

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
VIỆN SÓT RÉT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

BỘ Y TẾ

-----\*-----

**ĐẶNG THÚY HÀ**

**NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI HỆ VI SINH ĐƯỜNG RUỘT  
VÀ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ TIÊU CHẢY KÉO DÀI Ở TRẺ EM  
TỪ 3 - 24 THÁNG TUỔI BẰNG LIỆU PHÁP PROBIOTICS  
TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG (2022 - 2023)**

**Chuyên ngành** : Bệnh truyền nhiễm và các bệnh nhiệt đới  
**Mã số.** : 972.01.09

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2024**

**Công trình được hoàn thành tại:**  
**Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trần Minh Điển
2. PGS.TS. Phùng Thị Bích Thủy

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng trung ương

Vào hồi    giờ    ngày    tháng    năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội
- Thư viện Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Ha Thuy Dang, Dien Minh Tran, Thuy Bich Phung et al. (2024), “Promising clinical and immunological efficacy of *Bacillus clausii* spore probiotics for supportive treatment of persistent diarrhea in children”, *Nature Scientific Reports*, 14:6422.
2. Dang Thuy Ha, Tran Minh Dien, Phung Bich Thuỷ. (2024), “Thử nghiệm đánh giá an toàn và tác dụng của các sản phẩm bào tử lợi khuẩn *Bacillus* trên trẻ em tiêu chảy kéo dài”. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 66(6), tr. 74-80.



## ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chảy kéo dài (TCKD) ở trẻ em dưới 5 tuổi vẫn là một thách thức y tế đáng kể, đặc biệt tại các quốc gia đang phát triển. Mặc dù chỉ chiếm 10% tổng số ca mắc tiêu chảy, TCKD gây ra tới 35% tổng số ca tử vong liên quan đến bệnh này. Gần đây, các nghiên cứu đã chỉ ra mối liên hệ quan trọng giữa rối loạn hệ vi sinh đường ruột (VSĐR) và tiêu chảy, mở ra hướng tiếp cận mới trong chẩn đoán và điều trị. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về TCKD còn hạn chế, đặc biệt là về cơ chế bệnh sinh và phương pháp điều trị hiệu quả. Nghiên cứu này nhằm khám phá sự biến đổi hệ VSĐR ở trẻ mắc TCKD và đánh giá hiệu quả của liệu pháp probiotics, sử dụng công nghệ giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả nghiên cứu này hứa hẹn cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các chiến lược can thiệp hiệu quả, góp phần giảm gánh nặng bệnh tật và tử vong do TCKD ở trẻ em Việt Nam. Vì vậy, chúng tôi tiến hành: **“Nghiên cứu biến đổi hệ vi sinh đường ruột và hiệu quả điều trị tiêu chảy kéo dài ở trẻ em từ 3 - 24 tháng tuổi bằng liệu pháp probiotics tại Bệnh viện Nhi Trung ương (2022 - 2023)”** với ba mục tiêu:

1. *Mô tả đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở trẻ 3 - 24 tháng tuổi mắc tiêu chảy kéo dài tại Bệnh viện Nhi Trung ương.*
2. *Mô tả sự biến đổi hệ vi sinh đường ruột của trẻ mắc tiêu chảy kéo dài bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.*
3. *Đánh giá hiệu quả của liệu pháp probiotics trong điều trị tiêu chảy kéo dài.*

### **Tính cấp thiết của luận án thể hiện ở ba khía cạnh chính**

- TCKD là một vấn đề sức khỏe nghiêm trọng, đặc biệt ở trẻ từ 3-24 tháng tuổi, giai đoạn quan trọng cho sự phát triển của hệ VSĐR và hệ miễn dịch.
- Cần hiểu rõ hơn về nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của TCKD, đặc biệt là mối liên hệ với hệ VSĐR. Hiểu biết này có thể dẫn đến những phương pháp chẩn đoán và điều trị mới, hiệu quả hơn.

- Đánh giá hiệu quả của liệu pháp probiotics trong điều trị TCKD. Nếu chứng minh được hiệu quả, điều này có thể cung cấp một phương pháp điều trị mới, an toàn và hiệu quả cho trẻ em.

### **Những đóng góp mới của luận án**

- Áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA Illumina MiSeq, là nghiên cứu tiên phong tại Việt Nam trong nghiên cứu TCKD ở trẻ em 3-24 tháng tuổi.
- Cung cấp hiểu biết sâu sắc về mối liên hệ giữa hệ VSĐR và TCKD trong bối cảnh Việt Nam.
- So sánh trực tiếp hiệu quả của probiotics đơn chủng và đa chủng trong điều trị TCKD.
- Cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các phương pháp điều trị TCKD hiệu quả hơn.

### **Bố cục luận án**

Luận án có 127 trang, bao gồm các phần: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (31 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (21 trang), kết quả nghiên cứu (34 trang), bản luận (36 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang). Luận án có 14 bảng, 32 hình. Có 175 tài liệu tham khảo.

## **Chương 1 TỔNG QUAN**

### **1.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng tiêu chảy kéo dài ở trẻ em**

#### **1.1.1. Định nghĩa và dịch tễ học**

Tiêu chảy kéo dài (TCKD) được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và Hiệp hội Tiêu hóa Nhi khoa Châu Âu (ESPGHAN/ESPID) định nghĩa là tình trạng tiêu chảy kéo dài từ 14 đến 28 ngày. Định nghĩa này loại trừ các nguyên nhân như dị ứng thực phẩm, bệnh lý đường ruột bẩm sinh và bệnh Celiac. TCKD là một vấn đề sức khỏe cộng đồng đáng kể, với tỷ lệ mắc dao động từ 1,4% đến 28,4% tại các quốc gia có thu nhập thấp và trung bình. Trên phạm vi toàn cầu, khoảng 3-5% trẻ nữ nhi bị ảnh hưởng bởi tình trạng này. Tại Việt Nam, tỷ lệ tiêu chảy cấp chuyển thành TCKD dao động từ 2,8% đến 5,3%, phản ánh gánh nặng đáng kể của bệnh lý này trong bối cảnh địa phương.

### **1.1.2. Căn nguyên gây bệnh**

Tiêu chảy kéo dài có cơ chế bệnh sinh phức tạp, bao gồm các yếu tố liên quan đến tác nhân gây bệnh và rối loạn sinh lý bệnh của vật chủ:

#### **1.1.2.1. Nguyên nhân do vi sinh vật**

- Tác nhân gây bệnh trực tiếp: Bao gồm các chủng E. coli gây bệnh (EAEC, EPEC, EHEC/STEC, ETEC, EIEC), Campylobacter jejuni, Clostridium difficile, Shigella spp., Cryptosporidium spp., norovirus, và rotavirus.
- Rối loạn hệ vi sinh đường ruột: Đặc trưng bởi sự tăng mật độ của các vi khuẩn có hại và giảm số lượng vi khuẩn có lợi, dẫn đến mất cân bằng hệ vi sinh đường ruột.

#### **1.1.2.2. Nguyên nhân không do vi sinh vật**

- Tiêu chảy sau viêm ruột (PID): Xuất hiện sau các đợt nhiễm trùng đường ruột cấp tính, chủ yếu do rotavirus, norovirus, vi khuẩn hoặc ký sinh trùng.
- Tiêu chảy liên quan đến kháng sinh (AAD): Chiếm 5-30% các trường hợp TCKD ở trẻ em, phản ánh tác động của kháng sinh lên hệ vi sinh đường ruột.

### **1.1.3. Các yếu tố nguy cơ**

Nghiên cứu đã xác định một số yếu tố nguy cơ chính liên quan đến TCKD:

- Tuổi: Trẻ dưới 12 tháng tuổi có nguy cơ cao nhất, phản ánh sự chưa trưởng thành của hệ miễn dịch và đường tiêu hóa.
- Chế độ dinh dưỡng: Không nuôi dưỡng hoàn toàn bằng sữa mẹ làm tăng nguy cơ mắc TCKD từ 2-4 lần. Suy dinh dưỡng làm tăng nguy cơ gấp đôi. Thiếu hụt vi chất dinh dưỡng, đặc biệt là vitamin A, kẽm, acid folic và sắt, cũng làm tăng nguy cơ mắc TCKD.
- Tiền sử bệnh lý: Nhiễm trùng gần đây hoặc tiền sử TCKD làm tăng nguy cơ từ 2 đến 4 lần. Suy giảm miễn dịch làm tăng nguy cơ 1,8 lần.

- Yếu tố môi trường và xã hội: Điều trị tiêu chảy không phù hợp và lạm dụng kháng sinh. Điều kiện vệ sinh môi trường kém và chăm sóc không đầy đủ. Tỷ lệ bao phủ vắc xin rotavirus thấp.

#### ***1.1.4. Đánh giá lâm sàng và cận lâm sàng***

Đánh giá TCKD ở trẻ em đòi hỏi một cách tiếp cận toàn diện, kết hợp giữa thu thập tiền sử, đánh giá lâm sàng và xét nghiệm cận lâm sàng.

Về mặt lâm sàng, cần chú ý đến các yếu tố nguy cơ, đặc điểm của phân, triệu chứng đi kèm, tình trạng mất nước, rối loạn điện giải và tình trạng dinh dưỡng. Đánh giá ổ bụng và vùng hậu môn cũng cung cấp thông tin quan trọng

Về cận lâm sàng, các xét nghiệm máu giúp đánh giá tình trạng thiếu máu, nhiễm trùng và rối loạn điện giải. Xét nghiệm phân, đặc biệt là kỹ thuật real-time PCR, có vai trò quan trọng trong việc xác định nguyên nhân gây bệnh. Các phương pháp chẩn đoán hình ảnh như X-quang và siêu âm ổ bụng cũng hỗ trợ trong chẩn đoán phân biệt.

Việc kết hợp đầy đủ các phương pháp đánh giá lâm sàng và cận lâm sàng là cần thiết để đưa ra chẩn đoán xác định và toàn diện cho từng trường hợp TCKD cụ thể.

## **1.2. Hệ vi sinh đường ruột**

### ***1.2.1. Giải trình tự gen 16S rRNA hệ vi sinh đường ruột***

Công nghệ giải trình tự gen 16S rRNA, đặc biệt nhắm vào vùng V3-V4, sử dụng nền tảng Illumina, đã nổi lên như tiêu chuẩn vàng trong nghiên cứu hệ vi sinh vật đường ruột. Gen 16S rRNA sở hữu một số đặc điểm lý tưởng để nhận dạng và phân loại vi khuẩn, bao gồm tính phổ biến, bảo tồn tiến hóa, độ dài tối ưu và cấu trúc riêng biệt. Công nghệ giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS) chứng tỏ tính ưu việt so với các phương pháp Sanger truyền thống về thông lượng, độ chính xác, tốc độ và hiệu quả về chi phí. hện những ứng dụng quan trọng trong chẩn đoán và điều trị.

### ***1.2.2. Thành phần và vai trò hệ vi sinh đường ruột***

Hệ VSĐR là một hệ sinh thái phức tạp bao gồm hàng trăm loài vi khuẩn từ hơn 50 ngành. Ba ngành chiếm ưu thế - Firmicutes,



Bacteroidetes và Actinobacteria - đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa carbohydrate, sản xuất axit béo chuỗi ngắn và hỗ trợ hệ thống miễn dịch. Các ngành khác, bao gồm Proteobacteria, Fusobacteria và Verrucomicrobia, góp phần vào sự đa dạng và cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột. Sự phát triển của hệ vi sinh vật đường ruột trong 1000 ngày đầu đời rất quan trọng đối với kết quả sức khỏe lâu dài. Firmicutes, đại diện là *Lactobacillus* và *Clostridium*, tham gia vào quá trình chuyển hóa lactose và sản xuất SCFA. Bacteroidetes, bao gồm *Bacteroides* và *Prevotella*, rất cần thiết cho quá trình lên men chất xơ phức tạp và điều hòa miễn dịch. Actinobacteria, chủ yếu là *Bifidobacterium*, chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh và chuyển hóa HMOs.

### **1.2.3. Quá trình hình thành hệ vi sinh đường ruột khoẻ mạnh**

Sự phát triển của hệ VSĐR trong 1000 ngày đầu đời bao gồm ba giai đoạn quan trọng: trước khi sinh, sau khi sinh và bắt đầu ăn dặm. Phương thức sinh con, cho con bú và cho ăn bổ sung đóng vai trò then chốt trong việc hình thành thành phần và sự đa dạng của hệ VSĐR. Sự chuyển đổi từ sự thống trị của *Bifidobacteria* sang một cộng đồng vi khuẩn đa dạng hơn phản ánh sự thích nghi với các mô hình chế độ ăn uống ngày càng phức tạp. Ban đầu, sinh thường và cho con bú thúc đẩy sự hình thành các vi khuẩn có lợi, đặc biệt là *Bifidobacterium*, chuyển hóa oligosaccharides sữa mẹ một cách hiệu quả. Giai đoạn cai sữa đánh dấu một sự thay đổi đáng kể, đặc trưng bởi sự giảm *Bifidobacterium* và tăng *Bacteroides* và *Clostridium*, cùng với sự gia tăng ngắn hạn khả năng sản xuất axit béo chuỗi. Đến cuối năm thứ hai, hệ VSĐR của trẻ đạt đến thành phần giống như người lớn. Hiểu được các giai đoạn phát triển này có thể tạo cơ hội cho các biện pháp can thiệp sớm để cải thiện kết quả sức khỏe lâu dài ở trẻ em.

### **1.2.4. Vai trò của hệ vi sinh vật đường ruột trong bệnh tiêu chảy**

Hệ VSĐR đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì sức khỏe đường tiêu hóa và chức năng miễn dịch. Rối loạn VSĐR

(dysbiosis), một tình trạng mất cân bằng của hệ vi sinh vật, có thể dẫn đến các rối loạn khác nhau, bao gồm tiêu chảy kéo dài.

#### 1.2.4.1. Giảm đa dạng và thay đổi thành phần của vi khuẩn

Rối loạn VSĐR được đặc trưng bởi sự giảm đa dạng và mật độ của các vi khuẩn có lợi, cùng với sự gia tăng của các vi khuẩn gây bệnh hoặc có cơ hội. Các yếu tố như phương thức sinh nở, sử dụng kháng sinh sớm và chế độ ăn uống có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của hệ vi sinh vật đường ruột ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

Sự suy giảm của các loài *Bifidobacterium* (ví dụ: *B. longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum*, *B. breve*) đặc biệt đáng kể. Những vi khuẩn này không chỉ kích thích hệ miễn dịch đang phát triển mà còn tạo ra môi trường axit và kỵ khí, ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh. Sự mất cân bằng này có thể kéo dài đến 12 tháng tuổi và có những tác động lâu dài đến sự phát triển về miễn dịch, chuyển hóa và thần kinh của trẻ.

#### 1.2.4.2. Tác động của rối loạn vi sinh đường ruột đến hệ miễn dịch

Rối loạn VSĐR kéo dài có thể dẫn đến rối loạn chức năng miễn dịch đường ruột, bao gồm:

*Giảm tế bào T điều hòa (Tregs):* Tế bào T điều hòa đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì sự dung nạp miễn dịch và ngăn ngừa viêm mạn tính. Chúng tiết ra các cytokine chống viêm như TGF- $\beta$  và IL-10, kiểm soát các phản ứng miễn dịch quá mức. Sự suy giảm tế bào T điều hòa có thể dẫn đến mất cân bằng miễn dịch và tăng nguy cơ viêm mạn tính.

*Tăng tế bào Th17:* Tế bào Th17 sản sinh ra IL-17, một cytokine quan trọng trong việc kích hoạt các phản ứng viêm. Rối loạn vi sinh vật đường ruột có thể làm tăng tính thấm đường ruột, kích hoạt các thụ thể nhận dạng mẫu (PRRs) trên các tế bào biểu mô đường ruột. PRRs kích thích sản xuất các cytokine tiền viêm (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- $\alpha$ ), do đó thúc đẩy sự phát triển và tăng mật độ của tế bào Th17.

Việc duy trì cân bằng hệ VSĐR là rất quan trọng để đảm bảo phản ứng miễn dịch bình thường và ngăn ngừa viêm đường ruột mạn tính. Hiểu sâu về mối quan hệ giữa rối loạn VSĐR và rối loạn điều

hòa miễn dịch mở ra những triển vọng mới trong việc phát triển các chiến lược can thiệp để phòng ngừa và điều trị TCKD ở trẻ em.

### **1.3. Liệu pháp probiotics trong điều trị tiêu chảy kéo dài**

Probiotics đang nổi lên như một phương pháp điều trị hỗ trợ đầy hứa hẹn cho TCKD ở trẻ em. Các nghiên cứu và hướng dẫn quốc tế, đặc biệt là từ ESPGHAN, đã chỉ ra hiệu quả của một số chủng probiotics cụ thể trong việc giảm thời gian và mức độ nặng của tiêu chảy. Tuy nhiên, đối với TCKD, bằng chứng vẫn chưa đủ mạnh để đưa ra khuyến nghị chính thức.

Điểm đáng chú ý là:

Chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác động của probiotics lên hệ vi sinh đường ruột ở trẻ mắc TCKD tại Việt Nam cũng như trên thế giới. Đây là một khoảng trống quan trọng trong y văn, tạo cơ hội cho nghiên cứu mới mang tính đột phá.

Tại Việt Nam, mặc dù probiotics đã được đưa vào hướng dẫn điều trị tiêu chảy cấp, nhưng việc sử dụng trong điều trị TCKD vẫn chưa được thực hiện rộng rãi. Điều này nhấn mạnh nhu cầu cấp thiết cho các nghiên cứu đánh giá hiệu quả của probiotics trong bối cảnh cụ thể của Việt Nam.

Probiotics dạng bào tử *Bacillus* (SFP) đang nổi lên như một hướng nghiên cứu đầy triển vọng. Các chủng *Bacillus* có nhiều ưu điểm vượt trội: (i) Khả năng sống sót cao trong môi trường đường tiêu hóa khắc nghiệt; (ii) Đặc tính di truyền, có lợi, không mang gen kháng kháng sinh; Tính an toàn được công nhận bởi các cơ quan uy tín như FDA; (iii) Khả năng sản xuất enzyme ngoại bào và các chất có lợi cho sức khỏe.

Tuy nhiên, vẫn còn nhiều thách thức cần được giải quyết:

- Cần thêm nghiên cứu lâm sàng dài hạn để đánh giá đầy đủ hiệu quả và tính an toàn của SFP.
- Hiệu quả của probiotics phụ thuộc vào chủng cụ thể, đòi hỏi đánh giá riêng cho từng chủng *Bacillus*.

- Cần nghiên cứu để xác định hiệu quả cụ thể của SFP trong điều trị TCKD ở trẻ em, bao gồm tối ưu hóa liều lượng và thời gian sử dụng.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

##### 2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Trẻ 3-24 tháng tuổi, tiêu chảy kéo dài 2-4 tuần,  $\geq 3$  lần/ngày.
- Không thuyên giảm, cần nhập viện điều trị.
- Cha mẹ/người giám hộ đồng ý tham gia.

##### 2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Tình trạng nặng cần chăm sóc đặc biệt.
- Bệnh lý mạn tính, suy giảm miễn dịch, dị tật bẩm sinh.
- Sinh non hoặc suy dinh dưỡng nặng.
- Đã sử dụng probiotics chứa các chủng nghiên cứu.

#### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: giai đoạn 2022 - 2023.
- Địa điểm: Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi Trung ương.

#### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.3.1. Thiết kế nghiên cứu và phương pháp tính cỡ mẫu

#### Mục tiêu 1: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

- **Thiết kế:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang.
- **Phương pháp tính cỡ mẫu:** Áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho việc xác định một tỷ lệ.
- **Mục đích:** Ước tính tỷ lệ trẻ mắc TCKD có các đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng.
- **Cỡ mẫu:**  $n \geq 147$

#### Mục tiêu 2: Nghiên cứu mô tả cắt ngang có so sánh

- **Thiết kế:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang có so sánh
- **Phương pháp tính cỡ mẫu:** Sử dụng công thức tính cỡ mẫu cho việc so sánh hai nhóm độc lập
- **Mục đích:** Đánh giá sự khác biệt về thành phần vi sinh vật giữa trẻ mắc TCKD và trẻ khỏe mạnh

- **Phương pháp chọn mẫu:** Phân tầng ngẫu nhiên để đảm bảo sự cân bằng giữa các nhóm về các yếu tố quan trọng
- **Cỡ mẫu:** Nhóm bệnh:  $n \geq 17$ ; Nhóm khỏe mạnh:  $n \geq 13$

### **Mục tiêu 3: Nghiên cứu can thiệp lâm sàng**

- **Thiết kế:** Nghiên cứu can thiệp lâm sàng (thử nghiệm lâm sàng vượt trội)
- **Phương pháp tính cỡ mẫu:** Áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho thử nghiệm lâm sàng vượt trội
- **Mục đích:** So sánh hiệu quả điều trị giữa nhóm sử dụng probiotics và nhóm đối chứng
- **Cơ sở tính toán:** Dựa trên các nghiên cứu trước đó và giả định về hiệu quả điều trị của probiotics
- **Cỡ mẫu:** Tổng:  $n \geq 147$ ; Nhóm can thiệp (probiotics):  $n_1 = 98$ ; Nhóm chứng (giả dược):  $n_2 = 49$

#### **2.3.2. Quy trình nghiên cứu**

Tuyển chọn đối tượng: Trẻ 3-24 tháng mắc tiêu TCKD tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Mục tiêu tối thiểu 147 trẻ.

##### **2.3.2.1. Thu thập dữ liệu cho mục tiêu 1**

Sử dụng bệnh án chuẩn hóa, đánh giá lâm sàng và xét nghiệm.

##### **2.3.2.2. Phân nhóm và lấy mẫu cho mục tiêu 2**

- Phân nhóm ngẫu nhiên: Sử dụng phần mềm GraphPad.
- Lấy mẫu phân tầng ngẫu nhiên: Ít nhất 17 trẻ TCKD và nhóm tham chiếu trẻ khỏe mạnh.
- Phân tích 16S rRNA từ mẫu phân.

##### **2.3.2.3. Can thiệp và thu thập dữ liệu cho mục tiêu 3**

- Ba nhóm: Chứng (giả dược), Clausy (probiotic đơn chủng), Dia30 (probiotic đa chủng).
- Liều lượng và theo dõi được quy định cụ thể.
- Đánh giá lâm sàng và xét nghiệm định kỳ.

#### **2.3.3. Đảm bảo mù đôi**

Đóng gói giống nhau, mã hóa mẫu, quy trình giải mã khẩn cấp.

#### **2.3.4. Biến số nghiên cứu**

Độc lập (phương pháp điều trị), phụ thuộc (hiệu quả điều trị).

### **2.3.5. Các chỉ số nghiên cứu**

#### **2.3.5.1. Chỉ số đánh giá**

- Chính: Tỷ lệ trẻ khỏi TCKD tại ngày 5 (tiêu chí lâm sàng và cận lâm sàng).
- Phụ: Biến đổi hệ vi sinh đường ruột và thông số miễn dịch.

#### **2.3.5.2. Đánh giá hiệu quả probiotics**

- So sánh tỷ lệ khỏi bệnh giữa các nhóm.
- Đánh giá thay đổi hệ vi sinh và đáp ứng miễn dịch.
- Theo dõi tính an toàn.

### **2.3.6. Quản lý và phân tích dữ liệu**

- Thu thập qua REDCap, mã hóa theo ICD-10.
- Kiểm tra chất lượng dữ liệu hai lớp.
- Phân tích theo ý định điều trị (ITT).
- Sử dụng GraphPad Prism và R cho phân tích thống kê.
- Phương pháp: Khoảng tin cậy 95%, kiểm định Shapiro-Wilk, MaAsLin2.
- Phân tích bổ sung: Kaplan-Meier cho thời gian khỏi bệnh; Phân tích đa dạng hệ vi sinh (Alpha và Beta).

### **2.3.7. Sai số và kiểm soát sai số**

#### **2.3.7.1. Sai số hệ thống**

- Nhận diện: Sai lệch lựa chọn, sai sót thu thập dữ liệu, không tuân thủ can thiệp, mất theo dõi, sai số đo lường, và nhiễu.
- Kiểm soát: Áp dụng tiêu chuẩn lựa chọn chặt chẽ, đào tạo nhóm nghiên cứu, giám sát tuân thủ, phân tích intention-to-treat, sử dụng phương pháp đo lường chuẩn, và kiểm soát yếu tố nhiễu.

#### **2.3.7.2. Sai số ngẫu nhiên**

- Nguyên nhân: Sai số đo lường, biến thiên sinh học và lấy mẫu.
- Khắc phục: Tăng cỡ mẫu, lặp lại đo lường, chuẩn hóa quy trình, và sử dụng phân tích thống kê phù hợp.

### **2.3.8. Đạo đức trong nghiên cứu**

- Phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức Bệnh viện Nhi Trung ương.
- Tuân thủ nguyên tắc Helsinki, ICH GCP, và quy định của Bộ Y tế.

- Cung cấp thông tin đầy đủ và lấy chấp thuận tham gia.
- Đảm bảo quyền rút khỏi nghiên cứu, bảo mật thông tin cá nhân.
- Báo cáo biến cố bất lợi nghiêm trọng trong 24 giờ.
- Đăng ký nghiên cứu trên ClinicalTrials.gov.
- Công bố kết quả theo hướng dẫn CONSORT.
- Kê khai và quản lý xung đột lợi ích tiềm tàng.

### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu khảo sát 158 trẻ mắc TCKD từ 3-24 tháng tuổi.

### 3.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng trẻ tiêu chảy kéo dài.

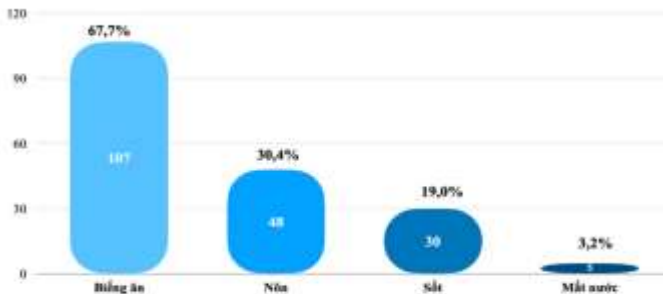
#### 3.1.1. Đặc điểm dịch tễ học và yếu tố nguy cơ

##### 3.1.1.1. Đặc điểm chung trẻ mắc tiêu chảy kéo dài

- Tuổi trung vị 5 tháng (IQR: 3 tháng), 57,6% dưới 6 tháng tuổi.
- Nam giới chiếm 58,2% các trường hợp.
- Các yếu tố nguy cơ chính bao gồm: sinh mổ (72,1%), tiền sử mắc bệnh (45,6%) và sử dụng kháng sinh (42,4%) 2 tháng trước khi mắc TCKD.
- 53,8% bà mẹ mắc bệnh trong thai kỳ, trong đó 72,9% mắc COVID-19.

#### 3.1.2. Biểu hiện lâm sàng của trẻ mắc tiêu chảy kéo dài

##### 3.1.2.1. Triệu chứng lâm sàng thường gặp của trẻ tiêu chảy kéo dài



Hình 3.1. Triệu chứng lâm sàng thường gặp của trẻ tiêu chảy kéo dài (n = 158)

**Nhận xét:**

- Biếng ăn là triệu chứng phổ biến nhất (67,7%).
- Tiếp theo là nôn (30,4%) và sốt (19,0%).
- Chỉ 3,2% trẻ có dấu hiệu mất nước khi nhập viện.

**3.1.2.2. Đặc điểm phân trẻ mắc tiêu chảy kéo dài**

- Đặc điểm phân: 43,0% trẻ đi ngoài 6-7 lần/ngày, 52,5% có nhiều nhầy trong phân, 25,3% có máu trong phân.
- Phân chủ yếu typ 4 (50,6%) và typ 5A (43,7%) theo Diapered.

**3.1.3. Đặc điểm cận lâm sàng trẻ mắc tiêu chảy kéo dài**

Kết quả soi phân tươi: Tất cả đều có bạch cầu trong phân, với 69,6% có mật độ bạch cầu từ 3+ trở lên; 44,3% trẻ có hồng cầu.

**Bảng 3.8. Kết quả phân lập vi khuẩn bằng nuôi cấy phân (n = 158)**

Kết quả		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Âm tính		150	94,9
Dương tính		8	5,1
Tác nhân	<i>Escherichia coli</i>	7	87,5
	<i>Salmonella enteriaca</i>	1	12,5

**Nhận xét:** Tỷ lệ nuôi cấy phân dương tính thấp (5,1%). Trong các trường hợp dương tính, *Escherichia coli* chiếm đa số và 1 trường hợp là *Salmonella enteriaca*.

**Bảng 3.9. Phân bố tác nhân gây bệnh bằng PCR (n = 158)**

Tác nhân	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Âm tính	118	74,7
Dương tính	40	25,3
Vi khuẩn]	19	47,5
Đồng nhiễm vi khuẩn và vi rút	12	30,0
Vi rút	9	22,5



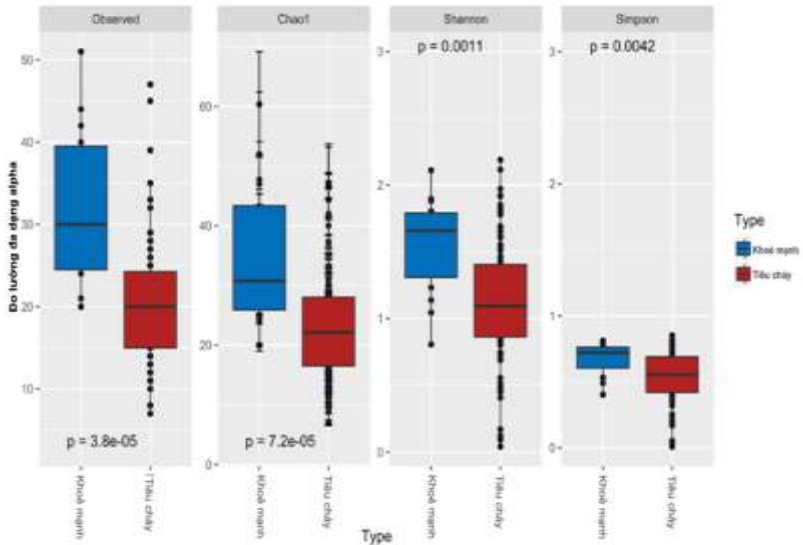
### Nhận xét:

- Tỷ lệ âm tính cao 74,7% (118/158 trường hợp) không phát hiện được tác nhân gây bệnh cụ thể bằng kỹ thuật PCR.
- Tỷ lệ dương tính là 25,3% (40/158 trường hợp). Trong số các trường hợp dương tính, vi khuẩn chiếm tỷ lệ cao nhất với 47,5% (19/40), tiếp theo là đồng nhiễm vi khuẩn và vi rút 30,0% (12/40) vi rút đơn thuần chiếm 22,5% (9/40).
- Tác nhân phổ biến nhất là *C. difficile*, Norovirus, *Campylobacter* spp., EAEC và *Salmonella* spp. Trẻ 3-6 tháng tuổi có sự đa dạng mầm bệnh nhất.

## 3.2. Mô tả sự biến đổi hệ vi sinh đường ruột trẻ tiêu chảy kéo dài

### 3.2.1. Đa dạng hệ vi sinh đường ruột

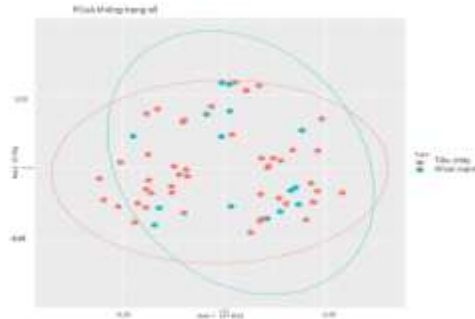
#### 3.2.1.1. Đa dạng alpha hệ vi sinh đường ruột



**Hình 3.4.** So sánh các các chỉ số dạng alpha của hệ vi sinh đường ruột giữa trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài

**Nhận xét:** Trẻ mắc TCKD có đa dạng thành phần loài thấp hơn so với trẻ khỏe mạnh. Phân bố các loài vi khuẩn kém đồng đều hơn ở trẻ TCKD. Số lượng loài hiếm gặp ít hơn ở trẻ TCKD.

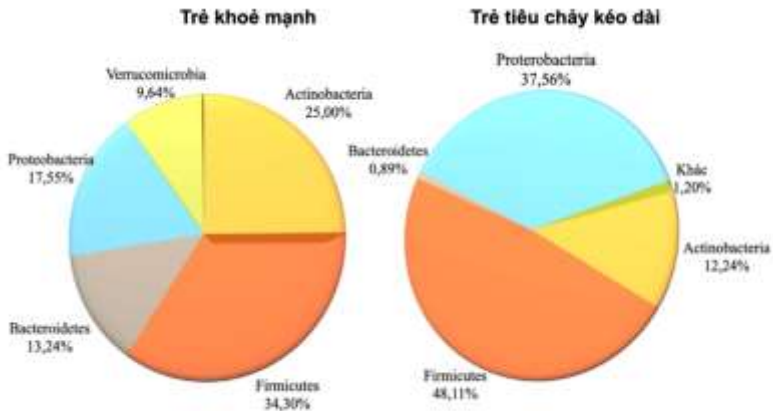
### 3.2.1.2. Đa dạng beta hệ vi sinh đường ruột



**Hình 3.5. Phân tích thành phần chính (PCoA) của hệ vi sinh đường ruột ở trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài**

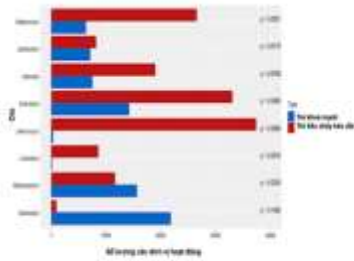
**Nhận xét:** Sự phân biệt không hoàn toàn giữa nhóm trẻ khỏe mạnh và TCKD qua phân tích PCoA gợi ý TCKD không gây ra sự thay đổi đột ngột trong hệ vi sinh, mà là một quá trình chuyển đổi dần dần.

### 3.2.2. Thành phần hệ vi sinh đường ruột trẻ tiêu chảy kéo dài

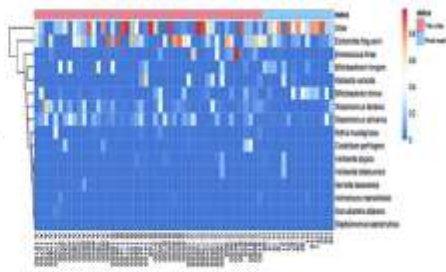


**Hình 3.6. So sánh mức độ phong phú vi sinh đường ruột ở trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài theo phân loại cấp độ ngành**

**Nhận xét:** Ở trẻ mắc TCKD, có sự gia tăng đáng kể của ngành Proteobacteria và Firmicutes, trong khi ngành Actinobacteria và Bacteroidetes giảm mạnh so với trẻ khỏe mạnh.



Hình 3.9. So sánh số lượng đơn vị phân loại hoạt động của các chi vi khuẩn chính đường ruột giữa trẻ tiêu chảy kéo dài và trẻ khỏe mạnh



Hình 3.10. Biểu đồ nhiệt (heatmap) so sánh độ phong phú tương đối của các loài vi khuẩn đường ruột chủ yếu

**Nhận xét:** Trẻ mắc TCKD có sự biến động về thành phần bao gồm sự suy giảm đáng kể chi *Bifidobacterium*, gia tăng chi *Escherichia*, *Clostridium* và *Streptococcus* ở nhóm trẻ TCKD so với nhóm trẻ khỏe mạnh. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Sự suy giảm *B. longum* và *B. breve*, cùng với sự gia tăng của *E. fergusonii*, *K. variicola* và *C. perfringens* ở trẻ TCKD

### 3.3. Đánh giá hiệu quả điều trị tiêu chảy kéo dài có bổ sung probiotics

#### 3.3.1. Các chỉ số nghiên cứu chính

Nghiên cứu cho thấy hiệu quả vượt trội của probiotics trong điều trị TCKD. Nhóm Dia30 (3 chủng probiotics) có tỷ lệ khỏi bệnh cao nhất (77,4%) và thời gian điều trị ngắn nhất (trung vị 2-3 ngày), tiếp theo là nhóm Clausy (60,8%, 3-4 ngày), và thấp nhất ở nhóm Chứng (31,5%, 5-6 ngày).

Khả năng khỏi bệnh ở nhóm Dia30 và Clausy cao hơn nhóm Chứng lần lượt 7,43 và 3,37 lần. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ( $p < 0,0001$ ), với nhóm Dia30 cho kết quả tốt hơn đáng kể so với nhóm Clausy.

Biến cố bất lợi dẫn đến dừng điều trị: Không ghi nhận trường hợp nào ở cả ba nhóm (Chứng, Clausy, Dia30). Không có trường hợp nào yêu cầu dừng điều trị ở cả ba nhóm.

#### 3.3.2. Các chỉ số nghiên cứu phụ vào ngày thứ 5 can thiệp

##### 3.3.2.1. Tác động đến hệ vi sinh đường ruột

Nhóm Chứng và Clausy cho thấy xu hướng giảm các chỉ số đa dạng alpha so với ngày 0, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở chỉ số Shannon và Simpson ( $p < 0,05$ ). Nhóm Dia30 thể hiện xu hướng tăng các chỉ số này tại ngày 5, cao hơn so với hai nhóm kia.

Cả hai chế phẩm probiotics (Clausy và Dia30) đều thể hiện hiệu quả trong việc giảm mật độ các vi khuẩn có khả năng gây bệnh như *Escherichia* và *Clostridium*, với Dia30 cho thấy hiệu quả vượt trội. Dia30 giúp duy trì tốt hơn mật độ *Bifidobacterium*, trong khi cả Clausy và Dia30 đều thúc đẩy sự gia tăng đáng kể của *Lactocaseibacillus*.

### 3.3.3.2. Tác động đến các yếu tố miễn dịch

Ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch: Dia30 thể hiện hiệu quả vượt trội trong việc điều hòa đáp ứng viêm, với sự giảm đáng kể của nhiều cytokine gây viêm (IL-17, IL-23, IL-6, TNF- $\alpha$ ). Clausy cũng cho thấy tác động tích cực, mặc dù ở mức độ thấp hơn, chủ yếu tập trung vào IL-17 và IL-23.

Sự gia tăng nhẹ của IL-10 (cytokine kháng viêm) ở nhóm Dia30 gợi ý về khả năng cân bằng đáp ứng miễn dịch.

Tác động lên IgA bài tiết trong phân: Cả Dia30 và Clausy đều làm giảm đáng kể nồng độ IgA bài tiết qua phân, với Dia30 cho hiệu quả rõ rệt hơn. Điều này có thể phản ánh sự cải thiện tính toàn vẹn của hàng rào ruột và giảm tình trạng viêm.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng trẻ mắc tiêu chảy kéo dài

##### 4.1.1. Đặc điểm dịch tễ học trẻ mắc tiêu chảy kéo dài

Phát hiện nổi bật nhất là sự tập trung cao của TCKD ở nhóm trẻ 3-6 tháng tuổi (57,6%), khác biệt đáng kể so với quan điểm truyền thống cho rằng TCKD thường gặp ở trẻ 6-24 tháng. Điều này gợi ý về những thay đổi trong các yếu tố môi trường và sinh học đang ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ tiêu hóa và miễn dịch ở trẻ nhũ nhi.

Có thể giải thích hiện tượng này bằng các giả thuyết sau: (i) Sự phát triển của hệ vi sinh đường ruột (VSDR) trong 6 tháng đầu đời đang bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường như sử dụng kháng sinh

sớm, chế độ ăn; (ii) Thay đổi trong thực hành nuôi dưỡng trẻ nhũ nhi, đặc biệt là xu hướng cai sữa sớm hoặc bổ sung thức ăn không phù hợp; (iii) Các yếu tố di truyền có thể đang tác động đến quá trình trưởng thành của hệ tiêu hóa và miễn dịch ở trẻ. Nghiên cứu cũng ghi nhận tỷ lệ cao các bà mẹ mắc bệnh trong thai kỳ (53,8%), trong đó nhiễm COVID-19 chiếm tới 72,9%. Điều này phản ánh tác động sâu sắc của đại dịch COVID-19 đối với sức khỏe bà mẹ và trẻ em, đồng thời gợi ý mối liên hệ giữa nhiễm SARS-CoV-2 trong thai kỳ và nguy cơ TCKD ở trẻ. Cơ chế có thể liên quan đến phản ứng viêm mạnh mẽ do nhiễm virus, cũng như những thay đổi trong hệ VSĐR của mẹ ảnh hưởng đến quá trình hình thành hệ VSĐR ban đầu của trẻ trong những tháng đầu đời.

Tỷ lệ sinh mổ cao (72,1%) ở nhóm trẻ mắc TCKD cũng là một phát hiện đáng chú ý, gợi ý mối liên hệ giữa phương pháp sinh và nguy cơ TCKD. Điều này có thể do sự thiếu hụt tiếp xúc với vi khuẩn có lợi từ mẹ trong quá trình sinh, ảnh hưởng đến quá trình phát triển của hệ miễn dịch và hệ VSĐR ở trẻ.

#### ***4.1.2. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng trẻ mắc tiêu chảy kéo dài***

Nghiên cứu đã áp dụng các công cụ đánh giá chuẩn hóa như thang điểm CoMiSS và Diapered để đánh giá toàn diện đặc điểm lâm sàng của TCKD. Phát hiện quan trọng trong nghiên cứu của chúng tôi là tỷ lệ mất nước thấp ở trẻ mắc TCKD. Chỉ có 3,2% trẻ có biểu hiện mất nước và không ghi nhận trường hợp nào mất nước nặng. Điều này phản ánh đặc điểm quan trọng của TCKD ở trẻ nhũ nhi: tình trạng mất nước thường diễn biến âm thầm và không rầm rộ như trong tiêu chảy cấp tính. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, như nghiên cứu của Pathela và cộng sự chỉ ra rằng chỉ có 5% trẻ TCKD có biểu hiện mất nước trên lâm sàng. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi một số cơ chế như giảm tiết enzyme tiêu hóa, dẫn đến giảm lượng dịch tiêu hóa bị mất, cơ thể trẻ có khả năng thích nghi dần với tình trạng mất nước từ từ, hệ thống nội tiết và thận có thể đã kích hoạt các cơ chế bù trừ để duy trì cân bằng nước và điện

giải trong thời gian dài. Tuy nhiên, mặc dù tỷ lệ mất nước thấp, việc đánh giá và quản lý cẩn thận vẫn rất quan trọng trong điều trị TCKD.

Nghiên cứu của chúng tôi đã áp dụng thang điểm Diapered để đánh giá một cách hệ thống và toàn diện đặc điểm phân ở trẻ nhũ nhi mắc TCKD. Kết quả cho thấy: Phần lớn trẻ có tần suất đi ngoài từ 5-7 lần/ngày, phản ánh tình trạng rối loạn nhu động ruột và tăng tiết dịch tiêu hóa. Hơn nữa, đa số các trẻ có phân nhầy, quánh, lỏng hơn bình thường (type 4 theo thang điểm Diapered). Điều này gợi ý tình trạng rối loạn hấp thu và tăng tiết dịch tiêu hóa do viêm niêm mạc ruột. Khoảng một phần tư số trẻ có máu đại thể trong phân, kèm theo mức độ phân nhầy từ trung bình đến nhiều. Những thay đổi này là dấu hiệu của tình trạng viêm ruột và có thể liên quan đến tổn thương niêm mạc ruột do viêm kéo dài hoặc nhiễm trùng. Các triệu chứng khác như nôn trớ có thể liên quan đến đầy hơi, chướng bụng do không tiêu hóa được thức ăn và tăng nhu động ruột. Biếng ăn được ghi nhận ở 67,7% trẻ, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Vernacchio (72%). Biếng ăn ảnh hưởng trực tiếp đến tình trạng dinh dưỡng và chất lượng cuộc sống của trẻ.

Nghiên cứu đã kết hợp cả phương pháp truyền thống và kỹ thuật hiện đại để đánh giá toàn diện đặc điểm cận lâm sàng của TCKD. Xét nghiệm soi tươi phân nhận thấy tất cả các trẻ có bạch cầu trong phân từ mức độ 2 (+) trở lên, gần một nửa số trẻ có hồng cầu trong phân, cao hơn đáng kể so với các báo cáo trước đây. Điều này phản ánh mức độ tổn thương niêm mạc ruột trong TCKD. Ngoài ra, trẻ có pH phân giảm  $\leq 5,5$ , có thể do sự thiếu hụt nguồn lợi khuẩn *Bifidobacterium*, dẫn đến giảm khả năng kháng khuẩn và tăng nguy cơ nhiễm trùng. Tỷ lệ nuôi cấy phân dương tính rất thấp (5,1%) với vi khuẩn gây bệnh được phát hiện là *E. coli* và *Salmonella*. Nghiên cứu của chúng tôi là công trình đầu tiên tại Việt Nam ứng dụng kỹ thuật real-time PCR đa môi hiện đại để phát hiện các tác nhân gây TCKD ở trẻ em. Kết quả cho thấy tỷ lệ phát hiện các tác nhân gây TCKD là 25,3%, cao hơn đáng kể so với 5,1% khi sử dụng phương pháp nuôi cấy truyền thống. Tuy nhiên, vẫn còn tới 74,7% số trường

hợp chưa xác định được nguyên nhân, đặt ra thách thức cần có thêm nhiều nghiên cứu sâu hơn..

Nghiên cứu này đã cung cấp một bức tranh toàn diện về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của TCKD ở trẻ em Việt Nam từ 3-24 tháng tuổi. Những phát hiện này không chỉ nâng cao hiểu biết về bệnh lý này mà còn có ý nghĩa quan trọng trong việc định hướng chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa TCKD ở trẻ em. Đặc biệt, việc áp dụng các kỹ thuật chẩn đoán tiên tiến như real-time PCR đã mở ra triển vọng mới trong việc xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh, từ đó cải thiện hiệu quả điều trị.

#### **4.2. Hệ vi sinh đường ruột trẻ mắc tiêu chảy kéo dài**

Một trong những phát hiện quan trọng nhất của nghiên cứu là sự suy giảm đáng kể về đa dạng alpha của hệ VSĐR ở trẻ mắc TCKD so với trẻ khỏe mạnh. Điều này không chỉ phản ánh sự giảm phong phú về số lượng loài mà còn cho thấy sự suy giảm về tính đa dạng và cân bằng trong cấu trúc cộng đồng vi sinh. Phát hiện này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, củng cố thêm giả thuyết về mối liên hệ chặt chẽ giữa sự mất cân bằng hệ VSĐR và tình trạng tiêu chảy ở trẻ em. Sự suy giảm đa dạng alpha này có thể vừa là hệ quả của tình trạng viêm và rối loạn chức năng đường ruột, vừa là yếu tố góp phần vào sự kéo dài của tình trạng tiêu chảy. Đặc biệt, nghiên cứu đã chỉ ra rằng giai đoạn 3-6 tháng tuổi là giai đoạn nhạy cảm, khi hệ VSĐR của trẻ đang trong quá trình thiết lập và phát triển ban đầu. Sự rối loạn trong giai đoạn này không chỉ làm tăng nguy cơ mắc TCKD mà còn có thể dẫn đến tăng nhạy cảm với kháng nguyên thực phẩm và các mầm bệnh đường ruột khác. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc bảo vệ và duy trì sự cân bằng của hệ VSĐR trong những tháng đầu đời.

Phân tích đa dạng beta dựa trên chỉ số UniFrac không trọng số đã mang lại một cái nhìn mới về bản chất của TCKD ở trẻ em. Kết quả cho thấy sự chồng lấp đáng kể giữa cấu trúc cộng đồng VSĐR của trẻ khỏe mạnh và trẻ mắc TCKD, thay vì một sự phân tách rõ ràng. Điều này gợi ý rằng TCKD có thể không liên quan đến một sự

thay đổi đột ngột và toàn diện trong cấu trúc cộng đồng vi sinh, mà là một quá trình dần dần với sự duy trì một số đặc điểm của hệ vi sinh bình thường. Phát hiện này có ý nghĩa quan trọng trong việc phát triển các chiến lược điều trị nhằm khôi phục cân bằng hệ VSĐR.

Ở cấp độ ngành, nghiên cứu ghi nhận sự gia tăng mật độ của ngành Proteobacteria và Firmicutes, đồng thời giảm mật độ của Actinobacteria và Bacteroidetes ở nhóm trẻ TCKD. Sự gia tăng bất thường của Proteobacteria được coi là dấu hiệu của sự mất cân bằng trong cộng đồng VKĐR. Những thay đổi này có thể là kết quả của nhiều yếu tố, bao gồm chế độ ăn của mẹ trong thời kỳ mang thai, chuyển giao hệ VKĐR từ mẹ sang con, phương thức sinh và sử dụng kháng sinh, cũng như chế độ dinh dưỡng của trẻ.

Ở cấp độ họ, nghiên cứu ghi nhận sự suy giảm mật độ các họ vi khuẩn có lợi như Bifidobacteriaceae và Bacteroidaceae, trong khi các họ vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh như Enterobacteriaceae, Streptococcaceae và Clostridiaceae lại gia tăng mật độ ở nhóm trẻ TCKD. Sự mất cân bằng này có thể giải thích cơ chế bệnh sinh của TCKD thông qua hai cơ chế chính: giảm sản xuất axit béo chuỗi ngắn (SCFA) và tăng sản xuất các chất trung gian gây viêm.

Ở cấp độ chi, nghiên cứu đã ghi nhận sự suy giảm đáng kể mật độ chi *Bifidobacterium*, một chi vi khuẩn có lợi chủ đạo ở trẻ nhũ nhi. Đồng thời, có sự gia tăng các chi vi khuẩn có tiềm năng gây hại như *Escherichia*, *Klebsiella*, *Clostridium* ở nhóm trẻ TCKD. Sự mất cân bằng này có ý nghĩa quan trọng trong việc hiểu rõ cơ chế bệnh sinh của TCKD và có thể giải thích xu hướng trẻ mắc TCKD ngày càng sớm.

Ở cấp độ loài, nghiên cứu phát hiện sự chiếm ưu thế của các loài có tiềm năng gây bệnh với sự gia tăng đáng kể mật độ của một số loài như *Klebsiella variicola*, *Escherichia fergusonii* và *Clostridium perfringens* ở nhóm trẻ TCKD. Đồng thời, có sự suy giảm các loài có lợi thuộc chi Bacteroides và Bifidobacterium. Những thay đổi này có thể dẫn đến sự phá vỡ các chức năng sinh lý quan trọng của hệ VSĐR, góp phần vào cơ chế bệnh sinh TCKD. Một phát hiện đáng



chú ý khác là mối liên hệ giữa *Escherichia coli* enteroaggregative (EAEC), sử dụng kháng sinh và TCKD.

#### **4.3. Hiệu quả điều trị tiêu chảy kéo dài có bổ sung probiotics**

Về mặt lâm sàng, probiotics, đặc biệt là chế phẩm đa chủng Dia30, đã chứng minh hiệu quả vượt trội trong việc cải thiện các triệu chứng của TCKD. Cụ thể, vào ngày thứ 5 của can thiệp, nhóm sử dụng Dia30 ghi nhận tỷ lệ trẻ đi ngoài dưới 3 lần/ngày cao nhất (75,5%), so với nhóm Clausy (54,9%) và nhóm Chứng (29,6%). Phân tích thống kê cho thấy Dia30 làm tăng khả năng giảm tần suất đi ngoài lên 7,31 lần so với nhóm Chứng. Không chỉ vậy, Dia30 còn thể hiện hiệu quả vượt trội trong việc cải thiện độ đặc và tính chất của phân, với 81,1% trẻ đạt phân typ 2-3 theo thang Diapered, cao hơn đáng kể so với các nhóm khác. Đáng chú ý, probiotics không chỉ cải thiện các triệu chứng lâm sàng mà còn làm giảm các chỉ số viêm trong phân. Cả Clausy và Dia30 đều làm giảm đáng kể sự hiện diện của hồng cầu và bạch cầu trong phân, với Dia30 cho hiệu quả rõ rệt hơn. Điều này gợi ý về khả năng của probiotics trong việc cải thiện tính toàn vẹn của lớp chất nhầy đường ruột và giảm tình trạng viêm.

Về tỷ lệ khỏi bệnh và thời gian hồi phục, Dia30 tiếp tục thể hiện ưu thế vượt trội. Vào ngày thứ 5 sau can thiệp, nhóm Dia30 đạt tỷ lệ khỏi bệnh cao nhất (77,4%), vượt trội so với Clausy (60,8%) và nhóm Chứng (31,5%). Probiotics cũng rút ngắn đáng kể thời gian điều trị, với Dia30 giúp trẻ phục hồi nhanh hơn 3 ngày so với nhóm Chứng. Đặc biệt, 100% trẻ sử dụng probiotics đều hồi phục trong vòng 10 ngày, trong khi nhóm đối chứng cần thêm 5 ngày điều trị. Bên cạnh hiệu quả lâm sàng, nghiên cứu còn cung cấp những hiểu biết sâu sắc về cơ chế tác động của probiotics thông qua phân tích hệ VSĐR. Kết quả cho thấy probiotics, đặc biệt là chế phẩm đa chủng Dia30, có khả năng điều chỉnh đáng kể cấu trúc và thành phần của hệ VSĐR ở trẻ mắc TCKD.

Đánh giá về đa dạng alpha của hệ VSĐR cho thấy nhóm sử dụng Dia30 là nhóm duy nhất thể hiện sự gia tăng các chỉ số đa dạng alpha so với trước can thiệp và so với hai nhóm còn lại. Điều này gợi ý rằng

probiotics đa chủng có khả năng đặc biệt trong việc bảo vệ và thậm chí phục hồi hệ VSĐR trước tác động của kháng sinh. Ngược lại, nhóm Chúng và nhóm Clausy đều ghi nhận sự suy giảm các chỉ số đa dạng alpha, phản ánh tác động tiêu cực của kháng sinh lên hệ VSĐR.

Về thành phần hệ VSĐR, nghiên cứu ghi nhận sự thay đổi đáng kể tỷ lệ phong phú tương đối của các ngành vi khuẩn sau can thiệp. Đặc biệt, cả hai nhóm can thiệp (Clausy và Dia30) đều thể hiện xu hướng giảm mạnh tỷ lệ Proteobacteria - một ngành chứa nhiều vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Ở cấp độ họ, tỷ lệ phong phú của Enterobacteriaceae giảm mạnh ở các nhóm can thiệp, với mức giảm rõ rệt nhất ở nhóm Dia30. Khi phân tích ở cấp độ chi, nghiên cứu quan sát thấy sự suy giảm đặc biệt rõ rệt ở chi *Escherichia* - một tác nhân phổ biến gây tiêu chảy. Tỷ lệ phong phú tương đối của *Escherichia* giảm 5-7 lần ở các nhóm nhận probiotics, với hiệu quả nổi bật nhất ở nhóm Dia30 đa chủng. Tương tự, chi *Clostridium*, một nhóm vi khuẩn bao gồm nhiều loài gây bệnh đường ruột, cũng ghi nhận sự suy giảm đáng kể sau khi can thiệp bằng probiotics.

Bên cạnh việc kiểm soát vi khuẩn gây bệnh, nghiên cứu cũng ghi nhận sự xuất hiện và gia tăng của các chi vi khuẩn có lợi. Đáng chú ý là sự xuất hiện của chi *Bacillus* và *Lacticaseibacillus* thuộc ngành Firmicutes, vốn không phải là thành viên bản địa của hệ VSĐR. Sự hiện diện của *Bacillus* chỉ được quan sát ở nhóm can thiệp với probiotics đa chủng Dia30, tăng từ 0,21% lên 4,66%. Ngoài ra, có sự gia tăng đáng kể các thành viên thuộc họ Atopobiaceae (ngành Actinobacteria), đặc biệt ở nhóm can thiệp probiotics.

Những thay đổi trong cấu trúc hệ VSĐR này có mối liên hệ chặt chẽ với biểu hiện của các cytokine và Immunoglobulin A (IgA). Nghiên cứu cho thấy nhóm điều trị bằng probiotics đa chủng Dia30 có sự cải thiện đáng kể về cân bằng cytokine. Cụ thể, có sự giảm rõ rệt các cytokine gây viêm như IL-6, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$ , đồng thời tăng yếu tố chống viêm IL-10 so với trước điều trị. Đáng chú ý, nhóm đơn chủng Clausy chỉ ghi nhận giảm IL-23 và IL-17, trong khi nhóm Chúng không có sự thay đổi đáng kể nào. Kết quả nghiên cứu

cũng chỉ ra khả năng can thiệp của probiotics vào trục cytokine IL-23/IL-17, vốn liên quan chặt chẽ đến viêm niêm mạc ruột mạn tính và tổn thương hàng rào ruột. Nghiên cứu ghi nhận sự cải thiện về mức độ bài tiết mucin-2 (Muc2) và IgA qua đường ruột, phản ánh chức năng tốt hơn của hàng rào chất nhầy niêm mạc và hàng rào miễn dịch. Đặc biệt, ở nhóm trẻ điều trị bằng Dia30, thời gian bài tiết chất nhầy ngắn hơn và mức giảm bài tiết IgA qua phân mạnh hơn so với các nhóm khác.

Tổng hợp các phân tích trên đã làm sáng tỏ mối liên hệ phức tạp giữa VSĐR, đáp ứng miễn dịch và tình trạng viêm trong TCKD. Nghiên cứu không chỉ củng cố những hiểu biết hiện có mà còn mở rộng kiến thức về cơ chế tác động của probiotics trong điều trị TCKD. Đặc biệt, việc can thiệp bằng probiotics, nhất là dạng đa chủng, đã cho thấy khả năng điều hòa hiệu quả các yếu tố này thông qua tác động lên trục IL-23/IL-17.

Mặc dù nghiên cứu đã cung cấp những hiểu biết quý giá, nhưng vẫn còn một số hạn chế cần được xem xét trong đó thiếu dữ liệu theo dõi dọc hạn chế khả năng đánh giá sự thay đổi của hệ VSĐR theo thời gian và mối quan hệ nhân quả với TCKD.

## **KẾT LUẬN**

### **1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng trẻ tiêu chảy kéo dài**

Đặc điểm chung: Trẻ mắc TCKD chủ yếu ở độ tuổi 3-6 tháng (57,6%), tỷ lệ nam cao hơn nữ. Đa số trẻ sinh mổ (72,1%) và có hơn một nửa bà mẹ mắc bệnh trong thời kỳ mang thai trẻ, chủ yếu là COVID-19.

Biểu hiện lâm sàng chính bao gồm: Biếng ăn phổ biến nhất (67,7%), ít gặp mất nước (3,2%). Tần suất đi ngoài 6-7 lần/ngày (43,0%). Phân chủ yếu typ 4 và 5A theo Diapered, với 52,5% có nhiều nhầy và 25,3% có máu.

Cận lâm sàng: 32,3% trẻ bị thiếu máu, chủ yếu ở mức độ nhẹ. Soi phân (100% trẻ có bạch cầu dương tính trong phân, 44,3% có hồng cầu dương tính). Phát hiện VSV gây bệnh bằng nuôi cấy phân

(5,1%) và real-time PCR (25,3%).

## **2. Sự biến đổi hệ vi sinh đường ruột ở trẻ mắc tiêu chảy kéo dài**

*Suy giảm đa dạng sinh học:* Suy giảm đáng kể đa dạng sinh học và cân bằng trong cấu trúc cộng đồng vi sinh ở trẻ mắc TCKD so với trẻ khỏe mạnh. Quá trình biến đổi diễn ra theo thời gian, không phải là sự thay đổi đột ngột mà là một quá trình dần dần và liên tục.

*Mất cân bằng hệ vi sinh đường ruột thể hiện qua:* Gia tăng mật độ ngành Firmicutes và Proteobacteria cùng với sự suy giảm ngành Actinobacteria và Bacteroidetes ở trẻ TCKD so với trẻ khỏe mạnh. Suy giảm đáng kể chi *Bifidobacterium*, gia tăng chi *Escherichia*, *Clostridium* và *Streptococcus* ở nhóm trẻ TCKD so với nhóm trẻ khỏe mạnh. Suy giảm *B. longum* và *B. breve*, cùng với sự gia tăng của *E. fergusonii*, *K. variicola* và *C. perfringens* ở trẻ TCKD

## **3. Hiệu quả điều trị tiêu chảy kéo dài bằng liệu pháp probiotics**

Chỉ số nghiên cứu chính cho thấy tỷ lệ khỏi bệnh vào ngày 5 của nhóm Dia30 (77,4%) cao hơn đáng kể so với nhóm Clausy (60,8%) và nhóm chứng (31,5%).

Tác động lên hệ VSĐR: Giảm mật độ vi khuẩn gây bệnh thuộc chi *Escherichia* và *Clostridium* giảm mạnh ở các nhóm sử dụng probiotics, đặc biệt là nhóm Dia30. Tăng vi khuẩn có lợi *Lacticaseibacillus* tăng đáng kể ở cả nhóm Dia30 và Clausy.

Tác động lên đáp ứng miễn dịch: Giảm chỉ số viêm theo con đường IL-23/IL-17. Tăng cytokine chống viêm IL-10. Giảm bài tiết IgA theo chất nhầy qua phân, đặc biệt rõ rệt ở nhóm Dia30.

### **KIẾN NGHỊ**

1. Tối ưu hóa quy trình chẩn đoán và điều trị TCKD ở trẻ em bằng cách kết hợp kỹ thuật real-time PCR với nuôi cấy truyền thống, đồng thời tích hợp liệu pháp probiotics đa chủng liều cao vào phác đồ điều trị sớm;
2. Thúc đẩy nghiên cứu chuyên sâu về mối tương tác giữa hệ vi sinh đường ruột và TCKD thông qua các nghiên cứu dọc dài hạn và thiết lập mạng lưới nghiên cứu đa trung tâm.