR 1-may-2021)
- **Cepa GG:** La cepa GG es una cepa pura y específica de *Lactobacillus rhamnosus*. Es una cepa no productora de D-lactato.▲ (USP 1-may-2021) ▲ No contiene ningún plásmido.▲ (BR 1-may-2021)

**IDENTIFICACIÓN**

**Cambio en la redacción:**

• **A. ▲ IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA**

**Análisis:** Proceder según se indica en la *Valoración* y realizar el examen microscópico.

**Criterios de aceptación:**

- **Cepa HN001:** Se presenta como bacilos de distintas longitudes, en cadenas cortas. ▲▲ (BR 1-may-2021)
- **Cepa GG:** Se presenta como bacilos pequeños uniformes, en cadenas.▲▲ (BR 1-may-2021)▲ (USP 1-may-2021)

**Cambio en la redacción:**

• **▲B.▲ (USP 1-may-2021) IDENTIFICACIÓN BASADA EN ÁCIDOS NUCLEICOS**

[NOTA—Para todos los casos en *Identificación*

▲B▲ (USP 1-may-2021), "agua estéril" se refiere a agua estéril exenta de nucleasas adecuada para uso en biología molecular.<sup>1</sup>]

**Solución amortiguadora:** Usar una solución amortiguadora de grado para biología molecular de clorhidrato de Tris 10 mM con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sódico 1 mM.<sup>2</sup>

**Solución muestra:** 100 mg/mL del polvo probiótico liofilizado en *Solución amortiguadora*

▲ **Sets de cebadores (primers):** Ver la *Tabla 1*.

▲ **Dilución del cebador:** Los cebadores deben diluirse con *Solución amortiguadora* hasta una concentración madre de

100 µM, y luego diluirse adicionalmente con *Solución amortiguadora* hasta 25 µM y almacenarse a

–20°.▲ (USP 1-may-2021)

**Preparación de la muestra para reacción en cadena de la**

**polimerasa (PCR):** 1 µL de *Solución muestra*,

▲12,5▲ (USP 1-may-2021) µL de polimerasa

mastermix,▲<sup>3</sup>▲ (USP 1-may-2021) 1 µL de cebador directo diluido (25 µM), 1 µL de cebador inverso diluido (25 µM) y

▲9,5▲ (USP 1-may-2021) µL de agua estéril

**Control negativo para PCR:** Preparar según se indica en

*Preparación de la muestra para PCR*, reemplazando el volumen de *Solución muestra* (1 µL) con 1 µL de agua estéril.

▲ **Control positivo para PCR:** Preparar según se indica en

*Preparación de la muestra para PCR*, reemplazando la *Solución muestra* con 1 µL del ADN genómico de la cepa de referencia o reemplazando los cebadores específicos de la cepa con cebadores universales específicos de la especie

para *Lactobacillus rhamnosus*.▲ (USP 1-may-2021)

**Amplificación por PCR:** Realizar una PCR en la *Preparación de la muestra para PCR*, el *Control negativo para PCR* ▲ y el *Control positivo para PCR*▲ (USP 1-may-2021) usando un

termociclador apropiado.<sup>4</sup> Incubar a 95° durante

▲10▲ (USP 1-may-2021) minutos (etapa 1), 95° durante 30

segundos (etapa 2), 57,0° durante 30 segundos (etapa 3)

y a 72° durante ▲1 minuto▲ (USP 1-may-2021) (etapa 4). Repetir

las etapas 2–4 por 34 ciclos, luego incubar a 72° durante 5 minutos y mantener a 4°.

**Análisis:** Analizar los productos de la *Amplificación por PCR* para la *Preparación de la muestra para PCR* y el *Control negativo para PCR* usando un sistema automatizado de

electroforesis en chip con kit para análisis de ADN.<sup>5</sup> Seguir las instrucciones del fabricante para el análisis. Como

alternativa, se puede llevar a cabo el análisis y la

visualización usando electroforesis en gel. Preparar o usar un gel de agarosa al ▲2%▲ (USP 1-may-2021) (p/v) disponible

comercialmente en una solución amortiguadora de tris-ácido acético-EDTA 1X (clorhidrato de Tris 40 mM,

ácido acético glacial al 1% y EDTA 1 mM). Teñir el gel con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio en agua y decolorar con

agua desionizada. [PRECAUCIÓN—El bromuro de etidio se considera una sustancia tóxica y un posible mutágeno. Usar

equipos de protección personal apropiados, incluyendo guantes de nitrilo, al manipular este reactivo.] Usar un

estándar de pares de bases de ADN (1 kilobase plus DNA ladder)<sup>6</sup> adecuado para determinar el tamaño de los

fragmentos lineales de ADN de doble cadena

▲▲ (USP 1-may-2021) amplificados con los *Sets de cebadores*

descritos en la *Tabla 1*. El estándar de pares de bases debe usarse en la primera y última calle del gel para lograr una

comparación apropiada de los amplicones.

▲ Si se usa el ADN genómico de las cepas como control positivo, el análisis del *Control positivo para PCR* debe dar

como resultado la amplificación de pares de bases específicos según se indica en los criterios de aceptación.

Si se usan cebadores universales específicos de la especie como control positivo, el análisis del *Control positivo*

*para PCR* debe dar como resultado la amplificación de pares de bases específicos según se indica en la literatura

<sup>3</sup> AmpliTaq Gold 360 Master Mix de Applied Biosystems ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) o equivalente.

<sup>4</sup> Se encuentran disponibles termocicladores adecuados en Eppendorf ([www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)).

<sup>5</sup> Se encuentran disponibles sistemas automatizados de electroforesis en chip con kits para análisis de ADN adecuados (p. ej., Agilent 2100 Bioanalyzer with Agilent DNA 1000 Kit) en Agilent ([www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com)).

<sup>6</sup> Se encuentran disponibles marcadores de pares de bases de ADN (más de 1 kilobase) adecuados en Life Technologies (<https://www.thermofisher.com/us/en/home.html>).

<sup>1</sup> Se puede obtener Agua Certificada para PCR exenta de RNAsas y DNAsas adecuada en Teknova ([www.teknova.com](http://www.teknova.com)).

<sup>2</sup> Se pueden obtener soluciones amortiguadoras adecuadas (p. ej., TE Buffer 1X, Molecular Biology Grade) en Promega ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

**Tabla 1. Sets de Cebadores y Criterios de Aceptación**

Cepa	Set de Cebadores <sup>a</sup>	Secuencia de Cebador Directo	Secuencia de Cebador Inverso	Criterios de Aceptación <sup>b</sup>
HN001	1	(5'-3') CACCTGCGATCAAAGC-GAAAC	(5'-3') GCTCCCACCGGCACATTA	Producto de amplificación de 340 pares de bases.
GG	1	(5'-3') GTGATCGGAA-CATCTTGGCCACTTGTGTTG	(5'-3') ACTTAATCAAACAAGG-CAAGCTGGACGATG	Producto de amplificación de 552 pares de bases; puede dar como resultado diferentes amplicones en otras cepas.
	2	(5'-3') CTCCACATTGCGCCAAA-CA	(5'-3') ACAACCTTCACCACGAC-CAA	Producto de amplificación de 388 pares de bases con 1 polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés); puede dar como resultado un amplicón similar en otras cepas. La secuencia SNP se identifica como (subrayado en la siguiente secuencia de 21 pares de bases) ACCAATG-TAAaCATAcCCATC y se encuentra a 250 pares de bases, a partir del extremo 3' del cebador directo descrito en <i>Set de cebadores 2</i> . La secuencia del amplicón debe determinarse mediante tecnologías de secuenciación estándar validadas, tal como la secuenciación de Sanger.
	3	(5'-3') GCCGGTTGTCAGTGAC-CATA	(5'-3') AGACAAATGCCTG-GATGCCT	Producto de amplificación de 293 pares de bases con 2 SNP; puede dar como resultado un amplicón similar en otras cepas. El primer SNP se identifica como (subrayado en la siguiente secuencia de 21 pares de bases) TCTTCCCGACtTAGCAGGGA y se encuentra a 71 pares de bases, a partir del extremo 3' del cebador directo descrito en <i>Set de cebadores 3</i> . El segundo SNP se identifica como (subrayado en la siguiente secuencia de 21 pares de bases) TCAGGCGCAtTATGAAGATGG y se encuentra a 98 pares de bases, a partir del extremo 3' del cebador directo descrito en <i>Set de cebadores 3</i> . La secuencia del amplicón debe determinarse mediante tecnologías de secuenciación estándar validadas, tal como la secuenciación de Sanger.
	4	(5'-3') TGCAACACATCAAGC-GATTGG	(5'-3') TCATAACCAGCA-TACGCCGG	Producto de amplificación de 490 pares de bases. No debe presentarse un producto de amplificación de 367 pares de bases; puede dar como resultado un amplicón similar en otras cepas.

<sup>a</sup> Se pueden obtener comercialmente cebadores (primers) de ADN (de fabricación por encargo) en Integrated DNA Technologies ([www.idtdna.com/pages](http://www.idtdna.com/pages)) y otras fuentes comerciales.

<sup>b</sup> Se deben cumplir los criterios de aceptación de cada set de cebadores para comprobar la identidad de la cepa.

publicada.▲ (USP 1-may-2021) El análisis del *Control negativo para PCR* debe dar como resultado la ausencia de productos de amplificación; de lo contrario, se debe repetir la *Preparación de la muestra para PCR* y el *Control negativo para PCR*, seguido de la *Amplificación por PCR* y el *Análisis*.

**Criterios de aceptación:** ▲Ver la *Tabla 1*.▲ (USP 1-may-2021)

## VALORACIÓN

### Cambio en la redacción:

#### • RECuento

▲Análisis: Proceder según se indica en el capítulo general *Pruebas para Probióticos (64)*.▲ (USP 1-may-2021)

**Criterios de aceptación:** No menos de 100% del recuento declarado de células viables, en ufc/g

## CONTAMINANTES

[NOTA—Los métodos de análisis microbiano incluidos en esta sección como ejemplos representan métodos actualmente aceptados y usados comúnmente en la industria. Los usuarios pueden usar otros métodos de prueba validados en lugar de los métodos de esta sección.]

### Eliminar lo siguiente:

▲• **PRUEBAS DE RECuento MICROBIANO (2021):** El recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 10<sup>2</sup> ufc/g.▲ (USP 1-may-2021)

**Eliminar lo siguiente:**

- ▲ **BACTERIAS NO PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO:** Número estándar internacional ISO 13559 (IDF 153), disponible en International Organization for Standardization (Organización Internacional para la Estandarización) ([www.iso.org](http://www.iso.org)). El recuento total de bacterias no productoras de ácido láctico es menos de  $5 \times 10^3$  ufc/g.▲ (USP 1-may-2021)

**Eliminar lo siguiente:**

- ▲ **AUSENCIA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS** (2022), *Procedimientos de Prueba, Prueba de Ausencia de Escherichia coli y Prueba de Ausencia de Salmonella spp.:* Cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*. Cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Salmonella* spp. en 40 g.▲ (USP 1-may-2021)

**Agregar lo siguiente:**

- ▲ **PRUEBAS PARA PROBIÓTICOS** (64), *Contaminantes, Microorganismos Contaminantes:* El recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de  $10^2$  ufc/g. El recuento total de bacterias no productoras de ácido láctico es menos de  $5 \times 10^3$  ufc/g.▲ (USP 1-may-2021)

**Agregar lo siguiente:**

- ▲ **PRUEBAS PARA PROBIÓTICOS** (64), *Contaminantes, Microorganismos Específicos:* Cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli* en 10 g. Cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Salmonella* spp. en 40 g.▲ (USP 1-may-2021)
- **LISTERIA:** (Ver *Food Chemicals Codex*, Appendix XV, disponible solo en inglés.) Cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Listeria* en 25 g.

**REQUISITOS ADICIONALES**

- **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en bolsas de laminado de aluminio de barrera alta. Almacenar a una temperatura de 4° o menor.

**Cambio en la redacción:**

- **ETIQUETADO:** Este ingrediente debe etiquetarse con los nombres del género, especie y cepa, y con el recuento formulado en ufc/g (o unidades similares). Esta monografía aplica solo a las ▲cepas HN001 y GG▲ (USP 1-may-2021) de *Lactobacillus rhamnosus* y a ninguna otra cepa de cultivos de *Lactobacillus rhamnosus*.