

KHẢO SÁT ĐỘC TÍNH CỦA KHỐI *BACILLUS* SPP. TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

Phạm Thị Ngọc Diệp¹, Bùi Thị Việt Hà², Nguyễn Văn Đô¹
Nguyễn Khánh Hòa³ và Nguyễn Thị Thanh Hương^{1,3,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Viện Nghiên cứu Y học Dinh Dưỡng

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn trên động vật của nhóm lợi khuẩn *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii* nồng độ 1×10^9 CFU/mL). Nghiên cứu độc tính cấp trên chuột nhắt trắng chủng Swiss theo đường uống bằng phương pháp liều cố định. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành trên thỏ Albino. Kết quả nghiên cứu của độc tính cấp cho thấy khối lợi khuẩn dùng đường uống đến liều 5000 mg/kg/ngày (2×10^{10} CFU/kg) không gây độc tính, chưa xác định được liều gây chết LD₅₀. Trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn, xuất hiện tình trạng thoái hóa gan nhẹ ở lô thỏ liều thấp 1 g/kg/ngày và liều cao 5 g/kg/ngày so với lô chứng (lô uống nước muối sinh lý), tuy nhiên kết quả xét nghiệm máu cho kết quả các chỉ số chức năng gan (AST, ALT, GGT) và chức năng thận (Creatinin, Ure) của 2 lô dùng thuốc đều bình thường, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô uống thuốc thử và lô chứng ($p > 0,05$). Như vậy, chủng *Bacillus* sp. VN không gây độc tính cấp khi dùng đường uống liều đến 5000 mg/kg, sử dụng 2 mức liều 1 và 5 g/kg/ngày tương đối an toàn trong độc tính bán trường diễn.

Từ khóa: Probiotics, *Bacillus* spp., động vật thực nghiệm.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotics hay “men vi sinh” là các chủng vi khuẩn sống, khi đưa vào cơ thể một lượng vừa đủ thì có lợi cho sức khỏe, đặc biệt là ở hệ tiêu hóa và hệ sinh thái âm đạo. *Lactobacillus* spp. và *Bacillus* spp. thường được xem là các loại probiotic phổ biến.¹ Một hệ sinh thái âm đạo khỏe mạnh chủ yếu gồm các loài *Lactobacillus* (chiếm ưu thế) – giúp duy trì pH âm đạo khoảng từ 3,8 đến 4,5, có tính axit vừa phải.² Tuy nhiên, một số chủng *Bacillus* (như *B. subtilis*, *B. coagulans*) cũng có thể được tìm thấy với tần suất thấp trong âm đạo người khỏe mạnh, mặc dù chiếm tỷ lệ thấp nhưng các chủng lợi khuẩn

Bacillus vẫn cho thấy rõ khả năng sinh acid và kháng khuẩn tốt, góp phần bảo vệ niêm mạc đường âm đạo.³ Nhóm lợi khuẩn *Bacillus* do có bào tử nên có thể tồn tại lâu dài trong âm đạo và ức chế các vi khuẩn gây viêm nhiễm đường âm đạo. Ngoài ra, nghiên cứu của Mohsen và cộng sự (2024) cũng đã tìm ra một số chủng *Bacillus* có tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, trong đó có tăng cường sức khỏe đường tiêu hóa, sản phẩm thay thế kháng sinh...⁴

Một số chế phẩm men vi sinh hiện nay có chứa *Bacillus coagulans* hoặc *Bacillus subtilis* dùng đường uống hoặc đường đặt âm đạo để hỗ trợ điều trị một số bệnh (Viêm âm đạo do vi khuẩn (bacterial vaginosis), Viêm âm đạo do nấm (*Candida albicans*), Rối loạn hệ vi sinh sau dùng kháng sinh...)³ Một nghiên cứu của Nista và cộng sự (2004) cũng cho thấy những bệnh nhân dương tính với *Helicobacter pylori*

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Thanh Hương

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: ntthanhhuong@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 21/08/2025

Ngày được chấp nhận: 22/09/2025

được điều trị bằng phác đồ kháng sinh kết hợp *Bacillus Clausii* có tỷ lệ xuất hiện tác dụng phụ thấp hơn đáng kể so với nhóm bệnh nhân chỉ dùng phác đồ kháng sinh đơn thuần.⁵ Tuy nhiên, đây đều là các chế phẩm *Bacillus* spp. được phân lập từ chủng của người nước ngoài. Với mong muốn tạo ra một sản phẩm có lợi cho sức khỏe, hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan đến nhiễm trùng đường âm đạo với giá thành rẻ hơn, chúng tôi đã tiến hành phân lập khối lợi khuẩn *Bacillus* spp. từ người Việt Nam do Công ty cổ phần Ana Bio Research & Development sản xuất. Sau khi phân lập, khối lợi khuẩn được kiểm tra và đánh giá về mật độ vi khuẩn và được gửi tới Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng để đánh giá tính an toàn của sản phẩm trên động vật thực nghiệm đánh giá tính an toàn của sản phẩm trên động vật thực nghiệm. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu: Đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng và độc tính bán trường diễn trên thỏ thực nghiệm của khối *Bacillus* spp.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Chất liệu nghiên cứu

Chế phẩm probiotic chứa hỗn hợp *B. coagulans*, *Bacillus clausii*, *B. subtilis* được phân lập từ đường tiêu hóa của người Việt Nam (*Bacillus* sp. VN), được sản xuất tại Công ty cổ phần Ana Bio Research & Development. Vi khuẩn tổng số 5×10^9 CFU/ống 5ml và được hòa tan trong NaCl 9‰. Độ sống vi khuẩn tổng số 5×10^9 CFU/5ml; pH 5,5 - 7,5; tỉ trọng $\leq 1,0$; hàm lượng Thủy ngân (ppm) $\leq 0,1$; hàm lượng Chì (ppm) $\leq 3,0$; hàm lượng Cd (ppm) $\leq 1,0$; Tổng số nấm men, nấm mốc (cfu/g) ≤ 10 ; Coliform (MPN/100g) ≤ 10 ; *Bacillus cereus* ≤ 10 ; *Clostridium perfringens* ≤ 10 ; *Escherichia coli*: 0; *Staphylococcus aureus* ≤ 5 ; *Salmonella*: 0. Điều kiện bảo quản: nhiệt độ phòng.

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng Swiss thuần chủng, cả 2 giống, tuổi từ 4 - 6 tuần tuổi cân nặng khoảng 18 - 20g được mua tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, dùng để nghiên cứu độc tính cấp. Thỏ *Albino*, cân nặng khoảng 1,8 - 2kg, khỏe mạnh, được mua từ Viện chăn nuôi quốc gia, dùng cho nghiên cứu độc tính bán trường diễn.

Tất cả động vật nghiên cứu được đưa về chăm sóc tại phòng chăn nuôi tại Labo của Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng và tuân thủ các nguyên tắc đạo đức của nghiên cứu trên động vật thực nghiệm.

2. Phương pháp

Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại phòng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng và Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch, Trường Đại học Y Hà Nội.

Thử nghiệm độc tính cấp

Căn cứ vào các tài liệu của y văn thế giới khẳng định chủng *Bacillus* spp. có liều gây độc LD₅₀ cho chuột nhắt lên tới > 5000 mg/kg (tương đương 63×10^{11} CFU/kg), ngoài ra liều gây độc LD₅₀ trên thỏ và lợn cũng trên 2×10^{11} CFU/kg, do đó chúng tôi cũng giả thuyết rằng liều lượng gây độc của *Bacillus* sp. VN. cũng không gây độc cho người và động vật sử dụng tới 5 g/kg.^{6,7}

Thử nghiệm độc tính cấp được tiến hành theo hướng dẫn của OECD 423, thuốc thử sử dụng là khối *Bacillus* sp. VN được hòa tan trong dung dịch NaCl 9‰.⁸ Chuột nhắt trắng chủng Swiss được chia ngẫu nhiên vào 5 lô, mỗi lô gồm 8 con, trong đó lô 1 là lô chứng uống nước muối sinh lý, chuột trong 4 lô còn lại được cho uống thuốc thử một lần duy nhất với các liều như sau: 50, 300, 2000 và 5000 mg/kg cân nặng chuột. Thuốc thử được pha trong nước

muối sinh lý với thể tích chung 20 mL/kg cân nặng và cho chuột uống.

Căn cứ theo hướng dẫn của OECD 423, chuột được uống với liều bắt đầu từ 50 mg/kg, sau đó nếu không có chuột chết sẽ tiếp tục tăng dần liều cho đến khi đạt liều 5000 mg/kg.⁸ Sau uống, tiến hành theo dõi chuột sau 2h, 4h, 8h uống thuốc và hàng ngày liên tục cho tới 14 ngày về hình dáng, tư thế, vận động, màu sắc lông, tình trạng phân và đếm số lượng chuột chết nếu có.

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn trên thỏ tiến hành theo hướng dẫn của OECD 407.⁹ Khôi *Bacillus* sp. VN dùng trong thử nghiệm được sử dụng 2 mức liều: liều thấp tương đương với liều dự kiến dùng trên người (1 g/kg/ngày - 0,4 mL/kg/ngày) và liều cao gấp 5 lần liều dự kiến dùng trên người (5 g/kg/ngày - 2 mL/kg/ngày) trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn.

Thỏ gồm 30 con (15 con đực và 15 con cái) được chia ngẫu nhiên vào 3 lô, mỗi lô 10 con (5 đực và 5 cái):

- Lô 1 (lô chứng): thỏ được cho uống nước muối sinh lý liều 2 mL/kg/ngày (n = 10).

- Lô 2 (*Bacillus* 1): thỏ uống thuốc thử liều 0,4 mL/kg/ngày (1 g/kg/ngày) (n = 10).

- Lô 3 (*Bacillus* 5): thỏ uống thuốc thử liều 2 mL/kg/ngày (5 g/kg/ngày) (n = 10).

Tiến hành thí nghiệm:

Hàng ngày cho thỏ uống thuốc vào 9 - 10 giờ sáng, thường sau khi đã cho thỏ ăn 1 - 2 giờ. Theo dõi các thỏ sau uống thuốc tại các thời điểm: Sau 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ ngày đầu tiên; sau 24 giờ, và theo dõi hàng ngày.

Quan sát các đặc điểm sau:

- Tư thế thỏ: Thay đổi về da, lông, mắt (xuất tiết nước mắt, kích thích đồng tử); kiểu hô hấp bất thường; thay đổi về dáng đi, tư thế, phản ứng với tác động bên ngoài...

- Mức độ ăn của thỏ.

- Thỏ có uống nước không.

- Đánh giá tính chất phân thỏ: 4 điểm: 1 điểm: bình thường, 2 điểm: phân mềm, 3 điểm: phân lẫn dịch, 4 điểm: dịch lỏng hoàn toàn.

Cân thỏ sau mỗi tuần uống thuốc.

Theo dõi độc tính

Khả năng gây độc tính bán trường diễn của thuốc thử được kiểm tra thông qua xét nghiệm về huyết học, sinh hóa máu của thỏ ở các thời điểm: trước thử nghiệm, ngày 14 và ngày 28 của thử nghiệm. Máu thỏ được lấy từ tĩnh mạch rìa tai, thể tích từ 1 - 2mL được cho vào ống chống đông. Tất cả các con thỏ của các lô đều được lấy máu làm xét nghiệm. Sau ngày 28, 30% thỏ sẽ bị giết để lấy các mô gan, thận làm tiêu bản đánh giá tác dụng gây hại của thuốc thử trên gan, thận.

Xử lý số liệu

Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và IBM - SPSS version 20. Trước khi đưa vào phân tích, số liệu này được kiểm tra ngẫu nhiên, tránh sai sót trong quá trình nhập số liệu. Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test Student, phân tích phương sai One-Way ANOVA. Số liệu được biểu diễn dưới dạng: $\pm$ SD. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ

1. Thử nghiệm độc tính cấp

Sau uống thuốc thử với mức liều 50 mg/kg ($0,2 \times 10^9$ CFU/kg), không có chuột nào chết. Tiếp tục cho chuột uống các mức liều tăng dần 300, 2000 và 5000 mg/kg (tương ứng $1,2 \times 10^9$ CFU/kg; 8×10^9 CFU/kg và 20×10^9 CFU/kg), kết quả cho thấy không có chuột nào chết, các chuột vẫn khỏe mạnh và hoạt động bình thường.

Sau 2 giờ, 4 giờ, và 6 giờ, theo dõi không thấy có chuột nào chết và không có biểu hiện bất thường. Theo dõi tiếp đến ngày thứ 15, các chuột vẫn hoạt động và ăn uống bình thường, không có hành vi nào bất thường, và không có chuột chết.

2. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn

Bảng 1. Theo dõi trọng lượng của các lô thỏ sau 28 ngày

Lô thỏ	Trước thí nghiệm ($\bar{x} \pm SD$)	Sau 7 ngày ($\bar{x} \pm SD$)	Sau 14 ngày ($\bar{x} \pm SD$)	Sau 28 ngày ($\bar{x} \pm SD$)
Lô 1 - Lô chứng (n = 10) (kg)	2,0 $\pm$ 0,08	2,2 $\pm$ 0,07	2,2 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,19
Lô 2 - Bacillus 1 (n = 10) (kg)	2,0 $\pm$ 0,13	2,2 $\pm$ 0,11	2,2 $\pm$ 0,11	2,2 $\pm$ 0,11
Lô 3 - Bacillus 5 (n = 10) (kg)	2,0 $\pm$ 0,17	2,1 $\pm$ 0,17	2,1 $\pm$ 0,16	2,2 $\pm$ 0,17
*p-value	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

*Kiểm định One-way ANOVA

Kết quả trong Bảng 1 cho thấy: sau 28 ngày uống thuốc, trọng lượng trung bình của các thỏ sau 28 ngày đều tăng so với thời điểm ban đầu.

Cân nặng của lô 2 và 3 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (chứng).

Kết quả sinh hóa máu

Bảng 2. Kết quả xét nghiệm sinh hóa máu

Chỉ số	Lô 1 - Lô chứng (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 2 - Bacillus 1 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 3 - Bacillus 5 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	p-value*
<i>Ure (mmol/L)</i>				
T0	9,5 $\pm$ 1,36	9,5 $\pm$ 1,75	9,5 $\pm$ 1,62	> 0,05
T1	9,6 $\pm$ 1,20	9,7 $\pm$ 1,17	9,4 $\pm$ 1,47	> 0,05
T2	9,6 $\pm$ 1,32	9,6 $\pm$ 1,03	9,8 $\pm$ 1,55	> 0,05
<i>Creatinin (mmol/L)</i>				
T0	103,1 $\pm$ 9,14	102,1 $\pm$ 9,11	102,4 $\pm$ 10,65	> 0,05
T1	102,8 $\pm$ 9,61	105,7 $\pm$ 9,43	104,2 $\pm$ 9,7	> 0,05
T2	102,6 $\pm$ 9,63	105,6 $\pm$ 8,07	104,7 $\pm$ 9,13	> 0,05
<i>AST (U/L)</i>				
T0	41,8 $\pm$ 6,79	43,6 $\pm$ 8,15	44,2 $\pm$ 9,91	> 0,05
T1	42,1 $\pm$ 8,10	43,7 $\pm$ 6,93	43,9 $\pm$ 8,37	> 0,05
T2	42,1 $\pm$ 6,62	43,4 $\pm$ 8,67	44,0 $\pm$ 8,99	> 0,05
<i>ALT (U/L)</i>				
T0	81,9 $\pm$ 14,37	82,6 $\pm$ 13,83	84,1 $\pm$ 13,75	> 0,05
T1	81,7 $\pm$ 14,40	80,6 $\pm$ 13,79	82,7 $\pm$ 12,36	> 0,05
T2	84,8 $\pm$ 15,73	85,7 $\pm$ 12,65	82,5 $\pm$ 15,90	> 0,05

Chỉ số	Lô 1 - Lô chứng (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 2 - Bacillus 1 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 3 - Bacillus 5 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	p-value*
<i>GGT (U/L)</i>				
T0	7,2 ± 1,83	7,3 ± 1,47	7,3 ± 1,99	> 0,05
T1	7,3 ± 1,82	7,4 ± 1,73	7,3 ± 1,93	> 0,05
T2	7,3 ± 1,65	7,6 ± 1,64	7,3 ± 1,62	> 0,05
<i>Bilirubin toàn phần (umol/l)</i>				
T0	4,0 ± 0,77	4,0 ± 0,74	4,2 ± 0,95	> 0,05
T1	3,9 ± 0,72	4,2 ± 0,87	4,2 ± 0,95	> 0,05
T2	4,0 ± 0,58	4,1 ± 0,51	4,2 ± 0,74	> 0,05
<i>Bilirubin trực tiếp (umol/l)</i>				
T0	1,0 ± 0,23	1,0 ± 0,24	1,2 ± 0,45	> 0,05
T1	1,0 ± 0,24	1,1 ± 0,28	1,4 ± 0,42	> 0,05
T2	1,0 ± 0,23	1,0 ± 0,24	1,1 ± 0,58	> 0,05
<i>Protein toàn phần (g/l)</i>				
T0	62,8 ± 7,33	63,0 ± 6,63	62,3 ± 6,90	> 0,05
T1	62,7 ± 6,11	63,1 ± 5,38	61,6 ± 7,49	> 0,05
T2	62,8 ± 6,76	64,4 ± 7,53	61,7 ± 8,82	> 0,05
<i>Albumin (g/l)</i>				
T0	34,7 ± 4,47	35,3 ± 4,11	34,1 ± 5,41	> 0,05
T1	35,0 ± 5,73	36,3 ± 4,57	34,5 ± 6,4	> 0,05
T2	35,2 ± 3,89	35,9 ± 5,69	35,4 ± 5,40	> 0,05

T0: Trước thử nghiệm, T1: Sau 14 ngày; T2: Sau 28 ngày

*Kiểm định One-way ANOVA

Trong kết quả xét nghiệm sinh hóa máu, các chỉ số về chức năng gan (AST, ALT, GGT) và chức năng thận (Creatinin, Ure) đều trong

giới hạn bình thường, không có khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 lô dùng thuốc thử so với lô chứng ($p > 0,05$).

Kết quả huyết học**Bảng 3. Kết quả xét nghiệm huyết học**

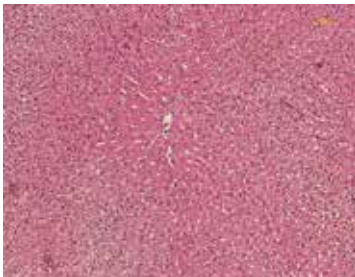
Chỉ số	Lô 1 - Lô chứng (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 2 - Bacillus 1 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 3 - Bacillus 5 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	p-value*
<i>Số lượng hồng cầu (T/L)</i>				
T0	5,7 $\pm$ 0,34	5,8 $\pm$ 0,49	5,8 $\pm$ 0,43	> 0,05
T1	5,8 $\pm$ 0,34	5,8 $\pm$ 0,30	5,8 $\pm$ 0,30	> 0,05
T2	5,8 $\pm$ 0,31	5,8 $\pm$ 0,36	5,7 $\pm$ 0,43	> 0,05
<i>Số lượng bạch cầu (G/L)</i>				
T0	8,4 $\pm$ 1,27	8,4 $\pm$ 1,01	8,3 $\pm$ 1,14	> 0,05
T1	8,4 $\pm$ 1,09	8,4 $\pm$ 1,19	8,4 $\pm$ 1,12	> 0,05
T2	8,4 $\pm$ 1,13	8,4 $\pm$ 1,05	8,4 $\pm$ 1,23	> 0,05
<i>Số lượng bạch cầu đa nhân trung tính (G/L)</i>				
T0	3,6 $\pm$ 0,72	3,6 $\pm$ 0,51	3,6 $\pm$ 0,47	> 0,05
T1	3,7 $\pm$ 0,65	3,5 $\pm$ 0,77	3,6 $\pm$ 0,50	> 0,05
T2	3,5 $\pm$ 0,91	3,6 $\pm$ 0,88	3,5 $\pm$ 0,83	> 0,05
<i>Phần trăm bạch cầu đa nhân trung tính (%)</i>				
T0	42,8 $\pm$ 8,04	42,6 $\pm$ 8,22	43,1 $\pm$ 7,97	> 0,05
T1	44,1 $\pm$ 8,78	42,0 $\pm$ 8,78	41,3 $\pm$ 7,08	> 0,05
T2	43,8 $\pm$ 9,72	41,3 $\pm$ 9,47	42,6 $\pm$ 8,15	> 0,05
<i>Số lượng bạch cầu lympho (G/L)</i>				
T0	4,5 $\pm$ 0,96	4,5 $\pm$ 0,95	4,5 $\pm$ 0,70	> 0,05
T1	4,5 $\pm$ 0,91	4,5 $\pm$ 0,84	4,5 $\pm$ 0,92	> 0,05
T2	4,7 $\pm$ 1,06	4,6 $\pm$ 0,82	4,4 $\pm$ 0,88	> 0,05
<i>Phần trăm bạch cầu lympho (%)</i>				
T0	53,4 $\pm$ 8,33	55,8 $\pm$ 8,61	55,2 $\pm$ 8,35	> 0,05
T1	55,9 $\pm$ 7,53	56,1 $\pm$ 9,48	54,1 $\pm$ 8,54	> 0,05
T2	55,9 $\pm$ 8,35	56,6 $\pm$ 6,96	54,4 $\pm$ 8,04	> 0,05

Chỉ số	Lô 1 - Lô chứng (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 2 - Bacillus 1 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	Lô 3 - Bacillus 5 (n = 10) ($\bar{x} \pm SD$)	p-value*
<i>Số lượng tiểu cầu (G/L)</i>				
T0	286,0 $\pm$ 65,84	289,6 $\pm$ 75,03	282,8 $\pm$ 64,18	> 0,05
T1	288,3 $\pm$ 73,97	288,7 $\pm$ 67,53	282,4 $\pm$ 87,13	> 0,05
T2	288,1 $\pm$ 79,52	288,4 $\pm$ 59,90	288,3 $\pm$ 70,45	> 0,05

T0: Trước thử nghiệm, T1: Sau 14 ngày; T2: Sau 28 ngày; *Kiểm định One-way ANOVA

Kết quả xét nghiệm huyết học cũng cho thấy không có sự khác biệt giữa 2 lô Bacillus 1 và 5 so với lô chứng, các chỉ số đều trong giới hạn bình thường.

Kết quả sinh thiết



Lô Chứng

Tế bào gan bình thường, khoảng cửa không có xâm nhập tế bào viêm, không nhìn thấy tế bào gan thoái hóa (Thỏ số 2)



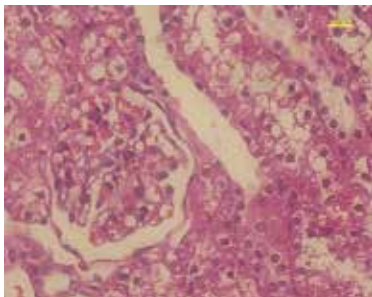
Lô 2 - Bacillus 1

Các tế bào gan bị thoái hóa nhẹ, khoảng cửa có thâm nhiễm một số tế bào viêm (mũi tên) (Thỏ số 10)



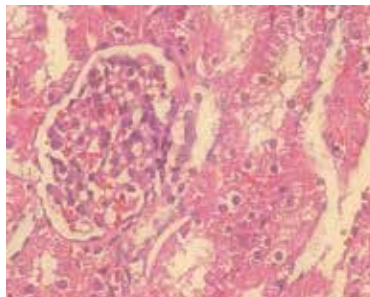
Lô 3 - Bacillus 5

Các tế bào gan bị thoái hóa, các xoang mạch máu và tĩnh mạch nan hoa không bị sung huyết, thâm nhiễm một ít tế bào viêm bên cạnh khoảng cửa (mũi tên) (Thỏ số 11)



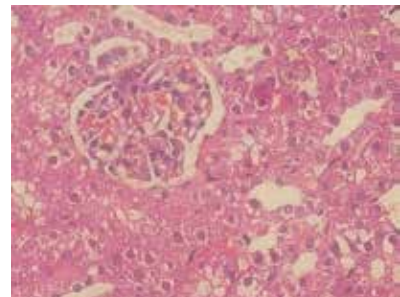
Lô chứng

Các tế bào biểu mô ống thận và cầu thận bình thường (Thỏ số 5)



Lô 2 - Bacillus 1

Các tế bào biểu mô ống thận và cầu thận bình thường (Thỏ số 6)



Lô 3 - Bacillus 5

Các tế bào biểu mô ống thận và cầu thận bình thường (Thỏ số 15)

Hình 1. Hình ảnh vi thể gan, thận

Với *Bacillus* spp. liều 1 g/kg và 5 g/kg, tế bào gan đều có biểu hiện thoái hóa nhẹ, có thâm nhiễm ít tế bào viêm ở khoảng cửa. Tế bào gan ở nhóm chứng bình thường, không có thoái hóa.

Tế bào cầu thận và ống thận của các lô dùng *Bacillus* spp. liều thấp và liều cao giống nhau so với nhóm chứng, đều có cấu trúc bình thường.

IV. BÀN LUẬN

Theo khuyến cáo của WHO và Bộ Y tế, trước khi tiến hành các thử nghiệm lâm sàng cần đánh giá tính an toàn của sản phẩm thông qua các thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn trên động vật.

Đánh giá độc tính cấp trên chuột nhắt trắng cho thấy khối *Bacillus* spp. phân lập từ đường tiêu hóa người Việt Nam khi sử dụng đến mức liều 5000 mg/kg (20×10^9 CFU/kg) vẫn chưa gây biểu hiện độc tính cấp. Ở các lô trị với các liều tăng dần từ 50 mg/kg - 5000 mg/kg ($0,2 \times 10^9$ - 20×10^9 CFU/kg), tất cả các chuột đều sinh hoạt và ăn uống bình thường. Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của Suvana và cộng sự (2017), trong đánh giá tính an toàn của *B. clausii* trên chuột thì liều gây chết LD_{50} lên đến > 5000 mg/kg (63×10^9 CFU/kg).⁷ Nghiên cứu của Nguyễn Duy Hà và cộng sự (2022) cũng đánh giá độc tính cấp của sản phẩm BaciMix (gồm *B. subtilis* và *B. coagulans*) trên chuột nhắt trắng, kết quả cho thấy sản phẩm không gây độc tính cấp trên chuột khi dùng liều lên đến 4×10^{11} CFU/kg (68 g/kg), không tìm được liều gây chết LD_{50} .¹⁰ Kết quả này cũng tương tự với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi khi chưa tìm được liều gây chết LD_{50} , tuy nhiên với nồng độ lợi khuẩn *Bacillus* spp. chúng tôi dùng cho nghiên cứu thì liều cao nhất 5000 mg/kg vẫn được coi là hoàn toàn an toàn.

Trong đánh giá thử nghiệm độc tính bán trường diễn trên thỏ, 2 mức liều được sử dụng là 1 g/kg/ngày (tương đương với liều dùng trên người) và 5 g/kg/ngày (gấp 5 lần liều dùng trên người) cho thỏ uống hàng ngày trong 28 ngày liên tục. Kết quả cho thấy: sau 4 tuần uống khối lợi khuẩn, cân nặng của tất cả các thỏ đều tăng so với thời điểm ban đầu. Điều này có thể giải thích do khối lợi khuẩn *Bacillus* spp. có tác dụng kích thích tiêu hóa, giúp kháng khuẩn.⁴ Kết quả này cũng tương tự như trong nghiên cứu của Nguyễn Duy Hà và cộng sự (2022) khi trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn, chuột của cả lô chứng và lô dùng thuốc đều tăng cân so với ban đầu.¹⁰ So sánh cân nặng giữa 2 lô liều 1 g/kg và 5 g/kg với lô chứng đều không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cũng tương tự như kết quả của tác giả Endres và cộng sự (2011) khi đánh giá độc tính trên chuột, các chuột được cho dùng khối *Bacillus* đường uống với 4 liều dùng tăng dần trong 1 năm để đánh giá độc tính trường diễn. Sau 1 năm theo dõi, cân nặng giữa các chuột dùng thuốc thử đều tương tự như chuột ở lô chứng, bao gồm cả các chuột được dùng liều cao nhất (2 g/kg/ngày).¹¹ Mặc dù nghiên cứu của chúng tôi tiến hành theo dõi trong thời gian ngắn hơn và 2 nghiên cứu sử dụng các động vật thí nghiệm khác nhau, tuy nhiên căn cứ kết quả của 2 nghiên cứu cho thấy cân nặng của động vật ở cả lô trị và lô chứng đều không khác nhau, có thể kết luận khối *Bacillus* không gây ảnh hưởng lên thể trạng của động vật thí nghiệm, ngay cả khi dùng liều tối đa.

Trong suốt thời gian nghiên cứu, thỏ ở cả 3 lô đều ăn uống bình thường, theo dõi thỏ không xuất hiện các biểu hiện của ngộ độc hay hành vi bất thường nào khác. Sau 28 ngày, tiến hành giết 30% số thỏ để làm mô bệnh học gan, thận, hình ảnh vi thể cho thấy tế bào gan ở cả 2 lô 1 g/kg/ngày và 5 g/kg/ngày đều có hiện tượng

thoái hóa nhẹ so với lô chứng, tuy nhiên biểu hiện không rõ rệt. Kết quả này khác biệt với kết quả mô bệnh học tế bào gan trong nghiên cứu của Nguyễn Duy Hà, cấu trúc tế bào gan của cả 3 lô chuột đều bình thường, không có tình trạng hoại tử, xơ hóa.¹⁰ Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, cấu trúc tế bào ống thận và cầu thận của cả 3 lô đều bình thường, kết quả này lại tương đồng với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Duy Hà. Ngoài ra, trong kết quả hóa sinh máu cho thấy các chỉ số Creatinin, Urê hay AST, ALT, GGT đều không tăng ở lô *Bacillus* 1 và 5 so với lô chứng. Do đó, biểu hiện thoái hóa nhẹ trên mô gan trong 2 lô liều 1 g/kg và 5 g/kg chưa phản ánh rõ rệt hiện tượng gây độc tính của *Bacillus* spp. Kết quả này tương tự như kết quả trong nghiên cứu của Endres, các chỉ số sinh hóa máu đều tương đồng giữa lô trị và lô chứng.¹¹ Về các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, hemoglobin, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu), tại các thời điểm trước nghiên cứu, sau 14 ngày và sau 28 ngày đều cho các kết quả trong giá trị bình thường ở 2 lô trị và không khác biệt so với lô chứng. Kết quả này tương đồng với trong nghiên cứu của Nguyễn Duy Hà, các chỉ số sinh hóa và công thức máu đều trong giới hạn bình thường và không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm dùng thuốc và nhóm chứng.¹⁰

Như vậy, khối lợi khuẩn *Bacillus* gồm *B. coagulans*, *Bacillus clausi*, *B. subtilis* không gây độc tính cấp khi dùng đường uống đến liều 5000 mg/kg (2×10^{10} CFU/kg). Trong độc tính bán trường diễn, có tình trạng thoái hóa gan nhẹ khi sử dụng liều 1 g/kg và 5 g/kg/ngày, tuy nhiên trên xét nghiệm sinh hóa máu đánh giá chức năng gan chưa thấy sự thay đổi, các chỉ số AST, ATL, GGT đều trong ngưỡng bình thường.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu khảo sát khả năng gây độc và gây viêm của khối *Bacillus* spp. cho thấy khối

lợi khuẩn gồm *B. coagulans*, *Bacillus clausi*, *B. subtilis* không gây các biểu hiện độc tính cấp trên chuột khi dùng đến mức liều 5000 mg/kg cân nặng. Nghiên cứu của chúng tôi chưa xác định được liều gây chết LD₅₀ trên chuột nhắt trắng theo đường uống. Với mức liều 1 và 5 g/kg/ngày sử dụng đường uống là tương đối an toàn khi không gây biểu hiện độc tính bán trường diễn trên thỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ming Ho, Yin-Yi Chang, Wei-Chun Chang, et al. Oral Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14 to reduce Group B Streptococcus colonization in pregnant women: A randomized controlled trial. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2016; 55: 515-518.
2. P Mastromarino, S Macchia, L Meggiorini, et al. Effectiveness of Lactobacillus-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15(1): 67-74.
3. Luca S, Andrea A, Natalia P, et al. *Bacillus coagulans* LMG S-24828 Impairs Candida Virulence and Protects Vaginal Epithelial Cells against Candida Infection In Vitro. *Microorganisms*. 2024; 12: 1634.
4. Mohsen G, Nastaran B, Zahra M, et al. Isolation and characterization of novel *Bacillus* strains with superior probiotic potential: comparative analysis and safety evaluation. *Scientific Reports*. 2024; 14: 1457.
5. Nista E C, Candelli M, Cremonini F, et al. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20: 1181-1188.
6. Iryna B S, Iryna V P, Muriel D, et al. The Safety of Two *Bacillus* Probiotic Strains for Human Use. *Dig Dis Sci*. 2008; 53: 954-963.

7. Suvarna G. Lakshmi a, N. Jayanthi a, M. Saravanan, et al. Safety assesment of *Bacillus clausii* UBBC07, a spore forming probiotic. *Toxicology Reports*. 2017; 4: 62-71.
8. OECD423. OECD guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 2001.
9. OECD407. OECD guideline for testing of chemicals: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. 2008.
10. Nguyen Duy Ha, Ta Thi Ngoc Anh, Dinh Toi Chu, et al. The acute toxicity and semi-chronic toxicity of bacimix product containing two strains of *Bacillus subtilis* BS 304.04 and *Bacillus coagulans* BC 304.06 on experimental animal model. *Journal of Military Pharmacology - Medicine*. 2022; 7: 133-144.
11. JR. Endresa, I Qureshia, T Farber, et al. One-year chronic oral toxicity with combined reproduction toxicity study of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49: 1174-1182.

Summary

ASSESSMENT OF THE ACUTE AND SUBACUTE TOXICITY OF *BACILLUS* SPP. ON EXPERIMENTAL ANIMALS

The study was performed to evaluate the acute and subacute toxicity tests on animals of the *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii* with concentration 1×10^9 CFU/mL). Acute toxicity study on *Swiss* mice by oral administration using the fixed dose method. A subacute toxicity study was conducted on *Albino* rabbits. The results of acute toxicity study showed that probiotics administered orally at a single dose up to 5000 mg/kg/day (2×10^{10} CFU/kg/day) did not cause toxicity, the lethal dose LD₅₀ has not been determined. In the sub-chronic toxicity study, mild liver degeneration appeared in both the group of 1 g/kg/day and 5 g/kg/day compared to the control group. However, blood test results showed that liver function indexes (AST, ALT, GGT) and kidney function (Creatinine, Urea) were similar between the groups using the product and the control group. The difference was not statistically significant ($p > 0.05$). Thus, *Bacillus* sp. VN does not cause acute toxicity when administered orally at doses up to 5000 mg/kg. Using two dose levels of 1 and 5 g/kg/day is relatively safe in subacute toxicity.

Keywords: Probiotics, *Bacillus* spp., animals.