

LIVESPO® NAVAX CHỨA BÀO TỬ LỢI KHUẨN BACILLUS HỖ TRỢ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ TRIỆU CHỨNG VÀ GIẢM NỒNG ĐỘ VIRUS HỢP BÀO HÔ HẤP (RSV) Ở TRẺ EM

Trần Thanh Tú¹, Nguyễn Thị Vân Anh³, Phùng Thị Bích Thủy¹, Bùi Thị Huyền^{2,3}, Nguyễn Thị Thanh Phúc¹,
Vũ Thị Tâm¹, Ngô Thị Phương Nga¹, Nguyễn Thị Mai¹, Đỗ Thị Hậu¹, Ngô Hồng Thủy¹,
Phạm Thị Thu Trang¹, Lê Xuân Ngọc¹, Đỗ Thu Hường¹, Nguyễn Hoà Anh²

1. Bệnh viện Nhi Trung ương, 2. Công ty TNHH ANABIO R&D
3. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: Viêm nhiễm virus hợp bào hô hấp RSV (Respiratory Syncytial virus) là một trong những nguyên nhân phổ biến gây bệnh đường hô hấp. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu khảo sát tác dụng hỗ trợ điều trị của sản phẩm probiotic LiveSpo® Navax dạng nước chứa bào tử lợi khuẩn Bacillus thế hệ LS-III ở nồng độ cao trên đối tượng trẻ em bị bệnh đường hô hấp cấp do nhiễm RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương. **Phương pháp:** Bước đầu đánh giá trên 30 bệnh nhân được chẩn đoán bị bệnh viêm tiểu phế quản do nhiễm RSV tham gia vào nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng mù. Bệnh nhân được chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm (n = 15/nhóm): nhóm sử dụng LiveSpo® Navax (nhóm Navax) và nhóm sử dụng nước muối sinh lý NaCl 0,9% (nhóm Chứng), được hướng dẫn xịt mũi với tần suất 3 lần/ngày trong 6 ngày liên tục, kết hợp với sử dụng thuốc điều trị thường quy tại bệnh viện. Bệnh nhân được tiến hành theo dõi các chỉ số lâm sàng (khò khè, khó thở, độ bão hòa oxy,...) trong suốt thời gian điều trị và được thực hiện các xét nghiệm như: (i) đo tải lượng RSV, nồng độ của B. subtilis và B. clausii ở ngày 0 và ngày 3 trong dịch tỵ hầu bằng phương pháp Real-time PCR. **Kết quả:** Nhóm Navax có thời gian khỏi các triệu chứng xuất tiết mũi, khó thở, ran rít, ran ẩm, rút lõm lồng ngực sớm hơn nhóm đối chứng khoảng 1 ngày. Sau 3 ngày điều trị, tải lượng RSV ở nhóm Navax ở dịch tỵ hầu của bệnh nhân giảm khoảng 300 lần, trong khi nhóm đối chứng chỉ giảm 15 lần, có liên quan tới sự có mặt của bào tử vi khuẩn B. subtilis và B. clausii ở dịch mũi bệnh nhân nhóm Navax mà vắng mặt ở nhóm đối chứng. 100% bệnh nhân sử dụng LiveSpo® Navax không có bất cứ dấu hiệu bất thường nào về rối loạn nhịp thở, mạch, kích ứng niêm mạc mũi, hay tiêu hóa. **Kết luận:** Đây là nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ở trẻ em đầu tiên trên thế giới về an toàn và tác dụng của probiotic bào tử lợi khuẩn Bacillus ở dạng xịt mũi. LiveSpo® Navax có tác dụng rút ngắn khoảng 1 ngày thời gian điều trị các triệu chứng điển hình của bệnh đường hô hấp do nhiễm RSV gây ra và làm giảm nồng độ virus hợp bào hô hấp RSV trong mũi của trẻ em hiệu quả hơn gấp 20 lần so với nước muối sinh lý.

Từ khóa: LiveSpo® Navax, bào tử lợi khuẩn Bacillus, RSV, nhiễm trùng hô hấp, trẻ em.

Nhận bài: 15-3-2021; Chấp nhận: 15-4-2021
Người chịu trách nhiệm chính: Trần Thanh Tú
Địa chỉ: tttu.rich@gmail.com

ABSTRACT

LIVESPO® NAVAX PROBIOTICS THAT CONTAIN BACILLUS SPORES EFFECTIVELY SUPPORT SYMPTOMATIC TREATMENT AND REDUCE THE CONCENTRATION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV) IN CHILDREN

Background/Aims: Infection with the Respiratory Syncytial Virus (RSV) is one of the most common causes of respiratory tract diseases. This study was conducted to initially investigate supportive therapeutic effects of probiotic product LiveSpo® Navax, as liquid form containing Bacillus spores of LS-III generation at a high concentration, in children having acute respiratory diseases caused by RSV at the Vietnam National Children's Hospital. **Methods:** Totally 30 patients acquiring bronchiolitis participated in the blind clinical study. The patients were divided randomly into 2 groups (n = 15/group each): one using LiveSpo® Navax (Navax group) and the other using 0.9% NaCl physiological saline (Control group), and were instructed to perform nasal spraying at frequency of 3 times per day for continuous 6 days, in combination with conventional drug therapy in the hospital. The patients were monitored their clinical indicators throughout the treatment period and underwent tests such as: (i) RSV rapid test at day 0, quantitative analysis of RSV, *B. subtilis* and *B. clausii* concentrations in nasal wash sample at day 0 and day 3 by real-time PCR. **Results:** The Navax group had about 1-day shorter recovery time of symptoms such as nasal secretion, difficulty breathing, sonorous rales, moist rales, chest depression than the control group. After 3 days of treatment, the Navax group had about 300-fold reduced RSV concentration in their nasal fluid, while the control group had only 15-fold reduction; in association with the presence of *B. subtilis* and *B. clausii* in the nasal fluids of Navax group but absence in Control group. 100% of patients using LiveSpo® Navax showed neither signs of abnormal breath, pulse, irritation of the nasal mucosa, nor digestion.

Conclusion: This study is the first clinical trial in children in the world to demonstrate safety and effects of Bacillus spore probiotics as nasal spray. LiveSpo® Navax provided 1-day earlier treatment time of typical symptoms for respiratory diseases caused by RSV infection, as well as effectively reduced the concentration of RSV in nasal fluid of children by 20-fold higher than 0.9% NaCl physiological saline.

Keywords: LiveSpo® Navax, Bacillus spore probiotics, RSV, respiratory infection, children.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus hợp bào hô hấp hay còn gọi là RSV (Respiratory syncytial virus) là loại virus phổ biến nhất gây viêm đường hô hấp cấp (viêm mũi họng, viêm tiểu phế quản, viêm phế quản...) đặc biệt trên đối tượng là trẻ em. Tùy thuộc vị trí tổn thương các triệu chứng lâm sàng thay đổi từ nhẹ như sốt, ho, chảy mũi,.. đến nặng như khó thở, suy hô hấp) một triệu chứng nổi bật ở trẻ nhiễm RSV đó là xuất tiết, khò khè nhiều và kéo dài thậm chí nhiều ngày sau khi không còn tổn thương thực thể. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), hàng năm có khoảng ba triệu

người nhập viện do nhiễm RSV, số ca tử vong có thể lên tới 66,000 trẻ em. RSV thường phát triển mạnh vào mùa đông - xuân, xuân - hè. RSV rất dễ lây lan, từ người này sang người khác bằng cách xâm nhập qua mắt, mũi hoặc miệng, dễ dàng lây lan qua không khí trên các giọt bắn đường hô hấp bị nhiễm bệnh. Virus này có thể sống hàng giờ trên các vật cứng như mặt bàn, đường ray cũi và đồ chơi. Những người có nguy cơ mắc bệnh nặng cao nhất bao gồm trẻ sinh non, trẻ nhỏ dưới 2 tuổi, hoặc người lớn bị suy giảm miễn dịch, người lớn tuổi, đặc biệt là những người có bệnh tim hoặc phổi tiềm ẩn. Theo số liệu báo cáo gần

đây (11/2020), số lượng trẻ nhập viện do viêm đường hô hấp tại Bệnh viện Nhi Trung ương (Hà Nội) tăng cao gấp 2 lần bình thường, trong số này gần 1/3 là trẻ nhiễm RSV [1-4].

Cho đến thời điểm hiện tại chưa có thuốc điều trị đặc hiệu vaccin phòng tránh và thuốc điều trị đặc hiệu RSV. Trẻ chỉ dùng kháng sinh khi có viêm bội nhiễm thêm vi khuẩn khác như *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae*... Trong những năm gần đây, các phương pháp điều trị dự phòng ngày càng được tăng cường, trong đó probiotic được coi là ứng cử viên có triển vọng trong việc hỗ trợ điều trị và giảm sự lệ thuộc vào kháng sinh [5-6].

Probiotic là những vi sinh vật có lợi cho vật chủ, đặc biệt an toàn với sức khỏe của con người. Các nghiên cứu gần đây cho thấy bên cạnh vai trò là lợi khuẩn cho đường tiêu hóa, probiotic còn có khả năng bảo vệ và phòng tránh sự viêm nhiễm đường hô hấp [4]. Có nhiều giả thuyết về cơ chế kháng virus của probiotic đã được thảo luận, tuy nhiên, vai trò kháng virus của probiotic được thể hiện qua ba cơ chế phổ biến gồm: (i) virus bị bắt giữ thông qua sự tương tác trực tiếp giữa probiotic và virus, (ii) probiotic có khả năng sản sinh ra các chất sinh trưởng thứ cấp ức chế sự phát triển của virus, và (iii) probiotic kích thích hệ thống miễn dịch bắt giữ các virus xâm nhập [7].

Trên thị trường hiện nay chỉ có một sản phẩm probiotic duy nhất được khuyến cáo sử dụng dưới dạng xịt trực tiếp vào mũi là LiveSpo® Navax, sản phẩm được bào chế dưới dạng hỗn dịch chứa bào tử sống của hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 và *Bacillus clausii* ANA39. Hai chủng lợi khuẩn này được phân lập lần lượt từ ruột tôm và ruột gà có hiệu quả tạo bào tử và tạo biofilm vượt trội, nhờ đó tăng cường khả năng gắn bám lên niêm mạc mũi và cạnh tranh môi trường sống với các vi sinh vật gây bệnh ở đường hô hấp. Ngoài ra, chủng lợi khuẩn này cũng kích thích sự tổng

hợp interferon-gamma (IFN- γ) và có hoạt tính kháng khuẩn. Trên cơ sở hoạt tính ưu việt của hai chủng vi khuẩn trong sản phẩm LiveSpo® Navax và tính mới- thuận tiện trong việc sử dụng sản phẩm khi dùng ở dạng xịt, nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu đánh giá tính an toàn và tác dụng hỗ trợ điều trị triệu chứng nhiễm RSV ở trẻ em đang điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương của LiveSpo® Navax. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng đánh giá mức độ giảm nồng độ RSV và sự có mặt của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 và *Bacillus clausii* ANA39 trong dịch tỵ hầu của bệnh nhân.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Nghiên cứu gồm 30 bệnh nhân nhi có độ tuổi từ 4 - 24 tháng tuổi, tình nguyện tham gia nghiên cứu bao gồm cả nam (chiếm 70%) và nữ (chiếm 30%) được chẩn đoán viêm tiểu phế quản có kết quả dương tính RSV điều trị nội trú tại Trung tâm Quốc tế S, Bệnh viện Nhi Trung ương trong thời gian từ ngày 2/1/2021 đến 8/2/2021.

- LiveSpo® Navax (Số XNCB: 190001347/PCBA-HN) của công ty TNHH LiveSpo Pharma được bào chế dưới dạng hỗn dịch nước muối sinh lý NaCl 0,9% chứa bào tử lợi khuẩn thế hệ LS-III của hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 và *Bacillus clausii* ANA39 ở dạng tinh khiết, nồng độ cao $\geq 5 \times 10^9$ CFU/5 mL, được sử dụng ở dạng xịt vào mũi, họng.

- Chẩn đoán nhiễm RSV từ bệnh phẩm dịch ngoáy tỵ hầu bằng phương pháp test nhanh sử dụng que thử BD Veritor System for rapid detection of RSV (Becton Dickison), xét nghiệm máu chỉ số protein phản ứng C (CRP) và số lượng bạch cầu giúp xác định mức độ viêm nhiễm, chụp Xquang tim phổi ở ngày 0 được thực hiện tại Trung tâm Quốc tế S, Bệnh viện Nhi Trung ương; chẩn đoán định lượng RSV bằng phương pháp real time PCR Taqman Probe từ dịch tỵ hầu đã được chuẩn hóa và sử dụng thường quy tại khoa Nghiên cứu Sinh

học Phân tử các bệnh truyền nhiễm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng.

Cỡ mẫu và chọn mẫu: Lựa chọn ngẫu nhiên mỗi nhóm 15 bệnh nhân. Chọn mẫu thuận tiện, tất cả các bệnh nhân đủ tiêu chuẩn trong thời gian nghiên cứu. Nhóm sử dụng LiveSpo® Navax (đặt tên là nhóm Navax) và nhóm đối chứng (đặt tên là nhóm Chứng) sử dụng nước muối sinh lý NaCl 0,9%.

Quy trình nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành song song trên 2 nhóm bệnh nhân và bệnh nhân được phát thuốc xịt mã hóa dưới dạng mẫu mù để đảm bảo tính khách quan của nghiên cứu. Điều dưỡng được hướng dẫn sử dụng xịt với liều lượng khoảng 50 µl/lần x 3 lần/ngày trực tiếp vào hốc mũi liên tục trong 6 ngày sản phẩm xịt song song với các thuốc điều trị thường quy tại bệnh viện. Như vậy, mỗi 50 µl LiveSpo® Navax chứa $\geq 2,5 \times 10^8$ CFU tổng cộng *B. subtilis* ANA4 và *B. clausii* ANA39. Trong quá trình điều trị, bệnh nhân được theo dõi các triệu chứng lâm sàng điển hình của viêm đường hô hấp do RSV bao gồm: xuất tiết mũi, khô khè, ran rít, ran ẩm, khó thở, rút lõm lồng ngực (RLLN), mạch, nhịp thở, nhiệt độ hàng ngày trong 6 ngày; định lượng RSV trong dịch tỵ hầu ở ngày 3 so sánh với ngày 0 bằng phương pháp real time PCR sử dụng Taqman probe; và định lượng *Bacillus subtilis* ANA4 và *Bacillus clausii* ANA39 trong dịch tỵ hầu ở ngày 3 bằng phương pháp real time PCR SYBR Green sử dụng mỗi đặc hiệu với *B. subtilis* và *B. clausii*, đã được tối ưu theo chuẩn ISO 17025 tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên [8-9]. Hiệu quả của LiveSpo® Navax được đánh giá dựa trên các kết quả xét nghiệm RSV sau 3 ngày điều trị và mức độ giảm các triệu

chứng trên lâm sàng và cận lâm sàng. Trong đó, mức độ giảm tải lượng RSV được tính theo công thức $2^{\Delta C_t}$ trong đó $\Delta C_t = C_t$ ngày 3 - C_t ngày 0; C_t là giá trị chu kỳ ngưỡng của real time PCR đặc hiệu cho RSV. Nồng độ của *B. subtilis* và *B. clausii* trong dịch tỵ hầu được tính toán dựa trên đường chuẩn về mối quan hệ giữa nồng độ (CFU/mL) và giá trị C_t của tín hiệu SYBR Green.

Thu thập và xử lý số liệu: Theo dõi, quan sát tình trạng của bệnh nhân trong suốt thời gian nghiên cứu và điền vào hồ sơ có sẵn. Phân tích và xử lý số liệu theo phương pháp thống kê y học.

Đạo đức y học: Nghiên cứu được thực hiện theo nguyên tắc đạo đức phù hợp với tuyên bố Helsinki và hướng dẫn ICH GCP, phù hợp với các quy định và chuẩn mực đạo đức hiện hành của Bộ Y tế về nghiên cứu trên đối tượng con người. Nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y học của Bệnh viện Nhi Trung ương theo số quyết định VNCH-RICH-2020-46.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm nhóm nghiên cứu trước khi điều trị

Số liệu thu thập được trên 30 bệnh nhân dương tính với RSV trước khi điều trị cho thấy, trên lâm sàng có 15/15 bệnh nhân ở cả hai nhóm đều ghi nhận triệu chứng xuất tiết mũi họng và ran rít, kèm theo ran ẩm; một số trường hợp có triệu chứng rút lõm lồng ngực và khó thở (20-33%), sốt (6,7%). Hơn 50% bệnh nhân có chỉ số CRP cao (> 6 mg/L) và khoảng 20% bệnh nhân có số lượng bạch cầu cao ($> 10,0$ g/L). Kết quả chụp Xquang cho thấy hầu hết các bệnh nhân (93-100%) có tổn thương ở phổi (nốt, ứ khí...). Các triệu chứng lâm sàng và các chỉ số cận lâm sàng của bệnh nhân thuộc hai nhóm Navax và nhóm Chứng được tổng hợp và trình bày ở Bảng 1 dưới đây cho thấy đối tượng nghiên cứu là bệnh viêm tiểu phế quản.

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của trẻ em nhiễm RSV trước khi tham gia điều trị

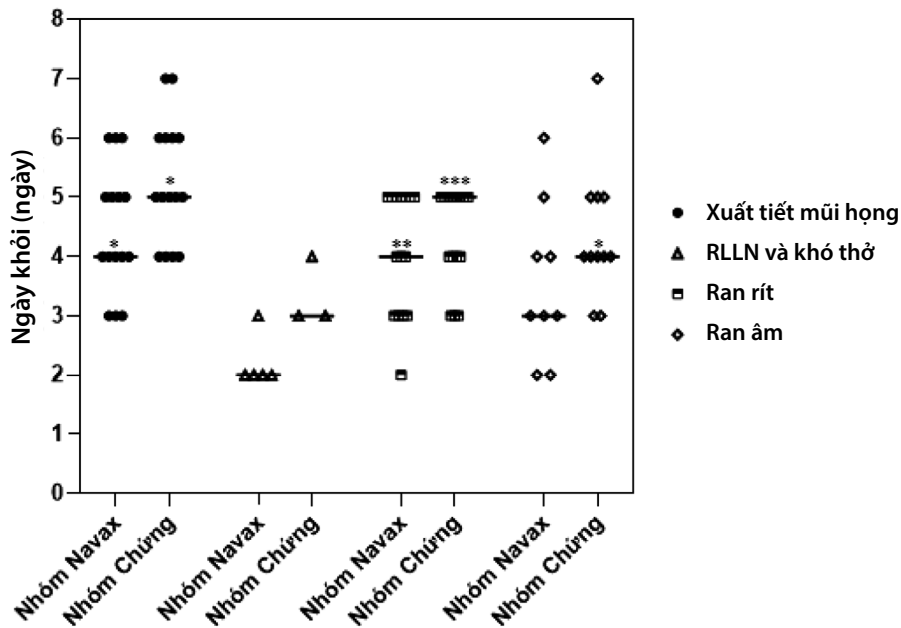
Các chỉ số	Nhóm Navax (N = 15)	Nhóm Chứng (N = 15)
Tuổi (tháng)		
≥ 4 - 12. n (%)	9 (60)	7 (46,67)
> 12-24. n (%)	6(40)	8 (53,33)
Giới tính		
Nam n (%)	11 (73,33)	10 (66,67)
Nữ n (%)	4 (26,67)	5 (33,33)
Đặc điểm lâm sàng		
Xuất tiết mũi họng. n (%)	15 (100)	15 (100)
Rút lõm lồng ngực và khó thở n (%)	5 (33,33)	3 (20)
Ran rít. n (%)	15 (100)	15 (100)
Ran ẩm. n (%)	9 (60,00)	11 (73,33)
Sốt (>37,5). n (%)	1 (6,67)	1 (6,67)
Đặc điểm cận lâm sàng		
Xquang tim phổi (Nốt/ứ khí/...)	15 (100)	14 (93,33)
Bạch cầu tổng số (>10,0 G/L)	8 (53,33)	10 (66,67)
Chỉ số CRP (> 6,0 mg/L)	4 (26,67)	3 (20)

3.2. An toàn và tác dụng hỗ trợ điều trị triệu chứng lâm sàng trên trẻ em nhiễm RSV của sản phẩm probiotic dạng xịt LiveSpo® Navax

Kết quả thử nghiệm LiveSpo® Navax trên tổng số 15 bệnh nhân đều không ghi nhận bất kỳ trường hợp nào liên quan đến các bất thường chỉ số về nhịp thở, mạch, nhiệt độ, độ bão hòa oxy trong máu (SpO₂) trước và sau xịt. 100% bệnh nhân tham gia thử nghiệm không có bất cứ dấu hiệu kích ứng niêm mạc mũi và cũng không có biểu hiện gì về rối loạn tiêu hóa (nôn, tiêu chảy).

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm sử dụng

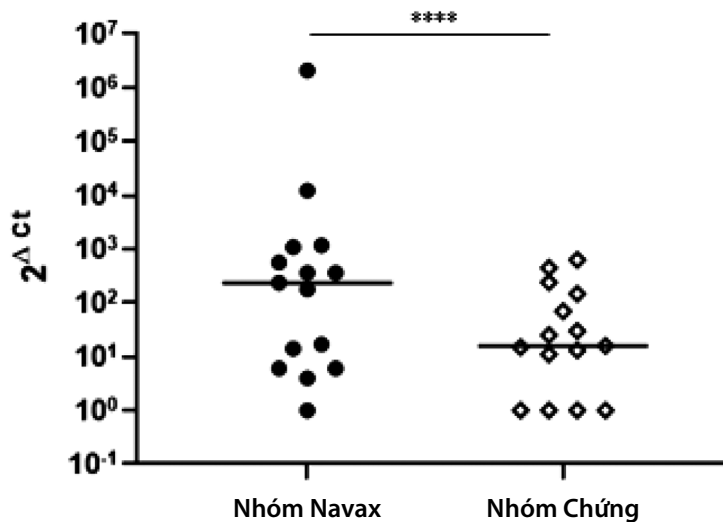
LiveSpo® Navax có tác động giảm các triệu chứng trên lâm sàng nhanh hơn nhóm sử dụng nước muối sinh lý (NaCl 0,9%). Cụ thể, kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy thời gian khỏi các triệu chứng xuất tiết mũi họng (Navax/NaCl 0,9% là 4 ngày/5 ngày), rút lõm lồng ngực và khó thở (Navax/NaCl 0,9% là 1 ngày/2 ngày), ran rít (Navax/NaCl 0,9% là 4 ngày/5 ngày) và ran ẩm (Navax/NaCl 0,9% là 3 ngày /4 ngày) ở bệnh nhân nhóm Navax sớm hơn 1 ngày so với nhóm Chứng, và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



Hình 1. Số ngày điều trị khỏi các triệu chứng lâm sàng của nhóm Navax và nhóm Chứng (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

3.3. Tác dụng giảm nồng độ RSV trong dịch tỵ hầu của bệnh nhân

Kết quả phân tích thống kê so sánh giá trị $2^{\Delta Ct}$ phản ánh mức độ giảm tải lượng RSV trong dịch ngoáy mũi của bệnh nhân 3 ngày sau khi sử dụng Navax kết hợp với các điều trị khác, so với trước điều trị trên 30 bệnh nhân ở 2 nhóm nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân sử dụng LiveSpo® Navax thể hiện mức độ giảm đáng kể nồng độ RSV, giảm khoảng 300 lần. Trong khi đó, nhóm đối chứng có mức độ giảm nồng độ virus chỉ đạt khoảng 15 lần (Hình 2). Như vậy, LiveSpo® Navax thể hiện hiệu quả giảm tải lượng RSV gấp khoảng 20 lần so với nước muối sinh lý, và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (****p<0,0001).

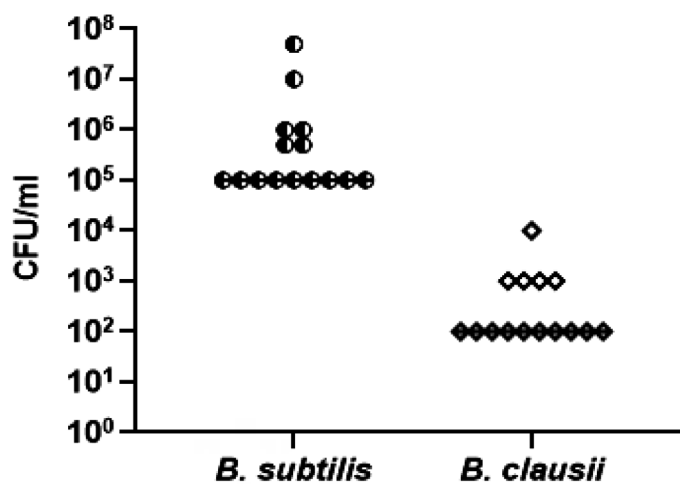


Hình 2. Mức độ giảm (số lần) giá trị Ct RSV sau 3 ngày điều trị của nhóm Navax và nhóm Chứng (****p<0,0001)

3.4. Đánh giá sự bám dính của bào tử *B. subtilis* ANA4 và *B. clausii* ANA39 lên niêm mạc mũi bệnh nhân nhóm sử dụng LiveSpo® Navax

Theo kết quả trình bày ở hình 3, nồng độ bào tử trung bình được phát hiện trong 1 mL dịch tỵ hầu bệnh nhân nhóm Navax là $\geq 10^5$ CFU/mL đối với *B. subtilis* và $\geq 10^2$ CFU/mL đối với *B. clausii* với độ tin cậy 96,48%. Như vậy, lượng bào tử *Bacillus* trung bình bám trên tăm bông của mỗi lần lấy mẫu xét nghiệm chỉ bằng 0,04% so với

lượng bào tử xịt đầu vào mỗi lần ($\geq 2,5 \times 10^8$ CFU tổng cộng *B. subtilis* ANA4 và *B. clausii* ANA39). Tuy nhiên, với trường hợp bệnh nhân âm tính với RSV thì nồng độ bào tử *Bacillus* trong dịch tỵ hầu lên tới $\geq 10^7$ CFU/mL, hay nói cách khác lượng bào tử *Bacillus* bám trên tăm bông lấy mẫu tương đương 4% lượng bào tử xịt đầu vào mỗi lần. Trong khi đó, không phát hiện thấy trường hợp nào ở nhóm Chứng mà dịch tỵ hầu có mặt bào tử *B. subtilis* hay *B. clausii*.



Hình 3. Nồng độ bào tử lợi khuẩn *B. subtilis* và *B. clausii* có trong dịch tỵ hầu (1 mL) của bệnh nhân nhóm Navax

4. BÀN LUẬN

Đây là nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng mẫu mù về an toàn và tác dụng của sản phẩm probiotic dạng xịt LiveSpo® Navax được thực hiện bước đầu trên tổng số 30 bệnh nhân nhi có kết quả dương tính RSV điều trị nội trú tại Trung tâm Quốc tế S, Bệnh viện Nhi Trung ương. Kết quả sàng lọc bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu cho thấy bệnh nhân có những dấu hiệu bất thường về các triệu chứng lâm sàng và các chỉ số cận lâm sàng của viêm tiểu phế quản. 100% trẻ đều ghi nhận triệu chứng xuất tiết mũi họng và ran rít, 66,67% bệnh nhân có biểu hiện ral ẩm và 26,67% bệnh nhân bị rút lõm lồng ngực và khó thở ở một số trường hợp bệnh nhân. Kết quả chụp Xquang tim phổi cho thấy 29/30 bệnh nhân đều phát hiện có những tổn thương ở phổi, chủ yếu là nốt hoặc

cả nốt và ứ khí hai bên. Xét nghiệm chỉ số bạch cầu tổng số và chỉ số CRP cũng cho thấy mức độ viêm nhiễm nhất định ở các bệnh nhân. Như vậy, các bệnh nhân được lựa chọn đều đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu.

RSV là một loại virus gây viêm đường hô hấp phổ biến, nhưng hiện nay vẫn chưa có vaccin hoặc thuốc đặc trị cụ thể nào được sử dụng trên lâm sàng để điều trị cho các bệnh nhân. Các nghiên cứu gần đây cho thấy việc sử dụng probiotic là một trong những liệu pháp tiềm năng để ngăn ngừa nhiễm RSV, từ đó giảm các triệu chứng của bệnh đường hô hấp cấp do RSV thông qua các cơ chế kháng virus đã được thảo luận từ những nghiên cứu trước. Nghiên cứu của Chiba và cộng sự (2013) thực hiện trên mô hình chuột cho thấy việc sử dụng probiotic bằng đường uống

có chứa *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 liên tục trong 5 ngày với nồng độ 10^8 tế bào/chuột/ngày có hiệu quả làm giảm nồng độ virus hợp bào hô hấp RSV khoảng 32 lần trong phổi ở ngày thứ 4 và bảo vệ các tế bào phổi. Sự bảo vệ này được thực hiện thông qua khả năng kích thích hệ thống miễn dịch phổi sản sinh các interferon IFN- γ và IL10 [10]. Nghiên cứu của Eguchi và cộng sự (2019) cũng trên mô hình chuột về đánh giá tác dụng probiotic của chủng vi khuẩn sinh acid lactic *Lactobacillus gasseri* LG2055, sử dụng theo đường uống, có tác dụng ngăn ngừa nhiễm virus. Kết quả cho thấy tải lượng RSV trong phổi của chuột, nhưng chỉ dừng ở mức độ khiêm tốn là giảm khoảng 8 lần sau 4 ngày điều trị [11]. Tuy nhiên, hai nghiên cứu trên chỉ giới hạn trên mô hình thử nghiệm trên chuột. Mặc dù các vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* đã chứng minh nhiều ưu điểm trong việc phòng ngừa sự xâm nhiễm của virus, nhưng sản phẩm probiotic chứa các loài vi khuẩn này có nhược điểm là không bền nhiệt trong quá trình vận chuyển dẫn tới độ sống bị giảm đáng kể theo thời gian và làm giảm tác dụng của sản phẩm; ngoài ra vì chỉ có thể bào chế dưới dạng bột, viên sử dụng bằng đường uống mà không bào chế được dưới dạng dung dịch để xịt trực tiếp vào hốc mũi, nên khó phát huy được hiệu quả cao nhất trong việc ức chế/diệt trực tiếp virus, vi khuẩn gây bệnh trên đường hô hấp trên. Hiện nay, có rất ít nghiên cứu đánh giá vai trò của các chủng vi khuẩn tạo bào tử thuộc họ *Bacillus* sp. Trong việc phòng chống sự xâm nhiễm của virus. Nghiên cứu của Wang và cộng sự (2017) đã chứng minh chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* OKB105 có khả năng bắt giữ và kháng virus viêm dạ dày (Transmissible gastroenteritis virus-TGEV) thuộc họ coronaviridae tấn công các tế bào biểu bì ruột (porcine intestinal epithelial cells) [12]. Tuy nhiên nghiên cứu này cũng chỉ thực hiện trên in vitro mà chưa thử nghiệm trên người.

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên về thử nghiệm tác dụng lâm sàng trên trẻ em của probiotic dạng xịt chứa bào tử lợi khuẩn *Bacillus*. Mặc dù mới chỉ là thử nghiệm bước đầu trên số lượng bệnh nhân còn khiêm tốn ($n = 30$), kết quả

thu được có ý nghĩa thống kê cho thấy thời gian khỏi các triệu chứng xuất tiết mũi, khó thở, ran rít, ran ẩm, rút lõm lồng ngực được rút ngắn khoảng 1 ngày khi sử dụng LiveSpo® Navax. Sau 3 ngày điều trị, nhóm thí nghiệm giảm tải lượng RSV ở dịch tỵ hầu bệnh nhân khoảng 300 lần, trong khi nhóm đối chứng chỉ giảm 15 lần; có liên quan tới sự có mặt của bào tử vi khuẩn *B. Subtilis* và *B. Clausii* ở dịch tỵ hầu bệnh nhân nhóm Navax mà vắng mặt ở nhóm đối chứng. Kết quả phân tích tải lượng RSV trong dịch tỵ hầu cho thấy việc sử dụng xịt LiveSpo® Navax chứa hai loại bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Bacillus clausii* có tác dụng giúp làm giảm tải lượng RSV tới gần 300 lần sau 3 ngày điều trị và hiệu quả gấp 20 lần so với nhóm bệnh nhân sử dụng xịt nước muối sinh lý. Đặc biệt, ghi nhận một trường hợp bệnh nhân có mức độ giảm nồng độ RSV về đến âm tính (được coi là giảm $>10^6$ lần) sau 3 ngày sử dụng xịt LiveSpo® Navax (Hình 2). Tương ứng với kết quả âm tính RSV ở bệnh nhân này, nồng độ bào tử lợi khuẩn *B.subtilis* đo được trong dịch tỵ hầu bệnh nhân này là cao nhất trong nhóm ($>10^7$ CFU/ml, tương đương với 4% lượng bào tử xịt đầu vào) (Hình 3). Kết quả này gợi ý việc tuân thủ đúng hướng dẫn sử dụng sản phẩm xịt LiveSpo® Navax sẽ giúp cho bào tử bám dính lên niêm mạc mũi nhiều và phát huy tác dụng hiệu quả tốt nhất trong việc ngăn ngừa sự nhân lên của RSV trong mũi bệnh nhân, nhờ đó hỗ trợ giảm thiểu các triệu chứng viêm đường hô hấp cũng như rút ngắn thời gian điều trị bệnh cho bệnh nhân.

Phân tích kết quả real-time PCR SYBR Green cho thấy đã phát hiện sự có mặt của *Bacillus subtilis* ANA4 và *Bacillus clausii* ANA39 trong niêm mạc mũi của tất cả các bệnh nhân sử dụng xịt LiveSpo® Navax và không phát hiện thấy hai loài vi khuẩn này trong nhóm Chứng. Nồng độ bào tử trung bình được phát hiện trong dịch tỵ hầu là $\geq 10^5$ CFU/ml đối với *B. Subtilis* và $\geq 10^2$ CFU/ml đối với *B. Clausii* (Hình 3). Kết quả này cho thấy các bệnh nhân tham gia nghiên cứu ở hai nhóm thử nghiệm và đối chứng được cung cấp đúng sản phẩm thử nghiệm, được hướng dẫn đúng và tuân thủ quy trình xịt mũi và 2 loại bào tử này cùng có khả năng bám dính lên niêm mạc mũi bệnh nhân.

Kết quả bước đầu đánh giá sản phẩm probiotic dạng xịt LiveSpo® Navax cho thấy sản phẩm hoàn toàn an toàn đối với trẻ em dưới 2 tuổi, với liều dùng thử nghiệm khuyến cáo cho bệnh nhân xịt mũi 3 lần/ngày trong vòng 3 ngày liên tục, kết hợp theo dõi và đánh giá các chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng. Trong suốt quá trình thử nghiệm đều không ghi nhận bất kỳ biểu hiện nào liên quan đến các bất thường về nhịp thở, mạch, nhiệt độ, và SpO₂, cũng như không có sự thay đổi bất thường về chỉ số CRP và số lượng bạch cầu phản ánh mức độ viêm của người tham gia thử nghiệm. 100% bệnh nhân sử dụng LiveSpo® Navax không cho thấy bất cứ dấu hiệu bất thường về tiêu hoá (nôn hay tiêu chảy) hay kích ứng niêm mạc mũi.

5. KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ở trẻ em đầu tiên trên thế giới về an toàn và tác dụng của probiotic bào tử lợi khuẩn *Bacillus* ở dạng xịt mũi. Sản phẩm probiotic LiveSpo® Navax dạng nước chứa bào tử lợi khuẩn thế hệ LS-III của hai chủng *Bacillus subtilis* ANA4 và *Bacillus clausii* ANA39 khi sử dụng dưới dạng xịt hoàn toàn an toàn với trẻ em, có tác dụng hỗ trợ rút ngắn 1 ngày thời gian điều trị triệu chứng điển hình của bệnh viêm đường hô hấp trên do RSV như xuất tiết mũi, rút lõm lồng ngực và khó thở, ran rít, ran ẩm; và làm giảm nồng độ RSV trong mũi bệnh nhân hiệu quả hơn gấp 20 lần so với nước muối sinh lý. Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng cần mở rộng với cỡ mẫu lớn hơn để đánh giá toàn diện hơn nữa mức độ an toàn và tác dụng của LiveSpo® Navax, làm cơ sở khoa học cho việc phát triển thành thuốc xịt mũi có tác dụng phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh đường hô hấp cấp do nhiễm RSV.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được tài trợ bởi Quý nghiên cứu khoa học của Công ty TNHH ANABIO R&D, mã số ANABIO/RG-2021-01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Scott CL. Respiratory syncytial virus (RSV), Mayo Clinic Family Health, 5th Ed., Mayo Clinic Press, 2018.

2. Pierce R, Giuliano J, Lakhani S. Overview RSV (Respiratory Syncytial Virus) - Fact Sheets. Yale Medicine, 2021.

3. CDC report (Respiratory Syncytial Virus): People at high risk for RSV, 2020.

4. Gia tăng bệnh nhi mắc virus hợp bào hô hấp: Khuyến cáo khẩn từ chuyên gia Bệnh viện Nhi Trung ương. Sức khỏe và đời sống, 2020. Bộ Y tế.

5. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanp P et al. Probiotics: Effects on immunity. The American Journal of Clinical Nutrition. 2001; 73, 444S-450S.

6. Kassa AI. New Insights on Antiviral Probiotics: From Research to Applications, 1st Ed., Kindle Edition, Springer, 2017.

7. LehtoRalta L, PitkäRalta A, Korpela R. Probiotics in respiratory virus infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2014; 33(8), 1289–1302. doi:10.1007/s10096-014-2086.

8. Sadeghi A, Ali Mortazavi S, Reza Bahrami A et al. Designing a SYBR Green Absolute Real time PCR Assay for Specific Detection and Quantification of *Bacillus subtilis* in Dough Used for Bread Making. Journal of Cell and Molecular Research. 2014; 6:83–92.

9. Perotti M, Mancini N, Cavallero A et al. Quantitation of *Bacillus clausii* in biological samples by real-time polymerase chain reaction. Journal of Microbiology Method. 2006; 65:632-636. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.010>.

10. Chiba E, Tomosada Y, Guadalupe MVP et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. International Immunopharmacology. 2013; 17:373–382 <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.024>.

11. Eguchi K, Fujitani N, Nakagawa H et al. Prevention of respiratory syncytial virus infection with probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus gasseri* SBT2055. Scientific Reports. 2019; 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39602-7>.

12. Wang X, Hu W, Zhu L, Yang Q. *Bacillus subtilis* and surfactin inhibit the transmissible gastroenteritis virus entering intestinal epithelial cells. Bioscience Reports. 2017; 37: BSR20170082. doi: <https://doi.org/10.1042/BSR20170082>.