

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả**Tạ Thị Ngọc Anh**

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng, lời cảm ơn sâu sắc nhất đến **TS. Hoàng Văn Vinh** và **PGS. TS Phí Quyết Tiến** – những người thầy đã tận tâm hướng dẫn, chỉ dạy tôi tận tâm, động viên và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập cũng như quá trình tôi làm việc tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học quốc gia Hà Nội.

Tôi xin cảm ơn ban lãnh đạo Viện và các đồng nghiệp phòng Sinh học Phân tử Ứng dụng, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN đã tạo điều kiện giúp đỡ, truyền kinh nghiệm, đưa ra lời khuyên chân thành và góp ý bổ ích trong suốt thời gian tôi hoạt động nghiên cứu tại phòng.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo Học viện, các thầy, cô giáo thuộc Khoa Công nghệ sinh học và Phòng Đào tạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập tại Học viện.

Luận văn này được hoàn thành tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, ĐHQGHN phối hợp nghiên cứu cùng Trung tâm nghiên cứu y dược học Quân sự, Học viện Quân Y. Luận văn được hỗ trợ kinh phí thực hiện và nằm trong khuôn khổ đề tài khoa học và công nghệ cấp quốc gia "***Nghiên cứu đánh giá vai trò cải thiện tích cực hệ vi sinh vật đường ruột và tăng cường miễn dịch của chế phẩm probiotic***", mã số ĐTĐL.CN-61/19.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể gia đình, người thân và bạn bè đã quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	3
1.1. CHẾ PHẨM PROBIOTIC	3
1.1.1. Định nghĩa và lịch sử nghiên cứu của probiotic	3
1.1.2. Tiêu chuẩn chủng vi sinh vật sử dụng để phát triển probiotic.....	3
1.1.3. Chế phẩm BaciMix	6
1.1.4. Tình hình nghiên cứu chế phẩm probiotic chứa chi <i>Bacillus</i>	7
1.2. ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN CỦA CHẾ PHẨM PROBIOTIC TRÊN MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT	8
1.2.1. Mô hình động vật thí nghiệm.....	8
1.2.2. Thử nghiệm độc tính cấp	10
1.2.3. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn	11
1.3. VAI TRÒ KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH CỦA CHẾ PHẨM PROBIOTIC	12
1.3.1. Vai trò của probiotic với hệ miễn dịch	12
1.3.2. Chỉ số kháng thể miễn dịch Ig A	14
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU	17
2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu	17
2.1.2. Động vật thí nghiệm	17
2.1.3. Hóa chất và thiết bị nghiên cứu	17
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu	18

2.2.2. Phương pháp xác định độc tính cấp.....	19
2.2.3. Phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn.....	20
2.2.4. Thí nghiệm đánh giá IgA ở mô hình chuột khỏe mạnh và chuột bị tiêu chảy	22
2.2.5. Phương pháp xác định chỉ số Immoglobulin A	24
2.2.6. Xử lý kết quả và phân tích thống kê	26
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ	27
3.1. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH CẤP.....	27
3.1.1. Kết quả theo dõi lâm sàng.....	27
3.1.2. Kết quả theo dõi khối lượng cơ thể chuột.....	28
3.1.3. Quan sát dấu hiệu ngộ độc.....	29
3.1.4. Kết quả mô bệnh học	30
3.2. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN	31
3.2.1. Kết quả theo dõi tình trạng chung.....	31
3.2.2. Kết quả khối lượng cơ thể.....	31
3.2.3. Kết quả huyết học	32
3.2.4. Kết quả sinh hóa	36
3.2.5. Kết quả mô bệnh học	42
3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM BACIMIX TỚI CHỈ SỐ KHÁNG THỂ IgA.....	45
3.3.1. Ảnh hưởng đến chỉ số IgA trên mô hình chuột khỏe mạnh	46
3.3.2. Ảnh hưởng đến chỉ số IgA trên mô hình chuột bị tiêu chảy do kháng sinh	47
3.3.3. Kết quả mô bệnh học đường ruột của chuột.....	48
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	52
PHỤ LỤC	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO	61

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên đầy đủ	Tên tiếng Việt
CFU	Colony-Forming Unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
ĐVTN		Động vật thí nghiệm
EFSA	European Food Safety Authority	Cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu
FAO	Food and Agriculture Organisation	Tổ chức lương thực và nông nghiệp liên hợp quốc
FDA	Food and Drug Administration	Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa kỳ
GRAS	General Recornized as Safe	
PCR	Polemerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
VSV		Vi sinh vật
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thông tin chủng có trong chế phẩm BaciMix.....	6
Bảng 1.2. Ngoại suy liều tương đương giữa các loài.....	9
Bảng 2.1. Động vật thí nghiệm	17
Bảng 2.2. Thời điểm và nội dung xét nghiệm.....	18
Bảng 2.3. Thí nghiệm độc tính cấp	19
Bảng 2.4. Thí nghiệm độc tính bán trường diễn	21
Bảng 2.5. Thí nghiệm đánh giá IgA mô hình chuột khỏe mạnh.....	22
Bảng 2.6. Thí nghiệm đánh giá IgA trên mô hình chuột tiêu chảy.....	23
Bảng 3.1. Theo dõi lâm sàng chuột thử nghiệm độc tính cấp.....	27
Bảng 3.2. Mô bệnh học gan chuột cống trắng	44
Bảng 3.3. Mô bệnh học thận chuột cống trắng	44
Bảng 3.4. Mô bệnh học lách chuột cống trắng.....	45
Bảng 3.5. Mô bệnh học ruột chuột cống trắng.....	49

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ hướng dẫn của FAO/WHO (2001) cho chủng vi sinh vật probiotic dùng cho thực phẩm.....	5
Hình 1.2. Chế phẩm BaciMix	7
Hình 1.3. Minh họa cơ chế tác động của probiotic đến đường ruột	13
Hình 1.4. Cấu trúc và quá trình hình thành IgA tiết	15
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	18
Hình 2.2. Hình ảnh chuồng nuôi phân lô thử nghiệm.....	20
Hình 2.3. Hình ảnh chuột cống trắng khỏe mạnh ở các lô nghiên cứu đánh giá IgA.....	22
Hình 2.4. Hình ảnh lấy máu tại vị trí tim chuột thí nghiệm.....	24
Hình 2.5. Hình ảnh minh họa xử lý mẫu máu.....	24
Hình 2.6. Hình ảnh mổ giải phẫu chuột	24
Hình 2.7. Hình ảnh ruột chuột.....	24
Hình 2.8. Bộ Kit IgA ELISA đặc hiệu trên chuột.....	25
Hình 3.1. Khối lượng cơ thể chuột nhắt trắng biểu hiện.....	28
Hình 3.2. Phần trăm tăng khối lượng chuột nhắt trắng.....	29
Hình 3.3. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận của chuột cống nghiên cứu	30
Hình 3.4. Khối lượng cơ thể chuột trong 28 ngày	31
Hình 3.5. Số lượng hồng cầu ở chuột cống trắng	32
Hình 3.6. Số lượng huyết sắc tố của chuột cống trắng	33
Hình 3.7. Số lượng bạch cầu của chuột cống trắng	34
Hình 3.8. Số lượng tiểu cầu của chuột cống trắng.....	35
Hình 3.9. Hoạt độ AST của chuột cống trắng.....	37
Hình 3.10. Hoạt độ ALT của chuột cống trắng.....	38
Hình 3.11. Nồng độ Bilirubin của chuột cống trắng.....	39
Hình 3.12. Nồng độ cholesterol của chuột cống trắng.....	40
Hình 3.13. Nồng độ creatinin của chuột cống trắng	41
Hình 3.14. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận ở chuột cống nghiên cứu.....	42
Hình 3.15. Hình ảnh mô bệnh học gan, lách, thận chuột cống ở các nhóm nghiên cứu	43
Hình 3.16. Hàm lượng IgA của chuột cống trắng.....	46
Hình 3.17. Hàm lượng IgA của chuột cống trắng bị tiêu chảy	47
Hình 3.18. Hình ảnh mô bệnh học manh tràng chuột cống	48

MỞ ĐẦU

Ngày nay, việc sử dụng các chế phẩm sinh học, bao gồm cả chế phẩm probiotic, để hỗ trợ cho điều trị một số bệnh đường tiêu hoá và một số bệnh lý khác đang ngày càng phổ biến. Chế phẩm probiotic được biết đến là những chế phẩm chứa vi sinh vật sống, khi được sử dụng với lượng thích hợp, mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ.

Chi *Bacillus* là một trong những chi vi sinh vật được nghiên cứu sử dụng trong vai trò probiotic nhiều nhất. Trong đó, hai loài *Bacillus subtilis* và *Bacillus coagulans* đã được đánh giá theo các chỉ tiêu theo khuyến cáo của FAO/ WHO về các chủng vi sinh vật sử dụng trong vai trò probiotic ở nhiều nghiên cứu. Các chủng thuộc 2 loài này được xem là một lựa chọn lý tưởng để phát triển các chế phẩm probiotic do khả năng tạo bào tử và tồn tại trong các môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa cũng như các điều kiện cần sử dụng nhiệt độ cao. Các chế phẩm probiotic chứa đơn chủng và đa chủng vi sinh vật trên đã được nghiên cứu phát triển và ứng dụng trong lĩnh vực chăm sóc và bảo vệ sức khỏe. Để có được tác dụng mong muốn, các chế phẩm probiotic phải đáp ứng một số yêu cầu cần thiết như tính an toàn, mật độ lợi khuẩn, độ sống sót, không bị tạp nhiễm... Tuy nhiên, các nghiên cứu chế phẩm probiotic đa chủng tại Việt Nam về tính an toàn và hiệu quả sử dụng còn khá khiêm tốn. Kế thừa các kết quả nghiên cứu trước đây (tuyển chọn chủng vi khuẩn probiotic *Bacillus subtilis* và *Bacillus coagulans* cũng như lên men thu sinh khối của hai chủng vi khuẩn này tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội), chúng tôi tiến hành thực hiện luận văn **“Nghiên cứu độ an toàn và hiệu quả của chế phẩm probiotic đa chủng BaciMix thông qua chỉ tiêu về độc tính và chỉ số miễn dịch IgA trên động vật thực nghiệm”** nhằm cung cấp các thông tin về tính an toàn và một phần hiệu quả của chế phẩm trên mô hình động vật thí nghiệm hướng tới mục tiêu ứng dụng chế phẩm này trong thực tế.

Mục tiêu của luận văn:

Đánh giá độ an toàn và hiệu quả của chế phẩm probiotic trên mô hình động vật thí nghiệm khi sử dụng chế phẩm probiotic BaciMix gồm hai loài *Bacillus subtilis* BS 304.04 và *Bacillus coagulans* BC 304.06.

Nội dung luận văn bao gồm:

1. Nghiên cứu, đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên mô hình động vật thực nghiệm khi sử dụng chế phẩm probiotic BaciMix (gồm hai loài *B. subtilis* BS 304.04 và *B. coagulans* BC 304.06)

2. Xác định sự biến động chỉ số Immunoglobulin A trong huyết thanh động vật thực nghiệm khi sử dụng chế phẩm probiotic BaciMix trên.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. CHẾ PHẨM PROBIOTIC

1.1.1. Định nghĩa và lịch sử nghiên cứu của probiotic

Probiotic bắt đầu từ tiếng Hy Lạp, theo FAO/WHO (2001) gồm các vi sinh vật sống, khi đưa vào cơ thể với một số lượng thích hợp sẽ có lợi cho sức khỏe vật chủ [1].

Những nghiên cứu về probiotic mới chỉ bắt đầu vào thế kỷ 20. Vào năm 1900, một bác sỹ người Pháp tên Henry Tisser đã quan sát và thấy rằng phân của những đứa trẻ mắc bệnh tiêu chảy có ít vi khuẩn lạ hình trứng hoặc hình chữ Y hơn những đứa trẻ khỏe mạnh. Sau đó năm 1907, Elie Metchnikoff – nhà khoa học người Nga đã đạt giải Nobel khi chứng minh được rằng việc tiêu thụ *Lactobacillus* sẽ hạn chế các nội độc tố của hệ vi sinh vật đường ruột [2].

Năm 1930, nhà khoa học người Nhật tên Minoru Shirota đã phân lập các vi khuẩn lactic từ phân của các em thiếu nhi khỏe mạnh. Cùng năm đó, các nhà khoa học đại học Havard phát hiện ra các vi khuẩn đường ruột đóng một vai trò quyết định trong quá trình tiêu hóa, giúp tiêu hóa thức ăn, cung cấp một số vitamin và các chất dinh dưỡng khác nhau mà cơ thể vật chủ không tự sản xuất ra được. Sau đó 5 năm, một trong các đồ uống lên men – đặt tên là “Yakult” từ sữa được cho là hỗ trợ sức khỏe đường ruột (intestinal health) được sản xuất. Khái niệm chung probiotics phổ biến ở Châu Á trong nhiều năm khi các sản phẩm lên men từ sữa probiotic đầu tiên được giới thiệu ở Châu Âu vào những năm 80 của thế kỉ 20 [2].

1.1.2. Tiêu chuẩn chủng vi sinh vật sử dụng để phát triển probiotic

Có 4 yêu cầu quan trọng cho một chủng vi khuẩn probiotic theo khuyến cáo FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/ World Health Organization) là: (i) an toàn; (ii) chủng vi sinh vật có thể tồn tại và phát triển trong hệ tiêu hóa của vật chủ; (iii) ức chế vi sinh vật có hại cho vật chủ; (iv) chủng vi sinh vật làm tăng hiệu quả trao đổi chất và khả năng miễn dịch của vật chủ [1].

An toàn: Một trong những yêu cầu tiên quyết của vi sinh vật probiotic là phải an toàn cho vật chủ. Theo khuyến cáo của tổ chức y tế thế giới (WHO), vi sinh vật an toàn cho sản xuất probiotic cần có nguồn gốc, tên khoa học rõ ràng

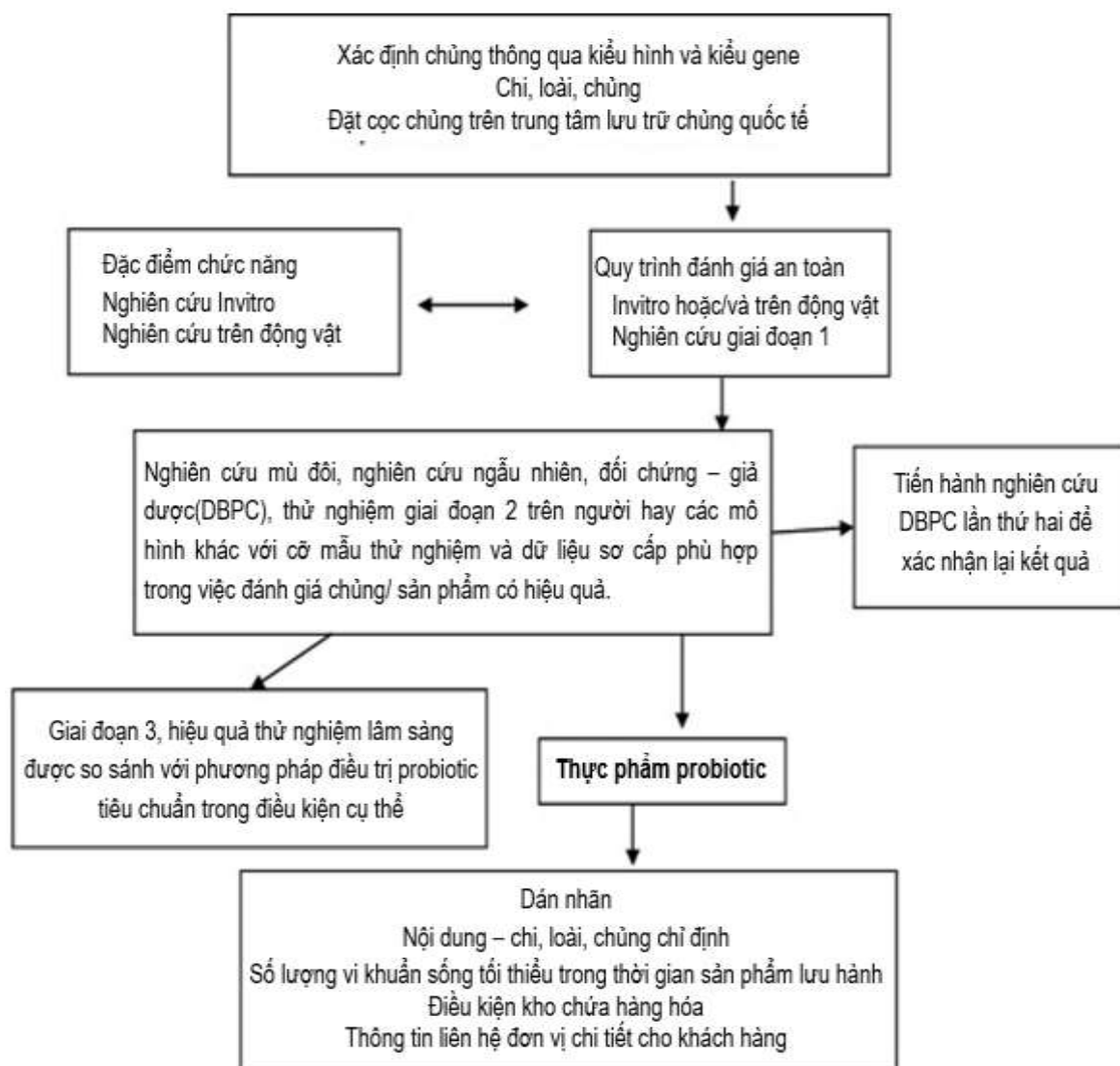
với một số yêu cầu cụ thể như: (i): thuộc nhóm GRAS (General Recognized as Safe); (ii) các chủng vi sinh vật có nguồn gốc phân lập từ ruột người và động vật hoặc từ thực phẩm lên men và được định danh thuộc đối tượng an toàn; và (iii) là nhóm các vi sinh vật được các tổ chức khoa học có năng lực bảo quản trong bộ sưu tập vi sinh vật, có tên khoa học, nguồn gốc và kết quả nghiên cứu đảm bảo an toàn sinh học (Bio Safety level 1). Theo yêu cầu mục (i), tổ chức FDA (Food and Drug Administration) của Mỹ khuyến cáo các chủng vi sinh vật được xếp vào GRAS (General Recognized as Safe) là các chủng vi sinh vật được xem là an toàn và đã được sử dụng từ trước cho đến ngày 1/1/1958;

Sinh trưởng và phát triển tốt trong hệ tiêu hóa của vật chủ (pH thấp, muối mật, enzyme): Các nghiên cứu đã chỉ ra lượng vi sinh vật probiotic đưa vào cơ thể dao động $10^8 - 10^{10}$ CFU/ngày trong khi đó quần xã vi sinh vật ở hệ tiêu hóa của vật chủ dao động từ $10^8 - 10^{11}$ CFU/ml/g tùy thuộc vào vị trí trong hệ tiêu hóa. Như vậy để probiotic có tác dụng thì các chủng lựa chọn phải thích ứng với môi trường sinh thái trong hệ tiêu hóa vật chủ như pH thấp (1 – 4), chịu enzyme tiêu hóa (pepsin, kimotripsin), axit và muối mật (0,1 – 0,3%) [1].

Ức chế vi sinh vật có hại: Các chủng VSV probiotic có khả năng sinh các chất kháng khuẩn bacteriocin (như nisin, acidophilin, plataricin, enterocin, lactococin ...); sinh acid hữu cơ (như lactic, acetic) làm thay đổi pH môi trường ức chế vi sinh vật gây bệnh và trung hòa độc tính, phân giải muối mật, giảm cholesterol. Đây được xem những đặc tính quan trọng có tác dụng trực tiếp ức chế nhóm vi sinh vật có hại như *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*.

Tăng hiệu quả trao đổi chất và khả năng miễn dịch của vật chủ: Khả năng bám dính và tạo khuẩn lạc tại thành ruột được xem là một đặc tính quan trọng có tác dụng kích thích miễn dịch cũng như ức chế vi sinh vật gây hại thông qua cạnh tranh vị trí bám trên nhu mô ruột, loại bỏ vi sinh vật gây hại và độc tố thông qua cơ chế hấp phụ. Vi khuẩn probiotic còn sinh các enzyme tiêu hóa, vitamin (B12, K, B5, B2, B3) có tác dụng tăng hiệu quả sử dụng thức ăn cho vật chủ.

Khuyến cáo của FAO/WHO trong nghiên cứu phát triển sản phẩm probiotic cho thực phẩm được thể hiện trên Hình 1.1 sau.



Hình 1.1. Sơ đồ hướng dẫn của FAO/WHO (2001) cho chủng vi sinh vật probiotic dùng cho thực phẩm

Ở Việt Nam, các yêu cầu về chủng trong sản xuất chế phẩm probiotic cũng đã được xây dựng trong Dược điển V (Phụ lục 1, mục 1.26) với các yêu cầu sau đây:

- Chủng được phân lập từ hệ vi sinh vật thông thường trong cơ thể người hoặc là vi khuẩn - vô hại, không độc;
- Có tác dụng tăng cường phát triển và hoạt động của hệ vi khuẩn đường ruột;
- Đặc tính sinh hóa và đặc tính gen của chủng phải ổn định;

- Chủng gốc cần được kiểm tra xác định sản phẩm chuyên hóa- axit béo; phân tích đặc tính về ADN (nồng độ mol % G+C); độ nhạy với kháng sinh; độ ổn định (chủng sau lần cấy truyền thứ 30 vẫn tương đồng với chủng gốc);

- Thiết lập hệ thống chủng: Cần phải thiết lập hệ thống chủng, chủng cần phải hạn chế số lần cấy truyền chủng, số lần cấy truyền từ chủng gốc không quá 10 lần, số lần cấy truyền chủng làm việc không quá 5 lần [3].

1.1.3. Chế phẩm BaciMix

Chế phẩm BaciMix là sản phẩm của đề tài “Nghiên cứu đánh giá vai trò cải thiện tích cực hệ vi sinh vật đường ruột và tăng cường miễn dịch của chế phẩm probiotic”, cấp quốc gia do Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN, mã số ĐTĐL.CN 61/19. Chế phẩm có số lô sản xuất 0121 DL, ngày sản xuất 10/11/22, hạn sử dụng 10/01/2024 và được gia công sản xuất tại Nhà máy đạt tiêu chuẩn GMP – Công ty CP Công nghệ Sinh phẩm Nam Việt. Chế phẩm đạt tiêu chuẩn cơ sở và được cung cấp bởi Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Chế phẩm được sử dụng để đánh giá tính an toàn và hiệu quả trên mô hình chuột. Chế phẩm BaciMix là chế phẩm đa chủng dạng bột chứa *Bacillus subtilis* BS 304.04 và *Bacillus coagulans* BC 304.06. Hiện nay, hai chủng này đang được lưu trữ và bảo quản tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học quốc gia Hà Nội. Hai chủng là kết quả quá trình phân lập, nuôi cấy và định danh bằng sinh học phân tử dựa trên trình tự 16S rADN và so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen quốc tế (NCBI). Ngoài ra, hai chủng đã được nuôi cấy, thử nghiệm các đặc tính an toàn và đặc tính probiotic *in vitro* trước khi nghiên cứu phối trộn chế phẩm.

Bảng 1.1. Thông tin chủng có trong chế phẩm BaciMix

Thông tin chủng	<i>Bacillus subtilis</i> BS 304.04	<i>Bacillus coagulans</i> BC 304.06
Mật độ trong chế phẩm	3x10 ⁹ CFU/g	3x10 ⁹ CFU/g
Mã lưu trữ tại VTCC	VTCC 60001	VTCC 60002
Mã DNA sequence trên genbank	OK335778	MZ596302



Hình 1.2. Chế phẩm BaciMix

1.1.4. Tình hình nghiên cứu chế phẩm probiotic chứa chi *Bacillus*

Chi *Bacillus* đã trải qua những thay đổi đáng kể về phân loại theo thời gian. Số lượng loài được phân bổ cho chi này đã tăng lên thành 318 loài trong “Danh mục sinh vật nhân sơ có danh pháp” [4]. Trong đó, 51 loài *Bacillus* đã được tách riêng biệt thành 05 cụm phát sinh loài. Theo Ash và cs. (1991) nhóm 1 của *Bacillus* tạo thành cụm lớn nhất gồm 28 loài và *Bacillus subtilis* thuộc nhóm này [5].

Bacillus là một trong những chi vi sinh vật được nghiên cứu sử dụng nhiều nhất trong vai trò probiotic. Trong đó, *B. subtilis* và *B. coagulans* đều là chủng nằm trong danh mục GRAS và được đánh giá là một lựa chọn hàng đầu để phát triển thực phẩm hỗ trợ sức khỏe do khả năng tạo bào tử và tồn tại trong các môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa cũng như các điều kiện cần sử dụng nhiệt độ cao [4].

B. coagulans đã được báo cáo rằng trình tự bộ gen của nó có thể cung cấp thông tin về đặc điểm tổng thể của vi khuẩn, ví dụ về tính an toàn để có thể sử dụng như một thực phẩm bổ sung [6]. Bộ gen của *B. coagulans* GBI-30, 6086 đã được khảo sát và kết quả cho thấy nó không chứa bất kỳ gen nguy hiểm nào [7].

Một số chủng không gây bệnh trong số 100 loài *Bacillus spp.* bao gồm *B. coagulans* và *Bacillus subtilis* đã được công bố là an toàn cho người [7].

Hai chủng *B. subtilis* và *B. coagulans* đã thu hút sự quan tâm và sử dụng phổ biến trong các chế phẩm probiotic bởi những tác dụng có lợi mà chúng mang lại. *B. subtilis* là vi khuẩn probiotic được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất trong chi *Bacillus* nhờ khả năng tăng sinh mạnh cũng như khả năng sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học như axit hữu cơ, màng sinh học, chất kháng khuẩn, các enzyme [8]. Bên cạnh *B. subtilis*, *B. coagulans* là vi khuẩn Gram dương cũng được nghiên cứu rộng rãi do khả năng tạo bào tử, sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn như coagulin và lactosporin, điều hòa miễn dịch và cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột [9], [10]. Việc sử dụng bào tử của các loài trong chi *Bacillus* để sản xuất các chế phẩm probiotic là một giải pháp lớn cho việc nâng cao hiệu quả sản phẩm do bào tử của chúng có thể tồn tại qua các giai đoạn xử lý thành phẩm bằng nhiệt độ cao và các môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hóa. Đặc biệt là trong môi trường áp suất 150 Mpa ở 37°C các bào tử này được kích hoạt nảy mầm [11].

Chế phẩm probiotic đơn chủng hay đa chủng đều được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi. Một số chế phẩm probiotic đơn chủng có lợi trong việc giảm bớt các bệnh liên quan đến dạ dày và đường ruột. Các chế phẩm đơn chủng hay đa chủng đều có lợi cho sức khỏe nhưng các chế phẩm đa chủng có thể hữu ích hơn vì tác dụng tổng hợp và kết hợp giữa các chủng riêng lẻ. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy một số chế phẩm probiotic đa chủng thể hiện tác dụng ức chế các mầm bệnh đường ruột tốt hơn và có tác dụng tốt hơn so với các chế phẩm đơn chủng của chúng [12]. Chế phẩm chứa hai loài probiotic *B. subtilis* và *B. coagulans* đã được nghiên cứu thử nghiệm trên động vật qua một số nghiên cứu như: chế phẩm *B. subtilis* HU58 và *B. coagulans* SC208 có tác dụng giảm chứng loạn khuẩn đường ruột [13]; *B. subtilis* và *B. coagulans* kích thích khả năng tăng trưởng của chuột [14].

1.2. ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN CỦA CHẾ PHẨM PROBIOTIC TRÊN MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT

1.2.1. Mô hình động vật thí nghiệm

Nghiên cứu trên mô hình động vật đã xuất hiện từ ít nhất 500 năm trước công nguyên. Mô hình động vật thí nghiệm (ĐVTN) được sử dụng để phát triển các phương pháp điều trị trong y tế, xác định độc tính của thuốc, kiểm tra độ

an toàn cho các sản phẩm dành cho con người và các mục đích sử dụng y sinh, mục đích thương mại và chăm sóc sức khỏe khác.

Theo trang Human Society International, hằng năm có hơn 115 triệu cá thể động vật được sử dụng với mục đích thí nghiệm. Tuy nhiên con số này vẫn nhỏ hơn con số thực tế vì nhiều quốc gia chưa thể kiểm soát số lượng ĐVTN này [15]. Theo thống kê tại Mỹ năm 2019 số lượng động vật thí nghiệm các loài như sau: chuột bạch 23%, thỏ 18%, chuột thường 12%, linh trưởng 9%, chó 7%, lợn 6%, mèo 2%, cừu 2% và còn lại 21% các loài động vật khác. Từ một liều thử nghiệm mẫu thử trên mô hình ĐVTN bất kỳ, áp dụng quy ước ngoại suy liều giữa các loài có thể ước tính liều dùng trên các loài khác (Bảng 1.2) [16].

Bảng 1.2. Ngoại suy liều tương đương giữa các loài

Loài ngoại suy	Loài thực nghiệm				
	Chuột nhất trắng	Chuột cống trắng	Thỏ	Chó	Người
Chuột nhất trắng	1	0,55	0,25	0,15	0,085
Chuột cống trắng	1,82	1	0,45	0,27	0,15
Thỏ	4	2,20	1	0,60	0,34
Chó	6,67	3,67	1,67	1	0,57
Người	11,76	6,47	2,94	1,76	1

Chuột bạch là loài gặm nhấm đã được thuần hóa từ 3000 năm trước đây bởi người Inca. Chuột bạch được sử dụng thí nghiệm nhiều nhất với các lý do sau đây [15]:

- Khối lượng cơ thể nhỏ, dễ kiểm soát trong quá trình thí nghiệm;
- Tập tính hiền lành, đã được thuần hóa phù hợp với môi trường phòng thí nghiệm;
- Chu kỳ sinh sản ngắn, dễ dàng nhân giống;

- Đường hô hấp nhạy với các chất gây dị ứng nên được chúng được chọn lựa nhiều trong các nghiên cứu độc tính;

- Bộ máy tiêu hóa gần giống người, không thể tự tổng hợp một số chất cần thiết nên phù hợp với nghiên cứu dinh dưỡng;

- Con giống giá thành rẻ.

Chính vì những lý do trên, chuột bạch trở thành mô hình động vật nghiên cứu phổ biến nhất trên toàn thế giới.

Để có thể ứng dụng, các chế phẩm probiotic cần được đánh giá mức độ an toàn thông qua thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên mô hình động vật thí nghiệm. Các kết quả này sẽ cung cấp thông tin chính xác về mức độ độc của chế phẩm, dự đoán triệu chứng và dự kiến biện pháp điều trị ngộ độc, thiết lập mức liều và phạm vi an toàn của chế phẩm. Thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của chế phẩm probiotic không những xác định độ an toàn mà còn đánh giá một chỉ số miễn dịch như IgA, cytokine, INF- α ... trong huyết thanh động vật thí nghiệm. Điều này góp phần khẳng định khả năng kích thích miễn dịch ở vật chủ khi được cho sử dụng các sản phẩm probiotic [14].

1.2.2. Thử nghiệm độc tính cấp

Vào năm 1927, JW Trevan đã cố gắng tìm ra cách để ước tính khả năng gây ngộ độc tương đối của các loại thuốc và dược phẩm được sử dụng vào thời điểm sử dụng. Thử nghiệm độc tính cấp cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của thuốc, dự đoán triệu chứng và dự kiến biện pháp điều trị ngộ độc cấp; thiết lập mức liều cho những thử nghiệm độc tính và tác dụng cũng như phạm vi an toàn của thuốc cho nghiên cứu tiếp theo [17]. Các phép thử độc tính cấp xác định được: liều an toàn, liều dung nạp tối đa, liều gây độc có thể quan sát được, liều LD₅₀ gần đúng, những triệu chứng ngộ độc có thể quan sát trên động vật thí nghiệm và khả năng phục hồi.

Theo Hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) thử nghiệm độc tính cấp của hóa chất được thực hiện trong điều kiện các nhóm động vật được theo dõi sau khi chúng tiếp xúc với một nồng độ (hoặc một loạt

nồng độ) của mẫu thử trong một khoảng thời gian nhất định (thường là 4 giờ). Các con vật thí nghiệm được quan sát lâm sàng tối đa trong 14 ngày [18].

LD 50 đưa ra một giá trị về độc tính cấp tính hoặc tức thời của một chất đối với một nhóm động vật cụ thể đang được thử nghiệm. Việc thay đổi bất kỳ biến bất kỳ trong số này (ví dụ, loại động vật hoặc tuổi) có thể dẫn đến các giá trị LD 50 khác nhau. Thử nghiệm LD 50 không được thiết kế nhằm mục đích cung cấp thông tin về tác động tiếp xúc lâu dài của mẫu thử [19].

Một số vấn đề cần lưu ý trong thử nghiệm độc tính cấp

- Cần quan tâm đến tác dụng phụ không có lợi của sản phẩm trước khi tiến tới thử nghiệm lâm sàng LD₅₀;

- Các mẫu thử thử nghiệm ở các điều kiện thí nghiệm khác nhau không thể so sánh LD₅₀ với nhau [19].

1.2.3. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn

Theo Bộ Y Tế 2015, thử nghiệm độc tính bán trường diễn nhằm xác định khả năng dung nạp của động vật thí nghiệm khi dùng mẫu thử nhiều lần và chỉ được tiến hành sau khi đã có thông tin về độc tính cấp trên động vật và mẫu thử được dự định sử dụng hoặc tiếp xúc dài ngày trên người [17].

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn là thử nghiệm theo dõi sự tăng lên của tác dụng phụ khi động vật thí nghiệm tiếp xúc lâu dài với mẫu thử hoặc tác nhân ngoại vật lý. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn thường được theo dõi qua khả năng gây chết trực tiếp, tốc độ tăng trưởng, khả năng sinh sản, chức năng trao đổi chất, hành vi và khả năng bơi lội [17]. Thời gian thử trên động vật được tính dựa theo thời gian dự kiến dùng trên người hoặc có thể thử với các khoảng thời gian xác định. Ngoài ra, thời gian thử còn phụ thuộc vào đích của thử nghiệm, ví dụ như cung cấp thông tin về giai đoạn trong thử nghiệm lâm sàng. Ví dụ, khi cần thông tin cho thử lâm sàng giai đoạn 1 hoặc 2, thời gian có thể ngắn hơn (14-28 ngày); khi cần cung cấp thông tin cho thử lâm sàng giai đoạn 3, thời gian thử cần dài hơn (28-90 ngày). Hiện nay, tài liệu hướng dẫn khuyến cáo tính thời gian thử độc tính theo 2 cách:

- Thời gian thử mẫu thử bằng 3-4 lần thời gian dự kiến dùng trên người.

- Thời gian thử theo từng khoảng xác định: 14 ngày, 28 hoặc 90 ngày. Khoảng thời gian thử được lựa chọn tùy theo yêu cầu của mẫu và điều kiện thử nghiệm.

1.3. VAI TRÒ KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH CỦA CHẾ PHẨM PROBIOTIC

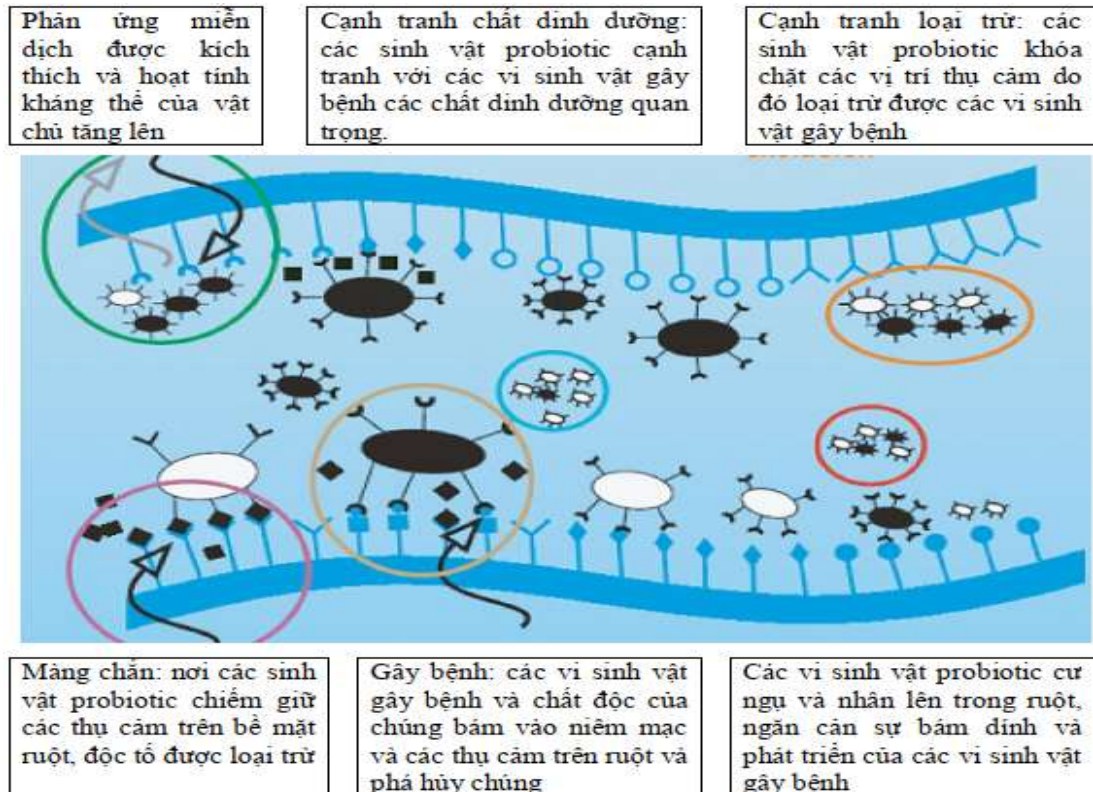
1.3.1. Vai trò của probiotic với hệ miễn dịch

Cơ thể tác động của probiotic với hệ miễn dịch đã được nghiên cứu và giải thích bằng nhiều cách khác nhau, nhưng phần lớn các tài liệu đề cập ba khía cạnh sau: (i) cạnh tranh loại trừ; (ii) đối kháng vi khuẩn và (iii) điều chỉnh miễn dịch [20]

Cạnh tranh loại trừ là đặc tính đấu tranh sinh tồn điển hình của các vi sinh vật probiotic khu trú và nhân lên trong ruột, khóa chặt các vị trí thụ cảm và ngăn cản sự bám dính của các vi sinh vật có hại khác như *E. coli*, *Salmonella*... Một số nấm men probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*; *S.bouardii*) không chỉ tranh vị trí bám dính của các vi khuẩn khác mà còn gắn kết các vi khuẩn có roi (phần lớn là những vi khuẩn có hại) thông qua các cơ quan thụ cảm mannose và đẩy chúng ra khỏi vị trí bám dính ở niêm mạc ruột [21]. Tuy nhiên, cạnh tranh dinh dưỡng vì sự sinh sôi với số lượng lớn của một loài vi sinh vật nào đó là phương thức cạnh tranh khốc liệt nhất và là một mối đe dọa nghiêm trọng đối với các loài khác về nguồn cơ chất cho phát triển [21].

Đường ruột ngoài chức năng chính trong quá trình tiêu hóa và hấp thụ chất dinh dưỡng còn tạo thành một hàng rào hiệu quả để bảo vệ chống lại sự xâm nhập của các vi sinh vật gây bệnh và các phân tử có hại tiềm tàng vào cơ thể. Đường ruột chính là cơ quan miễn dịch lớn nhất ở động vật có vú do hệ vi sinh vật ruột và hệ thống miễn dịch có mối tương tác đặc thù. Khả năng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào của hệ thống miễn dịch đường ruột bị ảnh hưởng rất lớn bởi sự cân bằng của hệ vi sinh vật ruột. Thông qua tương tác với hệ thống miễn dịch đường ruột, các probiotic có thể điều chỉnh cả miễn dịch thụ động và chủ động hoặc cả hai. Tác động điều chỉnh miễn dịch đặc hiệu của probiotic phụ thuộc vào chủng giống hoặc các loài vi khuẩn probiotic cụ thể [22]. Các tế bào miễn dịch ở ruột chiếm tổng số 70-80% các tế bào miễn dịch trong cơ thể người và hệ vi sinh đường ruột đóng một vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa các tế bào miễn dịch đó. Khi có sự mất cân bằng các vi sinh đường

ruột sẽ dẫn đến sự teo niêm mạc và không phát triển các tế bào miễn dịch cũng như giảm tiết các kháng thể, đặc biệt là các immunoglobulin A (IgA).



Hình 1.3. Minh họa cơ chế tác động của probiotic đến đường ruột [22]

Probiotic ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch của vật chủ và có khả năng điều chỉnh các phản ứng viêm. Những tác động này được diễn ra ở ruột thông qua việc tăng cường hàng rào bảo vệ do tăng lượng bạch cầu biểu mô và tế bào hình cốc. Ngoài ra probiotic còn kích thích sản xuất yếu tố tiền viêm $\text{TNF-}\alpha$ và cytokine điều hòa IL-6 cho các phản ứng chống lại mầm bệnh giúp duy trì sự khỏe mạnh của niêm mạc ruột [23].

Siegfried H. và cộng sự 2016 đã chỉ ra nhiều chủng probiotic lợi khuẩn kích thích sản sinh IgA thông qua các tế bào B, giúp duy trì khả năng miễn dịch dịch thể bằng cách liên kết với kháng nguyên. IgA trong huyết thanh được sản xuất trong tủy xương và được điều hòa từ hệ thống IgA niêm mạc với cơ chế độc lập. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu đã thực hiện thí nghiệm và báo cáo là nồng độ IgA huyết thanh tăng khoảng 10% sau khi động vật thí nghiệm tiêu thụ chế phẩm probiotic [24].

Các nghiên cứu cho thấy sự có mặt của vi khuẩn probiotic tạo thành môi trường có pH thấp với các thành phần bacteriocin, các peptid. Các vi khuẩn

probiotic sinh các loại axit béo liên kết thành các mạch ngắn và việc bám dính của chúng vào nhu mô ruột sẽ kích thích hệ thống miễn dịch tập nhiễm (innate immune response). Kết quả là đại thực bào tiết ra kháng thể miễn dịch IgA được kích thích và thông qua tế bào T để sinh ra các loại cytokine khác nhau như Interferon (IFN- γ), IL-10, IL-4 [25].

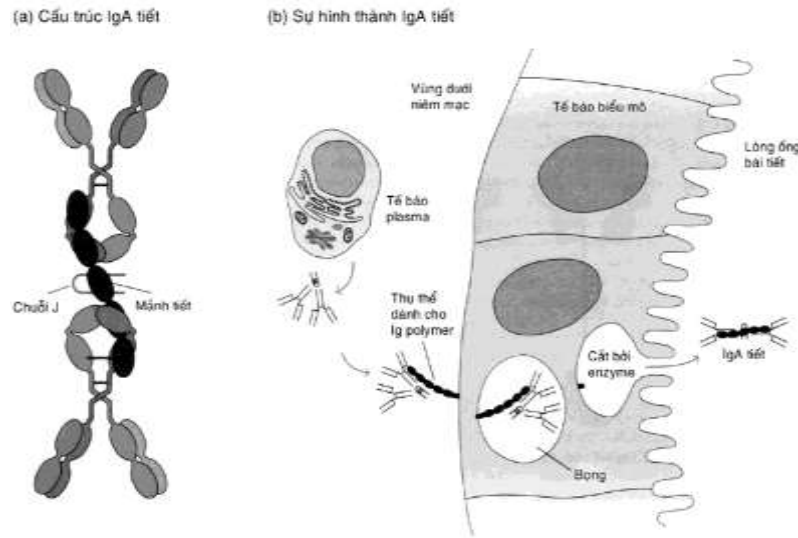
Fumico nghiên cứu trên 10 người khỏe mạnh khi sử dụng sữa lên men chứa chủng *Lactobacillus casei* Shirota với liều dùng 1×10^{10} CFU 3 lần/ngày và kết quả cho thấy hoạt tính tế bào NK (natural killer cell, tế bào tiêu diệt tự nhiên) tăng trong thời gian thí nghiệm và tiếp tục tăng sau 3 tuần liên tiếp [26]. Chen và nhóm nghiên cứu nhận thấy khi sử dụng tế bào vi khuẩn lactic (LAB) bất hoạt bằng nhiệt ở 100°C trong 30 phút hay 121°C trong 15 phút có tác dụng kích thích hệ thống miễn dịch trên chuột [27]. Cụ thể là, interleukin 12 và 10 tăng lên trong khi α -interferon và interleukin 6 lại bị giảm. Khi nghiên cứu bệnh nhân nhiễm khuẩn *H. pylori*, Ganjbakhsh nhận thấy vi khuẩn *L. fermentum* UCO-979C tham gia tăng cường hệ thống miễn dịch. Cụ thể là, việc sinh interleukin 8 liên quan đến *H. pylori* bị ngăn chặn [28]. Khi nghiên cứu hoạt tính miễn dịch của gà đối với độc tố tetanus toxoid (TT) và alpha-toxin, nghiên cứu của Hamid cho thấy kháng thể IgG và IgM trung hòa độc tố tetanus toxoid (TT) và alpha-toxin trong huyết thanh gà sử dụng *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* và *Streptococcus faecalis* tăng so với trường hợp không sử dụng probiotic [29].

1.3.2. Chỉ số kháng thể miễn dịch Ig A

Kháng thể (Antibody, Ab), còn được gọi là immunoglobulin (Ig) là một protein lớn, hình chữ Y được hệ thống miễn dịch sử dụng để xác định và vô hiệu hóa các vật thể lạ như vi khuẩn và virus gây bệnh. Kháng thể nhận ra một kháng nguyên đặc hiệu đặc trưng duy nhất của mầm bệnh [30, 31].

Trong huyết thanh, IgA tồn tại chủ yếu dưới dạng monomer nhưng đôi khi cũng tồn tại dưới dạng polymer như dimer, trimer và tetramer. IgA trong dịch ngoại tiết được gọi là IgA tiết và tồn tại dạng dimer hoặc tetramer. Mỗi ngày, lượng IgA tiết được cơ thể sinh ra là lớn nhất so với các lượng globulin miễn dịch khác (66 mg/kg/ngày) và IgA chiếm 10 – 15% tổng lượng kháng thể [32]. Ngoài ra, IgA còn là lớp kháng thể chính trong dịch ngoại tiết như nước

mắt, nước bọt; dịch nhầy khí phế quản, đường tiết niệu sinh dục, đường tiêu hóa.



Hình 1.4. Cấu trúc và quá trình hình thành IgA tiết [32]

Các IgA dạng polymer đều có thêm chuỗi J gắn vào (Hình 1.4). Ngoài chuỗi J, IgA tiết còn có thêm một chuỗi polypeptide nữa được gọi là mảnh tiết gắn vào. Chuỗi J của IgA giống với chuỗi J của IgM pentamer và cần thiết cho quá trình polymer hoá của IgA huyết thanh lần IgA tiết. Mảnh tiết là một polypeptide 70.000 Da do tế bào biểu mô của màng nhầy tạo ra. Mảnh tiết cần thiết cho sự chuyển vận IgA dimer qua tế bào biểu mô nhầy vào dịch tiết nhầy, đồng thời bảo vệ phân tử IgA không tác dụng của các enzyme thuỷ phân protein trong dịch chuyển vận IgA dimer qua tế bào biểu mô nhầy vào dịch tiết nhầy. Mảnh tiết này cũng có tác dụng bảo vệ phân tử IgA không bị tác dụng của các enzyme thuỷ phân protein có trong dịch tiết phân huỷ [33].

Tế bào plasma tiết IgA tập trung ở bề mặt màng nhầy và có xu hướng di chuyển (tái định cư) vào khu vực dưới niêm mạc. IgA được tạo ra ở đây có thể gắn một cách chặt chẽ với thụ thể dành cho phân tử globulin miễn dịch dạng polymer (poly - Ig receptor) có ở phía màng đáy của các tế bào biểu mô nhầy (ví dụ: biểu mô đường tiêu hoá, hô hấp, tiết niệu sinh dục) hoặc biểu mô tuyến chế tiết (tuyến sữa, tuyến nước bọt, tuyến lệ) (Hình 1.4). Sau khi kháng thể đã bám vào thụ thể thì phức hợp thụ thể - IgA sẽ được nhấn chìm về phía bào tương và nằm trong một bong rồi được chuyển vận qua tế bào tới mặt phía trong lòng ống. Tại đây, bong sẽ liên hợp với màng plasma, sau đó thụ thể được phân cắt bởi enzyme và một phần thụ thể sẽ trở thành mảnh tiết. Mảnh tiết này được

gắn và được giải phóng cùng với phân tử IgA dimer vào dịch tiết. Mảnh tiết che các vị trí dễ bị enzyme thủy phân protein tấn công ở vùng bản lề của IgA nên có tác dụng bảo vệ phân tử IgA tiết trong môi trường giàu enzym thủy phân protein như các dịch tiết. Thụ thể dành cho globulin miễn dịch polymer đã nhận dạng chuỗi J. Vì vậy, ngoài IgA tiết thì IgM pentamer cũng có chuỗi J nên cũng được chuyển vận vào dịch tiết này theo cùng cơ chế này mặc dù IgM có tỷ lệ thấp hơn IgA trong dịch tiết. IgA tiết có một chức năng hết sức quan trọng trong việc tạo miễn dịch tại chỗ ở đường tiêu hoá, đường hô hấp và tiết niệu sinh dục, vì đây là những con đường chính để phần lớn các vi sinh vật gây bệnh xâm nhập vào cơ thể. Do có cấu tạo polymer nên IgA tiết có thể liên kết chéo với các kháng nguyên kích thước lớn và chứa nhiều quyết định kháng nguyên. IgA tiết gắn với các cấu trúc của bề mặt vi khuẩn hoặc virus và ngăn cản các vi sinh vật này không cho chúng gắn vào tế bào này, vì vậy IgA tiết có tác dụng ngăn cản sự nhiễm virus và ức chế quá trình xâm nhập của vi khuẩn. Các phức hợp kháng nguyên - IgA tiết dễ dàng bị giữ lại [34].

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu và sản xuất chế phẩm probiotic đang trên đà phát triển, đáp ứng được nhu cầu của người tiêu dùng. Trong nước có một số đơn vị sản xuất probiotic (chủ yếu từ *Bacillus*) là công ty BIOSPRING, AnaBio, viện Pasteur Đà Lạt, Nha Trang... là một trong những đơn vị sản xuất probiotic tiên phong. Tuy nhiên, số liệu nghiên cứu chế phẩm đa chủng BaciMix chứa *B. subtilis* và *B. coagulans* vẫn là một nghiên cứu mang tính mới tại Việt Nam. Việc nghiên cứu, thử nghiệm độ an toàn và đánh giá hiệu quả sử dụng qua chỉ số miễn dịch nhằm tiến đến ứng dụng chế phẩm probiotic chứa hai chủng *B. subtilis* và *B. coagulans* rất cần thiết với thực trạng nước ta hiện nay. Với các lý do trên tôi tiến hành thực hiện luận văn **“Nghiên cứu độ an toàn và hiệu quả của chế phẩm probiotic đa chủng BaciMix thông qua chỉ tiêu về độc tính và chỉ số miễn dịch IgA trên động vật thực nghiệm”**.

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu

- Chế phẩm BaciMix
- Chế phẩm đối chứng dương

Sản phẩm chứa 2×10^9 *Bifidobacterium lactics*, 1×10^9 *Bifidobacterium longum*, 1×10^9 *Bifidobacterium bifidum*, 1×10^9 *Lactobacillus rhamnosus*, 1×10^9 *Lactobacillus acidophilus*. Ngày sản xuất sản phẩm 05/2020, hạn sử dụng 03 năm từ ngày sản xuất.

2.1.2. Động vật thí nghiệm

Bảng 2.1. Động vật thí nghiệm

	Độc tính cấp	Độc tính bán trường diễn	Xác định chỉ số IgA
ĐVTN	Chuột nhắt trắng Swiss	Chuột cống trắng	Chuột cống trắng
Trọng lượng ban đầu	20 ±2 (gam)	200±20 (gam)	200±20 (gam)
Tỉ lệ đực cái	1:1		
Thể trạng cơ thể	Khỏe mạnh		
Nơi cung cấp	Trung tâm nghiên cứu động vật thí nghiệm – Học viện Quân Y		
Nơi thực hiện thí nghiệm	Bộ môn Dược Lý – Học viện Quân Y		

2.1.3. Hóa chất và thiết bị nghiên cứu

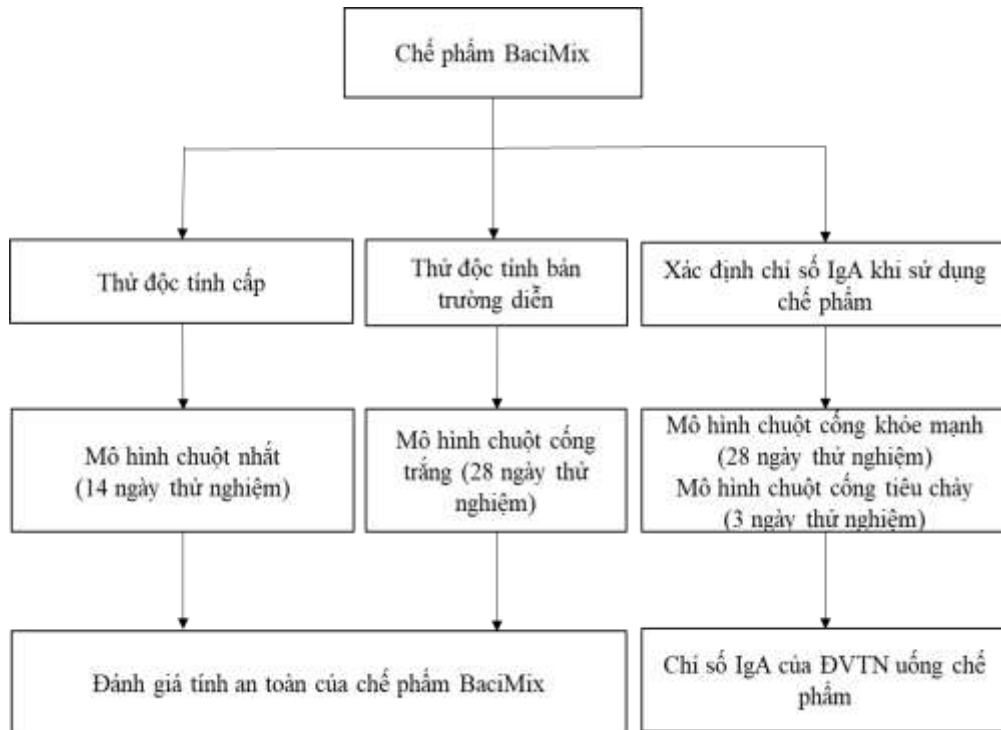
- **Hóa chất:** Bộ Kit IgA Rat Uncoated ELISA Kit with Plates (Invitrogen, Mỹ), Formaldehyde (Sigma, Mỹ).

- **Thiết bị:** Máy xét nghiệm sinh hoá tự động (AU480 - Beckman Coulter, Nhật Bản), máy xét nghiệm huyết học tự động (Erba Elite – 3, Đức), máy đồng hoá mô Wiggins D-5000 (Wiggins, Đức), máy đọc Elisa Chromate 4300 (Awareness, Mỹ), dụng cụ mổ giải phẫu chuột (Everbest, Pakistan), cân chính xác 10-2 mg (DJ6000TW, Nhật Bản), bơm kim tiêm (iBalance 211, Mỹ), máy ly tâm (Hettich- Đức), chuồng và dụng cụ nuôi chuột to và nhỏ.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu

* Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

* Thời điểm và nội dung xét nghiệm

Bảng 2.2. Thời điểm và nội dung xét nghiệm

Mô hình chuột	Trước thí nghiệm (4-5 ngày)	Ngày cân trọng lượng và lấy máu	Ngày mổ giải phẫu
Độc tính cấp	Làm quen môi trường thí nghiệm	Ngày 0; 7; 13: Cân trọng lượng	Ngày 14
Độc tính bán trường diễn	Làm quen môi trường thí nghiệm	Ngày 0; 7; 14; 28: Cân trọng lượng và lấy máu xét nghiệm	Ngày 28
Xác định IgA trên chuột khỏe mạnh	Làm quen môi trường thí nghiệm	Ngày 0; 7; 14; 28: Cân trọng lượng và lấy máu xét nghiệm	Ngày 28
Xác định IgA trên chuột tiêu chảy	Gây bệnh tiêu chảy	Ngày 0, 3: cân trọng lượng	Ngày 3

2.2.2. Phương pháp xác định độc tính cấp

Nghiên cứu được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ Chức Y Tế Thế Giới (WHO), Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) [18] và Bộ Y tế Việt Nam về nghiên cứu độc tính cấp của chế phẩm [17], chúng tôi tiến hành thí nghiệm như sau:

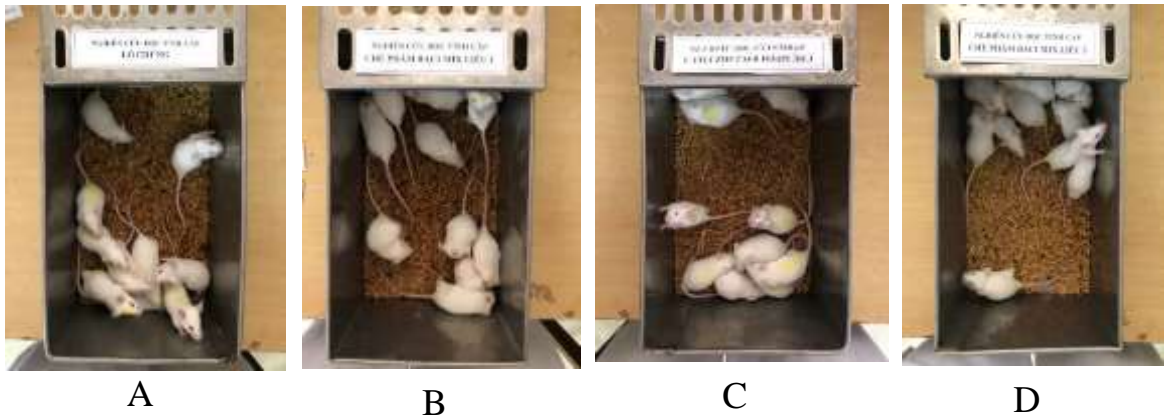
Chuột nhắt trắng đồng đều khối lượng cơ thể được chia ngẫu nhiên thành các lô. Chuột bị bỏ đói 12 giờ trước khi cho uống chế phẩm và được cho uống bằng kim cong chuyên biệt. Sau khi cho uống chế phẩm nghiên cứu, chuột được nuôi dưỡng và theo dõi, ăn thức ăn tổng hợp do trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm cung cấp, nước uống tự do. Thời gian theo dõi liên tục trong 72 giờ và 14 ngày sau đó. Tỷ lệ chuột chết được dùng để tính toán LD₅₀.

2.2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Chuột nhắt trắng đủ điều kiện thí nghiệm được phân lô thí nghiệm như bảng sau:

Bảng 2.3. Thí nghiệm độc tính cấp

Lô NC (n=10)	Vml/10g /24h	Lần 1 (ml/10g)	Lần 2 (ml/10g)	Lần 3 (ml/10g)	Lần 4 (ml/10g)	CFU/kg
Chứng	0,1	0,1	0	0	0	0
Lô 1	0,25	0,25	0	0	0	100x10 ⁹
Lô 2	0,50	0,25	0,25	0	0	200x10 ⁹
Lô 3	1,00	0,25	0,25	0,25	0,25	400x10 ⁹



Hình 2.2. Hình ảnh chuồng nuôi phân lô thử nghiệm

A. Lô đối chứng; B. Lô uống BaciMix liều 1;

C. Lô uống BaciMix liều 2; D. Lô uống BaciMix liều 3

2.2.1.2. Các chỉ tiêu theo dõi lâm sàng

+ Số chuột chết;

+ Khối lượng cơ thể chuột (g): Khối lượng cơ thể chuột được theo dõi từ thời điểm trước thí nghiệm gọi là xuất phát điểm (XFĐ). Sau đó chuột được cân và theo dõi vào các ngày 3 (N3), ngày 6 (N6), ngày 9 (N9), ngày 13 (N13);

+ Tỷ lệ chuột có bất thường về vận động tự động (đi lại bình thường, co cụm một góc ở lồng nuôi chuột, rối loạn vận động);

+ Tỷ lệ chuột có biểu hiện bất thường về hành vi;

+ Tỷ lệ chuột có biểu hiện bất thường về bài tiết.

2.2.1.3. Theo dõi giải phẫu bệnh

Kết thúc nghiên cứu, tiến hành mổ, quan sát đại thể và vi thể các tạng gan, lách và thận dưới kính lúp phóng đại 25 lần.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Nghiên cứu được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ Chức Y Tế Thế Giới (WHO), Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) [18] và Bộ Y tế Việt Nam về nghiên cứu độc tính bán trường diễn của chế phẩm [17], chúng tôi tiến hành thí nghiệm như sau:

2.2.3.1. Bố trí thí nghiệm

Bảng 2.4. Thí nghiệm độc tính bán trường diễn

Lô (n=10)	Mẫu thử	Liều uống	Thời gian uống
Lô 1 (lô chứng)	Nước cất	5 ml/1kg/24h	28 ngày liên tục 1 lần/ngày
Lô 2 (lô trị 1)	Chế phẩm BaciMix	$1,68 \times 10^9$ CFU/kg (5 ml/kg/24h)	
Lô 3 (lô trị 2)	Chế phẩm BaciMix	$8,4 \times 10^9$ CFU/kg (5 ml/kg/24h)	

2.2.3.2. Theo dõi tình trạng chung

Trong thời gian thí nghiệm chuột được theo dõi các tình trạng chung như: trạng thái lông, khả năng di chuyển, khả năng thu nhận thức ăn, các hiện tượng đi ngoài (nếu có), phản xạ ánh sáng, âm thanh.

2.2.3.3. Theo dõi sự thay đổi trọng lượng của động vật thí nghiệm

Trong thời gian thí nghiệm chuột được theo dõi sự thay đổi về trọng lượng 10 ngày/lần (thời điểm trước khi uống chế phẩm gọi là xuất phát điểm) để theo dõi quá trình tăng trọng lượng và qua đó đánh giá được tính độc (nếu có) khi cho uống trong thời gian dài liên tục.

2.2.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của mẫu nghiên cứu đến một số chỉ tiêu huyết học, sinh hóa máu cơ bản

Mẫu máu được lấy vào các thời điểm xét nghiệm và đưa vào máy xét nghiệm sinh hoá tự động (AU480 - Beckman Coulter, Nhật Bản) thu kết quả (aspartate aminotransferase (AST/SGOT), alanine aminotransferase (ALT/SGPT) và creatinin) và máy xét nghiệm huyết học tự động (Erba Elite – 3, Đức) thu kết quả một số chỉ tiêu huyết học (hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin). Từ các kết quả trên, tình trạng cơ thể, các chức năng gan và thận của động vật thí nghiệm được nghiên cứu đánh giá.

2.2.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của mẫu nghiên cứu đến cơ quan nội tạng

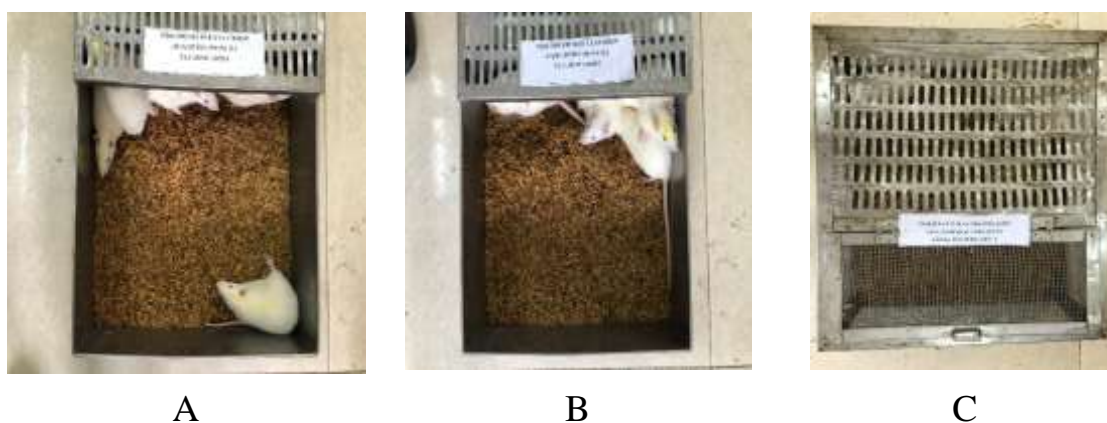
Sau quá trình thí nghiệm, gan, lách và thận của chuột được mổ giải phẫu để kiểm tra trực quan nội tạng và so sánh với lô đối chứng. Trong trường hợp có biểu hiện bất thường như viêm, sưng, hoại tử v.v. mẫu sẽ được cố định trong formol 10% để làm tiêu bản giải phẫu bệnh học.

2.2.4. Thí nghiệm đánh giá IgA ở mô hình chuột khỏe mạnh và chuột bị tiêu chảy

2.2.4.1. Mô hình chuột khỏe mạnh

Bảng 2.5. Thí nghiệm đánh giá IgA mô hình chuột khỏe mạnh

Lô (n=8)	Mẫu thử	Liều uống	Thời gian uống
Lô 1 (lô chứng)	Nước cất	5 ml/kg/24h	28 ngày liên tục 1 lần/ngày
Lô 2 (lô trị)	Chế phẩm BaciMix	68×10^9 CFU/kg (5 ml/kg/24h)	
Lô 3 (lô chứng dương)	Chế phẩm đối chứng dương	3×10^9 CFU/kg (5 ml/kg/24h)	



Hình 2.3. Hình ảnh chuột cống trắng khỏe mạnh ở các lô nghiên cứu đánh giá IgA (A: Lô chứng, B: Lô uống chế phẩm BaciMix, C: Lô uống chế phẩm đối chứng dương)

Các chỉ tiêu đánh giá

Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu như sau:

+ Tình trạng chung, thể trạng của chuột: cân nặng, ăn uống, vận động, các rối loạn....;

+ Đánh giá kháng thể miễn dịch IgA huyết thanh và IgA niêm mạc ruột;

+ Mô bệnh học: đại thể, vi thể.

2.2.4.2. Mô hình chuột tiêu chảy

Chuột cống trắng được gây tiêu chảy bằng kháng sinh Lincomycin với liều 5g/kg x 2 lần. Toàn bộ chuột ở các lô thí nghiệm sau khi đã bị tiêu chảy được bố trí thí nghiệm như sau:

Bảng 2.6. Thí nghiệm đánh giá IgA trên mô hình chuột tiêu chảy

Lô (n=8)	Mẫu thử	Liều uống	Thời gian uống
Lô 1 (lô chứng)	nước cất	5 ml/1kg/24h	3 ngày liên tục 1 lần/ngày
Lô 2 (lô chứng kháng sinh)	uống kháng sinh	5 ml/kg/24h	
Lô 3 (lô trị)	chế phẩm BaciMix	$1,68 \times 10^9$ CFU/kg (05 ml/kg/24h)	
Lô 4 (lô chứng dương)	chế phẩm đối chứng dương	3×10^9 CFU/kg (5 ml/kg/24h)	

Các chỉ tiêu đánh giá

Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu như sau:

+ Tình trạng chung, thể trạng của chuột: cân nặng, ăn uống, vận động, các rối loạn....;

+ Thu mẫu máu: Xác định chỉ số kháng thể miễn dịch IgA huyết thanh và IgA niêm mạc ruột;

+ Mô bệnh học: Kết thúc thí nghiệm ruột của 5 con chuột ở mỗi nhóm được tiến hành giải phẫu vi thể

2.2.5. Phương pháp xác định chỉ số Immoglobulin A

2.2.5.1. Phương pháp xử lý mẫu

- **Mẫu máu**

Mẫu máu tim chuột sau khi lấy vào ống giữ máu xét nghiệm được đậy nắp kín và ly tâm với tốc độ 5000 rpm trong 10 phút để tách huyết thanh.



Hình 2.4. Hình ảnh lấy máu tại vị trí tim chuột thí nghiệm



Hình 2.5. Hình ảnh minh họa xử lý mẫu máu

- **Mẫu manh tràng**



Hình 2.6. Hình ảnh mổ giải phẫu chuột



Hình 2.7. Hình ảnh ruột chuột

Thu mẫu: Chuột được mổ giải phẫu và manh tràng sau khi lấy được bảo quản ở -80°C đến khi thực hiện thí nghiệm.

Xử lý mẫu:

- Cân 0,1g mô niêm mạc ruột vào ống eppendorf;
- Bổ sung 1ml Tissue Extraction Reagent I vào ống epp đã chứa mô;
- Đồng nhất mẫu mô bằng máy đồng hoá mô;
- Li tâm mẫu mô đã được đồng nhất 10000 rpm trong 5 phút;

- Thu phần dịch nổi phía trên.
- Bảo quản ở -80°C .

2.2.5.1. Phương pháp xác định chỉ số IgA

Phương pháp xác định chỉ số kháng thể miễn dịch IgA được thực hiện với bộ Kit IgA ELISA đặc hiệu trên chuột



Hình 2.8. Bộ Kit IgA ELISA đặc hiệu trên chuột

Các bước thực hiện:

Chuẩn bị đĩa ELISA gắn kháng thể bắt giữ (capture antibody)

- Bỏ sung 100 μl / giếng kháng thể bắt giữ trong Coating Buffer vào đĩa;
- Đậy kín và ủ qua đêm ở 4°C ;
- Rửa hai lần bằng đệm rửa (Wash Buffer);
- Bỏ sung 250 μl Blocking Buffer và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;
- Rửa hai lần bằng đệm rửa.

Xây dựng đường chuẩn với 7 điểm chuẩn

- Pha loãng chất chuẩn (theo hệ số 2) với Assay Buffer A (1X);
- Bỏ sung 100 μl Assay Buffer A (1X) vào tất cả các giếng sử dụng cho chất chuẩn;
- Bỏ sung 100 μl chất chuẩn vào giếng đầu tiên; trộn đều và tiến hành pha loãng bậc 2 để có 7 giếng chứa chất chuẩn.

Pha loãng mẫu

- Bỏ sung mẫu huyết thanh và mẫu niêm mạc ruột vào đĩa và pha loãng theo hệ số 2 bằng Assay Buffer A (1X) trực tiếp trên đĩa.

Thực hiện phản ứng

- Ủ kín đĩa ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;
- Rửa đĩa bằng đệm rửa 4 lần;
- Bỏ sung 100 µl/giếng kháng thể phát hiện (Detection Antibody) vào tất cả các giếng;
- Ủ đĩa kín ở nhiệt độ phòng (25-28°C) trong 1 giờ;
- Rửa bốn lần bằng đệm rửa;
- Bỏ sung 100 µl/giếng dung dịch cơ chất vào mỗi giếng;
- Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 15 phút;
- Bỏ sung 100 µl đệm dừng phản ứng (Stop Solution) vào mỗi giếng;
- Đọc đĩa ở bước sóng 450 nm.

2.2.6. Xử lý kết quả và phân tích thống kê

Các số liệu thu thập được xử lý bằng các thuật toán thống kê và phần mềm Microsoft Excel 2013, SPSS 20.0.

So sánh giá trị trung bình của hai biến chuẩn bằng hai test Paired Sample T-Test và One Way ANOVA với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $P < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

3.1. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH CẤP

3.1.1. Kết quả theo dõi lâm sàng

Kết quả sau quá trình thử nghiệm cho thấy:

- Sau 72 giờ số chuột chết không có;
- Sau 14 ngày chuột nhắt trắng ăn uống, vận động, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, lông mượt, hậu môn khô, phân thành khuôn.

Kết quả cụ thể được thể hiện trong **Bảng 3.1**.

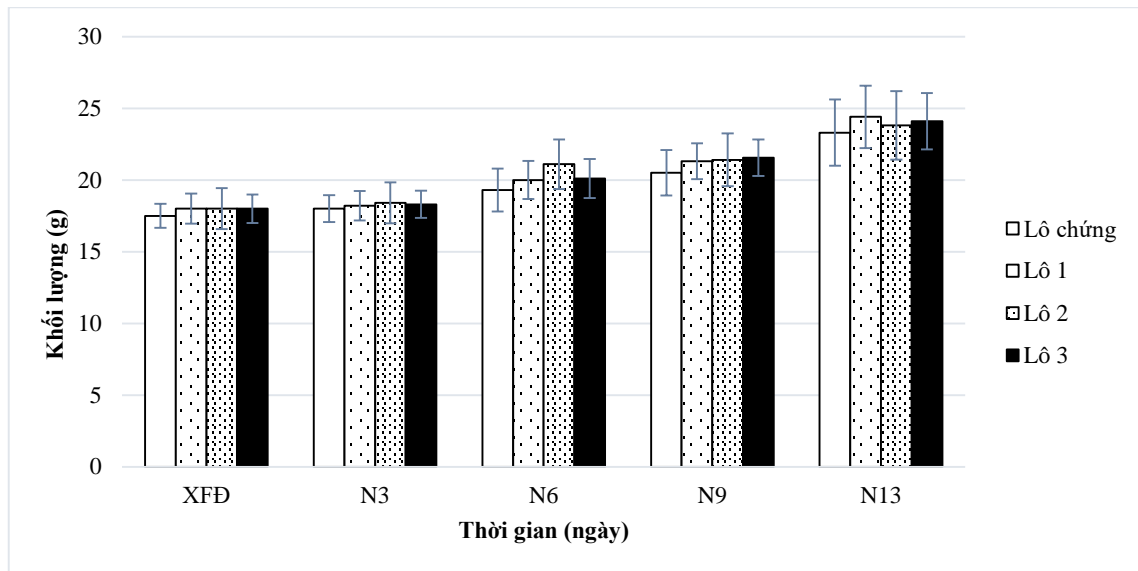
Bảng 3.1. Theo dõi lâm sàng chuột thử nghiệm độc tính cấp

Lô	Liều uống (CFU/50 kg/24 h)	Số chuột chết trong 72 giờ	Biểu hiện bên ngoài trong vòng 0-72 giờ
ĐC	0	0	Chuột ăn uống, vận động, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, bài tiết bình thường.
1	100×10^9	0	Chuột ăn uống, vận động, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, bài tiết bình thường.
2	200×10^9	0	Chuột ăn uống, vận động, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, bài tiết bình thường.
3	400×10^9	0	Chuột ăn uống, vận động, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, bài tiết bình thường.

Kết quả Bảng 3.1 cho thấy, với mức ngoại suy liều trên người là $416,67 \times 10^9$ CFU/50 kg/24 h thì liều dùng 100×10^9 CFU/50 kg/24 h gấp từ 17,36 lần đến 34,72 lần liều dùng trên người; liều 400×10^9 CFU/50 kg/24 h gấp từ 69,44 đến 138,88 lần liều dùng trên người. Từ đó, liều dự kiến sử dụng chế phẩm trên người là 6×10^9 đến $12 \times 10^9/50$ kg/24 h) với hệ số 11,76.

3.1.2. Kết quả theo dõi khối lượng cơ thể chuột

Khối lượng đầu vào của chuột đồng đều tại thời điểm xuất phát điểm và trong quá trình thí nghiệm tất cả các lô đều tăng khối lượng, tuy nhiên giá trị tăng ở mỗi lô khác nhau. Kết quả theo dõi khối lượng cơ thể chuột được trình bày trong Hình 3.1 và Bảng 1 (Phụ lục).



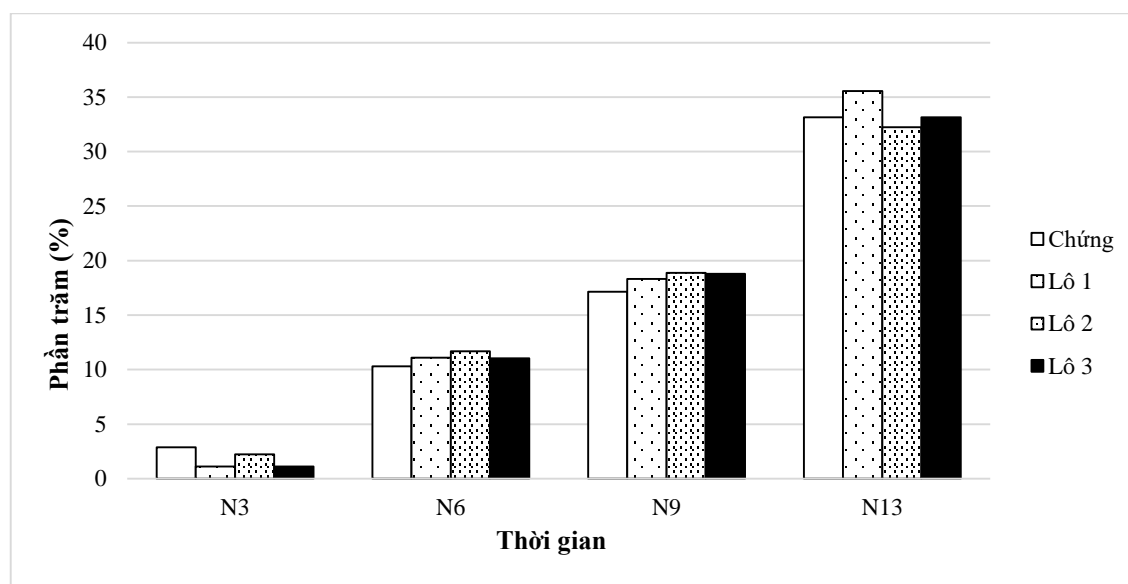
Hình 3.1. Khối lượng cơ thể chuột nhất trắng biểu hiện

Kết quả theo dõi khối lượng trung bình của chuột trong quá trình thử nghiệm cho thấy:

- Xuất phát điểm: Khối lượng trung bình của chuột ở các nhóm thử trước khi đưa vào thử nghiệm không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($P > 0,05$);
- Sau khi uống chế phẩm N3, N6, N9 và N13: Chuột nhất trắng ở nhóm chứng và các nhóm còn lại không có sự khác biệt về khối lượng cân nặng ($P > 0,05$);
- Sau khi kết thúc thí nghiệm: Khối lượng trung bình của chuột thí nghiệm ở lô ĐC tăng trung bình 5,8 g; lô 1 tăng 6,4 g; lô 2 tăng 5,8 g và lô 3 tăng 6 g. Điều này cho thấy, khối lượng chuột nhất trung bình ở các lô đều tăng tỉ lệ thuận theo thời gian và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các lô ($P > 0,05$).

Kết quả thu được chứng tỏ chế phẩm nghiên cứu không ảnh hưởng đến quá trình phát triển bình thường của chuột thí nghiệm.

Kết quả cân nặng cơ thể chuột nhắt trắng và được so sánh qua tỷ lệ tăng cân nặng (%) ở chuột nhắt trắng ở các lô trong từng thời điểm. Khi coi cân nặng trung bình của chuột tại các lô ở XFĐ là 100%, phần trăm tại thời điểm N3, N6, N9, N13 sẽ là sự chênh lệch phần trăm cân nặng với thời điểm XFĐ, kết quả sẽ là được thể hiện ở Hình 3.2.



Hình 3.2. Phần trăm tăng khối lượng chuột nhắt trắng

Kết quả trên Hình 3.2 kết hợp với Bảng 2 (Phụ lục) cho thấy: phần trăm tăng khối lượng cơ thể chuột tại các lô từ ngày 3 đến ngày 13 đều tăng tỉ lệ thuận theo thời gian.

Cụ thể, sau 13 ngày nghiên cứu cân nặng chuột nhắt trắng ở các lô nghiên cứu tăng từ 32,22% đến 35,56%. Trong đó lô được dùng BaciMix liều 1 tăng cao nhất (35,56%) và lô liều 2 tăng thấp nhất (32,22%), còn lô chứng tăng 33,14%. Sự tăng về cân nặng giữa các lô tại các thời điểm nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Như vậy, sự phát triển cân nặng của chuột nhắt trắng ở các lô không bị ảnh hưởng khi uống chế phẩm BaciMix các liều lần lượt là 100×10^9 , 200×10^9 và 400×10^9 CFU/kg.

3.1.3. Quan sát dấu hiệu ngộ độc

Khi kết thúc thí nghiệm, số lượng chuột ở tất cả các lô không thay đổi. Điều đó có nghĩa là không có cá thể chuột nào bị chết. Chuột ăn uống, vận động, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt, bài tiết bình thường.

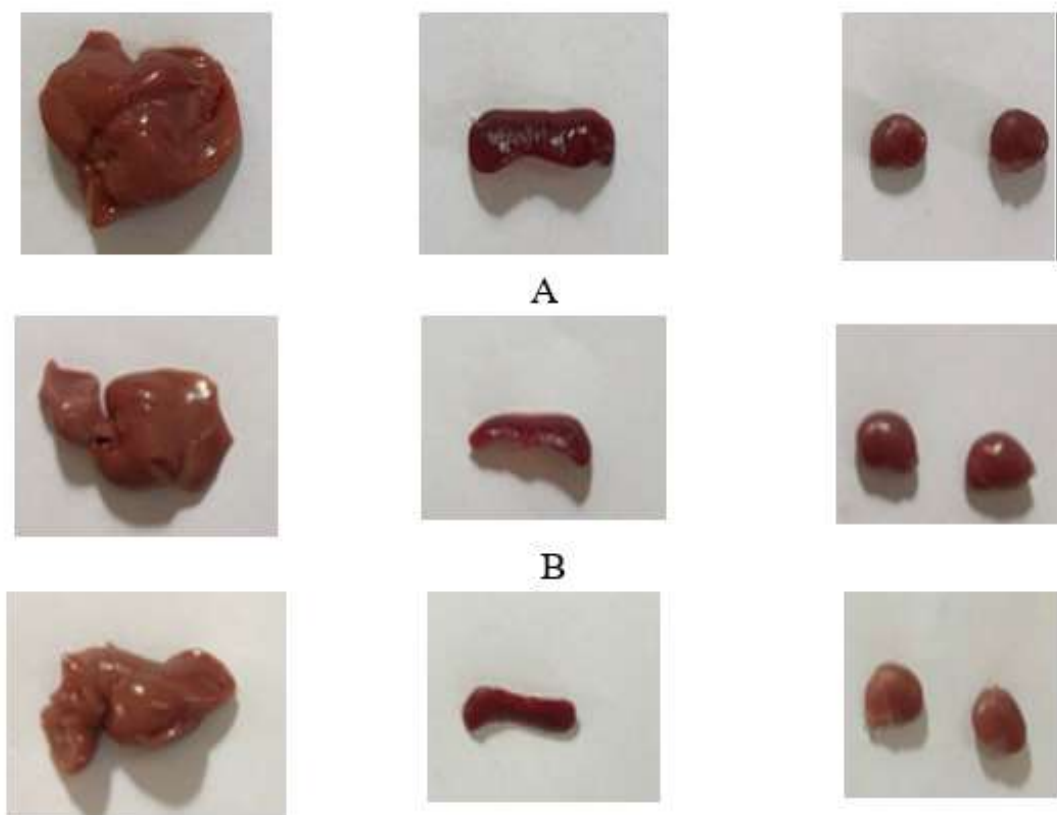
Theo phân loại chất độc theo đường uống của tổ chức WHO, OECD và GHS chế phẩm không gây độc ở liều tối đa, không xác định được giá trị LD₅₀ hoặc có giá trị LD₅₀ > 5000 mg/kg thể trọng theo đường uống thì được coi là không độc hoặc không phân loại (unclassified).

Dựa trên kết quả thu được của thử nghiệm này chúng tôi có thể kết luận chế phẩm BaciMix tổ hợp hai chủng khuẩn *Bacillus subtilis* BS 304.04 và *Bacillus coagulans* BC 304.06 thuộc nhóm không gây độc theo đường uống.

3.1.4. Kết quả mô bệnh học

Hình ảnh của gan, lách và thận cho thấy màu sắc, hình thái của các cơ quan này ở các lô được uống chế phẩm BaciMix không bị tổn thương và không có sự khác biệt so với lô chứng (Hình 3.3). Cụ thể như sau:

- Mô gan màu nâu đều, đồng nhất, không dấu hiệu tổn thương hay hoại tử.
- Lách màu nâu đậm hình thường, không sưng.
- Hai thận không có hiện tượng ứ nước



Hình 3.3. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận của chuột cống nghiên cứu

A: Lô chứng ; B: Lô trị 1; C: Lô trị 2

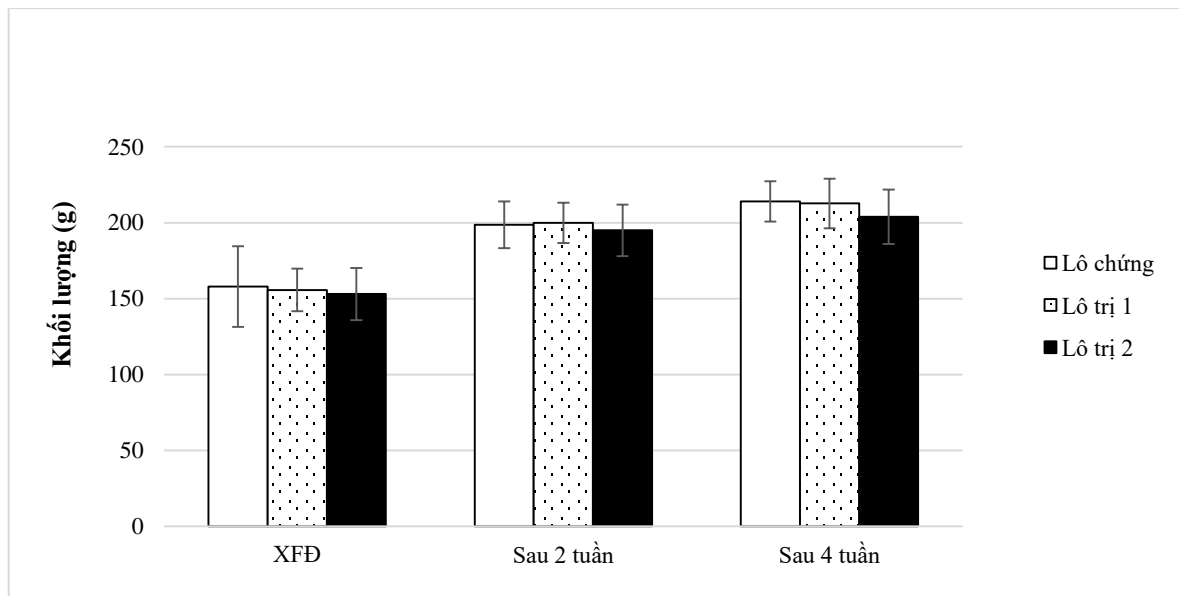
3.2. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN

3.2.1. Kết quả theo dõi tình trạng chung

Trong 28 ngày liên tục uống chế phẩm, chuột cống trắng ở các lô thử nghiệm được theo dõi tình trạng chung. Kết quả quan sát cho thấy chuột được uống chế phẩm BaciMix ở cả 2 liều nghiên cứu đều ăn uống bình thường, lông mượt, không có hiện tượng đi ngoài, hoặc rối loạn thần kinh. Đến thời điểm cuối, tất cả các lô thí nghiệm đều không có chuột bị chết.

3.2.2. Kết quả khối lượng cơ thể

Trong 28 ngày thực hiện thử nghiệm, khối lượng cơ thể nhóm chuột nghiên cứu sau 2 tuần và 4 tuần đều tăng nhiều so với XFD. Kết quả chi tiết cân nặng chuột cống trắng được thể hiện trong Hình 3.4.



Hình 3.4. Khối lượng cơ thể chuột trong 28 ngày

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

Kết quả Hình 3.4 và Bảng 3 (Phụ lục) cho thấy khối lượng cơ thể chuột cống trắng tăng rõ rệt qua từng thời điểm xét nghiệm và tỉ lệ thuận với thời gian. Khi so sánh khối lượng cơ thể các lô với nhau ở cùng thời điểm XFD, sau 02 tuần và sau 04 tuần không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Tuy nhiên trọng lượng chuột cống trắng ở một lô tại các thời điểm khác nhau có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Cụ thể, sau 02 tuần và 04 tuần

trọng lượng các lô tăng lần lượt như sau: lô chứng tăng trung bình 40,7 g và 57 g; lô trị 1 tăng trung bình 44,2 g và 57 g; lô trị 2 tăng trung bình 42 g và 50 g.

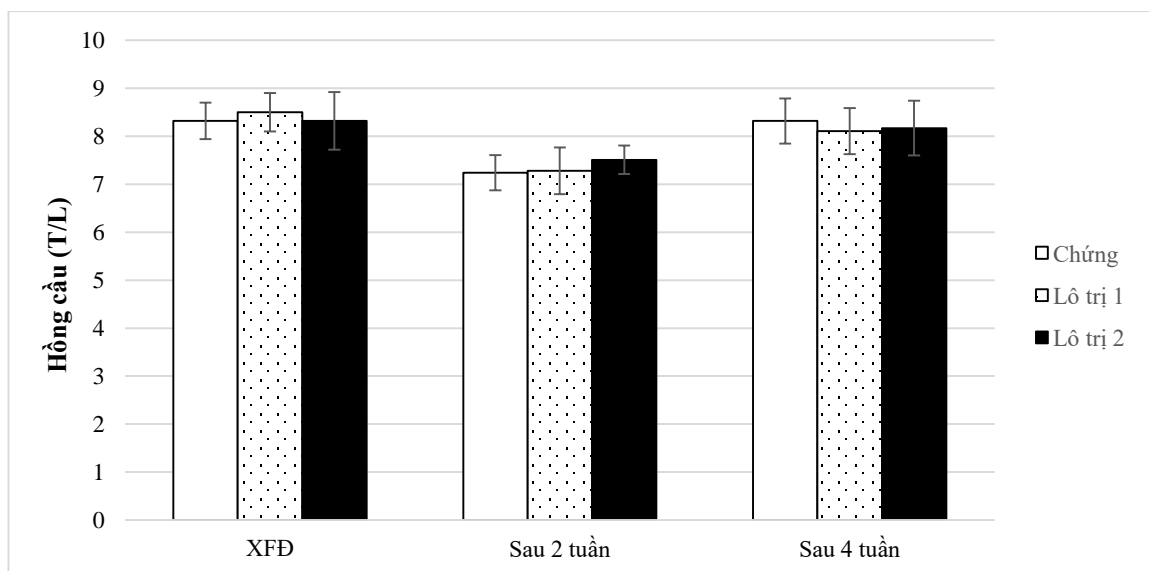
Như vậy, khối lượng cơ thể của chuột cống trắng không bị ảnh hưởng khi uống BaciMix với mức liều 1 và 2 trong 4 tuần.

3.2.3. Kết quả huyết học

Một số khác biệt về kết quả xét nghiệm huyết học của chuột cống trắng như số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, bạch cầu, và tiểu cầu ở các lô nghiên cứu đã được ghi chép và so sánh với giới hạn tiêu chuẩn. Kết quả cụ thể được thể hiện lần lượt ở các Hình 3.5, Hình 3.6, Hình 3.7, Hình 3.8 sau.

- **Số lượng hồng cầu**

Trong máu, hồng cầu là thành phần chính và chiếm số lượng lớn trong số các tế bào máu. Hồng cầu là một yếu tố quan trọng đối với hoạt động sống của cơ thể, trong đó có việc vận chuyển O_2 và CO_2 trong khắp cơ thể sống. Chỉ số về số lượng hồng cầu ở chuột cống trắng trưởng thành là 6,76 – 9,75 T/L [35]. Số lượng hồng cầu ở chuột cống trắng ở các lô thử nghiệm tại các thời điểm xét nghiệm được thể hiện ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Số lượng hồng cầu ở chuột cống trắng

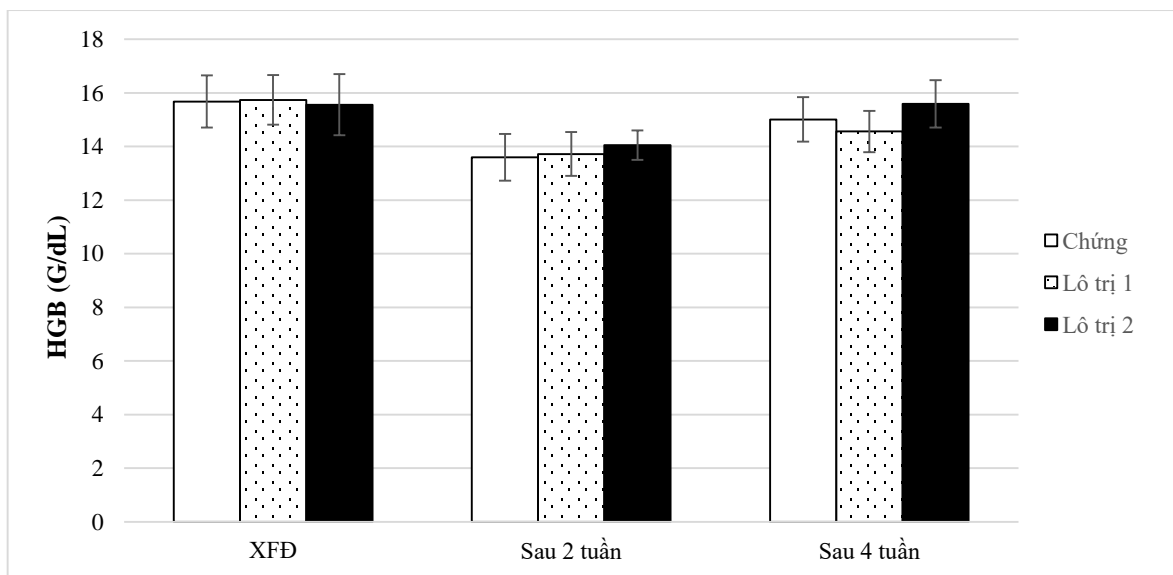
Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg

Kết quả Hình 3.5 kết hợp Bảng 4 (Phụ lục) cho thấy, số lượng hồng cầu của chuột cống trắng ở cả 3 thời điểm XFĐ, sau 2 tuần và sau 4 tuần đều nằm trong giới hạn cho phép. Số lượng hồng cầu tại thời điểm XFĐ so với số lượng này sau 02 tuần cũng như tại thời điểm sau 02 tuần so với sau 04 tuần có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Tuy nhiên sự khác biệt giữa số lượng này tại thời điểm XFĐ so với số lượng này sau 04 không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Cụ thể, tại thời điểm XFĐ số lượng hồng cầu của chuột cống trắng tại các lô tương đương nhau ($P > 0,05$), sau 02 tuần số lượng hồng cầu ở tất cả các lô cùng giảm ($P > 0,05$) và sau 04 tuần số lượng hồng cầu ở tất cả các lô cùng tăng tương đương với XFĐ. Vì vậy, số lượng hồng cầu chuột cống trắng ở tất cả các lô sau 04 tuần uống chế phẩm BaciMix không có sự khác biệt.

- **Số lượng huyết sắc tố**

Huyết sắc tố (HGB) có màu đỏ được chứa trong hồng cầu và đây là chỉ số đặc trưng của động vật có vú. Tương tự số lượng hồng cầu, số lượng huyết sắc tố của chuột cống trắng cũng được xét nghiệm tại 3 thời điểm. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.6 dưới đây:



Hình 3.6. Số lượng huyết sắc tố của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

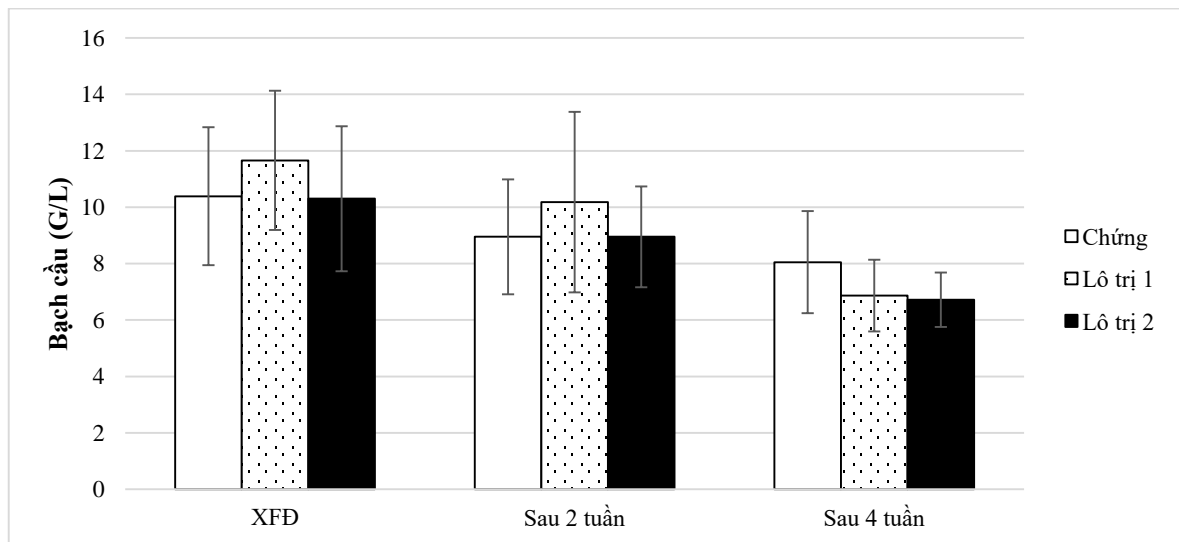
Kết quả Hình 3.6 và Bảng 5 (Phụ lục) thể hiện số lượng huyết sắc tố của chuột cống trắng mặc dù có sự thay đổi ở các thời điểm xét nghiệm nhưng vẫn

nằm trong giới hạn tiêu chuẩn. Giới hạn chỉ tiêu HGB của chuột cống trắng trưởng thành là 11,5 – 16,1 (G/dL) [35].

Sự khác biệt về số lượng huyết sắc tố ở tất cả các lô tại thời điểm XFĐ với sau 02 tuần và sau 02 tuần với sau 04 tuần có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Tuy nhiên khi so sánh số lượng này thời điểm XFĐ so với sau 04 thì kết quả không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Cụ thể, tại thời điểm XFĐ số lượng huyết sắc tố của chuột cống trắng tại các lô tương đương nhau ($P > 0,05$), nhưng sau 02 tuần số lượng huyết sắc tố ở tất cả các lô cùng giảm ($P > 0,05$) và sau 04 tuần số lượng huyết sắc tố ở tất cả các lô cùng tăng tương đương với XFĐ. Vì vậy, số lượng huyết sắc tố của chuột cống trắng ở tất cả các lô sau 04 tuần uống chế phẩm BaciMix không có sự khác biệt.

• Số lượng bạch cầu

Bạch cầu là chỉ số được quan tâm thứ 3 trong xét nghiệm máu. Bạch cầu có nhiệm vụ thực bào (ăn các vật thể lạ), chính vì vậy từ số lượng bạch cầu có thể biết được cơ thể vật chủ có đang trong trạng thái khỏe mạnh hay không. Giới hạn chỉ tiêu bạch cầu của chuột cống trắng trưởng thành là 6,6 – 12,6 (G/L) [35]. Kết quả số lượng bạch cầu của chuột cống trắng qua từng thời điểm được thể hiện trong Hình 3.7 dưới đây:



Hình 3.7. Số lượng bạch cầu của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

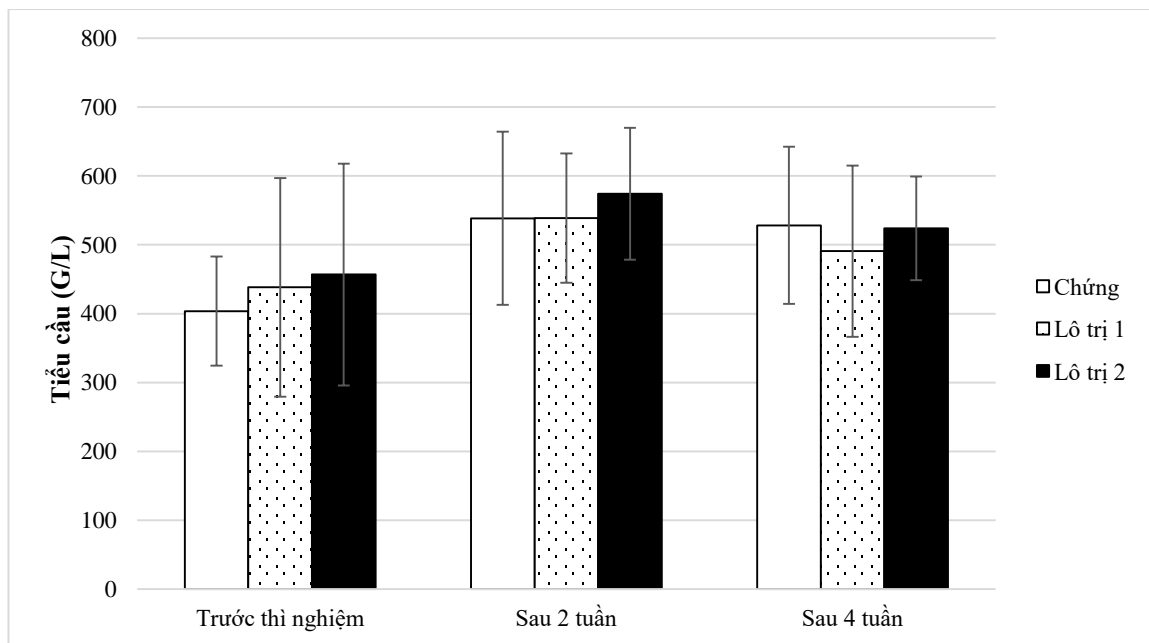
Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg

Kết quả Hình 3.7 và Bảng 6 (Phụ lục) cho thấy trong cùng một lô sau 2 tuần số lượng bạch cầu đều giảm so với thời điểm XFĐ ($P > 0,05$) ở cả 3 lô. Tại thời điểm sau 4 tuần nghiên cứu, số lượng bạch cầu giảm mạnh ở 2 lô được dùng chế phẩm BaciMix liều 1 và liều 2 so với thời điểm XFĐ ($P < 0,05$). Cụ thể, lô trị 1 giảm trung bình 4,79 G/L, lô trị 2 giảm trung bình 3,58 G/L. Trong đó lô chứng chỉ giảm trung bình 2,34 G/L.

Khi so sánh số lượng bạch cầu giữa các lô nghiên cứu tại cùng một thời điểm cho thấy: ở các thời điểm XFĐ, sau 2 tuần, 4 tuần nghiên cứu, số lượng bạch cầu giữa 3 lô nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Số lượng bạch cầu mặc dù có sự thay đổi ở các thời điểm xét nghiệm nhưng đều nằm trong giới hạn tiêu chuẩn. Vì vậy, số lượng bạch cầu trong máu chuột cống trắng uống chế phẩm BaciMix ở cả 2 liều đều không bị ảnh hưởng.

- **Số lượng tiểu cầu**

Tiểu cầu là một tế bào có trong huyết tương với chức năng chính là cầm máu bằng cách vón cục và đông lại khi mạch máu vật chủ bị tổn thương. Kết quả số lượng tiểu cầu được trình bày ở Hình 3.8.



Hình 3.8. Số lượng tiểu cầu của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

Kết quả Hình 3.8 và Bảng 7 (Phụ lục) cho thấy, sự khác biệt về số lượng tiểu cầu ở các lô tại thời điểm XFĐ và sau 2 tuần đều có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Tuy nhiên, tại các thời điểm khác ở các lô sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$), mặc dù số lượng tiểu cầu tại thời điểm XFĐ so với thời điểm sau 4 tuần tại lô chứng lại có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Cụ thể, số lượng tiểu cầu ở các lô tại thời điểm XFĐ là tương đương nhau ($P > 0,05$). Sau 2 tuần và 4 tuần thí nghiệm số lượng tiểu cầu ở các lô cùng tăng, và cùng ở 2 thời điểm này số lượng tiểu cầu giữa các lô cũng không có sự chênh lệch mang ý nghĩa thống kê. Giới hạn tiểu cầu trong máu chuột cống trưởng thành khỏe mạnh là 500 – 1300 (G/L) [35]. Cả 3 thời điểm xét nghiệm, số lượng tiểu cầu của chuột cống trắng tại các lô đều nằm trong giới hạn.

Như vậy, số lượng tiểu cầu trong máu chuột cống trắng không bị ảnh hưởng khi uống chế phẩm BaciMix 2 liều.

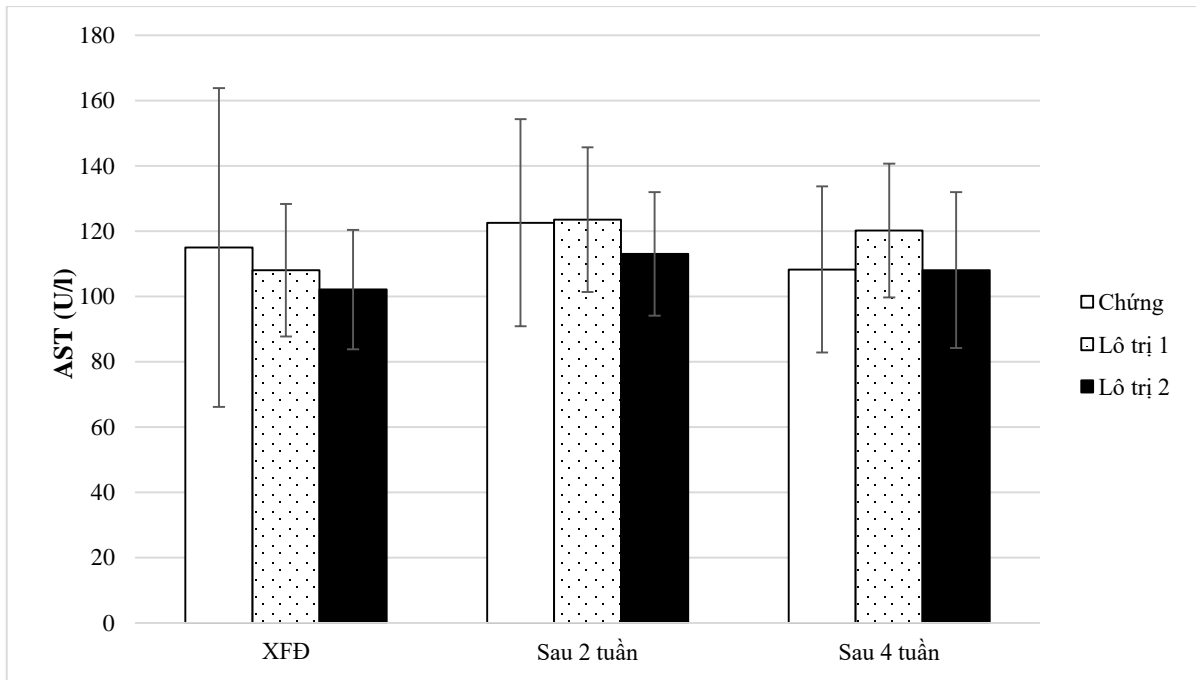
Các kết quả trên cho thấy các chỉ tiêu xét nghiệm đều nằm trong giới hạn cho phép và không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa các lô ở các thời điểm thí nghiệm ($P > 0,05$). Tóm lại, chuột cống trắng uống chế phẩm BaciMix 2 liều đều không làm ảnh hưởng đến chỉ số huyết học trong máu.

3.2.4. Kết quả sinh hóa

Kết quả xét nghiệm sinh hóa huyết thanh chuột cống trắng tại thời điểm trước thí nghiệm, sau 2 tuần và sau 4 tuần thể hiện lần lượt qua hoạt độ ALT, hoạt độ AST, nồng độ Bilirubin, nồng độ cholesterol, nồng độ creatinin. Kết quả chi tiết được trình bày lần lượt dưới đây.

- **Hoạt độ AST**

AST (Aspartate transaminase) là một enzyme tham gia vào quá trình chuyển amin. AST có nhiều trong gan, tim, cơ, thận, não và một lượng rất thấp trong máu. Khi một trong các cơ quan trên tổn thương, đặc biệt là gan thì AST sẽ giải phóng vào máu. Trong máu chuột cống khỏe mạnh và trưởng thành chỉ số này có giới hạn là 46,7 – 80,8 (U/L) [35]. Hoạt độ AST của chuột cống trắng ở các lô thử nghiệm được xét nghiệm tại 3 thời điểm (Hình 3.9).



Hình 3.9. Hoạt độ AST của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

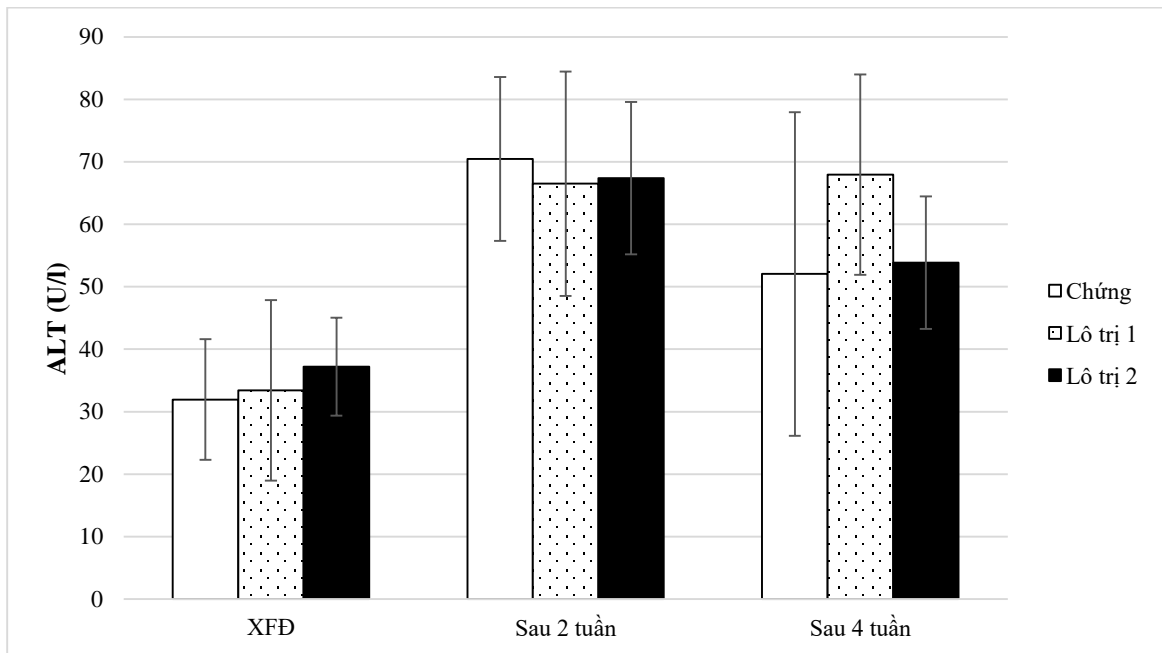
Kết quả Hình 3.9 và Bảng 8 (Phụ lục) cho thấy hoạt độ enzyme AST trong cùng một lô sau 2 tuần tăng nhẹ ở các lô chứng và lô dùng BaciMix liều 2. Hoạt độ AST so với thời điểm XFD thì ở lô trị 1 tăng nhiều nhất, sau 2 tuần tăng trung bình là 124,02 U/l, và sau 4 tuần tăng trung bình là 120,31 U/l. Tuy nhiên, sự tăng hoạt độ enzym tại các lô nghiên cứu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với thời điểm XFD ($P > 0,05$). Khi so sánh hoạt độ enzyme AST giữa các lô nghiên cứu tại cùng một thời điểm cho thấy: ở các thời điểm XFD, sau 2 tuần và sau 4 tuần nghiên cứu, hoạt độ AST không có sự khác biệt giữa lô trị 1, lô trị 2 và lô chứng ($P > 0,05$).

Chỉ số AST tại 3 thời điểm xét nghiệm ở tất cả các lô đều cao hơn giới hạn cho phép. Trong khi đó, chuột không xuất hiện biểu hiện đau hay chướng bụng, vì vậy điều này có thể giải thích bằng việc thức ăn đầu vào làm tăng chỉ số AST. Ngoài ra, kết quả được khẳng định lại bằng giải phẫu hình thái để đưa ra kết luận cuối cùng.

• Hoạt độ ALT

ALT (Alanine Aminotransferase) là một loại enzyme có trong gan và giúp gan có thể trao đổi chất cũng như chuyển hóa thức ăn thành năng lượng dễ dàng. Giới hạn cho phép của ALT trong máu chuột cống trưởng thành khỏe mạnh là 17,5 – 30,2 (U/l) [35].

Hoạt độ enzyme ALT tại ba thời điểm thí nghiệm của chuột cống trắng ở tất cả các lô thí nghiệm được thể hiện trong Hình 3.10.



Hình 3.10. Hoạt độ ALT của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

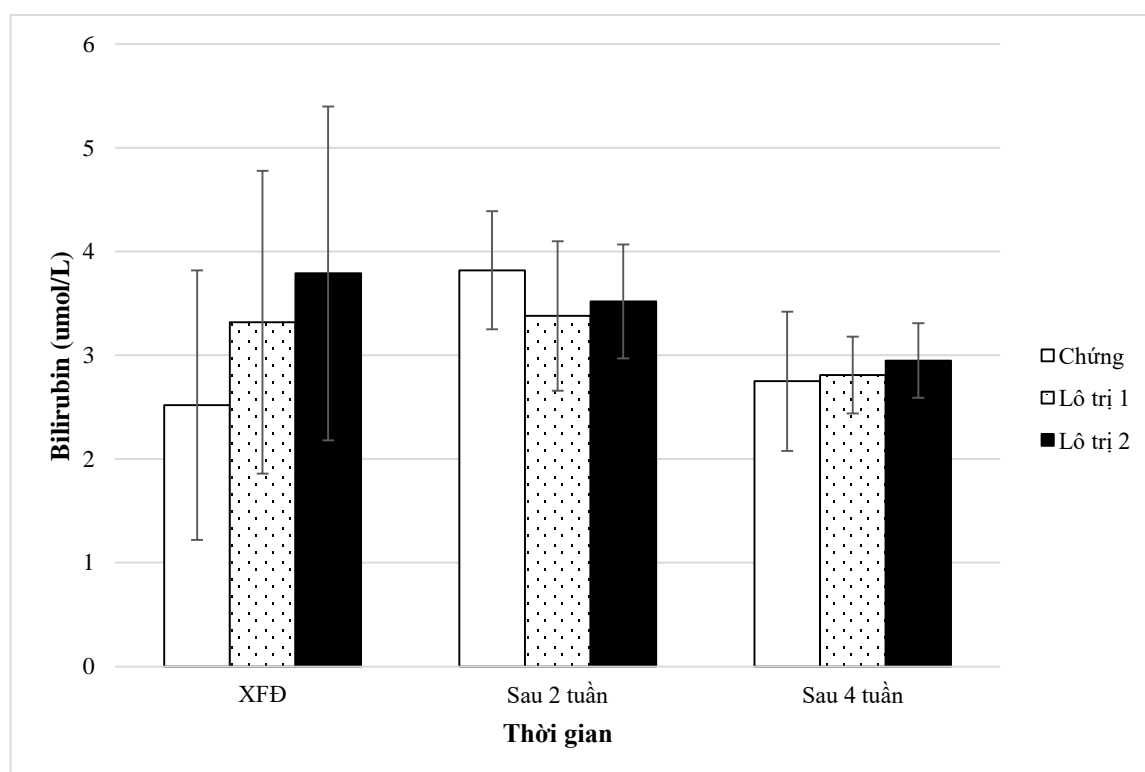
Kết quả Hình 3.10 và bảng 9 (Phụ lục) cho thấy hoạt độ enzyme ALT trong cùng một lô sau 2 tuần và 4 tuần tăng ở cả 3 lô nghiên cứu. Sự khác biệt này so với thời điểm XFD có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Sau 2 tuần, hoạt độ ALT ở lô chứng, lô trị 1 và lô trị 2 tăng trung bình lần lượt là 38,94 U/l; 33,08 U/l và 30,18 U/l; còn sau 4 tuần, hoạt độ ở các lô trên tăng trung bình lần lượt là 20,12 U/l; 34,52 U/l và 21,67 U/l.

So sánh hoạt độ enzyme ALT giữa các lô nghiên cứu tại cùng một thời điểm cho thấy: ở các thời điểm XFD, sau 2 tuần và sau 4 tuần nghiên cứu, hoạt độ ALT không có sự khác biệt, có ý nghĩa thống kê giữa lô trị 1, lô trị 2 và lô chứng ($P > 0,05$).

Chỉ số ALT tại 3 thời điểm xét nghiệm ở tất cả các lô đều cao hơn giới hạn cho phép. Trong khi đó, chuột không xuất hiện biểu hiện đau hay chướng bụng, vì vậy điều này có thể giải thích bằng việc thức ăn đầu vào làm tăng chỉ số ALT. Ngoài ra, chúng tôi tiến hành mổ giải phẫu khi kết thúc thí nghiệm kết hợp số liệu xét nghiệm để đưa ra kết luận cuối cùng.

• Nồng độ Bilirubin

Bilirubin được hình thành trong quá trình phá vỡ hồng cầu bình thường trong máu. Bilirubin đi qua gan và được bài tiết ra khỏi cơ thể thông qua phân và một lượng nhỏ trong nước tiểu. Giới hạn nồng độ Bilirubin trong máu ở chuột cống trắng là 2 – 5,5 $\mu\text{mol/L}$ [35]. Nồng độ Bilirubin của chuột cống trắng xét nghiệm tại ba thời điểm được thể hiện trong Hình 3.11.



Hình 3.11. Nồng độ Bilirubin của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

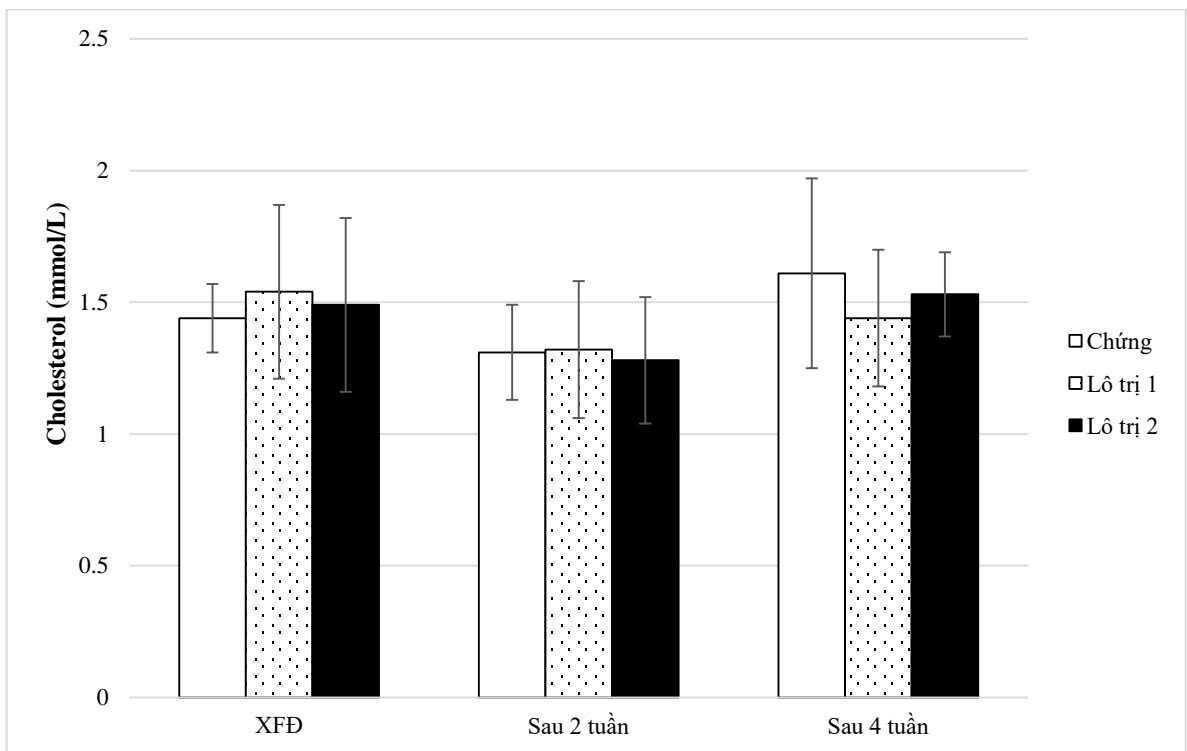
Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

Kết quả Hình 3.11 và Bảng 10 (Phụ lục) cho thấy nồng độ Bilirubin máu chuột cống trắng tại các thời điểm xuất phát điểm, sau 02 tuần, sau 04 tuần nghiên cứu ở lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($P > 0,05$).

Nồng độ Bilirubin trong máu chuột cống trắng ở các lô tại các thời điểm đều không vượt quá giới hạn cho phép (2 – 5,5 $\mu\text{mol/L}$). Vì vậy, chuột cống trắng uống BaciMix ở cả 2 liều tại các thời điểm đều không làm ảnh hưởng đến nồng độ Bilirubin.

- **Nồng độ cholesterol**

Cholesterol không hoàn toàn là chất gây hại mà còn là chất béo cần thiết của tế bào. Chất béo này được tạo ra từ gan hoặc tổng hợp từ thức ăn và được vận chuyển trong máu nhờ chất trung gian. Cholesterol chỉ có hại khi gan gặp vấn đề hoặc hấp thụ thức ăn có chứa nhiều cholesterol dẫn đến chất béo này bị lưu giữ và đọng ở dạng xơ vữa động mạch máu. Giới hạn nồng độ cholesterol trong máu của chuột cống trắng trưởng thành là 40-130 mg/dL (1,03 – 3,36 mmol/L) [35]. Nồng độ cholesterol của chuột cống trắng xét nghiệm tại ba thời điểm được thể hiện trong Hình 3.12.



Hình 3.12. Nồng độ cholesterol của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

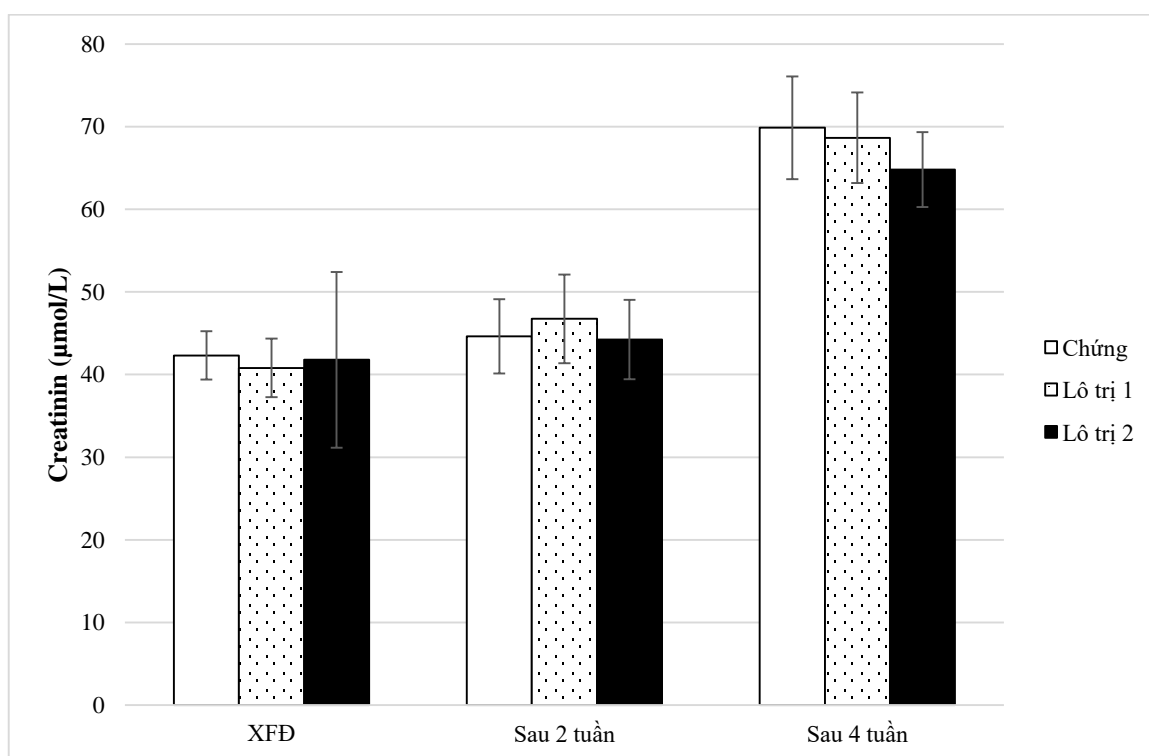
Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

Kết quả Hình 3.12 và Bảng 11 (Phụ lục) cho thấy nồng độ cholesterol trong máu chuột cống trắng tại các thời điểm xuất phát điểm, sau 02 tuần, sau

04 tuần nghiên cứu của lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt so với lô chứng ($P > 0,05$). So sánh kết quả thu được với giới hạn cho phép của nồng độ cholesterol cho thấy nồng độ này ở tất cả các lô tại các thời điểm đều nằm trong giới hạn (1,03 – 3,36 mmol/L). Vì vậy, nồng độ cholesterol trong máu chuột cống trắng không bị ảnh hưởng sau khi uống chế phẩm BaciMix 4 tuần.

• Nồng độ creatinin

Creatinin trong cơ thể cũng giống như cholesterol về nguồn gốc. Creatinin nội sinh chủ yếu tổng hợp từ gan và ngoại sinh là do thức ăn cung cấp. Creatinin được đào thải qua thận nên nồng độ của chúng thể hiện chức năng lọc của thận. Nồng độ creatinin là nồng độ hằng định, và ở chuột cống trắng chúng có giá trị 0,2 -0,8 mg/dL [35]. Trong quá trình thử nghiệm chế phẩm, nồng độ creatinin được theo dõi, ghi chép và thể hiện trong Hình 3.13.



Hình 3.13. Nồng độ creatinin của chuột cống trắng

Lô trị 1: liều sử dụng $1,68 \times 10^9$ CFU/kg;

Lô trị 2: liều sử dụng $8,4 \times 10^9$ CFU/kg;

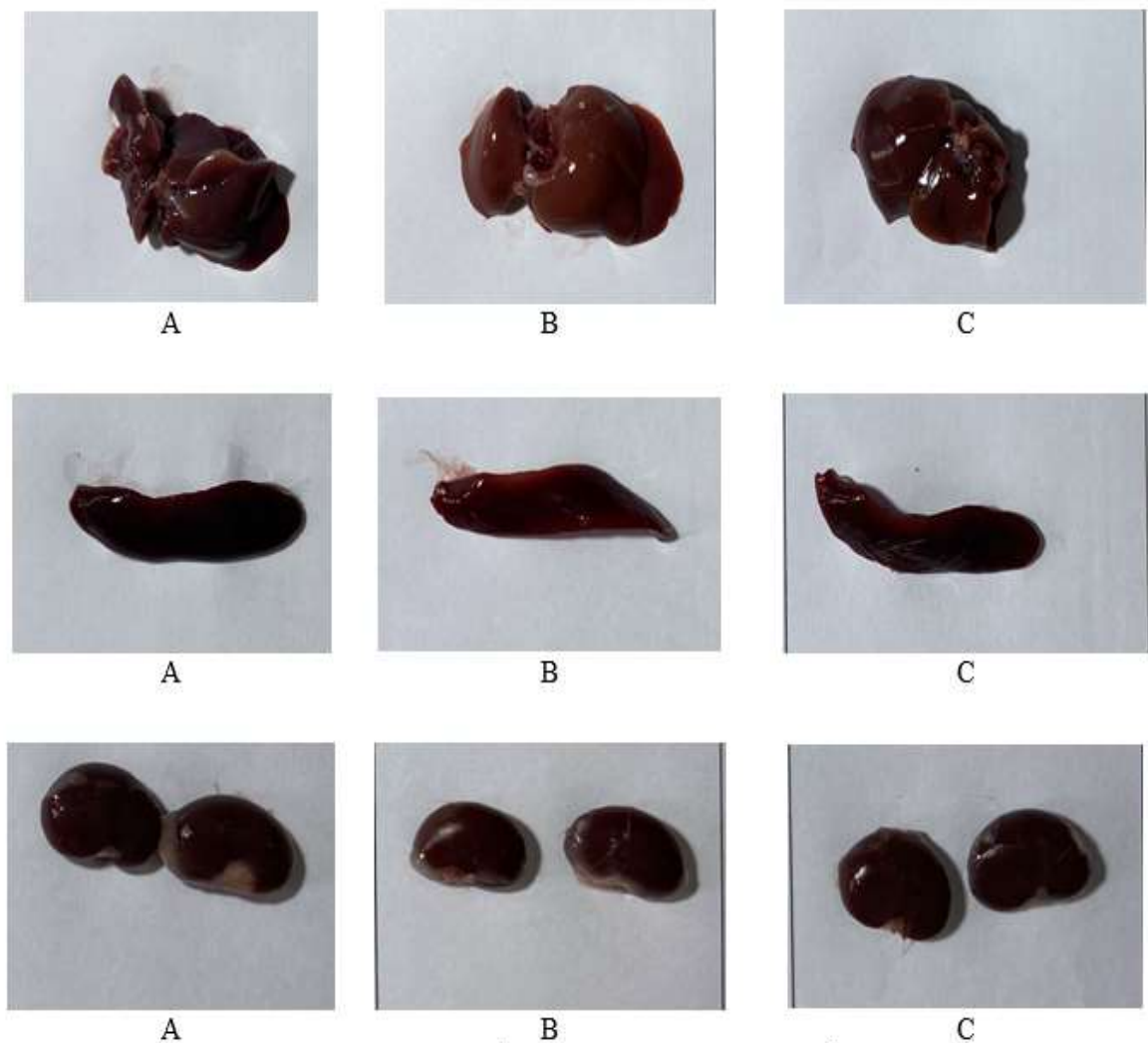
Kết quả Hình 3.13 và Bảng 12 (Phụ lục) cho thấy nồng độ creatinin tại các thời điểm XFD, sau 2 tuần, sau 4 tuần nghiên cứu của lô trị 1 và lô trị 2

không có sự khác biệt so với lô chứng ($P > 0,05$). Nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng sau 4 tuần uống chế phẩm BaciMix không bị ảnh hưởng.

Như vậy, kết quả sinh hóa của chuột cống trắng qua đánh giá tổng thể cho thấy các chỉ tiêu đều nằm trong giá trị cho phép. Kết quả trên cho thấy chế phẩm BaciMix không ảnh hưởng đến các chỉ số xét nghiệm cũng như chức năng gan thận của chuột cống trắng.

3.2.5. Kết quả mô bệnh học

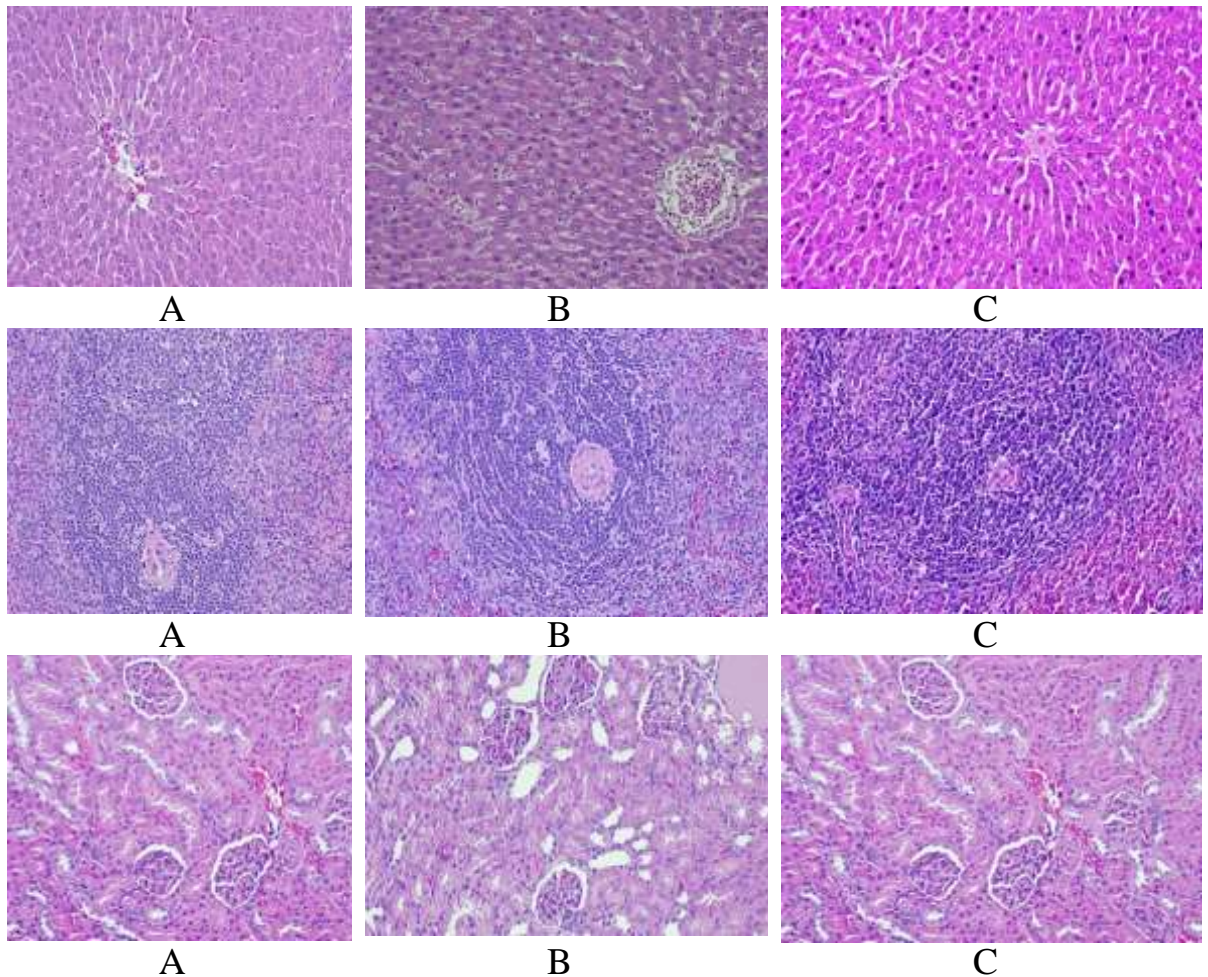
Quan sát đại thể cho thấy màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng chế phẩm BaciMix liều 1 và liều 2 không khác so với lô chứng.



Hình 3.14. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận ở chuột cống nghiên cứu

A: Lô chứng ; B:Lô trị 1; C: Lô trị 2

Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cống trắng cho thấy chế phẩm BaciMix dùng đường uống với liều $1,68 \times 10^9$ CFU/kg/24 giờ và liều $8,40 \times 10^9$ CFU/50 kg/24 h liên tục trong 04 tuần, không gây tổn thương trên gan, thận, ở chuột nghiên cứu (Hình 3.15).



Hình 3.15. Hình ảnh mô bệnh học gan, lách, thận chuột cống ở các nhóm nghiên cứu (HE, 100X)

A: Lô chứng ; B:Lô trị 1; C: Lô trị 2

Từ hình ảnh mô bệnh học gan, lách và thận của các lô chuột, những nhận xét chi tiết của mô bệnh học ở các cơ quan này của chuột cống trắng được thể hiện và kết luận lần lượt ở Bảng 3.2; Bảng 3.3 và Bảng 3.4

Bảng 3.2. Mô bệnh học gan chuột cống trắng

Chỉ tiêu đánh giá	Nhóm nghiên cứu, n = 10		
	Chứng (1)	Lô trị 1 (1,68 x10 ⁹ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 (8,4 x10 ⁹ CFU/kg) (3)
Tế bào gan	Bình thường	Bình thường, bào tương thuần nhất	Bình thường, bào tương thuần nhất
Cấu trúc tiểu thùy	Bình thường	Các tiểu thùy gan rõ	Các tiểu thùy gan rõ
Cấu trúc khoảng cửa	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Mạch máu	Bình thường	Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy xung huyết nhẹ	Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy xung huyết nhẹ
Các tổn thương	Không có	Không có	Không có
Kết luận	Gan bình thường	Không thấy hình ảnh tổn thương	Không thấy hình ảnh tổn thương

Bảng 3.3. Mô bệnh học thận chuột cống trắng

Chỉ tiêu đánh giá	Nhóm nghiên cứu n = 10		
	Chứng (1)	Lô trị 1 (1,68 x10 ⁹ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 (8,4 x10 ⁹ CFU/kg) (3)
Màu sắc	Màu nâu nhạt	Màu nâu nhạt	Màu nâu nhạt
Cấu trúc Vùng vỏ	Rõ ràng	Rõ ràng	Rõ ràng
Cấu trúc Vùng tủy	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Cầu thận	Bình thường	Bình thường, khoang bowman rõ	Bình thường, khoang bowman rõ
Ống thận	Bình thường	Không có	Không có
Kết luận	Tổ chức thận bình thường	Tổ chức thận bình thường, không thấy hình ảnh tổn thương	Tổ chức thận bình thường, không thấy hình ảnh tổn thương

Bảng 3.4. Mô bệnh học lách chuột cống trắng

Các chỉ tiêu đánh giá	Nhóm nghiên cứu n =10		
	Chúng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)
Màu sắc	Màu nâu đậm	Màu nâu đậm	Màu nâu đậm
Nhu mô lách	Rõ ràng	Rõ ràng	Rõ ràng
Vùng tủy trắng	Nang lympho đồng đều, động mạch bút lông bình thường	Nang lympho đồng đều, động mạch bút lông bình thường	Nang lympho đồng đều, động mạch bút lông bình thường
Vùng tủy đỏ	Dây Billroth và xoang mạch bình thường	Dây Billroth và xoang mạch bình thường	Dây Billroth và xoang mạch bình thường
Vùng tổn thương	Không có	Không có	Không có
Kết luận	Bình thường	Bình thường	Bình thường

Từ kết quả mô bệnh học, kết hợp với các kết quả xét nghiệm hóa sinh, huyết học bên trên chúng tôi đưa ra rất luận chuột cống trắng ở lô chúng và 2 lô uống BaciMix đều không bị ảnh hưởng tới các chỉ số xét nghiệm cũng như đại thể gan, lách, thận.

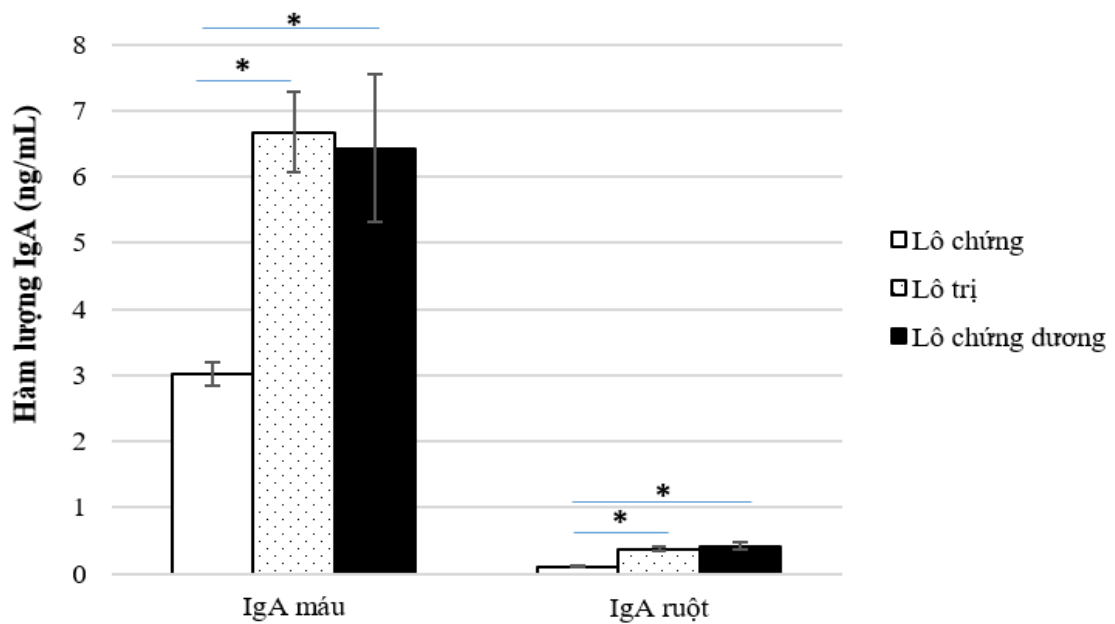
3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM BACIMIX TỚI CHỈ SỐ KHÁNG THỂ IgA

Trong 5 loại immunoglobulins của hệ thống miễn dịch, IgA được chúng tôi tập trung nghiên cứu vì IgA tiết là globulin miễn dịch chính trên bề mặt niêm mạc, chống lại các chất và vi khuẩn lạ, đồng thời không làm cho niêm mạc bị viêm quá mức. Mặc dù ở loài gặm nhấm đã có nghiên cứu IgM chiếm ưu thế trong việc bảo vệ niêm mạc nhưng giai đoạn chuột trưởng thành sản lượng IgA tiết mỗi ngày lại nhiều nhất. Ngoài ra, IgA tiết dịch chuyển trong dịch nhày tiêu hóa và máu có xu hướng di chuyển về dưới niêm mạc nên VSV đường ruột là một yếu tố ảnh hưởng đến sự tiết IgA [22,25]. Tiêu chảy là một

trong những triệu chứng phổ biến của bệnh rối loạn tiêu hóa nên chúng tôi thực hiện thí nghiệm trên hai mô hình chuột khỏe mạnh và chuột tiêu chảy nhằm đánh giá chỉ số IgA ở cả 2 mô hình này.

3.3.1. Ảnh hưởng đến chỉ số IgA trên mô hình chuột khỏe mạnh

IgA ở máu và niêm mạc ruột của chuột cống trắng khỏe mạnh được xác định và thể hiện kết quả ở **Hình 3.16**.



Hình 3.16. Hàm lượng IgA của chuột cống trắng

*: $P < 0,05$

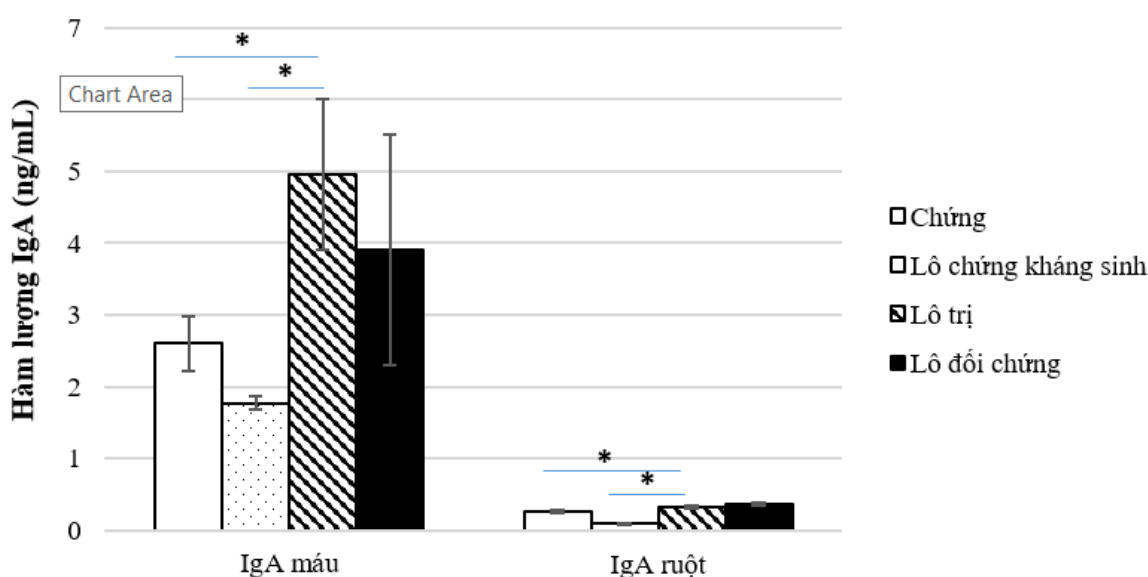
Kết quả Hình 3.16 và Bảng 13 (Phụ lục) thể hiện hàm lượng IgA trong máu và ruột ở lô trị và lô đối chứng đều cao hơn so với lô chứng ($P < 0,05$).

IgA là chỉ số kháng thể có sẵn trong cơ thể ĐVTN với chỉ số nhất định để duy trì chức năng miễn dịch. Hàm lượng IgA trong máu và ruột đều tăng ở lô trị 1 và lô trị 2 so với lô chứng và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Cụ thể ở IgA máu, hàm lượng IgA ở lô trị lớn hơn ở lô chứng 3,65 ng/ml và lớn hơn lô đối chứng dương 0,24 ng/ml (tương đương gấp 2,2 lần và 1,03 lần). IgA ở ruột lô trị lớn hơn lô chứng 0,26 ng/ml và nhỏ hơn lô đối chứng 0,05 ng/ml. Vì vậy, chỉ số IgA trong máu và ruột đều có ảnh hưởng tích cực sau 4 tuần uống chế phẩm probiotic BaciMix.

3.3.2. Ảnh hưởng đến chỉ số IgA trên mô hình chuột bị tiêu chảy do kháng sinh

Nghiên cứu của David S. và cộng sự năm 2022 cho thấy chuột cống trắng uống kháng sinh 5 ngày liên tục bị tiêu chảy do hệ vi sinh đường ruột bị mất cân bằng dẫn đến hệ miễn dịch của chuột bị ảnh hưởng và chỉ số IgA giảm [36]. Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện để đánh giá sự thay đổi của chỉ số IgA ở mô hình chuột bị tiêu chảy sau 8 ngày ở 4 nhóm nghiên cứu

Kết quả Hình 3.17 và Bảng 14 (Phụ lục) cho thấy tại thời điểm sau 4 tuần nghiên cứu lượng IgA máu và niêm mạc ruột ở các nhóm được điều trị bằng chế phẩm BaciMix và nhóm đối chứng (uống chế phẩm đối chứng dương) đều tăng so với nhóm tiêu chảy không được điều trị. Trong đó, lượng IgA ở nhóm uống chế phẩm BaciMix tăng cao nhất, rồi đến nhóm uống chế phẩm đối chứng dương và thấp nhất là nhóm tiêu chảy do kháng sinh. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê giữa lô uống cả 2 loại chế phẩm và lô không được điều trị ($P < 0,05$).



Hình 3.17. Hàm lượng IgA của chuột cống trắng bị tiêu chảy

So sánh giữa nhóm được điều trị bằng chế phẩm BaciMix và lô đối chứng được điều trị bằng chế phẩm đối chứng dương cho thấy lượng IgA máu và niêm mạc ruột không có khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$), trong khi lại có khác biệt này lại có ý nghĩa thống kê giữa lô uống chế phẩm và lô chứng ($P < 0,05$). Cụ thể, hàm lượng IgA máu ở lô trị uống BaciMix cao hơn lô chứng

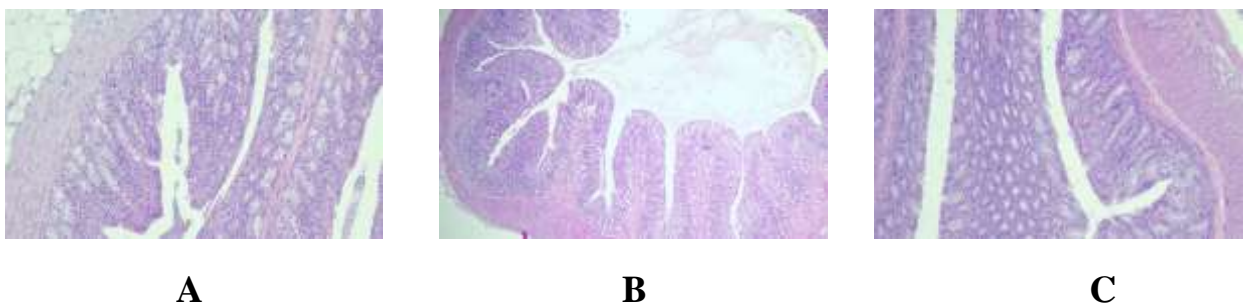
2,35 ng/ml và cao hơn lô chứng kháng sinh 3,19 ng/ml (tương đương gấp 1,9 lần và 2,8 lần). IgA ruột ở lô trị cao hơn lô chứng 0,07 ng/ml và cao hơn lô chứng kháng sinh 0,24 ng/ml (tương đương gấp 1,26 lần và 3,66 lần). Mặc dù sự chênh lệch IgA ruột ở các lô nhỏ hơn sự chênh lệch IgA máu ở các lô nhưng các sự chênh lệch này đều có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Cũng tương tự như ở mô hình chuột khỏe mạnh, ở mô hình chuột bị tiêu chảy IgA cũng có sự khác biệt tích cực có ý nghĩa thống kê giữa lô trị uống BaciMix với lô chứng và chứng kháng sinh. Tuy nhiên, tỷ lệ hàm lượng IgA máu/IgA ruột ở mô hình chuột bình thường cao hơn tỷ lệ này ở mô hình chuột bị tiêu chảy. Điều này có thể do IgA bị giảm trong quá trình gây bệnh tiêu chảy bởi kháng sinh [36], tuy nhiên từ số liệu trên đã cho thấy IgA được cải thiện khi uống chế phẩm BaciMix và chế phẩm đối chứng dương.

Như vậy, dựa trên kết quả về hàm lượng IgA có thể thấy chế phẩm BaciMix có ảnh hưởng tích cực đến kháng thể (IgA máu và niêm mạc ruột) của chuột cống trắng bình thường và chuột cống trắng bị tiêu chảy do kháng sinh.

3.3.3. Kết quả mô bệnh học đường ruột của chuột

Thí nghiệm này được tiến hành nhằm quan sát mô bệnh học đường ruột của chuột cống trắng ở 3 lô bao gồm lô chứng, lô trị và lô đối chứng. Kết quả nghiên cứu sơ bộ về mô bệnh học manh tràng chuột cống trắng cho thấy chế phẩm BaciMix dùng đường uống với liều $1,68 \times 10^9$ CFU/kg/24 giờ liên tục trong 04 tuần không gây tổn thương trên manh tràng của chuột nghiên cứu (Hình 3.18).



Hình 3.18. Hình ảnh mô bệnh học manh tràng chuột cống

A: Lô chứng ; B:Lô trị ; C: Lô đối chứng

Các kết quả về mô bệnh học của niêm mạc ruột, tế bào bảo mô, mạch máu, tế bào bạch huyết và các tổn thương ở ruột của chuột cống trắng dựa trên Hình 3.18 được tóm tắt trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Mô bệnh học ruột chuột cống trắng

Chỉ tiêu đánh giá	Nhóm nghiên cứu, n = 8		
	Chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô đối chứng (3)
Niêm mạc ruột	Bình thường	Dày, có tuyến nhú và tuyến ống	Dày, có tuyến nhú và tuyến ống
Tế bào biểu mô	Bình thường	Có nhân nhỏ và đều	Có nhân nhỏ và đều
Mạch máu	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Tế bào bạch huyết	Bình thường	Có các tế bào bạch huyết	Có các tế bào bạch huyết
Các tổn thương	Không có	Không có	Không có
Kết luận	bình thường	Không thấy hình ảnh tổn thương	Không thấy hình ảnh tổn thương

Như vậy, kết quả của chúng tôi về chỉ số IgA và mô bệnh học đường ruột ở chuột ở cả mô hình chuột khỏe mạnh và tiêu chảy do kháng sinh khá tương tự với các nghiên cứu khác. Tác giả Adrian C. và cs (2020) đã nghiên cứu về tổ hợp chế phẩm probiotic chứa *B. subtilis* và *B. coagulans* trên mô hình chuột thường và mô hình chuột viêm đại tràng. Kết quả cho thấy chế phẩm probiotic nghiên cứu có thể tồn tại, thích nghi trong hệ vi sinh vật đường ruột và có ảnh hưởng tích cực đến chỉ số miễn dịch immunoglobulin, cytokine tiền viêm và cytokine chống viêm [37]. Điều này tương đồng với kết quả của chúng tôi. Trong đó IgA lô trị tăng rõ rệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và lô kháng

sinh ($P < 0,05$). Ngoài ra, cũng theo Adrian C. và nhóm nghiên cứu khi phân tích mô bệnh học ở tất cả các lô chuột cho thấy, lô chuột bị bệnh có mô ruột tổn thương nghiêm trọng nhưng ở lô chuột được điều trị mô ruột bị tổn thương giảm [36]. Trong đó kết quả hình ảnh của chúng tôi ở các lô nghiên cứu chưa thấy sự khác biệt rõ rệt như bài báo công bố. Điều này có thể giải thích là nghiên cứu Adrian C. kéo dài trong 11 ngày nên kết quả mô ruột tổn thương rõ ràng hơn nghiên cứu của chúng tôi chỉ kéo dài 8 ngày.

Nghiên cứu của Siegfried H. và nhóm nghiên cứu (2016) cho thấy nhiều chủng probiotic lợi khuẩn kích thích sản sinh IgA thông qua các tế bào B, giúp duy trì khả năng miễn dịch dịch thể bằng cách liên kết với kháng nguyên. IgA huyết thanh tăng khoảng 10% sau khi động vật thí nghiệm được cho uống chế phẩm probiotic [24]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy chỉ số IgA cũng tăng ở lô được cho uống chế phẩm probiotic. Cụ thể, ở mô hình chuột khỏe mạnh, IgA máu ở lô trị, lô đối chứng và lô chứng lần lượt là 6,67 (ng/ml), 6,43 (ng/ml) và 3,02 (ng/ml) (Giá trị này ở lô trị và lô đối chứng tương đương nhau nhưng cao hơn 2,2 lần so với lô chứng). IgA ruột ở lô trị, lô đối chứng và lô chứng lần lượt là 0,37 (ng/ml), 0,42 (ng/ml) và 0,11 (ng/ml) (giá trị này lô trị xấp xỉ lô đối chứng và gấp 3,3 lần lô chứng). Mặc dù sự chênh lệch IgA ruột ở các lô nhỏ hơn sự chênh lệch IgA máu ở các lô nhưng các sự chênh lệch này đều có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Năm 2022, tác giả Somaye M. và cộng sự đã có nghiên cứu về tổ hợp chế phẩm chứa *B. subtilis* và *B. coagulans* trên mô hình chuột nhiễm khuẩn đường ruột. Kết quả của nghiên cứu đưa ra là sau ba tuần chuột bị bệnh uống chế phẩm trên dấu hiệu bệnh đã giảm, và không những tác động của mầm bệnh trên mô bệnh học đã giảm mà quần thể vi sinh vật trong ruột còn được duy trì [38].

Kết quả của chúng tôi cũng hoàn toàn tương đồng với kết quả của nhóm David S. và cs (2022) khi các tác giả thử nghiệm chế phẩm tổ hợp chế phẩm *Bacillus* chứa *B. subtilis* và *B. coagulans* trên 2 mô hình chuột (khỏe mạnh và rối loạn tiêu hóa do kháng sinh Vancomycin) và xét nghiệm chỉ số IgA trong máu và ruột bằng kit ELISA giống với nghiên cứu của chúng tôi. Kết quả này cũng chỉ ra rằng, trong quá trình sử dụng chế phẩm probiotic các tế bào B và T

có sự di chuyển tăng chỉ số IgA dẫn đến tăng khả năng bảo vệ khỏi rối loạn VSV đường ruột do kháng sinh [36].

Như vậy, kết quả chỉ số IgA ở máu, ruột và hình ảnh mô bệnh học cho thấy, chế phẩm BaciMix có kích thích tích cực trên chỉ số miễn dịch và không gây tổn thương đường ruột.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

- Chế phẩm BaciMix chưa xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng với liều cao nhất 400x10⁹ CFU/kg/24h và chế phẩm không gây độc đường uống.

- Chế phẩm BaciMix cho chuột cống trắng theo đường uống trong 28 ngày không tác động đến sự tăng trọng của chuột thí nghiệm ở tất cả các liều nghiên cứu. Các chỉ số huyết học, hóa sinh nằm trong giới hạn cho phép, hình ảnh giải phẫu gan, thận và lách không có sự sai khác so với đối chứng

- Chế phẩm BaciMix trên chuột cống trắng theo đường uống với liều 1,68x10⁹/kgTLC /24h (ngoại suy liều trên người là 6x10⁹ CFU/50kg/24h) làm tăng lượng IgA máu và niêm mạc ruột chuột khỏe mạnh. Hình ảnh giải phẫu ruột không xuất hiện tổn thương. Chế phẩm BaciMix trên chuột cống trắng theo đường uống với liều 1,68 x10⁹ CFU/kg thể trọng chuột trên mô hình chuột bị tiêu chảy do kháng sinh làm tăng chỉ số IgA máu và niêm mạc ruột.

KIẾN NGHỊ

- Đánh giá tính an toàn khi sử dụng lâu dài trên số lượng mẫu lớn hơn, thời gian theo dõi dài hơn có thể là 60 ngày và 90 ngày;

- Đánh giá thêm hiệu quả kích thích miễn dịch khi sử dụng qua các chỉ số kháng thể miễn dịch khác của chế phẩm BaciMix trên mô hình động vật từ đó làm cơ sở cho đánh giá trên người.

PHỤ LỤC

Bảng 1. Kết quả theo dõi khối lượng cơ thể của chuột ở các lô

Lô	Khối lượng trung bình của chuột thí nghiệm					P
	(XFĐ)	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 13	
ĐC	17,5±0,84	18,00±0,94	19,30±1,49	20,50±1,58	23,30±2,31	>0,05
1	18,00±1,05	18,20±1,03	20,00±1,33	21,30±1,25	24,40±2,17	>0,05
2	18,00±1,43	18,40±1,43	21,10±1,73	21,40±1,84	23,80±2,39	>0,05
3	18,10±0,99	18,30±0,95	20,10±1,37	21,56±1,27	24,10±1,97	

Bảng 2. Kết quả tỷ lệ % tăng cân nặng chuột nhắt trắng ở các lô

Lô	Liều	XFĐ	Khối lượng trung bình của chuột thí nghiệm				P
			Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 13	
ĐC	0	100	2,86	10,29	17,14	33,14	>0,05
1	100x10 ⁹	100	1,11	11,11	18,33	35,56	>0,05
2	200x10 ⁹	100	2,22	11,67	18,89	32,22	>0,05
3	400x10 ⁹	100	1,10	11,05	18,78	33,15	>0,05

Bảng 3. Trọng lượng của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P1-2,2-3,3-1
		Chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Cân nặng (g)	XFĐ (a)	157,90 ± 26,53	155,7±13,97	153±17,25	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	198,60 ± 15,41	199,9±13,24	195,0±16,97	
	Sau 04 tuần (c)	214,00 ± 13,26	212,70± 16,34	203,9 ± 17,83	
Pa-b,b-c,c-a		<0,05	<0,05	<0,05	

Bảng 4. Số lượng hồng cầu của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P _{1-2,2-3,3-1}
		Chứng (1)	Lô trị 1 (1,68 x10 ⁹ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 (8,4 x10 ⁹ CFU/kg) (3)	
Hồng Cầu (T/L)	XFD (a)	8,32 ± 0,38	8,50±0,40	8,32±0,60	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	7,24 ± 0,37	7,28±0,49	7,51±0,30	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	8,32 ± 0,47	8,11± 0,48	8,17 ± 0,57	>0,05
P _{a-b,b-c,c-a}		P _{a-b,b-c} <0,05 P _{a-c} >0,05	P _{a-b,b-c} <0,05 P _{a-c} >0,05	P _{a-b,b-c} <0,05 P _{a-c} >0,05	

Bảng 5. Lượng huyết sắc tố của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P _{1-2,2-3,3-1}
		Chứng (1)	Lô trị 1 (1,68 x10 ⁹ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 (8,4 x10 ⁹ CFU/kg) (3)	
HGB (G/dL)	XFD (a)	15,68 ± 0,97	15,74±0,93	15,65±1,14	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	13,6 ± 0,87	13,72±0,82	14,05±0,55	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	15,01 ± 0,83	14,56 ± 0,77	15,59 ± 0,88	>0,05
Pa-b,b-c,c-a		Pa-b,b-c<0,05 Pa-c>0,05	Pa-b,b-c<0,05 Pa-c<0,05	Pa-b<0,05 Pb-c,a-c>0,05	

Bảng 6. Số lượng bạch cầu của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			$P_{1-2,2-3,3-1}$
		Chứng (1)	Lô trị 1 ($1,68 \times 10^9$ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 ($8,4 \times 10^9$ CFU/kg) (3)	
Bạch cầu (G/L)	XFD (a)	10,39 \pm 2,45	11,66 \pm 2,47	10,3 \pm 2,57	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	8,59 \pm 2,04	10,18 \pm 3,2	8,95 \pm 1,79	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	8,05 \pm 1,81	6,87 \pm 1,27	6,72 \pm 0,96	>0,05
$P_{a-b,b-c,c-a}$		$P_{a-c} < 0,05$ $P_{b-c,a-b} > 0,05$	$P_{a-c,b-c} < 0,05$ $P_{a-b} > 0,05$	$P_{a-c,b-c} < 0,05$ $P_{a-b} > 0,05$	

Bảng 7. Số lượng tiểu cầu của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Nhóm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			$P_{1-2,2-3,3-1}$
		Chứng (1)	Lô trị 1 ($1,68 \times 10^9$ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 ($8,4 \times 10^9$ CFU/kg) (3)	
Tiểu cầu (G/L)	XFD (a)	403,6 \pm 79,19	438,2 \pm 158,79	456,9 \pm 161,16	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	538,5 \pm 125,76	538,9 \pm 93,99	574,2 \pm 95,78	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	528,3 \pm 114,10	490,7 \pm 124,27	524 \pm 75,49	>0,05
$P_{a-b,b-c,c-a}$		$P_{a-b,a-c} < 0,05$ $P_{b-c} > 0,05$	$P_{a-b} < 0,05$ $P_{b-c,a-c} > 0,05$	$P_{a-b} < 0,05$ $P_{b-c,a-c} > 0,05$	

Bảng 8. Hoạt độ AST của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Nhóm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P _{1-2,2-3,3-1}
		Chứng (1)	Lô trị 1 ($1,68 \times 10^9$ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 ($8,4 \times 10^9$ CFU/kg) (3)	
AST (U/l)	XFD (a)	115,00 ± 48,85	108,07±20,26	102,14±18,33	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	122,61 ± 31,72	123,56±22,16	113,09±18,93	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	108,31 ± 25,45	120,21 ± 20,49	108,09 ± 23,9	>0,05
P _{a-b,b-c,c-a}		>0,05	>0,05	>0,05	

Bảng 9. Hoạt độ ALT của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Nhóm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P _{1-2,2-3,3-1}
		Chứng (1)	Lô trị 1 ($1,68 \times 10^9$ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 ($8,4 \times 10^9$ CFU/kg) (3)	
ALT (U/l)	XFD (a)	31,94 ± 9,67	33,41±14,43	37,19±7,8 4	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	70,47 ± 13,12	66,49±17,94	67,37±12, 20	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	52,06 ± 25,90	67,93 ± 16,04	53,86 ± 10,63	>0,05
P _{a-b,b-c,c-a}		P _{a-b,a-c} <0,05 P _{b-c} >0,05	P _{a-b,a-c} <0,05 P _{b-c} >0,05	P _{a-b,a-c} <0,05 P _{b-c} <0,05	

Bảng 10. Nồng độ Bilirubin của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Nhóm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P _{1-2,2-3,3-1}
		Chứng (1)	Lô trị 1 (1,68 x10 ⁹ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 (8,4 x10 ⁹ CFU/kg) (3)	
Bilirubin (umol/L)	XFD (a)	2,52 ± 1,30	3,32±1,46	3,79±1,61	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	3,82 ± 0,57	3,38±0,72	3,52±0,55	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	2,75 ± 0,67	2,81 ± 0,37	2,95 ± 0,36	>0,05
P _{a-b,b-c,c-a}		P _{a-c,b-c} <0,05 P _{a-b} >0,05	P _{b-c} <0,05 P _{a-c,a-b} >0,05	P _{b-c} <0,05 P _{a-b, a-c} >0,05	

Bảng 11. Nồng độ cholesterol của chuột cống trắng

Chỉ tiêu nghiên cứu	Thời điểm Xét nghiệm	Nhóm nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P _{1- 2,2- 3,3-1}
		Chứng (1)	Lô trị 1 (1,68 x10 ⁹ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 (8,4 x10 ⁹ CFU/kg) (3)	
Cholester ol (mmol/L)	XFD (a)	1,44 ± 0,13	1,54±0,33	1,49±0,33	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	1,31 ± 0,18	1,32±0,26	1,28±0,24	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	1,61 ± 0,35	1,44 ± 0,26	1,53 ± 0,16	>0,05
Pa-b,b-c,c-a		Pa-b,b- c<0,05 Pa-c>0,05	Pa-b<0,05 Pa-c,b- c>0,05	Pb-c<0,05 Pa-b, a- c>0,05	

Bảng 12. Nồng độ creatinin của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Thời điểm	Lô ($\bar{X} \pm SD$), n = 10			P _{1-2,2-3,3-1}
		Chứng (1)	Lô trị 1 (1,68 x10 ⁹ CFU/kg) (2)	Lô trị 2 (8,4 x10 ⁹ CFU/kg) (3)	
Creatinin ($\mu\text{mol/L}$)	XFD (a)	42,31 \pm 2,93	40,81 \pm 3,55	41,78 \pm 10,6 2	>0,05
	Sau 02 tuần (b)	44,62 \pm 4,5	46,74 \pm 5,37	44,25 \pm 4,80	>0,05
	Sau 04 tuần (c)	69,86 \pm 6,20	68,65 \pm 5,48	64,82 \pm 4,53	>0,05
P _{a-b,b-c,c-a}		P _{a-c,b-c} <0,05 P _{b-a} >0,05	P _{a-c,b-c} <0,05 P _{b-a} <0,05	P _{a-c,b-c} <0,05 P _{b-a} >0,05	

Bảng 13. Kết quả định lượng IgA của chuột cống trắng

Chỉ tiêu	Lô ($\bar{X} \pm SD$), n = 8			P _{1-2,2-3,3-1}
	Chứng (1)	Lô trị (2)	Lô đối chứng (3)	
IgA máu ng/ml	3,02 \pm 0,18	6,67 \pm 0,61	6,43 \pm 1,11	P _{1-2, 1-3} <0,05 P ₂₋₃ >0,05
IgA ruột ng/ml	0,11 \pm 0,01	0,37 \pm 0,034	0,42 \pm 0,05	P _{1-2, 1-3} <0,05 P ₂₋₃ <0,05

Bảng 14. Kết quả định lượng IgA của chuột cống trắng bị tiêu chảy

Chỉ tiêu	Lô ($\bar{X} \pm SD$), n = 8				P
	Chứng (1)	Chứng Kháng sinh (2)	Lô trị (3)	Lô đối chứng (4)	
IgA máu ng/ml	2,6±0,38	1,77±0,32	4,96±1,05	3,91±1,6	$P_{3-2,3-1} < 0,05$ $P_{3-4} > 0,05$
IgA ruột ng/ml	0,26±0,016	0,09±0,008	0,33±0,018	0,36±0,024	$P_{3-2,3-1} < 0,05$ $P_{3-4} < 0,05$

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. FAO/WHO, 2001, *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.*
2. Dimitris Charalampopoulos, Robert A. Rastall (2009) *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, Springer, New York, NY
3. Bộ Y Tế, 2017, *Dược điển Việt Nam 5*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
4. Abdhul K., et al, 2015, Bacteriocinogenic potential of a probiotic strain *Bacillus coagulans* [BDU3] from Ngari, *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 800–806.
5. Ash, C., et al, 1991, Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of smallsubunit-ribosomal RNA sequences, *Letters in Applied Microbiology*, (13), 202–206
6. Orrù, L., et al, 2014, Draft genome sequence of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086, a widely used spore-forming probiotic strain, *Genome Announc*, 2.
7. Nithya, V., Halami, P., 2013, Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources, *Ann. Microbiol.*, 63, 129–137.
8. Keitarou K., Satoshi Y., 2019, Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods, *Curr Opin Biotechnol.*, (56), 36-42.
9. Konuray G., Erginkaya Z., 2018, Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry, *Food*, 7(6), 92.
10. Maity C., et al, 2020, Impact of a gastrointestinal stable probiotic supplement *Bacillus coagulans* LBSC on human gut microbiome modulation, *J Diet Supp.*, 18(6), 577-596.

11. Alessia L., Yifan Z., Vera H., et al, 2021, Isolation, stability, and characteristics of high-pressure superdormant *Bacillus subtilis* spores, *International Journal of Food Microbiology*, 343.
12. Lliya D. K., Olayinka A. A., et al, 2021, Multi-strain probiotics: Synergy among isolates enhances biological activities, *Biology*, 10(4), 322.
13. Marzorati M., Pieter V. A., et al., 2021, *Bacillus subtilis* HU58 and *Bacillus coagulans* SC208 Probiotics Reduced the Effects of Antibiotic-Induced Gut Microbiome Dysbiosis in an M-SHIME® Model, *Microorganisms*, 8(7), 1028.
14. Somaye M., Seyed S., Sara B., 2019, The effects of supplementation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* spores on the intestinal microflora and growth performance in rat, *Iran J Microbiol*, 11(3), 260–266. BBT (2012), About Animal Testing, *The Humane Society of The United States*.
15. <https://speakingofresearch.com/facts/statistics/>
16. Bộ Y tế, 371/BYT-QĐ, 1996, *Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc cổ truyền*
17. Đỗ Trung Đàm, 2014, *Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp của thuốc, Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
18. OECD, 2008, *Test No.425: Acute Oral Toxicity: UP- and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects*
19. Yadav, R., et al., 2017, An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57, 3233–3242.
20. Czerucka. D., Rampal. P., 2002, Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens, *Microbes and infection*, 4, 733-739.

21. Bjorn Westrom, 2020, The immature gut barrier and its importance in establishing immunity in newborn mammals, *Front. Immunol.*
22. Wróblewska B., et al, 2011 A. Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 215–227.
23. De Wolfe, T. J., Eggers, S., Barker, A. K., Kates, A. E., Dill-McFarland, K. A., Suen, G., & Safdar, N. (2018). Oral probiotic combination of lactobacillus and bifidobacterium alters the gastrointestinal microbiota during antibiotic treatment for clostridium difficile infection. *PLoS ONE*, 13(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204253>
24. Siegfried Hapfelmeier, et al, 2016, Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses, *Science*, 328 (5986), 1705-1709.
25. Quinto E. J., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J., 2014, Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review, *Food and Nutrition Sciences*, 5 (18), 1765-1775.
26. Fumiko Nagao, Maafumi Nakayama, T. M., K. O., 2000. Effects of a Fermented Milk Drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on Immune system in healthy human subjects, *Biosi. Biotechnol. Biochem*, 64 (12), 2706–2708.
27. Chen, C. Y., Tsen, H. Y., Lin, C. L., Lin, C. K., Chuang, L. T., Chen, C. S., Chiang, Y. C., 2013. Enhancement of the immune response against Salmonella infection of mice by heat-killed multispecies combinations of lactic acid bacteria, *Journal of Medical Microbiology*, 62(11), 1657–1664.
28. Ganjbakhsh, S. E., 2017, The Effect of Probiotics on Immune System, *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 5(4), 319–320.

29. Litman GW, et al, 1993, Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire, *Molecular Biology and Evolution*, 10(1), 60–72.
30. Nguyễn Văn Đô, 2017, *Kháng thể - Cấu trúc và chức năng*, *Miễn dịch học*, Đại học Y Hà Nội, 4.
31. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Janis Kuby, Barbara A. Osborne, 2002, *Immunology*, 5.
32. Woof J.M., Kerr MA, (2006), The function of immunoglobulin A in immunity, *J Pathol*, 208, 270 – 282.
33. Phạm Mạnh Hùng, 2011, *Miễn dịch học*, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, Hà Nội, 102-125.
34. Schroeder HW, et al, 2010, Structure and Function of Immunoglobulins, *J Allergy Clin Immunol*, 125(202), 41-52.
35. Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians, Johnson-Delaney, C., 1996, Zoological Education Network.
36. David S., et al, (2022), Targeting the Gut Microbiota and Host Immunity with a *Bacilli*-Species Probiotic during Antibiotic Exposure in Mice, *Microorganisms*, 10(6), 1178.
37. Adrian C., et al, 2020, Probiotic *Bacillus* spores together with amino acids and immunoglobulins exert protective effects on a rat model of ulcerative colitis, *Nutrients*, 12, 3607.
38. Somaye M., et al, 2022, Protective effects of oral administration of mixed probiotic spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* on gut microbiota changes and intestinal and liver damage of rats infected with *Salmonella Typhimurium*, *Journal of Food Safety*, 12981.