

Thử nghiệm đánh giá an toàn và tác dụng của sản phẩm bào tử lợi khuẩn *Bacillus* trên trẻ em tiêu chảy kéo dài

Đặng Thuý Hà^{1*}, Trần Minh Điền¹, Phùng Thị Bích Thuý¹, Nguyễn Thị Việt Hà¹, Bùi Thị Phương Anh², Vũ Hải Yến¹, Lương Thị Minh¹, Nguyễn Thị Thu Trang¹, Phạm Thị Thanh Nga¹, Nguyễn Thị Ngọc Hồng¹, Lê Thị Hương¹, Nguyễn Văn Ngoan¹, Nguyễn Minh Hằng¹, Trịnh Thị Hương¹, Bùi Thị Huyền², Võ Thị Ngọc Hảo², Nguyễn Thị Vân Anh², Nguyễn Hoà Anh^{2,3}

¹Bệnh viện Nhi Trung ương, 8/879 La Thành, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Công ty TNHH ANABIO R&D, 22 Lô 7+8 Khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

³Công ty TNHH LiveSpo Pharma, N03 T5 Ngoại Giao Đoàn, phường Xuân Tảo, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/9/2023; ngày chuyển phản biện 10/9/2023; ngày nhận phản biện 25/9/2023; ngày chấp nhận đăng 29/9/2023

Tóm tắt:

Tiêu chảy kéo dài (TCKD) ở trẻ dưới 24 tháng tuổi cho đến nay vẫn đang là một vấn đề sức khỏe cộng đồng toàn cầu, trong đó có Việt Nam. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành một thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên, mù đôi, có đối chứng, để đánh giá hiệu quả của 2 loại probiotic dạng bào tử lợi khuẩn *Bacillus*, gồm LiveSpo CLAUSY chứa *B. clausii* 2 tỷ CFU/ống 5 ml; LiveSpo DIA30 chứa *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* 5 tỷ CFU/ ống 5 ml, trong hỗ trợ điều trị cho trẻ em bị TCKD. Trẻ được phân nhóm ngẫu nhiên vào nhóm chứng (sử dụng nước RO) và 2 nhóm thử nghiệm là Clausy (sử dụng LiveSpo CLAUSY) và Dia30 (sử dụng LiveSpo DIA30), n=30/nhóm. Cả 3 nhóm đều được điều trị theo phác đồ thường quy tại bệnh viện bổ sung giả dược hay probiotic ở liều cao lên tới 4-6 ống/ngày. Kết quả cho thấy, bào tử lợi khuẩn *Bacillus* giúp rút ngắn thời gian điều trị khoảng 1-3 ngày và tăng hiệu quả điều trị 1,3-2,4 lần so với nhóm chứng trong việc giảm ba triệu chứng điển hình của tiêu chảy, gồm: đi ngoài ≥ 3 lần/ngày, phân có nhầy và phân lỏng - toé nước, trong đó LiveSpo DIA30 có hiệu quả tốt hơn so với LiveSpo CLAUSY 10-50%. Đây là nghiên cứu đầu tiên trên thế giới chứng minh hiệu quả hỗ trợ điều trị triệu chứng của bào tử lợi khuẩn *Bacillus* ở liều cao trên trẻ em bị TCKD.

Từ khóa: *Bacillus*, bào tử lợi khuẩn, probiotic, tiêu chảy kéo dài.

Chỉ số phân loại: 3.2, 3.3

1. Đặt vấn đề

TCKD là tình trạng đi ngoài phân lỏng hoặc nước bất thường xảy ra ít nhất 3 lần/ngày, kéo dài từ 2-4 tuần. Định nghĩa này loại trừ các bệnh tiêu chảy do nguyên nhân khác như tiêu chảy do dị ứng thức ăn, các bệnh lý đường ruột bẩm sinh và bệnh Celiac [1]. Đây là một vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng, đặc biệt ảnh hưởng đến trẻ nhỏ, gây ra tỷ lệ tử vong cao và ảnh hưởng đến sự phát triển của trẻ. Tiêu chảy là nguyên nhân gây tử vong thứ 3 trên toàn cầu ở trẻ dưới 5 tuổi, với khoảng 443,832 ca tử vong mỗi năm. Tổng cộng có gần 1,7 tỷ ca bệnh tiêu chảy ở trẻ em hàng năm, đồng thời cũng là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây suy dinh dưỡng ở nhóm tuổi này [2]. Tỷ lệ mắc TCKD có sự khác biệt đáng kể giữa các khu vực. Ở các nước có nguồn thu nhập thấp và trung bình, tỷ lệ mắc TCKD thường dưới 10%, dao động 1,4-28,4%. Trong khi đó, ở các nước phát triển, thông tin về tỷ lệ mắc bệnh còn hạn chế. Tuy nhiên, nghiên cứu tại Hoa Kỳ cho thấy, khoảng 8% các trường hợp tiêu chảy cấp tiến triển thành TCKD [3, 4].

Các nghiên cứu cho thấy, TCKD là hậu quả của nhiều tác nhân gây bệnh khác nhau. Điều này phù hợp với quan sát TCKD phổ biến hơn ở những khu vực có điều kiện vệ sinh kém, nơi môi trường chứa nhiều tác nhân gây bệnh đường ruột. Nhiều loại vi khuẩn, virus, ký sinh trùng đều có thể dẫn đến TCKD ở trẻ em. Một số mầm bệnh đặc biệt liên quan đến TCKD bao gồm *E. coli* bám dính (EAEC), *E. coli* gây bệnh đường ruột (EPEC), *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* spp. hay *Cryptosporidium* spp. và *Giardia lamblia*. Ngoài ra, các mầm bệnh do virus như Rotavirus, Adenovirus và

Norovirus là nguyên nhân chính gây tiêu chảy cấp tính, nhưng cũng có thể dẫn đến TCKD sau những đợt bùng phát nghiêm trọng [5]. Tiêu chảy sau viêm ruột: là tình trạng tổn thương niêm mạc ruột vẫn tồn tại sau các đợt nhiễm trùng cấp tính, và sự thiếu hụt men disaccharidase thứ phát làm tăng tính nhạy cảm với thức ăn, cũng như sự thay đổi hệ vi sinh đường ruột, góp phần dẫn đến bệnh TCKD [6]. Tiêu chảy liên quan đến kháng sinh là tình trạng đi ngoài phân lỏng hoặc nước bất thường từ 3 lần/ngày sau khi dùng kháng sinh, có thể xảy ra trong vòng vài giờ đến 8 tuần sau khi bắt đầu uống kháng sinh [7].

Để điều trị TCKD hiệu quả, bên cạnh bù nước điện giải, bổ sung kẽm, sử dụng kháng sinh hợp lý và chế độ ăn theo khuyến cáo. Ngày nay, với mục tiêu khôi phục hệ vi sinh đường ruột về trạng thái “eubiotic-cân bằng” và khỏe mạnh, việc sử dụng probiotics đóng vai trò quan trọng [8]. Nhiều thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng (Randomized Controlled Trials, RCTs) đã chứng minh tác dụng của probiotic trong hỗ trợ điều trị bệnh lý đường ruột. Ví dụ, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) và *Saccharomyces boulardii* có hiệu quả trong điều trị bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính (AGE) ở trẻ em làm giảm đáng kể thời gian tiêu chảy. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, probiotic thuộc các loài như *L. rhamnosus*, *S. boulardii* và *B. bifidum* có thể giảm tần suất và mức độ nặng của bệnh do các tác nhân gây bệnh khác nhau, bao gồm Rotavirus, *C. difficile* và các chủng của *E. coli* [9, 10].

So với những loài vi khuẩn và nấm men probiotic đã được đề cập, các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có ưu điểm là có

*Tác giả liên hệ: Email: dr.dangthuyha@gmail.com

Evaluate the safety and effectiveness of *Bacillus* probiotic spores in children with persistent diarrhea

Thuy Ha Dang^{1*}, Minh Dien Tran¹, Thi Bích Thuy Phung¹, Thi Viet Ha Nguyen¹, Thi Phuong Anh Bui², Hai Yen Vu¹, Thi Minh Luong¹, Thi Thu Trang Nguyen¹, Thi Thanh Nga Pham¹, Thi Ngọc Hồng Nguyễn¹, Thi Huong Le¹, Van Ngoan Nguyen¹, Minh Hang Nguyen¹, Thi Huong Trinh¹, Thi Huyen Bui², Thi Ngọc Hào Võ², Thi Van Anh Nguyen², Hoa Anh Nguyen^{2,3}

¹Vietnam National Children's Hospital, 8/879 La Thanh Street, Lang Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²ANABIO R&D Company Limited, 22 Lot 7+8 Van Khe Urban Area, La Khe Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

³LiveSpo Pharma Company Limited, N03 T5 Ngoai Giao Doan, Xuan Tao Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

Received 7 September 2023; revised 25 September 2023; accepted 29 September 2023

Abstract:

Persistent diarrhea in children under 24 months old has been a global public health concern, including in Vietnam. Therefore, the authors conducted a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the effectiveness of two *Bacillus* spore probiotic suspensions, namely LiveSpo CLAUSY containing *B. clausii* at 2 billion CFU/5 ml ampoule; and LiveSpo DIA30 containing *B. subtilis*, *B. clausii*, and *B. coagulans* at 5 billion CFU/5 ml ampoule, as a supportive treatment for children with persistent diarrhea. Children were randomly allocated into the control (using RO water) and two experimental groups, Clausy (using LiveSpo CLAUSY) and Dia30 (using LiveSpo DIA30), n=30/group. All three groups were treated following the standard protocol at the hospital, supplemented with either placebo or high-dose probiotics up to 4-6 ampoules/day. The results showed that *Bacillus* spore probiotics helped to shorten the treatment duration by approximately 1-3 days and enhanced treatment effectiveness by 1.3-2.4 folds compared to the control group in reducing the typical diarrhea symptoms, including bowel movements ≥ 3 times/day, presence of mucus, and diaper stool. Notably, LiveSpo DIA30 exhibited a better efficacy of 10-50% compared to LiveSpo CLAUSY. This is the world's first clinical study demonstrating the effectiveness of high-dose *Bacillus* spore probiotics in supporting the treatment of diarrhea symptoms in children with persistent diarrhea.

Keywords: *Bacillus*, persistent diarrhea, probiotic, spore.

Classification numbers: 3.2, 3.3

khả năng hình thành bào tử kháng lại những yếu tố bất lợi từ môi trường như nhiệt độ cao acid dạ dày và mật. Điều này giúp các bào tử lợi khuẩn *Bacillus* có khả năng sống sót và phát huy tác dụng có lợi cho sức khỏe con người khi đi qua dạ dày và tới ruột non. Trong số các loài *Bacillus* an toàn, *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* được sử dụng phổ biến nhất để làm probiotic. Đặc biệt, *B. clausii* đã được chứng minh giảm nồng độ Rotavirus/Adenovirus và giảm tần suất đi ngoài ở trẻ em mắc tiêu chảy cấp tính, giảm số lượng

trung bình các trường hợp tiêu chảy trong thời gian điều trị, khi sử dụng với liều hàng ngày là 2 ống x 2 tỷ CFU/ống [11, 12]. Tuy nhiên, hầu hết các thử nghiệm lâm sàng về *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* trên thế giới và tại Việt Nam mới được thực hiện trên trẻ em mắc tiêu chảy cấp tính và thời gian đạt được hiệu quả thường mất tới 5-7 ngày, trong khi đó chưa có nghiên cứu nào thực hiện trên trẻ em mắc TCKD. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất sử dụng 2 loại bào tử lợi khuẩn *Bacillus*, gồm LiveSpo DIA30 chứa *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* 5 tỷ CFU/ống 5 ml; LiveSpo CLAUSY chứa *B. clausii* 2 tỷ CFU/ống 5 ml, ở liều cao 4-6 ống/ngày gấp 2-3 lần so với liều thông thường, như một giải pháp tiềm năng để hỗ trợ giảm nhanh chóng các triệu chứng TCKD trên đối tượng trẻ em từ 3 đến 24 tháng tuổi. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi theo dõi các triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh TCKD, bao gồm tần suất đi ngoài ≥ 3 lần/ngày, phân có nhầy, và phân lỏng - toé nước (type 4-5B), ở nhóm thử nghiệm và so sánh với nhóm chứng để đánh giá hiệu quả rút ngắn thời gian điều trị và tăng hiệu quả điều trị của các probiotic này.

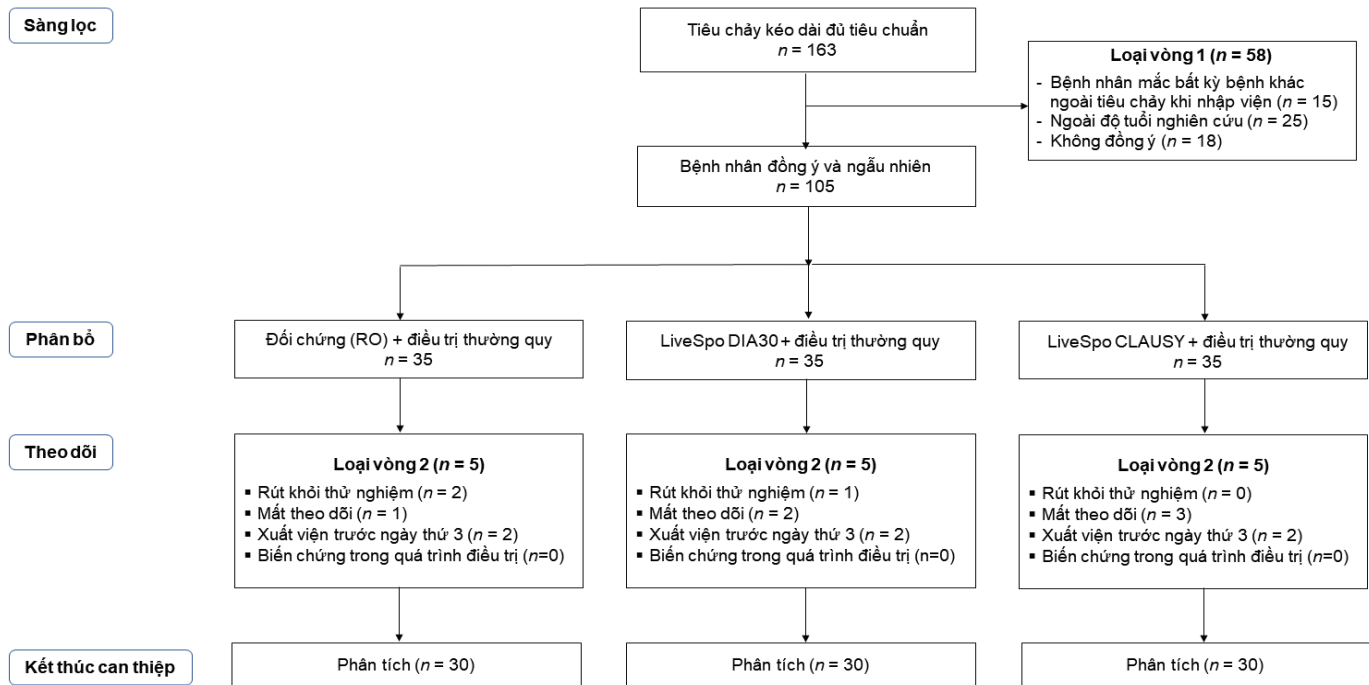
2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thực phẩm bảo vệ sức khỏe LiveSpo CLAUSY (*B. clausii* nồng độ 2 tỷ CFU/5 ml ống) và LiveSpo DIA30 (*B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* nồng độ 5 tỷ CFU/5 ml ống), do Công ty LiveSpo Pharma sản xuất tại Hà Nội. Sản phẩm được sản xuất theo tiêu chuẩn GMP được Bộ Y tế (số chứng nhận 18/2021/ATTP/CNG-GMP) và HACCP (số chứng nhận VICB 7831.6-A) và có số đăng ký lưu hành lần lượt là 4071/2021/ĐKSP và 6547/2019/ĐKSP. Sản phẩm đã được nghiên cứu chứng minh không gây độc tính cấp tính hay bán trường diễn khi tiến hành thử nghiệm trên chuột và thỏ tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Các sản phẩm LiveSpo CLAUSY và LiveSpo DIA30 không phân biệt được về mùi, vị, màu sắc với giả dược (nước RO) do hỗn dịch bào tử được bảo chế dưới dạng tinh khiết trong nước RO, và được đựng trong ống nhựa đục. Các sản phẩm đối chứng và thử nghiệm LiveSpo DIA30, LiveSpo CLAUSY được dán nhãn tương ứng với mã A, B và C, thông tin này được bảo mật với hầu hết các thành viên của nhóm nghiên cứu (trừ chủ nhiệm đề tài và người phân tích dữ liệu) cũng như tất cả phụ huynh của trẻ em và trẻ em.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu và thu thập bệnh nhân: Đây là một thử nghiệm mù, ngẫu nhiên, có đối chứng, với nhóm chứng sử dụng nước RO và 2 nhóm thử nghiệm được đặt tên là "Clausy" và "Dia30" sử dụng probiotics tương ứng là LiveSpo CLAUSY và LiveSpo DIA30. Nghiên cứu kéo dài trong 12 tháng, từ tháng 7/2022 đến tháng 7/2023, và bao gồm các bệnh nhân nhi (cả nam và nữ) có triệu chứng TCKD điều trị tại Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi Trung ương. Kích thước mẫu được tính toán dựa trên giả thuyết rằng LiveSpo CLAUSY và LiveSpo DIA30 làm giảm triệu chứng TCKD hiệu quả hơn khoảng 30%, được biểu thị bởi 90% bệnh nhân trong nhóm Clausy/Dia30 không có triệu chứng vào ngày 5-9 của can thiệp, so với 60% bệnh nhân trong nhóm chứng. Kích thước mẫu cần thiết ước tính cho mỗi nhóm là 31 bệnh nhân



Hình 1. Các bước thực hiện trong nghiên cứu cho thử nghiệm lâm sàng đánh giá an toàn và tác dụng của các sản phẩm bào tử lợi khuẩn *Bacillus* trên trẻ bị tiêu chảy kéo dài. Thu thập và phân tích dữ liệu được thực hiện từ ngày 0 đến khi xuất viện. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7/2022 đến tháng 7/2023.

vào cuối can thiệp ($\alpha=0,05$; $\text{power}=0,8$). Do tỷ lệ trẻ em nhập viện với triệu chứng TCKD trong tất cả các bệnh dạ dày/ruột ở trẻ em được nhập viện tại Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi Trung ương, dự kiến có khoảng 150-200 bệnh nhân tham gia khảo sát để thu được 105 bệnh nhân đủ điều kiện tham gia nghiên cứu ($n=35$ cho mỗi nhóm x 3 nhóm). Các bệnh nhân được gán ngẫu nhiên bằng cách rút thăm vào các nhóm được mã hoá ngẫu nhiên: nhóm chứng (nhóm A), Dia30 (nhóm B) và Clausy (nhóm C). Số bệnh nhân được tính dư khoảng 10% để đảm bảo số lượng bệnh nhân khi kết thúc nghiên cứu đạt được như kỳ vọng, có tính toán tới rủi ro cha mẹ bệnh nhân rút khỏi nghiên cứu trong quá trình theo dõi điều trị. Sơ đồ của nghiên cứu được hiển thị trong hình 1.

Các tiêu chí lựa chọn bao gồm: Bệnh nhân 3-24 tháng tuổi bị đi ngoài phân lỏng hoặc nước bất thường xảy ra ít nhất 3 lần/ngày kéo dài từ 14 ngày trở lên (tối đa 29 ngày) mà không thấy thuyên giảm, nhập viện điều trị tại Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi Trung ương. Cha mẹ trực tiếp chăm sóc trẻ khỏe mạnh, hiểu nội dung câu hỏi phỏng vấn, đồng ý tham gia và tuân thủ quy trình nghiên cứu.

Các tiêu chí loại trừ bao gồm: (1) Bệnh nhân có bất kỳ bệnh lý toàn thân nào khác ngoài tiêu chảy khi nhập viện như dị tật tim bẩm sinh, khe hở vòm, sút môi, hội chứng Down, bại não (do các bệnh này có thể gây ra các vấn đề liên quan đến đường tiêu hóa và ảnh hưởng đến tăng trưởng của trẻ); (2) Trẻ chẩn đoán mắc bệnh lao, HIV hoặc bệnh lý ruột viêm mạn tính (bệnh Crohn, viêm loét đại trực tràng chảy máu), bệnh Celiac; (3) Trẻ nhập viện trong tình trạng nặng như sốc, co giật, khó thở, suy hô hấp... (4) Trẻ đẻ non, suy dinh dưỡng với chiều cao, cân nặng lúc nhập viện $<-3SD$ (chỉ số đo cân nặng theo tuổi (Z-score)) hoặc phù.

Bảng câu hỏi, quy trình điều trị và quan sát lâm sàng: Cha mẹ của bệnh nhân được yêu cầu cung cấp các thông tin sau về con cái của họ: họ và tên đầy đủ, giới tính, tuổi, hồi cứu thông tin về thai sản của mẹ, tiêm chủng của trẻ, sử dụng kháng sinh và bệnh nền... Y tá và hộ lý được đào tạo để cho trẻ uống theo liều 2 ống (già được hoặc probiotics) mỗi lần, ba lần mỗi ngày (tổng cộng 6 ống mỗi ngày - “liều tấn công”) trong 3 ngày đầu và hai lần mỗi ngày (tổng cộng 4 ống mỗi ngày - “liều duy trì”) trong những ngày điều trị tiếp theo. Bào tử lợi khuẩn *Bacillus* được sử dụng kết hợp với phác đồ điều trị bệnh thông thường tại bệnh viện, như dung dịch bù điện giải (Oremut), gluconate kẽm và kháng sinh trong trường hợp nhiễm vi khuẩn. Thử nghiệm độ nhạy với kháng sinh và điều trị kháng sinh thích hợp đã được cung cấp cho tất cả bệnh nhân có kết quả dương tính cho các chủng vi khuẩn gây bệnh tiêu hóa. Các kháng sinh dùng để điều trị có thể là kháng sinh đường uống (ví dụ Zithromax hoặc Ciprofloxacin) và/hoặc kháng sinh đường tiêm (ví dụ Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Metronidazole, hoặc Vancomycin). Trong quá trình điều trị, bệnh nhân được theo dõi hàng ngày để theo dõi các triệu chứng thông thường của tiêu chảy, bao gồm số lần đi ngoài >3 lần/ngày, phân có nhầy, phân lỏng - toé nước theo thang phân loại phân của trẻ nhỏ (thang phân loại gồm các type 1, 2, 3, 4, 5A và 5B, trong đó phân lỏng - toé nước thuộc type 4, 5A và 5B) cho đến khi xuất viện. Tình trạng sức khỏe của bệnh nhân được quan sát và ghi chép trong hồ sơ bệnh án bởi bác sỹ và y tá.

Quan sát hiển vi và đo độ pH của phân: Các xét nghiệm này đã được tiến hành vào ngày 0, 3 và 5 cho tất cả bệnh nhân tham gia theo quy trình thông thường tại Khoa Vi khuẩn - Virus, Bệnh viện Nhi Trung ương. Các xét nghiệm bao gồm: (i) Xác định sự có mặt của tiểu cầu và bạch cầu trong phân, được phân loại thành các

mức độ khác nhau bao gồm âm tính (-), có vết (+), nhẹ (++) , trung bình (+++) và nặng (++++); (ii) Đo độ pH của phân, với khoảng 5,5-6,5 được xem là bình thường, trong khi các giá trị nằm ngoài khoảng này được phân loại là bất thường. Đây cũng là một tiêu chí sàng lọc để đảm bảo các tiêu chí lựa chọn và cân bằng đầu vào cho mỗi nhóm.

Phương pháp xét nghiệm real time RT-PCR đa môi: Bộ xét nghiệm Cartridge QIAstat-Dx Gastrointestinal Panel (Qiagen, Hoa Kỳ) được sử dụng cho xét nghiệm vào ngày 0 tại Khoa Sinh học phân tử các bệnh truyền nhiễm, Bệnh viện Nhi Trung ương theo tiêu chuẩn ISO 15189:2012, bằng hệ thống phân tích tự động hoàn toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất để phát hiện 24 chủng vi sinh vật đường ruột trong mẫu phân với mục đích tư vấn về phương pháp điều trị thích hợp. Các chủng vi sinh vật được phát hiện bao gồm: *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*), *Salmonella* spp., *Clostridium difficile* (*tcdA/tcdB*), *Yersinia enterocolitica*, *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enteraggregative E. coli* (EAEC), *Shiga-like toxin-producing E. coli* (STEC), *Shiga toxin-producing E. coli* (STEC) serotype O157:H7, *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *Shigella*, *Plesiomonas shigelloides*, *Human adenovirus F40/F41*, *Norovirus GI*, *Norovirus GII*, *Rotavirus A*, *Astrovirus* và *Sapovirus GI/GII/ GIV/GV*. Quy trình bao gồm việc sử dụng 25-100 mg phân trên mỗi ml chất mang Cary-Blair, sau đó chuyển 200 μ l mẫu vào ống Cartridge QIAstat-Dx Gastrointestinal Panel. Tiếp theo, mã vạch của mẫu và ống Cartridge QIAstat-Dx Gastrointestinal Panel được quét bằng thiết bị phân tích QIAstat-Dx Analyzer 1.0, và quá trình phân tích được khởi động. Phản ứng real time RT-PCR được thực hiện ở chu trình nhiệt: 50°C trong 20 phút, 95°C trong 15 phút, tiếp theo là 45 chu kỳ khuếch đại và phát hiện ở 95°C trong 10 giây, 60°C trong 1 phút, 72°C trong 30 giây. Sau 70 phút, kết quả được phân tích bằng thiết bị phân tích QIAstat-Dx Analyzer 1.0.

Đồng thời, xét nghiệm real time PCR SYBR Green sử dụng môi đặc hiệu cũng được thực hiện trên mẫu phân nhưng ở 3 mốc thời gian ngày 0, 5 và ngày xuất viện (nếu sau ngày 5) để phát hiện sự hiện diện của *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* nhằm kiểm tra việc sử dụng probiotics hoặc giả dược đúng cách trong các nhóm thí nghiệm và kiểm soát tương ứng [13]. Điều kiện real time PCR SYBR Green được thiết lập như sau: 95°C trong 10 phút, khuếch đại trong 40 chu kỳ tại 95°C trong 15 giây, 60°C trong 20 giây, 72°C trong 30 giây. Mẫu phân được coi là chứa *Bacillus* thuộc một trong ba loài *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. coagulans* khi giá trị C_t của mỗi phản ứng đặc hiệu là <35. Quy trình “in-house” được tối ưu và thực hiện phục vụ cho mục đích nghiên cứu tại Khoa Sinh học phân tử các bệnh truyền nhiễm, Bệnh viện Nhi Trung ương.

2.3. Phân tích thống kê

Phân tích bảng được thực hiện trên biến phân loại bằng cách sử dụng kiểm định χ^2 hoặc Fisher's exact test khi giá trị kỳ vọng của bất kỳ ô nào dưới năm. Các biến liên tục hoặc độc lập được so sánh

bằng cách sử dụng kiểm định Wilcoxon hoặc kiểm định Mann-Whitney test khi dữ liệu không tuân theo phân phối chuẩn. Phân tích thống kê và đồ họa được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism v8.4.3 (GraphPad Software, California, Hoa Kỳ).

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y học của Bệnh viện Nhi Trung ương chấp thuận theo Quyết định 1077/BVNTU-HĐĐĐ ngày 1/6/2022 và đã được thực hiện tuân thủ các nguyên tắc đạo đức được nêu ra trong tuyên bố Helsinki, hướng dẫn ICH GCP và các quy định và tiêu chuẩn của Bộ Y tế Việt Nam về nghiên cứu đối tượng người. Tất cả phụ huynh của các bệnh nhân nhi tham gia nghiên cứu đã được thông báo đầy đủ về nghiên cứu và đồng ý tham gia nghiên cứu. Người tham gia có quyền rút khỏi nghiên cứu bất cứ lúc nào theo yêu cầu.

3. Kết quả

3.1. Thiết kế thử nghiệm và đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của trẻ ở thời điểm đầu vào tham gia nghiên cứu

Từ tháng 7/2022 đến tháng 7/2023, tổng cộng 163 trẻ đã được sàng lọc để đủ điều kiện tham gia nghiên cứu. Trong số đó, 105 trẻ tham gia bị TCKD đã được ngẫu nhiên chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm 35 bệnh nhân, bao gồm nhóm Chứng, nhóm Dia30 sử dụng LiveSpo DIA30 và nhóm Clausy sử dụng LiveSpo CLAUSY. Trong thời gian theo dõi bình thường 5-9 ngày sau điều trị, 5 người nhóm Chứng, 5 người nhóm Clausy và 5 người nhóm Dia30 đã bị loại trừ, dẫn đến số người tham gia vào phân tích cuối cùng của nhóm Chứng, Clausy và Dia30 tương ứng còn 30 bệnh nhân (hình 1).

Bảng 1 cho thấy, trẻ em mắc chứng TCKD tham gia vào nghiên cứu này có độ tuổi từ 3 đến 24 tháng, và không có sự khác biệt đáng kể về tuổi tác hay phân bố giới tính giữa nhóm Clausy so với nhóm Chứng ($p=0,49$ và $0,79$) hay giữa nhóm Dia30 với nhóm Chứng ($p=0,19$ và $0,59$). Trước khi điều trị, các đặc điểm lâm sàng cơ bản, bao gồm tần suất đi ngoài hàng ngày ≥ 3 lần/ngày, phân có nhầy, và phân lỏng - toé nước phân loại thuộc các type 4-5B, không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm Clausy so với nhóm Chứng (giá trị p tương ứng cho 3 triệu chứng là: 0,12; 1 và 0,24) hay giữa nhóm Dia30 với nhóm Chứng (giá trị p tương ứng cho 3 triệu chứng là: 0,08; 0,19 và 0,4).

Hơn nữa, chúng tôi cũng thấy không có sự khác biệt đáng kể về các đặc điểm cận lâm sàng liên quan tới tính chất phân, bao gồm sự hiện diện của tế bào bạch cầu (leukocytes) và tế bào hồng cầu (erythrocytes) trong phân giữa nhóm Clausy so với nhóm Chứng ($p=0,57$ và 1) hay giữa nhóm Dia30 so với nhóm Chứng ($p=0,08$ và $0,69$); cũng không có sự khác biệt đáng kể về các giá trị pH bất thường của phân nằm ngoài khoảng pH bình thường từ 5,5 đến 6,5 giữa nhóm Clausy so với nhóm Chứng ($p=1$) hay giữa nhóm Dia30 so với nhóm Chứng ($p=0,79$).

Như được thể hiện ở bảng 1, có một tỷ lệ nhất định gần 30%, bao gồm 26,67% trong nhóm Chứng, 26,67% trong nhóm Clausy

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của trẻ em bị tiêu chảy kéo dài trước và trong quá trình điều trị.

Các chỉ số	Nhóm chứng			Nhóm Clausy			Nhóm DIA30			Giá trị p					
	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 5	Clausy - chứng			DIA30 - chứng		
										Ngày 0	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 5
Tuổi (tháng)															
3≤x≤12, n (%)	29 (96,67)			30 (100,0)			26 (86,67)			0,49			0,19		
12<x≤24, n (%)	1 (3,33)			0 (0,00)			4 (13,33)								
Giới tính															
Nam, n (%)	18 (60,00)			19 (63,33)			20 (66,67)			0,79			0,59		
Nữ, n (%)	12 (40,00)			11 (36,67)			10 (33,33)								
Đặc điểm lâm sàng															
Số lần đi ngoài (>3 lần/ngày), n %	29 (96,67)	19 (63,33)	14 (46,67)	25 (83,33)	17 (56,67)	6 (20,00)	24 (80,00)	15 (50,00)	3 (10,00)	0,12	0,6	0,03	0,08	0,3	0,0037
Nhảy trong phân n %	29 (96,67)	27 (90,00)	21 (70,00)	29 (96,67)	21 (70,00)	12 (40,00)	26 (86,67)	22 (73,33)	8 (26,67)	1	0,06	0,02	0,19	0,11	0,0012
Phân loại phân (Type 4-5B) n %	28 (93,33)	23 (76,67)	15 (50,00)	25 (83,33)	15 (50,00)	8 (26,67)	26 (86,67)	12 (40,00)	7 (23,33)	0,24	0,035	0,067	0,4	0,005	0,035
Kết quả soi phân															
Hồng cầu (≥2+) n %	10 (33,33)	3 (10,00)	1 (3,33)	8 (26,67)	3 (10,00)	0 (0,00)	4 (13,33)	2 (6,67)	0 (0,00)	0,57	1	0,49	0,08	0,64	0,49
Bạch cầu (≥2+) n %	27 (90,00)	15 (50,00)	5 (16,67)	27 (90,00)	5 (16,67)	1 (3,33)	26 (86,67)	3 (10,00)	0 (0,00)	1	0,008	0,12	0,69	0,002	0,09
Chỉ số pH (pH <5,5+pH >6,5) n %	19 (63,33)	17 (56,67)	13 (43,33)	19 (63,33)	16 (53,33)	12 (40,00)	18 (60,00)	18 (60,00)	9 (30,0)	1	0,8	0,79	0,79	0,79	0,29
<i>Campylobacter</i> spp.	1 (3,33)			2 (6,67)			2 (6,67)								
<i>Clostridium difficile</i>	1 (3,33)			3 (10,00)			1 (3,33)								
<i>Enteraggregative E. coli</i>	2 (6,67)						1 (3,33)								
<i>Enteropathogenic E. coli</i>	1 (3,33)			1 (3,33)											
<i>Enterotoxigenic E. coli</i>	1 (3,33)														
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1 (3,33)														
<i>Salmonella</i> spp.	3 (10,0)			1 (3,33)			1 (3,33)								
Astrovirus							2 (6,67)								
Norovirus (GI, GII)	2 (6,67)			2 (6,67)			5 (16,67)								
Rotavirus A				1 (3,33)											
Số bệnh nhân	8 (26,67)			8 (26,67)			9 (30,0)			1			0,77		

và 30% nhóm Dia30 được phát hiện nhiễm các vi sinh vật gây bệnh đường ruột. Trong cùng một mẫu phân, có thể có đơn lẻ 1 tác nhân hay có tới 2, 3, đến 4 tác nhân nhiễm đồng thời sau khi sàng lọc 24 vi sinh vật phổ biến nhất gây tiêu chảy bằng kỹ thuật real time RT-PCR như đã mô tả ở phần phương pháp. Trong các tác nhân sàng lọc được, phát hiện thấy tổng cộng có 11 loài vi sinh vật gây bệnh, bao gồm 7 loài vi khuẩn và 4 loài virus được phát hiện trong các mẫu phân của trẻ tham gia nghiên cứu. Trong đó, các vi sinh vật gây bệnh phổ biến nhất trong cả 3 nhóm là *Norovirus* (GI, GII) (n=5 trong nhóm Dia30, tỷ lệ chiếm 6,67-16,67%). Tiếp theo là *C. difficile* sản sinh độc tố A/B (n=3 trong nhóm Clausy, tỷ lệ chiếm 3,33-10%), *Salmonella* spp. (n=3 trong nhóm chứng, tỷ lệ 3,33-10%) và *Campylobacter* spp. (n=2 trong nhóm Clausy và Dia30, tỷ lệ chiếm 3,33-6,67%).

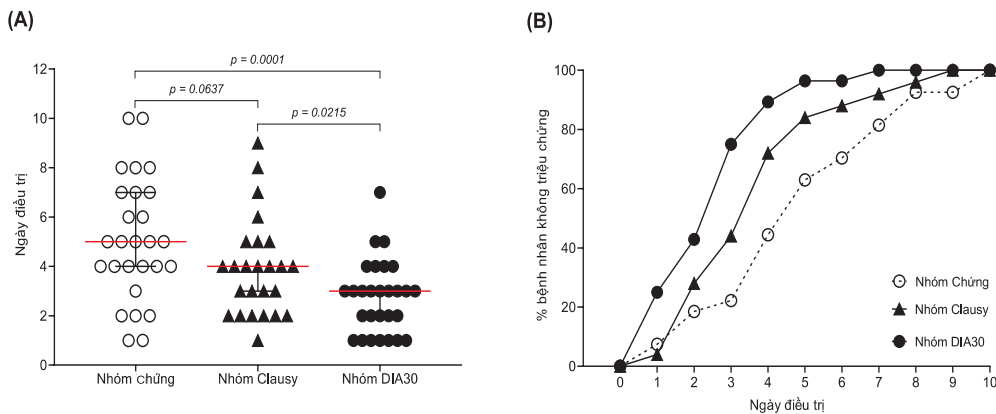
Kết luận lại, các bệnh nhân nhi được phân nhóm ngẫu nhiên và có tính chất tương đồng nhau về các chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng ở thời điểm đầu vào nghiên cứu, vì vậy thỏa mãn điều kiện để tiến hành thử nghiệm can thiệp với phác đồ thường quy kết hợp với probiotic cho nhóm thử nghiệm và giả dược cho nhóm chứng.

3.2. An toàn của bào tử lợi khuẩn *Bacillus khi dùng ở liều cao*

Trong thời gian điều trị, chúng tôi không ghi nhận bất kỳ trường hợp phản ứng phụ nào đối với sản phẩm LiveSpo CLAUSY và LiveSpo DIA30 ở liều cao, lên tới 8-12 tỷ CFU hàng ngày đối với sản phẩm LiveSpo CLAUSY và lên tới 20-30 tỷ hàng ngày đối với sản phẩm LiveSpo DIA30, như mô tả ở phần phương pháp. Đặc biệt, không có trường hợp nôn mửa hay thay đổi nhiệt độ quá 1°C nào được quan sát ở bất kỳ trẻ nào ở 2 nhóm sử dụng sản phẩm này.

3.3. Hiệu quả giảm số lần đi ngoài ở bệnh nhân tiêu chảy kéo dài khi uống bào tử lợi khuẩn *Bacillus*

Đầu tiên, chúng tôi đánh giá thời gian điều trị cần thiết để làm giảm triệu chứng lâm sàng điển hình nhất của tiêu chảy là “đi ngoài >3 lần/ngày”. Thuật ngữ “ngày điều trị” được định nghĩa là ngày đầu tiên (trong quá trình điều trị) khi bệnh nhân không còn biểu hiện triệu chứng đó. Kết quả, được thể hiện ở bảng 1 cho thấy, số lượng bệnh nhân biểu hiện triệu chứng này ở ngày 5 của nhóm Clausy (20%) và Dia30 (10%) đã ít hơn nhiều so với nhóm chứng (46,67%) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê, với giá



Hình 2. Số ngày điều trị triệu chứng đi ngoài hơn 3 lần/ngày (A) và tỷ lệ phần trăm (%) bệnh nhân không còn triệu chứng quan sát theo thời gian điều trị (B) ở nhóm chứng, Clausy, và Dia30. Phương pháp phân tích Mann-Whitney test được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có tính thống kê giữa các nhóm.

trị $p=0,03$ ở nhóm Clausy và $p=0,0037$ ở nhóm Dia30. Kết quả này thống nhất với kết quả ở hình 2 về số ngày điều trị triệu chứng đi ngoài >3 lần/ngày ở 3 nhóm tham gia thử nghiệm. Cụ thể, kết quả ở hình 2A cho thấy, số ngày điều trị cho triệu chứng đi ngoài >3 lần/ngày khỏi nhanh nhất ở nhóm Dia30 (trung vị: 3 ngày), tiếp theo là nhóm Clausy (trung vị: 4 ngày), so với nhóm chứng (trung vị: 5 ngày). Việc rút ngắn thời gian điều trị 2 ngày ở nhóm Dia30 so với nhóm chứng là có ý nghĩa thống kê, với giá trị $p=0,0001$. Tuy sự khác biệt giữa thời gian điều trị của nhóm Clausy với nhóm chứng sớm hơn 1 ngày chưa có ý nghĩa thống kê, nhưng với giá trị $p=0,0637$ nhỏ hơn 0,1 cũng chỉ ra được xu hướng rút ngắn thời gian điều trị triệu chứng này khi bệnh nhân sử dụng LiveSpo CLAUSY. Kết quả ở hình 2A cũng chỉ ra sự khác biệt trong thời gian điều trị của nhóm Dia30 so với Clausy là có ý nghĩa thống kê với $p=0,0215$, chứng tỏ LiveSpo DIA30 có tác dụng rút ngắn thời gian tiêu chảy nhanh hơn so với LiveSpo CLAUSY.

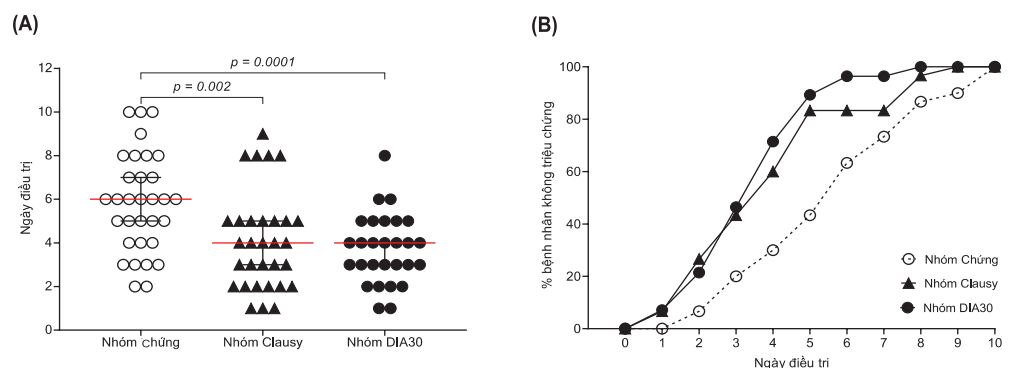
Như được thể hiện ở hình 2B, trong vòng 1 ngày đầu sau khi bắt đầu điều trị, không có sự khác biệt đáng kể về số lượng bệnh nhân khỏi triệu chứng đi ngoài hơn 3 lần/ngày giữa nhóm chứng và nhóm Clausy, với tỷ lệ đạt được khoảng dưới 5%. Đáng chú ý, nhóm Dia30 đạt tỷ lệ bệnh nhân khỏi triệu chứng này lên tới khoảng 25% trong ngày đầu tiên điều trị. Bắt đầu từ ngày thứ 2, có sự tăng đáng kể và liên tục trong tỷ lệ bệnh nhân khỏi triệu chứng này trong cả 3 nhóm nghiên cứu, với tỷ lệ khỏi bệnh đạt nhanh nhất ở nhóm Dia30, sau đó là nhóm Clausy, cuối cùng là nhóm chứng. Đến ngày thứ 3 và 4, hơn 50% trẻ em tương ứng trong nhóm Dia30 và Clausy đã không còn triệu chứng đi ngoài >3 lần/ngày, trong khi nhóm chứng phải tới ngày thứ 5 mới đạt được tỷ

lệ này. Xu hướng khỏi triệu chứng tăng dần theo ngày điều trị và đến ngày thứ 7, hầu hết 100% trẻ em trong nhóm Dia30 đã hồi phục khỏi triệu chứng này, trong khi nhóm Clausy và nhóm chứng cần 9 và 10 ngày tương ứng để kiểm soát hoàn toàn 100% trẻ không còn triệu chứng. Dựa trên dữ liệu về tỷ lệ bệnh nhân không còn triệu chứng đi ngoài ≥ 3 lần/ngày theo thời gian được thể hiện ở hình 2B, có thể thấy nhóm Dia30, Clausy và nhóm chứng có thời gian điều trị khi 50% bệnh nhân không còn triệu chứng (Days of

treatment, DT_{50}) tương ứng là 2,2; 3,2 và 4,3 ngày. Kết quả cho thấy, liệu pháp hỗ trợ bằng bào tử lợi khuẩn Clausy và Dia30 hiệu quả hơn tương ứng gấp 1,3 và 2,0 lần so với liệu pháp thường quy khi cải thiện tần suất đi ngoài ở bệnh nhân.

3.4. Hiệu quả giảm phân nhầy khi uống bào tử lợi khuẩn Bacillus

Tương tự với việc đánh giá tác dụng giảm triệu chứng tần suất đi ngoài ≥ 3 lần/trong ngày, chúng tôi cũng quan sát thấy có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm sử dụng bào tử lợi khuẩn *Bacillus* so với nhóm chứng trong giảm triệu chứng phân có nhầy. Cụ thể, nhóm Clausy và Dia30 đã rút ngắn được thời gian điều trị tương ứng là 2 và 2,5 ngày, thể hiện qua giá trị trung vị về thời gian điều trị triệu chứng phân có nhầy (hình 3A) cho các nhóm chứng, Clausy và Dia30 lần lượt là 6, 4 ngày ($p=0,002$) và 3,5 ngày ($p=0,0001$). Sự chênh lệch này là có ý nghĩa thống kê khi giá trị p đều nhỏ hơn 0,05, và được củng cố bởi số liệu thể hiện ở bảng 1 cho thấy tại ngày 5, số bệnh nhân còn triệu chứng phân nhầy ở nhóm Clausy (40%) và Dia30 (26,67%) đã ít hơn nhiều so với nhóm chứng (70%), với giá trị $p=0,02$ ở nhóm Clausy và $p=0,0012$ ở nhóm Dia30.



Hình 3. Số ngày điều trị triệu chứng phân nhầy (A) và tỷ lệ phần trăm (%) bệnh nhân không còn triệu chứng quan sát theo thời gian điều trị (B) ở nhóm chứng, Clausy và Dia30. Phương pháp phân tích Mann-Whitney test được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có tính thống kê giữa các nhóm.

Dựa trên dữ liệu về tỷ lệ bệnh nhân không có triệu chứng phân nhầy theo thời gian được thể hiện trong hình 3B, chúng tôi tính toán và nhận thấy rằng, cả 2 nhóm Clausy và Dia30 có giá trị DT_{50} cho triệu chứng phân nhầy thấp hơn so với nhóm chứng. Cụ thể, DT_{50} ở nhóm chứng, Clausy và Dia30, Clausy có giá trị tương ứng là 5,3, 3,4 và 3,1 ngày. Kết quả cho thấy, liệu pháp hỗ trợ bằng bào tử lợi khuẩn LiveSpo CLAUSY và LiveSpo DIA30 hiệu quả hơn gấp 1,6 và 1,7 lần so với liệu pháp thường quy khi cải thiện triệu chứng phân có nhầy ở trẻ bị TCKD.

3.5. Hiệu quả giảm phân lỏng - toé nước khi uống bào tử lợi khuẩn Bacillus

Cuối cùng, chúng tôi đánh giá hiệu quả cải thiện tính chất của phân bằng cách quan sát triệu chứng phân lỏng - toé nước ở bệnh nhân giữa các nhóm. Kết quả cho thấy, khi uống bào tử lợi khuẩn *Bacillus*, có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm sử dụng bào tử lợi khuẩn *Bacillus* so với nhóm chứng về số lượng bệnh nhân có tính chất phân lỏng - toé nước thuộc type 4, 5A và 5B theo thang phân loại phân cho trẻ nhỏ. Kết quả (bảng 1) cho thấy ngay tại ngày thứ 3, số lượng bệnh nhân biểu hiện triệu chứng này ở nhóm Clausy (26,67%) và Dia30 (23,33%) đã ít hơn đáng kể so với nhóm chứng (50%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với giá trị $p=0,035$ cho nhóm Clausy và $p=0,005$ cho nhóm Dia30. Ở ngày thứ 5, có sự khác biệt rõ hơn ở nhóm Dia30 so với nhóm chứng với giá trị $p=0,035$.

Kết quả này cũng tương thích với kết quả ở hình 4 liên quan đến số ngày điều trị triệu chứng phân lỏng - toé nước trong 3 nhóm tham gia thử nghiệm. Cụ thể, nhóm Clausy và Dia30 đều đã rút ngắn thời gian điều trị lần lượt là 2 và 3 ngày, được thể hiện qua giá trị trung vị của thời gian điều trị triệu chứng phân lỏng - toé nước (hình 4A) ở nhóm chứng là 5 ngày còn ở nhóm Clausy (3 ngày) và Dia30 (2 ngày). Sự chênh lệch này có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng khi tất cả giá trị p đều nhỏ hơn 0,05, với $p=0,0322$ ở nhóm Clausy và $p=0,0009$ ở nhóm Dia30.

Dựa trên kết quả ở hình 4B về tỷ lệ bệnh nhân không có triệu chứng phân lỏng - toé nước theo thời gian, chúng tôi nhận thấy, nhóm Clausy và Dia30 có giá trị DT_{50} cho triệu chứng này thấp

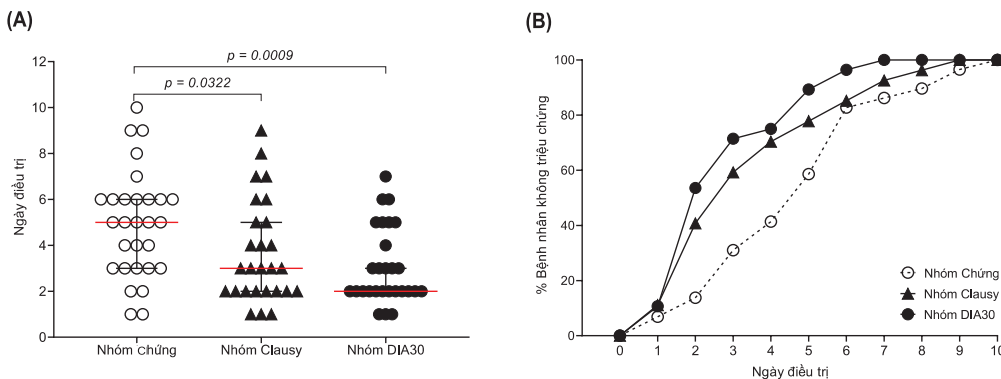
hơn đáng kể so với nhóm chứng, với giá trị DT_{50} là 4,5 ngày cho nhóm chứng, 2,5 ngày cho nhóm Clausy và chỉ còn 1,9 ngày cho nhóm Dia30. Kết quả cho thấy, liệu pháp hỗ trợ bằng bào tử lợi khuẩn Clausy và Dia30 hiệu quả hơn gấp 1,8 lần và 2,4 lần so với liệu pháp thường quy khi cải thiện triệu chứng phân lỏng - toé nước ở trẻ bị TCKD.

4. Bàn luận

Sử dụng vi sinh vật có lịch sử an toàn và đem lại tác dụng lợi cho sức khoẻ của con người dưới dạng thực phẩm bổ sung probiotic cho đường tiêu hoá là xu hướng được các nhà khoa học và các nhà sản xuất probiotic quan tâm từ trước tới nay. Các nghiên cứu trước đã chứng minh được khả năng hỗ trợ điều trị tiêu chảy cấp của bào tử lợi khuẩn *B. subtilis* và *B. clausii* ở các liều sử dụng thông thường trong khoảng 4-5 tỷ CFU/ngày và hiệu quả rõ rệt đem lại thường sau tới 5-7 ngày sử dụng [12, 14]. Đây là nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng mẫu mù có đối chứng đầu tiên trên thế giới đánh giá về mặt an toàn và hiệu quả của bào tử lợi khuẩn *Bacillus* thuộc 3 loài *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* ở liều sử dụng hàng ngày khá cao, lên tới khoảng 8-12 tỷ đối với sản phẩm LiveSpo CLAUSY và 20-30 tỷ đối với sản phẩm LiveSpo DIA30 để điều trị TCKD ở trẻ em 3-24 tháng tuổi. Các liều cao này được chọn dựa trên liều lượng vi sinh vật có thể sử dụng cho mục đích hỗ trợ điều trị, được khuyến cáo bởi Tổ chức Tiêu hoá Gan mật Thế giới (WGO) [15]. Kết quả về an toàn của nghiên cứu cho thấy, liệu pháp điều trị với bào tử lợi khuẩn *Bacillus* ở những liều cao này đã được dung nạp tốt và không có biến cố bất lợi nào được ghi nhận. Kết quả này càng khẳng định thêm lịch sử an toàn của bào tử lợi khuẩn thuộc 3 loài *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans*.

Sử dụng men vi sinh trong điều trị tiêu chảy ở trẻ em đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc giảm thời gian tiêu chảy và giảm tần suất đi ngoài nhờ quá trình điều chỉnh chứng rối loạn tiêu hóa và phục hồi hệ vi sinh đường ruột. Đặc biệt, các dạng men vi sinh bằng đường uống giúp cải thiện sự mất cân bằng vi khuẩn của cơ thể con người và có khả năng chống lại nhiễm trùng đường ruột. Liên quan đến hiệu quả của bào tử lợi khuẩn

Bacillus trong giảm triệu chứng của bệnh lý đường tiêu hoá, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự giảm thiểu đáng kể về thời gian điều trị cả ba triệu chứng điển hình cho trẻ em bị TCKD, thể hiện qua giá trị trung vị được quan sát ở nhóm Dia30 và Clausy luôn thấp hơn so với giá trị này ở nhóm chứng khoảng 1-3 ngày, tùy từng triệu chứng. Nhóm sử dụng LiveSpo DIA30 và LiveSpo CLAUSY đã cho thấy sự giảm đáng kể cả 3 triệu chứng điển hình liên quan đến TCKD tại hai thời điểm quan



Hình 4. Số ngày điều trị triệu chứng phân lỏng - toé nước thuộc type 4-5B theo thang phân loại phân của trẻ nhỏ (A) và tỷ lệ phần trăm (%) bệnh nhân không còn triệu chứng quan sát theo thời gian điều trị (B) ở nhóm chứng, Clausy và Dia30. Phương pháp phân tích Mann-Whitney test được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có tính thống kê giữa các nhóm.

sát, cụ thể là số bệnh nhân thể hiện cả 3 triệu chứng đều giảm có ý nghĩa thống kê ở ngày 5 so với nhóm chứng (bảng 1). Các hình đồ thị thể hiện số bệnh nhân không còn triệu chứng tiêu chảy của các nhóm Clausy và Dia30 cũng có tốc độ bệnh nhân khỏi bệnh nhanh hơn so với nhóm chứng, và sự khác biệt này bắt đầu quan sát thấy ở ngay ngày thứ 1-2 sau khi sử dụng probiotic. Trong đó, nhóm Dia30 có tốc độ khỏi bệnh nhanh nhất và vượt trội so với cả nhóm Clausy. Điều này có thể là do các bào tử lợi khuẩn *B. subtilis*, *B. clausii* và *B. coagulans* ở sản phẩm LiveSpo DIA30 có nồng độ rất cao, lên tới 5 tỷ/ống, cao hơn 2,5 lần so với bào tử lợi khuẩn *B. clausii* ở sản phẩm LiveSpo CLAUSY, nên bám dính trên niêm mạc ruột nhiều hơn, tác dụng hiệp đồng để nảy mầm thành tế bào sinh trưởng và phát triển để cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột nhanh và hiệu quả hơn. Một số nghiên cứu lâm sàng khác sử dụng các chủng *Lactobacillus* sp. và *Saccharomyces boulardii* [16] hay chủng *L. rhamnosus* GG [17] cũng đã cho thấy hiệu quả của việc điều trị bằng men vi sinh, nhưng với tốc độ chậm hơn so với LiveSpo DIA30 vì việc giảm số lần đi ngoài đạt được vào ngày thứ 5 ở trẻ em TCKD. Nghiên cứu của S. Basu và cs (2007) [17] sử dụng liều cao của men vi sinh chứa *Lactobacillus rhamnosus* GG nồng độ trong khoảng 10^{10} - 10^{12} CFU lại đều cho hiệu quả như nhau ở cả hai liều lượng trong việc giảm tần suất và thời gian tiêu chảy cũng như giảm thời gian nằm viện ở ngày thứ 6, rút ngắn 2 ngày điều trị so với nhóm đối chứng không sử dụng probiotic là 8 ngày. Nghiên cứu chúng tôi sử dụng bào tử lợi khuẩn *Bacillus* có khả năng tạo bào tử và sống sót cao trong môi trường acid tại dạ dày giúp tác dụng nhanh và hiệu quả hơn khi so sánh với hai nghiên cứu này. Kết quả nghiên cứu dùng liều cao của LiveSpo DIA30 và LiveSpo CLAUSY đã chứng minh khả năng rút ngắn thời gian điều trị cho 3 triệu chứng điển hình của tiêu chảy, gồm số lần đi ngoài >3 lần/ngày, phân có nhầy, và phân lỏng - toé nước khoảng 2-3 ngày, giúp cải thiện hiệu quả lên đến 1,3-2,4 lần. Khi so sánh giữa 2 loại probiotic sử dụng, chúng tôi nhận thấy LiveSpo DIA30 thể hiện khả năng vượt trội hơn so với LiveSpo CLAUSY khi rút ngắn nhanh thời gian điều trị 1 ngày và tăng hiệu quả điều trị tốt hơn so với LiveSpo CLAUSY khoảng 10-50% cho cả 3 triệu chứng.

Tóm lại, hiệu quả đem lại khi sử dụng 2 loại bào tử lợi khuẩn LiveSpo CLAUSY và LiveSpo DIA30 không chỉ có lợi rõ rệt cho sức khỏe đường tiêu hoá của trẻ em mà còn giảm lo âu của phụ huynh và giảm thời gian chăm sóc, đồng thời giảm chi phí điều trị trong bệnh viện. Liệu pháp probiotic bào tử lợi khuẩn *Bacillus* dạng nước nồng độ cao có thể mang lại lợi ích đáng kể về cả mặt xã hội và kinh tế trong việc điều trị tiêu chảy, đặc biệt là ở các nước thu nhập thấp và trung bình, nơi TCKD vẫn là một căn bệnh nghiêm trọng.

5. Kết luận

Sử dụng probiotic bào tử lợi khuẩn *Bacillus* (LiveSpo) dạng nước, nồng độ cao giúp hỗ trợ điều trị và giảm các triệu chứng tiêu chảy ở trẻ em bị tiêu chảy kéo dài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Giannattasio, A. Guarino, A.L. Vecchio (2016), "Management of children with prolonged diarrhea", *F1000 Research*, **5**, DOI: 10.12688/f1000research.7469.1.
- [2] S.R. Moore (2011), "Update on prolonged and persistent diarrhea in children", *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **27(1)**, pp.19-23, DOI: 10.1097/MOG.0b013e32833f215d.
- [3] S.A. Sarker, T. Ahmed, H. Brussow (2017), "Persistent diarrhea: A persistent infection with enteropathogens or a gut commensal dysbiosis?", *Environ. Microbiol.*, **19(10)**, pp.3789-3801, DOI: 10.1111/1462-2920.13873.
- [4] P.H.T. Linh (2017), "Knowledge and practice of mothers of children under 5 years old with acute diarrhea at Hai Phong Children's Hospital in 2017", *Nursing Science*, **1**, pp.44-50 (in Vietnamese).
- [5] H.U. Ugbo, O.C. Nwinyi, S.U. Oranusi, et al. (2020), "Childhood diarrhoeal diseases in developing countries", *Heliyon*, **6(4)**, DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03690.
- [6] A.L. Vecchio, M.L. Conelli, A. Guarino (2021), "Infections and chronic diarrhea in children", *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **40(7)**, pp.e255-e258, DOI: 10.1097/INF.0000000000003182.
- [7] G.A. Coté, A.L. Buchman (2006), "Antibiotic-associated diarrhoea", *Expert. Opin. Drug Saf.*, **5(3)**, pp.361-372, DOI: 10.1517/14740338.5.3.361.
- [8] P. Szychowiak, K.V. Tran, J. Patrier, et al. (2022), "The role of the microbiota in the management of intensive care patients", *Ann. Intensive Care*, **12(1)**, DOI: 10.1186/s13613-021-00976-5.
- [9] S. Hempel, S.J. Newberry, A.R. Maher, et al. (2012) "Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis", *Jama*, **307(18)**, pp.1959-1969, DOI: 10.1001/jama.2012.3507.
- [10] M. Sanklecha, L. Verma, U. Pai, et al. (2022), "*Lactobacillus rhamnosus* GG evaluation in acute diarrhea (LEAD): An observational study", *Cureus*, **14(4)**, DOI: 10.7759/cureus.24594.
- [11] G. Ianiro, G. Rizzatti, M. Plomer, et al. (2018), "*Bacillus clausii* for the treatment of acute diarrhea in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *Nutrients*, **10(8)**, DOI: 10.3390/nu10081074.
- [12] J.A.D. Castro, D. Kesavelu, K.R. Lahiri, et al. (2020), "Recommendations for the adjuvant use of the poly-antibiotic-resistant probiotic *Bacillus clausii* (O/C, SIN, N/R, T) in acute, chronic, and antibiotic-associated diarrhea in children: Consensus from Asian experts", *Trop. Dis. Travel Med. Vaccines*, **6(21)**, DOI: 10.1186/s40794-020-00120-4.
- [13] M. Perotti, N. Mancini, A. Cavallero, et al. (2006), "Quantitation of *Bacillus clausii* in biological samples by real-time polymerase chain reaction", *J. Microbiol. Methods*, **65(3)**, pp.632-636, DOI: 10.1016/j.mimet.2005.10.010.
- [14] B. Maugo, C.Y. Jowi, F. Murila, et al. (2021), "Effectiveness of *Bacillus clausii* in reducing duration of illness in acute diarrhoea in children 6-59 months of age admitted with severe dehydration", *East Afr. Med. J.*, **98**, pp.3649-3658.
- [15] World Gastroenterology Organisation Global Guidelines (2023), *Probiotics and Prebiotics*, <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/english>, accessed 5 May 2022.
- [16] D. Gaón, H. García. L. Winter, et al. (2003), "Effect of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children", *Medicina*, **63(4)**, pp.293-298.
- [17] S. Basu, M. Chatterjee, S. Ganguly, et al. (2007), "Efficacy of *Lactobacillus rhamnosus* GG in acute watery diarrhoea of Indian children: A randomised controlled trial", *J. Paediatr. Child Health*, **43(12)**, pp.837-842, DOI: 10.1111/j.1440-1754.2007.01201.x.