

manh và là một trong những bước quan trọng giúp cải thiện tiên lượng bệnh nhân. Kể từ khi thang điểm Ranson ra đời năm 1974, có rất nhiều hệ thống thang điểm khác (như Glasgow, APACHE-II, BISAP, JSS) được đề nghị; nhưng cho đến nay chưa có thang điểm nào là tiêu chuẩn vàng trong dự đoán kết cục VTC, mỗi thang điểm có những hạn chế và thời điểm áp dụng riêng. Trong thực hành lâm sàng, không nên phụ thuộc vào một thang điểm tiên lượng duy nhất, cần hiểu rõ thời điểm sử dụng, khả năng và hạn chế của từng thang điểm; đồng thời đánh giá bệnh nhân dựa vào các yếu tố nguy cơ nền tảng và theo dõi sát đáp ứng điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Iannuzzi J, Leung J, Quan J, et al.** A256 Global Incidence of Acute Pancreatitis through Time: A Systematic Review. *J Can Assoc Gastroenterol.* 2019 Mar;2(Suppl 2):499-501. doi: 10.1093/jcag/gwz006.255. Epub 2019 Mar 15.
2. **Scott Tenner, Steinberg WM.** Acute pancreatitis. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease.* 10th. Elsevier; 2016:969-993.
3. **Kiat TTJ, Gunasekaran SK, Junnarkar SP, et al.** Are traditional scoring systems for severity

- stratification of acute pancreatitis sufficient? *Annals of hepato-biliary-pancreatic surgery.* 2018;22(2): 105-115. doi:10.14701/ahbps.2018.22.2.105
4. **Wu BU, Johannes RS, Sun X, et al.** The early prediction of mortality in acute pancreatitis: a large population-based study. 2008;57(12):1698-1703. doi:10.1136/gut.2008.152702 %J Gut
 5. **Tan JW, Zhang XQ, Geng CM, et al.** Development of the National Early Warning Score-Calcium Model for Predicting Adverse Outcomes in Patients With Acute Pancreatitis. *Journal of emergency nursing.* 2020;46(2):171-179. doi:10.1016/j.jen.2019.11.003
 6. **Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, et al.** Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. 1990;174(2): 331-336. doi:10.1148/radiology.174.2.2296641
 7. **Banday IA, Gattoo I, Khan AM, et al.** Modified Computed Tomography Severity Index for Evaluation of Acute Pancreatitis and its Correlation with Clinical Outcome: A Tertiary Care Hospital Based Observational Study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR.* 2015;9(8):Tc01-5. doi:10.7860/jcdr/2015/14824.6368
 8. **Tenner S, Baillie J, DeWitt J, et al.** American College of Gastroenterology Guideline: Management of Acute Pancreatitis. 2013;108(9): 1400-1415. doi:10.1038/ajg.2013.218

ĐÁNH GIÁ INVITRO VỀ TÍNH AN TOÀN VÀ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA BACILLUS SUBTILIS PHÂN LẬP TỪ PHÂN TRẺ EM

Nguyễn Thị Hường¹, Ngô Nguyễn Quỳnh Anh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này đánh giá tính an toàn và các đặc tính probiotic của các chủng *Bacillus* phân lập từ phân trẻ em. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Các chủng *Bacillus* được phân lập từ mẫu phân trẻ em khỏe mạnh, định danh sơ bộ bằng phản ứng lý hóa, định danh chính xác vi khuẩn bằng giải trình tự gen 16S rRNA, tuyển chọn các đặc tính probiotic và đánh giá in-vitro tính an toàn của chúng vi khuẩn phân lập. **Kết quả nghiên cứu:** 6 chủng sơ bộ định danh là *Bacillus* M23, M26, M31, M36, M70, M91. Các chủng này được đánh giá không gây tan máu và khả năng tạo bào tử cao, có khả năng kháng acid, chịu nhiệt, sinh enzyme ngoại bào, nhạy cảm với kháng sinh và khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh. Đặc tính tốt vượt trội là *Bacillus* M70. Giải trình tự gen 16S rADN cho thấy *Bacillus* M70 tương đồng 100% với chủng *Bacillus subtilis* HGUP 332 trên Genbank. Thử

nghiệm độ an toàn trên chuột nhắt trắng cho thấy *Bacillus subtilis* M70 an toàn. **Kết luận:** Nghiên cứu đã đánh giá được các đặc tính của *Bacillus subtilis* phân lập từ phân trẻ em. Các kết quả thu được cho thấy chủng *Bacillus subtilis* M70 có thể có tiềm năng được xem xét làm chế phẩm sinh học, tuy nhiên cần có các nghiên cứu in vitro/vivo sâu rộng hơn. **Từ khóa:** *Bacillus subtilis*, probiotic, in-vitro, phân trẻ em.

SUMMARY

IN-VITRO EVALUATION OF THE SAFETY AND PROBIOTIC PROPERTIES OF BACILLUS SUBTILIS ISOLATED FROM CHILDREN'S FECES

Objective: This study aims to assess the safety and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from the feces of children. **Research subjects and methods:** *Bacillus* strains were isolated from stool samples of healthy children, initially identified through physical and chemical reactions. Subsequently, precise identification was conducted using automatic sequencing of the 16S rRNA gene. The selected bacteria underwent specialized probiotic assessments, and the safety of bacterial isolates was evaluated in vitro. **Research results:** Six strains were preliminarily identified as *Bacillus* M23, M26, M31, M36, M70 and

¹Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Hường

Email: huong.cdd@gmail.com

Ngày nhận bài: 19.01.2024

Ngày phản biện khoa học: 11.3.2024

Ngày duyệt bài: 29.3.2024

M91. These strains were found to be non-hemolytic with a high spore-forming ability, demonstrating acid resistance, heat resistance, extracellular enzyme production, sensitivity to antibiotics, and resistance to pathogenic bacteria. Notably, Bacillus M70 exhibited outstanding characteristics. Automated 16S rDNA gene sequencing revealed that Bacillus M70 shares 100% similarity with *B. subtilis* HGUP 332 on Genbank. Safety testing on white mice demonstrated that *B. subtilis* M70 is safe. **Conclusion:** This study evaluated the properties of *B. subtilis* isolated from children's feces. The results suggest that the *B. subtilis* M70 strain may have the potential to be considered as a probiotic; however, further extensive in vitro/vivo studies are necessary. **Keywords:** Bacillus subtilis, probiotic, in-vitro, children's feces.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotic là những vi khuẩn sống, khi được sử dụng trong cơ thể lượng vừa đủ sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ [1]. Các loài đã được nghiên cứu rộng rãi là *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis*... *Bacillus subtilis* là lợi khuẩn probiotic tốt, bền nhiệt có ưu điểm hơn các loài không tạo bào tử khác như *Lactobacillus* spp., giúp sản phẩm có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong ở dạng khô mà không ảnh hưởng đến khả năng sống sót. *B. subtilis* có thể nảy mầm trong ruột non, phát triển và sau đó tái sinh bào tử [2, 3]. Bào tử có thể tồn tại được trong đất, rơm rạ, bùn ... và tìm thấy trong ruột côn trùng, động vật và con người [3, 4]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng *Bacillus* có thể dễ dàng thu được từ đường tiêu hóa của con người bằng cách sử dụng phân lập mẫu sinh thiết và phân [3, 4]. Hiện có rất ít tài liệu công bố liên quan đến phân lập *B. subtilis* trong phân trẻ em ở Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu đặt mục tiêu tìm ra các đặc tính probiotic chủng *B. subtilis* phân lập từ phân trẻ em và đánh giá tính an toàn, nhằm hướng tới việc ứng dụng tạo nguồn nguyên liệu và sản xuất chế phẩm probiotics.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn thử nghiệm: Các chủng *Bacillus subtilis* được phân lập từ mẫu phân trẻ em khỏe mạnh. Các trẻ này có chỉ số BMI đạt chuẩn và không dùng các chế phẩm probiotic ít nhất 2 tuần.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn probiotic. Theo phương pháp phân lập được đề cập trong nghiên cứu của Hong và cộng sự (2009) [3]. Mẫu phân trẻ em được bảo quản trong dung dịch glycerol 20%, pha loãng với nước muối sinh lý và cấy trải trên môi trường LB agar (Merck, Đức). Các đĩa

trải được nuôi ủ ở 37°C, nồng độ 5% CO₂, trong 24 giờ. Thử các phản ứng sinh hóa và test API CH50 (BioMérieux).

Đánh giá khả năng chịu pH. Đánh giá khả năng chịu pH tham khảo phương pháp của Ngô Chí Công (2021) [2] để cập và có cải tiến như sau: Hút 1 ml dịch nuôi cấy sau ly tâm vào các bình NB pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 được ký hiệu lần lượt là T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6. Đánh giá số lượng vi khuẩn sống sót sau 3 giờ so với ban đầu.

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào. Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào tham khảo phương pháp của Hong (2009) [3].

Đánh giá khả năng kháng các loại vi khuẩn gây bệnh. Theo phương pháp của Won đề cập (2020) [6] có cải tiến. Xác định khả năng kháng với các chủng vi khuẩn và nấm có hại bằng phương pháp giếng thạch.

Đánh giá khả năng miễn cảm các loại kháng sinh. Theo phương pháp được đề cập của Guo 2016 [7] và tham khảo hướng dẫn Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng thí nghiệm (CLSI-2020) đối với xét nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh. Sử dụng khoanh giấy tẩm kháng sinh. Các kháng sinh được sử dụng là: Chloramphenicol 30µg; Erythromycin 15µg; Kanamycin 10µg; Tetracycline 30µg; Cefotaxime 30µg; Ampicillin 10µg; Gentamicin 10µg; Ciprofloxacin 5µg.

2.2. Thử nghiệm an toàn

Thử khả năng gây tan huyết. Thử nghiệm trên đĩa thạch Colombia chứa 5% (w/v) máu cừu (OR-BAK). Đĩa nuôi cấy được ủ trong 24 giờ ở 37°C và sau đó kiểm tra hoạt tính tan huyết.

Thử độ an toàn trên chuột thực nghiệm. Thử độ an toàn probiotic theo phương pháp thử tại Dược điển Việt Nam V [2]. Lấy 2g thành phẩm (khoảng 10⁹ CFU/g) hòa tan trong 8ml nước muối sinh lý, lắc đều, cho chuột nhắt 18-22g, uống 0,5ml/lần/ngày (tương đương liều 10⁸ CFU/ lần). Uống trong 3 ngày liên tiếp. Quan sát chuột trong 7 ngày. Thử trên 6 con chuột/lô: Lô chứng cho uống nước muối sinh lý. Lô đối chiếu cho uống hỗn dịch *B. subtilis* ATCC 11774. Lô thử cho uống hỗn dịch *Bacillus* M70.

Quan sát chuột trong 7 ngày. So sánh các lô chuột thực nghiệm.

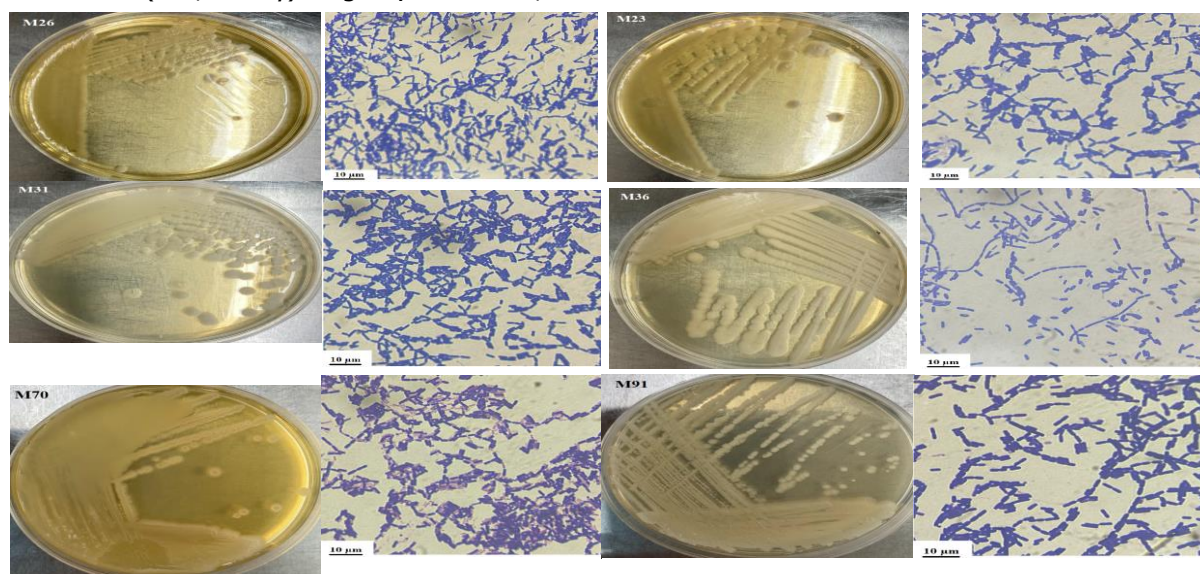
Giải trình tự gen *Bacillus subtilis*. Khuẩn lạc riêng rẽ của chủng *Bacillus* được tuyển chọn sử dụng để tách chiết ADN bằng DNA Blood and Tissue DNA Extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Qiagen). ADN sau tinh sạch được dùng làm khuôn của PCR khuếch đại đoạn gen mã hoá cho 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu. Các trình tự ADN sau đó được phân tích bằng phần mềm Illumina MiSeq và so sánh với dữ liệu có

sẵn trong ngân hàng gen của NCBI (GenBank), sử dụng chương trình BLAST để tìm ra chủng có trình tự với tỉ lệ tương đồng cao nhất với chủng cần giải trình tự.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu. Các nghiên cứu được thực hiện lặp lại 3 lần, kết quả trình bày là trung bình cộng ± SD. Số liệu nghiên cứu được xử lý so sánh bằng phần mềm thống kê SPSS Statistics 20 (IBM, Hoa Kỳ) với giá trị P-value ≤ 0,05.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

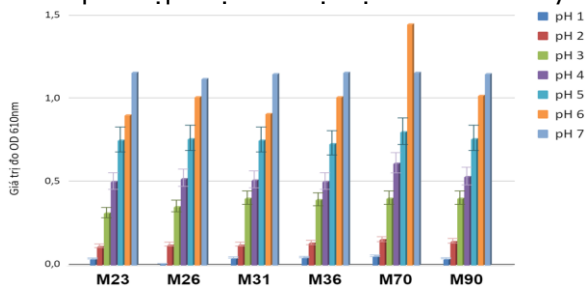
3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn. Chọn các đĩa khuẩn lạc thuần nhất, hình dạng tròn, màu trắng, xám hoặc hơi vàng, bìa nguyên hoặc chia thùy nhẹ; kết quả nhuộm Gram: chọn các chủng trực khuẩn Gram dương bắt màu tím, hình que, sinh bào tử; cụ thể kết quả lựa chọn tại Hình 1 dưới đây:



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc và nhuộm Gram tế bào một số chủng vi khuẩn Bacillus phân lập từ mẫu phân trẻ em

Kết quả nhuộm Gram và quan sát trên kính hiển vi, thấy vi khuẩn Hình 1 có dạng que ngắn, hai đầu tròn, đứng riêng lẻ, có khi nối lại thành sợi dài. Chủng vi khuẩn này là vi khuẩn Gram dương. Qua đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào, các đặc điểm sinh lí hóa (test API CH50) của các chủng M23, M26, M31, M36, M70, M91 có thể kết luận sơ bộ các chủng này có nhiều đặc điểm trùng khớp với *B. subtilis* [6, 7].

3.2. Kết quả khảo sát khả năng chịu acid của các chủng vi khuẩn. Đo giá trị OD₆₁₀ ban đầu của bình nuôi cấy là T₀ = 1,05. Kết quả khảo sát khả năng chịu acid của các chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện tại Hình 2 dưới đây:



Hình 2. Sự phát triển của các chủng vi khuẩn

khuẩn B. subtilis ở các môi trường nuôi cấy có pH khác nhau

Trong số 6 chủng vi khuẩn phân lập, có 6 chủng có khả năng phát triển ở pH dưới 3. Các chủng vi khuẩn có khả năng phát triển ở các pH thử nghiệm, sắp xếp theo mức độ chịu pH thấp từ cao đến thấp. Tuy nhiên, các chủng *B. subtilis* phát triển tốt nhất ở pH 6, đặc biệt là chủng M70. Chủng này vừa có khả năng tồn tại, chống chịu tốt ở pH thấp. Nghiên cứu của Sorokulova và cộng sự (2013) cho thấy, các chủng vi khuẩn probiotic thuộc chi *Bacillus* có khả năng chịu được pH thấp ở mức pH 2 đến pH 3 trong thời gian 2 giờ [5, 6]. Đối với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được xác định trong nghiên cứu của Won và cộng sự (2020) có khả năng chịu được mức pH 3 trong thời gian 120 phút. Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn M23, M26, M31, M36, M70 và M91 có thể chịu được mức pH 2 trong thời gian lâu hơn (3 giờ).

3.5. Kết quả đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào. Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp lỗ thạch được thực hiện với các chủng vi khuẩn M23,

M26, M31, M36, M70 và M91.

Bảng 1. Khả năng sinh enzym ngoại bào của các chủng vi khuẩn

Enzym ngoại bào	Đường kính vòng phân giải (D-d) (mm)					
	M23	M26	M31	M36	M70	M91
Amylase	9,35 ± 0,91	9,80 ± 0,45	11,50 ± 0,83	12,43 ± 0,64	20,15 ± 0,35	9,33 ± 0,63
Protease	11,13 ± 0,25	12,41 ± 0,73	12,56 ± 0,47	16,48 ± 0,21	18,36 ± 0,41	10,62 ± 0,12

Ghi chú: D - d là đường kính vòng phân giải, d = 5 mm.

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại (n=3) và tính giá trị trung bình.

Các chủng M23, M26, M31, M36, M70 và M91 đều có khả năng sinh cả enzyme amylase và protease. Khả năng sinh amylase của các chủng thấp hơn so với khả năng sinh protease

thể hiện đường kính vòng phân giải cơ chất tinh bột (9 - 20 mm) cao hơn so đường kính vòng phân giải casein (10 - 18 mm). Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây, chủng *B. subtilis* có khả năng sinh enzym ngoại bào để phân giải các cơ chất [7].

3.6. Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn

Bảng 2. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng vi khuẩn

Vi khuẩn gây bệnh	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d) (mm)					
	M23	M26	M31	M36	M70	M91
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8,26 ± 0,23	9,80 ± 0,45	15,50 ± 0,83	12,43 ± 0,25	15,10 ± 0,21	9,04 ± 0,53
<i>E. coli</i> ATCC 8739	10,17 ± 0,25	11,41 ± 0,54	12,56 ± 0,47	14,38 ± 0,22	18,06 ± 0,32	8,62 ± 0,12
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	9,35 ± 0,91	15,38 ± 0,47	9,52 ± 0,81	12,70 ± 0,64	21,45 ± 0,35	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	11,29 ± 0,19	12,06 ± 0,23	12,37 ± 0,47	16,25 ± 0,27	24,32 ± 0,81	10,26 ± 0,58

Ghi chú: D - d là đường kính vòng kháng khuẩn, d = 5 mm. Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại (n=3) và tính giá trị trung bình.

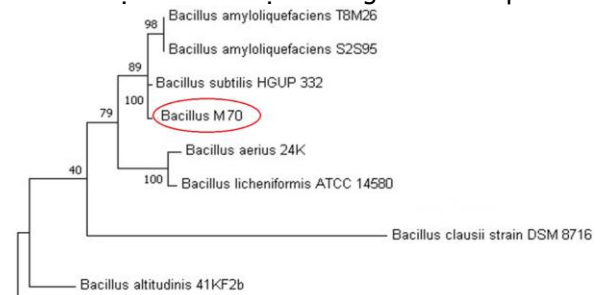
Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *B. subtilis* được phân lập được đánh giá bằng cách đo đường kính vùng ức chế tăng trưởng của các loại vi khuẩn và nấm gây bệnh khác nhau phát triển khi có mặt probiotic. Các kết quả trong Bảng 2 cho thấy hiệu quả của *Bacillus* M70 vượt trội hơn trong việc kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn Gram dương và Gram âm gây bệnh cũng như khả năng ức chế sự phát triển của nấm và vi khuẩn.

3.7. Kết quả đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh. Qua kết quả đánh giá kết quả độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng phân lập được tham chiếu theo mức độ đề kháng và nhạy cảm theo giá trị tiêu chuẩn được đưa ra bởi CLSI (2020). Nhận thấy 6 chủng đều có mức độ nhạy cảm (S) với các kháng sinh thử nghiệm bao gồm Chloramphenicol 30µg; Erythromycin 15µg; Kanamycin 10µg; Tetracycline 30µg; Cefotaxime 30µg; Ampicillin 10µg; Gentamicin 10µg; Ciprofloxacin 5µg. Riêng M31 kháng Kanamycin; M36, M91 kháng Ampicillin.

Ghi chú: Vòng kháng khuẩn ≥ 20 mm : Nhạy (S). Vòng kháng khuẩn từ 15-19 mm: Trung gian (I). Vòng kháng khuẩn ≤ 14 mm : Kháng (R)

3.8. Kết quả giải trình tự gen *Bacillus subtilis* bằng phương pháp 16S rADN. Vùng trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn

được khuếch đại bằng PCR và giải trình tự. Với cặp mồi sử dụng cho thấy đã khuếch đại được vùng gen này ở tất cả các chủng vi khuẩn. Kích thước đoạn khuếch đại khoảng 350-400 bp.



Hình 3. Cây phát sinh loài của chủng vi khuẩn *Bacillus* M70

Đoạn trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài, kết hợp với vùng trình tự gen 16S rRNA với các chủng vi khuẩn tham chiếu trong Genbank (Hình 3). Kết quả phân tích từ cây phát sinh loài của chủng M70 nằm cùng nhánh với chủng *Bacillus subtilis* HGUP 332 với chỉ số bootstrap 100, có mức độ tin cậy cao. Vậy có thể kết luận *Bacillus* M70 là *Bacillus subtilis* HGUP 332. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu của Simon và cộng sự (2011) khi chứng minh rằng các chủng vi khuẩn *Bacillus* đều có mặt trong đường ruột của con người [6].

3.9. Kết quả thử nghiệm độ an toàn

Kết quả đánh giá hoạt tính làm tan máu. Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus subtilis* M70 không thể hiện hoạt tính gây tan máu, kết quả này là một tiêu chí lựa chọn quan trọng trong các nghiên cứu in-vitro và là một tính chất vô cùng cần thiết để đánh giá tính an toàn của chủng *Bacillus subtilis* M70 [6].

Kết quả thử độ an toàn trên động vật thực nghiệm. Trên các lô chuột, lô trắng và lô thử đều quan sát thấy:

+ Các chuột đều không có biểu hiện bất thường, ăn uống, vận động bình thường, phản xạ tốt với kích thích, lông mượt, niêm mạc hồng hào, mắt sáng, phân khô, nước tiểu bình thường, tăng cân.

+ Trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc, không xuất hiện chuột chết. Sau 7 ngày thí nghiệm, 100% chuột đều còn sống.

Như vậy, không quan sát thấy sự khác biệt giữa lô đối chiếu và lô thử ($p < 0,05$). Điều đó chứng tỏ, lô thử nghiệm trên *Bacillus subtilis* M70 được chứng minh là an toàn khi dùng theo đường uống trên chuột thực nghiệm, đạt tiêu chí thử độ an toàn với probiotic theo Dược điển Việt Nam V.

IV. BÀN LUẬN

Kết quả phân lập *Bacillus* từ mẫu phân trẻ em khỏe mạnh cho thấy *Bacillus* có thể tồn tại trong cơ thể người, và sự tồn tại của *Bacillus* rất đa dạng [1].

Việc đánh giá tuyển chọn các đặc tính probiotic của *Bacillus* này cho thấy rằng các chủng phân lập có khả năng hình thành bào tử, chống chịu được trong các môi trường khắc nghiệt như pH thấp để tồn tại trong đường tiêu hóa, sinh enzym amylase và protease, do đó có thể được sử dụng làm chế phẩm sinh học và ứng dụng sản xuất trong ngành công nghiệp thực phẩm như đã báo cáo trước đây trong các nghiên cứu khác [6, 7]. Trong điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao kéo dài, pH acid ... chủng *Bacillus* sẽ hình thành bào tử [3].

Về mức độ nhạy cảm với kháng sinh: Nghiên cứu của Won và cộng sự (2020) đã thử nghiệm trên các loại kháng sinh đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Mức độ đề kháng và nhạy cảm của các chủng *B. subtilis* phân lập với kháng sinh được đánh giá theo giá trị tiêu chuẩn được đưa ra bởi CLSI 2020. Kết quả thử độ nhạy với kháng sinh cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó đã chứng minh rằng, các chủng *Bacillus* phân lập đều rất nhạy cảm (S) với hầu hết loại kháng sinh và chỉ kháng (R) với ampicillin [7]. Kết quả này cho thấy *B. subtilis* M70 có tiềm

năng như chế phẩm sinh học bổ sung trong các tình trạng nhiễm khuẩn.

Về kết quả định danh 16S AND: Kết quả phân loài các chủng vi khuẩn trên cây phát sinh loài dựa vào chỉ số bootstrap tương ứng với mỗi nhánh. Chỉ số bootstrap càng cao thì mức độ tin cậy của chủng vi khuẩn cần định danh tương đồng với chủng vi khuẩn trên cùng một nhánh càng lớn [7]. Kết quả trên cây phát sinh loài của chủng *Bacillus* M70 cho thấy mức độ gần gũi khi giải trình tự gen đạt 100% tương đồng *Bacillus subtilis* HGUP 332.

Về thử độ an toàn: Các nghiên cứu đã chứng minh sự hình thành các vùng sạch và xanh lục trên các đĩa thạch được đánh giá là tan máu. Kết quả thử trên đĩa thạch Colombia chứa 5% máu cừu cho thấy không có vùng sạch và màu xanh lục xung quanh nên được xác định là hoạt tính không tan máu [3]. Hoạt tính không tan máu của vi khuẩn probiotic là một tiêu chí lựa chọn quan trọng trong các nghiên cứu in-vitro và là một tính chất vô cùng cần thiết để đánh giá tính an toàn của chủng. Vi khuẩn dương tính với tan máu được coi là không an toàn để sử dụng làm chế phẩm sinh học do độc lực của chúng gây phù nề và thiếu máu. Kết quả thử *B. subtilis* M70 không gây tan máu. Ngoài ra, thử nghiệm độ an toàn trên chuột nhắt trắng cho thấy 100% chuột khỏe mạnh, biểu hiện bình thường và tăng cân. Vì vậy, có thể chứng minh *B. subtilis* M70 là chủng an toàn [3].

V. KẾT LUẬN

Từ 6 chủng *Bacillus* phân lập được, nghiên cứu đã lựa chọn được chủng có hoạt tính cao nhất để định danh chính xác là *Bacillus subtilis* M70. Chủng phân lập M70 cho thấy trình tự tương đồng gần gũi (100%) với *Bacillus subtilis* HGUP 332. Trình tự nucleotide thu được của chủng này đã được lưu giữ vào cơ sở dữ liệu NCBI GenBank với các mã số gia nhập CP045816. Chủng *Bacillus subtilis* M70 là trực khuẩn Gram dương, có khả năng hình thành bào tử, chịu được pH 3 trong 3 giờ, có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh, nhạy cảm với kháng sinh. Đồng thời, *Bacillus subtilis* M70 không gây tan huyết, đạt độ an toàn in-vitro và thử an toàn thành công trên chuột thí nghiệm. Như vậy, có đủ dữ liệu để đánh giá *Bacillus subtilis* M70 an toàn và là một probiotic tiềm năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M.E., Stanton, C. (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario.

- Bộ Y tế**, Dược điển Việt Nam V (2018), Phụ lục 1.26 (Yêu cầu chung đối với các chế phẩm probiotic, PL - 34)
- Hong, H.A., Khaneja, R., Tam** (2009). *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res. Microbiol.* 160.
- Ngô Chí Công, Trịnh Ngọc Nam** (2021) Đánh giá đặc tính probiotic của vi khuẩn Gram dương phân lập từ đường tiêu hóa gà, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Số 01, Trang 15-25.
- Simon M. Cutting** (2011) *Bacillus* probiotics, *Food Microbiology*, Volume 28.
- Won S, Hamidoghli A, Choi W, Bae J, Jang WJ.** (2020) Evaluation of Potential Probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*. 2020 Feb 19;8(2):281.
- Guo X, Chen D-D et al.** (2016) Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. *Fish Shellfish Immunol.*, 2016 May;52:74-84.

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH ẢNH SIÊU ÂM NỘI SOI VÀ MÔ BỆNH HỌC CỦA U DƯỚI NIÊM MẠC DẠ DÀY

Hoàng Cẩm Tú¹, Đào Văn Long^{1,2}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Mô tả đặc điểm và đối chiếu hình ảnh siêu âm nội soi (SANS) và kết quả mô bệnh học (MBH), hóa mô miễn dịch (HMMD) của u dưới niêm mạc dạ dày. **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang tiến cứu trên 52 bệnh nhân có u dưới niêm mạc dạ dày đã được xác định qua nội soi dạ dày tá tràng, được làm siêu âm nội soi tại Phòng khám đa khoa Hoàng Long từ 8/2022 đến 7/2023. **Kết quả:** Tuổi trung bình là 57,1 ± 9,04 và nữ giới chiếm 76,9%; 96,15% các trường hợp u tế bào hình thoi trên SANS là các khối giảm âm đồng nhất xuất phát từ lớp dưới niêm mạc dạ dày; kết quả HMMD thấy 44,2% là u GIST, 50% là u cơ trơn, và 3,8% chưa phù hợp với SANS và MBH. **Kết luận:** MBH kết hợp với HMMD làm tăng tỷ lệ chẩn đoán chính xác của SANS. **Từ khóa:** u dưới niêm mạc dạ dày, siêu âm nội soi, mô bệnh học, hóa mô miễn dịch

SUMMARY

STUDY ON ENDOSCOPIC ULTRASONIC IMAGING CHARACTERISTICS AND HISTOLOGY OF STOMACH SUBMUCULAR TUMOR

Objective: Characterize and compare endoscopic ultrasound images (EUS) and histopathology and immunohistochemistry results of gastric submucosal tumors. **Methods:** A prospective cross-sectional descriptive study on 52 patients with gastric submucosal tumors identified through gastroduodenal endoscopy who underwent endoscopic ultrasound at Hoang Long General Clinic from August 8, 2022, to July 20, 2023. **Results:** The average age was 57.1 ± 9.04 years, and women accounted for 76.9%; 96.15% of spindle cell tumors on the EUS are homogeneous hypoechoic masses originating from the gastric

submucosa; immunohistochemistry results showed that 44.2% were GIST tumors, 50% were leiomyomas, and 3.8% were not compatible with immunohistochemistry and histopathology. **Conclusion:** histopathology combined with immunohistochemistry increases the accurate diagnosis rate of EUS. **Keywords:** Gastric submucosal tumors, Endoscopic ultrasound, Histopathology, Immunohistochemistry

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U dưới niêm mạc dạ dày (UDNMDD) là những tổn thương nằm dưới lớp niêm mạc dạ dày. Các khối u có thể là u cơ trơn, u tế bào Schwann, u hạt, u cuộn mạch, sarcoma cơ... Hình ảnh nội soi của các khối u này đa số đều là khối đẩy lùi vào lòng dạ dày, niêm mạc phủ trên bình thường. Chính vì vậy việc xác định bản chất khối u qua nội soi tiêu hóa trên là không dễ dàng. SANS có thể chẩn đoán được chính xác vị trí u ở lớp nào của thành dạ dày, kích thước, mật độ âm, bờ khối u với độ nhạy và độ đặc hiệu cao,^{1,2} giúp các bác sĩ có thể dự đoán được phần nào typ MBH, đặc điểm ác tính của khối u và lựa chọn phương pháp điều trị cắt u qua nội soi hay phẫu thuật. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu UDNMDD tuy nhiên tại Việt Nam các nghiên cứu này còn rất ít do tần suất gặp bệnh lý này không quá nhiều, sự hiểu biết và phổ biến của SANS còn chưa cao. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài "*Nghiên cứu đặc điểm siêu âm nội soi và mô bệnh học của u dưới niêm mạc dạ dày*" với mục tiêu mô tả đặc điểm và đối chiếu hình ảnh siêu âm nội soi và kết quả mô bệnh học, hóa mô miễn dịch của u dưới niêm mạc dạ dày.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Là các bệnh nhân có UDNMDD đã được xác định qua nội soi dạ

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Đại Học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Hoàng Cẩm Tú

Email: tuhoang.fsh@gmail.com

Ngày nhận bài: 22.01.2024

Ngày phản biện khoa học: 8.3.2024

Ngày duyệt bài: 29.3.2024