

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Nguyễn Thị Thơm**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG PHÂN  
TRẺ EM 6-24 THÁNG TUỔI KHÔNG BỊ TIÊU CHẢY**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

*Hà Nội - 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Nguyễn Thị Thơm**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG PHÂN  
TRẺ EM 6-24 THÁNG TUỔI KHÔNG BỊ TIÊU CHẢY**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 84 20 114**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

**PGS. TS Đỗ Thị Huyền**

**Hà Nội - 2024**

## 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 dưới sự hướng dẫn của PGS. TS Đỗ Thị Huyền. 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 chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

**Tác giả luận văn**



**Nguyễn Thị Thơm**

## LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất để bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS Đỗ Thị Huyền - người Cô đã tận tình, chu đáo hướng dẫn, chỉ bảo tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, khoa Công nghệ sinh học, phòng Đào tạo, các phòng chức năng và quý thầy cô giáo bộ môn đã nhiệt tình giảng dạy, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới tập thể cán bộ **Phòng Kỹ thuật di truyền - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Khoa Tiêu hóa, Khoa Sinh học phân tử và các bệnh truyền nhiễm - Bệnh viện Nhi Trung Ương** đã giúp đỡ, hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện các nội dung nghiên cứu của đề tài. Luận văn được thực hiện dưới sự tài trợ kinh phí của Đề tài ĐTDLCN.63/22 do PGS. TS Đỗ Thị Huyền chủ nhiệm. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn tới sự giúp đỡ quý báu đó.

Tôi cũng xin cảm ơn toàn thể các đồng chí trong Ban giám đốc, lãnh đạo và tập thể đồng nghiệp Trung tâm Huyết học - Truyền máu, Bệnh viện 19-8 đã giúp đỡ và tạo điều kiện hỗ trợ tôi rất nhiều trong quá trình thực hiện luận văn.

Cuối cùng, tôi vô cùng cảm ơn sự quan tâm và ủng hộ của gia đình và bạn bè. Đó chính là nguồn động viên tinh thần rất lớn để tôi hoàn thành luận văn này.

Dù đã rất cố gắng, tuy nhiên khả năng và kiến thức của tôi còn hạn chế nên bài luận văn không tránh khỏi những thiếu sót. Tôi rất mong nhận được những đóng góp ý kiến của quý thầy cô và toàn thể các bạn để luận văn được hoàn thiện hơn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

*Hà Nội, ngày 11 tháng 11 năm 2024*

**Tác giả luận văn**

  
**Nguyễn Thị Thơm**

## MỤC LỤC

<b>LỜI CAM ĐOAN</b> .....	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN</b> .....	<b>ii</b>
<b>MỤC LỤC</b> .....	<b>iii</b>
<b>DANH MỤC VIẾT TẮT</b> .....	<b>v</b>
<b>DANH MỤC BẢNG</b> .....	<b>vii</b>
<b>DANH MỤC HÌNH</b> .....	<b>viii</b>
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>4</b>
1.1. VAI TRÒ CỦA VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT Ở TRẺ KHỎE MẠNH .....	4
1.1.1. Vai trò trong chuyển hóa các chất dinh dưỡng.....	4
1.1.2. Bảo vệ và điều hòa hệ miễn dịch đường ruột.....	5
1.1.3. Điều hòa nhu động ruột .....	6
1.2. ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG MẪU PHÂN .....	7
1.3. THỰC TRẠNG TIÊU CHẢY Ở TRẺ EM 6-24 THÁNG TUỔI TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM, NGUYÊN NHÂN GÂY TIÊU CHẢY .....	13
1.3.1. Tình hình bệnh tiêu chảy .....	13
1.3.2. Tác nhân gây tiêu chảy .....	14
1.3.3. Xét nghiệm tác nhân gây tiêu chảy.....	15
1.3.4. Điều trị mất cân bằng hệ vi sinh đường ruột.....	17
<b>Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>19</b>
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	19
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	19
2.1.2. Hóa chất và thiết bị máy móc .....	19
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	19
2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu.....	19
2.2.2. Phương pháp xác định 24 tác nhân gây tiêu chảy thông thường bằng realtime-PCR.....	20
2.2.3. Phương pháp tách chiết thu hồi vi khuẩn từ mẫu phân.....	21
2.2.4. Tách DNA đa hệ gen vi khuẩn.....	21
2.2.5. Điện di DNA trên gel agarose.....	23

2.2.6. Phương pháp PCR khuếch đại vùng gen V3, V6-V8 rDNA và gen 16S rRNA từ đa hệ gen vi khuẩn.....	23
2.2.7. Phân tích vùng gen V3, V6-V8 bằng DGGE và đánh giá độ đa dạng của vi khuẩn dựa trên vùng V3, V6-V8.....	25
2.2.8. Giải trình tự DNA đa hệ gen và đánh giá đa dạng vi sinh ở hai nhóm tuổi .....	26
2.2.9. Phương pháp thống kê, xử lý số liệu .....	26
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>27</b>
3.1. ĐÁNH GIÁ TÌNH TRẠNG MANG TRÙNG GÂY TIÊU CHẢY THÔNG THƯỜNG TRONG MẪU PHÂN Ở TRẺ KHỎE MẠNH 6-24 THÁNG TUỔI .....	27
3.1.1. Phát hiện vi khuẩn gây tiêu chảy thông thường bằng realtime-PCR.....	27
3.1.2. Đánh giá tình trạng mang trùng ẩn ở trẻ khỏe mạnh.....	28
3.2. ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG MẪU PHÂN CỦA TRẺ KHỎE MẠNH ÂM TÍNH VỚI CÁC TÁC NHÂN GÂY TIÊU CHẢY THÔNG THƯỜNG .....	31
3.2.1. Tách chiết DNA đa hệ gen vi khuẩn trong phân .....	31
3.2.2. Đa dạng phổ vi khuẩn trong các mẫu phân dựa vào phân tích DGGE vùng gen V3, V6-V8 .....	38
3.2.3. Đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh không bị tiêu chảy .....	44
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>53</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ .....</b>	<b>54</b>
<b>DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>55</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>69</b>

## DANH MỤC VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
<b>AMP</b>	Antimicrobial peptide	Peptit kháng khuẩn
<b>APRIL</b>	A proliferation-inducing ligand	Một phối tử gây tăng sinh
<b>CDI</b>	<i>Clostridium difficile</i> infection	Nhiễm trùng <i>Clostridium difficile</i>
<b>DGGE</b>	Denaturing gradient gel electrophoreis	Điện di trên gel có gradient chất biến tính
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>	
<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>	<i>Escherichia coli</i> antigen somatic157:Antigen flagellar 7	<i>E. coli</i> kháng nguyên O157:H7
<b>EAEC</b>	Enteraggregative <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> kết dính đường ruột gây tiêu chảy kéo dài
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid	
<b>EHEC</b>	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> gây xuất huyết đường ruột
<b>EIEC</b>	Enteroinvasive <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> xâm lấn đường ruột gây tiêu chảy và viêm
<b>EPEC</b>	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> gây bệnh đường ruột ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ
<b>ETEC</b>	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> sinh độc tố ruột gây tiêu chảy cấp
<b>FMT</b>	Fecal microbiota transplantation	Cấy ghép vi khuẩn đường ruột
<b>FOS</b>	Fructo-oligosaccharide	1 loại prebiotic được cấu tạo từ các chuỗi fructose ngắn
<b>GBS</b>	Group B <i>Streptococcus</i>	Liên cầu khuẩn nhóm B
<b>HMO</b>	Human milk oligosaccharide	Các oligosaccharide trong sữa mẹ

<b>Tên viết tắt</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
<b>IBD</b>	Inflammatory bowel disease	Bệnh viêm ruột mạn tính
<b>IgA</b>	Immunoglobulin A	Kháng thể IgA
<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG</b>	GG: Gorbach-Goldin	Chủng <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG được phát hiện bởi 2 nhà khoa học: Tiến sỹ Gorbach và tiến sỹ Goldin
<b>OD</b>	Optical density	Mật độ quang học
<b>OTU</b>	Operational taxonomic unit	Đơn vị phân loại hoạt động
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline	Dung dịch muối đệm photphat
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
<b>RFLP</b>	Restriction fragment length polymorphism	Đa hình chiều dài đoạn giới hạn
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
<b><i>Salmonella spp.</i></b>	<i>Salmonella species</i>	Các loài thuộc chi <i>Salmonella</i>
<b>SFCA</b>	Short-chain fatty acid	Axit béo chuỗi ngắn
<b>sIgA</b>	Secretory immunoglobulin A	Kháng thể IgA tiết
<b><i>spp</i></b>	<i>Species</i>	Loài
<b>STEC</b>	Shiga-like toxin-producing <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> sản sinh độc tố Shiga gây viêm ruột, tiêu chảy ra máu
<b>TAE</b>	Tris acetate ethylene diamine tetraacetic acid	Dung dịch đệm TAE
<b>TcdA</b>	Exotoxin A	Ngoại độc tố A
<b>TcdB</b>	Exotoxin B	Ngoại độc tố B
<b>TE</b>	Tris ethylene diamine tetraacetic acid	Dung dịch đệm TE
<b>Th1</b>	T help 1	Tế bào lympho T trợ giúp 1
<b>TLR</b>	Toll-Like Receptor	Thụ thể Toll



## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 2.1.</b> Chương trình PCR khuếch đại gen 16S rRNA, vùng V3, V6-V8 của gen 16S rRNA từ DNA hệ gen vi khuẩn .....	24
<b>Bảng 2.2.</b> Danh sách môi dùng để khuếch đại gen 16S rDNA, các vùng gen V3, V6-V8 .....	24
<b>Bảng 2.3.</b> Các chỉ số đa dạng và công thức tính dùng để đánh giá kết quả băng điện di sau DGGE .....	25
<b>Bảng 3.1.</b> Danh sách 21 mẫu dương tính với vi sinh gây tiêu chảy thông thường được xét nghiệm bằng phương pháp realtime-PCR.....	27
<b>Bảng 3.2.</b> Chỉ số đa dạng vi khuẩn của các mẫu dựa trên phân tích vùng V3, V6-V8 gen 16S rRNA.....	40
<b>Bảng 3.3.</b> Tổng quát bộ dữ liệu giải trình tự metagenome vi khuẩn trong phân của nhóm trẻ khỏe mạnh có độ tuổi 6-24 tháng tuổi .....	44
<b>Bảng 3.4.</b> Đa dạng vi sinh vật trong phân của nhóm trẻ khỏe mạnh có độ tuổi 6-24 tháng tuổi .....	45

## DANH MỤC HÌNH

<b>Hình 3.1.</b> (A) Tỷ lệ mẫu xét nghiệm âm tính và dương tính; (B) Tỷ lệ % tác nhân gây bệnh trong 21 mẫu dương tính.....	28
<b>Hình 3.2.</b> Chỉ số chu kỳ ngưỡng của 1 số tác nhân gây bệnh trong các mẫu xét nghiệm dương tính.....	30
<b>Hình 3.3.</b> Biểu đồ hàm lượng tương đối của vi khuẩn trong 1 gam phân của 30 mẫu phân âm tính với các tác nhân gây tiêu chảy thông thường.....	32
<b>Hình 3.4.</b> Biểu đồ so sánh lượng vi khuẩn trong mẫu phân của các nhóm tuổi khác nhau (A) và nhóm giới tính khác nhau (B).....	33
<b>Hình 3.5.</b> Điện di đồ phân tích DNA metagenome sau khi tách chiết bằng phương pháp phenol-chloroform từ vi khuẩn trong 30 mẫu phân (âm tính). 34	
<b>Hình 3.6.</b> Điện di đồ phân tích gen 16S rRNA được khuếch đại từ DNA đa hệ gen của vi khuẩn tách bằng phương pháp phenol-chloroform từ 30 mẫu phân (âm tính)......	35
<b>Hình 3.7.</b> Điện di đồ phân tích DNA metagenome sau khi tách chiết bằng kit GeneJET từ vi khuẩn trong 30 mẫu phân (âm tính). .....	36
<b>Hình 3.8.</b> Điện di đồ phân tích gen 16S rRNA được khuếch đại từ DNA đa hệ gen của vi khuẩn tách bằng kit GeneJET từ 30 mẫu phân (âm tính). .....	37
<b>Hình 3.9.</b> Điện di đồ phân tích sản phẩm khuếch đại gen V3 (A), V6-V8 (B) trên gel agarose 0,8%. .....	38
<b>Hình 3.10.</b> Điện di đồ DGGE phân tích vùng gen V3 (A), V6-V8 (B) trên gel polyacrylamide 8%.....	39
<b>Hình 3.11.</b> So sánh chỉ số đa dạng của vùng gen V3, V6-V8.....	41
<b>Hình 3.12.</b> So sánh chỉ số đa dạng của vùng gen V3, V6-V8 ở hai nhóm tuổi 6-12 tháng và 13-24 tháng. ....	43
<b>Hình 3.13.</b> Đa dạng ngành vi khuẩn trong phân của trẻ khỏe mạnh 6-24 tháng tuổi.....	46
<b>Hình 3.14.</b> Đa dạng chi vi khuẩn trong phân của trẻ khỏe mạnh 6-24 tháng tuổi.....	48
<b>Hình 3.15.</b> Tỷ lệ của các chi vi khuẩn có sự biến động mạnh trong đường ruột của nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi (HMG1) và 13-24 tháng tuổi (HMG2).....	50

## MỞ ĐẦU

### ❖ Lý do chọn đề tài

Hệ tiêu hóa là nơi có đa dạng vi sinh vật nhất trong cơ thể con người bao gồm vi khuẩn, virus, nấm, ký sinh trùng. Ở người khỏe mạnh, trong đường ruột ước tính có khoảng  $10^{13}$ - $10^{14}$  vi khuẩn. Số lượng và thành phần của vi khuẩn tăng dần từ đầu đến cuối hệ tiêu hóa, bị chi phối bởi các yếu tố như: acid dạ dày, các chất dinh dưỡng, oxy và peptid kháng khuẩn [1]. Quá trình tiêu hóa thức ăn, hệ vi khuẩn trong đường ruột đóng nhiều vai trò quan trọng như tổng hợp vitamin, loại bỏ chất độc, mầm bệnh khỏi hệ tiêu hóa và kích thích cũng như điều hòa hệ thống miễn dịch, hệ trục não ruột... giúp cơ thể được khỏe mạnh [2]. Do vậy, hệ gen của vi khuẩn đường ruột được xem như hệ gen thứ 2 của người.

Ở trẻ em, thời điểm xuất hiện vi khuẩn trong đường ruột là sau khi trẻ ra đời. Giai đoạn sơ sinh, hệ tiêu hóa ban đầu chứa những loại vi khuẩn hiếu khí như *Enterobacter*, *Staphylococcus* và *Streptococcus*, tiếp theo đến *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* và các loại vi khuẩn kỵ khí khác [3]. Sau sinh, trẻ em được bổ sung hệ vi sinh đường ruột nhờ nguồn sữa mẹ, với các nhóm vi khuẩn như *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bifidobacterium*... Chế độ ăn dặm từ 6 tháng tuổi khiến đường ruột của trẻ được bổ sung thêm nhiều loại vi khuẩn mới, phát triển và đạt đến trạng thái ổn định giống với người trưởng thành khi trẻ 3 tuổi. Do vậy, hệ vi sinh trong đường ruột của trẻ dưới 3 tuổi có cấu trúc khác với trẻ trên 3 tuổi. Đồng thời, lứa tuổi 6 tháng đến 3 tuổi này thường dễ bị mắc các loại bệnh trong đó có tiêu chảy, do đường ruột có cấu trúc hệ vi khuẩn chưa được phát triển, ổn định, bền vững.

Hệ vi khuẩn trong đường ruột của trẻ bị tổn thương nghiêm trọng khi trẻ bị nhiễm khuẩn, nhiễm virus đặc biệt là nhiễm cúm, SARS-Cov2 và điển hình là nhiễm khuẩn đường ruột. Tiêu chảy làm mất cân bằng cấu trúc hệ vi khuẩn đường ruột và làm suy giảm chức năng của hệ tiêu hóa, dẫn đến cơ thể hấp thụ dinh dưỡng kém, làm chậm hồi phục, gây suy dinh dưỡng [4], [5], [6]. Ở nước ta, tiêu chảy (bao gồm tiêu chảy tiên phát hay thứ phát) là một trong 10 bệnh phổ biến nhất, xếp thứ 4 về tỷ lệ gây tử vong. Bệnh hay gặp nhiều ở trẻ em, đặc biệt ở trẻ dưới 2 tuổi (chiếm 71,0%) và trẻ dưới 1 tuổi (chiếm

40,9%) [7]. Tiêu chảy kéo dài ở trẻ thường diễn tiến từ tiêu chảy cấp, chiếm khoảng 3-20% tùy theo mùa, nơi sinh sống và đặc điểm dịch tễ [8]. Tiêu chảy làm ảnh hưởng nghiêm trọng tới: (1) sự tiết các enzyme tiêu hóa của tế bào nhung mao đường ruột dẫn tới tiêu hóa kém; (2) giảm sự hình thành lớp màng nhày bảo vệ đường ruột; (3) giảm chức năng hấp thụ chất của tế bào ruột; (4) mất cân bằng cấu trúc ổn định của hệ vi khuẩn trong đường ruột dẫn tới giảm các vi khuẩn có lợi, đồng thời làm tăng vi khuẩn gây hại. Mặc dù, tiêu chảy kéo dài chủ yếu là do vi khuẩn nhưng có khoảng 40% trẻ bị tiêu chảy không có yếu tố dịch tễ, không tìm ra nguyên nhân [9]. Nhiều phương pháp được áp dụng trong điều trị tiêu chảy không xác định được căn nguyên, trong đó việc sử dụng các probiotics giúp cân bằng lại hệ vi khuẩn đường ruột là liệu pháp quan trọng. Nhiều trường hợp, vi khuẩn ở người khỏe được cấy ghép cho người bệnh là cần thiết để hồi phục tổn thương đường ruột [10], [11]. Bên cạnh trẻ bị nhiễm khuẩn và tiêu chảy thì trẻ khỏe mạnh, không tiêu chảy vẫn có nguy cơ mang trùng ẩn, không có biểu hiện bệnh. Tình trạng mang trùng ẩn cũng làm cho hệ vi khuẩn đường ruột có cấu trúc bị thay đổi. Hiện nay, ở Việt Nam, đa dạng vi khuẩn, cấu trúc của hệ vi khuẩn ở trong phân của trẻ khỏe mạnh dưới 2 tuổi chưa được nghiên cứu. Do vậy, việc nghiên cứu đa dạng, cấu trúc vi khuẩn ở nhóm trẻ khỏe mạnh là cần thiết và có ý nghĩa, để tìm ra nguyên nhân của trẻ tiêu chảy chưa rõ nguyên nhân, đồng thời gợi ý các nhà khoa học nghiên cứu tạo bộ vi khuẩn có lợi cho hỗ trợ điều trị bệnh tiêu chảy nói riêng và làm tăng sức đề kháng, miễn dịch cho trẻ dưới 2 tuổi để trẻ được phát triển khỏe mạnh cả về tinh thần, trí tuệ và thể chất.

#### ❖ Mục đích nghiên cứu

- Nghiên cứu, đánh giá được tình trạng mang vi khuẩn, virus, ký sinh trùng gây tiêu chảy thông thường trong mẫu phân ở trẻ 6-24 tháng tuổi khỏe mạnh, không bị tiêu chảy;
- Nghiên cứu, đánh giá được đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh, âm tính với các tác nhân gây tiêu chảy thông thường.

#### ❖ Nội dung nghiên cứu

- ✓ *Nghiên cứu đánh giá tình trạng mang trùng gây tiêu chảy thông thường trong mẫu phân ở trẻ 6-24 tháng tuổi không bị tiêu chảy*

- Nghiên cứu xét nghiệm vi khuẩn gây tiêu chảy thông thường bằng realtime-PCR;
- Nghiên cứu tình trạng mang trùng gây tiêu chảy thông thường trong các mẫu phân.
- ✓ *Nghiên cứu đánh giá đa dạng vi khuẩn trong các mẫu phân âm tính với các tác nhân gây tiêu chảy thông thường*
  - Nghiên cứu tách chiết DNA đa hệ gen vi khuẩn trong mẫu phân;
  - Nghiên cứu đa dạng phổ vi khuẩn trong mẫu phân dựa vào phân tích đa hình vùng V3, V6-V8 gen 16S rDNA của vi khuẩn bằng PCR-DGGE;
  - Nghiên cứu giải trình tự metagenome của vi khuẩn trong phân, đánh giá đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh không bị tiêu chảy.

#### ❖ **Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài**

Hệ vi khuẩn đường ruột có vai trò quan trọng về sức khỏe tâm thần, thể chất ở trẻ và ảnh hưởng lớn tới sức khỏe khi trẻ trưởng thành. Với sự phát triển của các kỹ thuật sinh học phân tử, giải trình tự gen thế hệ mới và các công cụ tin sinh học, việc nghiên cứu đa dạng vi sinh vật trong hệ tiêu hóa trở nên dễ dàng hơn. Hệ vi sinh đường ruột nhạy cảm với nhiều tác nhân gây bệnh đặc biệt là vi sinh vật gây tiêu chảy. Nhiều trẻ khỏe mạnh, không có biểu hiện bệnh nhưng có mang trùng ẩn cũng làm thay đổi hệ vi sinh. Do vậy, việc sàng lọc, lựa chọn được trẻ khỏe mạnh không mang trùng ẩn là bước đầu tiên và rất cần thiết để đưa vào nghiên cứu hệ vi sinh đường tiêu hóa của trẻ. Kết quả nghiên cứu sẽ là cơ sở giúp các nhà khoa học nghiên cứu, tìm ra sự mất cân bằng vi sinh ở những trường hợp trẻ bị bệnh không rõ nguyên nhân và để phát triển các chế phẩm vi sinh giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột ở trẻ.

#### ❖ **Những đóng góp của luận văn**

Luận văn cung cấp thông tin về tình trạng mang trùng gây tiêu chảy thông thường ở trong phân trẻ khỏe mạnh và sự đa dạng hệ vi khuẩn đường ruột của trẻ khỏe mạnh âm tính với tác nhân tiêu chảy thông thường.

## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. VAI TRÒ CỦA VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT Ở TRẺ KHỎE MẠNH

Hệ vi khuẩn trong đường ruột có vai trò vô cùng quan trọng đối với quá trình tiêu hóa thức ăn, tổng hợp vitamin, kích thích điều hòa hệ thống miễn dịch bảo vệ đường tiêu hóa, là hàng rào bảo vệ cơ thể tránh sự xâm nhập của mầm bệnh, điều khiển hệ trục não ruột, ảnh hưởng đến sức khỏe tinh thần của con người. Hệ vi khuẩn đường ruột bắt đầu được hình thành sau khi trẻ ra đời, đầu tiên là các vi khuẩn *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* và vi khuẩn kỵ khí khác [3]. Tụ cầu, liên cầu, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bifidobacterium*, ... là những vi khuẩn được bổ sung từ nguồn sữa mẹ từ sau đẻ cho đến 1 tuần tuổi. Sau khi ăn dặm, hệ vi khuẩn đường ruột của trẻ được bổ sung, phát triển và đạt tới trạng thái ổn định khi trẻ 3 tuổi. Cấu trúc hệ vi khuẩn đường ruột, chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố như phương thức sinh, chế độ ăn, địa dư, thuốc đã dùng và stress theo từng thời kỳ phát triển của con người [12]. Vi sinh trong hệ tiêu hóa quyết định trực tiếp, đóng vai trò quan trọng tới sức khỏe và hoạt động của con người. Do vậy, hệ gen của vi sinh vật đường ruột còn được ví như hệ gen thứ 2 của cơ thể con người [13].

#### 1.1.1. Vai trò trong chuyển hóa các chất dinh dưỡng

Hệ vi khuẩn đường ruột có liên quan mật thiết đến quá trình chuyển hóa của cơ thể. Các vi khuẩn yếm khí ở đại tràng như *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Roseburia* chuyển hóa carbohydrate, tổng hợp các acid béo chuỗi ngắn (SFCA) như butyrate, acetate, propionate. Butyrate cung cấp năng lượng cho biểu mô đại tràng, duy trì môi trường yếm khí, tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn (thuộc ngành Firmicutes) như *Ruminococcus*, *Erysipelothrix*, *Lachnospira*, *Clostridium* thực hiện chức năng. Propionate và acetate duy trì nội môi trong lòng ruột. Tại gan, các acid béo chuỗi ngắn này tham gia vào quá trình beta oxi hóa, tạo nguồn năng lượng cho cơ thể. Bên cạnh đó, SFCA còn có tác dụng chống viêm, tăng cường chức năng hàng rào ruột, chống lại các tác nhân gây bệnh [14].

Hệ vi khuẩn đường ruột ảnh hưởng tới sự chuyển hóa lipid, liên quan đến chuyển hóa acid mật, lipid acid mật thứ cấp. Từ cholesterol, tế bào gan sản xuất cholic acid, chenodeoxycholic acid. Sau đó, các acid mật này liên

hợp với taurine, glycine để tạo ra muối mật. Muối mật được lưu trữ trong túi mật và được giải phóng trong quá trình tiêu hóa thức ăn. Muối mật sơ cấp được vi khuẩn đường ruột khử thành muối mật thứ cấp và theo tĩnh mạch cửa được tái hấp thu tích cực ở hồi tràng về gan. Muối mật có vai trò nhũ tương hóa lipid và tạo điều kiện cho sự hấp thu lipid trong quá trình tiêu hóa thức ăn [15]. Ngoài ra, hệ vi khuẩn đường ruột còn sản xuất lipid. Vi khuẩn thuộc ngành Bacteroides tham gia tích cực vào chuyển hóa carbohydrate và các chất xơ, tạo ra các polysaccharide chuỗi ngắn và SFCA vừa có tác dụng nuôi dưỡng lợi khuẩn trong lòng ruột, cải thiện chức năng đường ruột, vừa cung cấp các chất làm tăng cường miễn dịch cho cơ thể và tăng chuyển hóa có lợi cho cơ thể. Các vi khuẩn thuộc ngành Firmicutes giúp chuyển hóa sữa và tinh bột hiệu quả, làm tăng khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng.

Với nhóm vitamin và khoáng chất, việc cung cấp vitamin phụ thuộc vào chế độ ăn uống và vi khuẩn đường ruột. Hệ vi khuẩn đường ruột tổng hợp một số vitamin quan trọng như vitamin B, K, hormone, cung cấp một số axit amin thiết yếu mà cơ thể con người không tự tổng hợp được... Theo một nghiên cứu năm 2015 của Thiele và cộng sự, nhóm nghiên cứu đã phân tích đa hệ gen vi sinh vật, đánh giá khả năng tổng hợp 8 loại vitamin nhóm B (biotin-vitamin B7, cobalamin-vitamin B12, niacin-vitamin B3, axit folic-vitamin B9, pantothenat-vitamin B5, ribofavin-vitamin B2, pyridoxine-vitamin B6, thiamin-vitamin B1) của 256 vi khuẩn. Kết quả phân tích cho thấy có khoảng 40-65% vi khuẩn có khả năng tổng hợp vitamin B trong số 256 vi khuẩn cộng sinh ở người [16]. Vitamin D cũng điều chỉnh cấu trúc hệ vi khuẩn đường ruột. Thiếu hụt vitamin D cũng có thể gây ra bệnh viêm ruột. Việc bổ sung vitamin D dẫn đến thay đổi về số lượng vi khuẩn thuộc ngành Firmicutes, Actinobacteria và Bacteroidetes. Một số loài coccobalmon có thể điều chỉnh thụ thể vitamin D, ví dụ *Lactobacillus rhamnosus* và *L. plantarum* làm tăng thụ thể vitamin D và bảo vệ chống lại viêm đại tràng theo cách phụ thuộc vào tín hiệu thụ thể này [17].

### **1.1.2. Bảo vệ và điều hòa hệ miễn dịch đường ruột**

Hệ miễn dịch của người và hệ vi khuẩn đường ruột có sự tương tác rõ ràng. Hệ miễn dịch đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể khỏi các tác nhân gây bệnh xâm nhập, duy trì khả năng tự dung nạp. Rối loạn vi khuẩn

đường ruột, có thể ảnh hưởng đến khả năng tự miễn dịch do thay đổi sự cân bằng giữa các thành viên dung nạp và gây viêm của hệ vi khuẩn. Những vi khuẩn có lợi sống bám trên lớp biểu mô có vai trò tham gia chủ yếu vào tiêu hóa thức ăn thành các chất dễ tiêu hóa để cơ thể sử dụng. Trong hệ miễn dịch tự nhiên cơ thể con người, chúng còn là hàng rào bảo vệ đầu tiên giúp cơ thể ngăn chặn sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh. Hệ tiêu hóa phát triển khỏe mạnh cần một hệ vi sinh vật đường ruột vừa cộng sinh với vi khuẩn có lợi nhưng vẫn ngăn chặn sự phát triển quá mức của các vi khuẩn gây bệnh. Cơ chế bảo vệ đầu tiên của niêm mạc ruột là khả năng tiết ra lớp chất nhầy hai tầng, giữ cho vi khuẩn ở lòng ruột tránh tiếp xúc với biểu mô, chủ yếu ở đại tràng.

Hệ vi sinh vật đường ruột có thể điều hòa sản xuất các globulin miễn dịch. Ở ruột non, hệ vi sinh vật đường ruột tiết ra các protein kháng khuẩn (AMP) hay còn gọi là bacteriocin như cathelicidin, lectin loại C và (pro) defensin để ức chế vi khuẩn gây bệnh. Ngoài ra, vi khuẩn còn tham gia phát triển thần kinh thông qua điều hòa trục não ruột trong giai đoạn phát triển thần kinh, kiểm soát thần kinh vận động và cảm xúc chuyển hóa thuốc, độc tố, kháng lại nhiều tác nhân gây bệnh [18].

Hệ vi khuẩn trong đường ruột đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì cân bằng miễn dịch, có vai trò vô cùng quan trọng đối với sức khỏe của con người. Những thay đổi trong hệ vi khuẩn đường ruột và các chất chuyển hóa của chúng đã được chứng minh có liên quan đến miễn dịch như các bệnh viêm ruột, bệnh tiểu đường, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh lupus ban đỏ hệ thống [19], [20], [21], [22]. Các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ hệ vi khuẩn đường ruột ảnh hưởng đến rất nhiều phản ứng của tế bào miễn dịch, bao gồm tế bào T, tế bào B, tế bào dạng sợi và đại thực bào [23]. Trong ruột *Bacteroides fragilis* đã được chứng minh là kích thích đáp ứng miễn dịch tế bào T thông qua polysaccharide [24]; *B. thetaiotaomicron* đã được nghiên cứu về tác động của nó lên quá trình trao đổi chất trong đường tiêu hóa của vật chủ [25].

### **1.1.3. Điều hòa nhu động ruột**

Nhu động ruột đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiêu hóa thức ăn, hấp thu và bài tiết của cơ thể. Hệ vi khuẩn đường ruột đóng vai trò then chốt



trong việc điều hòa nhu động ruột giúp duy trì, phát triển hệ thần kinh đường ruột nhờ khả năng sản xuất serotonin ở niêm mạc ruột và tế bào thần kinh, đồng thời làm tăng mật độ và khả năng vận động của tế bào thần kinh. Deoxycholic acid do vi khuẩn hình thành bào tử tiết ra giúp tăng cường sinh tổng hợp serotonin từ các tế bào enterochromaffin ở đại tràng, kích thích nhu động ruột. Do đó, rối loạn sinh lý đường ruột có thể gây ra hội chứng ruột kích thích, táo bón mãn tính và có liên quan đến rối loạn nhu động ruột [15].

## 1.2. ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG MẪU PHÂN

Theo ước tính, trong hệ tiêu hóa số lượng vi khuẩn là khoảng  $3,8 \times 10^{13}$  vi khuẩn nhiều hơn lượng tế bào của cơ thể ( $3,0 \times 10^{13}$ ) [26]. Phân bố vi khuẩn trong hệ tiêu hóa người trưởng thành tăng dần về số lượng và độ đa dạng của vi khuẩn. Ở dạ dày số lượng vi khuẩn khoảng  $10^3$ - $10^4$  vi khuẩn/ml, ở hồi tràng khoảng  $10^8$  vi khuẩn/ml và đại tràng khoảng  $10^{11}$  vi khuẩn/ml [27], [28]. Thành phần các loại vi khuẩn cũng tăng dần từ dạ dày, tá tràng và hồi tràng (ruột non trên), hồi tràng đến đại tràng do sự thay đổi về lượng oxi, nồng độ pH... Ngoài vi khuẩn, hệ tiêu hóa còn có cổ khuẩn, virus, bacteriophage, nấm men và các loài nấm khác.

Trong giai đoạn đầu đời, hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh trải qua quá trình chuyển đổi từ vi khuẩn chiếm ưu thế là *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* sang các chi thuộc ngành Firmicutes [29], chúng đại diện cho hệ vi sinh vật đường ruột từ giai đoạn sơ sinh đến khi trưởng thành. *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* có thể thúc đẩy sự phát triển khả năng miễn dịch ở trẻ sơ sinh và khả năng miễn dịch bẩm sinh trong giai đoạn đầu đời. Thành phần và sự đa dạng của hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh thay đổi đáng kể khi trẻ ăn thức ăn đặc. Chất xơ được lên men bởi hệ vi sinh vật đường ruột tạo ra các axit béo chuỗi ngắn, có liên quan đến khả năng miễn dịch và trao đổi chất của vật chủ [30], [31]. Hệ vi sinh vật đường ruột ở người trưởng thành tương đối ổn định [32], trong khi trẻ sơ sinh (dưới 1 tuổi) có hệ vi sinh vật đường ruột đa dạng thấp hơn so với các nhóm tuổi khác [33]. Mặc dù hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh có *Bifidobacterium* chiếm ưu thế, nhưng có sự khác biệt lớn giữa các cá thể. Thành phần chiếm ưu thế của hệ vi sinh vật đường ruột ở trẻ sơ sinh chủ yếu được chia thành sáu nhóm [34]: nhóm 1 đặc trưng bởi Bifidobacteriales, Lactobacillales, Anaerostipes,

Clostridiales và Faecalibacteria; nhóm 2 đặc trưng bởi Verrucobiotices và Bacteroidales; nhóm 3 đặc trưng bởi Clostridiales; nhóm 4 đặc trưng bởi Enterobacteres; nhóm 5 đặc trưng bởi Pasteurellales và nhóm 6 đặc trưng bởi Selenomonadales.

*Bifidobacterium* thuộc ngành Actinomycetes, trực khuẩn gram dương kỵ khí, được phân lập từ phân của trẻ sơ sinh bú sữa mẹ. *Bifidobacterium* đã được sử dụng rộng rãi trong y học và thực phẩm. Các chủng mới liên tục được phát hiện. Hiện nay, những loại vi khuẩn được phát hiện có liên quan chặt chẽ đến sức khỏe trẻ sơ sinh là *B. breve* và *B. longum*. Sự truyền dọc của *Bifidobacterium* từ mẹ sang con cái thúc đẩy sự phân bố của các chủng này trong tự nhiên. Các thí nghiệm xác định *Bifidobacterium* phổ biến ở bà mẹ và con cái đã chứng minh nhận định này [35], [36]. Các oligosaccharide trong sữa mẹ (HMO) là prebiotic tự nhiên và sự hấp thụ của chúng trong đường ruột của trẻ sơ sinh chủ yếu phụ thuộc vào *Bifidobacterium* [37]. Bằng chứng là mức độ HMO trong phân của trẻ sơ sinh có mối tương quan nghịch với tỷ lệ *Bifidobacterium*. Điều thú vị là HMO không có giá trị dinh dưỡng trực tiếp cho trẻ sơ sinh, chức năng quan trọng của chúng là hình thành hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh và mang lại lợi ích sức khỏe lâu dài [38]. Sau khi trẻ sinh non được bổ sung *B. longum*, phản ứng viêm sẽ yếu đi và tính thấm của ruột giảm. Trẻ sinh non được bổ sung vi khuẩn dựa trên *Bifidobacterium* có thể khôi phục hệ vi sinh vật đường ruột ở mức độ của trẻ đủ tháng [39]. Vì vậy, trong giai đoạn đầu đời, *Bifidobacterium* có thể cải thiện hiệu quả sức khỏe của trẻ sơ sinh, cho dù trẻ sinh non hay trẻ đủ tháng.

Chi *Lactobacillus* cũng được biết đến là loài chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh và được quan sát ngay sau khi sinh [40]. Nhiều loại thuộc chi *Lactobacillus* được phát hiện trong phân su với mức độ phong phú tương đối nhờ sinh qua đường âm đạo lớn hơn đáng kể so với sinh mổ, bao gồm các loài *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. brevis* và *L. casei* [41]. Các nghiên cứu về hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh trong giai đoạn đầu đời cho thấy *L. gasseri* và *L. rhamnosus* chiếm ưu thế [42]. Ngoài việc chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh, âm đạo và sữa của người mẹ cũng rất giàu chi *Lactobacillus*. Con đường truyền vi khuẩn này cho con là trong quá trình sinh nở qua đường âm đạo và con đường thứ

hai mẹ truyền cho con trong quá trình cho con bú. Các loài thuộc chi *Lactobacillus* chính có trong sữa là *L. plantarum* và *L. pentosus* [43]. Chi *Lactobacillus* cũng có thể tiêu hóa HMO và có sự khác biệt rõ ràng về khả năng lên men HMO của các chủng khác nhau [44]. Hơn nữa, *L. reuteri* đã được chứng minh có hiệu quả trong việc làm giảm chứng đau bụng ở trẻ bú mẹ [45].

Chi *Clostridium* là chi vi khuẩn kỵ khí, sinh bào tử có hình tròn hoặc hình trứng. Hầu hết các loài thuộc chi *Clostridium* trong ruột trẻ sơ sinh đều gây bệnh, đặc biệt là *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. tetani* và *C. botulinum* [46]. Các loài *Clostridium* thường cư trú trong ruột trẻ sơ sinh nhưng chúng thường không có triệu chứng. Kết quả nuôi cấy vi sinh vật trong phân trẻ sơ sinh cho thấy *C. perfringens* và các loại Clostridia khác có thể đạt tới  $10^7$  CFU/g. *Clostridium* và *Bifidobacterium* trong phân của trẻ sơ sinh đều phát triển mạnh trên prebiotic oligosaccharide. Điều này gây khó khăn trong việc bổ sung prebiotic cho trẻ sơ sinh thiếu *Bifidobacterium* [47]. Ngược lại, *Enterococcus faecalis* phân lập từ phân trẻ sơ sinh có thể ức chế sự phát triển của *C. difficile*, có thể có ứng dụng tiềm năng để ngăn ngừa sự xâm nhập và nhiễm trùng của *C. difficile* [48]. Như vậy, trong giai đoạn đầu đời, chúng ta cần cẩn thận với *Clostridium* để ngăn chúng trở thành loài chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh. Tuy nhiên, Kim và cộng sự đã phát hiện ra rằng sự có mặt của các loài Clostridia ở trẻ sơ sinh đã bảo vệ chống lại sự xâm chiếm của các mầm bệnh vi khuẩn [49]. Nghiên cứu này chỉ ra rằng việc sử dụng Clostridiales giúp tăng cường khả năng kháng khuẩn của ruột trẻ sơ sinh, điều này có thể ngăn chặn một số mầm bệnh tấn công ruột trẻ sơ sinh. Tương tự, Clostridia hội sinh được coi là đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì cân bằng nội môi đường ruột. Những dữ liệu này cải thiện sự hiểu biết của chúng ta về chức năng của vi khuẩn sơ sinh. Việc ứng dụng các loài Clostridia để điều hòa cân bằng nội môi của hệ vi sinh vật đường ruột ở trẻ sơ sinh vẫn là một thách thức lớn, bởi vì hầu hết Clostridia đều gây bệnh.

Chi *Bacteroides*: Từ khi sinh ra cho đến khi trưởng thành, hệ vi sinh vật ở người dần dần ổn định. Sự phong phú tương đối của *Bacteroides* trong phân trẻ sơ sinh được sinh qua đường âm đạo cao hơn so với sinh mổ [50]. Sự đa dạng của *Bacteroides* trong phân của trẻ bú sữa công thức cao hơn trẻ bú

mẹ [51]. Hơn nữa, sự xâm nhập muộn của *Bacteroides* do mô lấy thai có thể liên quan đến phản ứng Th1. Tương tự như *Bifidobacterium* và các chi *Lactobacillus*, *Bacteroides* và *Fragilis* trong ruột trẻ sơ sinh cũng có thể tiêu hóa HMO [52]. Ngoài ra, trong môi trường carbohydrate và HMO, *B. thetaiotaomicron* thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn sản xuất axit béo chuỗi ngắn. Tuy nhiên, một số *Bacteroides* có khả năng gây bệnh. Ví dụ, *B. fragilis* có thể gây viêm màng não kỵ khí ở trẻ sơ sinh [53].

Chi *Veillonella* là loại kỵ khí nghiêm ngặt và ký sinh trong miệng, ruột và đường hô hấp của người và động vật. Chúng có thể sản xuất nội độc tố và do đó đóng vai trò trong nhiều bệnh nhiễm trùng hỗn hợp khác nhau. Chúng thường được phát hiện từ áp xe mô mềm và máu [54]. Chi *Veillonella* cũng phổ biến trong ruột của trẻ sơ sinh. Trong những năm gần đây, các loài mới liên tục được xác định. Loại chủng cầu khuẩn gram âm kỵ khí mới được phân lập từ tưa lưỡi trẻ em là *V. infantium* [55].

Chi *Streptococcus* là một nhóm cầu khuẩn Gram dương phổ biến khác. Có 69 loài và phân loài phân bố rộng rãi trong tự nhiên và vùng mũi họng, đường ruột của cơ thể con người và hầu hết chúng thuộc chi không gây bệnh [56]. Streptococci gây bệnh có thể gây ra nhiều loại bệnh viêm mủ và quá mẫn ở người, trong đó *Streptococcus* nhóm B (GBS) là mối nguy hiểm nhất đối với trẻ sơ sinh. Mặc dù kháng sinh có thể làm giảm GBS trong khi sinh, nhưng chúng vẫn là nguyên nhân quan trọng gây nhiễm trùng sơ sinh [57]. Khoảng 35% phụ nữ mang thai mang GBS dẫn đến hệ vi sinh đường ruột của trẻ sinh ra từ bà mẹ mang GBS khác biệt đáng kể so hệ vi sinh đường ruột của trẻ sinh ra từ bà mẹ những người không mang GBS [58]. Vì vậy, việc phòng ngừa hiệu quả bệnh việc xâm chiếm GBS là điều cần thiết cho sức khỏe trẻ sơ sinh.

Chi *Collinsella* và *Akkermansia*: Hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh bị chi phối bởi *Bifidobacterium*, tuy nhiên chi *Collinsella* cũng có thể là chi trội. Cho đến nay, chi *Collinsella* bao gồm năm loài *C. stercoris*, *C. gutis*, *C. aerofaciens*, *C. tanakaei* và *C. ihuae*, tất cả đều được phân lập từ đường tiêu hóa của người [59], [60]. *Akkermansia muciniphila* là loài duy nhất của chi *Akkermansia* trong hệ vi sinh vật đường ruột. Vi khuẩn *A. muciniphila* trong ruột tăng nhanh sau khi trẻ được cai sữa và tăng theo độ tuổi. Các thí

nghiệm trên động vật chỉ ra rằng sự phong phú của *A. muciniphila* trong ruột của chuột mắc bệnh tiểu đường loại 2 và béo phì giảm đi và việc sử dụng *A. muciniphila* có thể kiểm soát tình trạng viêm và giảm tính thấm của ruột. Đáng chú ý là *A. muciniphila* cũng được phát hiện có liên quan đến quá trình lên men HMO [61].

Ở hệ vi sinh vật thông thường, nhóm vi khuẩn có lợi (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) chiếm khoảng 85% và vi khuẩn có khả năng trở thành gây bệnh cơ hội chiếm khoảng 15%, chúng cùng chung sống trong 1 cộng đồng phức tạp. Tuy nhiên, trong một quần thể vi sinh vật, sự đấu tranh sinh tồn luôn luôn xảy ra để đạt trạng thái cân bằng ổn định. Có nhiều vi khuẩn có lợi ở trạng thái cân bằng này nhưng lại trở nên có hại ở một trạng thái sinh lý rối loạn khác. Ngoài vi sinh vật lõi (core microbiome) ra, hệ vi sinh cũng có tới 2/3 mang tính cá thể, di truyền theo gia đình. Hệ vi khuẩn đường ruột khỏe mạnh được xem là chìa khóa, giúp duy trì sức khỏe và chức năng của hệ tiêu hóa.

Hệ vi sinh vật đường ruột ở người khỏe mạnh thường ở trạng thái cân bằng ổn định đặc biệt là hệ vi khuẩn lõi (core microbiome) [13], trong đó chủ yếu là các vi khuẩn thuộc ngành Firmicutes [62]. Vi khuẩn đường ruột có thể được phân thành hai nhóm: nhóm chiếm tỷ lệ lớn trong ruột là vi khuẩn kỵ khí như *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*. Nhóm vi khuẩn này có chức năng duy trì môi trường nội môi trong ruột, sản xuất các chất có lợi và cạnh tranh với vi khuẩn gây hại, ngăn cản sự xâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh. Nhóm chiếm tỷ lệ thấp là nhóm vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí tùy tiện như *Enterococcus*, *Escherichia coli* và *Streptococcus*, chúng được xem như nhân tố gây bệnh cơ hội. Nhóm vi khuẩn này lấy đi oxy trong ruột để tạo môi trường thuận lợi cho các vi khuẩn kỵ khí sinh trưởng, phát triển [18]. Sự cân bằng giữa nhóm vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí là vô cùng quan trọng đối với sức khỏe của hệ tiêu hóa. Hệ vi khuẩn đường ruột có tính đặc trưng theo quần thể, di truyền theo hệ gen tộc người, theo gia đình, khu vực địa lý do đặc thù của khí hậu, nguồn dinh dưỡng chế độ ăn. Ví dụ điển hình đó là vi khuẩn đường ruột của người Ấn Độ sinh sống ở thành phố và nông thôn có chế độ ăn khác nhau nên hệ vi sinh vật khác nhau. Trong phân người sống ở nông thôn Melghat, vi khuẩn trội được tìm thấy là *Prevotella* và có chứa nhiều gen mã

hóa enzyme thủy phân cellulose, lipid. Trong đó quần thể người sống ở thành thị Nagpur ăn chủ yếu là tinh bột, thịt, cá chi vi khuẩn trội lại là *Bacteroides* spp.. Hệ metageome của người thành thị chứa nhiều gen kháng kháng sinh hơn nhiều so với hệ metagenome của người nông thôn [63]. *Prevotella* cũng là chi phổ biến trong hệ tiêu hóa của người Mông Cổ, Mỹ.

Thành phần của hệ vi sinh đường ruột chịu tác động, bị ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố. Đặc biệt là thói quen sinh hoạt, chế độ ăn, việc sử dụng thuốc hay độ tuổi cũng như tình trạng về sức khỏe tinh thần, căng thẳng, lo âu. Mất cân bằng hệ vi sinh (dysbiosis) đường ruột đó là sự thay đổi về thành phần, cấu trúc, đa dạng vi khuẩn của hệ vi sinh vật so với thành phần vi sinh vật tương ứng ở người khỏe mạnh. Sự mất cân bằng này đã được xác định là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh khác nhau, điển hình như bệnh lo âu, trầm cảm, tim mạch, co thắt viêm ruột, bệnh thần kinh, ung thư ở người lớn, bệnh tự kỷ ở trẻ em [64], [65]. Cấu trúc hệ vi khuẩn đường ruột cũng bị thay đổi nếu có mặt của vi khuẩn gây tiêu chảy trong mẫu phân, làm mất cân bằng hệ vi sinh của trẻ. Viêm ruột mạn tính có thể xảy ra bởi tác động của nhiều yếu tố ngoại sinh, nội sinh và được trung gian bởi các tế bào miễn dịch, không miễn dịch ở vật chủ dễ bị tổn thương về mặt di truyền. Ví dụ như sử dụng kháng sinh, sự xâm nhập của vi sinh vật gây bệnh... Bệnh viêm ruột (IBD) là một bệnh điển hình, gồm hai dạng phổ biến là bệnh Crohn và viêm loét đại tràng có mối liên hệ với hệ vi khuẩn đường ruột. Ở những bệnh nhân IBD nhóm vi khuẩn *Faecalibacterium prausnitzii* và *Roseburia* spp. thuộc ngành Firmicutes bị giảm đáng kể [66] thay vào đó là tăng số lượng của các vi khuẩn Enterobacteriaceae, *Bacteroides fragilis* - nhóm vi khuẩn sinh ra nội độc tố lipopolysacchride gây viêm đại tràng, viêm ruột [67]. Bệnh Celiac là một bệnh viêm mạn tính, do rối loạn giữa các yếu tố di truyền và môi trường, ảnh hưởng chủ yếu ở ruột non, đặc trưng bởi tình trạng không dung nạp với gluten và prolamin. Hầu hết, các kết quả nghiên cứu đều ghi nhận có sự thay đổi trong thành phần vi khuẩn đường ruột so với nhóm chứng, kể cả ở người lớn và trẻ em [68], [69]. Những bệnh nhân mắc Celiac có sự thuyên giảm số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium* spp., thay vào đó là sự gia tăng số lượng vi khuẩn *Bacteroides* spp.. Trên thực tế, những thay đổi trong hệ vi khuẩn đường ruột có phải là nguyên nhân hay hậu quả của bệnh Celiac vẫn chưa được

kháng định. Sự mất cân bằng vi khuẩn đường ruột, đều gặp ở những bệnh nhân mắc bệnh Celiac chưa được điều trị hoặc đã được điều trị bằng chế độ ăn kiêng không chứa gluten. Bên cạnh đó, một số thay đổi cụ thể trong hệ vi khuẩn đường ruột, sẽ làm tăng quá trình phân giải protein, ảnh hưởng đến việc tạo ra các peptide độc hại và miễn dịch từ gluten, chống lại một phần quá trình tiêu hóa, làm suy yếu hàng rào ruột. Những thay đổi này làm cho các triệu chứng của bệnh Celiac nặng hơn, tạo nên một vòng xoắn bệnh lý phức tạp. Do vậy, việc khảo sát sự mang trùng ẩn các loài gây tiêu chảy ở bệnh nhi để loại trừ trong nghiên cứu đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ không bị tiêu chảy là cần thiết.

### **1.3. THỰC TRẠNG TIÊU CHẢY Ở TRẺ EM 6-24 THÁNG TUỔI TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM, NGUYÊN NHÂN GÂY TIÊU CHẢY**

#### **1.3.1. Tình hình bệnh tiêu chảy**

Tiêu chảy là bệnh phổ biến trên toàn cầu, tập trung chủ yếu ở những quốc gia có nền kinh tế phát triển và đang phát triển. Bệnh gặp ở cả đối tượng trẻ em và người lớn. Bệnh gây nguy hiểm chủ yếu cho nhóm trẻ nhỏ dưới 5 tuổi [70]. Hơn một nửa gánh nặng y tế toàn cầu về các bệnh do thực phẩm là do tiêu chảy gây ra. Tiêu chảy không những là mối đe dọa với sức khỏe của con người mà nó còn là một trong số những nguyên nhân gây tử vong đứng đầu ở trẻ dưới 5 tuổi [71]. Bệnh tiêu chảy gây ra nhiều hậu quả như mất nước, rối loạn điện giải, suy dinh dưỡng, nhiễm trùng do sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh khác. Đặc biệt, khi cơ thể mất nước kéo dài sẽ gây mất điện giải, rối loạn và suy giảm các chức năng của cơ thể nếu không được điều trị kịp thời có thể dẫn đến tử vong.

Ở Việt Nam, tiêu chảy đứng thứ 4 về tỷ lệ tử vong, bệnh tiêu chảy còn là một trong 10 bệnh mà trẻ em thường gặp ở [72]. Trẻ em có hệ miễn dịch, hệ thống tiêu hóa chưa trưởng thành, hệ vi sinh vật đường tiêu hóa chưa hoàn thiện, nhu cầu dinh dưỡng cao, nhiều trẻ ăn thức ăn nhân tạo nên là dễ bị mắc tiêu chảy [73]. Trẻ có độ tuổi dưới 1 tuổi chiếm 40,9%, dưới 2 tuổi chiếm 71,0%. Mặc dù dự phòng, ngăn chặn, kiểm soát bệnh tiêu chảy là một mục tiêu được đưa ra của cộng đồng nhưng bệnh vẫn còn xảy ra với tần suất khá cao, gây nhiều gánh nặng cho xã hội.

Tiêu chảy kéo dài thường là giai đoạn tiếp theo của tiêu chảy cấp (chiếm 3% -20%) [8]. Tiêu chảy lâu ngày kết hợp với suy dinh dưỡng tạo nên một vòng xoắn bệnh lý, có thể gây tử vong hoặc tác động đáng kể đến tăng trưởng và phát triển về thể chất của trẻ. Tỷ lệ trẻ tiêu chảy kéo dài tại bệnh viện Nhi đồng 2 bị suy dinh dưỡng chiếm khoảng 31%, trong đó 26,8% ở dạng nhẹ cân và 12,7% trẻ suy dinh dưỡng gầy mòn [74].

### 1.3.2. Tác nhân gây tiêu chảy

Tiêu chảy có thể do nhiều nguyên nhân bao gồm các yếu tố nhiễm khuẩn, nhiễm độc, dùng thuốc và nhiều yếu tố bệnh lý khác. Tuy nhiên, theo định nghĩa của Tổ chức Y tế Thế giới WHO, tiêu chảy kéo dài là tiêu chảy kéo dài trên 14 ngày và loại trừ yếu tố bệnh lý khác. Do vậy nguyên nhân chủ yếu dẫn tới tiêu chảy dẫn đến tiêu chảy kéo dài là do nhiễm khuẩn [4], [75], ký sinh trùng và nhiễm virus *Rotavirus*, *Norovirus*, *Sapovirus*, *Adenovirus* (có trên 50 type huyết thanh), *Astrovirus*. Mặc dù được khuyến cáo sử dụng xà phòng vệ sinh nhưng tình trạng tiêu chảy vẫn không giảm [6].

Bệnh tiêu chảy chủ yếu do nhiễm khuẩn, ký sinh trùng và nhiễm virus, trong đó phần lớn bệnh nhân tiêu chảy là do vi khuẩn. *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp. *Salmonella* serovars và *Staphylococcus aureus* là những tác nhân vi khuẩn phổ biến nhất gây bệnh tiêu chảy. Đối với trẻ dưới 5 tuổi, nguyên nhân hay gặp gây bệnh tiêu chảy là do *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, ký sinh trùng *Cryptosporidium* [75], [4] và *Rotavirus*. *Rotavirus* lưu hành ở mức độ đa dạng di truyền cao và thường gây ra dịch hàng năm ở các nước đang phát triển. Các virus khác như *Norovirus* và *Sapovirus* thuộc họ *Caliciviridae*, *Adenovirus* (có trên 50 type huyết thanh) type 40, 41 và *Astrovirus* thuộc chi *Mamastrovirus* cũng thường xuyên gây tiêu chảy ở người [4]. Một trong những nguyên nhân đầu gây bệnh tiêu chảy mắc phải trong bệnh viện, có liên quan tới kháng sinh là do *C. difficile*. *C. difficile* sản sinh ra độc tố enterotoxin (TcdA) và/ hoặc cytotoxin (TcdB), phá vỡ kết nối và làm mất tổ chức khung tế bào biểu mô ruột, dẫn đến thay đổi hình thái và gây chết tế bào. Bệnh dẫn đến viêm đại tràng giả mạc, tiêu chảy, suy dinh dưỡng có thể dẫn đến tử vong [76], [48]. Triệu chứng lâm sàng của



bệnh gồm tiêu chảy, sốt, đau bụng, buồn nôn. Các chế phẩm sinh học dùng trong điều trị nhiễm trùng do *C. difficile* thông qua cơ chế đối kháng vi khuẩn khác nhau như cạnh tranh bám dính vào niêm mạc ruột, giảm độc tính và ức chế bào tử *C. difficile*.

Rotavirus, đặc biệt là Rotavirus nhóm A được coi là tác nhân nghiêm trọng nhất dẫn đến viêm dạ dày ruột mức độ nặng ở trẻ em, chiếm 1/3 tổng số ca nhập viện do tiêu chảy và ước tính khoảng 500.000 ca tử vong trên thế giới mỗi năm [4]. Ngoài Rotavirus, nhóm vi khuẩn *E. coli* gồm *E. coli* tiết độc tố ruột (ETEC), *E. coli* gây bệnh đường ruột (EPEC), *E. coli* kết dính đường ruột (EAEC), *E. coli* gây xuất huyết đường ruột (EHEC-enterohemorrhagic *E. coli*), *E. coli* sản sinh độc tố Shiga (STEC), *E. coli* kiểu huyết thanh O157:H7, *E. coli* xâm lấn đường ruột (EIEC)/*Shigella* cũng là sinh vật gây bệnh đường ruột phổ biến thứ hai [77]. Các tác nhân gây bệnh chủ yếu lây lan qua nguồn nước bị nhiễm bệnh, thực phẩm và vệ sinh kém. *Shigella* spp. và *Salmonella* spp. [78] cũng là tác nhân hay gặp gây tiêu chảy ở đối tượng trẻ nhỏ hơn 5 tuổi [79]. Theo một nghiên cứu của Nguyễn Tiến Dũng và cộng sự, ở nhóm trẻ dưới 24 tháng, trẻ mắc tiêu chảy do Rotavirus chiếm tới 68,61% và tỷ lệ mắc theo giới nam/ nữ là 1,43/1 [80].

Ngoài các nhân tố trên, việc sử dụng kháng sinh, suy dinh dưỡng, thiếu vitamin, khoáng chất (như Zn, vitamin A), hoặc rối loạn chuyển hóa (như không dung nạp lactose, carbohydrate, không dung nạp protein từ sữa bò, dị ứng thực phẩm) cũng là các nguyên nhân dẫn tới tiêu chảy [81]. Các nhân tố này vừa là hậu quả của tiêu chảy cấp, vừa là nguyên nhân dẫn tới mức độ nghiêm trọng và dai dẳng ở bệnh nhi tiêu chảy. Bên cạnh những ca bệnh tiêu chảy tìm được tác nhân gây bệnh, có khoảng 40% trẻ bị tiêu chảy không có yếu tố dịch tễ, không tìm ra nguyên nhân [9].

### 1.3.3. Xét nghiệm tác nhân gây tiêu chảy

Ở các bệnh viện, để xác định nguyên nhân gây bệnh tiêu chảy có thể dùng các phương pháp như soi tươi, nhuộm, cấy phân, phương pháp miễn dịch và PCR. Các kỹ thuật PCR thường được dùng cho chẩn đoán bệnh tiêu chảy gồm real-time PCR (qPCR), multiplex PCR, reverse transcription PCR (RT-PCR). Đặc biệt nhiều phương pháp sinh học phân tử mới được áp dụng để chẩn đoán xác định nguyên nhân gây bệnh, cũng như phân tích đa dạng vi

khuẩn trong phân để đánh giá sự mất cân bằng của vi khuẩn trong đường ruột như phân tích đa hình đoạn giới hạn (RFLP), điện di trên gel gradient biến tính (DGGE)...

Việc xác định chính xác và sớm các ca nhiễm trùng *C. difficile* là bước quan trọng để điều trị thành công cho bệnh nhân, làm giảm các biến chứng và hậu quả nghiêm trọng. Kết hợp các phương pháp chẩn đoán như xét nghiệm miễn dịch, nuôi cấy và phương pháp khuếch đại axit nucleic dựa trên việc phát hiện gen *tcdA* hoặc *tcdB* đã làm giảm thời gian chẩn đoán, giảm chi phí, giúp ngăn ngừa lây nhiễm [82]. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, việc chuyển từ xét nghiệm miễn dịch men độc tố A/B sang phương pháp PCR để chẩn đoán bệnh nhiễm trùng *C. difficile* đã chứng minh rằng xét nghiệm *C. difficile* nhanh bằng PCR có tác động tích cực đến việc quản lý bệnh nhân bằng cách giảm điều trị theo kinh nghiệm, thời gian nằm viện và các xét nghiệm lặp lại không cần thiết [83].

Trong chẩn đoán Rotavirus, hầu hết các phương pháp được sử dụng như điện di gel polyacrylamide và phản ứng PCR phiên mã ngược (RT-PCR). Bên cạnh đó, phương pháp real-time cũng được áp dụng. Phương pháp này có độ nhạy cao, làm giảm thời gian chẩn đoán. Trong một nghiên cứu ở Mexico, việc xét nghiệm PCR thời gian thực cho các bệnh nhân bị viêm dạ dày ruột đã được xác định bằng phương pháp điện di gel polyacrylamide, phản ứng RT-PCR đã phát hiện *Rotavirus* từ 73% mẫu được xác định âm tính với *Rotavirus*, do đó tỷ lệ mẫu dương tính với rotavirus đã tăng lên 81% [84]. Do đó, có thể nói real-time PCR là một công cụ chẩn đoán lý tưởng để phát hiện rotavirus.

Với các nguyên nhân gây tiêu chảy do ký sinh trùng, phương pháp PCR thời gian thực cũng được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán. Nghiên cứu năm 2022 của Dashti và cộng sự đã tiến hành đánh giá về xét nghiệm PCR thời gian thực (VIASURE) đối với *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* và *Entamoeba histolytica*. Các mẫu DNA được lấy từ các mẫu phân lâm sàng hoặc các mẫu được nuôi cấy tại một trung tâm tham chiếu quốc gia. Độ nhạy và độ đặc hiệu của ba loại tác nhân trên được ước tính lần lượt là 0,94-0,96 và 0,99-1. Do vậy, xét nghiệm PCR thời gian thực là một lựa chọn phù hợp giúp chẩn đoán nhanh và cho độ nhạy, độ đặc hiệu rất cao [85].

### 1.3.4. Điều trị mất cân bằng hệ vi sinh đường ruột

Tiêu chảy là một trong những nguyên nhân quan trọng nhất gây tử vong đối với trẻ em trên toàn cầu, đặc biệt ở các nước đang phát triển và là nguyên nhân đứng thứ hai gây tử vong ở trẻ dưới 5 tuổi [86]. Mục tiêu điều trị là phòng ngừa, giải quyết tình trạng mất nước và mất thời gian tiêu chảy và thời kỳ lây nhiễm. Bù nước bằng đường uống, thuốc ức chế nhu động ruột và thuốc kháng sinh được sử dụng để điều trị viêm dạ dày ruột cấp tính. Bù nước bằng đường uống làm giảm tình trạng mất nước nhưng lại không có tác dụng đến nhu động ruột, thời gian tiêu chảy [87].

Probiotic được sử dụng rộng rãi trên toàn cầu và dự kiến có thể đạt doanh thu 64 tỷ đô la Mỹ vào năm 2023 [88]. Probiotic đã được đánh giá trong điều trị tiêu chảy và nhiều cơ chế cải thiện bệnh tiêu chảy đã được xác định. Probiotic chứa đủ lượng vi khuẩn sống đặc hiệu không gây bệnh như *Lactobacillus*, *Yeast*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* và *Bacillus*. Trong điều trị bệnh tiêu chảy, probiotic đã được sử dụng rộng rãi do cải thiện, duy trì được sự cân bằng của vi khuẩn trong đường ruột. Probiotic cạnh tranh chất dinh dưỡng, có thể tạo nên nhiều hợp chất kháng khuẩn, ức chế sự xâm chiếm của vi khuẩn có hại [89]. Probiotic còn làm giảm hậu quả do nhiễm trùng *Citrobacter Rodentium*, *Listeria monocytogenes*, *EHEC* và *Salmonella* Typhimurium. Theo nghiên cứu năm 2019 của Li và cộng sự, điều trị tiêu chảy cấp bằng *L. rhamnosus* GG được xác nhận là có hiệu quả làm giảm thời gian bị tiêu chảy và số lượng phân mỗi ngày [90]. Đặc biệt, probiotic còn có thể ức chế, ngăn cản sự phát triển của các yếu tố gây bệnh. Một số chủng *E. faecalis* ức chế các chủng *C. difficile* sinh độc tố và sản xuất bào tử, giảm thiểu khả năng lây nhiễm và tình trạng bệnh [48].

Prebiotic là chất được vi sinh vật chủ sử dụng có chọn lọc nhằm đưa đến hiệu quả điều trị tốt cải thiện tình trạng cho sức khỏe, thường là carbohydrate có cấu trúc phân tử khác nhau gồm polyphenol và axit béo không bão hòa. Prebiotic có nhiều trong một số loại thực phẩm như hành tây, măng tây, tỏi, yến mạch, lúa mì..., làm yếu tố tác động tốt đến phát triển của vi khuẩn đường ruột, kích thích sự trao đổi chất trong đại tràng. Các chất này cung cấp chất dinh dưỡng, tạo môi trường thuận lợi làm tăng cường thành phần, số lượng một số loài vi khuẩn có lợi của hệ vi sinh đường tiêu hóa như

*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*. Bên cạnh đó, nhờ quá trình lên men, prebiotic còn tác động đến nhiều chức năng của đường ruột [91]. Prebiotic làm tăng sản xuất các axit béo chuỗi ngắn có vai trò vô cùng quan trọng để duy trì, cải thiện hệ vi sinh ở đường ruột. Một số prebiotic như fructo oligosaccharide, pectin oligosaccharide, inulin có thể cạnh tranh với rereptor của mầm bệnh ngăn cản sự xâm nhập của mầm bệnh, làm giảm thời gian tiêu chảy [92]. FOS (inulin- trong một số loài thực vật và neosugar-được tổng hợp bằng enzym từ sucrose), là chất xơ có lợi, giúp tăng thể tích phân, giảm táo bón, tăng độ axit của phân. FOS được tiêu hóa dễ dàng bởi *Bifidobacterium* và nhóm vi khuẩn khác như *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Bacteroides vulgatus* [93].

Cấy ghép hệ vi khuẩn của đường ruột (fecal microbiota transplantation-FMT) trong điều trị các bệnh đường tiêu hóa đã trở thành một trong những mối quan tâm đặc biệt trong nghiên cứu về y sinh, y học lâm sàng. Đặc biệt, FMT ngày càng được chú ý do đã áp dụng thành công trong điều trị nhiễm trùng *C. difficile* (CDI) và bệnh viêm ruột (IBD) [94], [95], [96]. Đây là quá trình cấy hệ vi khuẩn chức năng trong phân của người khỏe mạnh vào đường tiêu hóa của bệnh nhân giúp cân bằng nội mô của đường ruột, nhằm xây dựng lại hệ vi sinh của đường tiêu hóa có chức năng bình thường. Đó là một trong những phương pháp điều trị có đáp ứng hiệu quả nhằm điều chỉnh hệ vi sinh đường ruột. FMT thường được cung cấp qua truyền dịch nội soi đại tràng và thụt tháo. Các bệnh nhân được điều trị bằng FMT của người hiến chứa vi khuẩn kỵ khí giúp giảm viêm loét đại tràng [11]. Trong một nghiên cứu (năm 2022) của Haifer và cộng sự, có chỉ ra rằng dùng FMT bằng đường uống có mang lại hiệu quả điều trị ở những bệnh nhân loét đại tràng [97]. Điều trị CDI bằng FMT cho hiệu quả rất cao, không có tái phát ở những bệnh nhân được theo dõi sau 16 tháng [98]. Một kết quả nghiên cứu khác cho thấy điều trị bằng FMT có thể làm số lượng vi khuẩn có lợi tăng lên và tái tạo hệ vi khuẩn ở đường ruột; đồng thời nghiên cứu sâu hơn cho thấy FMT đã kích hoạt quá trình tự thực bào của niêm mạc ruột, làm giảm những tổn thương hàng rào ruột do vi khuẩn *E. coli* K88 gây ra [10].

## **Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU**

#### **2.1.1. Đối tượng nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện trên 51 mẫu phân của trẻ khỏe mạnh (C01-C51) (Phụ lục 1).

#### **2.1.2. Hóa chất và thiết bị máy móc**

##### **2.1.2.1. Các loại hóa chất**

Một số hóa chất được sử dụng như: Qiastart Dx Gastrointestinal Panel (QIAGEN), GeneJET Genomic DNA purification kit (Thermo Scientific, USA), QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany), E.Z.N.A Stool DNA kit (Omega Bio-tek, USA), TopPURE stool DNA extraction kit (ABT, Vietnam), MEGAquick-spin plus total fragment DNA purification kit (Intron, Hàn Quốc), đệm PBS 1X pH 7,4, đệm TE 1X pH 7,4, chloroform, isoamyl alcohol, isopropanol, phenol (Merk).

##### **2.1.2.2. Máy móc và thiết bị**

Một số máy móc và thiết bị chính sử dụng như máy PCR (Applied Biosystems, Mỹ), máy điện di (Bio-Rad, Mỹ), máy biến tính, máy UV (Bio-Rad, Mỹ), máy ly tâm lạnh (Sorvall RC5B, Mỹ và Sorvall RC5B, Mỹ), máy ổn nhiệt (Mỹ), cân phân tích (Precisa, Thụy Sĩ), cân điện tử (Precisa, Thụy Sĩ), máy đo pH (Metler, Thụy Sĩ), máy đo pH (Hana Instrument, Mỹ), cột sắc kí ái lực Hitrap (GE, Healthcare, Thụy Điển), máy NanoDrop (Implen, Đức), tủ lạnh sâu -80°C (Panasonic, Nhật), máy đọc ELISA ELx800 (BioTek, Mỹ).

### **2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu**

Việc thu mẫu phân của trẻ khỏe mạnh được thực hiện bởi các bác sĩ Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi trung ương. Mẫu phân sau khi thu thập được lấy một phần nhỏ (1 g) cho xét nghiệm 24 tác nhân gây tiêu chảy thông thường. Phần phân còn lại được tách chiết vi khuẩn cho các nghiên cứu đánh giá đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân.

##### **2.2.1.1. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu**

Trước khi tiến hành nghiên cứu, bố mẹ và người chăm sóc trẻ được tư vấn về mục đích nghiên cứu, quyền lợi và trách nhiệm khi tham gia nghiên cứu và ký vào "Phiếu chấp thuận tham gia nghiên cứu". Cha mẹ hoặc người

trực tiếp chăm sóc trẻ cung cấp các thông tin về trẻ theo phiếu điều tra thông tin theo mẫu đã được chuẩn bị sẵn.

Các thông tin riêng liên quan tới đối tượng nghiên cứu được giữ kín.

Việc thu mẫu tuân thủ nguyên tắc về đạo đức trong đề cương nghiên cứu đã được Hội đồng đạo đức phê duyệt theo Giấy chứng nhận số 1875/BVNTW-HĐĐĐ do Giám đốc Bệnh viện Nhi trung ương ký ngày 10/7/2023 về việc Chứng nhận chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học cơ sở IRB-VN01037/IRB00011976/FWA00028418.

### **2.2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu phân từ trẻ khỏe mạnh**

- Đối tượng nghiên cứu: Trẻ 6-24 tháng tuổi khỏe mạnh đến khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

+ Trẻ không bị tiêu chảy và các bệnh liên quan đến tiêu hóa, không sử dụng kháng sinh tối thiểu trong vòng 1 tháng. Bố mẹ hoặc người chăm sóc trẻ điền phiếu điều tra thông tin (Phụ lục 2) đầy đủ.

+ Bố mẹ hoặc người chăm sóc trẻ đồng ý tham gia nghiên cứu (Phụ lục 3).

- Tiêu chuẩn loại trừ: Trẻ có tiền sử bị tiêu chảy trong vòng 1 tháng; đã từng bị phẫu thuật đường tiêu hóa (dạ dày, ruột, mật, túi mật, gan); đang bị bệnh cấp tính hoặc đang có bệnh mạn tính như bệnh ung thư, bệnh thận, bệnh gan, bệnh tim mạch, HIV/AIDS, lao, các bệnh hệ thống; trong vòng 1 tháng qua đã sử dụng thuốc ảnh hưởng đến hệ vi khuẩn đường ruột như kháng sinh, corticoid, thuốc ức chế bơm proton (PPI), và thuốc nhuận tràng trị táo bón, thuốc Đông y; trẻ đi nước ngoài, đi du lịch hoặc sống ở tỉnh khác trong vòng 3 tháng qua; bố mẹ hoặc người chăm sóc trẻ không đồng ý tham gia nghiên cứu.

### **2.2.2. Phương pháp xác định 24 tác nhân gây tiêu chảy thông thường bằng realtime-PCR**

Việc xác định 24 tác nhân gây bệnh từ mẫu phân được thực hiện tự động trên hệ thống máy máy phân tích QIAstat-Dx 1.0 (Qiagen). Đầu tiên, lấy 25-100 mg (tối đa 250 mg) phân được hòa vào 1 ml môi trường Cary-Blair có sẵn trong bộ kit. Mẫu được làm đồng nhất, sau đó hút 200 µl dịch mẫu chuyển vào Cartridge của bộ kit QIAstat-Dx Gastrointestinal Panel (Qiagen) và đưa vào buồng Cartridge của máy. Máy sẽ tự động tách chiết DNA đa hệ gen và

tiến hành real-time PCR. Sau 1 giờ chạy, máy sẽ trả về kết quả với các chỉ số chu kỳ ngưỡng của các tác nhân dương tính. Danh sách các tác nhân gây tiêu chảy thông thường được phát hiện bằng bộ kit QIAstat-Dx Gastrointestinal Panel được liệt kê trong phụ lục 4.

### **2.2.3. Phương pháp tách chiết thu hồi vi khuẩn từ mẫu phân**

Mẫu phân từ  $-80^{\circ}\text{C}$  được để lên đá để mẫu tan từ từ, tránh gây sốc nhiệt sẽ làm vỡ tế bào vi khuẩn. Cân 1 g mẫu phân và chuyển vào ống falcon có thể tích 50 ml. Bổ sung đệm PBS lạnh (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) vào ống tới thể tích 3 ml, lắc đảo bằng máy vortex để phân được huyền phù đều, sau đó để yên 10 phút ở nhiệt độ phòng. Hút dịch nổi sang ống falcon thứ hai. Tiếp tục bổ sung thêm 3 ml đệm PBS vào mỗi ống, lắc mạnh bằng máy vortex, ly tâm 500-700 vòng/phút trong 10 phút. Toàn bộ dịch nổi được chuyển sang ống mới và thực hiện lặp lại hai lần. Tiếp tục ly tâm mẫu 1000 vòng/phút trong 10 phút. Hút chuyển dịch nổi sang ống mới. Sau đó ly tâm dịch nổi ở tốc độ 6.000-8.000 rpm trong 10-15 phút, thu tủa vi khuẩn.

Tủa vi khuẩn ở một mẫu được hòa vào đệm PBS, rửa lại ba lần bằng đệm PBS, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, vi khuẩn được hòa vào 1 ml đệm TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) và được đo mật độ ở bước sóng  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ . Mật độ vi khuẩn được đưa về giá trị  $4 \times 10^9$  tế bào/ml bằng cách hòa tế bào vào đệm TE (ước tính tương đối,  $\text{OD}_{600\text{nm}}=1$  tương đương với  $1,5 \times 10^9$  CFU/ml) [99].

Chia 1 ml huyền phù vi khuẩn ở trên vào các ống Eppendorf 1,5 ml. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch. Vi khuẩn được bảo quản ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  để sử dụng cho tách chiết DNA đa hệ gen cho nghiên cứu đa dạng hệ vi khuẩn trong phân.

### **2.2.4. Tách DNA đa hệ gen vi khuẩn**

Để tách chiết DNA đa hệ gen của vi khuẩn từ mẫu phân vừa đảm bảo thu được DNA có hàm lượng cao, chất lượng tốt ( $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ ,  $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$  và không còn chất ức chế Taq DNA polymerase ở nồng độ 2 ng/10  $\mu\text{l}$  phản ứng) và đa dạng cao, chúng tôi đã khảo sát phương pháp tách chiết bằng phenol:chloroform và 4 kit bao gồm GeneJET Genomic DNA purification kit (Thermo Scientific, USA), QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen,

Germany), E.Z.N.A Stool DNA kit (Omega Bio-tek, USA), TopPURE stool DNA extraction kit (ABT, Vietnam). Qua khảo sát chúng tôi chọn ra được 2 phương pháp cho tách chiết DNA đa hệ gen gồm phương pháp tách chiết bằng phenol:chloroform và tách chiết bằng kit GeneJET.

#### **2.2.4.1. Tách chiết DNA đa hệ gen bằng phương pháp phenol:chloroform**

Phương pháp tách DNA đa hệ gen vi khuẩn được cải biên từ phương pháp chuẩn của Sambrook [100]. Tế bào vi khuẩn của mỗi mẫu được lấy từ tủ -80°C được hòa vào 180  $\mu$ l đệm ly giải (Tris HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM pH 8, triton X-100 1,2%, lysozyme 20 mg/ml), ủ ở 37°C trong 30 phút. Bổ sung 3  $\mu$ l proteinase K (20 mg/ml), 30  $\mu$ l SDS 10%, ủ ở 56°C trong 30 phút. Bổ sung 170  $\mu$ l đệm TE, 3  $\mu$ l RNase A (1%), ủ ở 37°C trong 30 phút. Bổ sung 140  $\mu$ l đệm TE, 180  $\mu$ l NaCl 5 M, ủ tiếp ở 37°C trong 15 phút. Dịch nổi chứa DNA đa hệ gen được thu lại bằng cách ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó chiết lại bằng 750  $\mu$ l phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1), lắc kỹ để các protein hòa vào pha phenol:chloroform. Mẫu sau đó được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, thu DNA đa hệ gen ở pha trên. Để loại bỏ triệt để được protein lẫn trong mẫu DNA, 750  $\mu$ l chloroform:isoamylalcohol (24:1) được bổ sung vào mẫu, lắc kỹ và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, thu DNA đa hệ gen ở pha trên. Bước này được thực hiện lặp lại 2 lần.

DNA đa hệ gen của vi khuẩn được tủa lại bằng 0,7 lần thể tích isopropanol 100%, để ở -20°C trong 30-60 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, thu tủa DNA đa hệ gen. Tủa DNA được rửa lại bằng 0,5 ml ethanol 70%, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút để thu tủa DNA và làm khô DNA ở 55°C. DNA metagenome được hòa lại bằng 30  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O vô trùng. Dịch DNA sau khi tách được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% và kiểm tra chất lượng DNA, hàm lượng DNA bằng Nanodrop ở bước sóng 230 nm, 260 nm và 280 nm. Sự tồn tại của chất ức chế polymerase có trong mẫu DNA metagenome sau tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuếch đại đa hệ gen 16S rRNA của vi khuẩn.

#### **2.2.4.2. Tách DNA bằng GeneJET Genomic DNA purification kit**

Quy trình tách DNA vi khuẩn được thực hiện theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm GeneJET DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific) có một



chút thay đổi nhỏ để thu được cả DNA metagenome của vi khuẩn Gram âm và Gram dương.

Tế bào vi khuẩn của mỗi mẫu được lấy từ tủ  $-80^{\circ}\text{C}$  và được hòa vào  $180\mu\text{l}$  đệm ly giải (Tris HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM pH 8, Triton X-100 1,2%, lysozyme 20 mg/ml), ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút. Bổ sung  $200\mu\text{l}$  đệm ly giải,  $3\mu\text{l}$  proteinase K (20 mg/ml), ủ ở  $56^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút. Bổ sung  $3\mu\text{l}$  dung dịch RNase A 1%, ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút. Mẫu sau đó được bổ sung  $400\mu\text{l}$  dung dịch ethanol 50%, trộn đều. Hút lần lượt  $500\mu\text{l}$  dịch chuyển lên cột GeneJET Genomic DNA purification column, ly tâm 8.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch phía dưới, lặp lại đến khi hết dịch. DNA metagenome bám trên cột được rửa và thu lại theo các bước trong quy trình chuẩn của bộ kit. DNA metagenome được thu lại bằng  $40\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O và được kiểm tra điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Hàm lượng và chất lượng DNA được kiểm tra bằng phương pháp đo quang phổ trên máy Nanodrop. Sự tồn tại của chất ức chế polymerase có trong mẫu DNA metagenome sau tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuếch đại đa gen 16S rRNA của vi khuẩn.

### **2.2.5. Điện di DNA trên gel agarose**

Phương pháp điện di DNA trên gel agarose được thực hiện theo quy trình chuẩn [101].

Gel agarose được chuẩn bị với nồng độ thích hợp trong đệm TAE 1x. Các mẫu DNA cần kiểm tra được trộn với loading dye 6x theo tỷ lệ 5:1 trước khi tra vào giếng. Quá trình điện di được thực hiện dưới hiệu điện thế 100V trong khoảng 30 phút, bản gel được nhuộm bằng dung dịch ethidium bromide 0,1% trong khoảng 10 phút trước khi soi trên ánh sáng tử ngoại.

### **2.2.6. Phương pháp PCR khuếch đại vùng gen V3, V6-V8 rDNA và gen 16S rRNA từ đa hệ gen vi khuẩn**

Trước khi thực hiện thí nghiệm này, chúng tôi đã khảo sát phương pháp và nhận thấy gen 16S rDNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi 27-F và 1527-R từ DNA đa hệ gen của vi khuẩn được tách chiết bằng phương pháp phenol:chloroform và kit GeneJET cho độ đa dạng vi sinh trong mẫu khác nhau. Vì vậy, trong thí nghiệm này gen 16S rRNA vi khuẩn của cùng một mẫu, tách từ hai phương pháp khác nhau được trộn chung, để làm khuôn cho khuếch đại vùng V3, V6-V8. Vùng gen V3, V6-V8 được khuếch đại bằng các

cặp mồi V3 [102], [103] V6-V8 [104] được liệt kê trong bảng 2.2 trong đó trình tự clamp là 5' CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG 3'. PCR được tiến hành trong tổng thể tích 25 µl gồm 2,5 µl đệm PCR 10x, 2,0 µl dNTP (2 mM), 1,0 µl mồi mỗi loại (10 µM), 5,0 µl DNA khuôn (2 ng/µl), 0,25 µl DreamTaq DNA polymerase (5 U/µl, Fermentas). Chương trình PCR sử dụng cho khảo sát khuếch đại đa dạng vùng gen V3, V6-8 là chương trình tough-up (Bảng 2.1) có nhiệt độ gán mồi tăng dần trong mỗi 5 chu kỳ từ 50°C, 52°C, 55°C và cuối cùng là 20 chu kỳ có nhiệt độ gán mồi ở 58°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% [105]. Hàm lượng DNA và chất lượng DNA được đo bằng máy Nanodrop 2000 (Implen).

**Bảng 2.1.** Chương trình PCR khuếch đại gen 16S rRNA, vùng V3, V6-V8 của gen 16S rRNA từ DNA hệ gen vi khuẩn

Các bước	Chu trình nhiệt
Bước 1	94°C, 4'
Bước 2	5 chu kỳ (94°C, 30''; 50°C, 30''; 72°C, 1')
Bước 3	5 chu kỳ (94°C, 30''; 52°C, 30''; 72°C, 1')
Bước 4	5 chu kỳ (94°C, 30''; 55°C, 30''; 72°C, 1')
Bước 5	20 chu kỳ (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 1')
Bước 6	72°C, 4'
Bước 7	4°C, ∞

**Bảng 2.2.** Danh sách mồi dùng để khuếch đại gen 16S rDNA, các vùng gen V3, V6-V8

Gen	Kích thước	Tên mồi	Trình tự mồi
Gen 16S rDNA	1500 bp	27-F	5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCAG-3'
		1527-R	5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAGCC-3'
Vùng gen V3	180 bp	BA338F-GC	5'-GC-clamp GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'
		UN518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'
Vùng gen V6-V8	433 bp	U968F-GC	5'-GC-clamp GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3'
		L1401R	5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3'

### 2.2.7. Phân tích vùng gen V3, V6-V8 bằng DGGE và đánh giá độ đa dạng của vi khuẩn dựa trên vùng V3, V6-V8

#### 2.2.7.1. Phân tích vùng gen bằng DGGE

Vùng gen V3, V6-V8 sau khi khuếch đại được phân tích bằng điện di DGGE như được mô tả bởi Hovda và đồng tác giả [106] trên hệ thống máy VS20-DGGETC system (Cleaver Scientific Ltd, England). Vùng V3 được phân tích trên gel có nồng độ chất biến tính từ 35% đến 70%, vùng V6-V8 được phân tích trên gel có nồng độ chất biến tính từ 40 đến 60%. Trong đó 100% chất biến tính có chứa 7 M urea, 40% formamide deionized. Nồng độ polyacrylamide trên bản gel là 8%. Điện di được tiến hành trong đệm TAE 1x (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) ở 60°C, 20V trong 10 phút sau đó tăng lên 70V trong 18 giờ. Sau khi điện di, gel được nhuộm với SYBR-Gold (S11494, Thermo Scientific, USA) pha loãng 10.000 lần trong đệm TAE, pH 7,6.

#### 2.2.7.2. Đánh giá chỉ số đa dạng vi sinh dựa trên phân tích DGGE

**Bảng 2.3.** Các chỉ số đa dạng và công thức tính dùng để đánh giá kết quả bằng điện di sau DGGE

Chỉ số	Công thức tính	Chỉ số	Công thức tính
Simpson's dominance index (Do)	$D_o = \sum_{k=1}^S p_k^2$	Shannon diversity index (H0)	$H_0 = -\sum_{k=1}^S p_k \ln(p_k)$
Simpson's diversity index (Di)	$D_i = 1 - D_o$	Shannon equitability (evenness) index (E)	$E = H_0 / \ln(S)$

*N là tổng số băng riêng lẻ; n<sub>k</sub> là số băng riêng lẻ có cùng vị trí trên gel trên tất cả các mẫu trong một nhóm; p<sub>k</sub> là tỷ lệ các băng tại vị trí cụ thể trong nhóm, p<sub>k</sub> được định nghĩa là (n<sub>k</sub>/N); S là tổng số vị trí.*

Ảnh điện di DGGE được chuyển vào phần mềm ImageLab để phần mềm quét và đưa ra chỉ số cường độ đậm nhạt của các băng ở mỗi vị trí tương ứng với hàm lượng DNA của các băng ở mỗi vị trí. Dựa vào chỉ số cường độ băng, số lượng băng, tỷ lệ của băng, các chỉ số đa dạng được tính toán bao gồm Simpson's dominance index (Do - cường độ băng), Simpson's diversity

index (Di - độ đa dạng băng), Shannon diversity index (H0 chỉ số đa dạng), Shannon equitability (evenness) index (E - chỉ số đồng đều) với công thức được tính như trong bảng 2.3.

#### **2.2.8. Giải trình tự DNA đa hệ gen và đánh giá đa dạng vi sinh ở hai nhóm tuổi**

Dựa trên kết quả đánh giá đa dạng, vi khuẩn trong mẫu phân của 30 trẻ khỏe mạnh có xu hướng thay đổi theo độ tuổi. Do vậy, DNA metagenome của trẻ đã được trộn theo hai nhóm: nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi ký hiệu là HMG1 và nhóm trẻ 13-24 tháng tuổi là HMG2. DNA từ mỗi mẫu được trộn theo cùng hàm lượng, sau đó gửi sang công ty BGI (Hồng Kông) để giải trình tự trên hệ thống máy DNBseq G-400. Trình tự sau khi giải được đánh giá chất lượng. Các trình tự có chất lượng thấp ( $Q < 20$ ) và các trình tự adapter, trình tự của người được loại bỏ để có bộ dữ liệu sạch. Sau đó công cụ Kraken2 được sử dụng để xác định nguồn gốc của các read và đánh giá đa dạng. Đây là công cụ hiện đại nhất đang được sử dụng để đánh giá đa dạng vi sinh trong dữ liệu DNA đa hệ gen [107].

#### **2.2.9. Phương pháp thống kê, xử lý số liệu**

Dựa trên kết quả nhận được, chúng tôi đã lập danh sách mẫu chứng đã được kiểm tra với đầy đủ thông tin, kết quả phân tích, tác nhân gây bệnh được phát hiện vào bảng Excel 2010. Các kết quả được thống kê lại, đánh giá mức độ phù hợp của mẫu cho nghiên cứu, thống kê kết quả và lập bảng, đồ thị biểu thị kết quả trên phần mềm Excel 2010, xử lý thống kê bằng chương trình IBM SPSS Statistics 20.

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. ĐÁNH GIÁ TÌNH TRẠNG MANG TRÙNG GÂY TIÊU CHẢY THÔNG THƯỜNG TRONG MẪU PHÂN Ở TRẺ KHỎE MẠNH 6-24 THÁNG TUỔI

##### 3.1.1. Phát hiện vi khuẩn gây tiêu chảy thông thường bằng realtime-PCR

Từ 51 mẫu phân của trẻ khỏe mạnh, không bị tiêu chảy, chúng tôi tiến hành thực hiện xét nghiệm realtime-PCR 24 tác nhân gây tiêu chảy thông thường và thu được kết quả như sau:

**Bảng 3.1.** Danh sách 21 mẫu dương tính với vi sinh gây tiêu chảy thông thường được xét nghiệm bằng phương pháp realtime-PCR

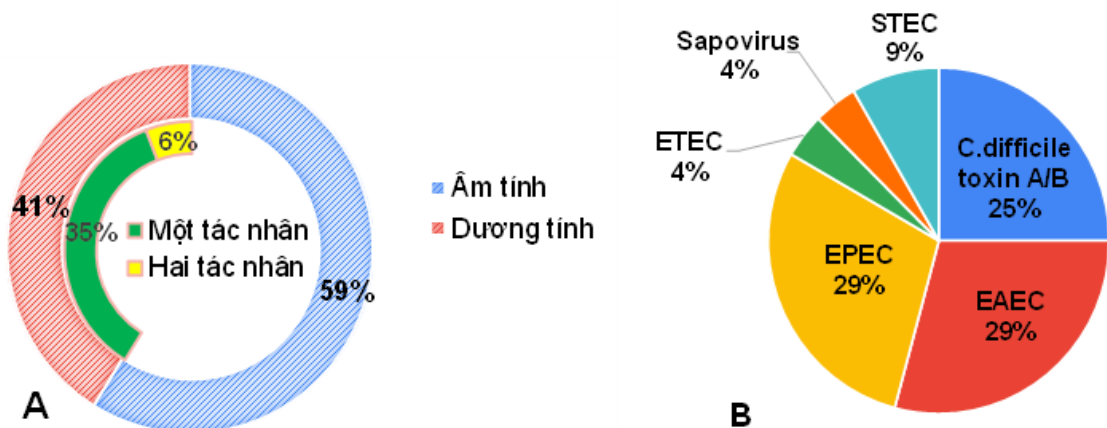
STT	Mã nghiên cứu	Kết quả xét nghiệm	Tác nhân được phát hiện	Chu kỳ ngưỡng
1	C02	Dương tính	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Ct=31,6
2	C05	Dương tính	<i>Sapovirus</i> Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=24,1 Ct=34,1
3	C06	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=32,2
4	C07	Dương tính	<i>C. difficile</i> toxin A/B	Ct=31,5
5	C08	Dương tính	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Ct=29,9
6	C09	Dương tính	<i>C. difficile</i> toxin A/B	Ct=35,4
7	C11	Dương tính	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Ct=34,3
8	C13	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=30,3
9	C14	Dương tính	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Ct=27
10	C15	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=33
11	C16	Dương tính	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Ct=33
12	C28	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=35
13	C32	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=31,6
14	C33	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=32,5
15	C35	Dương tính	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Ct=34,3
16	C39	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=30,2
17	C40	Dương tính	<i>C. difficile</i> toxin A/B Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>	Ct=30,7 Ct=33,6
18	C41	Dương tính	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>	Ct=28,8
19	C47	Dương tính	<i>C. difficile</i> toxin A/B	Ct=32,9
20	C49	Dương tính	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Ct=33,8
21	C51	Dương tính	<i>C. difficile</i> toxin A/B Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Ct=35,2 Ct=29,9

Trong số 51 trẻ (6-24 tháng tuổi) khỏe mạnh đến khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện Nhi Trung ương, có đủ tiêu chuẩn tham gia vào nghiên cứu có 47 trẻ đến từ Hà Nội và 4 trẻ đến từ Hưng Yên. Danh sách trẻ tham gia lấy mẫu kèm theo (Phụ lục 1).

Kết quả xét nghiệm cho thấy, trong số 51 mẫu xét nghiệm có 30 mẫu âm tính (chiếm tỷ lệ 59%) và 21 mẫu dương tính (chiếm tỷ lệ 41%) (Bảng 3.1, Hình 3.1-A). Tất cả các mẫu phân làm xét nghiệm 24 tác nhân gây bệnh, không tìm thấy tác nhân gây bệnh là ký sinh trùng, tìm thấy 5 loại tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, 1 loại tác nhân gây bệnh là virus.

### 3.1.2. Đánh giá tình trạng mang trùng ẩn ở trẻ khỏe mạnh

Trong số 21 mẫu xét nghiệm dương tính có 18 mẫu dương tính với 1 tác nhân gây bệnh (chiếm 35% tổng số mẫu), 3 mẫu dương tính với hai tác nhân gây bệnh (chiếm 6% tổng số mẫu) (Hình 3.1-A) đó là mẫu C05 dương tính với *Sapovirus* (Ct=24,1) và Enteropathogenic *E. coli* (Ct=34,1); mẫu C40 dương tính với *C. difficile* toxin A/B (Ct=30,7) và STEC (Ct=33,6); mẫu C51 dương tính với *C. difficile* toxin A/B Ct=35,2, Enteroaggregative *E. coli* Ct=29,9.

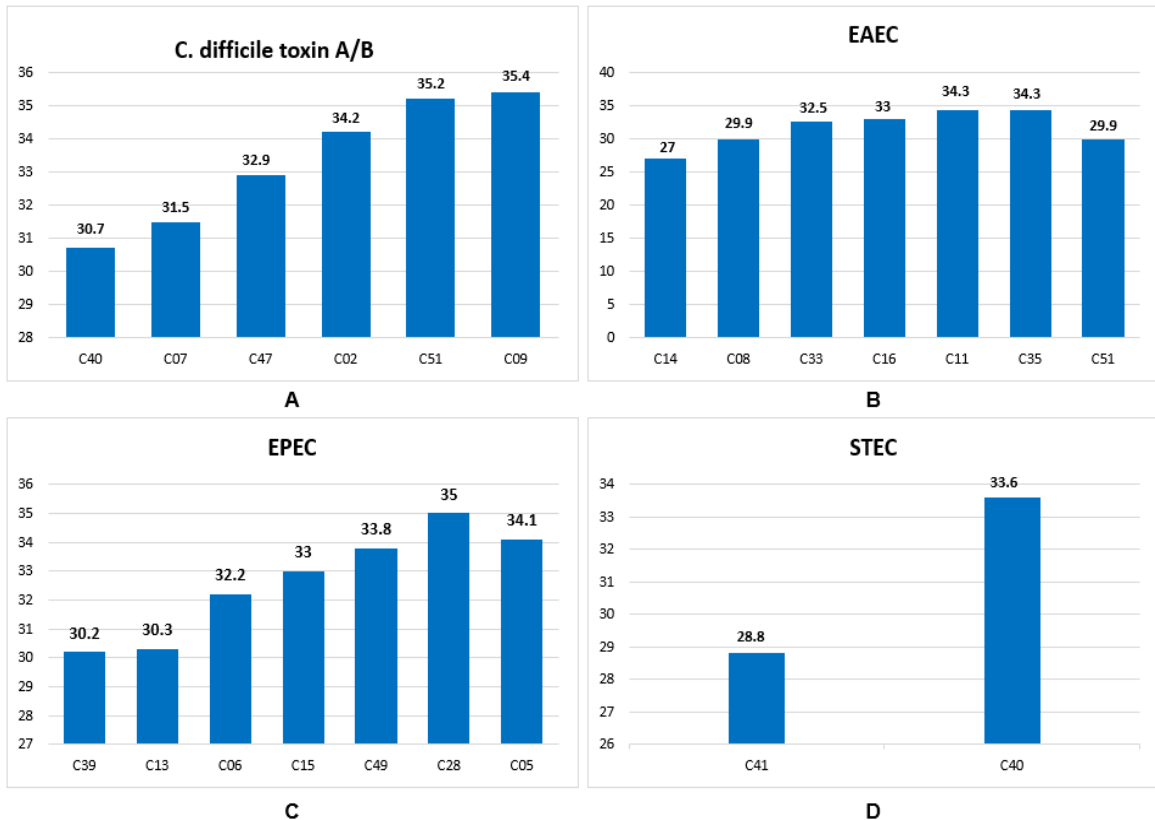


**Hình 3.1.** (A) Tỷ lệ mẫu xét nghiệm âm tính và dương tính; (B) Tỷ lệ % tác nhân gây bệnh trong 21 mẫu dương tính.

Trong số vi khuẩn gây tiêu chảy thông thường được tìm thấy, enteroaggregative *E. coli* (EAEC) và enteropathogenic *E. coli* (EPEC) là 2 tác nhân tìm thấy được nhiều nhất (trong 7 mẫu chiếm tỷ lệ 29%); tiếp theo là *C. difficile* toxin A/B tìm thấy được trong 6 mẫu (chiếm tỷ lệ 25%), shiga-like

toxin-producing *E. coli* (STEC) tìm thấy trong 2 mẫu (chiếm tỷ lệ 9%) và cuối cùng là *Sapovirus*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) tìm thấy trong 1 mẫu (chiếm tỷ lệ 4%) (Hình 3.1-B).

Chu kỳ ngưỡng (threshold cycle) là giá trị quan trọng trong các xét nghiệm realtime PCR xác định tác nhân gây bệnh (gồm cả vi khuẩn, virus, ký sinh trùng). Chu kỳ ngưỡng là chu kỳ tối thiểu của PCR mà tại đó ghi nhận được tín hiệu huỳnh quang dương tính với tác nhân đích. Giá trị chu kỳ ngưỡng có liên quan đến số bản sao của tác nhân gây bệnh trong 1 ml mẫu bệnh phẩm. Chỉ số chu kỳ ngưỡng trên xét nghiệm sẽ tỉ lệ nghịch với nồng độ tác nhân gây bệnh đích bởi khi mẫu có càng nhiều bản sao của tác nhân gây bệnh thì tín hiệu huỳnh quang sẽ xuất hiện sớm ở những chu kỳ đầu tiên (Ct thấp) và ngược lại trong mẫu bệnh phẩm càng ít tác nhân gây bệnh đích thì tín hiệu huỳnh quang sẽ có thể xuất hiện muộn ở những chu kỳ sau (Ct cao). Điển hình phương pháp phát hiện vi khuẩn trong mẫu máu của bệnh nhân nhiễm trùng máu cũng cho thấy giá trị Ct để xác định dương tính với *H. influenzae* và *Enterococcus* spp. nằm trong khoảng 22,13 tới 26,63 [108]. Nghiên cứu khác chỉ ra rằng, trong khoảng giá trị Ct là 24-30, độ chính xác giảm dần từ 83% xuống còn 48% [109]. Các xét nghiệm trong mẫu phân cũng đưa ra kết quả tương tự. Nghiên cứu phương pháp realtime PCR xác định vi khuẩn *C. difficile* trong mẫu phân bệnh nhân ung thư cũng chỉ ra rằng, giá trị Ct để xác định giữa âm tính và dương tính là 28,0 (với độ chính xác dương tính là 64-82%). Giá trị Ct từ 22,5 đến 24,5 là giá trị cho độ chính xác 85-100%. Khi tăng Ct lên 31, độ chính xác còn 40-61% và khi tăng lên 37 thì độ chính xác dương tính là 0-4% [110]. Do đó, nếu chu kỳ ngưỡng 33-35 thì mẫu âm tính với độ chính xác 80-87%. Các xét nghiệm vi khuẩn trong phân bệnh nhi tự kỷ cũng sử dụng giá trị Ct dưới 30 [111].



**Hình 3.2.** Chỉ số chu kỳ ngưỡng của 1 số tác nhân gây bệnh trong các mẫu xét nghiệm dương tính. (A) Tác nhân *C. difficile* toxin A/B; (B) Tác nhân EAEC; (C) Tác nhân EPEC; (D) Tác nhân STEC

Trong nhóm mẫu (21 mẫu) có xét nghiệm dương tính thì chỉ có mẫu C05 dương tính với *Sapovirus* với chu kỳ ngưỡng  $Ct=24,1$ . Mẫu C32 dương tính với ETEC với chu kỳ ngưỡng  $Ct=31,6$ . Mẫu C41, C40 dương tính với STEC với chu kỳ ngưỡng tương ứng  $Ct=28,8$  và  $Ct=33,6$ . Mẫu C40 dương tính với *C. difficile* toxin A/B với chu kỳ ngưỡng thấp nhất ( $Ct=30,7$ ); mẫu C09 dương tính với *C. difficile* toxin A/B với chu kỳ ngưỡng cao nhất ( $Ct=35,4$ ). Với tác nhân gây bệnh EAEC mẫu C14 dương tính với chu kỳ ngưỡng thấp nhất ( $Ct=27$ ), mẫu C11 và C35 dương tính với chu kỳ ngưỡng cao nhất là  $Ct=34,3$ . Với tác nhân gây bệnh EPEC mẫu C39 dương tính với chu kỳ ngưỡng thấp nhất  $Ct=30,2$  mẫu C28 dương tính với chu kỳ ngưỡng cao nhất  $Ct=35$  (Hình 3.2). Như vậy, trong số 24 tác nhân được phát hiện thì có 18 mẫu có chu kỳ ngưỡng  $Ct \geq 30$  chiếm 85,7% (trong đó có mẫu C40 dương tính với 2 tác nhân có chu kỳ ngưỡng  $Ct > 30$ ) và 5 mẫu có chu kỳ ngưỡng  $Ct$  trong khoảng 24,1 đến 29,9. Điều này cho thấy những trẻ mang



trùng với Ct cao sẽ không có triệu chứng của bệnh và các vi khuẩn gây bệnh ít có khả năng gây ra bệnh nếu trong hệ tiêu hóa có nhóm vi khuẩn có lợi kháng lại các vi khuẩn gây bệnh này. Những trẻ mang vi khuẩn gây bệnh có chỉ số Ct thấp sẽ có khả năng bị mắc tiêu chảy nếu hệ miễn dịch của trẻ kém. Nghiên cứu khảo sát mối liên hệ giữa nơi sinh sống, nguồn nước uống, giới tính của trẻ, tuổi của trẻ với sự mang trùng ẩn cho thấy chúng không có mối liên quan đến nhau. Khả năng mang trùng gây tiêu chảy thông thường là ngẫu nhiên, phân bố đồng đều trong các nhóm tuổi.

Các mẫu phân dương tính sẽ bị loại ra khỏi nhóm nghiên cứu do sự có mặt của vi khuẩn gây tiêu chảy thông thường có thể làm ảnh hưởng tới cấu trúc hệ vi khuẩn ở trẻ khỏe mạnh. Các mẫu phân âm tính với 24 tác nhân gây tiêu chảy thông thường sẽ được đánh số theo thứ tự từ H1 đến H30 để tiến hành tách chiết DNA đa hệ gen của vi khuẩn để giải trình tự, đánh giá đa dạng.

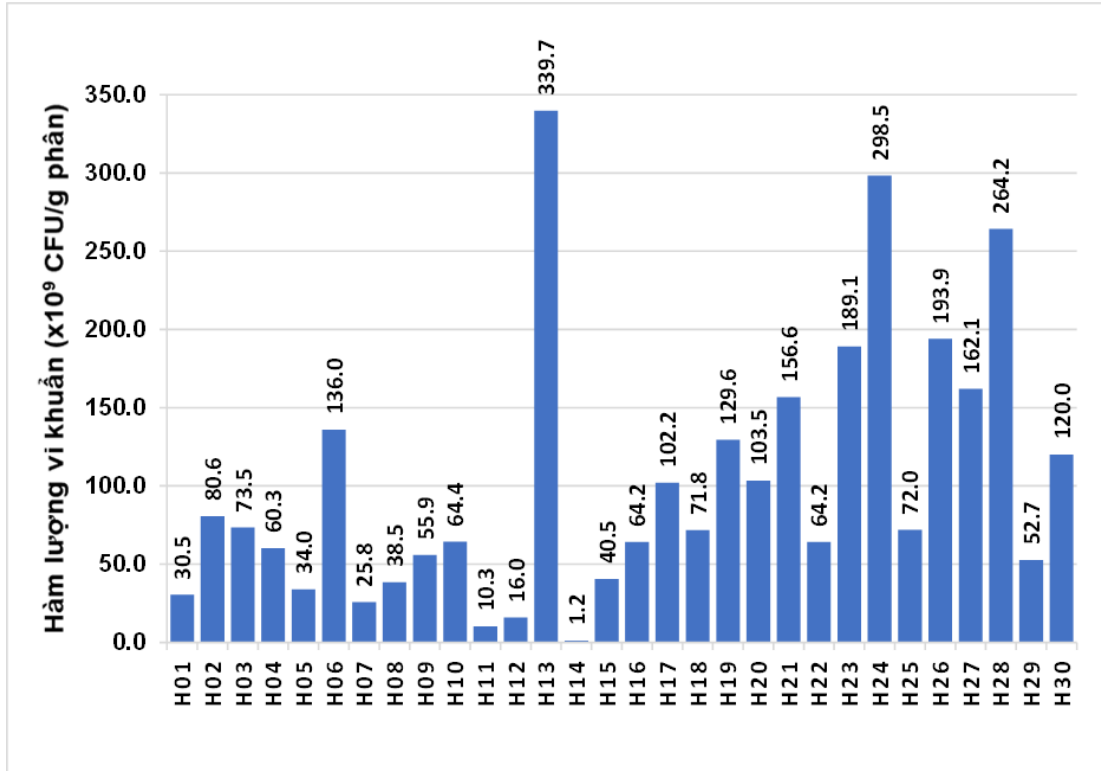
## **3.2. ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG MẪU PHÂN CỦA TRẺ KHỎE MẠNH ÂM TÍNH VỚI CÁC TÁC NHÂN GÂY TIÊU CHẢY THÔNG THƯỜNG**

### **3.2.1. Tách chiết DNA đa hệ gen vi khuẩn trong phân**

#### ***3.2.1.1. Tách DNA vi khuẩn từ 30 mẫu phân âm tính với các tác nhân gây tiêu chảy thông thường***

Mẫu phân thông thường có chứa rất nhiều chất ức chế các enzyme sử dụng trong kỹ thuật sinh học phân tử. Các chất ức chế PCR tích tụ trong phân theo độ tuổi từ lúc trẻ mới sinh ra, có thể phát hiện thấy trong 17% mẫu phân trẻ ở độ tuổi 6-24 tháng [112] và cao hơn ở người lớn [113]. Các chất ức chế PCR này gồm nhiều loại như các hợp chất có vòng thơm như các chất kháng sinh được sử dụng trong quá trình phát triển của trẻ, các chất béo, cellulose và các thành phần do vi sinh vật bị phân hủy, các kim loại nặng... [112]. Vì vậy, để loại bỏ được tốt hơn các chất ức chế polymerase, trước hết vi khuẩn từ các mẫu phân được tách chiết để loại bỏ chất ức chế, các tế bào Eukaryote có trong mẫu và các thức ăn chưa được phân giải hết. Kết quả cho thấy hàm lượng vi khuẩn trong 30 mẫu phân thu được có sự thay đổi và khác biệt rõ rệt. Mẫu H13 là mẫu có lượng vi khuẩn thu được cao nhất ( $339,7 \times 10^9$  CFU/g phân) cao gấp 283 lần mẫu H14 - mẫu có lượng vi khuẩn thấp nhất ( $1,2 \times 10^9$

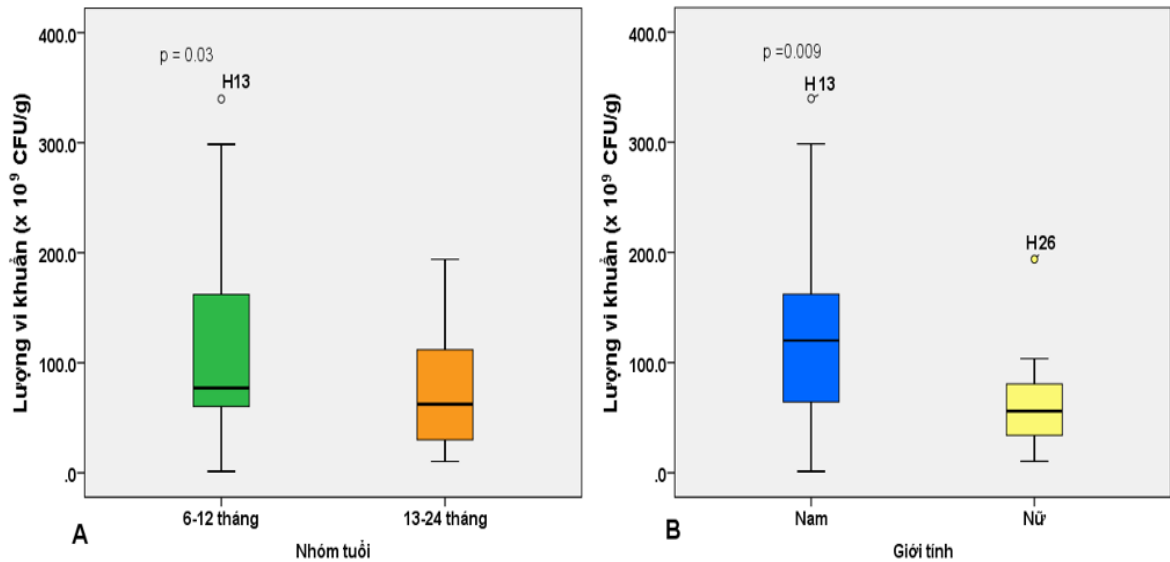
CFU/g phân) (Hình 3.3). Trong đó giá trị trung bình của hàm lượng vi khuẩn trong 30 mẫu phân là  $101,7 \times 10^9$  CFU/g phân và giá trị trung vị là  $71,9 \times 10^9$  CFU/g phân.



**Hình 3.3.** Biểu đồ hàm lượng tương đối của vi khuẩn trong 1 gam phân của 30 mẫu phân âm tính với các tác nhân gây tiêu chảy thông thường

Phân tích thống kê sự khác biệt giữa nhóm trẻ nam và nữ cho thấy, nhóm trẻ nam (17 trẻ) có xu hướng có lượng vi khuẩn trong phân cao hơn nhóm trẻ nữ (13 trẻ). Lượng vi khuẩn trung bình ở trẻ nam là  $129,16 \times 10^9$  CFU/g phân, trong khi ở trẻ nữ là  $65,86 \times 10^9$  CFU/g phân, khoảng trung vị của vi khuẩn trong mẫu phân trẻ nam là  $120 \times 10^9$  CFU/g phân và của trẻ nữ là  $55,88 \times 10^9$  CFU/g phân. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P=0,009$ ). Tương tự như vậy, phân tích thống kê sự khác biệt giữa nhóm tuổi của trẻ cho thấy, nhóm trẻ 6-12 tháng (18 trẻ) có xu hướng có lượng vi khuẩn trong phân cao hơn nhóm trẻ 13-24 tháng (12 trẻ). Nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi và nhóm trẻ 13-24 tháng tuổi có lượng vi khuẩn trung bình trong phân lần lượt là  $120,85 \times 10^9$  CFU/g phân và  $73,04 \times 10^9$  CFU/g phân; khoảng trung vị của vi khuẩn trong phân lần lượt là  $77,05 \times 10^9$  CFU/g phân và  $62,2 \times 10^9$  CFU/g phân. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P=0,03$ ) (Hình 3.4). Phân tích thống kê hàm lượng vi khuẩn trong phân ở trẻ sống ở vùng nông thôn (9 mẫu) và thành thị (21 mẫu) cho thấy

không có sự khác biệt ( $P=0,402$ ). Hàm lượng vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ còn bú mẹ (18 mẫu) với trẻ ăn đầy đủ và đã cai sữa (12 mẫu) cũng không có sự khác biệt ( $P=0,399$ ).



**Hình 3.4.** Biểu đồ so sánh lượng vi khuẩn trong mẫu phân của các nhóm tuổi khác nhau (A) và nhóm giới tính khác nhau (B)

Mẫu H13 là mẫu khác biệt, mẫu có lượng vi khuẩn nằm ngoài khoảng dữ liệu của nhóm (trong cả nhóm nam hay nhóm tuổi 6-12 tháng tuổi). Đây là mẫu từ bạn nam, 7 tháng tuổi, còn bú mẹ, ăn dặm, không ăn sữa chua. Trẻ H26 cũng có số lượng vi khuẩn trong mẫu phân khác biệt so với nhóm trẻ nữ. Trẻ H26 là một trẻ nữ, 20 tháng tuổi, bú mẹ, ăn cháo, không ăn sữa chua. Vì số lượng trẻ không được ăn sữa chua rất ít (04 trẻ) còn lại 23 trẻ ăn sữa chua và 03 trẻ không biết có ăn sữa chua không, do đó việc đánh giá thống kê không thể thực hiện được. Tuy nhiên, có thể thấy rằng trẻ được bú mẹ và ăn tinh bột có lượng vi khuẩn trong phân đa dạng hơn trẻ ăn sữa chua và đầy đủ khẩu phần. Đây là nghiên cứu đầu tiên chiết vi khuẩn ra khỏi mẫu phân trước khi tách chiết để làm tăng chất lượng DNA của vi khuẩn khi tách chiết.

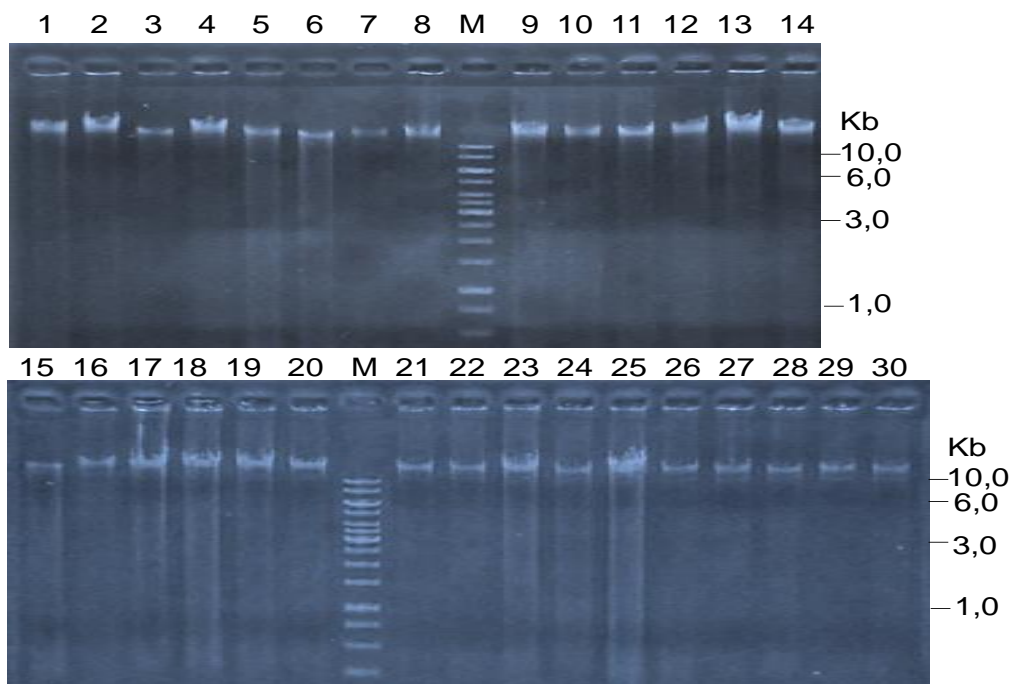
### 3.2.1.2 Tách, tinh chế DNA đa hệ gen vi khuẩn của 30 mẫu phân

DNA đa hệ gen của vi khuẩn trong 30 mẫu phân đã được tách chiết bằng 2 phương pháp: Phương pháp phenol: chloroform và bộ kit GeneJET. Với phương pháp tách chiết bằng phenol: chloroform, DNA đa hệ gen của vi khuẩn sau khi tách chiết được sẽ được tinh chế loại bỏ protein bằng phenol:chloroform:isoamylalcohol và được chiết lại với

chloroform:isoamylalcohol để loại bỏ tốt nhất protein có trong mẫu. Đối với bộ kit GeneJET, DNA metagenome được tinh chế bằng cách hấp phụ DNA lên màng. Các protein và các tạp chất bám theo mẫu được rửa bằng dung dịch rửa. Vì vậy, cả hai phương pháp này đều đảm bảo vừa tách chiết, vừa tinh chế được DNA metagenome có chất lượng cho nghiên cứu phân tích đa dạng bằng fingerprinting và giải trình tự đa hệ gen.

#### ❖ Tách chiết, DNA bằng phương pháp phenol:chloroform

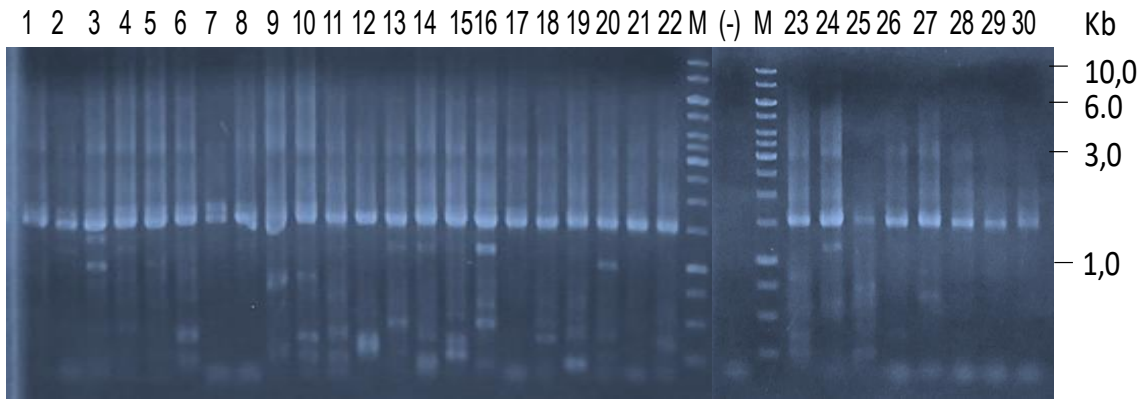
Trên điện di đồ (Hình 3.5) DNA đa hệ gen của cả 30 mẫu được thể hiện là băng sáng, nét có kích thước lớn hơn băng 10 kb của DNA chuẩn, phù hợp với kích thước DNA đa hệ gen của vi khuẩn. Một phần nhỏ DNA đa hệ gen có thể bị phân cắt tạo thành vệt sáng có kích thước dưới 10 kb trên điện di đồ nhưng lượng này không nhiều, không ảnh hưởng tới việc đánh giá đa dạng và giải trình tự.



**Hình 3.5.** Điện di đồ phân tích DNA metagenome sau khi tách chiết bằng phương pháp phenol-chloroform từ vi khuẩn trong 30 mẫu phân (âm tính). M. DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific).

Độ nhiễm tạp protein và các chất có vòng thơm trong mẫu được đánh giá thông qua chỉ số  $A_{260}/A_{280}$  và  $A_{260}/A_{230}$ . Chất lượng DNA được kiểm tra bằng phương pháp đo quang phổ trên máy Nanodrop. Kết quả, cả 30 mẫu phân có chỉ số  $A_{260}/A_{280}$  đạt từ 1,7-1,9 (trong đó có 5 mẫu có chỉ số  $A_{260}/A_{280} = 1,7$ ). Chỉ số  $A_{260}/A_{230}$  có sự dao động lớn về kết quả, có 26 mẫu có chỉ số  $A_{260}$

$/A_{230} \leq 2,0$  và 4 mẫu có chỉ số này lớn hơn 2. Sở dĩ các chỉ số có sự dao động như vậy, có thể là do trong mẫu phân có chứa nhiều chất ức chế và tạp chất. Nồng độ DNA ở mẫu H07 thu được là thấp nhất (28,5 ng/ $\mu$ l) và ở mẫu H18 là cao nhất (259 ng/ $\mu$ l) (Phụ lục 5).



**Hình 3.6.** Điện di đồ phân tích gen 16S rRNA được khuếch đại từ DNA đa hệ gen của vi khuẩn tách bằng phương pháp phenol-chloroform từ 30 mẫu phân (âm tính).

M. DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific); (-): đối chứng âm.

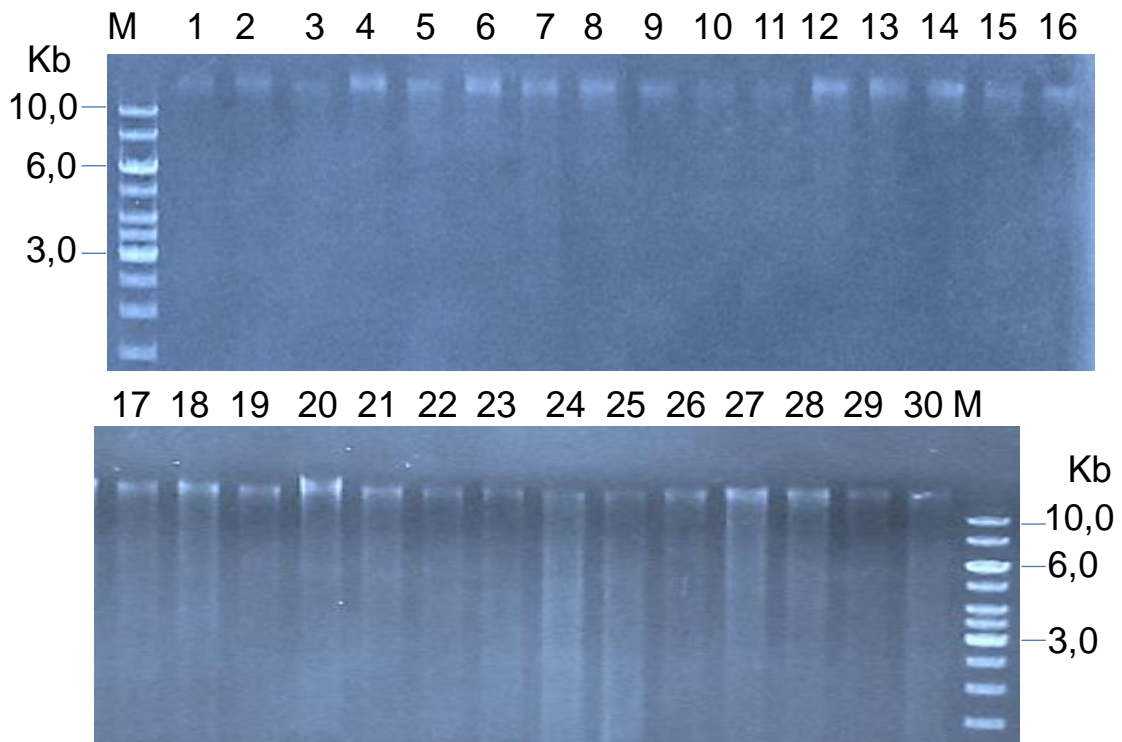
Để kiểm tra sự có mặt của chất ức chế polymerase trong mẫu DNA đa hệ gen được tách chiết, chúng tôi đã sử dụng 2 ng DNA đa hệ gen làm khuôn cho khuếch đại đa gen 16S rRNA của vi khuẩn trong tổng thể tích 10  $\mu$ l. Kết quả điện di (Hình 3.6) cho thấy gen 16S rRNA có kích thước 1,5 kb đã được khuếch đại ở tất cả các mẫu. Việc sử dụng chương trình tough-up đã khuếch đại các đoạn gen có kích thước khác nhau, từ những đoạn gen nhỏ đến những đoạn gen có kích thước trên 1,5 kb tùy thuộc vào các mẫu. Như vậy, ở lượng 2 ng/phản ứng PCR (10  $\mu$ l) thì trong mẫu DNA đa hệ gen không phát hiện thấy có chất ức chế polymerase. DNA đa hệ gen có thể được sử dụng cho giải trình tự.

Tóm lại, DNA đa hệ gen của vi khuẩn trong 30 mẫu phân (âm tính với các tác nhân gây tiêu chảy thông thường) đã được tách chiết, tinh chế thành công bằng phương pháp phenol:chloroform.

#### ❖ Tách chiết, tinh chế DNA bằng kit GeneJET

DNA đa hệ gen của vi khuẩn từ 30 mẫu phân trẻ khỏe mạnh âm tính với 24 tác nhân gây bệnh đã được tách chiết bằng kit GeneJET. Dựa trên điện di đồ hình 3.7, có thể nhận thấy nồng độ DNA thu được từ việc tách

chiết từ vi khuẩn trong 30 mẫu phân (âm tính) bằng bộ kit GeneJET thấp hơn so với nồng độ DNA được tách chiết bằng phương pháp phenol:chloroform. DNA đa hệ gen được tách chiết có kích thước lớn (lớn hơn DNA chuẩn có kích thước 10 kb) và ít bị đứt gãy. Một số mẫu đứt gãy nhiều hơn các mẫu khác như mẫu 24, 27.



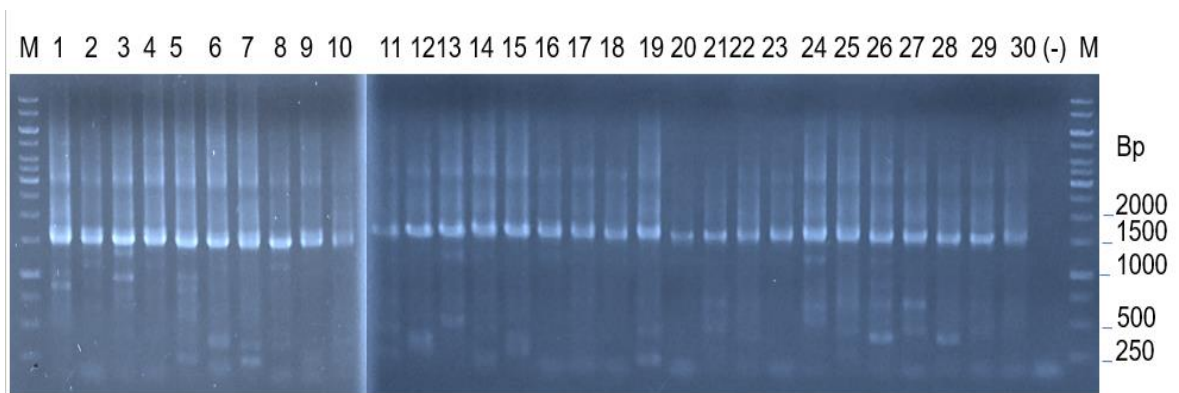
**Hình 3.7.** Điện di đồ phân tích DNA metagenome sau khi tách chiết bằng kit GeneJET từ vi khuẩn trong 30 mẫu phân (âm tính).

*M. DNA chuẩn 1 kb Thermo Fisher Scientific)*

Việc tách mẫu bằng kit GeneJET cũng không có hiệu quả đối với 100% mẫu ở lần đầu tiên mà với mỗi mẫu khác nhau có thể phải tách lại nhiều lần. Có thể do trong mẫu phân có quá nhiều chất ức chế, vi khuẩn trong mẫu lại đa dạng; việc loại bỏ không triệt để các chất ức chế dẫn đến việc phá vỡ tế bào thu DNA không được hiệu quả. Hoặc do trong quá trình chiết, vi khuẩn có thể bị phân hủy dẫn đến hàm lượng DNA thu được thấp. Nồng độ DNA đa hệ gen thu được khá thấp so với phương pháp tách chiết bằng phenol:chloroform. Mẫu có nồng độ DNA thấp nhất là 5,3 (ng/ $\mu$ l) (mẫu H03) và mẫu có nồng độ DNA cao nhất là 65,3 (ng/ $\mu$ l) (mẫu H17). Chỉ số  $A_{260}/A_{280}$  của các mẫu đạt từ 1,6-2,0 trong đó chỉ có 4 mẫu có chỉ số  $A_{260}/A_{280}$  có giá trị  $< 1,8$ . Các mẫu có chỉ số  $A_{260}/A_{230}$  dao động rất lớn. Có 4 mẫu không xác định được chỉ số này,



9 mẫu có chỉ số  $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$ , 17 mẫu có chỉ số này  $\leq 1,7$  (Phụ lục 6). Trên thế giới, khá nhiều nghiên cứu khảo sát các phương pháp khác nhau để tách chiết DNA metagenome của vi khuẩn trong mẫu phân. Tuy nhiên, các nghiên cứu đều chỉ ra rằng sự có mặt của chất ức chế làm cho các xét nghiệm sinh học phân tử từ nguồn gen trong mẫu phân gặp khó khăn. Costea và đồng tác giả đã khảo sát 21 phương pháp tách chiết khác nhau và thử nghiệm trong 21 phòng thí nghiệm trên 11 nước để xem độ lặp lại của kết quả tách chiết. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã kết luận kết quả khó lặp lại được ở các mẫu có hàm lượng phân thấp [114].



**Hình 3.8.** Điện di đồ phân tích gen 16S rRNA được khuếch đại từ DNA đa hệ gen của vi khuẩn tách bằng kit GeneJET từ 30 mẫu phân (âm tính).

*M.* DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific); (-): đối chứng âm

Dựa trên kết quả điện di đồ hình 3.8, có thể thấy ở tất cả các mẫu, sản phẩm khuếch đại gen 16S rRNA từ khuôn là DNA metagenome tách chiết bằng kit GeneJET đều thể hiện đoạn DNA có kích thước 1,5 kb tương ứng với kích thước gen của gen 16S rRNA. Ngoài băng này ra, trên điện di đồ còn thấy xuất hiện các băng phụ có kích thước nhỏ ở một số mẫu. Các gen ngắn này thường xuất hiện khi gen được khuếch đại bằng chương trình tough-up PCR khi nhiệt độ gắn môi được điều chỉnh tăng dần từ thấp lên cao. Chương trình này giúp khuếch đại đa dạng các đoạn gen. Nghiên cứu của Pechgit và đồng tác giả [115] cũng chỉ ra rằng, chương trình tough-up giúp khuếch đại đa dạng các trình tự, trong đó ở những chu kỳ đầu, nhiệt độ gắn môi giảm thấp giúp môi bám vào đa dạng các sợi khuôn. Do đó, các chu trình đầu của chương trình PCR đã khuếch đại làm tăng mạnh nguồn gen này trong mẫu theo cấp số nhân. Như vậy, ở lượng 2 ng/phản ứng PCR (10  $\mu$ l) thì DNA đa

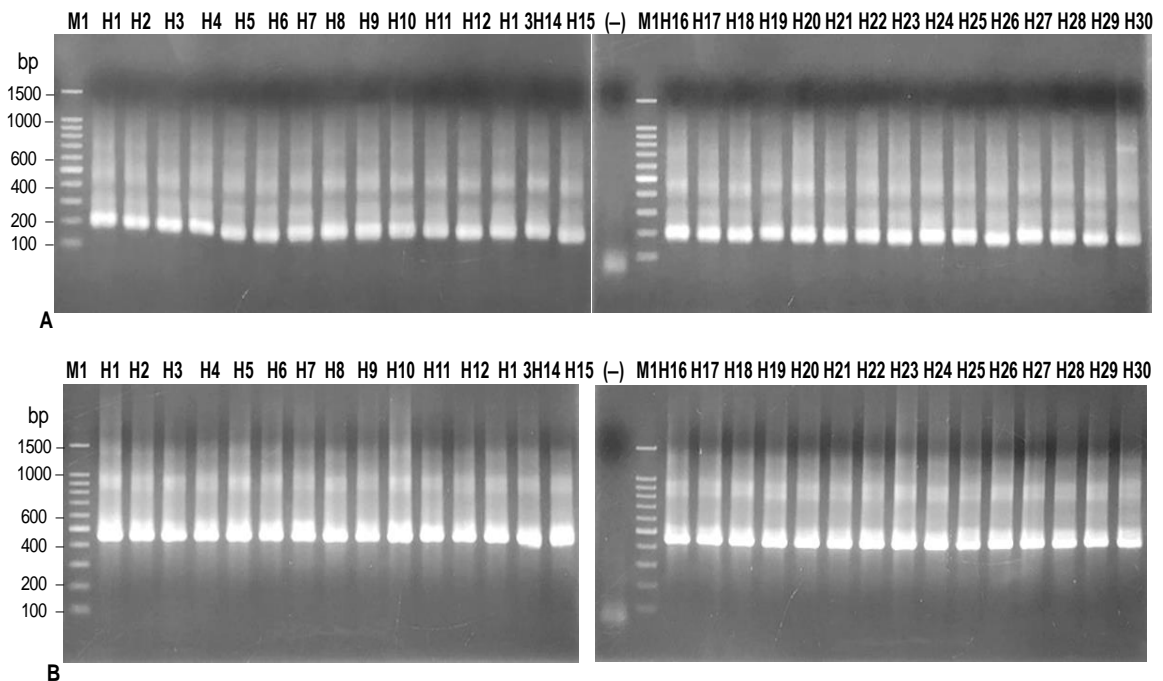
hệ gen không có chất ức chế polymerase, đảm bảo cho việc giải trình tự đa hệ gen.

Tóm lại, dựa vào những kết quả đã phân tích ở trên, có thể kết luận DNA đa hệ gen của vi khuẩn trong 30 mẫu phân âm tính với các tác nhân gây tiêu chảy thông thường, đã được tách chiết thành công bằng hai phương pháp khác nhau là phương pháp phenol:chloroform và kit GeneJET.

### 3.2.2. Đa dạng phổ vi khuẩn trong các mẫu phân dựa vào phân tích DGGE vùng gen V3, V6-V8

#### 3.2.2.1. Khuếch đại vùng gen V3, V6-V8

Trước khi thực nghiệm thí nghiệm, chúng tôi đã khảo sát nguồn gen sử dụng, kết quả cho thấy việc phối trộn hai nguồn gen được tách chiết bằng phương pháp phenol:chloroform và kit GeneJET sẽ giúp các vùng gen V3, V6-V8 khuếch đại được đa dạng hơn. Vì vậy trong nội dung nghiên cứu này, gen 16S rRNA của một mẫu khuếch đại từ DNA đa hệ gen được tách chiết bằng hai phương pháp ở trên được trộn chung theo tỷ lệ 1:1 về hàm lượng để làm khuôn khuếch đại vùng V3, V6-V8.



**Hình 3.9.** Điện di đồ phân tích sản phẩm khuếch đại gen V3 (A), V6-V8 (B) trên gel agarose 0,8 %.

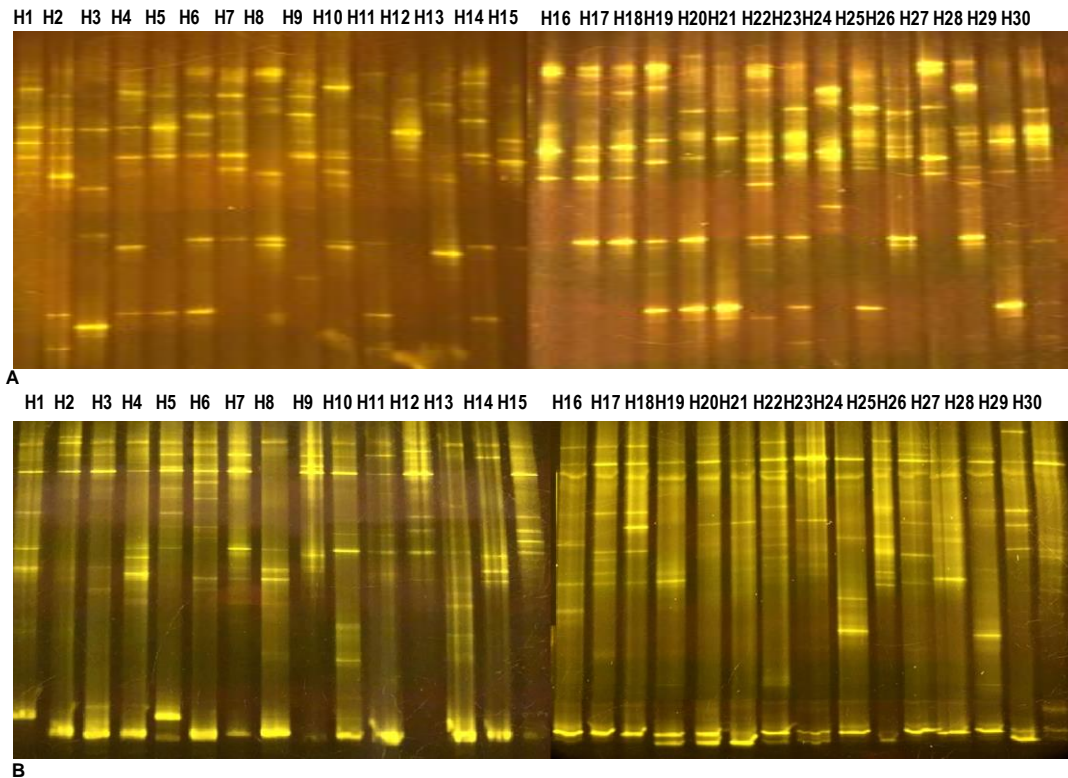
M1: 100 bp DNA marker (Intron, Korea); (-): Đối chứng âm không có DNA khuôn; H1-H30: 30 mẫu từ 30 trẻ khỏe mạnh



Kết quả (Hình 3.9) cho thấy, vùng V3 và V6-V8 của vi khuẩn trong 30 mẫu phân trẻ khỏe mạnh đã được khuếch đại thành công. Vùng V3 có kích thước khoảng gần 200 bp và vùng V6-V8 có kích thước khoảng gần 450 bp như tính toán lý thuyết. Sản phẩm PCR (1 µg/mẫu) được dùng để phân tích đa dạng gen trên gel polyacrylamide 8% có chất biến tính urea và deion formamide.

### 3.2.2.2. Phân tích vùng gen V3, V6-V8 trên gel polyacrylamide bằng DGGE

Kết quả (Hình 3.10) cho thấy mặc dù vùng V3, V6-V8 được khuếch đại có cùng kích thước nhưng trên gel điện di biến tính chúng đã được phân tách thành các băng rất khác biệt nhau. Phổ băng của các mẫu khác nhau là khác nhau. Nhìn trên điện di đồ có thể thấy vùng V3 được phân tách thành các băng trải đều trên điện di đồ, vùng V6-V8 phân tách thành các băng cao hơn tập trung nhiều ở phần gel có nồng độ chất biến tính thấp. Mẫu càng có nhiều băng thì có độ đa dạng loài vi sinh càng lớn. Băng càng đậm thể hiện gen của vi khuẩn trội càng cao. Như vậy, nhìn trên điện di đồ phân tích vùng gen V3 có thể thấy, vi khuẩn trong mẫu H12 ít đa dạng nhất.



**Hình 3.10.** Điện di đồ DGGE phân tích vùng gen V3 (A), V6-V8 (B) trên gel polyacrylamide 8%.

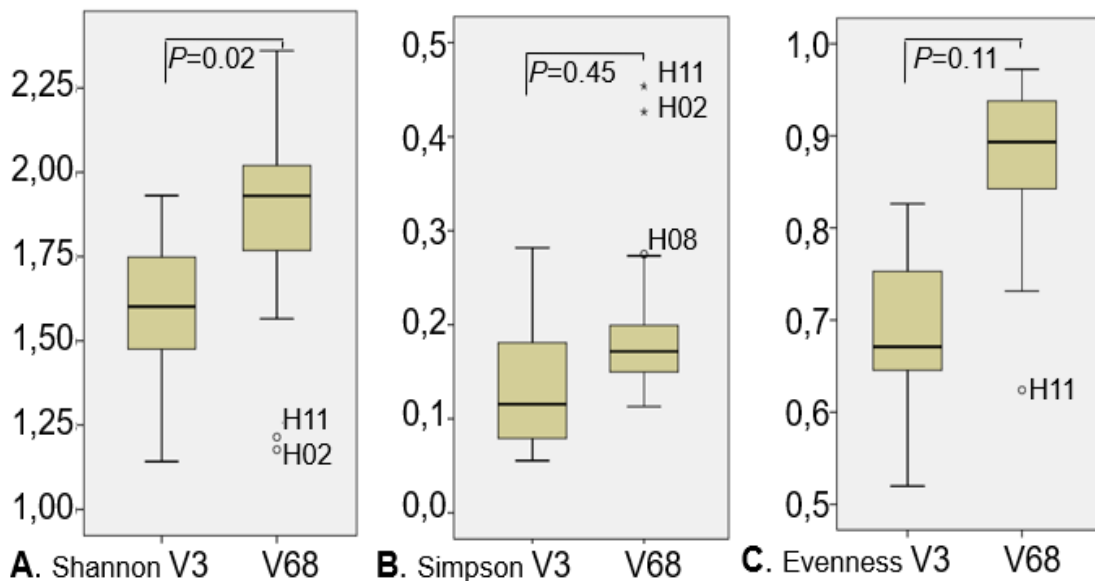
**Bảng 3.2.** Chỉ số đa dạng vi khuẩn của các mẫu dựa trên phân tích vùng V3, V6-V8 gen 16S rRNA

Mẫu	V3				V6-V8			
	H0	E	D	1-D	H0	E	D	1-D
H1	1.42	0.65	0.12	0.88	1.81	0.93	0.18	0.82
H2	1.77	0.69	0.14	0.86	1.18	0.73	0.43	0.57
H3	1.40	0.68	0.26	0.74	1.57	0.80	0.27	0.73
H4	1.79	0.65	0.06	0.94	2.02	0.84	0.18	0.82
H5	1.75	0.73	0.15	0.85	2.08	0.87	0.17	0.83
H6	1.93	0.75	0.11	0.89	1.94	0.84	0.20	0.80
H7	1.54	0.67	0.08	0.92	1.86	0.89	0.18	0.82
H8	1.45	0.60	0.08	0.92	1.64	0.79	0.28	0.72
H9	1.64	0.66	0.09	0.91	1.85	0.95	0.17	0.83
H10	1.51	0.77	0.10	0.90	2.04	0.89	0.16	0.84
H11	1.48	0.76	0.22	0.78	1.21	0.62	0.45	0.55
H12	1.61	0.83	0.17	0.83	1.96	0.89	0.17	0.83
H13	1.61	0.61	0.19	0.81	1.77	0.80	0.26	0.74
H14	1.43	0.62	0.07	0.93	1.60	0.89	0.24	0.76
H15	1.54	0.70	0.18	0.82	1.89	0.97	0.16	0.84
H16	1.48	0.59	0.13	0.87	1.92	0.87	0.19	0.81
H17	1.63	0.66	0.10	0.90	2.16	0.94	0.13	0.87
H18	1.67	0.67	0.12	0.88	2.02	0.92	0.15	0.85
H19	1.65	0.66	0.07	0.93	1.71	0.95	0.19	0.81
H20	1.72	0.78	0.18	0.82	1.63	0.84	0.23	0.77
H21	1.50	0.65	0.28	0.72	1.98	0.95	0.15	0.85
H22	1.91	0.72	0.07	0.93	2.36	0.92	0.11	0.89
H23	1.88	0.78	0.14	0.86	1.95	0.89	0.17	0.83
H24	1.37	0.62	0.10	0.90	1.82	0.94	0.17	0.83
H25	1.60	0.67	0.09	0.91	2.22	0.93	0.13	0.87
H26	1.80	0.82	0.16	0.84	2.21	0.92	0.13	0.87
H27	1.14	0.52	0.06	0.94	1.84	0.95	0.17	0.83
H28	1.47	0.59	0.07	0.93	1.94	0.88	0.17	0.83
H29	1.79	0.78	0.22	0.78	2.01	0.97	0.14	0.86
H30	1.55	0.67	0.22	0.78	2.07	0.94	0.14	0.86
<b>Trung vị</b>	<b>1.61</b>	<b>0.67</b>	<b>0.12</b>	<b>0.88</b>	<b>1.93</b>	<b>0.89</b>	<b>0.17</b>	<b>0.83</b>
<b>Trung bình</b>	<b>1.6±0.2</b>	<b>0.7±0.1</b>	<b>0.1±0.1</b>	<b>0.9±0.1</b>	<b>1.9±0.3</b>	<b>0.9±0.1</b>	<b>0.2±0.1</b>	<b>0.8±0.1</b>

H0: Chỉ số đa dạng Shannon, E: Chỉ số đồng đều Shannon, D: Chỉ số ưu thế Simpson, 1-D: Chỉ số đa dạng Simpson.

Tính trên cả 30 mẫu thì số băng V3 được phân tách và được máy quét phát hiện trên điện di đồ là 38 băng, trong đó vùng V6-V8 chỉ phân tách ra thành 28 băng. Vùng V3 có số băng DNA phát hiện được trong từng mẫu giao động từ 7 đến 16 băng. Mẫu kém đa dạng nhất là mẫu số H10, H11, H12 và mẫu có vi sinh đa dạng nhất là mẫu H4. Trong khi đó vùng V6-V8 có số băng dao động từ 5 băng (mẫu H2) đến 13 băng (mẫu H22). Điều đó cho thấy, số loài có khả năng phân biệt dựa trên V3 là đa dạng hơn số loài có khả năng phân biệt dựa vào vùng gen V6-V8.

Kết quả phân tích đa dạng vi khuẩn dựa trên phân tích DGGE cho thấy chỉ số đa dạng Shannon của vùng V6-V8 cao hơn chỉ số Shannon vùng V3, sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $P=0,02$ ). Chỉ số Shannon vùng V3 trung bình là 1,6 trong khi đó chỉ số Shannon vùng V6-V8 trung bình là 1,9. Chỉ số Shannon đánh giá độ giàu có của loài. Vùng V6-V8 có chỉ số Shannon cao hơn tức hàm lượng DNA của mỗi băng trên gel điện di cao hơn vùng V3.



**Hình 3.11.** So sánh chỉ số đa dạng của vùng gen V3, V6-V8.

A. Chỉ số Shannon, B. Chỉ số Simpson, C. Chỉ số Evenness

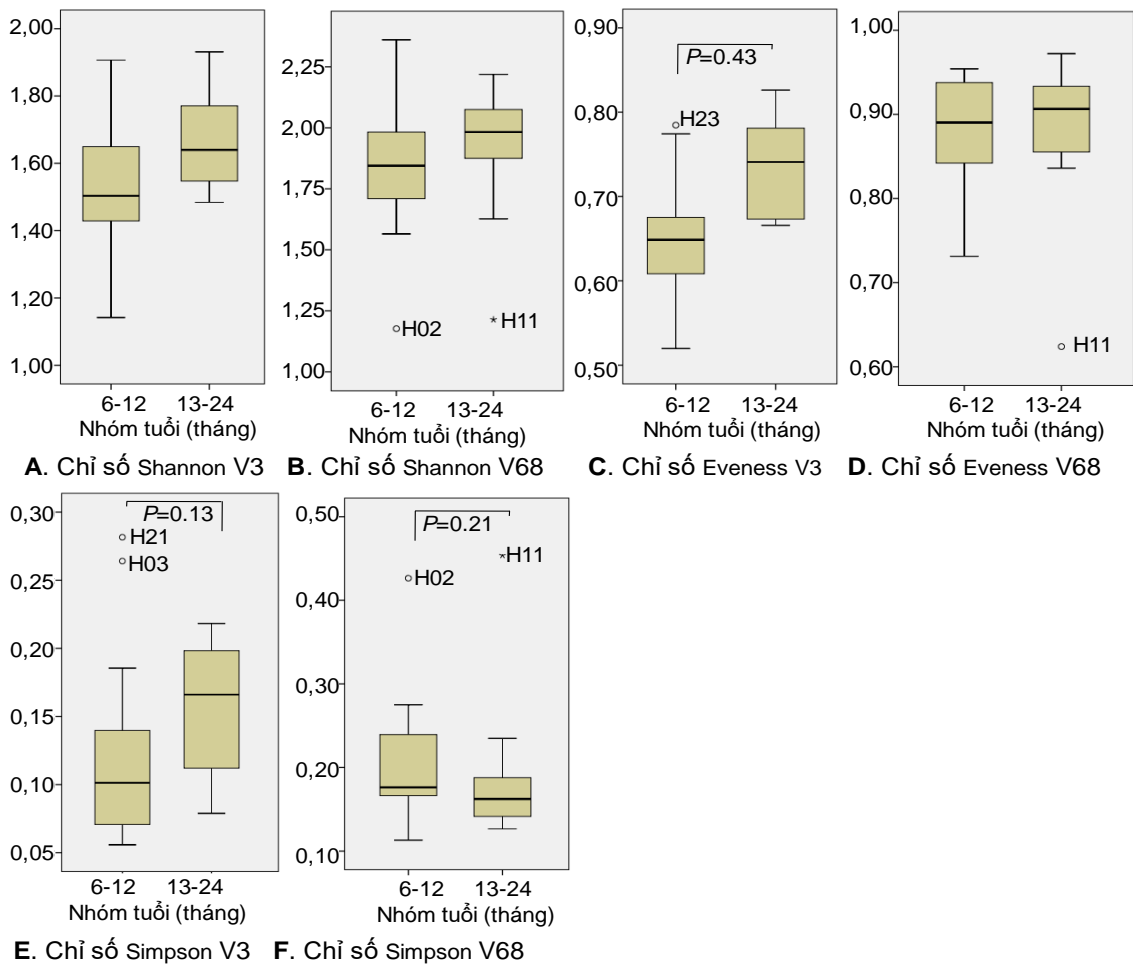
Từ chỉ số Shannon thì chỉ số về độ đồng đều của các băng cũng đã được đánh giá qua chỉ số Evenness (E). Chỉ số E có giá trị nằm trong khoảng 0-1 trong đó E=1 thể hiện mẫu có độ đồng đều cao nhất. Qua phân tích chỉ số E của vùng V6-V8 trung bình đạt 0,9, trung vị đạt 0,89 trong khi đó chỉ số E của vùng V3 thấp hơn với trung bình đạt 0,7 và trung vị đạt 0,67. Điều đó chứng

tỏ các băng DNA của vùng V6-V8 đồng đều hơn vùng V3. Kết quả đánh giá chỉ số E và chỉ số Shannon có sự phù hợp với nhau (Hình 3.11).

Về độ đa dạng, chỉ số Simpson (D) cũng dao động trong khoảng giá trị 0-1 trong đó chỉ số D càng nhỏ thì mẫu có độ đa dạng càng lớn. Chỉ số D của vùng V3 dao động rất lớn ở các mẫu từ 0,06 (mẫu H4, H27) đến 0,28 (mẫu H21) với trung bình là 0,1 và trung vị là 0,12. Trong khi đó chỉ số D của vùng V6-V8 của các mẫu cao hơn, dao động ít hơn (thể hiện độ đồng đều cao hơn) từ 0,11 (mẫu H22) đến 0,28 (mẫu H8) trong đó có 2 mẫu có chỉ số rất cao ( $D > 0,4$ ) là mẫu H02, H11 nằm ngoài khoảng thống kê (Hình 3.11-B). Điều này chứng tỏ mẫu phân tích dựa trên vùng V3 đa dạng hơn mẫu phân tích dựa trên vùng V6-V8. Kết quả này tương đồng với kết quả phân tích số lượng băng DNA trên điện di đồ DGGE.

Kết quả khảo sát độ đa dạng theo giới tính cho thấy sự đa dạng của mẫu không phụ thuộc vào giới tính nam hoặc nữ. Chỉ số đa dạng của mẫu cũng không phụ thuộc vào nhóm tuổi ( $P > 0,05$ ) nhưng các chỉ số Shannon, Evenness của nhóm tuổi 13-24 tháng tuổi có xu hướng cao hơn ở cả mẫu phân tích dựa trên vùng V3, V6-V8 chứng tỏ vi khuẩn trong mẫu phân trẻ lớn tuổi phong phú, giàu có và đồng đều hơn nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi. Các chỉ số Simpson vùng V3 của vi khuẩn trong mẫu phân trẻ 13-24 tháng tuổi cũng có xu hướng cao so với trẻ 6-12 tháng tuổi chứng tỏ vi khuẩn trong mẫu phân trẻ lớn tuổi ít đa dạng về loài hơn so với trẻ 6-12 tháng tuổi (Hình 3.12-E). Kết quả này tương ứng với kết quả tách vi khuẩn trong mẫu phân ở trên hình 3.4.

Tuy nhiên, phân tích chỉ số D của vùng V6-V8 thì có sự khác biệt so với vùng V3. Hình 3.12-F cho thấy, chỉ số D ở nhóm trẻ 13-24 tháng thấp hơn chỉ số D của nhóm trẻ 6-12 tháng. Điều đó chứng tỏ vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ 13-24 tháng tuổi lại có xu hướng đa dạng hơn về loài so với nhóm trẻ 6-12 tháng. Tuy nhiên, giá trị  $P (= 0,21)$  của chỉ số Simpson V6-V8 lớn hơn giá trị  $P (= 0,13)$  của chỉ số Simpson V3 nên có thể thấy việc phân tích đa dạng theo vùng V3 có độ tin cậy cao hơn.



**Hình 3.12.** So sánh chỉ số đa dạng của vùng gen V3, V6-V8 ở hai nhóm tuổi 6-12 tháng và 13-24 tháng.

A, B. Chỉ số Shannon; C, D. Chỉ số Evenness; E, F. Chỉ số Simpson

Phân tích DGGE vùng V3, V6-V8 của gen 16S rDNA thường được sử dụng trong đánh giá đa dạng vi khuẩn trong phân của trẻ để tìm ra sự mất cân bằng vi sinh trong bệnh như dị ứng [116], [117] hay bệnh eczema [118], tiêu chảy [104]. Phân tích vùng V2-V3 bằng DGGE đã cho thấy sự mất cân bằng vi khuẩn ở bệnh viêm ruột [119]. PCR-DGGE phân tích vùng V6-V8 đã được áp dụng trong xác định dịch tễ tiêu chảy ở người

Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, vùng V3-V5 của gen 16S rRNA là thích hợp cho phát hiện *Klebsiella*, vùng V1-V3 thích hợp cho phát hiện *Escherichia* và *Shigella* [120]. Các vi khuẩn này phổ biến trong hệ tiêu hóa và có liên quan đến tiêu chảy ở trẻ. Vùng V3 cũng đã được đánh giá là vùng tốt nhất cho phân tích bằng PCR-DGGE [121] trong khi đó vùng V6-V8 có khả năng phân biệt đánh giá đa dạng tốt cho các vi khuẩn thuộc hai chi

*Clostridium* và *Staphylococcus* [122]. Tuy nhiên vùng gen này không thể phân biệt được vi khuẩn *E. coli* và *Shigella* spp [104]. Như vậy, mỗi vùng gen có ưu điểm riêng. Sự đa dạng của vi khuẩn trong các mẫu phân sẽ được khẳng định lại bằng giải trình tự DNA đa hệ gen.

Theo lý thuyết, trẻ lớn tuổi hơn sẽ ăn các thức ăn đa dạng hơn và hệ vi sinh hình thành bắt đầu ổn định hơn nên có sự đa dạng loài cao hơn. Vì vậy, để khảo sát đa dạng vi sinh trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh ở hai nhóm tuổi, chúng tôi đã giải trình tự, phân tích đa dạng dựa trên gen 16S rRNA và phân tích metagenomic DNA của vi khuẩn trong hai nhóm tuổi. Trong khuôn khổ luận văn thạc sĩ, chúng tôi trình bày kết quả đánh giá đa dạng vi khuẩn dựa trên phân tích metagenomic DNA của vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ ở hai nhóm tuổi 6-12 tháng tuổi và 13-24 tháng tuổi.

### **3.2.3. Đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh không bị tiêu chảy**

Metagenomic DNA của vi khuẩn từ mỗi mẫu được trộn theo tỷ lệ tương đương về hàm lượng. Mẫu từ nhóm trẻ khỏe mạnh có độ tuổi 6-12 tháng tuổi được ký hiệu là HMG1 và trẻ ở độ tuổi 13-24 tháng tuổi được ký hiệu là HMG2. Lượng DNA được gửi giải trình tự từ hai nhóm tương ứng với 102 µg và 104 µg.

**Bảng 3.3.** Tổng quát bộ dữ liệu giải trình tự metagenome vi khuẩn trong phân của nhóm trẻ khỏe mạnh có độ tuổi 6-24 tháng tuổi

	<b>Chất lượng giải trình tự Q30</b>	<b>Trình tự sạch (bp)</b>	<b>Kích thước sau lắp ghép</b>	<b>Kích thước trung bình</b>	<b>Số lượng contig</b>	<b>Tỷ lệ bao phủ (mapping rate)</b>	<b>Số lượng gen</b>
<b>HMG 1</b>	94,03%	23358567600	170312426	1580	107747	78.08	176200
<b>HMG 2</b>	93,67%	20252874600	114248877	1821	62736	85.59	123021

*HMG1: Trẻ 6-12 tháng tuổi; HMG2: 13-26 tháng tuổi*

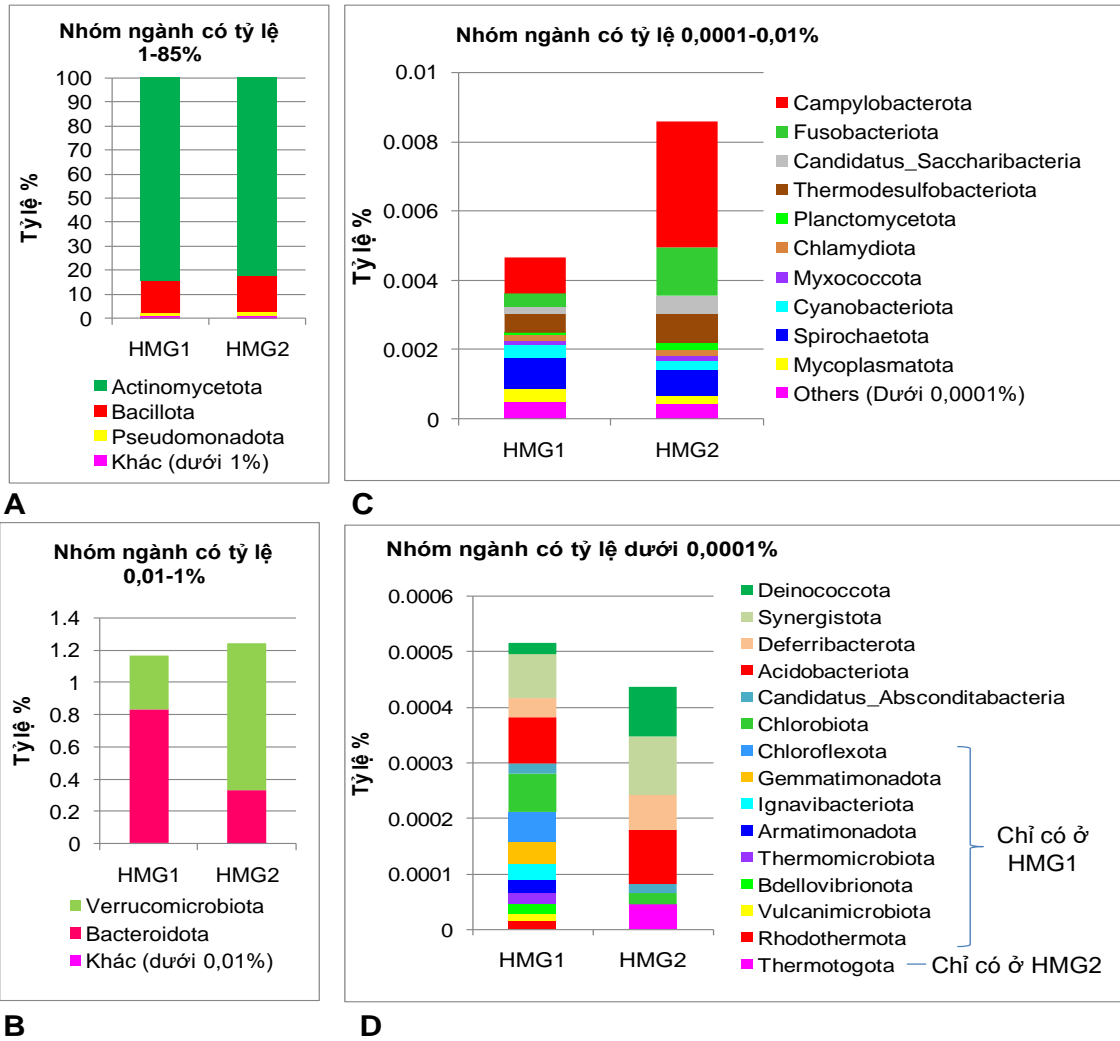
Kết quả giải trình tự cho thấy, cả hai nhóm mẫu đều được giải có chất lượng tốt với Q30 lớn hơn 90%, nghĩa là trên 90% nucleotide ở mỗi vị trí có độ chính xác lên tới 99,9%.

Mặc dù lượng DNA được giải là như nhau nhưng bộ dữ liệu của trẻ 6-12 tháng tuổi (HMG1) thu được lớn hơn với kích thước lên tới 23 Gb, trong khi đó bộ dữ liệu của trẻ 13-24 tháng tuổi (HMG2) chỉ đạt 20 Gb. Tuy nhiên, tỷ lệ sử dụng read để lắp ráp thành contig ở HMG2 cao hơn, đạt 85,59% (Bảng 3.3). Điều đó chứng tỏ đa dạng về loài vi sinh vật trong mẫu trẻ 13-24 tháng tuổi thấp hơn so với nhóm trẻ nhỏ 6-12 tháng tuổi. Kết quả này được làm sáng tỏ hơn sau khi định danh và phân tích sự đa dạng của vi sinh vật trong hai loại mẫu. Mẫu từ nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi đều có số lượng vi sinh cũng như vi khuẩn được phân loại vào các thứ bậc phân loại từ loài cho đến ngành đều cao hơn so với mẫu từ nhóm trẻ 13-24 tháng tuổi (Bảng 3.4).

**Bảng 3.4.** Đa dạng vi sinh vật trong phân của nhóm trẻ khỏe mạnh có độ tuổi 6-24 tháng tuổi

Tên mẫu	Giới	Ngành	Lớp	Bộ	Họ	Chi	Loài
<b>Hệ vi sinh tổng số</b>							
HMG1	4	36	61	120	244	663	1790
HMG2	4	29	51	110	227	575	1570
<b>Hệ vi khuẩn</b>							
HMG1 (74714450 reads)	1	29	48	101	220	631	1738
HMG2 (64276198 reads)	1	22	39	99	206	544	1533

Kết quả phân tích ngành vi khuẩn trội trong hai nhóm trẻ cho thấy, vi khuẩn Actinomycetota là vi khuẩn trội nhất, chiếm đại đa số vi khuẩn trong phân của trẻ. Tỷ lệ ngành vi khuẩn này ở hai nhóm 6-12 tháng tuổi và 13-24 tháng tuổi đạt lần lượt là 84,5% và 82,6%. Kết quả này tương đồng với kết quả của Turoni và cộng sự, khi phân tích thành phần của hệ vi khuẩn đường ruột ở trẻ sơ sinh với kết quả Actinomycetota chiếm 88,5% và ngành Firmicutes chiếm 11,1% [123].



**Hình 3.13.** Đa dạng ngành vi khuẩn trong phân của trẻ khỏe mạnh 6-24 tháng tuổi.

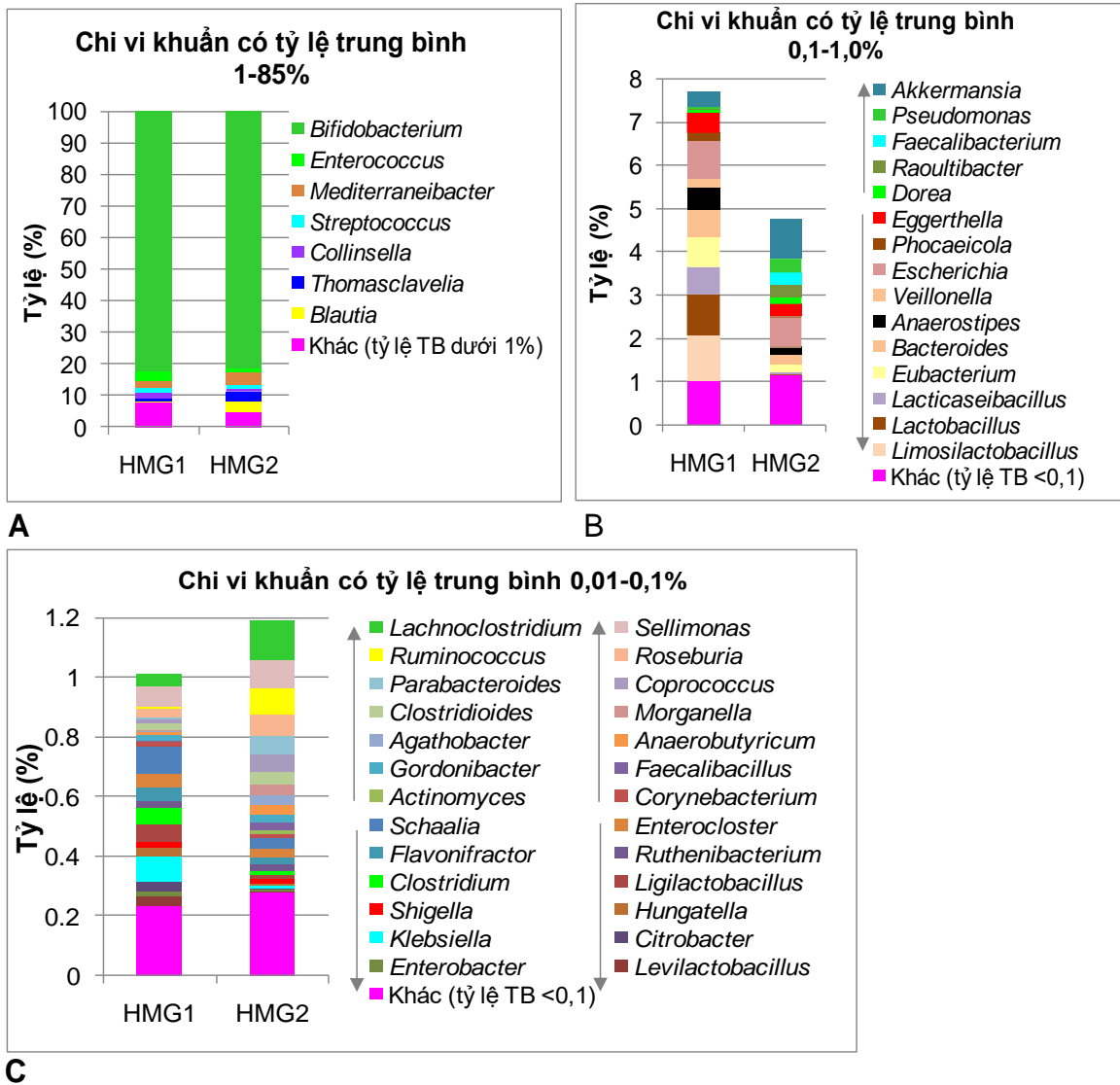
HMG1, HMG2: tương ứng với mẫu từ nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi và 13-24 tháng tuổi; A-D: Biểu đồ phân bố tỷ lệ % của các ngành theo nhóm tương ứng chiếm tỷ lệ 1-85%; 0,01-1%; 0,0001-0,01% và dưới 0,0001%

Ngành trội tiếp theo là Bacillota (Firmicutes) , chiếm 13,3% ở mẫu phân trẻ 6-12 tháng tuổi và chiếm 15,0% trong phân trẻ 13-24 tháng tuổi. Vi khuẩn ngành Pseudomonadota chiếm khoảng trên 1% ở cả hai nhóm tuổi. Ba ngành vi khuẩn trội này đã bao trùm 98,8% vi khuẩn đường ruột ở trẻ 6-24 tháng tuổi. Mặc dù ngành Actinomycetota có giảm nhẹ và ngành Bacillota có tăng hơn ở nhóm mẫu HMG2 so với nhóm HMG1 nhưng sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ( $P=0,48$ ). Như vậy, về cơ bản cấu trúc của hệ vi khuẩn trội của hai nhóm trẻ không có sự khác biệt.



Hai ngành cũng được xem là trội trong hệ vi sinh nhưng chiếm tỷ lệ thấp hơn là Bacteroidota và Verrucomicrobiota. Mặc dù tổng phần trăm của hai ngành này trong hệ vi khuẩn đường ruột của hai nhóm trẻ là tương đương nhau nhưng Bacteroidota trong mẫu HMG1 cao gấp 2,6 lần so với mẫu HMG2 và ngược lại ngành Verrucomicrobiota trong mẫu HMG2 lại có tỷ lệ cao gấp 2,7 lần so với mẫu HMG1. Verrucomicrobiota là vi khuẩn Gram âm, thường tìm thấy trong phân người. Vi khuẩn *Akkermanisa muciniphila* là vi khuẩn thuộc ngành Verrucomicrobiota có lợi phổ biến đang được quan tâm là nhóm lợi khuẩn làm tăng chiều cao ở trẻ em [124].

Kết quả phân tích ngành vi khuẩn có tỷ lệ thấp hơn cho thấy ngành Campylobacterota, Fusobacteriota, Candidatus\_Saccharibacteria tăng cao ở nhóm trẻ 13-24 tháng tuổi (Hình 3.13). Nhiều ngành (tám ngành) vi khuẩn có tỷ lệ thấp chỉ quan sát thấy ở nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi mà không thấy ở trẻ lớn hơn bao gồm Rhodothermota, Vulcanimicrobiota, Bdellovibrionota, Thermomicrobiota, Armatimonadota, Ignavibacteriota, Gemmatimonadota, Chloroflexota và ngược lại chỉ có một ngành Thermotogota tìm thấy ở nhóm trẻ lớn tuổi hơn mà không thấy ở trẻ 6-12 tháng tuổi. Rất có thể sự có mặt của 8 ngành vi khuẩn tìm thấy trong mẫu HMG1 mà không có ở nhóm HMG2 là vì bộ dữ liệu HMG1 lớn hơn nên cơ hội tìm thấy nhiều trình tự của vi khuẩn có tần số xuất hiện thấp trong mẫu tốt hơn.



**Hình 3.14.** Đa dạng chi vi khuẩn trong phân của trẻ khỏe mạnh 6-24 tháng tuổi.

HMG1, HMG2: tương ứng với mẫu từ nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi và 13-24 tháng tuổi; A-C: Biểu đồ phân bố tỷ lệ phần trăm của các chi vi khuẩn theo nhóm tương ứng chiếm tỷ lệ trung bình của hai nhóm 1-85%; 0,1-1,0%; 0,01-0,1%

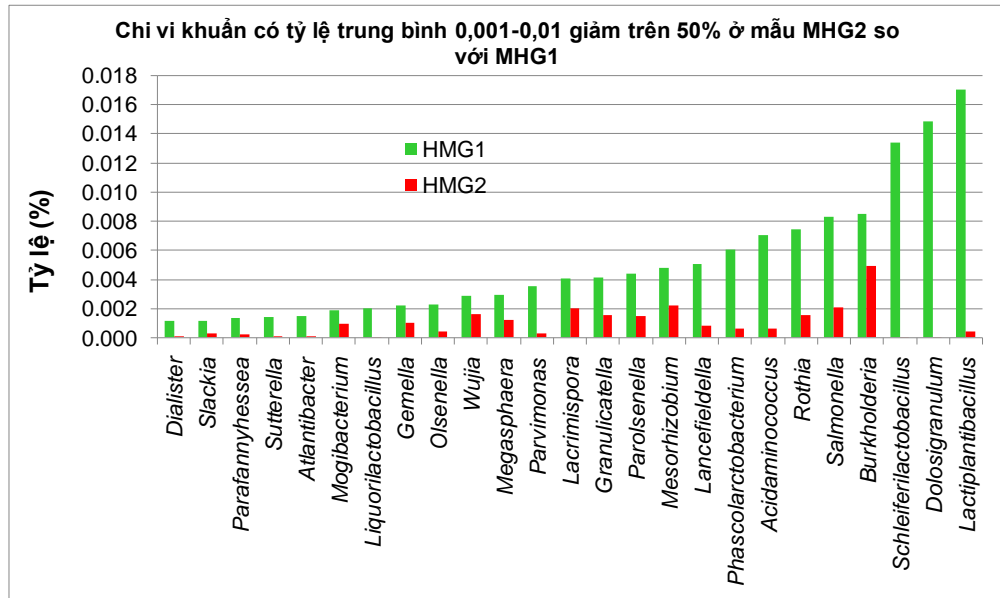
Kết quả phân tích cấu trúc chi vi khuẩn trội cho thấy, vi khuẩn trong phân của trẻ khỏe mạnh được hình thành từ 7 chi vi khuẩn chính bao gồm *Bifidobacterium* (trung bình chiếm 81,75%), tiếp theo là *Mediterraneibacter* (2,9%), *Enterococcus* (2,3%), *Thomasclavelia* (2,0%), *Blautia* (1,9%), *Streptococcus* (1,6%) và *Collinsella* (1,1%). Trong đó tỷ lệ của hai chi *Bifidobacterium* và *Streptococcus* giảm không đáng kể ở trẻ 13-24 tháng tuổi so với nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi. Kết quả của chúng tôi tương đồng với

kết luận của nhóm nghiên cứu của Stark và Lee, số lượng vi khuẩn chi *Bifidobacterium* chiếm tỷ lệ rất lớn, hầu như không có sự thay đổi trong suốt năm đầu đời [125]. Nồng độ *Bifidobacterium* cao trong ruột trẻ sơ sinh có liên quan đến sự phát triển và trưởng thành kịp thời và phù hợp của hệ thống miễn dịch. Tác dụng chống viêm rõ rệt nhất được thể hiện bởi các loài *Bifidobacterium*, chúng điều hòa tăng sản xuất cytokine (IL-10), làm giảm biểu hiện của các phân tử đồng kích thích CD80 và CD40 [126]. *B. thetaiotaomicron* là vi khuẩn được biết đến với các chức năng có lợi như hấp thụ chất dinh dưỡng, củng cố hàng rào niêm mạc, hình thành mạch máu và trưởng thành ruột sau sinh [127].

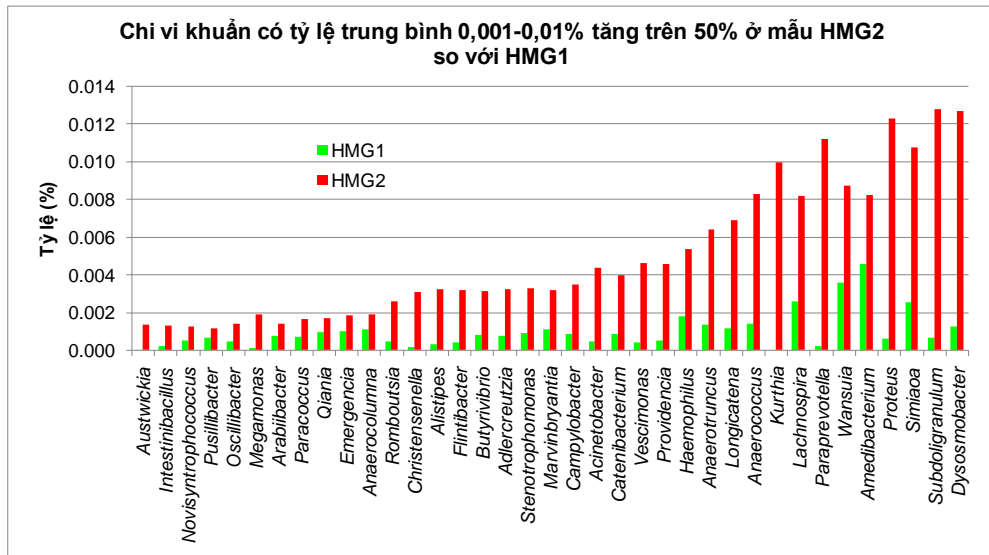
Các chi khác gồm *Enterococcus* và *Collinsella* có tỷ lệ giảm khoảng 2,2-2,3 lần ở nhóm trẻ 13-24 tháng tuổi so với trẻ 6-12 tháng tuổi. Trong khi đó ở nhóm tuổi của trẻ lớn hơn có tỷ lệ *Mediterraneibacter*, *Thomasclavelia* và *Blautia* tăng gấp 1,9 đến 3 lần so với nhóm trẻ nhỏ (Hình 3.14-A). Như vậy có thể thấy các chi vi khuẩn có lợi, yếm khí và vi sinh hiếu khí đóng vai trò quan trọng giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột là những vi sinh thiết lập cấu trúc ổn định của hệ vi sinh đường ruột, đặc biệt vi sinh có vai trò trong việc tăng sinh lớp màng nhày ruột như *Bifidobacterium* và vi sinh sử dụng oxy như *Streptococcus*.

Các chi vi khuẩn có tỷ lệ thấp hơn (chiếm 0,1-1,0%) trong hệ vi sinh cũng có sự dao động. Chi vi khuẩn có tỷ lệ giảm đáng kể ở nhóm trẻ lớn gồm là chi *Limosilactobacillus* (giảm 393 lần), *Lactobacillus* (giảm 320 lần), *Lacticaseibacillus* (giảm 93 lần), *Veillonella* (giảm 17 lần) và *Phocaeicola* (giảm 7 lần). Các chi có tỷ lệ giảm nhẹ (2-3 lần) gồm *Eubacterium*, *Bacteroides* và *Anaerostipes*. Các chi vi khuẩn *Escherichia*, *Eggerthella* và *Dorea* có tỷ lệ ổn định ở hai nhóm tuổi. Chi vi khuẩn có tỷ lệ tăng đáng chú ý là *Raoultibacter* (tăng 243 lần) tiếp theo là *Pseudomonas* (tăng 53 lần), *Faecalibacterium* (tăng 11 lần) và *Akkermansia* (tăng 2,7 lần) (Hình 3.14-B). *Akkermansia muciniphila* là một loại vi khuẩn phân hủy chất nhày, chiếm ưu thế ở người [128]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, *A. muciniphila* là một vi khuẩn có lợi, có nhiều tiềm năng trong việc phòng ngừa, điều trị bệnh tiểu đường, béo phì [129], [130], [131], [132]. Đây là mối quan tâm cho các nghiên cứu và phát triển trong tương lai. Các nghiên cứu trước cũng chỉ ra

rằng chi *Lactobacillus* chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh [40]. Nhiều loài thuộc chi *Lactobacillus* được phát hiện trong phân su với mức độ phong phú như loài *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. brevis* và *L. casei* [41]. Các nghiên cứu về hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh trong giai đoạn đầu đời cho thấy *L. gasseri* và *L. rhamnosus* chiếm ưu thế [42].



A



B

**Hình 3.15.** Tỷ lệ của các chi vi khuẩn có sự biến động mạnh trong đường ruột của nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi (HMG1) và 13-24 tháng tuổi (HMG2).

A,B: Biểu đồ phân bố tỷ lệ phần trăm của các chi vi khuẩn theo nhóm vi khuẩn giảm và tăng.

Chi vi khuẩn có tỷ lệ thấp hơn, chiếm từ 0,01 đến 0,1% là các chi có thể liên quan tới bệnh tật của trẻ. Các vi khuẩn có khả năng làm tăng chuyển hóa dinh dưỡng có xu hướng tăng lên ở nhóm trẻ có độ tuổi lớn hơn, điển hình là chi *Morganella* (tăng 51,5 lần), *Faecalibacillus* (tăng 13,8 lần), *Ruminococcus* (tăng 12,2 lần), *Parabacteroides* (tăng 8,1 lần), *Coprococcus* (tăng 4,1 lần), *Anaerobutyricum* (tăng 3,6 lần), *Lachnoclostridium* và *Agathobacter* (tăng 3,3 lần). Chi vi khuẩn *Levilactobacillus* có tỷ lệ giảm mạnh nhất (799 lần) ở nhóm trẻ lớn tuổi hơn, trong khi đó một số vi khuẩn thông thường gây tiêu chảy ở trẻ có chiều hướng giảm. Điển hình chi *Enterobacter* giảm 11,8 lần, *Klebsiella* giảm 8 lần, *Citrobacter* giảm 5,1 lần, *Ligilactobacillus* giảm 4,5 lần, *Clostridium* giảm 3,8 lần, *Hungatella* giảm 3,1 lần và *Schaalia* giảm 2,4 lần. Sự khác biệt ở hai nhóm trẻ là chắc chắn, có ý nghĩa thống kê với  $P= 0,0072$ . Như vậy, các vi khuẩn thông thường gây tiêu chảy ở trẻ như *Vibrio*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *E. coli* đã có sự suy giảm rõ rệt ở trẻ 13-24 tháng tuổi và các vi khuẩn có lợi đã được quan sát thấy có sự tăng nhanh về tỷ lệ trong đường ruột trẻ. Đây có thể là nguyên nhân mà trẻ lớn tuổi hơn ít bị ảnh hưởng bởi tiêu chảy hơn trẻ nhỏ.

Kết quả trong hình 3.15 A-B đã thể hiện tỷ lệ của một số vi khuẩn có sự biến động mạnh trong đường ruột. Một số chi vi khuẩn có sự giảm đáng kể ở nhóm trẻ 13-24 tháng phải kể đến là *Schleiferilactobacillus* (giảm 614,1 lần), *Dolosigranulum* (giảm 341,0 lần), *Liquorilactobacillus* (giảm 47,1 lần), *Lactiplantibacillus* (giảm 40,3 lần) *Atlantibacter* (giảm 21,3 lần), *Sutterella* (giảm 17,9 lần), *Acidaminococcus* (giảm 11,6 lần), *Parvimonas* (giảm 11,0 lần), *Dialister* và *Phascolarctobacterium* (giảm 10 lần). Có ý nghĩa thống kê ( $P=1,021E-09$ ). Trong khi đó một số chi vi khuẩn có tỷ lệ tăng mạnh (trên 50%) ở nhóm trẻ lớn tuổi như *Kurthia* (tăng 390,6 lần), *Paraprevotella* (tăng 48,0 lần), *Austwickia* (tăng 30,5 lần), *Proteus* (tăng 19,9 lần), *Subdoligranulum* (tăng 19,6 lần), *Christensenella* (tăng 16,8 lần), *Megamonas* (tăng 13,6 lần), *Vescimonas* (tăng 10,3 lần), *Alistipes* và *Dysosmobacter* (tăng 10 lần). Sự thay đổi tỷ lệ giữa hai nhóm trẻ của các vi khuẩn này có ý nghĩa thống kê với  $P= 5,209E-13$ .

Số chi vi khuẩn được phát hiện ở nhóm trẻ nhỏ nhưng không có trong nhóm trẻ lớn là 224 chi. Có 137 chi vi khuẩn được phát hiện thấy ở trẻ lớn tuổi nhưng không có ở trẻ 6-12 tháng tuổi (Phụ lục 7).

Tóm lại, cấu trúc vi khuẩn ở trẻ 6-24 tháng tuổi khỏe mạnh là tương đối ổn định trong đó vi khuẩn *Bifidobacterium* có vai trò hình thành hệ miễn dịch đường ruột của trẻ chiếm tỷ lệ cao nhất (trung bình chiếm 81,75%), tiếp theo là *Mediterraneibacter*, *Enterococcus*, *Thomasclavelia*, *Blautia*, *Streptococcus* và *Collinsella*. Trẻ 13-24 tháng tuổi có tỷ lệ vi khuẩn có lợi tăng lên, trong đó vi khuẩn gây tiêu chảy thông thường như *Vibrio*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *E. coli* có tỷ lệ giảm rõ rệt so với nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi. Đây có thể là nguyên nhân làm cho trẻ lớn tuổi ít bị tiêu chảy hơn trẻ dưới 12 tháng tuổi.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã sàng lọc được 21 mẫu dương tính với 24 tác nhân gây tiêu chảy chiếm 41%. Trong đó, chủ yếu nhóm vi khuẩn *E. coli* chiếm tỷ lệ lớn (71%).
2. Đánh giá chỉ số Simpson (D) vùng V3 của nhóm trẻ 6-12 tháng có xu hướng thấp hơn nhóm trẻ 13-24 tháng. Chứng tỏ vi khuẩn trong mẫu phân của nhóm trẻ 6-12 tháng có xu hướng đa dạng về loài hơn nhóm trẻ 13-24 tháng.
3. Đánh giá đa dạng vi khuẩn. Kết quả cho thấy:

Cấu trúc hệ vi sinh dựa trên ngành trội của nhóm trẻ 6-12 tháng tuổi và 13-24 tháng tuổi là tương tự nhau, trong đó vi khuẩn thuộc ngành Actinomycetota chiếm trên 80% là vi khuẩn trội nhất, chiếm đại đa số vi khuẩn trong phân của trẻ.

Cấu trúc chi vi khuẩn trội giữa 2 nhóm có sự tương đồng. Chi vi khuẩn *Bifidobacterium* - có vai trò hình thành hệ miễn dịch ở trẻ chiếm tỷ lệ cao nhất, trung bình 81,75%.

Nhóm trẻ 13-24 tháng tuổi: Tăng một số chi vi khuẩn có lợi như *Morganella*, *Faecalibacillus*, *Ruminococcus* và giảm một số chi vi khuẩn có khả năng gây tiêu chảy thông thường như *Klebsiella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*...

### KIẾN NGHỊ

Tiếp tục phân tích sâu hơn về vai trò của các vi khuẩn có lợi trong phân của nhóm trẻ khỏe mạnh để định hướng phân lập nhóm vi khuẩn có lợi cho các ứng dụng lâm sàng.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Nguyễn Thị Quý, Đào Trọng Khoa, Nguyễn Thị Thơm, Đỗ Thị Huyền, 2024, Khảo sát phương pháp PCR-DGGE cho phân tích đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ 6-24 tháng tuổi, *Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học*, 2024, trang 26-31.



## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vogt.S.L., Finlay.B.B., 2017, Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections, *J Travel Med*, 24(1), pp. S39–S43.
- [2] Heintz-Buschart.A., Wilmes.P., 2018, Human gut microbiome: Function matters, *Trends in Microbiology*, 26(7), pp. 563–574.
- [3] Morelli.L., 2008, Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition, *The Journal of Nutrition*, 138(9), pp. 1791S-1795S.
- [4] Kotloff.K.L., 2017, The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries, *Pediatrics Clinics of North America*, 64(4), pp. 799–814.
- [5] Modgil.V., Chaudhary.P., Bharti.B., Mahindroo.J., Yousuf.M., Koundal.M., Mohan.B., Taneja.N., 2021, Prevalence, virulence gene profiling, and characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children with acute diarrhea, asymptomatic nourished, and malnourished children younger than 5 years of age in India, *Journal of Pediatrics*, 234, pp. 106-114.e5.
- [6] Tagbo.B., Chukwubike.C., Ifeyinwa.R., Ani.E., 2019, Adenovirus and Rotavirus associated diarrhoea in fewer than 5 children from Enugu rural communities, South East Nigeria, *World Journal of Vaccines*, 09, pp. 71–83.
- [7] Vu Nguyen T., Le Van. P., Le Huy.C., Nguyen Gia. K.,Weintraub.A., 2006, “Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam,” *International Journal of Infectious Diseases*, 10(4), pp. 298–308.
- [8] Đào Ngọc Diễm, Lê Thị Hải, 2021, Chế độ ăn trong bệnh tiêu chảy kéo dài ở trẻ em,<http://viendinhduong.vn/vi/dinh-duong-tre-em/che-do-an-trong-benh-tieu-chay-keo-dai-o-tre-em.html>
- [9] Finkbeiner.S.R., Allred.A.F., Tarr.P.I., Klein.E.J., Kirkwood.C.D., Wang.D., 2008, Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery, *PLOS Pathogens*, 4(2), pp. e1000011.
- [10] Cheng.S., Ma.X., Geng.S., Jiang.X., Li.Y., Hu.L., Li.J., Wang.Y., Han.X., 2018, Fecal microbiota transplantation beneficially regulates

- intestinal mucosal autophagy and alleviates gut barrier injury, *mSystems*, 3(5), pp. e00137-18.
- [11] Costello.S.P., Hughes.P.A., Waters.O.,, Bryant.R.V., Vincent.A.D.,... 2019, Effect of fecal microbiota transplantation on 8-week remission in patients with ulcerative colitis, *Journal of the American Medical Association* , 321(2), pp. 156–164.
- [12] Cresci.G.A., Bawden.E., 2015, The gut microbiome: What we do and don't know, *Nutr Clin Pract*, 30(6), pp. 734–746.
- [13] Zhu.B., Wang.X., Li.L., 2010, Human gut microbiome: the second genome of human body, *Protein Cell*, 1(8), pp. 718–725.
- [14] Jandhyala.S.M., Talukdar.R., Subramanyam.C., Vuyyuru.H., Sasikala.M., Reddy.D.N., 2015, Role of the normal gut microbiota, *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), pp. 8787–8803.
- [15] Fujisaka.S., Watanabe.Y., Tobe.K., 2022, The gut microbiome: a core regulator of metabolism, *Journal of Endocrinology*, 256(3), pp. e220111.
- [16] Magnúsdóttir.S., Ravcheev.D., de Crécy-Lagard.V., Thiele.I., 2015, Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests cooperation among gut microbes, *Frontiers in Genetics*, 6, pp. 148.
- [17] Wu.S., Yoon.S., Zhang.Y-G.,...Sun.J., 2015, Vitamin D receptor pathway is required for probiotic protection in colitis, *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(5), pp. G341–G349.
- [18] Zhang.M., Shi.M., Fan.M.,...Liu.S., 2018, Comparative analysis of gut microbiota changes in Père David's deer populations in Beijing Milu park and Shishou, Hubei province in China, *Frontiers in Microbiology*, 0.
- [19] Halfvarson.J., Brislawn.C., Lamendella.R.,...Jansson.J.K., 2017, Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease, *Nature Microbiology*, 2, pp. 17004.
- [20] Qin.J., Li.Y., Cai.Z.,...Wang.J., 2012, A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes, *Nature*, 490(7418), pp. 55–60.

- [21] Zhang.X., Zhang.D., Jia.H.,...Wang.J., 2015, The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment, *Nature Medicine*, 21(8), pp. 895–905.
- [22] Luo.X.M., Edwards.M.R., Mu.Q.,...Bankole.A.A., 2018, Gut microbiota in human systemic lupus erythematosus and a mouse model of lupus, *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4), pp. e02288-17.
- [23] Yang.W., Cong.Y., 2021, Gut microbiota-derived metabolites in the regulation of host immune responses and immune-related inflammatory diseases, *Cellular & Molecular Immunology*, 18(4), pp. 866–877.
- [24] Mazmanian.S.K., Round.J.L., Kasper.D.L., 2008, A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease, *Nature*, 453(7195), pp. 620–625.
- [25] Goodman.A.L., McNulty.N.P., Zhao.Y.,...Gordon.J.I., 2009, Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat, *Cell Host Microbe*, 6(3), pp. 279–289.
- [26] Sender.R., Fuchs.S., Milo.R., 2016, Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body, *PLoS Biology*, 14(8), pp. e1002533.
- [27] Booijink.C.C.G.M., El-Aidy.S., Rajilic-Stojanovic.,...Zoetendal.E.G., 2010, High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota, *Environmental Microbiology*, 12(12), pp. 3213–3227.
- [28] Evaldson.G., Heimdahl.A., Kager.L., Nord.C.E., 1982, The normal human anaerobic microflora, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement*, 35, pp. 9–15.
- [29] Palmer.C., Bik.E.M., DiGiulio.D.B., Relman.D.A., Brown.P.O., 2007, Development of the Human Infant Intestinal Microbiota, *PLoS Biology*, 5(7), pp. e177.
- [30] Yao.Y., Cai.X., Fei.W., Ye.Y., Zhao.M., Zheng.C., 2022, The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism.
- [31] Koenig.J.E., Spor.A., Scalfone.N., Ley.E.R., 2011, Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), pp. 4578–4585.

- [32] Claesson.M.J., Cusack.S., O'Sullivan.O.,...O'Toole.P.W., 2011, Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,108(1), pp. 4586–4591.
- [33] Arrieta.M.C., Stiemsma.L.T., Amenyogbe.N., Brown.E., Finlay.B., 2014, The intestinal microbiome in early life: Health and disease.
- [34] Vallès.Y., Artacho.A., Pascual-Garcia.A.,...Rfancino.M.P., 2014, Microbial succession in the gut: Directional trends of taxonomic and functional change in a birth cohort of spanish infants, *PLoS Genetics*, 10(6).
- [35] Avershina.E., Lundgard.K., Sekelja.M.,...Rudi.K., 2016 , Transition from infant- to adult-like gut microbiota, *Environmental microbiology*, 18(7), pp. 2226–2236.
- [36] Milani.C., Mancabelli.L., Lugli.G.A.,...Ventura.M., 2015, Exploring vertical transmission of *bifidobacteria* from mother to child, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), pp. 7078–7087.
- [37] Sakanaka.M., Gotoh.A., Yoshida.K.,...Katayama.T., 2020, Varied pathways of infant gut-associated *Bifidobacterium* to assimilate human milk oligosaccharides: Prevalence of the gene set and its correlation with *bifidobacteria*-rich microbiota formation.
- [38] Underwood.M.A., German.J.B., Lebrilla.C.B., Mills.D.A., 2015, *Bifidobacterium longum* subspecies infantis: Champion colonizer of the infant gut.
- [39] Alcon-Giner.C., Dalby.M.J., Caim.S.,...Hall.L.J., 2020, Microbiota supplementation with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* modifies the preterm infant gut microbiota and metabolome: An observational study, *Cell Reports Medicine*, 1(5).
- [40] Solís.G., de los Reyes-Gavilan.C.G., Fernández.N., Margolles.A., Gueimonde.M., 2010, Establishment and development of lactic acid bacteria and *bifidobacteria* microbiota in breast-milk and the infant gut, *Anaerobe*, 16(3), pp. 307–310.
- [41] Nagpal.R., Tsuji.H., Takahashi.T.,... Yamashiro.Y., 2016, Sensitive quantitative analysis of the meconium bacterial microbiota in healthy

- term infants born vaginally or by cesarean section, *Frontiers in Microbiology*, 7.
- [42] Yang.B., Chen.Y., Stanton.C.,...Chen.W., 2019, *Bifidobacterium* and *lactobacillus* composition at species level and gut microbiota diversity in infants before 6 weeks, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13).
- [43] Jamyuang.C., Phoonlapdacha.P., Chongviriyaphan.N., Chanput.W., Nitisinprasert.S., Nakphaichit.M., 2019, Characterization and probiotic properties of *Lactobacilli* from human breast milk, *3 Biotech*, 9(11).
- [44] Thongaram.T., Hoeflinger.J.L., Chow.J.M., Miller.M.J., 2017, Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated *bifidobacteria* and *lactobacilli*, *Journal of Dairy Science*, 100(10), pp. 7825–7833.
- [45] Sung.V., D'Amico.F., Cabana.M.D.,...Tancredi.D., 2018, *Lactobacillus reuteri* to treat infant colic: A meta-analysis.
- [46] Kiu.R., Caim.S., Alcon-Giner.,...Hall.L.J., 2017, Preterm infant-associated *clostridium tertium*, *clostridium cadaveris*, and *clostridium paraputrificum* strains: Genomic and evolutionary insights, *Genome Biology and Evolution*, 9(10), pp. 2707–2714.
- [47] Rada.V., Nevoral.J., Trojanová.I., Tománková.E., Šmehilová.M., Killer.j., 2008, Growth of infant faecal *bifidobacteria* and *clostridia* on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions, *Anaerobe*, 14(4), pp. 205–208.
- [48] Romyasamit.C., Thatrimontrichai.A., Aroonkesorn.A., ...Singkhamanan.K., 2020, *Enterococcus faecalis* isolated from infant feces inhibits toxigenic *Clostridioides (Clostridium) difficile*, *Frontiers in Pediatrics*, 8.
- [49] Kim.Y.G., Sakamoto.K., Seo.S.U.,...Nunnez.G., 2017, Neonatal acquisition of *Clostridia* species protects against colonization by bacterial pathogens, *Science*, 356(6335), pp. 315–319.
- [50] Gregory.K.E., Laplante.R.D., Shan.G., Kumar.D.V., Gregas.M., 2015, Mode of birth influences preterm infant intestinal colonization with

- Bacteroides* over the early neonatal period, *Advances in Neonatal Care*, 15(6), pp. 386–393.
- [51] Sánchez.E., Palma.G.D., Capilla.A., Sanz.Y., 2011, Influence of environmental and genetic factors linked to celiac disease risk on infant gut colonization by *Bacteroides* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), pp. 5316–5323.
- [52] Marcobal.A., Barboza.M., Sonnenburg.E.D.,...Sonnenburg.J.L., 2011, *Bacteroides* in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways, *Cell Host and Microbe*, 10(5), pp. 507–514.
- [53] Farah.S., Alshehri.M.A., Alfawaz.T.S., Ahmad.M., Alshahrani.D.A., 2018, *Bacteroides fragilis* meningitis in a Saudi infant, *International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 5(3), pp. 122–126.
- [54] Feng.D., Neuweiler.I., Nogueira.R., Nackenhorst.U., 2021, Modeling of symbiotic bacterial biofilm growth with an example of the *Streptococcus–Veillonella sp.* system, *Bulletin of Mathematical Biology*, 83(5).
- [55] Mashima.I., Liao.Y.C., Miyakawa.H.,...Nakazawa.F., 2018, *Veillonella infantium* sp. Nov., an anaerobic, gram-stain-negative coccus isolated from tongue biofilm of a thai child, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4), pp. 1101–1106.
- [56] Saad.R., Tsoi.K., Onac.I.A., Davies.K.A., Hajela.V.K., Tacu.C., , 2021, *Streptococcus*-associated vasculitis: A role for antibiotic therapy?, *IDCases*, 24.
- [57] Madrid.L., Seale.A.C., Lynch.M.K.,...Schrag.S., 2017, Infant group B Streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: Systematic review and meta-analyses.
- [58] Cassidy-Bushrow.A.E., Sitarik.A., Levin.A.M.,...Wegienka.G., 2016, Maternal group B *Streptococcus* and the infant gut microbiota, *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 7(1), pp. 45–53.
- [59] Kageyama.A., Benno.Y., Nakase.T., 1999, Phylogenetic and phenotypic evidence for the transfer of *Eubacterium aerofaciens* to the genus *Collinsella* as *Collinsella aerofaciens* gen. nov., comb. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), pp. 557–565.

- [60] Durand.G.A., Cadoret.F., Lagier.J.C., Fournier.P.E., Raoult.D., 2017, Description of ‘*Gorbachella massiliensis*’ gen. nov., sp. nov., ‘*Fenollaria timonensis*’ sp. nov., ‘*Intestinimonas timonensis*’ sp. nov. and ‘*Collinsella ihuae*’ sp. nov. isolated from healthy fresh stools with culturomics, *New Microbes and New Infections*, 16, pp. 60–62.
- [61] Everard.A., Belzer.C., Geurts.L.,...Cani.P.D., 2013, Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), pp. 9066–9071.
- [62] Tap.J., Mondot.S., Levenez.F.,...Leclerc.M., 2009, Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core, *Environmental Microbiology*, 11(10), pp. 2574–2584.
- [63] Monaghan T.M., Sloan.T.J., Stockdale.S.R.,...Kashyap.R.S., 2020, Metagenomics reveals impact of geography and acute diarrheal disease on the Central Indian human gut microbiome, *Gut Microbes*, 12(1), pp. 1752605.
- [64] Cao.X., Liu.K., Liu.Y-W.,...Kong.X-J., 2021, Dysbiotic gut microbiota and dysregulation of cytokine profile in children and teens with autism spectrum disorder, *Frontiers in Neuroscience*, 15, pp. 93.
- [65] Xu.M., Xu.X., Li.J., Li.F., 2019, Association between gut microbiota and autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis, *Frontiers in Psychiatry*, 10, pp. 473.
- [66] Machiels.K., Joossens.M., Sabino.J.,...Vermeire.S., 2014, A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis, *Gut*, 63(8), pp. 1275–1283.
- [67] Gronbach.K., Flade.I., Holst.O.,...Frick.J-S., 2014, Endotoxicity of lipopolysaccharide as a determinant of T-cell-mediated colitis induction in mice, *Gastroenterology*, 146(3), pp. 765–775.
- [68] Di Cagno.R., Angelis.M.D., Pasquale.I.D.,...Francavilla.R., 2011, Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization, *BMC Microbiol*, 11, pp. 219.

- [69] Nistal.E., Caminero.A., Vivas.S.,...Casqueiro., 2012, Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients, *Biochimie*, 94(8), pp. 1724–1729.
- [70] Walker.C.L.F., Aryee.M.J., Boschi-Pinto.C., Black.R.E., 2012, Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries, *PLoS One*, 7(1), pp. e29151.
- [71] Ugboko.H.U., Nwinyi.O.C., Oranusi.S.U., Oyewale.J.O., 2020, Childhood diarrhoeal diseases in developing countries, *Heliyon*, 6(4), pp. e03690.
- [72] Nguyễn Thị Thanh Tâm, Bùi Thị Ngọc Ánh, Tìm hiểu một số yếu tố liên quan đến tiêu chảy kéo dài nhiễm khuẩn ở trẻ em 6-24 tháng tại Bệnh viện Nhi Trung ương, *Tạp chí Y học thực hành*, 1054, pp. 9–12.
- [73] Nguyễn Thị Việt Hà, 2021, Tiêu chảy cấp và chương trình CDD, *Thầy Thuốc Việt Nam*. <https://thaythuocvietnam.vn/thuvien/tieu-chay-cap-va-chuong-trinh-cdd/>
- [74] Trần Thị Thanh Tâm, 2002, Tình trạng dinh dưỡng và chế độ nuôi dưỡng của trẻ em tiêu chảy kéo dài tại bệnh viện Nhi Đồng 2, *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 6(1), pp. 25–30.
- [75] Tarr.G.A.M., Linda.C., Lee.B.E.,...Freedman.S.B., 2019, Performance of stool-testing recommendations for acute gastroenteritis when used to identify children with 9 potential bacterial enteropathogens, *Clinical Infectious Diseases*, 69(7), pp. 1173–1182.
- [76] Martin.J.S.H., Monaghan.T.M., Wilcox.M.H., 2016, *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(4), pp. 206–216.
- [77] Khalil.I.A., Troeger.C., Blacker.B.F.,...Reiner Jr.R.C., 2018, Morbidity and mortality due to *shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global burden of disease study 1990–2016, *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), pp. 1229–1240.
- [78] Ferrari.R.G., Rosario.D.K.A., Cunha-Neto.A., Mano.S.B., Figueiredo.E.E.S., Conte-Junior.C.A., 2019, Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a Meta-analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14), pp. e00591-19.



- [79] GBD diarrhoeal diseases collaborators, 2017, Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global burden of disease study 2015, *The Lancet Infectious Diseases*, 17(9), pp. 909–948.
- [80] Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Liễu, 2022, Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng tiêu chảy do Rotavirus ở trẻ em dưới 5 tuổi, *Tạp chí Nhi khoa*, 15(4), pp.25-31.
- [81] Giannattasio.A., Guarino.A, Lo Vecchio.A., 2016, Management of children with prolonged diarrhea, *F1000Research*, 5, pp. F1000 Faculty Rev-206.
- [82] Barbut.F., Surgers.L., Eckert.C.,...Lalande.V., 2014, Does a rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection impact on quality of patient management?, *Clinical Microbiology and Infection*, 20(2), pp. 136–144.
- [83] Catanzaro.M and Cirone.J., 2012, Real-time polymerase chain reaction testing for *Clostridium difficile* reduces isolation time and improves patient management in a small community hospital, *American Journal of Infection Control*, 40(7), pp. 663–666.
- [84] Hernández.S.I.D.L.C., Molina.Y.A., Santiago.F.G.,...Lozano.H.G., 2018, Real-time RT-PCR, a necessary tool to support the diagnosis and of rotavirus in Mexico, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(4), pp. 272–276.
- [85] Dashti.A., Alonso.H., Escolar-Minana.C.,...González.D., 2022, Evaluation of a novel commercial real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica*, *Microbiology Spectrum*, 10(3), pp. e00531-22.
- [86] Do Carmo.M.S., Santos.C.I.D., Araújo.M.C., Girón.J.A., Fernandes.E.S., Monteiro-Neto.V., 2108, Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children, *Food & Function*, 9(10), pp. 5074–5095.
- [87] Binder.H.J., Brown.I., Ramakrishna.B.S.,Young.G.P., 2014, Oral rehydration therapy in the second decade of the twenty-first century, *Current Gastroenterology Reports*, 16(3), pp. 376.

- [88] Schnadower.D., Tarr.P.I., Casper.T.C.,...Hall-Moore.C., 2018, *Lactobacillus rhamnosus GG* versus placebo for acute gastroenteritis in children, *The New England Journal of Medicine*, 379(21), pp. 2002–2014.
- [89] Bron.P.A., Kleerebezem.M., Brummer.R-J.,...Wells.J.M., 2017, Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function?, *British Journal Nutrition*, 117(1), pp. 93–107.
- [90] Li.Y.T., Xu.H., Ye.J-Z.,...Li.L-J., 2019, Efficacy of *Lactobacillus rhamnosus GG* in treatment of acute pediatric diarrhea: A systematic review with meta-analysis, *World Journal Gastroenterology*, 25(33), pp. 4999–5016.
- [91] Cummings.J.H., Macfarlane.G.T., Englyst.H.N., 2001, Prebiotic digestion and fermentation, *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), pp. 415S-420S.
- [92] Guarino.M.P., Altomare.A., Emerenziani.S.,...Cicala.M., 2020, Mechanisms of action of prebiotics and their effects on gastro-intestinal disorders in adults, *Nutrients*, 12(4), pp. 1037.
- [94] Van Nood.E., Vreze.A., Nieuwdorp.M.,...Keller.J.J., 2013, Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*, *The New England Journal of Medicine*, 368(5), pp. 407–415.
- [95] Cammarota.G., Masucci.L., Laniro.G.,...Gabarrini.A., 2015, Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(9), pp. 835–843.
- [96] Li.Y.T., Cai.H.F., Wang.Z.H., Xu.J, and Fang.J.Y, 2016, Systematic review with meta-analysis: long-term outcomes of faecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(4), pp. 445–457.
- [97] Haifer.C., Paramsothy.S., Kaakoush.N.O.,...Leong.R.W., 2022, Lyophilised oral faecal microbiota transplantation for ulcerative colitis (LOTUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 7(2), pp. 141–151.

- [98] Konturek.P.C., Dieterich.W., Neurath.M., Y.Zopf.Y., 2017, Successful therapy of *Clostridium Difficile* infection with fecal microbiota transplantation, *Gastroenterology*, 152(5), pp. S341.
- [99] Kallastu.A., Malv.E., Aro.V.,...Kazantseva., 2023, Absolute quantification of viable bacteria abundances in food by next-generation sequencing: Quantitative NGS of viable microbes, *Current Research in Food Science*, 6, pp. 100443.
- [100] Green.M.R., Sambrook.J., 2017, Isolation of high-molecular-weight DNA using organic solvents, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(4) , pp. pdb.prot093450.
- [101] Green.M.R., Sambrook.J., 2019, Agarose gel electrophoresis, in *Cold Spring Harbor Protocols*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 87–94.
- [102] Ariefdjohan.M.W., Savaiano.D.A., Nakatsu.C.H., 2010, Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens, *Nutrition Journal*, 9, pp. 23.
- [103] Fei.P., Li.L., Cai.X.,...Guo.L., 2016, Differences in the biodiversity of the fecal microbiota of infants with rotaviral diarrhea and healthy infants, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(4), pp. e32356.
- [104] Mai.V., Braden.C.R., Heckendorf.J., Pironis.B., Hirshon.J.M., 2006, Monitoring of stool microbiota in subjects with diarrhea indicates distortions in composition, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), pp. 4550–4552.
- [105] Wood.E.J., 1983, Molecular cloning. A laboratory manual by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. \$48 ISBN 0-87969-136-0, *Biochemical Education*, 11(2), pp. 82–82.
- [106] Hovda.M.B., Sivertsvik.M., Tore Lunestad.B., Lorentzen.G., Rosnes.J.T., 2007, Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE, *Food Microbiology*, 24(4), pp. 362–371.

- [107] Wood.D.E., Lu.J., Langmead.B., 2019, Improved metagenomic analysis with Kraken 2, *Genome Biology*, 20, pp. 257.
- [108] Jordan.J.A., Durso.M.B., 2005, Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis, *Journal of Molecular Diagnostics*, 7(5), pp. 575–581.
- [109] Hansen.W.L.J., van der Donk.C.F.M., Bruggeman.C.A., Stobberingh.E.E, Wolffs.P.F.G, 2013, A real-time PCR-based semi-quantitative breakpoint to aid in molecular identification of urinary tract infections, *PLOS ONE*, 8(4), pp. e61439.
- [110] Kamboj.M., Brite.J., McMillen.T.,...Babady.N.E., 2018. Potential of Real-time PCR threshold cycle (CT) to predict presence of free toxin and clinically relevant *C. difficile* infection (CDI) in patients with cancer, *Journal of Infection*, 76(4), pp. 369–375.
- [111] Song.Y., Liu.C., Finegold.S.M., 2004, Real-time PCR quantitation of Clostridia in feces of autistic children, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), pp. 6459–6465.
- [112] Oikarinen.S., Tauriainen.S., Viskari.H.,...Hyoty.H., 2009, PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants, *Journal of Clinical Virology*, 44(3), pp. 211–214.
- [113] Srirungruang.S., Mahajindawong., Nimitpanya.P.,...Sanprasert.V., 2022, Comparative study of DNA extraction methods for the PCR detection of intestinal parasites in human stool samples, *Diagnostics*, 12(11).
- [114] Costea.P.I., Zeller.G., Sunagawa., Bork.P., 2017, Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies, *Nature Biotechnology*, 35(11), pp. 1069–1076.
- [115] Pechgit.p., Intarapuk.A., Pinyoowong.D., Bhumiratana.A., 2011, Touchdown–touchup nested PCR for low-copy gene detection of benzimidazole-susceptible *Wuchereria bancrofti* with a *Wolbachia* endosymbiont imported by migrant carriers, *Experimental Parasitology*, 127(2), pp. 559–568.
- [116] Štšepetova.J., Sepp.E., Julge.K., Vaughan.E., Mikelsaar.M., de Vos.W.M., 2007, Molecularly assessed shifts of *Bifidobacterium ssp.* and

- less diverse microbial communities are characteristic of 5-year-old allergic children, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(2), pp. 260–269.
- [117] Bisgaard.H., Li.N., Bonnelykke.,...Krogfelt., 2011, Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(3), pp. 646-652.e5.
- [118] Forno.E., Onderdonk., McCracken.J., Celedón.J.C., 2008, Diversity of the gut microbiota and eczema in early life, *Clinical and Molecular Allergy*, 6(1), pp. 11.
- [119] Mirsepasi-Lauridsen.H.C., Vrankx.K., Engberg.,...Krogfelt.K.A., 2018, Disease-specific enteric microbiome dysbiosis in inflammatory bowel disease, *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 5, pp. 304.
- [120] Johnson.J.S., Spakowicz.D.J., Hong.B-Y.,...Weinstock.G.M., 2019, Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis, *Nature Communications*, 10(1), pp. 5029.
- [121] Yu.Z., Morrison.M., 2004, Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), pp. 4800–4806.
- [122] Yang.B., Wang.Y., Qian.P.Y., 2016, Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis, *BMC Bioinformatics*, 17, pp. 135.
- [123] Turróni.F., Peano.C., Pass.D.A.,...Ventura.M., 2012, Diversity of *Bifidobacteria* within the infant gut microbiota, *PLoS One*, 7(5), pp. e36957.
- [124] George.C.M., Birindwa.A., Li.S.,...Stine.O.C., 2023, *Akkermansia muciniphila* associated with improved linear growth among young children, democratic republic of the Congo, *Emerging Infectious Diseases*, 29(1), pp. 81–88.
- [125] Stark.P.L., Lee.A., 1982, The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life, *Journal of Medical Microbiology*, 15(2), pp. 189–203.

- [126] Hart.A.L., Lammers.K., Brigidi.P.,...Stagg.A.J., 2004, Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria, *Gut*, 53(11), pp. 1602–1609.
- [127] Hooper.L.V., Wong.M.H., Thelin.A., Hansson.L., Falk.P.G., Gordon.J.I., 2001, Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine, *Science*, 291(5505), pp. 881–884.
- [128] Belzer.C., de Vos.W.M., 2012, Microbes inside-from diversity to function: the case of *Akkermansia*, *The ISME Journal*, 6(8), pp. 1449–1458.
- [129] Karlsson.C.L.J., Onnerfält.J., Xu.J., Molin.G., Ahrné.S.,Thorngren-Jerneck.K., 2012, The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight, *Obesity (Silver Spring)*, 20(11), pp. 2257–2261.
- [130] Santacruz.A., Collado.M.C., Valdés.L.G.,...Sanz.Y., 2010, Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women, *British Journal Nutrition*, 104(1), pp. 83–92.
- [131] Shin.N.R., Lee.J.C., Lee.H.Y.,...Bae.J.W., 2014, An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice, *Gut*, 63(5), pp. 727–735.
- [132] Hansen.C.H.F., Krych.L., Nielsen.FK.,...Hansen.AK., 2012, Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse, *Diabetologia*, 55(8), pp. 2285–2294.

## PHỤ LỤC

### PHỤ LỤC 1. DANH SÁCH TRẺ THAM GIA LẤY MẪU

TT	Mã NC	Họ tên	Giới tính	Ngày sinh	Tuổi	Địa chỉ
1	C01	Phan Bảo C	Nữ	9/12/2022	8 tháng	Mỹ đình 1, Nam Từ Liêm, HN
2	C02	Phạm Như Anh K	Nam	10/11/2022	9 tháng	Khuong Mai, Thanh Xuân, HN
3	C03	Nguyễn Nhật L	Nữ	4/1/2023	7 tháng	Xuân La, Tây Hồ, HN
4	C04	Trần Hữu Nhật M	Nam	15/2/2023	6 tháng	Cổ Nhuế 1, Bắc Từ Liêm, HN
5	C05	Đào Xuân Nguyên B	Nam	7/9/2022	11 tháng	Dục Tú, Đông Anh, HN
6	C06	Hoàng Xuân Minh T	Nam	28/5/2022	15 tháng	Bạch Hạ, Phú Xuyên, HN
7	C07	Nguyễn An T	Nữ	6/11/2022	9 tháng	Song Phương, Hoài Đức, HN
8	C08	Đào Gia H	Nữ	19/2/2022	18 tháng	Giáp Bát, Hoàng Mai, HN
9	C09	Nguyễn Vũ Đức T	Nam	29/11/2022	9 tháng	La Khê, Hà Đông, HN
10	C10	Nguyễn Quang M	Nam	8/12/2022	8 tháng	Trung Hòa, Cầu Giấy, HN
11	C11	Nguyễn Bảo K	Nữ	14/08/2022	12 tháng	Vân Côn, Hoài Đức, HN
12	C12	Nguyễn Phạm Minh K	Nữ	25/06/2022	14 tháng	Xuân Phương, Nam Từ Liêm, HN
13	C13	Vũ Trần Gia L	Nữ	10/3/2022	18 tháng	Cổ Nhuế 1, Bắc Từ Liêm, HN
14	C14	Đàm Hà A	Nữ	18/06/2022	18 tháng	Cổ Nhuế 1, Bắc Từ Liêm, HN
15	C15	Nguyễn Diệu L	Nữ	13/08/2022	13 tháng	Kim Thái- Phú Xuyên- HN
16	C16	Đàm Quang P	Nam	27/10/2022	11 tháng	Kim Thái, Phú Xuyên, HN
17	C17	Trịnh Nhật D	Nam	23/04/2022	16 tháng	Thạch Hòa, Thạch Thất, HN
18	C18	Vũ Hoàng M	Nam	27/7/2022	14 tháng	Cổ Nhuế 1, Bắc Từ Liêm, HN
19	C19	Nguyễn Đức M	Nam	8/3/2023	6 tháng	Cổ Nhuế 1, Bắc Từ

<b>TT</b>	<b>Mã NC</b>	<b>Họ tên</b>	<b>Giới tính</b>	<b>Ngày sinh</b>	<b>Tuổi</b>	<b>Địa chỉ</b>
						Liên, HN
20	C20	Phan Minh A	Nữ	14/10/2022	11 tháng	Nghĩa Tân, Cầu Giấy, HN
21	C21	Bùi Minh D	Nam	22/12/2022	9 tháng	Láng Thượng, Đống Đa, HN
22	C22	Nguyễn Kiều Anh T	Nữ	13/08/2022	13 tháng	Mỹ Đình 1, Nam Từ Liêm, HN
23	C23	Vũ Kiều Huệ T	Nữ	9/8/2022	13 tháng	Mỹ Đình 1, Nam Từ Liêm, HN
24	C24	Nguyễn Đắc Bảo L	Nam	29/01/2023	7 tháng	Phúc La, Hà Đông, HN
25	C25	Bùi Phạm Nguyên A	Nam	29/12/2022	9 tháng	La Khê- Hà Đông- HN
26	C26	Nguyễn Lê Diễm M	Nữ	25/08/2022	13 tháng	La Khê- Hà Đông- HN
27	C27	Nguyễn Bảo V	Nữ	14/12/2022	9 tháng	Hiền Giang, Thường Tín, HN
28	C28	Nguyễn Đoàn Khánh D	Nam	24/8/2022	13 tháng	Trung Văn, Nam Từ Liêm, HN
29	C29	Nguyễn Minh C	Nữ	29/9/2022	12 tháng	Láng Thượng, Đống Đa, HN
30	C30	Nguyễn Đan V	Nữ	11/8/2022	13 tháng	Liên Ninh - Thanh Trì- HN
31	C31	Nguyễn Hải N	Nam	16/12/2022	10 tháng	Đức Giang, Hoài Đức, HN
32	C32	Đỗ Minh C	Nam	1/2/2022	20 tháng	Dục Tú, Đông Anh, HN
33	C33	Phạm Anh T	Nam	4/7/2022	15 tháng	Láng Thượng, Đống Đa, HN
34	C34	Nguyễn Minh T	Nữ	13/8/2022	13 tháng	Cao Viên, Thanh Oai, HN
35	C35	Đỗ Khôi N	Nam	19/12/2021	21 tháng	Phương Trung, Thanh Oai, HN
36	C36	Đỗ Minh K	Nam	24/12/2022	9 tháng	Ngọc Hồi - Thanh Trì – HN
37	C37	Hoàng Minh K	Nam	14/11/2022	10 tháng	Yên Hòa, Cầu Giấy, HN
38	C38	Nguyễn Minh T	Nam	17/9/2022	12 tháng	Khai Thái, Phú Xuyên, HN
39	C39	Phạm Hải Y	Nữ	24/01/2022	19 tháng	Mai Động, Kim Động,



<b>TT</b>	<b>Mã NC</b>	<b>Họ tên</b>	<b>Giới tính</b>	<b>Ngày sinh</b>	<b>Tuổi</b>	<b>Địa chỉ</b>
						HY
40	C40	Trương Hoàng M	Nữ	11/1/2023	9 tháng	Mai Động, Kim Động, HY
41	C41	Trương Hoàng A	Nam	1/11/2021	23 tháng	Mai Động, Kim Động, HY
42	C42	Trần Minh V	Nam	16/12/2022	10 tháng	Mai Động, Kim Động, HY
43	C43	Nguyễn Việt A	Nam	2/4/2022	18 tháng	Khai Thái, Phú Xuyên, HN
44	C44	Lê Đặng Phương M	Nữ	22/1/2022	20 tháng	Yên Hòa, Cầu Giấy, HN
45	C45	Nguyễn Nam S	Nam	23/10/2022	11 tháng	Quan Hoa, Cầu Giấy, HN
46	C46	Hoàng Minh T	Nam	22/3/2023	6 tháng	Thọ An, Đan Phượng, HN
47	C47	Nguyễn Phúc Tùng L	Nam	4/6/2022	16 tháng	Trung Văn, Nam Từ Liêm, HN
48	C48	Nguyễn Linh C	Nữ	6/22/2022	15 tháng	Vĩnh Ngọc, Đông Anh, HN
49	C49	Nguyễn Quang S	Nam	11/13/2022	11 tháng	Tảo Dương Văn, Ứng Hòa, HN
50	C50	Nguyễn Đăng K	Nam	3/2/2022	19 tháng	Khai Thái, Phú Xuyên, HN
51	C51	Nguyễn Bảo L	Nam	7/22/2022	15 tháng	Khai Thái, Phú Xuyên, HN

NC: Nghiên cứu; HN: Hà Nội, HY: Hưng Yên

## PHỤ LỤC 2. PHIẾU ĐIỀU TRA THÔNG TIN CỦA TRẺ

### PHIẾU ĐIỀU TRA THÔNG TIN VÀ BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU TIÊU CHẢY Ở TRẺ EM (NHÓM CHỨNG)

**Tên đề tài nhánh:** *Nghiên cứu thu thập mẫu phân bệnh nhi tiêu chảy kéo dài chưa rõ nguyên nhân và mẫu phân trẻ khỏe mạnh*

**Thuộc đề tài:** *Nghiên cứu đa hệ gen vi khuẩn ở bệnh nhi tiêu chảy kéo dài chưa rõ nguyên nhân bằng công nghệ Metagenomics nhằm tìm tác nhân gây bệnh và gen kháng thuốc" Mã số ĐTĐLCN.63/22.*

**Chủ nhiệm đề tài nhánh:** PGS. TS Nguyễn Thị Việt Hà

Đồng chủ nhiệm: PGS. TS Phùng Thị Bích Thủy

**Đơn vị chủ trì đề tài nhánh:** Bệnh viện Nhi trung ương

**Cơ quan chủ trì đề tài mã số Mã số ĐTĐLCN.63/22:** Viện Công nghệ sinh học

**Chủ nhiệm:** PGS. TS Đỗ Thị Huyền

**Mã đối tượng:**.....

Tài liệu này được thông báo đầy đủ đến các đối tượng tham gia nghiên cứu, không có trang hay phần nào trong tài liệu này được bỏ qua. Những nội dung trong tài liệu này cần phải được giải thích rõ bằng khẩu ngữ với các đối tượng tham gia nghiên cứu, bao gồm nhưng không giới hạn các thông tin sau:

#### I. HÀNH CHÍNH

Họ và tên trẻ: ..... Mã bệnh nhân: .....

Ngày sinh: ..... Tuổi (tháng): .....

Giới tính: Nam:  Nữ  Dân tộc: .....

Họ, tên mẹ: ..... Nghề nghiệp: .....

Học vấn: Tiểu học:  THCS  THPT:  Cao đẳng/đại học

Họ, tên bố: ..... Nghề nghiệp: .....

Học vấn: Tiểu học:  THCS  THPT:  Cao đẳng/đại học

Địa chỉ nơi ở: .....

Ngày đến khám.....

Lý do đến khám: .....

Điện thoại liên lạc: .....

## II. DỊCH TỄ HỌC

Chỗ ở: Nông thôn:  Thành thị:  Miền núi:   
Môi trường sống: Nhà trẻ:  Ở nhà:   
Nguồn nước ăn, uống Giếng:  Nước máy  Nước mưa  Sông/suối   
Mới thay đổi nguồn nước ăn, uống: Có:  Không:

## III. TIỀN SỬ:

<b>1.</b>	<b>Tiền sử sản khoa:</b> Bé là con thứ: ..... Trong gia đình có: ..... con Sinh đủ tháng: <input type="checkbox"/> Sinh non: <input type="checkbox"/> Đẻ thường: <input type="checkbox"/> Mổ: <input type="checkbox"/> Cân nặng lúc sinh: .....
<b>2.</b>	<b>Thời kỳ sơ sinh:</b> Nhiễm trùng: Có <input type="checkbox"/> Không <input type="checkbox"/> Tiêm chủng: Đầy đủ theo lịch: <input type="checkbox"/> Không đầy đủ: <input type="checkbox"/> Nuôi dưỡng: Bú mẹ hoàn toàn: <input type="checkbox"/> , Ăn hỗn hợp: <input type="checkbox"/> ; Ăn nhân tạo: <input type="checkbox"/> Thời điểm ăn bổ sung: Dưới 6 tháng: <input type="checkbox"/> ; 4-6 tháng: <input type="checkbox"/> ; Trên 6 tháng <input type="checkbox"/>
<b>3.</b>	<b>Thời điểm cai sữa:</b> .....
<b>4.</b>	<b>Chế độ ăn trong 3 tháng gần đây:</b> 4.1 Thức ăn chính (ghi chi tiết thức ăn như cơm, cháo, rau, thịt ... và số bữa trong ngày):..... ..... Thành phần bột/cháo: Đầy đủ đậm, tinh bột, mỡ, rau: <input type="checkbox"/> Đạm, tinh bột, mỡ <input type="checkbox"/> Đạm, tinh bột <input type="checkbox"/> Tinh bột: <input type="checkbox"/> Còn bú mẹ: <input type="checkbox"/> Đã cai sữa: <input type="checkbox"/> 4.2 Chế độ ăn gần đây có ăn thêm sữa: Có <input type="checkbox"/> Không <input type="checkbox"/> . Nếu có thì trả lời thêm: Ăn thêm sữa thông thường: <input type="checkbox"/> Sữa không có lactose: <input type="checkbox"/> Sữa thủy phân một phần: <input type="checkbox"/> Sữa thủy phân hoàn toàn: <input type="checkbox"/> Ăn thêm sữa chua: Có <input type="checkbox"/> Không <input type="checkbox"/> Cách pha sữa cho trẻ theo tỷ lệ như khuyến cáo: Có <input type="checkbox"/> Không: <input type="checkbox"/> Dụng cụ cho ăn: Bú bình <input type="checkbox"/> Đồ thìa: <input type="checkbox"/> Số bữa ăn/ngày: ..... Vệ sinh dụng cụ: Chỉ rửa nước <input type="checkbox"/> Rửa, tráng nước sôi <input type="checkbox"/> Rửa với nước rửa, dụng cụ rửa bình: <input type="checkbox"/> Tiệt trùng/luộc <input type="checkbox"/>
<b>5.</b>	<b>Tiền sử mắc bệnh trong vòng 3 tháng <input type="checkbox"/> 2 tháng <input type="checkbox"/> 1 tháng <input type="checkbox"/> trước khi tới khám lần này</b>
5.1.	Không mắc bệnh gì <input type="checkbox"/> Viêm phế quản phổi <input type="checkbox"/> Cúm/Covid <input type="checkbox"/> Nhiễm khuẩn hô hấp trên cấp <input type="checkbox"/> Tiêu chảy cấp <input type="checkbox"/> ; Rối loạn tiêu hóa <input type="checkbox"/> Tiêu chảy kéo dài <input type="checkbox"/> Béo phì <input type="checkbox"/> Tụ ký <input type="checkbox"/> ; Rối loạn chuyển hóa <input type="checkbox"/> Dị ứng <input type="checkbox"/> Bệnh khác <input type="checkbox"/> .....

5.2.	Tiền sử mắc tiêu chảy: Có <input type="checkbox"/> Không <input type="checkbox"/> Số lần vào viện do tiêu chảy: ..... Ngày vào gần nhất: ..... Thói quen rửa tay bằng xà phòng của người chăm sóc: Có <input type="checkbox"/> Không <input type="checkbox"/>
------	---

**Ngày tháng năm**

**Người thu thập số liệu**

**PHỤ LỤC 3. PHIẾU CUNG CẤP THÔNG TIN VÀ ĐỒNG Ý THAM GIA NGHIÊN CỨU CỦA CHA, MẸ HOẶC NGƯỜI BẢO DƯỠNG, CHĂM SÓC TRẺ**

Tên đối tượng tham gia nghiên cứu \_\_\_\_\_ Mã số đăng ký \_\_\_\_\_

**PHIẾU CUNG CẤP THÔNG TIN**

**DÀNH CHO CHA MẸ/NGƯỜI BẢO TRỢ TRẺ EM THAM GIA NGHIÊN CỨU**

Tên nghiên cứu:

**NGHIÊN CỨU ĐA HỆ GEN VI KHUẨN Ở BỆNH NHI TIÊU CHẢY KÉO DÀI CHƯA RÕ NGUYÊN NHÂN BẰNG CÔNG NGHỆ METAGENOMICS NHẪM TÌM TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ GEN KHÁNG THUỐC**

Nghiên cứu viên chính: PGS.TS. Nguyễn Thị Việt Hà-PGS.TS. Phùng Thị Bích Thủy

Đơn vị chủ trì: Khoa Tiêu hóa và Khoa SHPT các bệnh truyền nhiễm Bệnh viện Nhi TW

***Chúng tôi đề nghị bạn làm gì?***

Chúng tôi đề nghị con của bạn và khoảng 50 trẻ khỏe mạnh khác trong độ tuổi 6 tháng đến 24 tháng tuổi đi khám sức khỏe tại khoa Khám bệnh hoặc Phòng khám và tư vấn tiêm chủng – bệnh viện Nhi Trung ương tham gia một nghiên cứu. Chúng tôi sẽ thực hiện nghiên cứu phân của con bạn và so sánh với phân của trẻ tiêu chảy kéo dài nhiễm khuẩn để xác định một số vi khuẩn có thể là căn nguyên gây bệnh, so sánh sự biến đổi của hệ sinh vật đường ruột của trẻ bị tiêu chảy kéo dài với trẻ khỏe mạnh bằng phương pháp bằng kỹ thuật giải trình tự metataxonmic 16S rDNA. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng sẽ đánh giá sự đa dạng các gen kháng kháng sinh, các gen độc bằng kỹ thuật giải trình tự metagenome. Nghiên cứu này giúp chúng tôi hiểu rõ hơn và có thêm bằng chứng khoa học để điều trị tốt hơn đối với bệnh nhân bị tiêu chảy kéo dài.

Nếu bạn đồng ý cho con bạn tham gia nghiên cứu này, các nghiên cứu viên hỏi bạn một số thông tin về tình hình sức khỏe và lấy mẫu phân của con bạn.

Bạn tự do lựa chọn có cho con bạn tham gia hoặc không tham gia nghiên cứu này. Vui lòng đọc các thông tin sau đây. Nếu bạn không thể đọc được, sẽ có người đọc giúp bạn. Bạn nên cân nhắc kỹ trước khi tự nguyện quyết định cho con bạn tham gia. Vui lòng hỏi bác sĩ đang trao đổi với bạn về phiếu chấp thuận này bất cứ câu hỏi nào mà bạn nghĩ tới. Nếu bạn đồng ý cho con bạn tham gia nghiên cứu này, bạn sẽ yêu cầu ký tên hoặc in dấu vân tay ở trang cuối của phiếu này.

***Tại sao nghiên cứu này quan trọng?***

Tiêu chảy là bệnh khá phổ biến trên toàn thế giới, có tỷ lệ tử vong cao đặc biệt là ở trẻ dưới 5 tuổi và là gánh nặng y tế trên toàn cầu. Tại Việt Nam, tiêu chảy là một trong 10 bệnh phổ biến ở trẻ em và đứng thứ 4 về tỷ lệ tử vong. Theo các nghiên cứu khoảng 3-20% những đợt tiêu chảy cấp ở trẻ dưới 5 tuổi chuyển sang tiêu chảy kéo dài (TCKD) và có liên quan đến một nửa số ca tử vong do tiêu chảy. Theo tổ chức Y tế thế giới (WHO), tiêu chảy kéo dài được định nghĩa là tình trạng tiêu chảy khởi đầu cấp tính và kéo dài trên 14 ngày.

Có nhiều tác nhân gây tiêu chảy kéo dài như là virus, vi khuẩn ...và ký sinh. Tuy nhiên theo thống kê, có tới 30-65% trẻ tiêu chảy kéo dài không xác định được nguyên nhân đặc hiệu để có liệu pháp điều trị chính xác. Hơn thế nữa việc nhiễm vi khuẩn, nhiễm virus hay sự gia tăng tính độc của các vi khuẩn gây bệnh ở đường ruột, gia tăng kháng kháng sinh ở

vi khuẩn đường ruột, sử dụng kháng sinh trong giai đoạn điều trị tiêu chảy cấp... đều dẫn tới mất cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột.

Các phương pháp thông thường nhất để phát hiện nhân tố gây bệnh đường ruột bao gồm các phương pháp thường qui như nhuộm Gram, soi kính hiển vi, nuôi cấy, phát hiện độc tố, xét nghiệm kháng nguyên, xét nghiệm sinh hóa và miễn dịch, PCR. Tuy nhiên, các phương pháp này có hạn chế về độ nhạy, độ bao phủ do đó không thể phát hiện tác nhân gây bệnh ở tất cả các trường hợp .

Hiện nay các nghiên cứu về tiêu chảy kéo dài ở Việt Nam còn ít, đặc biệt, các nghiên cứu căn nguyên gây tiêu chảy kéo dài ở Việt Nam còn rất hiếm, hiện nay chưa có công trình nghiên cứu nào sử dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới thông lượng cao để tìm hiểu rõ căn nguyên gây bệnh, hoặc giám sát sự xuất hiện các vi sinh vật gây bệnh mới, đánh giá về hệ gen kháng thuốc hay gen độc lực của vi khuẩn trong hệ tiêu hóa của trẻ cũng như sự mất cân bằng vi sinh vật, rối loạn chuyển hóa ở trẻ. Vì thế, đây là ý tưởng nghiên cứu đầu tiên với kỳ vọng tìm ra được tác nhân gây bệnh chính, đánh giá được sự mất cân bằng vi sinh vật, đánh giá được hệ gen kháng thuốc, hệ gen độc, sự rối loạn chuyển hóa ở trẻ tiêu chảy kéo dài không rõ nguyên nhân ở bệnh viện Nhi trung ương để từ các kết quả nghiên cứu khoa học, các bác sĩ có thể xem xét điều chỉnh các liệu pháp điều trị tốt hơn cho trẻ.

#### ***Ai sẽ thực hiện nghiên cứu này?***

PGS. TS. Nguyễn Thị Việt Hà, Trưởng khoa Tiêu hóa – Bệnh viện Nhi Trung ương.

PGS.TS. Phùng Thị Bích Thủy, Trưởng khoa Sinh học phân tử các bệnh truyền nhiễm – Bệnh viện Nhi Trung Ương.

Và các nhân viên y tế tại Khoa Tiêu hóa và Khoa Sinh học phân tử các bệnh truyền nhiễm

#### ***Điều gì xảy ra với con của tôi trong nghiên cứu này?***

Con bạn sẽ được lấy một mẫu phân (không xâm lấn) để làm xét nghiệm.

#### ***Chúng tôi sẽ làm gì trên các mẫu bệnh phẩm của con bạn?***

Chúng tôi sẽ thực hiện phân tích hệ vi sinh vật đường ruột qua mẫu phân của con bạn bằng soi tươi, nuôi cấy,PCR 25 tác nhân gây bệnh. Nếu xét nghiệm sàng lọc âm tính chúng tôi sẽ tiếp tục thực hiện kỹ thuật metataxonomic 16S rDNA và metagenome.

#### ***Những nguy cơ nào xảy ra với con của tôi khi tham gia nghiên cứu này?***

Mẫu bệnh phẩm phân chúng tôi lấy không xâm lấn không gây ảnh hưởng đến sức khỏe của trẻ.

#### ***Lợi ích của việc tham gia nghiên cứu là gì?***

Con bạn sẽ không được hưởng lợi ích trực tiếp từ nghiên cứu. Tuy nhiên, cộng đồng có thể nhận được lợi ích từ nghiên cứu này vì nghiên cứu sẽ thu thập số liệu hệ vi sinh đường ruột của trẻ khỏe mạnh so với trẻ tiêu chảy kéo dài nhiễm khuẩn nhằm tìm tác nhân gây bệnh, đánh giá sự mất cân bằng hệ vi sinh đường ruột và tỷ lệ mang gen kháng thuốc ở những trẻ tiêu chảy kéo dài không rõ căn nguyên. Những số liệu đó sẽ hữu ích trong việc cung cấp các kiến thức tốt hơn về nguyên nhân gây tiêu chảy kéo dài cũng như mối liên quan giữa sự mất cân bằng hệ vi sinh đường ruột, tỷ lệ mang gene kháng thuốc/ gene độc của vi khuẩn đến kết quả điều trị. Từ đó, bác sĩ đưa ra hướng điều trị mới, hiệu quả hơn cho bệnh lý này.

#### ***Con của tôi có thể được nhận tiền bồi dưỡng khi tham gia nghiên cứu này không?***

Con bạn sẽ không nhận được tiền bồi dưỡng khi tham gia nghiên cứu, nghiên cứu được tài trợ để thực hiện các xét nghiệm chuyên biệt cho con bạn.

***Điều gì xảy ra nếu con của tôi có những tổn thương liên quan đến nghiên cứu?***

Chúng tôi chưa dự liệu là sẽ có bất cứ tổn thương nào liên quan đến việc tham gia nghiên cứu này.

***Điều gì xảy ra nếu tôi từ chối tham gia hoặc tôi thay đổi ý định về sau?***

Các bác sĩ sẽ tôn trọng quyết định của bạn và điều này không ảnh hưởng đến việc chăm sóc y tế mà con bạn nhận được.

***Có ai khác có thể quyết định ngừng việc tham gia nghiên cứu của con tôi?***

Đúng thế, nhưng chỉ trong một số trường hợp. Nếu bác sĩ của con bạn quyết định rằng sức khỏe của con bạn có nguy cơ nếu tiếp tục tham gia nghiên cứu, họ sẽ ngừng việc tham gia nghiên cứu của con bạn. Nếu bạn quyết định không tiếp tục tiến hành các thủ tục và đánh giá của nghiên cứu trên con bạn, thì họ cũng có thể rút bạn khỏi nghiên cứu. Hội đồng đạo đức có thể ngừng nghiên cứu bất cứ lúc nào nếu có lý do pháp lý chính đáng.

***Thông tin của con tôi được giữ bảo mật như thế nào?***

Toàn bộ thông tin của con bạn sẽ được giữ bí mật, chỉ các thành viên trong nhóm nghiên cứu được biết với mục đích phục vụ nghiên cứu.

***Tôi liên lạc với ai nếu tôi có câu hỏi hay thắc mắc?***

Nếu bạn có bất cứ câu hỏi hoặc thắc mắc nào liên quan đến dự án nghiên cứu này, bạn có thể liên lạc

PGS.TS. Phùng Thị Bích Thủy- Khoa Sinh học phân tử các bệnh truyền nhiễm - Bệnh viện Nhi Trung Ương- số 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội. Điện thoại: 0912588377

PGS.TS. Nguyễn Thị Việt Hà - Khoa Tiêu hóa - Bệnh viện Nhi Trung Ương- số 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội; Điện thoại: 0913555187

Ths.BS. Phạm Thị Thanh Nga – Khoa Tiêu hóa Bệnh viện Nhi Trung Ương- số 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội; Điện thoại: 0985507912.

Bạn cũng có thể liên hệ với Hội đồng đạo đức nếu bạn có câu hỏi về quyền của bạn nếu bạn tham gia vào nghiên cứu. Thông tin liên hệ của Hội đồng đạo đức được cung cấp dưới đây. p

Hội đồng đạo đức Bệnh viện Nhi Trung ương;

Địa chỉ số 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội; Điện thoại: 04 6273 6848

***Tên đối tượng tham gia nghiên cứu \_\_\_\_\_***

Phiếu chấp thuận tham gia nghiên cứu

NGHIÊN CỨU ĐA HỆ GEN VI KHUẨN Ở BỆNH NHI TIÊU CHẢY KÉO DÀI CHỮA RÕ NGUYÊN NHÂN BẰNG CÔNG NGHỆ METAGENOMICS NHẪM TÌM TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ GEN KHÁNG THUỐC

Tôi đã đọc phiếu chấp thuận này HOẶC tôi đã được nghe đọc phiếu chấp thuận này.

Tôi đã có cơ hội để đặt những câu hỏi về phiếu chấp thuận này và những câu hỏi hay thắc mắc của tôi đã được trả lời thỏa đáng. Tôi hoàn toàn tự nguyện cho con tôi tham gia vào nghiên cứu này. Tôi hiểu rằng tôi có thể rút lại chấp thuận tham gia nghiên cứu bất cứ lúc nào.

\_\_\_\_\_  
Họ và tên cha mẹ hoặc  
người giám hộ hợp pháp

\_\_\_\_\_  
Ký tên

\_\_\_\_\_  
Ngày ký

*\* Nếu cha mẹ/người giám hộ hợp pháp không biết viết, có thể dùng dấu vân tay (ngón cái)*

\_\_\_\_\_  
Họ và tên người làm chứng

\_\_\_\_\_  
Ký tên

\_\_\_\_\_  
Ngày ký

*\* Dành cho cha mẹ/người giám hộ hợp pháp không biết chữ*

\_\_\_\_\_  
Họ và tên nghiên cứu viên  
lấy chấp thuận

\_\_\_\_\_  
Ký tên

\_\_\_\_\_  
Ngày ký



**PHỤ LỤC 4. DANH SÁCH CÁC TÁC NHÂN GÂY BỆNH MÀ QIASTAT-DX GASTROINTESTINAL PANNEL CÓ THỂ PHÁT HIỆN ĐƯỢC**

<b>STT</b>	<b>Tên vi sinh vật</b>	<b>Phân loại (dạng axit nucleic)</b>
1	<i>Entamoeba histolytica</i>	Ký sinh trùng (DNA)
2	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Ký sinh trùng (DNA)
3	<i>Giardia lamblia</i>	Ký sinh trùng (DNA)
4	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Ký sinh trùng (DNA)
5	<i>Vibrio vulnificus</i>	Vi khuẩn (DNA)
6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vi khuẩn (DNA)
7	<i>Vibrio cholerae</i>	Vi khuẩn (DNA)
8	<i>Campylobacter</i> spp. ( <i>C. jejuni</i> , <i>C. upsaliensis</i> , <i>C. coli</i> )	Vi khuẩn (DNA)
9	<i>Salmonella</i> spp.	Vi khuẩn (DNA)
10	<i>Clostridium difficile</i> (tcdA/tcdB)	Vi khuẩn (DNA)
11	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Vi khuẩn (DNA)
12	Enteraggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	Vi khuẩn (DNA)
13	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	Vi khuẩn (DNA)
14	Shiga-like toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC)	Vi khuẩn (DNA)
15	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC) serotype O157:H7	Vi khuẩn (DNA)
16	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	Vi khuẩn (DNA)
17	Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)/Shigella	Vi khuẩn (DNA)
18	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Vi khuẩn (DNA)
19	Human Adenovirus F40/F41	Adenovirus (DNA)
20	Norovirus GI	Calicivirus (RNA)
21	Norovirus GII	Calicivirus (RNA)
22	Rotavirus A	Reovirus (RNA)
23	Astrovirus	Astrovirus (RNA)
24	Sapovirus GI, GII, GIV, GV	Calicivirus (RNA)

**PHỤ LỤC 5. KẾT QUẢ ĐO MẪU DNA TÁCH CHIẾT BẰNG PHƯƠNG  
PHÁP PHENOL-CHOLOROFORM**

<b>STT</b>	<b>Mẫu</b>	<b>[DNA] (ng/<math>\mu</math>l)</b>	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/_{230}$	<b>Thể tích (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Lượng DNA (<math>\mu</math>g)</b>
1	H01	104	1.8	1.8	100	10.4
2	H02	86.5	1.8	1.7	100	8.7
3	H03	64	1.8	1.5	80	5.1
4	H04	87.5	1.9	1.8	100	8.8
5	H05	70	1.8	1.6	100	7.0
6	H06	104	1.9	1.8	100	10.4
7	H07	28.5	1.8	1.3	30	0.9
8	H08	67	1.9	1.5	100	6.7
9	H09	66.5	1.8	1.8	70	4.7
10	H10	111	1.8	2.0	70	7.8
11	H11	69.5	1.8	2.3	100	7.0
12	H12	81.5	1.8	2.3	100	8.2
13	H13	141	1.8	2.1	100	14.1
14	H14	91.5	1.8	2.0	100	9.2
15	H15	62.5	1.7	1.3	100	6.3
16	H16	81	1.8	1.6	100	8.1
17	H17	162	1.7	1.6	100	16.2
18	H18	259	1.8	1.9	100	25.9
19	H19	166	1.8	1.9	100	16.6
20	H20	86.5	1.7	1.6	100	8.7
21	H21	71	1.8	1.9	100	7.1
22	H22	78.5	1.8	1.7	100	7.9
23	H23	174	1.8	1.8	100	17.4
24	H24	96	1.8	1.3	100	9.6
25	H25	224	1.8	2.1	100	22.4
26	H26	83	1.8	1.7	100	8.3
27	H27	72	1.8	1.6	100	7.2
28	H28	117	1.7	1.5	100	11.7
29	H29	162	1.7	1.7	100	16.2
30	H30	63	1.8	1.4	100	6.3

**PHỤ LỤC 6. KẾT QUẢ ĐO MẪU DNA TÁCH CHIẾT BẰNG KIT  
GENEJET**

<b>STT</b>	<b>Mẫu</b>	<b>[DNA] (ng/<math>\mu</math>l)</b>	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/230$	<b>Thể tích (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Lượng DNA (<math>\mu</math>g)</b>
1	H01	6.0	1.8	KXĐ	60	0.360
2	H02	7.5	1.8	KXĐ	60	0.450
3	H03	5.3	1.7	KXĐ	60	0.315
4	H04	9.8	1.9	KXĐ	60	0.585
5	H05	12.3	1.7	2.5	60	0.735
6	H06	8.3	1.7	2.2	60	0.495
7	H07	9.8	1.8	3.1	60	0.585
8	H08	13.8	1.8	3.3	60	0.825
9	H09	9.5	1.9	2.2	90	0.810
10	H10	9.8	2.0	1.2	90	0.870
11	H11	12.5	1.6	1.2	90	1.125
12	H12	28.3	1.8	1.8	90	2.400
13	H13	30.3	1.8	1.3	90	2.600
14	H14	22.0	1.8	1.6	90	1.940
15	H15	21.8	1.8	1.1	90	1.850
16	H16	28.3	1.8	1.2	90	2.425
17	H17	65.3	1.8	1.5	90	5.725
18	H18	31.8	1.8	1.4	90	2.745
19	H19	12.0	1.9	1.3	90	1.020
20	H20	35.0	1.8	1.6	90	3.075
21	H21	13.0	2.0	1.7	90	1.115
22	H22	14.0	1.8	1.2	90	1.195
23	H23	13.8	1.9	2.1	90	1.160
24	H24	26.8	1.8	1.6	90	2.230
25	H25	23.8	1.9	1.7	90	2.015
26	H26	21.3	1.8	1.1	90	1.855
27	H27	43.8	1.8	1.9	90	3.800
28	H28	25.5	1.8	1.2	90	2.205
29	H29	13.0	1.8	1.2	90	1.125
30	H30	15.0	2.0	1.9	90	1.255

KXĐ: Không xác định được

PHỤ LỤC 7. DANH SÁCH CHI VI KHUẨN PHÁT HIỆN Ở MỘT TRONG HAI NHÓM TRẺ 6-12 THÁNG TUỔI VÀ 13-24 THÁNG TUỔI

TT	Tên chi vi khuẩn	Tỷ lệ (1/1000 000)	TT	Tên chi vi khuẩn	Tỷ lệ (1/100 0000)
<b>Chi vi khuẩn có trong nhóm trẻ HMG1 nhưng không có trong nhóm trẻ HMG2</b>					
1	<i>Companilactobacillus</i>	150.25	113	<i>Melissococcus</i>	0.33
2	<i>Pediococcus</i>	78.10	114	<i>Lentzea</i>	0.33
3	<i>Kluyvera</i>	65.61	115	<i>Chromobacterium</i>	0.32
4	<i>Dysgonomonas</i>	8.63	116	<i>Bergeyella</i>	0.32
5	<i>Lentilactobacillus</i>	5.82	117	<i>Marispirochaeta</i>	0.32
6	<i>Phytobacter</i>	5.13	118	<i>Lutibacter</i>	0.32
7	<i>Loigolactobacillus</i>	4.55	119	<i>Marinobacterium</i>	0.32
8	<i>Curtobacterium</i>	2.29	120	<i>Leptolyngbya</i>	0.32
9	<i>Proteiniphilum</i>	2.09	121	<i>Ureaplasma</i>	0.32
10	<i>Blastococcus</i>	1.87	122	<i>Phyllobacterium</i>	0.31
11	<i>Coprobacter</i>	1.83	123	<i>Streptobacillus</i>	0.31
12	<i>Aerococcus</i>	1.82	124	<i>Allobacillus</i>	0.31
13	<i>Parascardovia</i>	1.81	125	<i>Polymorphospora</i>	0.31
14	<i>Petrimonas</i>	1.78	126	<i>Miniimonas</i>	0.29
15	<i>Cellulosimicrobium</i>	1.63	127	<i>Pseudofrankia</i>	0.29
16	<i>Paucilactobacillus</i>	1.49	128	<i>Geothrix</i>	0.29
17	<i>Umezawaea</i>	1.49	129	<i>Melioribacter</i>	0.29
18	<i>Secundilactobacillus</i>	1.34	130	<i>Phaeobacter</i>	0.29
19	<i>Metabacillus</i>	1.24	131	<i>Salinivibrio</i>	0.29
20	<i>Propioniciclava</i>	1.24	132	<i>Thermacetogenium</i>	0.29
21	<i>Serratia</i>	1.22	133	<i>Sandaracinus</i>	0.29
22	<i>Amycolatopsis</i>	1.22	134	<i>Syntrophobotulus</i>	0.28
23	<i>Pasteurella</i>	1.11	135	<i>Syntrophus</i>	0.28
24	<i>Pandoraea</i>	1.03	136	<i>Lutimonas</i>	0.28
25	<i>Spirosoma</i>	1.02	137	<i>Microvirga</i>	0.28

<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/1000 000)</b>	<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/100 0000)</b>
26	<i>Sphingopyxis</i>	0.96	138	<i>Piscirickettsia</i>	0.28
27	<i>Apilactobacillus</i>	0.95	139	<i>Desemzia</i>	0.28
28	<i>Actinoplanes</i>	0.94	140	<i>Fannyhessea</i>	0.28
29	<i>Polynucleobacter</i>	0.91	141	<i>Glutamicibacter</i>	0.27
30	<i>Sulfitobacter</i>	0.88	142	<i>Frigidibacter</i>	0.27
31	<i>Nostoc</i>	0.87	143	<i>Pelagibacter</i>	0.27
32	<i>Ketogulonicigenium</i>	0.84	144	<i>Oceanidesulfovibrio</i>	0.27
33	<i>Gloeothece</i>	0.84	145	<i>Phnomibacter</i>	0.27
34	<i>Helicobacter</i>	0.83	146	<i>Labilibaculum</i>	0.27
35	<i>Buttiauxella</i>	0.75	147	<i>Erythrobacter</i>	0.27
36	<i>Ralstonia</i>	0.70	148	<i>Abyssicoccus</i>	0.27
37	<i>Cupriavidus</i>	0.68	149	<i>Suicoccus</i>	0.27
38	<i>Ignavigranum</i>	0.67	150	<i>Fundicoccus</i>	0.27
39	<i>Fructilactobacillus</i>	0.67	151	<i>Candidatus_Arthromitus</i>	0.27
40	<i>Leptospira</i>	0.64	152	<i>Dermatobacter</i>	0.27
41	<i>Eikenella</i>	0.63	153	<i>Mycolicibacillus</i>	0.25
42	<i>Actinomadura</i>	0.62	154	<i>Micrococcus</i>	0.25
43	<i>Pedobacter</i>	0.62	155	<i>Sediminicoccus</i>	0.25
44	<i>Sporomusa</i>	0.62	156	<i>Pragia</i>	0.25
45	<i>Aneurinibacillus</i>	0.60	157	<i>Shimwellia</i>	0.25
46	<i>Geobacillus</i>	0.60	158	<i>Kitasatospora</i>	0.25
47	<i>Kroppenstedtia</i>	0.58	159	<i>Jatrophihabitans</i>	0.24
48	<i>Phytohabitans</i>	0.58	160	<i>Methylophaga</i>	0.24
49	<i>Fervidibacillus</i>	0.56	161	<i>Nitrosococcus</i>	0.24
50	<i>Parageobacillus</i>	0.56	162	<i>Wohlfahrtiimonas</i>	0.24
51	<i>Novibacillus</i>	0.54	163	<i>Macellibacteroides</i>	0.24
52	<i>Dehalococcoides</i>	0.54	164	<i>Pseudoduganella</i>	0.24
53	<i>Morococcus</i>	0.54	165	<i>Superficieibacter</i>	0.24
54	<i>Tannerella</i>	0.54	166	<i>Trichocoleus</i>	0.24

<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/1000 000)</b>	<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/100 0000)</b>
55	<i>Halomonas</i>	0.54	167	<i>Lentibacillus</i>	0.24
56	<i>Spiroplasma</i>	0.54	168	<i>Catellatospora</i>	0.24
57	<i>Clavibacter</i>	0.52	169	<i>Citricoccus</i>	0.23
58	<i>Epilithonimonas</i>	0.52	170	<i>Demequina</i>	0.23
59	<i>Chlorobium</i>	0.50	171	<i>Desulfoscapio</i>	0.23
60	<i>Paenarthrobacter</i>	0.48	172	<i>Fimbriimonas</i>	0.23
61	<i>Gilliamella</i>	0.48	173	<i>Halalkalibacterium_( ex_Joshi_et_al.2022)</i>	0.23
62	<i>Rhodobacter</i>	0.47	174	<i>Epidermidibacterium</i>	0.21
63	<i>Trabulsiella</i>	0.47	175	<i>Rhodobaca</i>	0.21
64	<i>Mangrovibacillus</i>	0.47	176	<i>Thalassospira</i>	0.21
65	<i>Evansella</i>	0.47	177	<i>Leadbetterella</i>	0.21
66	<i>Mucilaginibacter</i>	0.46	178	<i>Sphingomicrobium</i>	0.21
67	<i>Microcella</i>	0.44	179	<i>Dechloromonas</i>	0.21
68	<i>Bartonella</i>	0.44	180	<i>Caldalkalibacillus</i>	0.21
69	<i>Nitratidesulfovibrio</i>	0.44	181	<i>Furfurilactobacillus</i>	0.21
70	<i>Geomonas</i>	0.44	182	<i>Conexibacter</i>	0.21
71	<i>Delftia</i>	0.44	183	<i>Actinoalloteichus</i>	0.21
72	<i>Actinobacillus</i>	0.44	184	<i>Propionimicrobium</i>	0.20
73	<i>Moraxella</i>	0.43	185	<i>Acididesulfobacillus</i>	0.20
74	<i>Trichlorobacter</i>	0.43	186	<i>Heliorestis</i>	0.20
75	<i>Agrococcus</i>	0.41	187	<i>Methylocystis</i>	0.20
76	<i>Pleionea</i>	0.41	188	<i>Alloacidobacterium</i>	0.20
77	<i>Saccharophagus</i>	0.41	189	<i>Sneathia</i>	0.20
78	<i>Orrella</i>	0.41	190	<i>Limnobacter</i>	0.20
79	<i>Capnocytophaga</i>	0.41	191	<i>Ottowia</i>	0.20
80	<i>Globicatella</i>	0.41	192	<i>Cryobacterium</i>	0.19
81	<i>Kutzneria</i>	0.41	193	<i>Oligella</i>	0.19
82	<i>Ancylobacter</i>	0.40	194	<i>Sedimentisphaera</i>	0.19
83	<i>Hymenobacter</i>	0.40	195	<i>Halobacteriovorax</i>	0.19

TT	Tên chi vi khuẩn	Tỷ lệ (1/1000 000)	TT	Tên chi vi khuẩn	Tỷ lệ (1/100 0000)
84	<i>Gemmatirosa</i>	0.40	196	<i>Pseudocnuella</i>	0.19
85	<i>Paludibacter</i>	0.40	197	<i>Thermomicrobium</i>	0.19
86	<i>Planktothrix</i>	0.40	198	<i>Amylolactobacillus</i>	0.19
87	<i>Alkalihalophilus</i>	0.40	199	<i>Ilumatobacter</i>	0.19
88	<i>Anoxybacillus</i>	0.40	200	<i>Heliomicrobium</i>	0.17
89	<i>Oenococcus</i>	0.40	201	<i>Desulfomicrobium</i>	0.17
90	<i>Metamycoplasma</i>	0.40	202	<i>Salipaludibacillus</i>	0.17
91	<i>Nonomuraea</i>	0.39	203	<i>Pontibacillus</i>	0.17
92	<i>Thermoactinomyces</i>	0.39	204	<i>Neomicrococcus</i>	0.16
93	<i>Dongshaea</i>	0.39	205	<i>Calothrix</i>	0.16
94	<i>Methylosinus</i>	0.39	206	<i>Guyparkeria</i>	0.16
95	<i>Aggregatibacter</i>	0.39	207	<i>Aliiroseovarius</i>	0.16
96	<i>Carboxydocella</i>	0.39	208	<i>Marivivens</i>	0.16
97	<i>Agromyces</i>	0.37	209	<i>Salinispira</i>	0.16
98	<i>Stackebrandtia</i>	0.37	210	<i>Aureispira</i>	0.16
99	<i>Nitratireductor</i>	0.37	211	<i>Tenuifilum</i>	0.16
100	<i>Aminobacterium</i>	0.37	212	<i>Aquincola</i>	0.16
101	<i>Marinilactibacillus</i>	0.37	213	<i>Caballeronia</i>	0.16
102	<i>Flaviflexus</i>	0.37	214	<i>Zobellella</i>	0.15
103	<i>Acuticoccus</i>	0.36	215	<i>Rosistilla</i>	0.15
104	<i>Melittangium</i>	0.36	216	<i>Vulcanimicrobium</i>	0.15
105	<i>Flexistipes</i>	0.36	217	<i>Prauserella</i>	0.15
106	<i>Ruegeria</i>	0.36	218	<i>Aquabacterium</i>	0.15
107	<i>Saccharomonospora</i>	0.36	219	<i>Isoptericola</i>	0.13
108	<i>Thermomonas</i>	0.35	220	<i>Kytococcus</i>	0.13
109	<i>Paroceanicella</i>	0.35	221	<i>Propionibacterium</i>	0.13
110	<i>Dermabacter</i>	0.33	222	<i>Rhodothermus</i>	0.13
111	<i>Chromohalobacter</i>	0.33	223	<i>Roseateles</i>	0.13
112	<i>Caldibacillus</i>	0.33	224	<i>Halothermothrix</i>	0.13

**Chi vi khuẩn chỉ có ở nhóm HMG2 mà không có ở nhóm HGM1**

TT	Tên chi vi khuẩn	Tỷ lệ (1/1000 000)	TT	Tên chi vi khuẩn	Tỷ lệ (1/100 0000)
1	<i>Comamonas</i>	454.35	70	<i>Teredinibacter</i>	0.30
2	<i>Lysobacter</i>	13.66	71	<i>Adhaeribacter</i>	0.30
3	<i>Turicimonas</i>	3.66	72	<i>Lawsonia</i>	0.30
4	<i>Butyricoccus</i>	3.17	73	<i>Xenorhabdus</i>	0.28
5	<i>Geotalea</i>	2.15	74	<i>Sphingobium</i>	0.28
6	<i>Mesobacillus</i>	2.02	75	<i>Planctomyces</i>	0.28
7	<i>Arachnia</i>	1.85	76	<i>Salinimonas</i>	0.26
8	<i>Chania</i>	1.43	77	<i>Lautropia</i>	0.26
9	<i>Rummeliibacillus</i>	1.38	78	<i>Kingella</i>	0.26
10	<i>Flavivirga</i>	1.29	79	<i>Jiella</i>	0.26
11	<i>Mycobacterium</i>	1.28	80	<i>Caminibacter</i>	0.26
12	<i>Tachikawaea</i>	1.24	81	<i>Syntrophotalea</i>	0.26
13	<i>Allobaculum</i>	1.17	82	<i>Sorangium</i>	0.26
14	<i>Barnesiella</i>	1.04	83	<i>Mycobacteroides</i>	0.25
15	<i>Caldicellulosiruptor</i>	1.00	84	<i>Sporofaciens</i>	0.25
16	<i>Acetobacter</i>	0.84	85	<i>Rodentibacter</i>	0.25
17	<i>Thalassobaculum</i>	0.76	86	<i>Ferrimonas</i>	0.25
18	<i>Novacetimonas</i>	0.75	87	<i>Neopusillimonas</i>	0.25
19	<i>Marinomonas</i>	0.73	88	<i>Labrenzia</i>	0.25
20	<i>Fenollaria</i>	0.65	89	<i>Gemmobacter</i>	0.25
21	<i>Legionella</i>	0.62	90	<i>Flammeovirga</i>	0.25
22	<i>Pseudodesulfovibrio</i>	0.61	91	<i>Streptosporangium</i>	0.23
23	<i>Aequorivita</i>	0.59	92	<i>Thermincola</i>	0.23
24	<i>Duncaniella</i>	0.51	93	<i>Carboxydothemus</i>	0.23
25	<i>Saccharopolyspora</i>	0.50	94	<i>Gudongella</i>	0.23
26	<i>Acetohalobium</i>	0.50	95	<i>Gloeobacter</i>	0.23
27	<i>Candidatus_Karelsulci a</i>	0.50	96	<i>Piscinibacter</i>	0.23
28	<i>Oxalobacter</i>	0.48	97	<i>Methylocella</i>	0.23
29	<i>Brachyspira</i>	0.48	98	<i>Calditerrivibrio</i>	0.23



<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/1000 000)</b>	<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/100 0000)</b>
30	<i>Pyramidobacter</i>	0.48	99	<i>Agreia</i>	0.22
31	<i>Salicibibacter</i>	0.47	100	<i>Koleobacter</i>	0.22
32	<i>Octadecabacter</i>	0.47	101	<i>Desulfuromonas</i>	0.22
33	<i>Duodenibacillus</i>	0.45	102	<i>Sediminispirochaeta</i>	0.22
34	<i>Thermotoga</i>	0.45	103	<i>Nordella</i>	0.22
35	<i>Halanaerobium</i>	0.44	104	<i>Nannocystis</i>	0.22
36	<i>Cysteiniphilum</i>	0.44	105	<i>Thermanaerosceptrum</i>	0.20
37	<i>Breoghania</i>	0.44	106	<i>Oceanithermus</i>	0.20
38	<i>Pontibacter</i>	0.44	107	<i>Endozoicomonas</i>	0.20
39	<i>Mesoterricola</i>	0.44	108	<i>Gluconobacter</i>	0.20
40	<i>Candidatus_Minimicrobia</i>	0.44	109	<i>Emcibacter</i>	0.20
41	<i>Marinobacter</i>	0.42	110	<i>Polaribacter</i>	0.20
42	<i>Paludisphaera</i>	0.42	111	<i>Cloacibacterium</i>	0.20
43	<i>Gracilinema</i>	0.42	112	<i>Aquirufa</i>	0.20
44	<i>Syntrophobacter</i>	0.40	113	<i>Paludibaculum</i>	0.20
45	<i>Fischerella</i>	0.39	114	<i>Jeotgalicoccus</i>	0.19
46	<i>Alysiella</i>	0.39	115	<i>Laceyella</i>	0.19
47	<i>Aquibium</i>	0.39	116	<i>Thiodictyon</i>	0.19
48	<i>Paramuribaculum</i>	0.39	117	<i>Tropicibacter</i>	0.19
49	<i>Mucispirillum</i>	0.39	118	<i>Limnoglobus</i>	0.19
50	<i>Ndongobacter</i>	0.39	119	<i>Wenyingzhuangia</i>	0.19
51	<i>Rubroacter</i>	0.37	120	<i>Fretibacterium</i>	0.19
52	<i>Caminiella</i>	0.36	121	<i>Rhodoluna</i>	0.17
53	<i>Roseovarius</i>	0.36	122	<i>Microlunatus</i>	0.17
54	<i>Crinalium</i>	0.34	123	<i>Salisediminibacterium</i>	0.17
55	<i>Stappia</i>	0.34	124	<i>Tissierella</i>	0.17
56	<i>Roseococcus</i>	0.34	125	<i>Geitlerinema</i>	0.17
57	<i>Archangium</i>	0.34	126	<i>Microvirgula</i>	0.17

<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/1000 000)</b>	<b>TT</b>	<b>Tên chi vi khuẩn</b>	<b>Tỷ lệ (1/100 0000)</b>
58	<i>Pollutimonas</i>	0.33	127	<i>Celeribacter</i>	0.17
59	<i>Thauera</i>	0.33	128	<i>Pirellulimonas</i>	0.17
60	<i>Solwaraspora</i>	0.31	129	<i>Bremerella</i>	0.17
61	<i>Thalassotalea</i>	0.31	130	<i>Brucepastera</i>	0.17
62	<i>Thalassomonas</i>	0.31	131	<i>Breznakiella</i>	0.17
63	<i>Xanthobacter</i>	0.31	132	<i>Terriglobus</i>	0.17
64	<i>Caulobacter</i>	0.31	133	<i>Aquihabitans</i>	0.16
65	<i>Botrimarina</i>	0.31	134	<i>Salimicrobium</i>	0.16
66	<i>Brachybacterium</i>	0.30	135	<i>Anthocerotibacter</i>	0.16
67	<i>Alkalibacter</i>	0.30			
68	<i>Mahella</i>	0.30			
69	<i>Tumebacillus</i>	0.30			

**ĐẠI HỌC HUẾ**  
**NHIỀU TÁC GIẢ**

# **BÁO CÁO KHOA HỌC**

## **PROCEEDINGS**

**HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024**  
**NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024**

**Thành phố Huế, ngày 25 – 26 tháng 9 năm 2024**

**Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào;**  
**Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp;**  
**Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào**



**NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ**  
**Huế, 2024**



# MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU.....	iii
BAN TỔ CHỨC.....	vi
BAN BIÊN TẬP.....	viii
CÁC TIỂU BAN CHUYÊN MÔN.....	ix
CHƯƠNG TRÌNH HỘI NGHỊ.....	xi
1. ĐẨY MẠNH PHÁT TRIỂN VÀ ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC PHỤC VỤ PHÁT TRIỂN BỀN VỮNG ĐẤT NƯỚC TRONG BỐI CẢNH HỘI NHẬP QUỐC TẾ HIỆN NAY. PGS.TS. Nguyễn Phú Hùng, TS. Lưu Quang Minh, TS. Phạm Văn Tiềm.....	1

## CÔNG NGHỆ GEN

1. BIỂU HIỆN CỦA MỘT SỐ GEN LIÊN QUAN ĐẾN KHẢ NĂNG CHỊU HẠN Ở MỘT SỐ DÒNG CHÈ TẠI PHÚ THỌ. Nguyễn Hồng Chiên, Lưu Ngọc Quyên, Nguyễn Thị Kim Linh, Mai Thị Phương Nga.....	6
2. LENGTH AND SEQUENCE HETEROPLASMY IN mtDNA D-LOOP REGION OF INDIVIDUALS FROM KINH POPULATION IN SOUTHERN VIETNAM. Nguyen Thi Lan Huong, Nguyen Ngoc Hoa Binh, Dang Thanh Xuan, Mai Quang Truong.....	12
3. GENETIC CHARACTERISTICS OF 22 a-STR LOCI IN THE VIETNAMESE POPULATION. Nguyen Thi Lan Huong, Vuong Gia Bao, Mai Quang Truong.....	19
4. KHẢO SÁT PHƯƠNG PHÁP PCR-DGGE CHO PHÂN TÍCH ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG MẪU PHÂN CỦA TRẺ 6-24 THÁNG TUỔI. Nguyễn Thị Quý, Đào Trọng Khoa, Nguyễn Thị Thơm, Đỗ Thị Huyền.....	26
5. KHẢO SÁT <i>in silico</i> MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA BETA-GLUCOSIDASE TỪ DỮ LIỆU TRÌNH TỰ DNA METAGENOME 8.4 GB CỦA VI KHUẨN TRONG DẠ CỎ DÈ. Đỗ Thị Huyền, Nguyễn Minh Chiến, Trương Nam Hải.....	32
6. NHÂN DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN <i>glpF</i> MÃ HÓA PROTEIN XUYÊN Màng HỖ TRỢ VẬN CHUYỂN GLYCEROL Ở <i>Escherichia coli</i> . Phạm Thị Kiều Duyên, Nguyễn Thị An Hòa, Nguyễn Hà Mi, Quyền Mỹ Linh, Nguyễn Quang Huy, Kiều Cẩm Nhung, Chử Lương Luân.....	38
7. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG CỦA BỘ KIT TẠO DÒNG DỰA TRÊN TRÌNH TỰ TƯƠNG ĐỒNG eClone. Nguyễn Thị Mỹ Trinh, Nguyễn Văn Hậu.....	44
8. TẠO DÒNG BỔ SUNG (COMPLEMENTATION LINES) TỪ CÂY ĐỘT BIẾN MẤT CHỨC NĂNG GEN DO CHÈN ĐOẠN T-DNA Ở <i>Arabidopsis thaliana</i> . Lê Nguyễn Tiểu Ngọc.....	51
9. NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN BIẾN HIỆN ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP TỪ VI KHUẨN BIẾN <i>Formosa agariphila</i> VỚI HOẠT TÍNH PHÂN CẮT ULVAN. Trần Nguyễn Hà Vy, Cao Thị Thúy Hằng, Huỳnh Hoàng Như Khánh, Nguyễn Thị Thuận, Phạm Đức Thịnh, Trần Hoàng Hải.....	58
10. XÁC ĐỊNH VÀ PHÂN TÍCH CÁC GENE HSP70 Ở CÂY CỦ CẢI ĐƯỜNG ( <i>Beta vulgaris</i> L.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP TIN SINH HỌC. Lê Thị Mận, Trần Thị Mai Lan, Chu Thị Bích Ngọc, Nguyễn Thị Thanh Hương, Nguyễn Phương Quý, Cao Phi Bằng.....	64
11. PHÂN LẬP VÀ PHÂN TÍCH GEN MÃ HÓA $\beta$ -1,3-GLUCANASE TỪ <i>Bacillus</i> sp. 41. Nguyễn Thị Thanh Huyền, Lê Thị Nhật Anh, Trần Quốc Dung, Nguyễn Đức Huy.....	70
12. NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH, PHÂN TÍCH ĐẶC TÍNH VÀ ĐÁNH GIÁ BIỂU HIỆN CỦA NHÓM GENE MÃ HÓA JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE Ở CÂY Sắn ( <i>Manihot esculenta</i> ). Phùng Trường Trinh, Lê Đức Chiến, Đào Thị Chúc, Nguyễn Quốc Trung, Tống Văn Hải, Lê Thị Ngọc Quỳnh, Đồng Huy Giới, La Việt Hồng, Chu Đức Hà, Lê Huy Hàm.....	76
13. PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG <i>Tomato necrotic ringspot virus</i> GÂY HẠI TRÊN CÀ CHUA ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) DỰA TRÊN TRÌNH TỰ GEN NUCLEOCAPSID PROTEIN. Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa, Nguyễn Thị Kim Thoa, Nguyễn Xuân Dũng.....	82
14. ĐÁNH GIÁ TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA PROTEIN TÁI TỔ HỢP MÃ HOÁ VÙNG RBD CỦA VIRUS VIÊM PHẾ QUẢN TRUYỀN NHIỄM Ở GÀ. Nguyễn Thị Trà, Lê Thị Trà My, Chu Thanh Tâm, Trịnh Thái Vy, Ngô Hồng Dương, Nguyễn Thị Thu Hiền, Lê Thị Kim Xuyên, Đoàn Thị Thanh Hương, Hoàng Thị Thu Hằng, Phạm Bích Ngọc.....	90





15. TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN TÁI TỔ HỢP hMMP-1 (HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE 1) TRONG <i>E. coli</i> BL21. Nguyễn Trọng Bình, Trần Phú Hiền, Chương Thị Ngọc Hiếu, Nguyễn Thiện Phương... 97	
16. GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH GEN S1 CỦA CHŨNG VIRUS PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA GÂY BỆNH TIỂU CHẢY CẤP TRÊN LỢN TẠI TỈNH HƯNG YÊN NĂM 2023. Lưu Minh Đức, Đỗ Thị Roan, Nguyễn Thị Khuê, Don Nguyen, Đoàn Thị Thanh Hương..... 104	
17. ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LẠC LÀY ( <i>Trichosanthes cucumerina</i> L.). Trương Thị Hồng Hải, Hồ Thị Hoàng Nhi, Sonexay Rasphone, Hồ Ngọc Hân ..... 110	
18. THIẾT KẾ CẤU TRÚC VECTOR CRISPR/Cas9 CHỈNH SỬA GEN TÍN HIỆU CỦA HOOC MÔN BRASSINOSTEROID Ở CÂY CÀ CHUA. Lã Văn Hiền, Trương Thanh Tùng, Lã Thị Thảo, Nguyễn Văn Tịnh..... 116	
19. PHÂN TÍCH ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE CỦA THỤ THỂ KHỨU GIÁC cOR52H9 VÀ cOR9S13 TRÊN CHÓ NGHIỆP VỤ. Lê Thị Huệ, Phạm Thị Khánh Linh, Nguyễn Ngọc Hưng, Lê Văn Trọng, Đoàn Thị Thanh Hương..... 123	
20. PHÂN TÍCH CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA HỌ PROTEIN VACUOLAR IRON TRANSPORTER (VIT) VÀ DỮ LIỆU BIỂU HIỆN HỌ GEN <i>OsVIT</i> Ở LÚA BẰNG CÔNG CỤ TIN SINH HỌC. Lê Quỳnh Mai, Phạm Minh Duy, Đỗ Minh Ân..... 130	
21. NGHIÊN CỨU MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG HOA HỒNG ( <i>Rosa</i> spp.) CỎ Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM DỰA TRÊN TRÌNH TỰ VÙNG <i>trnH-psbA</i> . Ngô Văn Đức, Hoàng Hải Đăng, Triệu Phương Mai, Phạm Quốc Toàn, Nguyễn Thị Bích Hương, Lê Thị Kiều Trinh, Nguyễn Minh Phương ..... 136	
22. BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA MÃ VẠCH <i>trnH-psbA</i> TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ MẪU LAN KIM TUYẾN THU THẬP TẠI VIỆT NAM. Hoàng Hải Đăng, Ngô Văn Đức, Trịnh Thị Hương, Hồ Viết Thế, Trần Trọng Tuấn ..... 142	
23. ĐỊNH DANH CHŨNG NẤM HƯƠNG THU NHẬN TẠI VƯỜN QUỐC GIA BẠCH MÃ BẰNG SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG NHÂN GIỐNG NHẪM BẢO TỒN NGUỒN GEN. Lê Thị Như Ngọc, Nguyễn Vũ Linh, Trần Thiện Ân, Võ Đình Ba, Nguyễn Việt Thắng, Nguyễn Minh Trí..... 149	
24. BIỂU HIỆN PROTEIN TOLL-LIKE RECEPTOR 22 TỪ CÁ TRA <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TƯƠNG TÁC VỚI VI KHUẨN. Nguyễn Thanh Tấn, Trần Văn Hiếu ..... 154	
25. NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HỆ GENE CỦA 243 MẪU VI KHUẨN <i>Neisseria gonorrhoeae</i> PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM. Nguyễn Tiến Đạt, Vương Thị Hương, Trịnh Thị Xuân, Nguyễn Cường ..... 160	
26. NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TẠI VIỆT NAM THÔNG QUA PHÂN TÍCH PAN GENOME, CORE GENOME MLST VÀ CORE GENOME SNP. Vương Thị Hương, Nguyễn Tiến Đạt, Trịnh Thị Xuân, Nguyễn Cường..... 166	

## CÔNG NGHỆ HÓA SINH VÀ PROTEIN

1. NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH VÀ SINH ENZYME PHÂN GIẢI CHẤT HỮU CƠ CỦA CÁC CHỦNG VI NẤM PHÂN LẬP TỪ TRẦM TÍCH VÙNG BIỂN QUẢNG BÌNH. Vũ Thị Thu Huyền, Nguyễn Mai Anh, Lê Thị Hồng Minh ..... 174	
2. ISOLATION AND SCREENING OF <i>Bacillus</i> SP. PRODUCING FIBRINOLYTIC ENZYME WITH LOW CULTURE BROTH VISCOSITY. Thi-Thu-Trang Nguyen, Quoc-Phong Truong, Lan-Huong Nguyen, Tuan Le..... 182	
3. CÁC CHỈ SỐ SINH HÓA MÁU CỦA DÊ BOER KHI SỬ DỤNG THỨC ĂN Ủ CHUA. Nguyễn Thị Thu Hiền..... 188	
4. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA QUÁ TRÌNH TIỀN XỬ LÝ NẤM VÀ THỦY PHÂN RƠM LÚA MÌ BẰNG HỖN HỢP CHẾ PHẨM ENZYME THƯƠNG MẠI. Dương Hiếu Linh, Dietmar Schlosser..... 194	
5. NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HOÁ CỦA TINH DẦU CÂY BÁCH XANH ( <i>Calocedrus macrolepis</i> Kurz) TẠI KHU BẢO TỒN THIÊN NHIÊN PÙ HƯƠNG, NGHỆ AN. Trần Đức Dũng, Nguyễn Quốc Bình, Trần Đình Thắng ..... 199	
6. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHIẾU XẠ TIA GAMMA NGUỒN Co60 ĐẾN HÌNH THÀNH RỄ THỨ CẤP VÀ TÍCH LŨY HỢP CHẤT THỨ CẤP CỦA RỄ CÂY ĐẰNG SÂM ( <i>Codonopsis javanica</i> ) NUÔI CÂY <i>IN VITRO</i> . Lê Thị Thúy, Trịnh Thị Hương, Tạ Nguyễn Minh Hằng, Đỗ Thanh Như ..... 205	
7. NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP PECTINASE CỦA CHỦNG VI KHUẨN <i>Bacillus licheniformis</i> V114. Nguyễn Thị Hồng Liên, Nguyễn Văn Hiếu, Trần Thị Hương, Đặng Thị Nhung, Lê Thị Trà, Phan Thị Hồng Thảo ..... 210	



## KHẢO SÁT PHƯƠNG PHÁP PCR-DGGE CHO PHÂN TÍCH ĐA DẠNG VI KHUẨN TRONG MẪU PHÂN CỦA TRẺ 6-24 THÁNG TUỔI

Nguyễn Thị Quý<sup>1</sup>, Đào Trọng Khoa<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thơm<sup>2,3</sup>, Đỗ Thị Huyền<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Bệnh viện 19-8, Bộ Công an

### TÓM TẮT

Đa dạng vi khuẩn và mất cân bằng vi khuẩn trong phân của trẻ 6-24 tháng tuổi được cho là có liên quan đến nhiều bệnh như tiêu chảy, tỵ, dị ứng, chàm... Việc phân tích đa dạng cấu trúc vi khuẩn trong phân bằng phương pháp điện di trên gel gradient chất biến tính (DGGE) cho phép thực hiện trên một số lượng mẫu lớn, có khả năng so sánh cấu trúc vi sinh trong các mẫu và gợi ý được tình trạng mất cân bằng vi sinh cũng như xác định vi khuẩn gây bệnh có thể có. Để áp dụng được phương pháp DGGE trên đối tượng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài chưa rõ nguyên nhân, trong nghiên cứu này vùng V3, V6-V8 của gen 16S rDNA đã được khuếch đại bằng chương trình tough-up, tough-down và chương trình đặc hiệu từ hệ gen của 8 vi khuẩn đã biết, 5 đa hệ gen vi khuẩn của trẻ khỏe mạnh và 1 đa hệ gen của trẻ tiêu chảy kéo dài. Kết quả cho thấy, gel DGGE có nồng độ polyacrylamide 8% là thích hợp cho phân tách tốt, đa dạng vùng V3. Chương trình tough-up giúp khuếch đại được vùng V3 đa dạng hơn các chương trình PCR khác. Hàm lượng DNA gen V3 thích hợp nhất cho phân tích DGGE là 1 µg/giếng. Gel DGGE được nhuộm với SYBR-Gold cho độ nét và độ nhạy tốt, đảm bảo cho việc quét ảnh phân tích đánh giá đa dạng vi sinh vật trong các mẫu nghiên cứu.

*Từ khóa:* DGGE, chương trình PCR tough-up, đa dạng vi khuẩn trong phân, tiêu chảy kéo dài, vùng gen V3.

### MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, tiêu chảy là một trong 10 bệnh phổ biến và đứng thứ 4 về tỷ lệ tử vong ở trẻ dưới 5 tuổi và tập trung chủ yếu ở trẻ 6-24 tháng tuổi. Tùy theo điều kiện y tế và dịch tễ, khoảng 3-20% trẻ tiêu chảy cấp diễn tiến thành tiêu chảy kéo dài. Mặc dù Bệnh viện Nhi trung ương đã áp dụng các phương pháp hiện đại như real-time PCR chẩn đoán 24 tác nhân gây tiêu chảy thông thường nhưng cũng có tới 47,39% trẻ không tìm được ra nguyên nhân (Vũ Thị Thu Hà *et al.*, 2016). Gần đây, bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới tìm hiểu đa hệ gen vi khuẩn trong phân của trẻ tiêu chảy ở một số nước, các nhà nghiên cứu nhận thấy sự thay đổi cấu trúc hệ vi sinh vật của trẻ (rối loạn hệ vi sinh) là nguyên nhân dẫn tới trẻ tiêu chảy kéo dài, khó hồi phục. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới là phương pháp đánh giá được toàn diện nhất sự mất cân bằng hệ vi sinh của trẻ nhưng phương pháp này chỉ đánh giá được trên từng cá thể, với chi phí tốn kém và mất nhiều thời gian, khó so sánh tình trạng mất cân bằng trên số lượng lớn trẻ trong cùng thời điểm. Mặc dù được xem là phương pháp có khả năng phân tích thấp hơn phương pháp giải trình tự nhưng các phương pháp dấu vân tay phân tử (molecular fingerprinting techniques) như điện di trên gel gradient biến tính (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE), đa hình độ dài đoạn giới hạn (restriction fragment length polymorphism - RFLP) hay đa hình cấu hình sợi đơn (single strand conformation polymorphism - SSCP) vẫn được sử dụng thường xuyên có giá trị để có thể so sánh sự biến động vi sinh trong hệ sinh thái liên quan đến các yếu tố tác động khác nhau (Westaway *et al.*, 2021). Phân tích DGGE vùng V3, V6-V8 (gọi tắt là vùng V68) của gen 16S rDNA thường được sử dụng trong đánh giá đa dạng vi khuẩn trong phân của trẻ để tìm ra sự mất cân bằng vi sinh trong bệnh như dị ứng (Štšepetova *et al.*, 2007, Bisgaard *et al.*, 2011) hay bệnh eczema (Forno *et al.*, 2008), tiêu chảy (Mai *et al.*, 2006).

Do phân có hệ vi sinh đa dạng nhất trong các hệ sinh thái, đặc biệt ở cơ thể người (Costea *et al.*, 2017) nên việc đánh giá đa dạng vi sinh, so sánh, xác định sự biến động vi sinh giữa nhóm chứng và nhóm bệnh bằng phương pháp DGGE cần được khảo sát. Các nghiên cứu trước đã chỉ ra nồng độ chất biến tính (gồm urea và formamide deionized, trong đó 100% chất biến tính gồm 7 M urea, 40% formamide deionized) thích hợp cho phân tách DGGE vùng gen V3 là 35-70% và vùng V68 là 40-60%. Một số tác giả đã cho rằng gel được nhuộm bằng bạc có độ nhạy tốt (Qiu *et al.*, 2012) nhưng một số tác giả lại cho rằng việc nhuộm gel DGGE bằng ethidium bromide và SYBR-Gold cho độ nhạy và độ nét tốt hơn (Huang, Fu, 2005). Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành

khảo sát một số yếu tố như nồng độ gel polyacrylamide, vùng gen V3, V68 của gen 16S rDNA, hàm lượng DNA và phương pháp thích hợp cho phân tích gen bằng DGGE để có thể đánh giá đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân trẻ 6-24 tháng tuổi tốt nhất. Kết quả của công trình này sẽ định hướng phương pháp cho phân tích đa dạng vi khuẩn trong các mẫu phân của trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài, xem xét sự mất cân bằng vi khuẩn trong phân của trẻ tiêu chảy kéo dài.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

DNA hệ gen của 8 chủng vi khuẩn bao gồm *Escherichia coli* ATCC27117, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* 168, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Typhimurium (viết tắt là *S. Typhimurium*), *S. enterica* Enteritidis ATCC 13076 (viết tắt là *S. Enteritidis*), *Listeria fermentum*, *Enterococcus faecium* đã được tách chiết trong nghiên cứu trước (Nguyễn Hồng Dương *et al.*, 2023) được sử dụng làm khuôn khuếch đại gen 16S rDNA trước khi khuếch đại vùng gen V3, V68 trong thí nghiệm lựa chọn nồng độ gel polyacrylamide thích hợp cho phân tách DGGE hai vùng gen.

DNA đa hệ gen của vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ khỏe mạnh H1 (bé gái 8 tháng tuổi), trẻ tiêu chảy kéo dài chưa rõ nguyên nhân B1 (bé gái 11 tháng tuổi bị tiêu chảy trên 14 ngày) được tách chiết từ nghiên cứu trước (Nguyễn *et al.*, 2023). Hai mẫu DNA đa hệ gen H1 và B1 được sử dụng để khảo sát phương pháp PCR khuếch đại vùng V3 cho việc đánh giá đa dạng và lựa chọn phương pháp nhuộm gel DGGE. DNA đa hệ gen vi khuẩn trong phân của 4 trẻ khỏe mạnh 6-24 tháng tuổi (ký hiệu H2-H5) dùng để khuếch đại vùng V3 cho thí nghiệm đánh giá hàm lượng gen V3 thích hợp cho phân tích DGGE. Việc thu mẫu phân cho nghiên cứu đã được Hội đồng Đạo đức của Bệnh viện Nhi trung ương chấp thuận cho phép theo Giấy chứng nhận số 1875/BVNTWW-HĐĐĐ ngày 10/7/2023.

### Phương pháp PCR khuếch đại vùng gen V3, V68 và gen 16S rDNA từ hệ gen/đa hệ gen vi khuẩn

Gen 16S rDNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi 27-F và 1527-R từ DNA hệ gen/đa hệ gen của vi khuẩn. Vùng gen V3, V68 được khuếch đại từ sản phẩm PCR gen 16S rDNA, sử dụng các trình tự mồi V3 (Ariefdjohan *et al.*, 2010, Fei *et al.*, 2016) V68 (Mai *et al.*, 2006) được liệt kê trong Bảng 1 trong đó trình tự clamp là 5' CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG 3'. PCR được tiến hành trong tổng thể tích 25 µl gồm 2,5 µl đệm PCR 10x, 2,0 µl dNTP (2 mM), 1,0 µl mỗi mồi loại (10 µM), 5,0 µl DNA khuôn (2 ng/µl), 0,25 µl DreamTaq DNA polymerase (5 U/µl, Fermentas). Chương trình PCR sử dụng cho khảo sát khuếch đại đa dạng vùng gen V3, V68 gồm ba chương trình. Chương trình đặc hiệu (ký hiệu là N) có nhiệt độ bắt cặp mồi với sợi khuôn là 55°C, chương trình tough-up (ký hiệu là U) có nhiệt độ gắn mồi tăng dần trong mỗi 5 chu kỳ từ 50°C, 52°C, 55°C và cuối cùng là 20 chu kỳ có nhiệt độ gắn mồi ở 58°C. Chương trình tough-down tương tự như chương trình tough-up nhưng nhiệt độ bắt cặp mồi với sợi khuôn giảm dần từ 58°C xuống 52°C, cuối cùng là 20 chu kỳ với nhiệt độ mồi bắt cặp sợi khuôn là 50°C. Tổng số chu kỳ trong các chương trình PCR là 35 chu kỳ (Nguyễn Hồng Dương *et al.*, 2023). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Sambrook *et al.*, 2001). Hàm lượng DNA và chất lượng DNA được đo bằng máy Nanodrop 2000 (Implen).

**Bảng 1. Danh sách mồi dùng để khuếch đại gen 16S rDNA, các vùng gen V3, V6-V8**

Gen	Kích thước	Tên mồi	Trình tự mồi
Gen 16S rDNA	1500 bp	27-F	5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCAG-3'
		1527-R	5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAGCC-3'
Vùng gen V3	180 bp	BA338F-GC	5'-GC-clamp GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'
		UN518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'
Vùng gen V6-V8	433 bp	U968F-GC	5'-GC-clamp GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3'
		L1401R	5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3'

### Phân tích vùng gen V3, V68 bằng DGGE

Vùng gen V3, V68 sau khi khuếch đại được phân tích bằng điện di DGGE như được mô tả bởi Hovda và đồng tác giả (Hovda *et al.*, 2007) trên hệ thống máy VS20-DGGETC system (Clever Scientific Ltd, England). Trong đó vùng V3 được phân tích trên gel có nồng độ chất biến tính từ 35% đến 70%, vùng V68 được phân tích trên gel có nồng độ chất biến tính từ 40 đến 60%. Nồng độ polyacrylamide trên bản gel được khảo sát ở hai nồng độ là 6% và 8%. Điện di được tiến hành trong đệm TAE 1x (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) ở 60°C, 20V trong 10 phút sau đó tăng lên 70V trong 18 giờ. Sau khi điện di, gel được xử lý nhuộm với ba phương pháp là ethidium bromide (0,5 mg/l) hoặc SYBR-Gold (S11494, Thermo Scientific, USA) pha loãng 10000 lần trong đệm TAE 1x,

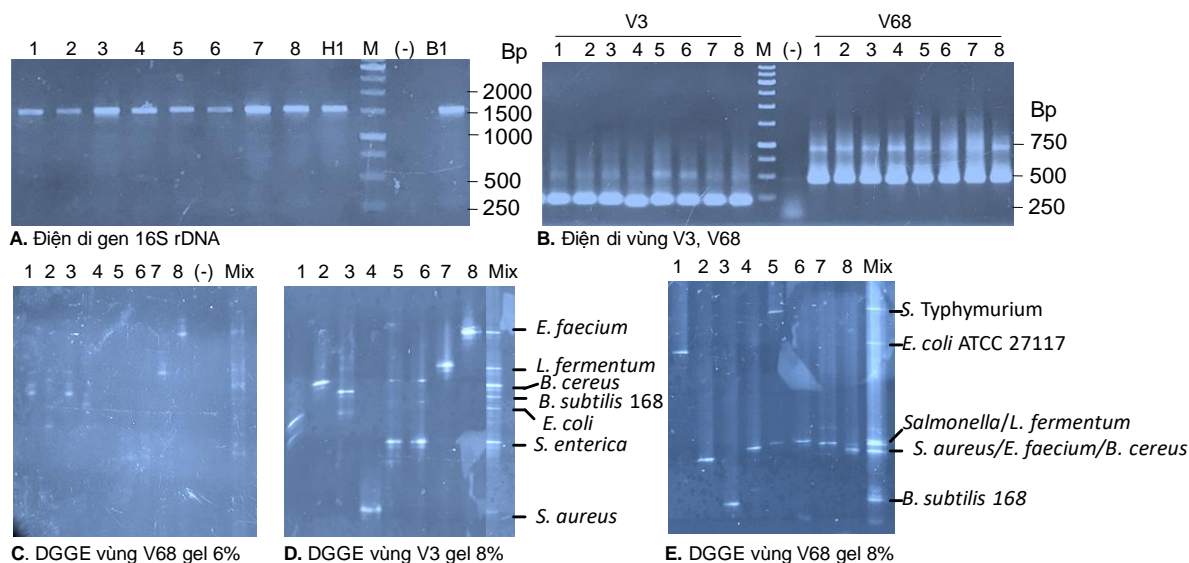
pH 7,6 và nhuộm bạc theo phương pháp số 2 của Qiu và đồng tác giả năm 2012 (Qiu *et al.*, 2012).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Khảo sát nồng độ gel polyacrylamide cho phân tích vùng V3, V68

Để đảm bảo độ ổn định cho việc khuếch đại vùng V3, V68 của 8 chủng vi khuẩn khảo sát, và của đa hệ gen vi khuẩn trong mẫu H1, B1, gen 16S rDNA và đa hệ gen 16S rDNA của các vi khuẩn đã được khuếch đại bằng PCR sử dụng mỗi và chương trình PCR đặc hiệu từ hệ gen của các chủng khảo sát và đa hệ gen của mẫu H1, B1. Kết quả (Hình 1) cho thấy gen 16S rDNA có cùng kích thước khoảng 1,5 kb đã được khuếch đại thành công từ 8 chủng vi khuẩn và hai DNA đa hệ gen B1, H1. Gen được khuếch đại đặc hiệu, không có băng phụ (Hình 1A) trong đó mẫu đối chứng âm không có băng nào được khuếch đại. Sử dụng sản phẩm PCR gen 16S rDNA này làm khuôn, các vùng V3, V68 của vi khuẩn cũng đã được khuếch đại thành công với hàm lượng DNA thu được lớn (khoảng 100 ng/μl). Vùng gen V3 được khuếch đại có kích thước thấp hơn DNA chuẩn 250 bp, tương ứng với kích thước mong đợi là 180 bp. Vùng V68 được khuếch đại có kích thước thấp hơn băng DNA chuẩn 500 bp, tương ứng với kích thước mong đợi là 433 bp (Hình 1B).

Các vùng gen V3, V68 đã được phân tích trên gel DGGE với nồng độ polyacrylamide 6%, tuy nhiên, chỉ có vùng V68 xuất hiện các băng DNA nhưng rất mờ, không rõ ràng (Hình 1C) còn vùng V3 hoàn toàn không nhìn thấy băng điện di (kết quả không được trình bày). Khi tăng nồng độ gel polyacrylamide lên 8%, các băng DNA vùng V3, V68 của các vi khuẩn đã thể hiện rõ ở tất cả các mẫu (Hình 1D, E). Vùng V3 có khả năng phân tách khá tốt, đặc biệt ở khả năng phân biệt các vi khuẩn trong cùng chi. Vùng V3 của các vi khuẩn ở các chi khác nhau dừng ở các vị trí cách nhau khá xa trên gel điện di và quan sát rõ hơn ở đường chạy Mix (Hình 1D). Trình tự có quãng đường di chuyển dài hơn thể hiện trình tự giàu GC hơn so với các trình tự khác do các trình tự này có nhiệt độ nóng chảy cao hơn nên dừng ở vùng gel có nồng độ chất biến tính cao hơn. Theo đó, vùng V3 của *E. faecium* di chuyển quãng đường ngắn nhất, tiếp đó là vùng V3 của *L. fermentum*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* và cuối cùng là *S. aureus*. Đáng chú ý, vùng V3 của *B. cereus*, *B. subtilis* có trình tự gần giống nhau nên nằm gần nhau. Vùng V3 của *S. Typhimurium* và *S. Enteritidis* cùng ở vị trí như nhau trên điện di đồ vì vùng V3 của hai vi khuẩn này tương đồng nhau về trình tự vì cùng trong một loài *S. enterica* (Hình 1D). Điều đó cho thấy, phân tích vùng V3 trên DGGE của các chủng vi khuẩn này có khả năng đánh giá độ đa dạng và quan hệ di truyền của các vi khuẩn.



**Hình 1. Lựa chọn nồng độ gel polyacrylamide cho phân tách cùng V3, V68**

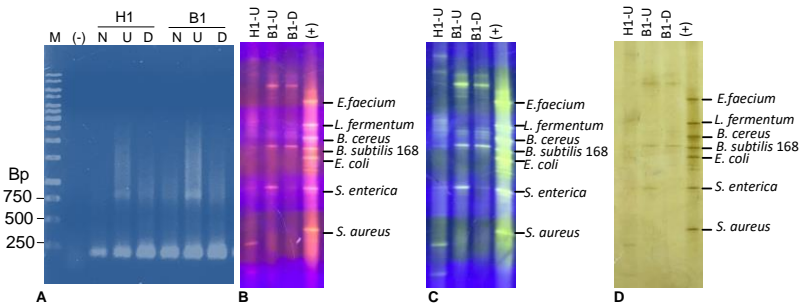
A: Điện di đồ phân tích gen/đa hệ gen 16S rDNA khuếch đại từ DNA hệ gen của 8 chủng vi khuẩn và đa hệ gen vi khuẩn trong mẫu phân của trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài. B: Điện di đồ phân tích vùng gen V3, V68 được khuếch đại từ khuôn là sản phẩm PCR gen 16S rDNA; C: Điện di đồ DGGE trên gel polyacrylamide 6% phân tách vùng V68; D, E: Điện di đồ DGGE trên gel polyacrylamide 8% phân tách vùng V3, V68 tương ứng. (-) Đối chứng âm không chứa DNA khuôn; M: DNA chuẩn 1 kb (Fermentas); 1-8: Sản phẩm PCR có nguồn gốc tương ứng từ *E. coli* ATCC 27117, *B. cereus*, *B. subtilis* 168, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *L. fermentum*, *E. faecium*. H1, B1: Tương ứng với DNA đa hệ gen từ mẫu phân của trẻ khỏe mạnh; trẻ tiêu chảy kéo dài; Mix: Hỗn hợp vùng V3 của 8 chủng chỉ thị từ 1 đến 8.



Ngược lại, mặc dù vùng V3 được phân tách tốt trên gel DGGE ở nồng độ gel polyacrylamide 8% nhưng vùng V68 của 8 chủng vi khuẩn không được phân tách tốt và không đặc trưng cho chi, loài. Điển hình, vùng V68 của *S. Typhimurium* nằm ở vị trí cao nhất trên gel sau đó đến vùng V68 của *E. coli* ATCC27117 và cuối cùng là *B. subtilis* 168. Tuy nhiên, vùng V68 của các vi khuẩn *Salmonella*, *L. fermentum* lại nằm cùng trên một vùng, và rất gần, khó phân biệt với vùng V68 của *S. aureus*, *E. faecium*, *B. cereus*. Vì vậy, việc sử dụng vùng gen V68 cho đánh giá đa dạng vi khuẩn và phân biệt vi khuẩn trong các mẫu môi trường, đặc biệt là trong phần nơi có cộng đồng vi khuẩn rất phức tạp là rất khó khăn. Vùng gen V68 cũng đã được khảo sát phân tách ở gradient nồng độ chất biến tính 30-75% nhưng sự phân tách vùng V68 của các chủng cũng không được cải thiện. Do vậy, vùng V3 sẽ được sử dụng để khảo sát phương pháp nhuộm gel DGGE và hàm lượng DNA đưa lên gel. Hỗn hợp V3 của 8 chủng được trộn với hàm lượng tương đương để làm đối chứng dương trong các thí nghiệm tiếp theo.

### Khảo sát phương pháp nhuộm gel DGGE

Trong các nghiên cứu trước, chương trình tough-up đã được chứng minh có khả năng khuếch đại đa gen 16S rDNA từ đa hệ gen vi khuẩn trong mẫu phân đa dạng hơn chương trình tough-down và chương trình đặc hiệu. Chương trình tough-down cũng cho độ đa dạng của gen 16S rDNA tốt hơn chương trình đặc hiệu (Nguyễn Hồng Dương *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này, đa gen 16S rDNA của vi khuẩn từ mẫu phân của trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài được khuếch đại bằng chương trình tough-up. Đa gen 16S rDNA này được dùng làm khuôn cho khuếch đại vùng V3 bằng ba chương trình tough-up, tough-down và chương trình đặc hiệu. Kết quả (Hình 2A) cho thấy vùng gen V3 đã được khuếch đại ở cả ba chương trình nhưng vùng gen V3 có kích thước đa dạng hơn, hàm lượng cao hơn ở mẫu PCR sử dụng chương trình tough-up. Trên bản điện di, vùng gen V3 khuếch đại bằng chương trình tough-up có thêm các băng phụ đậm hơn, nét hơn so với sản phẩm khuếch đại bằng chương trình đặc hiệu (chỉ có một băng đặc hiệu duy nhất, với lượng thấp hơn khi điện di với cùng thể tích mẫu). Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước, trong đó ở các chu kỳ đầu của chương trình PCR, nhiệt độ gắn mỗi thấp đã giúp khuếch đại được các trình tự có số bản copy thấp có trong mẫu và số lượng mỗi bám được vào sợi khuôn tăng, giúp khuếch đại DNA với hàm lượng lớn (Pechgit *et al.*, 2011). Kết quả thử nghiệm nhuộm gel DGGE bằng các phương pháp khác nhau cho thấy, trong ba gel được nhuộm bằng SYBR-Gold, ethidium bromide và nhuộm bạc thì bản gel được nhuộm bằng bạc cho độ phát hiện băng kém nhất, các băng không rõ ràng, không nét và đây cũng là phương pháp nhuộm phức tạp nhất (Hình 2D). Phương pháp nhuộm SYBR-Gold và nhuộm ethidium là phương pháp nhuộm đơn giản nhưng cho độ nét của băng tốt hơn, phổ băng phát hiện cũng nhiều hơn (Hình 2B, C). Trong đó, phương pháp nhuộm bằng SYBR-gold cho băng rõ nét nhất, đa dạng nhất. Tương đồng với kết quả này, nghiên cứu trước đây so sánh việc sử dụng phương pháp nhuộm gel bằng SYBR-Gold và ethidium cũng cho thấy SYBR-Gold có độ nhạy tốt hơn (Huang, Fu, 2005, Tuma *et al.*, 1999). Phương pháp nhuộm gel bằng ethidium bromide rẻ nhưng độc. Vì vậy, phương pháp nhuộm gel bằng SYBR-Gold được lựa chọn cho các thí nghiệm sau.



**Hình 2. Điện di đồ phân tích sản phẩm khuếch đại vùng gen V3 từ mẫu phân trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài (A) và DGGE phân tích vùng gen được nhuộm bằng ethidium bromide (B), SYBR-Gold (C) và bạc (D)**

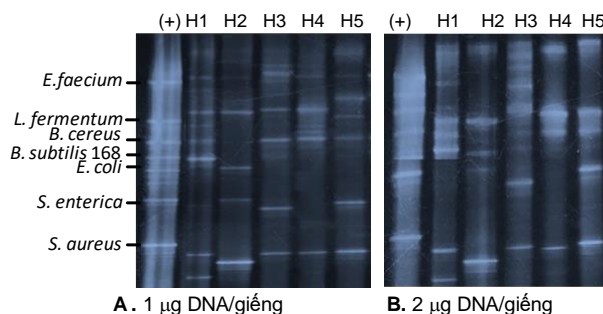
M: DNA chuẩn 1 kb (*Fermentas*); (-) Đối chứng âm không chứa DNA khuôn; H1: DNA khuôn có nguồn gốc từ trẻ khỏe mạnh; B1: DNA có nguồn gốc từ mẫu phân của trẻ tiêu chảy; N, U, D: Tương ứng là DNA được khuếch đại bằng chương trình đặc hiệu, tough-up và tough-down; (+): Đối chứng dương.

Kết quả phân tích DGGE cũng cho thấy, ở mẫu phân trẻ tiêu chảy kéo dài, vùng V3 được khuếch đại bằng chương trình tough-up cho độ đa dạng băng cao hơn so với chương trình tough-down. Điều đó chứng tỏ để phân tích đa dạng vi khuẩn trong một mẫu, việc sử dụng chương trình tough-up sẽ cho kết quả tốt hơn là hai chương trình còn lại. So sánh giữa mẫu chứng và mẫu bệnh, trẻ bị tiêu chảy có xu hướng giảm mức độ đa dạng vi khuẩn. Kết quả trên Hình 2 cũng chỉ ra rằng mẫu từ trẻ khỏe mạnh có số băng nhiều hơn mẫu bệnh nên mẫu khỏe mạnh có xu hướng có hệ vi sinh vật đa dạng hơn.

### Khảo sát hàm lượng DNA vùng V3 thích hợp cho phân tích DGGE

Trong các mẫu phân, vi sinh vật trong mẫu rất đa dạng. Vì vậy, việc lựa chọn hàm lượng DNA thích hợp cho phân tích DGGE là cần thiết. Trong các thí nghiệm trên, hàm lượng V3 được phân tích trên mỗi giếng là 1 µg.

Trong thí nghiệm này, để đánh giá chính xác hơn hàm lượng DNA thích hợp cho phân tích DGGE, vùng V3 gen 16S rDNA của đa hệ gen vi khuẩn từ 5 trẻ khỏe mạnh H1-H5 đã được khuếch đại và phân tích DGGE. Kết quả (Hình 3) cho thấy vùng V3 của đa gen vi khuẩn đã được phân tách khá tốt trên gel DGGE, các băng DNA đều thể hiện rõ nét trong cả 5 mẫu. Mặc dù là mẫu khỏe mạnh nhưng đa dạng vùng V3 ở các mẫu khác nhau là khác nhau về cả số lượng băng và vị trí của các băng DNA trên điện di đồ (Hình 3A). Điều này chứng tỏ vi khuẩn ở các mẫu chứng cũng rất đa dạng. Dựa trên phổ băng DNA có thể thấy đa dạng vi khuẩn trong mẫu H1 khác hẳn với 4 mẫu còn lại. Mẫu H3, H4 có sự tương đồng nhau về phổ băng hơn cả. Như vậy, rất có thể đa dạng vi khuẩn mẫu H3, H4 giống nhau hơn so với mẫu H1. Nhìn trên hai bản điện di thì có thể thấy hàm lượng DNA thích hợp đưa lên giếng DGGE là 1 µg vì ở hàm lượng này các băng thể hiện rõ nét, không bị nhòe phủ sang các băng bên cạnh tạo thuận lợi cho việc quét băng đánh giá đa dạng trong các mẫu. Khi tăng lên hàm lượng 2 µg/giếng điện di, các băng có sự giao thoa, nhòe với các băng lân cận làm cho độ nét của băng kém hơn. Theo tìm hiểu của tác giả, không có tài liệu khoa học nghiên cứu khảo sát hàm lượng DNA thích hợp cho phân tích DGGE nhưng trong một diễn đàn, các nhà nghiên cứu đã thảo luận, chia sẻ có thể sử dụng hàm lượng DNA vùng V3 từ 250 ng-750 ng/giếng điện di là đủ. Tuy nhiên, để nghiên cứu được đa dạng vi sinh trong mẫu sinh thái, việc tăng hàm lượng DNA cho phân tích là cần thiết. Vì vậy, để phân tích đa dạng vi khuẩn dựa trên vùng V3, lượng DNA thích hợp để đưa lên giếng cho phân tích là 1 µg/giếng.



**Hình 3. Điện di đồ DGGE phân tích vùng gen V3 của vi khuẩn trong mẫu phân từ 5 trẻ khỏe mạnh với hàm lượng DNA khác nhau 1 µg/giếng (A) và 2 µg/giếng (B)**

(+): Đối chứng dương; H1-H5: DNA có nguồn gốc từ mẫu phân của trẻ khỏe mạnh H1-H5.

## KẾT LUẬN

Vùng V3 gen 16S rDNA của vi khuẩn trong mẫu phân trẻ khỏe mạnh và trẻ tiêu chảy kéo dài đã được phân tích thành công bằng phương pháp PCR-DGGE trên gel polyacrylamide 8%, nồng độ chất biến tính 35-70% với hàm lượng DNA được đưa vào phân tích trên mỗi giếng điện di là 1 µg. Phổ băng DNA của V3 trên điện di đồ ở các mẫu khác nhau là khác nhau thể hiện sự đa dạng của vi sinh vật có trong mẫu.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu mã số DTĐLCN.63/22 (Bộ Khoa học và Công nghệ) và trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ariefdjojan MW, Savaiano DA, Nakatsu CH (2010). Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr J*, 9: 23.
- Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, Stokholm J, Smith B, Krogfelt KA (2011). Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*, 128: 646-652.e5.
- Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, Tramontano M, Driessen M, Hercog R, Jung FE, Kultima JR, Hayward MR, Coelho LP, Allen-Vercoe E, Bertrand L, Blaut M, Brown JRM, Carton T, Cools-Portier S, Daigneault M, Derrien M, Druesne A, de Vos W, Finlay BB, Flint HJ, Guarner F, Hattori M, Heilig H, Luna RA, van Hylckama Vlieg J, Junick J, Klymiuk I, Langella P, Le Chatelier E, Mai V, Manichanh C, Martin JC, Mery C, Morita H, O'Toole PW, Orvain C, Patil KR, Penders J, Persson S, Pons N, Popova M, Salonen A, Saulnier D, Scott KP, Singh B, Slezak K, Veiga P, Versalovic J, Zhao L, Zoetendal EG, Ehrlich SD, Dore J, Bork P (2017). Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*. 35 (11):1069-1076.
- Fei P, Li L, Cai X, Zhang X, Bai HJ, Jiang YJ, Feng Z, Guo L (2016). Differences in the biodiversity of the fecal microbiota of infants with Rotaviral diarrhea and healthy infants. *Jundishapur J Microbiol*, 9: e32356.
- Forno E, Onderdonk AB, McCracken J, Litonjua AA, Laskey D, Delaney ML, Dubois AM, Gold DR, Ryan LM, Weiss ST, Celedon JC, (2008). Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clin Mol Allergy*. 6: 11.
- Hovda MB, Sivertsvik M, Tore Lunestad B, Lorentzen G, Rosnes JT (2007) Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food*

*Microbiol*, 24: 362-371.

Huang Q, Fu WL (2005) Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*, 43: 841–842.

Mai V, Braden CR, Heckendorf J, Pironis B, Hirshon JM (2006). Monitoring of stool microbiota in subjects with diarrhea indicates distortions in composition. *J Clin Microbiol* 44: 4550-4552.

Nguyễn Hồng Dương, Nguyễn Thị Quý, Ngọc Thu Thảo, Nghiêm Đỗ Như Thảo, Phùng Thị Bích Thủy, Đỗ Thị Huyền (2023). Nghiên cứu phương pháp PCR-RFLP gen 16S rRNA để đánh giá đa dạng vi khuẩn trong phân trẻ tiêu chảy không rõ nguyên nhân. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 526: 182-189.

Nguyen TQ, Phung TBT, Ngoc TT, Do TH (2023). A comparison of five methods for effective extraction of bacterial metagenomic DNA from stools of children suffer from diarrhea with unknown cause. *Biol Forum - Int J*, 15: 1-9.

Qiu S, Chen J, Lin S, Lin X (2012). A comparison of silver staining protocols for detecting DNA in polyester-backed polyacrylamide gel. *Braz J Microbiol*, 43: 649–652.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 11. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Štšepetova J, Sepp E, Julge K, Vaughan E, Mikelsaar M, de Vos WM (2007). Molecularly assessed shifts of *Bifidobacterium* ssp. and less diverse microbial communities are characteristic of 5-year-old allergic children. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51: 260-269.

Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung CY, Yue S, Singer VL (1999). Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Anal Biochem*, 268: 278-288.

Vũ Thị Thu Hà, Nguyễn Tuấn Khiêm, Tăng Chí Thượng, Trần Thị Mộng Hiệp (2016). Khảo sát đặc điểm bệnh tiêu chảy kéo dài ở trẻ em tại bệnh viện Nhi đồng 2. *Nghiên Cứu Y Học - Y Học TP Hồ Chí Minh*, 20: 96-102.

Westaway JAF, Huerlimann R, Miller CM, Kandasamy Y, Norton R, Rudd D (2021). Methods for exploring the faecal microbiome of premature infants: a review. *Matern Health Neonatol Perinatol*, 7: 11.

## INVESTIGATION OF PCR-DGGE METHOD FOR ANALYZING BACTERIAL DIVERSITY IN FECAL SAMPLES FROM CHILDREN OF 6-24 MONTHS OLD

**Nguyen Thi Quy<sup>1</sup>, Dao Trong Khoa<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thom<sup>2,3</sup>, Do Thi Huyen<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>3</sup>*19-8 Hospital, Ministry of public security*

### SUMMARY

Bacterial diversity and bacterial dysbiosis in stools of children at 6-24 months old are related to many diseases such as diarrhea, autism, obesity, allergies, eczema, etc. Analysis of bacterial diversity by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method allows spontaneously performing on a large number of samples, capable of comparing the structure of microbial diversity in the samples and suggesting the status of bacterial imbalance or possible pathogens presence in the feces. To successfully apply the DGGE method for analysis of the bacterial structure and diversity in the feces of healthy children and persistent diarrheal children with undetected-pathogens, in this study V3, V6-V8 regions of the 16S rDNA gene were amplified from the genomic DNA of 8 bacteria, 5 bacterial metagenomic DNA extracted from the feces of healthy children and a metagenomic DNA from feces of a child with persistent diarrhea, using tough-up, tough-down and specific PCR programs. The results showed that DGGE gel contained 8% polyacrylamide concentration was suitable for separating diverse V3 regions of bacteria. The V3 region that was amplified by tough-up program exhibited more diverse than one amplified by other PCR programs. The V3 DNA content of 1 µg per well was enough for analyzing this region by DGGE. DGGE gel stained with SYBR-Gold presented good sharpness and sensitivity for analysis of bacterial diversity in research samples.

**Keywords:** DGGE, PCR tough-up program, bacterial diversity, persistent diarrhea, V3 gene region.

\* Author for correspondence: Tel: +84-4-7917021; Email: dohuyen@ibt.ac.vn