

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DINH DƯỠNG QUỐC GIA

NGUYỄN LÂN

**ẢNH HƯỞNG CỦA SỮA BỔ SUNG PRE-PROBIOTIC
LÊN TÌNH TRẠNG DINH DƯỠNG, NHIỄM KHUẨN
VÀ HỆ VI KHUẨN CHÍ ĐƯỜNG RUỘT Ở TRẺ 6-12 THÁNG TUỔI
TẠI HUYỆN PHỔ YÊN, TỈNH THÁI NGUYÊN.**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ DINH DƯỠNG

HÀ NỘI 2012

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DINH DƯỠNG QUỐC GIA

NGUYỄN LÂN

**ẢNH HƯỞNG CỦA SỮA BỔ SUNG PRE-PROBIOTIC
LÊN TÌNH TRẠNG DINH DƯỠNG, NHIỄM KHUẨN VÀ HỆ VI
KHUẨN CHÍ ĐƯỜNG RUỘT Ở TRẺ 6-12 THÁNG TUỔI
TẠI HUYỆN PHỔ YÊN, TỈNH THÁI NGUYÊN.**

MÃ SỐ: 62.72.03.03

LUẬN ÁN TIẾN SỸ DINH DƯỠNG

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. GS.TS. NGUYỄN GIA KHÁNH
2. PGS.TS. NGUYỄN THỊ LÂM

HÀ NỘI 2012

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Ban Giám đốc Viện Dinh dưỡng, Trung tâm Đào tạo Dinh dưỡng và Thực phẩm, các Thầy Cô giáo và các Khoa- Phòng của Viện đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Nguyễn Gia Khánh, PGS.TS. Nguyễn Thị Lâm, những thầy cô đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn và định hướng cho tôi trong quá trình thực hiện và hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới Công ty Friesland Campina Hà Lan, công ty Dutch Lady Việt Nam đã hỗ trợ về kỹ thuật cũng như kinh phí để triển khai các hoạt động nghiên cứu tại cộng đồng.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Chính quyền, đoàn thể, các bà mẹ và trẻ em của Huyện Phổ Yên, Tỉnh Thái Nguyên đã hợp tác và tạo điều kiện cho tôi tiến hành nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới BS. Lưu Mạnh Tuyền, BS. Nguyễn Đức Vương-Trung Tâm Y tế huyện Phổ Yên đã ủng hộ và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian triển khai nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn những người thân, bạn bè đã động viên khích lệ tôi trong suốt quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn bố mẹ, vợ và các con tôi đã hỗ trợ, động viên để tôi có thể hoàn thành luận án.

Ths. Nguyễn Lâm

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi trực tiếp thực hiện, các số liệu, kết quả trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kì công trình nào khác.

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Lân

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

NEC	: Necrotizing Enterocolitis (Bệnh viêm ruột hoại tử)
IBD	: Imflammatory Bowel Disease (Các bệnh viêm ruột)
SCFAs	: Short chain fatty acids (Các acid béo mạch ngắn)
FDA	: Food and Drug Administration (Cục Quản lý Dược & thực phẩm)
FOS	: Fructo - oligo saccharit
GOS	: Galacto-oligosaccharit
GSV	: Giám sát viên
AIDS	: Acquired Immune Dediciency Syndrome (Hội chứng suy giảm miễn dịch)
LRI	: Lower Respiratory Infection (Nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới)
URI	: Upper Respiratory Infection (Nhiễm khuẩn đường hô hấp trên)
ARI	: Acute Respiratory Infection (Nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính)
NKHH	: Nhiễm khuẩn hô hấp
NCBSM	: Nuôi con bằng sữa mẹ
ORS	: Ôrêzon
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Phương pháp PCR)
UNICEF	: United Nation Children' Fund (Quỹ Nhi đồng Liên Hiệp Quốc)
SDD	: Suy Dinh dưỡng
FAO	: The Food and Agriculture Organization (Tổ chức Nông lương)
WHO	: World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)
LAB	: Lactic acid bacteria (Vi khuẩn sinh acid lactic)
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (Vi rút gây suy giảm miễn dịch ở người)
T ₀ , T ₂ , T ₄ , T ₆	: Trước can thiệp, 2 tháng sau can thiệp, 4 tháng sau can thiệp, 6 tháng sau can thiệp
WAZ	: Z-score cân nặng theo tuổi
HAZ	: Z-score chiều cao theo tuổi
WHZ	: Z-score của cân nặng theo chiều cao

MỤC LỤC

	Trang
Lời cảm ơn.....i
Lời cam đoan.....ii
Danh mục các chữ viết tắt.....iii
Mục lục.....iv
Danh mục các bảng.....vii.....
Danh mục các biểu đồ.....ix
ĐẶT VẤN ĐỀ1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU4
1.1. Hệ vi khuẩn chí đường ruột.....4
1.1.1. Khái niệm.....4
1.1.2. Sự xuất hiện vi khuẩn chí đường ruột ở trẻ sơ sinh.....5
1.1.3. Sự phân bố của các vi khuẩn đường ruột.....6
1.1.4. Các loài vi khuẩn chí đường ruột.....6
1.1.5. Vai trò của vi khuẩn chí đường ruột7
1.1.6. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột12
1.2. Probiotic, prebiotic và các nghiên cứu liên quan.....15
1.2.1. Probiotic15
1.2.2. Prebiotic.....17
1.2.3. Tác động của probiotic trên hệ vi khuẩn chí đường ruột18
1.2.4. Vai trò của probiotic với chức năng rào cản và miễn dịch....19
1.2.5. Tổng hợp nghiên cứu lâm sàng về probiotic ở trẻ nhỏ.....20
1.2.6. Tính an toàn, liều lượng probiotic sử dụng.....26
1.2.7. Hướng dẫn đánh giá probiotics sử dụng trong thực phẩm của WHO.....28
1.3. Bệnh tiêu chảy28
1.3.1. Dịch tễ học của bệnh tiêu chảy28
1.3.2. Định nghĩa29

1.3.3. Phân loại bệnh tiêu chảy	29
1.3.4. Nguyên nhân bệnh tiêu chảy	31
1.3.5. Các biện pháp phòng chống bệnh tiêu chảy	32
1.4. Nhiễm khuẩn đường hô hấp cấp tính (ARI).....	33
1.4.1. Dịch tễ học của ARI	33
1.4.2. Nguyên nhân gây ARI ở trẻ em	34
1.4.3. Các yếu tố nguy cơ thường gặp gây ARI ở trẻ em.....	35
1.4.4. Các giải pháp phòng chống bệnh ARI ở trẻ em	35
1.5. Các biện pháp dinh dưỡng trong phòng chống nhiễm khuẩn hô hấp và tiêu chảy cấp ở trẻ em	35
1.5.1. Nuôi con bằng sữa mẹ.....	35
1.5.2. Bổ sung Vitamin A.....	37
1.5.3. Bổ sung Kẽm.....	39
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	42
2.1. Một số nét cơ bản về địa bàn nghiên cứu.....	42
2.2. Thiết kế nghiên cứu.....	42
2.2.1. Giai đoạn 1	43
2.2.2. Giai đoạn 2.....	44
2.2.2.1. Địa điểm, đối tượng, cỡ mẫu.....	44
2.2.2.2. Phương pháp chọn mẫu.....	45
2.2.2.3. Thời gian can thiệp.....	46
2.2.2.4. Cách tiến hành.....	46
2.2.2.5. Các số liệu và thời điểm thu thập số liệu trong quá trình can thiệp.....	50
2.2.2.6. Nguồn gốc và thành phần sữa sử dụng cho nghiên cứu.....	50
2.2.3. Các phương pháp thu thập số liệu và tiêu chuẩn đánh giá	54
2.3. Xử lý và phân tích số liệu	58
2.4. Đạo đức nghiên cứu	60
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	61
3.1. Thực trạng NCBSM, thực hành ăn bổ sung, tình hình nuôi dưỡng và bệnh tật của trẻ.....	61

3.1.1. Một số thực hành NCBSM và ăn bổ sung	61
3.1.2. Tình hình mắc tiêu chảy, viêm đường hô hấp cấp ở trẻ và một số thực hành chăm sóc nuôi dưỡng trẻ	64
3.2. Một số đặc điểm chung của đối tượng trước can thiệp.....	65
3.3. Tình trạng dinh dưỡng của trẻ trong 6 tháng can thiệp.....	67
3.4. Tình hình bệnh tật ở trẻ trong 6 tháng can thiệp.....	74
3.5. Sự thay đổi hệ vi khuẩn chí đường ruột của trẻ trong 6 tháng can thiệp.....	80
Chương 4. BÀN LUẬN	90
4.1. Thực trạng NCBSM, thực hành ăn bổ sung, tình hình nuôi dưỡng và bệnh tật của trẻ.....	90
4.2. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu trước can thiệp.....	93
4.3. Mức độ ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic và synbiotic đến tình trạng dinh dưỡng của trẻ trong 6 tháng can thiệp.....	94
4.3.1. Về cân nặng.....	94
4.3.2. Về chiều dài nằm.....	95
4.3.3. Về các chỉ số WAZ, HAZ và WHZ.....	96
4.4. Mức độ ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic và synbiotic đến nhiễm khuẩn tiêu hóa và hô hấp ở trẻ trong 6 tháng can thiệp.....	100
4.4.1. Tình hình mắc nhiễm khuẩn đường tiêu hóa.....	100
4.4.2. Các bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp.....	105
4.5. Ảnh hưởng lên hệ vi khuẩn chí đường ruột.....	108
KẾT LUẬN	117
KHUYẾN NGHỊ	119
PHỤ LỤC	
Tài liệu tham khảo	

DANH MỤC CÁC BẢNG

		Trang
Bảng 3.1.	Thời gian cho trẻ bú sau sinh	61
Bảng 3.2.	Thức ăn cho trẻ trước khi bú lần đầu	61
Bảng 3.3.	Thời điểm trẻ bắt đầu được cho ăn bổ sung	62
Bảng 3.4.	Lý do cho trẻ ăn thêm ngoài sữa mẹ	62
Bảng 3.5.	Thực phẩm được sử dụng cho trẻ ăn ngày hôm qua ngoài sữa mẹ	63
Bảng 3.6.	Người chăm sóc trẻ khi mẹ vắng nhà	64
Bảng 3.7.	Cách thức cho bú khi trẻ bị bệnh	64
Bảng 3.8.	Tỷ lệ trẻ mắc bệnh tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp cấp trong hai tuần qua	64
Bảng 3.9.	Một số đặc điểm chung của trẻ ở 4 nhóm nghiên cứu	65
Bảng 3.10.	Một số đặc điểm chung của các bà mẹ ở 4 nhóm nghiên cứu	66
Bảng 3.11.	Hiệu quả trên cân nặng tại các thời điểm can thiệp	67
Bảng 3.12.	Hiệu quả trên chiều dài nằm tại các thời điểm can thiệp	69
Bảng 3.13.	Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo WAZ-Score tại các thời điểm nghiên cứu	70
Bảng 3.14.	Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo HAZ-Score tại các thời điểm nghiên cứu	72
Bảng 3.15.	Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo WHZ-Score tại các thời điểm nghiên cứu	72
Bảng 3.16.	Tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn đường tiêu hóa trong 6 tháng can thiệp	74
Bảng 3.17.	Tình hình nhiễm khuẩn đường tiêu hoá trong 6 tháng can thiệp	75
Bảng 3.18.	Một số đặc điểm của phân trong 6 tháng can thiệp	76
Bảng 3.19.	Tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn đường hô hấp ở trẻ trong 6 tháng can thiệp	77
Bảng 3.20.	Tình hình bệnh nhiễm khuẩn hô hấp cấp và điều trị bệnh sau 6	78

	tháng can thiệp	
Bảng 3.21.	Tình hình nhiễm khuẩn đường hô hấp trong 6 tháng can thiệp	80
Bảng 3.22.	Mẫu phân có <i>BB12</i> (+) ^a tại các thời điểm nghiên cứu	80
Bảng 3.23.	Hiệu quả sau 6 tháng can thiệp lên vi khuẩn có ích	82
Bảng 3.24.	Hiệu quả sau 6 tháng can thiệp lên vi khuẩn có hại	84

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ		Trang
Biểu đồ 3.1.	Thay đổi cân nặng của trẻ trước và sau can thiệp	68
Biểu đồ 3.2.	Mức tăng cân nặng của trẻ trong các giai đoạn can thiệp	68
Biểu đồ 3.3.	Thay đổi chiều dài nằm của trẻ trước và sau can thiệp	69
Biểu đồ 3.4.	Mức tăng chiều dài nằm của trẻ trong các giai đoạn can thiệp	70
Biểu đồ 3.5.	Thay đổi WAZ-Score sau 6 tháng can thiệp	71
Biểu đồ 3.6.	Thay đổi WHZ-Score sau 6 tháng can thiệp	73
Biểu đồ 3.7.	Số lần đại tiện của trẻ ở các nhóm nghiên cứu	76
Biểu đồ 3.8.	Số ngày và số đợt bị ho của trẻ ở các nhóm nghiên cứu	79
Biểu đồ 3.9.	Thay đổi số lượng <i>BB12</i> trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu	81
Biểu đồ 3.10.	Thay đổi số lượng <i>Lactobacilli</i> trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu	85
Biểu đồ 3.11.	Tỷ lệ <i>Lactobacilli</i> trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp	86
Biểu đồ 3.12.	Thay đổi số lượng <i>Bifidobacteria</i> trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu	86
Biểu đồ 3.13.	Tỷ lệ <i>Bifidobacteria</i> trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp	87
Biểu đồ 3.14.	Thay đổi số lượng <i>Bacteroides</i> trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu	87
Biểu đồ 3.15.	Thay đổi tỷ lệ <i>Bacteroides</i> trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp	88
Biểu đồ 3.16.	Thay đổi số lượng <i>E.coli</i> trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu	88
Biểu đồ 3.17.	Thay đổi tỷ lệ <i>E. Coli</i> trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp	89

ĐẶT VẤN ĐỀ

Mục tiêu thiên niên kỉ đặt ra là giảm 2/3 tỷ lệ tử vong trẻ em từ năm 1990 đến 2015. Với sự nỗ lực không ngừng của chính phủ các nước và các tổ chức quốc tế như UNICEF, WHO, đến nay đã có rất nhiều tiến bộ đạt được trong việc làm giảm tỷ lệ tử vong ở trẻ em. Nhưng cho đến nay, nhiễm khuẩn hô hấp cấp (ARI) và tiêu chảy vẫn là hai bệnh đứng hàng đầu gây tử vong ở trẻ em trên toàn thế giới. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), mỗi năm có khoảng 15 triệu trẻ em bị chết, trong đó khoảng 5 triệu trẻ em chết vì viêm đường hô hấp cấp tính (ARI). Tỷ lệ mắc ARI/ tổng số trẻ em ở Iraq là 39,3%, Brazil là 41,8%, ở Anh là 30,5%, và tại Úc là 34% [161]. Trong các bệnh thì ARI, viêm phổi là bệnh gây tử vong cao nhất ở trẻ em, cao hơn AIDS, sốt rét và sởi cộng lại. Có khoảng 1,5 triệu trẻ em dưới 5 tuổi trên thế giới bị tử vong do viêm phổi hằng năm, chiếm khoảng 18% tử vong (bao gồm tử vong trong tháng đầu sau sinh) trẻ em toàn cầu [167]. Sau ARI, bệnh tiêu chảy là nguyên nhân thứ hai tử vong ở trẻ em, chiếm khoảng 14% tử vong trẻ em dưới 5 tuổi, khoảng 1,2 triệu trẻ em mỗi năm [167].

Tại Việt Nam, ARI cũng là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở trẻ em, chiếm 44% trong số các bệnh gây tử vong cho trẻ ở độ tuổi này. Sau đó là bệnh tiêu chảy, tỷ lệ mắc tiêu chảy thường dao động theo mùa và theo độ tuổi của trẻ, trong đó trẻ dưới 2 tuổi là nhóm có nguy cơ cao nhất, đây cũng là thời kì trẻ được nuôi dưỡng bằng thức ăn bổ sung cùng với sữa mẹ. ARI và tiêu chảy cũng là hai bệnh gây SDD hàng đầu ở trẻ em dưới 5 tuổi.

Năm 2008 Tỷ lệ thiếu máu ở trẻ dưới 5 tuổi trên toàn quốc là 29,4%, Tây Nguyên là 23,1 %, Đông Nam Bộ 30,2 %, đồng bằng Bắc Bộ là 23,9% (2008). Lượng Sắt trong khẩu phần đạt 6,5 mg/trẻ/ngày, đáp ứng được 73% nhu cầu khuyến nghị (70% ở khu vực nông thôn và 87% ở khu vực thành phố). Tình trạng vitamin A huyết thanh thấp vẫn còn phổ biến ở trẻ em vùng nông thôn và miền núi, chiếm 10,8% [156]. Năm 2010 có đến 29,2% trẻ em dưới 5 tuổi bị thiếu máu dinh dưỡng [19]. Năm 2010, ở nước ta ước tính có gần 1,3 triệu trẻ em dưới 5 tuổi bị SDD thể nhẹ cân, khoảng 2,1 triệu trẻ em bị SDD thể thấp còi và 520.000 trẻ SDD thể gầy còm. Năm 2010, tỷ lệ trẻ em dưới 5 tuổi bị suy dinh dưỡng theo chỉ

tiêu cân nặng/tuổi trên toàn quốc là 17,5%, trong đó Tây Nguyên, miền núi phía Bắc và các tỉnh duyên hải miền Trung là những nơi có tỷ lệ trẻ bị SDD cao hơn những vùng khác, tương ứng là 24,7%, 22,1% và 19,8%. Đông nam bộ là khu vực có tỷ lệ trẻ bị SDD thấp nhất (10,7%). Bên cạnh việc giảm tỷ lệ trẻ bị SDD cân nặng /tuổi thì tỷ lệ suy dinh dưỡng thấp còi vẫn còn ở mức cao 29,3% [19]. Tỷ lệ trẻ nhỏ dưới 6 tháng tuổi được bú mẹ hoàn toàn còn thấp (19,6%) và tỷ lệ bú mẹ chủ yếu là 25,4%, tỷ lệ bà mẹ cho trẻ bú sớm trong vòng 1 giờ đầu sau sinh là 61,7%, tỷ lệ trẻ dưới 2 tuổi được nuôi hợp lý là 54,8%, tỷ lệ trẻ được ăn bổ sung kịp thời là 85,0% [19].

Mặc dù hiện nay Bộ Y tế Việt nam đã khuyến cáo các bà mẹ cần nuôi trẻ hoàn toàn bằng sữa mẹ trong vòng 6 tháng đầu sau sinh, nhưng trên thực tế, có nhiều bà mẹ vì nhiều lí do như mẹ thiếu sữa, bận rộn công việc, mẹ bị bệnh, nhiễm HIV vẫn cho trẻ ăn thêm sữa ngoài. Đây cũng là lí do khiến trẻ em phải đối mặt với các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hoá và hô hấp khi trẻ không được bú mẹ hoàn toàn và ăn bổ sung thêm thức ăn khác sớm hơn khuyến cáo.

Trong những năm gần đây, hệ vi khuẩn trong đường ruột được nhiều nghiên cứu đề cập đến, chúng có vai trò rất quan trọng giúp duy trì sự ổn định nội môi của cơ thể và tình trạng sức khoẻ tốt. Đặc biệt, trẻ suy dinh dưỡng thường kèm theo rối loạn hệ vi khuẩn đường ruột, làm tăng các đợt tiêu chảy do nhiễm khuẩn cấp tính, và kéo theo những thay đổi của hệ miễn dịch tại đường tiêu hóa [131], [140]. Trong số các vi khuẩn đường ruột, giới khoa học đặc biệt quan tâm nhiều tới một vài vi khuẩn sinh acid lactic có tác dụng có lợi lên sức khỏe của con người. Trong số này phải kể đến *Lactobacilli* và *Bifidobacteria*, chúng là một phần của hệ vi khuẩn đường ruột và đã được sử dụng trong các sản phẩm sữa khác nhau.

Theo Tổ chức Y tế thế giới, Probiotic được định nghĩa là các vi khuẩn có lợi cho sức khỏe của con người khi ăn (bổ sung) vào một lượng nhất định [70]. Probiotic ngày nay đã trở nên phổ biến đối với các bác sĩ lâm sàng cũng như cộng đồng và nhận được sự quan tâm mạnh mẽ. Nhiều nghiên cứu khác nhau đã tập trung vào các cơ chế nhằm giải thích các lợi ích lâm sàng của một số vi khuẩn được sử

dụng trong nhi khoa. Bên cạnh các nghiên cứu chỉ sử dụng probiotic đơn lẻ, nhiều nghiên cứu kết hợp probiotic và prebiotic được tiến hành nhằm tìm hiểu tác dụng phối hợp giữa probiotic và prebiotic “sự kết hợp prebiotic và probiotic được gọi là Synbiotic” [135].

Việc bổ sung prebiotic, probiotic kết hợp với prebiotic (synbiotic) vào sữa bột làm cho nó có tính chất gần giống với sữa mẹ hơn, có thể là biện pháp nhằm giúp những đứa trẻ, mà mẹ của chúng không có điều kiện NCBSM hoặc NCBSM hoàn toàn do gánh nặng công việc hoặc do thiếu sữa hoặc vì một lí do khác và phải ăn bổ sung sớm, giảm thiểu các bệnh tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp cấp phổ biến ở trẻ góp phần làm giảm tỷ lệ suy dinh dưỡng, tử vong cho trẻ.

Trong nghiên cứu này sử dụng 4 loại sữa khác nhau (sữa công thức không bổ sung, sữa bổ sung prebiotic; sữa bổ sung probiotic kết hợp với các liều khác nhau của prebiotic) nhằm đánh giá ảnh hưởng của sữa đến tình trạng dinh dưỡng, tình hình mắc bệnh tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp cấp, cũng như hệ vi khuẩn chí đường ruột ở trẻ từ 6-12 tháng tuổi, tại huyện Phổ Yên, tỉnh Thái Nguyên.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

1. Mô tả thực trạng NCBSM, thực hành ăn bổ sung, tình hình nuôi dưỡng và bệnh tật của trẻ từ 5-6 tháng tuổi tại huyện Phổ Yên, tỉnh Thái Nguyên.
2. Đánh giá mức độ ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic và synbiotic (probiotic kết hợp với prebiotic) đến tình trạng dinh dưỡng, tình trạng nhiễm khuẩn và hệ vi khuẩn chí đường ruột ở trẻ từ 6-12 tháng tuổi trong 6 tháng can thiệp.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. HỆ VI KHUẨN CHÍ ĐƯỜNG RUỘT

1.1.1. Khái niệm

Vi khuẩn chí đường ruột là các vi khuẩn sống bình thường trong đường tiêu hoá và thực hiện nhiều chức năng có lợi cho con người. Cơ thể con người có khoảng 10^{13} tế bào, trong khi đó số vi khuẩn có trong đường ruột còn gấp mười lần [83], [142]. Phần lớn vi khuẩn ở trong ruột [155] và 60% trong phân [83]. Có khoảng từ 300 đến 1000 loài vi khuẩn sống trong đường ruột [83], trung bình khoảng 500 loài [142]. Tuy nhiên mỗi cá thể có khoảng từ 30-40 loài chiếm ưu thế [79]. Nấm (*Saccharomyces boulardii*) cũng là một phần của vi khuẩn đường ruột, nhưng hoạt động của chúng ít được biết đến.

Nhiều nghiên cứu cho thấy mối liên quan giữa vi khuẩn và con người không chỉ đơn thuần là mối liên quan hội sinh (không gây hại) mà là mối quan hệ phụ thuộc lẫn nhau - mối quan hệ cộng sinh [83]. Mặc dù con người có thể sống mà không cần đến vi khuẩn chí [142], nhưng trong thực tế, các vi khuẩn chí thực hiện nhiều chức năng có lợi cho con người, như làm lên men các chất chứa năng lượng chưa được sử dụng, tác động lên hệ miễn dịch, kìm hãm sự phát triển của các vi khuẩn có hại, điều hoà sự phát triển của ruột, tạo ra vitamin cho cơ thể như biotin và vitamin K, tạo hóc môn điều khiển dự trữ mỡ của cơ thể... Tuy nhiên, trong một số tình huống nhất định thì một số loài có thể gây bệnh và làm tăng nguy cơ gây ung thư [143]. Không phải tất cả các vi khuẩn ăn vào đều là probiotic vì bên cạnh việc lên men các loại thực phẩm thì lợi ích của nó chưa được xác định và các vi khuẩn cũng có các cơ chế khác nhau tác động lên cơ thể.

Các thực phẩm lên men, đặc biệt là các sản phẩm làm từ sữa như sữa chua, đã được sử dụng từ lâu. Ngày nay thực phẩm và nước giải khát có chứa các vi khuẩn

sản sinh acid lactic (*LAB*) chiếm khoảng 40% thực phẩm sử dụng trên thế giới, các vi khuẩn *LAB* đặc biệt là các loài *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus* là được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm, chúng hiếm khi gây bệnh nhiễm trùng và có tác hại đối với cơ thể con người. Chỉ có một số nhỏ các loài này được nghiên cứu và có tác dụng như một probiotic.

Các probiotic thường được nghiên cứu cho đến nay là loài *Lactobacillus* bao gồm các chủng như *L.Rhamnosus* (*GG*), *L.Acidophilus*, *L.Casei*, *L.Johnsonii*, *L.Reuteri* là được nghiên cứu nhiều nhất ở người. Đối với loài *Bifidobacteria*, các chủng được nghiên cứu nhiều nhất là *B.Breve*, *B.Infantis*, *B.Lactis*, *B.Longum*. Tên gọi của các chủng cũng có sự thay đổi ví dụ như *B.Lactis* còn được gọi là *B.Bifidum*, *B.Animalis* hoặc *Bifidobacterium*, *BB12*. *Rhamnosus* của chủng *Lactobacillus Pacasei* còn được gọi là *Lactobacillus GG*.

1.1.2. Sự xuất hiện vi khuẩn chí đường ruột ở trẻ sơ sinh

Đường ruột của trẻ mới sinh là vô trùng. Ngay sau khi được sinh ra, số lượng vi khuẩn chí đường ruột của trẻ phát triển nhanh và phụ thuộc vào nhiều yếu tố như yếu tố di truyền, đẻ thường hay đẻ có can thiệp, vi khuẩn của người mẹ, cách nuôi trẻ và môi trường xung quanh trẻ. Khi đứa trẻ vừa được sinh ra, ngay lập tức vi khuẩn từ người mẹ và môi trường xung quanh xâm nhập vào đường tiêu hoá của trẻ. Ngay sau khi đẻ trẻ sơ sinh đã có vi khuẩn ở đường tiêu hoá, các vi khuẩn này có nguồn gốc từ phân của người mẹ, nếu đứa trẻ được sinh ra bằng can thiệp thì có thể nhiễm vi khuẩn từ mẹ, nhưng chủ yếu là từ môi trường xung quanh [140]. Sau khi sinh, vi khuẩn từ môi trường bên ngoài qua đường miệng và đường da thâm nhập vào cơ thể trẻ khi mẹ cho trẻ bú, hôn trẻ, vuốt ve...

E. coli và *streptococci* là những vi khuẩn đầu tiên có mặt ở trẻ và chỉ sau vài ngày số lượng vi khuẩn có thể đạt tới $10^8 - 10^{10}$ /g phân [140]. Trong tuần đầu sau khi sinh, những vi khuẩn này tạo nên một môi trường thuận lợi cho sự có mặt tiếp theo của các vi khuẩn kỵ khí, chủ yếu là các vi khuẩn thuộc các loài

Bifidobacterium, *Bacteroides*, *Clostridium* và *Ruminococcus* [69]. Trẻ được nuôi bằng sữa mẹ thì *Bifidobacteria* tăng nhanh và chiếm ưu thế, có thể do trong sữa mẹ có yếu tố phát triển *Bifidobacteria* và chiếm khoảng 80-90% tổng số vi khuẩn, *Lactobacilli* và *Bacteroids* cũng tăng nhưng ít hơn và *Enterobacteria* thì giảm. Trẻ được nuôi bằng các loại sữa bột thì vi khuẩn đa dạng hơn với số lượng lớn *Enterobacteriaceae*, *enterococci*, *bifidobacteria*, *Bacteroides* và *clostridia* [57], chủ yếu là *Coliform* và *Bacteroids* [87], [66]. Khi trẻ bắt đầu ăn dặm, thì vi khuẩn của trẻ bú mẹ là gần giống như của trẻ ăn sữa ngoài, khi trẻ hai tuổi thì hệ vi khuẩn trong cơ thể giống như ở người trưởng thành. Mặc dù thành phần của vi khuẩn đường ruột là khác nhau giữa các cá thể, nhưng trong một cá thể thì thành phần này là ổn định trong 1 thời gian dài (16-18 triệu).

1.1.3. Sự phân bố của các vi khuẩn đường ruột

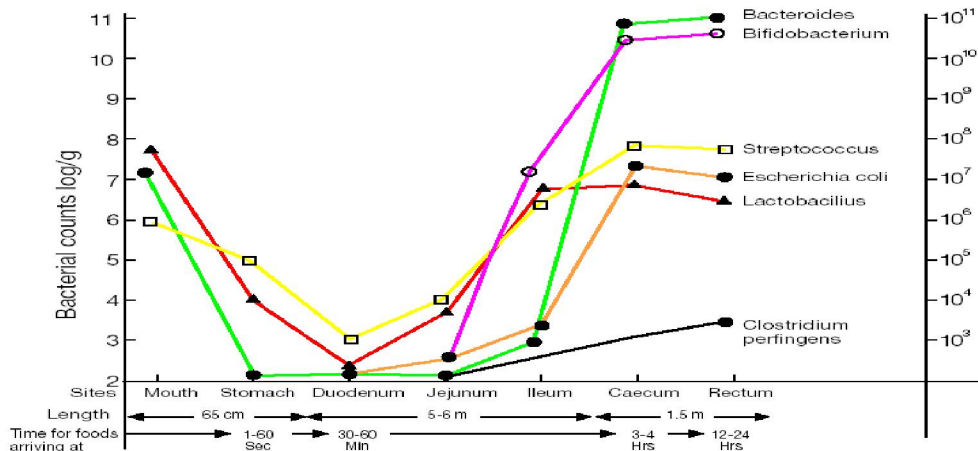
Trong cơ thể, đại tràng là nơi có số lượng lớn và nhiều loài vi khuẩn nhất, hoạt động của chúng làm cho ruột già trở thành cơ quan chuyên hoá tích cực của cơ thể [155]. Phần lớn vi khuẩn ở ruột non là vi khuẩn gram (+), trong khi đó ở đại tràng là gram(-) [34]. Phần đầu của ruột kết phần lớn chịu trách nhiệm việc lên men carbohydrate [143], [155] trong khi đó phần sau của ruột chịu trách nhiệm phân huỷ protein và amino acid [143], [155]. Vi khuẩn phát triển nhanh ở manh tràng và phần đi lên của ruột kết, nơi có độ pH thấp, phát triển chậm ở kết tràng, nơi có độ pH gần như trung tính [143]. Cơ thể điều chỉnh sự cân bằng và phân bố của vi khuẩn thông qua thay đổi độ pH, hoạt động hệ miễn dịch và nhu động ruột. Hơn 99% vi khuẩn đường ruột là vi khuẩn kỵ khí [143], nhưng ở manh tràng thì vi khuẩn yếm khí có mật độ cao [143].

1.1.4. Các loài vi khuẩn chí đường ruột

Không phải tất cả các loài vi khuẩn đường ruột đều được xác định [143], [155], do một vài loài không nuôi cấy được [83], [79], do vậy việc phân lập và xác định DNA là rất khó khăn [145]. Mật độ các loài là khác nhau giữa các cá thể, nhưng

tương đối ổn định trên từng cá thể [143].

Distribution of microbes in various segments of the adult digestive tract



Biểu đồ 1. Phân bố vi khuẩn tại các đoạn khác nhau trong đường tiêu hóa người trưởng thành

Phần lớn vi khuẩn là các giống *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium* [143], [79], *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* và *Bifidobacterium* [143], [79]. Các giống khác như *Escherichia* và *Lactobacillus* là ít hơn [143]. Các loài của *Bacteroides* chiếm khoảng 30% vi khuẩn đường ruột và đóng vai trò rất quan trọng trong hoạt động của cơ thể người [83].

Hiện nay người ta cũng biết đến các giống nấm của đường ruột như *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* và *Penicillium*.

1.1.5. Vai trò của vi khuẩn chí đường ruột

Vi khuẩn ở đường ruột thực hiện nhiều chức năng hữu ích cho con người, bao gồm chức năng tiêu hoá các chất giàu năng lượng chưa được sử dụng [69], kích thích sự tăng trưởng tế bào, ức chế sự phát triển của các vi khuẩn có hại, làm cho hệ miễn dịch chỉ phản ứng đối với các vi khuẩn gây bệnh, bảo vệ cơ thể khỏi một số bệnh [143], [83].

1.1.5.1. Tác dụng tới quá trình lên men Carbohydrate và hấp thu

Cơ thể con người không thể sử dụng một vài carbohydrate, không thể tiêu hoá

nếu thiếu vi khuẩn đường ruột do một số vi khuẩn có các enzyme để chuyển hoá một số loại polysaccharide mà tế bào người không có [83]. Carbohydrate mà cơ thể người không thể tiêu hoá nếu thiếu vi khuẩn chỉ là các loại tinh bột, chất xơ, oligosaccharide và đường như lactose, đường rượu, chất nhày đường ruột và protein [143], [155].

Vi khuẩn chí giúp chuyển hoá carbohydrate, lên men và chuyển thành các acid béo mạch ngắn (SCFAs) [155], [79] và được cơ thể sử dụng như một nguồn năng lượng và các chất dinh dưỡng hữu ích [155], chúng còn làm tăng hấp thu nước, giảm khả năng phát triển các vi khuẩn gây bệnh, tăng sự phát triển tế bào đường ruột và phát triển vi khuẩn có ích [145]. Các acid béo mạch ngắn được tạo thành do quá trình lên men đường bao gồm các acid như acid propionic, acid butyric...[155], [79]. Gas và các acid hữu cơ như acid lactic cũng được sản xuất nhờ quá trình lên men này [79]. Acid acetic được cơ thể sử dụng, acid propionic giúp gan sản xuất ATP và acid butyric cung cấp năng lượng cho tế bào đường ruột và có tác dụng ngăn ngừa ung thư [155].

Có nhiều bằng chứng khác còn cho thấy vi khuẩn chí làm tăng quá trình hấp thu và dự trữ lipid [83]. Vi khuẩn chí giúp cơ thể tăng hấp thu các vitamin như vitamin K. Hơn nữa các acid béo mạch ngắn còn giúp cơ thể hấp thu các chất khác như calci, magie và sắt [143]. Các acid béo mạch ngắn còn làm tăng sự phát triển, kiểm soát sự tăng sinh và biệt hoá các tế bào biểu mô ruột [143], giúp các mô lympho cạnh đường tiêu hoá phát triển. Vi khuẩn còn làm thay đổi sự phát triển đường ruột thông qua việc thay đổi sản sinh các protein bề mặt tế bào như protein vận chuyển natri và glucose [83].

1.1.5.2. Ngăn chặn sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh

Một vai trò quan trọng khác của vi khuẩn chí là ngăn chặn sự phát triển của các vi khuẩn gây hại, nấm và các vi khuẩn có hại như *Clostridium difficile* không thể phát triển quá mức do phải cạnh tranh với các vi khuẩn có ích. Tác dụng rào cản

của vi khuẩn có ích là ngăn ngừa sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh và ức chế sự phát triển làm giảm số lượng các vi khuẩn này trong đường ruột [143].

Các vi khuẩn chí còn ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn có hại thông qua cạnh tranh các chất dinh dưỡng và điếm gắn (receptor) vào tế bào biểu mô của ruột kết. Các vi khuẩn cộng sinh thường thành công hơn trong việc cạnh tranh này. Các vi khuẩn chí gửi các tín hiệu hoá học đến chủ thể về số lượng chất dinh dưỡng mà chúng cần và chủ thể chỉ cung cấp đủ số lượng đó, do vậy các vi khuẩn có hại bị đói, thiếu chất dinh dưỡng. Các vi khuẩn có ích còn sản xuất ra chất *bacteriocin* có thể tiêu diệt vi khuẩn có hại và số lượng của chúng được điều khiển bởi các enzyme của chủ thể [143].

Quá trình lên men và tạo ra các acid béo cũng làm giảm độ pH trong ruột già, làm giảm sự tăng sinh của vi khuẩn có hại và tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn có ích. Độ pH cũng có thể làm tăng bài tiết carcinogen [155].

1.1.5.3. Ảnh hưởng đến hệ miễn dịch

Các vi khuẩn chí đường ruột tác động một cách liên tục lên hệ tiêu hoá và hệ miễn dịch của cơ thể. Các vi khuẩn này là yếu tố quan trọng trong sự phát triển sớm hệ miễn dịch màng nhày, cả yếu tố vật lí và chức năng, nó còn tiếp tục đóng vai trò quan trọng sau này trong hoạt động của chúng. Các vi khuẩn kích thích các tế bào lympho cùng với màng nhày tạo ra các kháng thể đối với vi khuẩn gây bệnh. Hệ miễn dịch nhận biết và tiêu diệt các vi khuẩn có hại, không tiêu diệt các vi khuẩn có ích và sự dung nạp được hình thành ở trẻ [143].

Ngay sau khi sinh, vi khuẩn đã có mặt trong đường tiêu hoá của trẻ. Những vi khuẩn có mặt đầu tiên trong đường tiêu hoá có khả năng tác động lên các đáp ứng miễn dịch và làm cho chúng thuận lợi hơn với các vi khuẩn này và ít thuận lợi hơn cho các vi khuẩn cạnh tranh, do vậy các vi khuẩn có mặt đầu tiên trong ruột đóng vai trò quan trọng trong thành phần vi khuẩn đường tiêu hoá sau này. Tuy nhiên từ thời điểm trẻ ăn bổ sung thì ưu thế chuyển từ vi khuẩn yếm khí như

Streptococci và *Escherichia coli* sang vi khuẩn kỵ khí [143], [83].

Các nghiên cứu trong thời gian gần đây cho thấy, các vi khuẩn chí đường ruột đóng vai trò quan trọng trong việc sản sinh TLRs trong ruột giúp cơ thể hạn gấn các tổn thương. Vi khuẩn chí có thể ảnh hưởng đến "dung nạp miệng" làm cho nó ít nhạy cảm với các kháng nguyên được tiêu hoá, trong đó có kháng nguyên do vi khuẩn có ích tạo ra. *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* có thể tác động lên miễn dịch cục bộ và miễn dịch hệ thống [144]. Tần suất mắc bệnh và các rối loạn đường ruột ở trẻ được bú mẹ có thể liên quan đến sự khác nhau về thành phần vi khuẩn giữa trẻ bú mẹ và trẻ được nuôi bằng sữa công thức. *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* định cư trong ruột chống lại việc định cư của các vi khuẩn gây bệnh và do vậy nó thực hiện một phần chức năng rào cản của ruột. Các vi khuẩn này cũng có liên quan đến việc bài tiết các chất có tính chất chống vi khuẩn [146] và mucin thông qua việc kích thích gen MUC2 và MUC3, một phần rào cản của ruột ngăn chặn sự bám dính của các vi khuẩn gây bệnh [107]. Một vài *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* làm giảm các phản ứng miễn dịch đối với các kháng nguyên và làm giảm các đáp ứng miễn dịch dị ứng.

Một tác động khác của vi khuẩn đường ruột là làm tăng đáp ứng miễn dịch sIgA và vi khuẩn đường ruột. sIgA là immunoglobulin quan trọng và chiếm ưu thế trên bề mặt màng nhày, bảo vệ chống lại các kháng nguyên, vi khuẩn gây bệnh, các độc tố và các yếu tố độc hại khác [72]. Việc tổng hợp sIgA ở ruột chịu tác động của vi khuẩn. Sự phát triển của tế bào sản xuất IgA ở màng nhày của ruột, tiền sIgA chịu ảnh hưởng nhiều của vi khuẩn đường ruột. Sữa mẹ có chứa nhiều sIgA và truyền sang cho trẻ. Thêm vào đó *Bifidobacteria* có nhiều ở những trẻ được bú mẹ kích thích việc tổng hợp và bài tiết IgA. Trong 28 ngày đầu sau khi sinh, ở những trẻ được nuôi bằng sữa công thức thì sIgA không có trong phân [31]. Các nghiên cứu trên động vật cho thấy khi bổ sung *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* bằng đường miệng thì ảnh hưởng đến sIgA [154] Các nghiên cứu trên trẻ sơ sinh

nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của việc bổ sung một số loài *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* lên việc kích thích các đáp ứng miễn dịch màng nhày cũng cho các kết quả dương tính. Có thể nói rằng từng loại vi khuẩn, (đặc biệt là *Bifidobacteria* và *Lactobacilli*) đã giúp cho vật chủ (cơ thể) duy trì chức năng rào cản của ruột và các đáp ứng miễn dịch một cách hợp lí.

1.1.5.4. Phòng ngừa dị ứng

Vi khuẩn chí cũng tham gia vào việc ngăn ngừa dị ứng [41], một phản ứng quá mức của hệ miễn dịch đối với các kháng nguyên lành tính. Nhiều nghiên cứu về hệ vi khuẩn đường ruột của trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ cho thấy thành phần vi khuẩn đường ruột của trẻ bị dị ứng và trẻ không bị dị ứng là khác nhau, những trẻ bị dị ứng có số lượng các loại vi khuẩn có hại như *C.difficile* và *S.aureus* nhiều hơn và có ít *Bacteroides* và *Bifidobacteria* [41]. Điều này được giải thích là do các vi khuẩn có ích kích thích, làm cho hệ miễn dịch phản ứng một cách hợp lí đối với các kháng nguyên và việc thiếu các vi khuẩn này làm cho hệ miễn dịch phản ứng quá mức đối với các kháng nguyên. Ở khía cạnh khác, sự khác nhau về vi khuẩn đường ruột có thể chỉ là kết quả chứ không phải nguyên nhân gây ra dị ứng [41].

1.1.5.5. Phòng ngừa các bệnh viêm ruột

Một vài tác giả cho rằng các acid béo mạch ngắn (SCFAs) do vi khuẩn chí sinh ra giúp phòng ngừa các bệnh viêm ruột ở trẻ nhỏ [84]. Tần suất mắc mới và tỷ lệ mắc bệnh IBD cao hơn ở các nước công nghiệp phát triển so với các nước có nền kinh tế kém hơn, bệnh cũng có liên quan đến việc vệ sinh tốt khi còn trẻ, không nuôi con bằng sữa mẹ, tiêu thụ nhiều đường và mỡ động vật [84] và tần suất mắc mới tỷ lệ nghịch với vệ sinh kém trong năm đầu của cuộc đời, tiêu thụ rau quả và các thức ăn chưa được chế biến [84]. Việc sử dụng kháng sinh giết chết các vi khuẩn có lợi, cũng như vi khuẩn có hại cũng có mối liên quan với IBD. Mặt khác việc sử dụng probiotic mang lại lợi ích cho sức khỏe, giúp điều trị IBD.

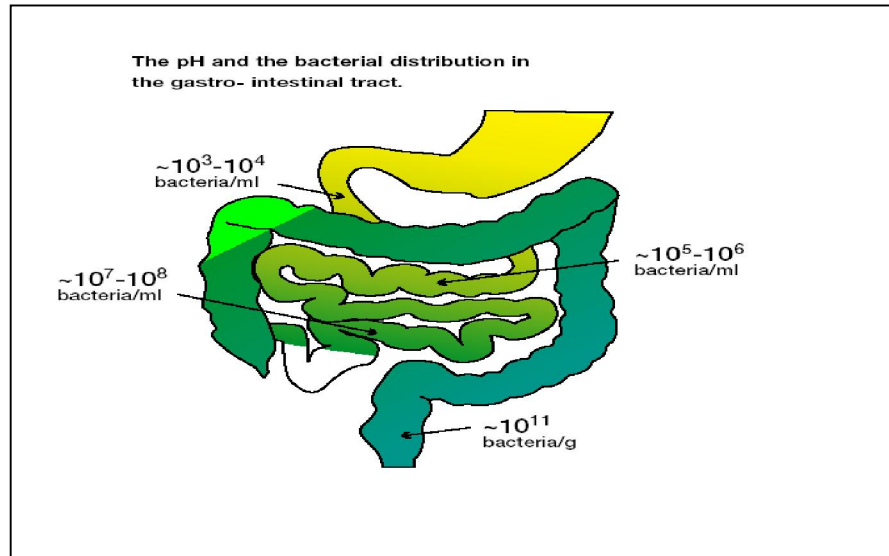
1.1.5.6. Hệ vi khuẩn chí đường ruột với các bệnh khác

Bên cạnh việc có lợi cho sức khỏe, vi khuẩn đường tiêu hoá cũng có thể có hại cho cơ thể. Chúng có thể sản xuất độc tố và carcinogen [155] liên quan đến các bệnh nhiễm trùng máu, ung thư ruột kết và IBD [143]. Do vậy, điều quan trọng đối với sức khỏe là phải cân bằng số lượng vi khuẩn, quá nhiều hoặc quá ít đều không có lợi cho sức khỏe. Có thể dùng enzyme để điều hoà sự cân bằng này [155].

1.1.6. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột

1.1.6.1. Độ pH của đường ruột

Độ pH đóng vai trò quan trọng cho hoạt động của ruột. Độ pH của dạ dày là rất thấp, chỉ khoảng 2-4, điều này quan trọng cho quá trình tiêu hoá và tiêu diệt các vi khuẩn có hại. Độ pH tăng dần từ dạ dày đến ruột già. Vi khuẩn sản sinh acid lactic ưa môi trường acid, trong khi đó vi khuẩn gây thối lại ưa thích môi trường kiềm. Do vậy, có một sự cạnh tranh giữa các vi khuẩn lên men và vi khuẩn gây thối. Vi khuẩn lên men sản xuất ra acid hữu cơ để duy trì độ pH thấp, tạo môi trường thuận lợi cho chúng phát triển và hoạt động, trong khi đó các vi khuẩn gây thối sản xuất amoniac để tăng độ pH, tạo môi trường thuận lợi cho chúng phát triển và hoạt động. Nếu độ pH tăng thì các vi khuẩn gây thối và các dạng gây bệnh của candida có cơ hội phát triển và ức chế các vi khuẩn tạo acid lactic. Điều này có thể gây ra hàng loạt các tổn thương ở ruột. Việc bổ sung probiotic và prebiotic giúp phục hồi độ pH và tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn có lợi.



Hình 2. Độ pH và sự phân bố vi khuẩn trong hệ tiêu hóa

1.1.6.2. Tác dụng của kháng sinh

Việc sử dụng các kháng sinh phổ rộng làm thay đổi số lượng các vi khuẩn có ích có thể ảnh hưởng xấu đến sức khỏe và khả năng tiêu hoá thức ăn [46]. Thuốc kháng sinh có thể gây ra tiêu chảy do kích thích trực tiếp lên ruột, thay đổi số lượng vi khuẩn đường ruột hoặc cho phép vi khuẩn có hại phát triển, làm tăng sức đề kháng của vi khuẩn và khó điều trị khi mắc bệnh lần sau [46]. Việc thay đổi số lượng và số loài vi khuẩn chí có thể làm giảm khả năng lên men carbohydrate, chuyển hóa các acid mật và có thể gây ra tiêu chảy. Carbohydrate không được tiêu hoá sẽ hấp thu nhiều nước, làm lỏng phân hoặc việc thiếu các acid béo mạch ngắn có thể gây tiêu chảy [34]. Ngoài ra, việc giảm số lượng các vi khuẩn có ích làm giảm khả năng khống chế sự phát triển của các loài vi khuẩn có hại như *C. difficile* và *Salmonella kedougou*. Thành phần vi khuẩn đường ruột cũng có thể thay đổi khi bị bệnh nặng, do sử dụng kháng sinh, chán ăn...

1.1.6.3. Probiotic & Prebiotic

Do việc thiếu vi khuẩn trong đường tiêu hoá có thể gây ra tác hại đối với sức khỏe nên việc sử dụng probiotic có tác dụng chống viêm và có thể nâng cao sức

khỏe. Prebiotic là thành phần của thức ăn có thể hỗ trợ sự phát triển vi khuẩn đường ruột và cải thiện sức khỏe [84].

1.1.6.4. Bệnh tật

Tác động của vi khuẩn chí lên miễn dịch đường ruột đã rõ, điều này cho thấy sự thay đổi vi khuẩn đường ruột có liên quan đến các trạng thái do sự thay đổi các đáp ứng miễn dịch. Ví dụ như việc tăng *Bacteroides* và *Clostridia* trong phân và giảm *Bifidobacteria* không điển hình ở những trẻ bị bệnh dị ứng so với trẻ bình thường [42]. Sự thay đổi vi khuẩn chí đường ruột và các loài không phải là *Bifidobacteria* chiếm ưu thế là cơ sở cho việc can thiệp bằng probiotic nhằm giảm thiểu các bệnh như bệnh viêm ruột kết hoại tử (NEC) [108]. Đối với bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột thì việc giảm số lượng *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* và tăng số lượng các vi khuẩn khác như *Bacteroides* có liên quan đến sự xuất hiện và mức độ nặng nhẹ của bệnh [60].

Những thay đổi “cân bằng” vi khuẩn đường ruột, đặc biệt là trong các bệnh liên quan đến viêm và miễn dịch do ít vi khuẩn đi theo đường ăn uống hoặc ít phơi nhiễm đã đưa đến “giả thuyết sạch”. Giả thuyết này cho rằng ít phơi nhiễm đối với vi khuẩn và các kháng thể trong thời thơ ấu ở các nước công nghiệp dẫn đến sự phát triển không đầy đủ các đáp ứng miễn dịch, tăng nguy cơ bùng phát các bệnh hen và dị ứng [164]. Ngày càng ngày người ta càng thừa nhận rằng mối tương tác giữa cơ thể và vi khuẩn có ảnh hưởng lên bệnh phản ứng đặc dị. Trẻ sinh ra có hoạt động tế bào lympho Th2 vượt trội, làm cho chúng có phản ứng mạnh đối với các dị nguyên và tăng sản xuất IgE. Ở một khía cạnh khác, việc phơi nhiễm với vi khuẩn đường ruột kích thích hoạt động của Th1 và kết quả là vi khuẩn đường ruột (sẵn có trong ruột hoặc bổ sung) có thể cân bằng miễn dịch từ trạng thái vượt trội của Th2 sang đáp ứng cân bằng Th1/Th2 và giảm cơ hội cho các phản ứng dị ứng mạnh. Cuối cùng thì các tế bào TReg giải phóng cytokine như TGF- β giúp ức chế phản ứng của Th1 hoặc Th2 và cũng đóng vai trò quan trọng trong việc

cân bằng đáp ứng của cơ thể đối với vi khuẩn hoặc kháng nguyên trong thực phẩm và hoạt động của tế bào này cũng tăng theo số lượng vi khuẩn trong ruột. Mỗi tương tác giữa vi khuẩn và đường ruột và tác động của chúng lên các đáp ứng miễn dịch là cơ sở cho việc sử dụng probiotic trong Nhi khoa.

1.2. PROBIOTIC, PREBIOTIC VÀ CÁC NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN

1.2.1. Probiotic

Theo Tổ chức Y tế thế giới thì Probiotic được định nghĩa là các vi khuẩn có lợi cho sức khỏe của con người khi ăn (bổ sung) vào một lượng nhất định [70]. *LAB* và *bifidobacteria* là các loại vi khuẩn phổ biến được sử dụng như “probiotic”. Probiotic được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm sữa như sữa chua, đậu tương lên men và các sản phẩm bổ sung. Bắt đầu từ thế kỷ 20 người ta mới cho rằng probiotic có lợi cho cơ thể trong việc cải thiện sự cân bằng vi khuẩn đường ruột, ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây hại và các vi khuẩn sản sinh độc tố.

Một số đặc tính của probiotic [70]:

- Là một vi khuẩn có nguồn gốc từ người và không gây bệnh
- Vẫn sống và ổn định sau khi cấy, xử lý và đề kháng các kỹ thuật xử lý
- Đề kháng dưới tác động của dịch dạ dày, mật và dịch tụy
- Có khả năng bám vào tế bào niêm mạc ruột, có khả năng sinh sản và tạo nên các hiệu ứng lâm sàng hoặc chức năng có lợi cho cơ thể người sử dụng

1.2.1.1. Đặc điểm của vi khuẩn *Bifidobacterium*

Bifidobacteria tồn tại ở trẻ ngay từ những ngày đầu sau sinh, đặc biệt là trẻ được bú mẹ. *Bifidobacteria* lần đầu tiên được phân lập từ phân của trẻ được bú mẹ, số lượng các vi khuẩn này là tương đối ổn định và giảm đi khi lớn tuổi. Quần thể vi khuẩn *bifidobacteria* chịu ảnh hưởng của các yếu tố như khẩu phần ăn, thuốc kháng sinh và sự căng thẳng. *Bifidobacteria* là vi khuẩn kỵ khí gram (-), không chuyển động, không tạo bào tử catalase-âm tính, hình dạng của chúng khác nhau. Tên gọi của vi khuẩn này xuất phát từ việc chúng thường tồn tại ở dạng hình chữ

Y hay dạng chẻ đôi. Thành phần guanine và cytosine của DNA là trong khoảng 54 mol% và 67 mol%. Chúng tạo ra acid acetic và acid lactic mà không tạo ra CO₂. Chúng cũng được phân loại là vi khuẩn tạo acid lactic (*LAB*). Hiện nay có khoảng 30 loài *bifidobacteria* được phân lập. *Bifidobacteria* được sử dụng như probiotic là: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium lactis*. Các chủng của *Bifidobacteria* được dùng như probiotic là *Bifidobacterium breve strain Yakult*, *Bifidobacterium breve RO70*, *Bifidobacterium lactis BB12*, *Bifidobacterium longum RO23*, *Bifidobacterium bifidum RO71*, *Bifidobacterium infantis RO33*, *Bifidobacterium longum BB536* and *Bifidobacterium longum SBT-2928*.

1.2.1.2. Đặc điểm của vi khuẩn *Lactobacillus*

Lactobacilli có mặt trong ruột và trong âm đạo là vi khuẩn kị khí gram (+), không tạo bào tử. Thành phần guanine và cytosine của DNA là trong khoảng 32 mol% và 51 mol%. Chúng cũng được phân loại như là vi khuẩn tạo acid lactic (*LAB*). Hiện nay có khoảng 56 loài *Lactobacillus* được phân lập. *Lactobacilli* được sử dụng như probiotic bao gồm *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus GG* (*Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus casei subspecies rhamnosus*), *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus salivarius*. *Lactobacillus plantarum 299v strain* có nguồn gốc từ bột chua. *Lactobacillus plantarum* có nguồn gốc từ người. Các chủng khác của *Lactobacillus* là *Lactobacillus acidophilus BG2FO4*, *Lactobacillus acidophilus INT-9*, *Lactobacillus plantarum ST31*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii LA1*, *Lactobacillus acidophilus NCFB 1748*,

Lactobacillus casei Shirota, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus acidophilus* DDS-1, *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* type 2038, *Lactobacillus acidophilus* SBT-2062, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius* UCC 118 và *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* F19.

1.2.2. Prebiotic

1.2.2.1. Khái niệm

Prebiotic là thành phần thực phẩm không tiêu hóa được, có ảnh hưởng tích cực tới cơ thể vật chủ bằng cách kích thích có chọn lọc lên sự phát triển và tăng cường hoạt động của một số loài vi sinh vật có lợi trong ruột và nâng cao sức khỏe của cơ thể (vật chủ) [78]. Oligosaccharides trong sữa mẹ được xem như là prebiotic vì nó hỗ trợ sự phát triển của vi khuẩn *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* trong ruột già của những trẻ bú mẹ hoàn toàn [81]. Các prebiotic thường được sử dụng là FOS, GOS và Inulin. Người ta thường kết hợp probiotic với prebiotic (được gọi là synbiotic) để tăng tác dụng có ích của probiotic đối với cơ thể.

Fructo- oligosaccharid (FOS) có các phân tử đường trong cấu trúc nên chúng có vị ngọt. FOS có khả năng chống chịu và không bị tiêu hóa trong dạ dày do đó có khả năng kích thích sự phát triển của chủng *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* ở ruột già. FOS làm tăng hấp thụ Calci và Magie đồng thời làm giảm triglycerid. GOS (Galacto- oligosaccharit) là một prebiotic được sử dụng rộng rãi vì có khả năng kích thích hoạt động của các vi khuẩn có lợi trong hệ tiêu hóa, kích thích việc sản xuất các acid béo mạch ngắn, làm tăng khả năng hấp thu Calci và Magie.

1.2.2.2. Chức năng của prebiotic

Chức năng chủ yếu của prebiotic là kích thích sự phát triển của vi khuẩn có lợi, khả năng chống ung thư, tăng khả năng hấp thu Calci, Magie, kích thích sự phát triển của *Bifidobacteria* và *Lactobacilli*, các loài vi khuẩn này kích thích sự gia tăng các kháng thể IgA, IgM, IgG [130], đồng thời cũng tạo ra chất kháng khuẩn

như acid lactic, bacterioxin, H_2O_2 và có khả năng giảm triglycerid, cholesterol, tác dụng tích cực đối với lượng glucose trong máu [94]. Các oligosaccharid có thể kéo dài thời gian tiêu hóa trong dạ dày và rút ngắn thời gian trung chuyển qua ruột già nhờ các acid béo mạch ngắn [106]. Các prebiotic có thể mô phỏng các thụ thể ở ruột và do vậy các vi khuẩn gây hại sẽ liên kết với prebiotic thay vì niêm mạc ruột. Điều này giải thích tại sao trẻ bú mẹ ít bị tiêu chảy hơn so với trẻ bú sữa công thức.

Một vài nghiên cứu đã chứng minh tác dụng có lợi của GOS và FOS lên các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa với việc sử dụng hỗn hợp GOS/FOS với tỷ lệ 90% và 10% kết hợp với probiotic [132].

Liều prebiotic 5g/ngày (trong một số trường hợp lên đến 8g/ngày) được sử dụng và có ảnh hưởng lên vi khuẩn chí đường ruột. Tác dụng phụ của prebiotic có thể gây ra do tăng vi khuẩn tạo khí gas, nhưng các loài *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* không sinh gas trong quá trình chuyển hóa và do vậy người ta cho rằng thậm chí đến 20g/ ngày cũng không gây chướng bụng. Nếu tiêu thụ một lượng lớn (>20g) inulin mỗi ngày có thể ảnh hưởng đến cân bằng nước và gây ra nhuận tràng. Những người tham gia thử nghiệm sử dụng prebiotic đi vệ sinh thường xuyên hơn và phân nhiều hơn.

1.2.3. Tác động của probiotic trên hệ vi khuẩn chí đường ruột

Bifidobacteria và *Lactobacilli* được đưa vào cơ thể qua đường ăn uống có thể sống tạm thời trong ruột của trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Một số nghiên cứu cho thấy có sự tăng lên rõ rệt số lượng *Bifidobacteria* ở trong phân một tuần sau khi được bổ sung. Trong một số trường hợp thì số lượng này đạt mức như ở trẻ được bú mẹ [98], [102]. Việc bổ sung *Bifidobacteria* đối với trẻ đẻ non đã thay đổi tích cực thành phần vi khuẩn chí đường ruột của trẻ [114], tăng acid béo mạch ngắn, giảm độ pH của phân, giảm amoniac và idol trong phân, giảm *Bacteroides* và *E.Coli* [98]. Mỗi probiotic cụ thể sẽ làm thay đổi tỷ lệ vi khuẩn có lợi và không

có lợi ở trẻ và dẫn đến những thay đổi tích cực ở môi trường màng nhày của ruột.

1.2.4. Vai trò của probiotic với chức năng rào cản và miễn dịch

Có nhiều nghiên cứu cho thấy tác động của việc bổ sung một số probiotic lên chức năng rào cản và miễn dịch của cơ thể. Các nghiên cứu trên người và động vật cho thấy việc bổ sung *L. Casei*, *L. Bulgaricus* và *L. Acidophilus* kích thích tăng sản đại thực bào và tăng thực bào, sCD14 cao hơn một cách có ý nghĩa ở những trẻ được bổ sung probiotic so với trẻ nhóm chứng và giảm sự thâm thấu của ruột khi bổ sung *Lactobacilli* [85] và ở những trẻ đẻ non được bổ sung *Bifidobacteria*. Ở người trưởng thành khi sử dụng *L. Acidophilus* La1 và *Bifidobacteria* làm tăng IgA đặc hiệu và tổng thể đối với *Salmonella* sau khi cho uống *S. typhi*. Các probiotic này cũng như *B. Lactics* làm tăng hoạt động thực bào chống lại *E. Coli*, tăng khả năng tiêu diệt tế bào [50]. Ngoài ra trong nhi khoa một số chủng *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* có tác động lên miễn dịch dịch thể, đặc biệt là tăng bài tiết IgA và các immunoglobulin khác. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy các tế bào sản sinh IgA, IgM, IgG cũng như IgA trong phân cũng tăng lên [124]. Tương tự như vậy việc tăng IgA đặc hiệu đối với *Rotavirus* sau khi bị nhiễm trùng, hoặc các IgA chống bại liệt sau khi được tiêm chủng cũng được chứng minh [74]. Các kết quả nghiên cứu đây cũng cho thấy các IgA trên cũng tăng lên sau khi trẻ được bổ sung *B. Lactics* [113]. Thêm vào đó một vài probiotic có tác dụng tốt lên việc bài tiết cytokin [74], giảm anti-trypsin trong phân, eosinophil protein X trong nước tiểu, TNF- α [92] làm thay đổi TGF- β và Cytokin khác làm giảm các chất xúc tác gây viêm đặc biệt là ở những trẻ có đáp ứng miễn dịch mạnh như trong phản ứng đặc dị (atopy).

Như vậy có nhiều bằng chứng cho thấy tác động của việc sử dụng probiotic lên chức năng rào cản và đáp ứng miễn dịch của cơ thể bao gồm miễn dịch không đặc hiệu (miễn dịch tự nhiên) và miễn dịch đặc hiệu (miễn dịch thu được). Miễn dịch đặc hiệu tốt cần thiết cho việc bảo vệ cơ thể, giảm cơ hội cho các phản ứng

quá mẫn hay viêm.

Một số nghiên cứu đã chứng minh tác dụng của việc sử dụng probiotic lên hệ miễn dịch:

- Tác dụng lên miễn dịch không đặc hiệu :

- ❖ Tăng sản xuất mucin
- ❖ Cạnh tranh và ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh
- ❖ Giảm tính thấm thấu của ruột
- ❖ Tăng hoạt động tiêu diệt tế bào tự nhiên, đại thực bào, thực bào

- Tác dụng lên miễn dịch đặc hiệu :

- ❖ Tăng các tế bào sản sinh IgA, IgG, IgM
- ❖ Tăng IgA tổng thể và đặc hiệu trong huyết thanh và thành ruột
- ❖ Thay đổi các đáp ứng viêm

1.2.5. Tổng hợp nghiên cứu lâm sàng về probiotic ở trẻ nhỏ

1.2.5.1. Probiotic trong điều trị tiêu chảy cấp

Có nhiều nghiên cứu liên quan đến việc sử dụng probiotic trong điều trị tiêu chảy. Phần lớn các nghiên cứu sử dụng các loài *Lactobacilli*, *L.Rhamnosus* (GG). Phân tích tổng hợp của 4 nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng *L.Rhamnosus* (GG) có hiệu quả khi bổ sung sớm trong điều trị tiêu chảy do *rotavirus* và tác dụng chính là làm giảm thời gian kéo dài của tiêu chảy từ 1/2 đến 1,5 ngày [152]. Một số nghiên cứu với các ý nghĩa thống kê khác nhau đã chỉ ra rằng việc sử dụng *Bifidobacteria*, chủ yếu là *B.Lactis* [53], *Lactobacilli*, chủ yếu là *L.Rhamnosus* (GG) [151] làm giảm tần suất mắc mới và mức độ nặng của tiêu chảy cấp. Tuy nhiên sự khác biệt không phải lúc nào cũng có ý nghĩa thống kê [110]. Thêm vào đó việc sử dụng *L.Rhamnosus* (GG) và *L.Reuteri* [127] trong điều trị và sử dụng *B.Lactis* [131] trong dự phòng cho thấy có việc giảm *Rotavirus*. Phân tích 34 nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng gần đây nhằm đánh giá hiệu lực của probiotic trong phòng ngừa tiêu chảy cấp. Probiotic làm giảm một cách có ý nghĩa nguy cơ

mắc tiêu chảy khoảng 57% (IC: 35-71%) ở trẻ em. Tác dụng bảo vệ thay đổi tùy theo việc sử dụng các loài probiotic bao gồm *B.Lactis*, *L.Rhamnosus* (GG), *L.Acidophillus*, *S.Boulevardii* và các probiotic khác khi sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp các probiotic khác nhau. Thời gian nằm viện và nhập viện giảm. Các nghiên cứu đều cho thấy tác động của probiotic lên triệu chứng và lên quá trình tiến triển bệnh. Các quan sát này là luận cứ cho việc tìm ra phương thức sử dụng probiotic lâu dài và cho việc phòng bệnh nhất là ở trẻ nhỏ.

Kết luận của một nghiên cứu can thiệp ngẫu nhiên, mù kép trên trẻ 5-29 tháng tuổi cho thấy sữa lên men bởi *CRL-431* và *Lactobacillus acidophilus* có thể được sử dụng trong phòng ngừa và điều trị bệnh tiêu chảy ở trẻ. Liều sử dụng hằng ngày là $0,15-1,10^9$ CFU. Một nghiên cứu khác can thiệp, ngẫu nhiên, mù kép trên trẻ từ 6 - 24 tháng tuổi được bổ sung *CRL 431* hoặc *CRL 730* và *S.boulevardii* vào sữa bò cho thấy cả 2 loại probiotic làm giảm một cách có ý nghĩa số lần đại tiện, thời gian kéo dài của tiêu chảy, giảm số lần nôn của trẻ.

1.2.5.2. Probiotic trong điều trị tiêu chảy liên quan đến kháng sinh

Nhiều probiotic có giá trị trong việc giảm thiểu nguy cơ tiêu chảy liên quan đến kháng sinh ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ [58], [100]. Đánh giá hiệu quả phòng ngừa tiêu chảy liên quan đến kháng sinh từ 6 nghiên cứu với số lượng trẻ tham gia 766 trẻ cho thấy nguy cơ tiêu chảy giảm từ 28,5% đến 11,9% [50]. *B.lactis* và *S.Thermophilus* cho vào sữa công thức và *L.Rhamnosus* (GG) dưới dạng bổ sung có tác dụng tốt nhất. Chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá tác động của probiotic lên tiêu chảy do *C.Difficile* ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

1.2.5.3. Probiotic trong phòng ngừa và điều trị nhiễm khuẩn hô hấp cấp

Nghiên cứu của Weizman 2005 cho thấy, nhóm trẻ nhóm đối chứng có số đợt bị sốt cao hơn so với nhóm trẻ được bổ sung *B. lactis* hoặc *L.reuteri* và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (tương ứng là 0,41 [0,28–0,54] so với 0,27 [0,17– 0,37] và 0,11 [0,04–0,18]) [163].

Trong một nghiên cứu khác trên trẻ từ 1-3 tuổi, được chia thành hai nhóm: nhóm chứng (n= 312) được uống sữa công thức và nhóm can thiệp (n= 312) uống sữa công thức có bổ sung 2,4 g/ngày prebiotic oligosaccharide và $1,9 \times 10^7$ CFU/ngày *Bifidobacterium lactis HN019* trong vòng một năm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sữa bổ sung prebiotic và probiotic làm giảm tỷ lệ mắc mới của viêm phổi khoảng 24% (95% CI: 0 - 42%; p=0,05) và nhiễm khuẩn hô hấp cấp thể dưới nặng giảm khoảng 35% (95% CI: 0- 58%; p=0,05). So với nhóm chứng thì trẻ ở nhóm can thiệp giảm khoảng 5% (95% CI: 0 - 10%; p=0,05) số ngày bị sốt cao [138]. Kết quả nghiên cứu bổ sung 0,8g GOS/ngày cùng với $8-9 \times 10^9$ CFU/ngày của hỗn hợp probiotic *L.rhamnosus GG*, *L. LC705*, *B. breve Bb99*, *propionibacterium freudenreichii* và *spp shermanii*, trong vòng 6 tháng cho trẻ có nguy cơ bị dị ứng cho thấy, số lượng nhiễm khuẩn đường hô hấp giảm đi [137]. Một nghiên cứu khác đã được tiến hành gần đây, với việc bổ sung probiotic đơn lẻ với 1×10^9 CFU *BB12*/ngày cho thấy các triệu chứng nhiễm khuẩn hô hấp có giảm đi ở trẻ nhỏ [153].

Trong khi đó, một nghiên cứu khác lại cho thấy khi bổ sung *L. rhamnosus* 1×10^9 CFU/ngày cho trẻ từ 6 đến 24 tháng, có nguy cơ bị dị ứng và hen, thì không có ảnh hưởng lên thời gian kéo dài và số đợt của triệu chứng thở khò khè [126]. Nghiên cứu của Vliergy và cộng sự với việc bổ sung synbiotic chủng loại như trong nghiên cứu của chúng tôi tuy liều có thấp hơn cho thấy việc bổ sung synbiotic không có tác dụng lên nhiễm khuẩn hô hấp trong 6 tháng can thiệp (số đợt nhiễm khuẩn/tháng là 1,1 lần ở nhóm can thiệp so với 1,0 lần ở nhóm chứng với p> 0,05) [158]. Tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu ảnh hưởng của probiotic lên nhiễm khuẩn đường hô hấp cấp.

1.2.5.4. Probiotic đối với tăng trưởng của trẻ

Một nghiên cứu trên trẻ 18-36 tháng tuổi và trẻ từ 24-26 tháng tuổi cho thấy mức tăng cân nặng và chiều dài nằm của trẻ được uống sữa có chứa probiotic và

prebiotic đều cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm đối chứng [12], [13]. Kết quả của một số nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự [52], [162]. Trong một nghiên cứu ngẫu nhiên mù kép về tính an toàn và khả năng dung nạp của việc bổ sung hỗn hợp *B. lactis* BB 12 và *S. thermophilus* với hàm lượng khác nhau (1×10^6 và 1×10^7 CFU / ngày) trên 118 trẻ từ 3 đến 24 tháng tuổi với thời gian can thiệp trung bình là 210 ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy tăng trưởng của trẻ không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu [133].

Một nghiên cứu khác được tiến hành ở trẻ 14 ngày tuổi không được bú mẹ, với việc cho trẻ uống sữa công thức có chứa 2×10^7 CFU *Bifidobacterium longum* BL999 và 4g/L hỗn hợp chứa 90% galacto-oligosaccharides và 10% fructo-oligosaccharides trong vòng 112 ngày lại cho thấy kết quả là không có sự khác biệt về mức tăng cân giữa nhóm can thiệp và nhóm đối chứng với mức tăng trung bình khoảng 1,01 kg [122].

Một nghiên cứu khác trên trẻ 18-36 tháng tuổi với việc bổ sung probiotic và prebiotic cũng cho kết quả là sau 3 tháng can thiệp, mức tăng chiều cao ở nhóm can thiệp là cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng (4,93 cm so với 3,89 cm) [15]. Tuy nhiên kết quả của một số nghiên cứu của các tác giả khác lại cho thấy không có sự khác biệt về mức tăng chiều dài nằm/chiều cao ở nhóm có bổ sung prebiotic và probiotic so với nhóm đối chứng [122].

Các nghiên cứu được tiến hành tại một số nước khác trên thế giới, lại đưa ra kết quả khác. Một nghiên cứu được tiến hành tại Hà Lan, trên 126 trẻ sơ sinh với việc bổ sung prebiotic và probiotic, 0,24g prebiotic galacto-oligosaccharides/100 ml sữa và 1×10^7 CFU *B.animalis* ssp. *lactis*/g (còn gọi là *Bifidobacterium* BB12) và 1×10^7 CFU *L. paracasei* ssp. *paracasei*/g (còn gọi là *L. casei* CRL-431), trong vòng 6 tháng cho thấy chỉ số WAZ và HAZ không có sự khác biệt giữa nhóm nghiên cứu so với nhóm chứng (0,1 so với 0,17), (0,51 so với 0,50). Sau 6 tháng can thiệp, mức tăng cân nặng và chiều cao ở nhóm can thiệp là 4152 g và

17,7 cm so với 4282 g và 17,3 cm ở trẻ của nhóm chứng và sự khác nhau giữa các nhóm là không có ý nghĩa thống kê [158].

Một nghiên cứu khác tại Italia, được tiến hành trên 138 trẻ sơ sinh không được bú mẹ với việc cho trẻ uống sữa có chứa 2×10^7 CFU *Bifidobacterium longum* BL999 và 4g/L hỗn hợp chứa 90% GOS và 10% FOS trong vòng 112 ngày cũng cho thấy không có sự khác biệt về mức tăng chiều cao và cân nặng giữa nhóm can thiệp và nhóm chứng và mức tăng cân trung bình là khoảng 1,01kg. Mức tăng chiều cao/tháng ở trẻ trai của nhóm chứng và nhóm can thiệp là 3,51cm và 3,51 cm, còn đối với trẻ gái là 3,22 cm và 3,22 cm [122].

Một nghiên cứu khác trên 105 trẻ sơ sinh dưới 2 tháng tuổi thì lại cho kết quả trái chiều, trong nghiên cứu này trẻ của nhóm can thiệp (51 trẻ) được bổ sung sữa công thức chứa *Lactobacillus rhamnosus* GG và trẻ nhóm chứng được bổ sung sữa công thức cho đến khi trẻ được 6 tháng tuổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm trẻ can thiệp có sự tăng trưởng tốt hơn so với nhóm chứng, sự thay đổi cân nặng và chiều cao của nhóm can thiệp cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng ($0,44 \pm 0,37$ so với $0,07 \pm 0,06$, $P < 0,01$ và $0,44 \pm 0,19$ so với $0,07 \pm 0,06$, $P < 0,005$) [157]. Kết quả phân tích tổng hợp của 3 nghiên cứu [67], [115], [170], sử dụng sữa công thức cho trẻ đủ tháng, cũng chỉ ra rằng trẻ được uống bổ sung sữa có chứa prebiotic có mức tăng cân nặng cao hơn một cách có ý nghĩa [119].

Qua kết quả nghiên cứu của các tác giả có thể thấy rằng tác động của prebiotic và probiotic lên tăng trưởng cân nặng và chiều cao của trẻ còn chưa thống nhất.

1.2.5.5. Probiotic trong điều trị dị ứng

Một số nghiên cứu cho thấy số lượng *Bifidobacteria* ở trẻ bị dị ứng đặc hiệu là ít hơn trẻ không bị dị ứng đặc hiệu. Có giả thuyết cho rằng *Bifidobacteria* có hiệu quả hơn trong việc làm tăng dung nạp đối với các kháng nguyên không có nguồn gốc vi khuẩn bằng cách ức chế sự phát triển của Th2 (proallergic).

Ở những trẻ bị viêm da dị ứng được uống sữa công thức thủy phân có bổ sung

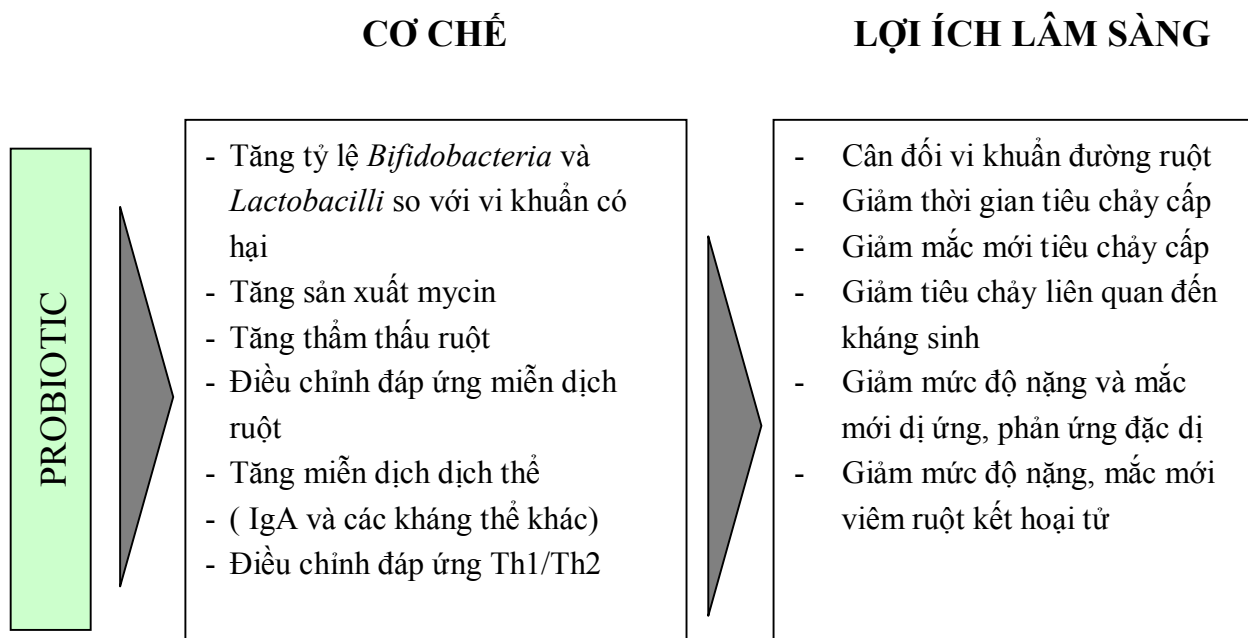
L.Rhamnosus (GG) thì việc cải thiện lâm sàng tốt hơn so với sữa thủy phân bình thường, người ta cho rằng do probiotic làm giảm tính thấm thấu của ruột [95]. Trẻ bị dị ứng đặc dị được điều trị tích cực bằng sữa thủy phân được bổ sung *L.Rhamnosus (GG)* hoặc *B.Lactis* có sự cải thiện tốt hơn mức độ nặng của các biểu hiện ngoài da so với trẻ uống sữa bình thường. Đối với nhóm bổ sung thì CD4 huyết thanh giảm và TGF- α 1 thì tăng lên [95].

Một số nghiên cứu cho rằng việc bổ sung thường xuyên có thể ổn định chức năng rào cản của đường ruột và đóng vai trò trong việc điều chỉnh các đáp ứng miễn dịch làm giảm mức độ nặng của các triệu chứng của dị ứng đặc dị, đặc biệt là viêm da dị ứng liên quan đến protein sữa bò [95]. Một nghiên cứu gần đây cũng cho thấy có sự thay đổi thành phần vi khuẩn trong phân của trẻ bị dị ứng đặc hiệu (lượng *Bacteroides* và *E.Coli* trong phân giảm). Điều thú vị là IgE huyết thanh có mối liên quan đến số lượng *E.Coli* và đối với trẻ mẫn cảm thì IgE lại có mối liên quan đến số lượng *Bacteroides*. Do vậy mỗi loại probiotic dường như tác động lên các đáp ứng gây viêm do dị nguyên và tạo nên tác dụng rào cản chống lại các kháng nguyên gây ra triệu chứng dị ứng hệ thống như chàm bội nhiễm [98].

1.2.5.6. Probiotic trong điều trị viêm ruột hoại tử (NEC)

Vi khuẩn chí đường ruột giúp cho việc giữ gìn sự toàn vẹn của hệ miễn dịch, phòng các bệnh lây nhiễm, sản xuất vitamin và giúp cho sự phát triển của màng nhày [108]. Một nghiên cứu trên 12.000 trẻ được bổ sung *L.Acidophilus* và *B.Infantis* về tỷ lệ mắc mới của viêm ruột kết hoại tử cho thấy việc giảm một cách có ý nghĩa tỷ lệ mắc mới và tỷ lệ chết do viêm ruột kết hoại tử ở nhóm probiotic so với nhóm chứng [159].

Như vậy có bằng chứng lâm sàng rõ ràng cho việc áp dụng các hiệu quả của probiotic lên các vi khuẩn chí đường ruột đặc biệt là ở trẻ nhỏ. Các lợi ích lâm sàng cụ thể tùy thuộc vào từng probiotic.



Hình 1. Cơ chế và lợi ích lâm sàng của probiotic

1.2.6. Tính an toàn, liều lượng probiotic sử dụng

Phần lớn *Lactobacilli* dùng trong thực phẩm là không gây bệnh, không gây hại và không độc [159]. Nhiều chủng *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* được dùng nhiều trong thực phẩm truyền thống và được thừa nhận là an toàn. Cho đến nay có hơn 70 nghiên cứu lâm sàng với sự tham gia của hơn 4000 trẻ thì chưa có báo cáo nào cho thấy có tác hại lên trẻ liên quan đến probiotic. Trong báo cáo của FAO/WHO đánh giá probiotic trong thực phẩm đã công bố “mối liên quan giữa bệnh dịch của con người và việc sử dụng probiotic được ghi nhận là ít và tất cả các trường hợp này chỉ xuất hiện ở những bệnh nhân nặng” [71]. Nhiễm trùng máu do *Lactobacilli* từ môi trường ngoài, từ thức ăn hoặc từ phân là rất hiếm gặp. Các ca nhiễm trùng *L.Rhamnosus* có liên quan đến probiotic ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch là không phổ biến [103]. Cơ chế và con đường lây nhiễm bệnh là chưa rõ. Trẻ sơ sinh có thể mắc bệnh từ nhiều vi khuẩn có mặt trong cơ thể. Tuy nhiên sự thật là *Bifidobacteria* có nhiều ở trẻ (đặc biệt là ở trẻ bú mẹ), nhưng cơ chế sinh bệnh thì chưa được ghi nhận. *Bifidobacteria* có mặt trong nhiều thực phẩm như sữa chua, bao gồm sữa chua dành cho trẻ đã ăn dặm. Đối nghịch lại, thỉnh thoảng

còn có các báo cáo về việc nhiễm trùng máu do *Lactobacilli*, nhưng việc nhiễm trùng máu do *Bifidobacteria* trong sản phẩm thương mại dù có hay không có *Bifidobacteria*. *Bifidobacteria* được sử dụng trong sữa công thức hơn 15 năm nhưng chưa có trường hợp nào bị bệnh hoặc các tác dụng có hại.

Đặc biệt, các nghiên cứu cũng cho thấy tính an toàn và phát triển tốt khi sử dụng *B.Lactis* cho trẻ từ khi mới sinh [163], cho các nhóm có nguy cơ cao như trẻ đẻ non [114], trẻ bị suy dinh dưỡng, trẻ của bà mẹ bị HIV [56].

Đối với tính an toàn thì dựa trên các thông tin sẵn có hiện nay thì *Bifidobacteria*, đặc biệt là *B.Lactis* là có độ an toàn tốt và là probiotic tốt được sử dụng cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. *Lactobacilli*, đặc biệt là *L.Rhamnosus* nhìn chung là an toàn, là probiotic phù hợp cho trẻ ở độ tuổi lớn hơn. Trong khi chưa có số liệu về từng probiotic cụ thể thì việc sử dụng probiotic nói chung không nên khuyến cáo cho các quần thể có miễn dịch yếu. Mặc dù liều lượng chưa được nghiên cứu và chúng khác nhau ở nhiều nghiên cứu. Chưa có nghiên cứu nào công bố hiệu lực với việc sử dụng $< 10^7 - 10^{10}$ CFU cho một lần dùng hoặc cho 1 liều. Liều hằng ngày dao động từ $10^8 - 10^{10}$ CFU/ngày. Phần lớn các sản phẩm có chứa vi khuẩn sống được nghiên cứu chứa từ $10^7 - 10^{10}$ CFU cho mỗi lần dùng, đã kiểm soát tốt khả năng sống của vi khuẩn trong thời hạn sử dụng của sản phẩm. Số lượng vi khuẩn ở đầu xa của ruột dao động đến 10^{12} CFU/ ml dịch ruột.

Vấn đề cuối cùng là cách cung cấp probiotic. Nếu probiotic được sử dụng để điều trị thì nó phải được cung cấp theo ‘liều’ dưới dạng viên nang hoặc viên nhộng. Tuy nhiên, khi sử dụng probiotic trong nhi khoa với mục tiêu phòng ngừa dị ứng, tiêu chảy liên quan đến kháng sinh, tiêu chảy cấp do virus, cần bổ sung dài hạn thì các probiotic nên đưa vào thức ăn như sữa chua, nước giải khát, thức ăn bổ sung, sữa công thức sẽ giảm được chi phí so với ‘bổ sung’ hằng ngày.

Ở Bắc Mỹ, một số probiotic được sử dụng như ‘chất bổ sung’ vào nước giải khát hoặc sữa công thức và công bố rõ như *L.Rhamnosus (GG)*, *L.Casei*, *L.Reuteri*.

Các loại nước giải khát và sữa công thức có chứa probiotic được sử dụng rộng rãi trên khắp thế giới, nhưng chỉ có *B.Lactis* là được kiểm định và đánh giá bởi FDA cho phép sử dụng trong sữa công thức thương mại cho trẻ sau sinh.

1.2.7. Hướng dẫn đánh giá probiotic được sử dụng trong thực phẩm (WHO)

Theo FAO/WHO để đánh giá thực phẩm có tác dụng probiotic thì phải tuân thủ các hướng dẫn sau [68]:

1. *Xác định Chủng/loài/giống của probiotic*: Việc xác định chủng, loài, giống được thực hiện bằng các xét nghiệm kiểu hình và kiểu gen.
2. *Sàng lọc các probiotic tiềm năng In vitro*. Cần thiết để đánh giá tính an toàn của probiotic và để tìm hiểu về probiotic và cơ chế tác dụng. Các test thường được sử dụng là khả năng đề kháng đối với acid dạ dày, acid mật, khả năng bám vào các tế bào niêm mạc ruột, hoạt động chống lại vi khuẩn gây bệnh tiềm năng, giảm khả năng bám dính lên bề mặt của vi khuẩn gây bệnh, hoạt động thủy phân muối mật, đề kháng với tinh trùng (probiotic sử dụng ở âm đạo)
3. *Tính an toàn*: Phải có bằng chứng về tính an toàn và không gây ô nhiễm thực phẩm của probiotic
4. *Được nghiên cứu trên động vật và trên người*. Nghiên cứu đánh giá hiệu lực, hiệu quả trên người.
5. *Nhãn mác trên thực phẩm*: bao gồm chủng/loài/giống, số lượng vi khuẩn sống cuối thời hạn sử dụng, tác dụng, điều kiện bảo quản, địa chỉ liên lạc khi cần.

1.3. BỆNH TIÊU CHẢY

1.3.1. Dịch tễ học của bệnh tiêu chảy:

Mỗi năm, ước tính 2,5 triệu trường hợp tiêu chảy xảy ra ở trẻ em dưới năm tuổi, tỷ lệ mắc bệnh vẫn duy trì tương đối ổn định trong vòng hai thập kỉ qua. Trong đó, tình hình mắc bệnh trầm trọng nhất là ở châu Phi và Nam Á, nơi chiếm hơn nửa số người bị mắc trên toàn thế giới, cũng là nơi có tỷ lệ tử vong do tiêu chảy cao nhất, đặc biệt là ở trẻ em. Trẻ em dưới 2 tuổi có tỷ lệ mắc cao nhất, đây cũng

là thời kì trẻ được nuôi dưỡng bằng thức ăn bổ sung cùng với sữa mẹ. Tỷ lệ này được giảm dần cùng với sự lớn lên của trẻ. Tỷ lệ tử vong do tiêu chảy đã giảm trong hai thập kỷ qua, từ 5 triệu ca tử vong ở trẻ em dưới 5 tuổi ở đầu thập niên trước xuống còn 1,87 triệu ca vào năm 2003 và 1,5 triệu ca năm 2004, cùng với xu hướng giảm chung của tỷ lệ tử vong ở trẻ em do tất cả các nguyên nhân. Trẻ em dưới 3 tuổi mắc tiêu chảy trung bình 3-4 đợt/năm. Tuy vậy, tiêu chảy vẫn là nguyên nhân đứng thứ hai gây ra tử vong ở trẻ em dưới năm tuổi trên toàn cầu, sau viêm phổi [169].

Tại Việt nam, trẻ em bị tiêu chảy trung bình 2,2 lần/năm và là 22,0% nguyên nhân tử vong của trẻ em dưới 5 tuổi [1]. Theo nghiên cứu của Nguyễn Yên Bình, trong số 5 tác nhân gây tiêu chảy ở trẻ em thì *Rotavirus* chiếm tỷ lệ cao nhất (39,3%), tiếp theo là *E.coli* (21,0%), *Shigella* (6,7%), *Campylobacter* (6,0%) và ít gặp nhất là *Salmonella* (1,0%) [1].

1.3.2. Định nghĩa:

Bệnh tiêu chảy được định nghĩa là đại tiện phân lỏng bất thường (Phân lỏng, phân toé nước, phân có nhày máu, mủi...) từ 3 lần trở lên trong 24 giờ [3]. Phân lỏng là phân không thành khuôn, trừ những trẻ bú mẹ thường đi một ngày vài lần phân nhão. Đối với những trẻ này, xác định tiêu chảy thực tế phải dựa vào tăng số lần hay tăng mức độ lỏng của phân mà các bà mẹ cho là bất thường [3].

1.3.3. Phân loại bệnh tiêu chảy: Có 3 dạng lâm sàng chủ yếu của bệnh tiêu chảy cấp có thể ảnh hưởng đến tính mạng con người và đòi hỏi các phương pháp điều trị khác nhau.

1.3.3.1. Tiêu chảy cấp phân nước (bao gồm cả bệnh tả):

Là đợt tiêu chảy cấp, thời gian không quá 14 ngày, thường khoảng 5-7 ngày, chiếm khoảng 80% tổng số các trường hợp tiêu chảy [3]. Tác nhân chính của bệnh là do *V. cholerae* hoặc vi khuẩn *E. coli*, cũng như *rotavirus*. Tiêu chảy phân lỏng gây mất nước và điện giải, bệnh nhân bị tử vong thường do kiệt sức vì

mất nước và điện giải nặng. Những trẻ em bị suy dinh dưỡng hoặc có miễn dịch bị suy yếu có nhiều nguy cơ bị tử vong do tiêu chảy hơn những trẻ khỏe mạnh.

1.3.3.2. Tiêu chảy cấp phân máu (Hội chứng lỵ):

Đây là bệnh tiêu chảy có chung một hội chứng gọi là hội chứng lỵ, gồm: sốt, đau quặn bụng, mót rặn, phân thường có máu, chất nhày. Đặc biệt phân có rất nhiều bạch cầu, chủ yếu là bạch cầu đa nhân khi soi kính hiển vi. Chiếm khoảng 10-20% tổng số các trường hợp tiêu chảy.

Nguyên nhân chủ yếu là do *Shigella*, *E.Coli* xâm nhập (EIEC), *Campylobacter jejuni* [3]. Trẻ em bị hội chứng lỵ có nguy cơ cao bị nhiễm trùng máu, suy dinh dưỡng và gây mất nước. Lỵ là một nguyên nhân góp phần không nhỏ trong tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong do tiêu chảy. Lỵ đặc biệt nặng ở trẻ em suy dinh dưỡng và chính lỵ cũng gây nhiều hậu quả nguy hiểm đến tình trạng suy dinh dưỡng hơn là tiêu chảy cấp phân toé nước.

1.3.3.3. Tiêu chảy kéo dài:

Tiêu chảy kéo dài được xác định là một đợt tiêu chảy kéo dài tới 14 ngày hoặc lâu hơn, chiếm khoảng 5-10% tổng số các trường hợp tiêu chảy. Có tới 3-23% đợt tiêu chảy cấp trở thành tiêu chảy kéo dài. Tỷ lệ này cao nhất ở trẻ từ 1-2 tuổi. Tiêu chảy kéo dài thường làm cho tình trạng dinh dưỡng kém đi nhanh và có tỷ lệ tử vong cao do nhiễm khuẩn nặng ngoài đường ruột và mất nước.

1.3.3.4. Tiêu chảy thẩm thấu:

Tiêu chảy thẩm thấu xảy ra khi quá nhiều nước được hút vào ruột. Điều này có thể là kết quả của rối loạn tiêu hóa (ví dụ, bệnh tuyến tụy hoặc bệnh Coeliac), trong đó các chất dinh dưỡng được giữ lại trong lòng ruột và hút theo nước. Tiêu chảy thẩm thấu cũng có thể do thuốc nhuận tràng thẩm thấu (tác dụng hút nước vào lòng ruột để làm giảm bớt táo bón). Ở người khỏe mạnh, nếu có quá nhiều magie, vitamin C hoặc lactose không tiêu hóa được cũng có thể gây ra tiêu chảy thẩm thấu và chướng ruột. Ở người không dung nạp lactose thì khó hấp thụ

được lactose sau khi sử dụng nhiều sản phẩm sữa. Ở người bị rối loạn hấp thu fructose việc sử dụng nhiều fructose cũng có thể gây tiêu chảy. Những thực phẩm có chứa nhiều fructose cũng thường có nhiều glucose thì dễ hấp thu hơn và ít gây tiêu chảy. Rượu đường như sorbitol (thường có trong các thực phẩm không đường) là khó hấp thu và khi sử dụng với số lượng lớn có thể dẫn đến tiêu chảy thẩm thấu. Tiêu chảy thẩm thấu sẽ hết khi ngừng sử dụng các thực phẩm gây tiêu chảy như sữa, sorbitol...[1].

Theo báo cáo của WHO, tiêu chảy kéo dài gây khoảng 35% tổng số các trường hợp tử vong và có 15% lượt tiêu chảy kéo dài dẫn tới tử vong. Không có loại vi khuẩn đơn thuần nào được xác định là nguyên nhân gây tiêu chảy kéo dài một cách rõ ràng, mặc dù *Salmonella* và *E.coli* bám dính vào niêm mạc ruột (EAEC) có thể đóng vai trò quan trọng ở trẻ em suy dinh dưỡng nặng hoặc suy giảm miễn dịch. Bất kể do nguyên nhân gì, tiêu chảy kéo dài thường kèm theo sự thay đổi nặng nề của niêm mạc ruột, đặc biệt sự teo dẹt của các nhung mao ruột và sự giảm sản xuất men disaccharidase. Những thay đổi trên làm giảm hấp thu các chất dinh dưỡng và có thể làm cho bệnh tồn tại mãi mãi ngay cả khi nguyên nhân nhiễm trùng bị loại trừ.

1.3.4. Nguyên nhân bệnh tiêu chảy:

1.3.4.1. Nhiễm trùng:

a. Virus

- *Rotavirus* là tác nhân chính gây tiêu chảy nặng và đe dọa tính mạng cho trẻ dưới 2 tuổi. Trẻ lớn và người lớn ít bị tiêu chảy do *Rotavirus*. *Rotavirus* là nguyên nhân gây ra tiêu chảy ở khoảng 40% trẻ em dưới 5 tuổi phải nhập viện trên phạm vi toàn cầu .
- Các virus khác có thể gây tiêu chảy là *Adenovirus*, *Enterovirus*, *Norovirus*

b. Vi khuẩn

- *E. Coli* sinh độc tố ruột là tác nhân chính gây tiêu chảy phân nước ở trẻ em.

- Các vi khuẩn *E. coli*, *Shigella* (gây hội chứng lỵ phân máu)
- *Campylobacter jejuni* và *Salmonella enterocolitica* (gây bệnh ở trẻ nhỏ, tiêu chảy phân nước hoặc phân máu).
- Vi khuẩn tả *V. cholerae* (gây tiêu chảy xuất tiết bằng độc tố tả, mất nước và mất điện giải nặng ở cả trẻ em và người lớn) [3].

c. Kí sinh trùng

- *Entamoeba histolytica* (Amip): xâm nhập vào liên bào đại tràng, hồi tràng và gây bệnh khi ở thể hoạt động.
- *Giardia lamblia*: là đơn bào bám dính lên liên bào ruột non gây tiêu chảy do giảm hấp thu.
- *Cryptosporidium*: gây bệnh ở trẻ nhỏ, trẻ bị suy giảm miễn dịch. Gây tiêu chảy kéo dài ở trẻ SDD hoặc AIDS [3].

1.3.4.2. Các nguyên nhân khác:

Bệnh tiêu chảy cũng có thể lây lan từ người sang người, thường do vệ sinh cá nhân kém. Thức ăn được chế biến hoặc được bảo quản trong điều kiện không hợp vệ sinh là một trong những nguyên nhân chính gây tiêu chảy. Nước có thể làm ô nhiễm thực phẩm trong quá trình nuôi trồng, tưới bón. Cá và hải sản từ nguồn nước ô nhiễm cũng có thể là nguyên nhân gây ra căn bệnh này. Ngoài ra còn có các nguyên nhân khác như sai lầm của chế độ ăn, dị ứng thức ăn, sử dụng kháng sinh...

1.3.5. Các biện pháp phòng chống bệnh tiêu chảy

Để phòng ngừa bệnh tiêu chảy, giảm tỷ lệ tử vong do tiêu chảy ở trẻ em trên toàn thế giới, WHO đã thành lập Chương trình phòng chống bệnh tiêu chảy toàn cầu. Ngoài ra các Trung tâm nghiên cứu bệnh tiêu chảy quốc tế và quốc gia cũng được thành lập. Bộ Y tế Việt Nam đã thành lập “Chương trình phòng chống bệnh tiêu chảy quốc gia”, gồm hệ điều trị và hệ dự phòng.

Phòng chống bệnh tiêu chảy đã giúp làm giảm tỷ lệ mắc bệnh một cách hữu hiệu.

Trong thời gian qua, Bộ Y tế Việt Nam đã đưa ra các biện pháp giúp phòng chống bệnh tiêu chảy như sau: *Khuyến khích nuôi con bằng sữa mẹ, cải thiện nuôi dưỡng bằng thức ăn bổ sung, bổ sung Fe, Zn, Vitamin A và các vi chất khác cho trẻ, sử dụng nước sạch, rửa tay thường quy, sử dụng thực phẩm an toàn, sử dụng hố xí và xử lý phân an toàn, phòng bệnh bằng vắc xin.*

1.4. NHIỄM KHUẨN ĐƯỜNG HÔ HẤP CẤP TÍNH (ARI)

1.4.1. Dịch tễ học của ARI:

ARI là một căn bệnh phổ biến và gây ra tỷ lệ tử vong cao nhất cho trẻ em dưới 5 tuổi ở nhiều quốc gia. Người ta ước tính rằng hằng năm có khoảng 10,8 triệu trẻ em bị tử vong [43], trong đó 1,9 triệu trẻ em chết do nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính, châu Phi và Nam Á chiếm tới 70% [168], trong đó, viêm phổi là bệnh gây tử vong cao nhất ở trẻ em trong các loại bệnh, cao hơn AIDS, sốt rét và sởi cộng lại và có khoảng 1,5 triệu trẻ em dưới 5 tuổi trên thế giới bị tử vong do viêm phổi hằng năm, chiếm khoảng 18% tử vong (bao gồm tử vong trong tháng đầu sau sinh) trẻ em toàn cầu [167].

Nghiên cứu của chương trình ARI ở Việt Nam về tình hình ARI trên cộng đồng đã cho thấy, với một xã trung bình có khoảng 8000 dân, với khoảng 1000 trẻ dưới 5 tuổi, hàng năm có tới 1600-1800 lượt trẻ bị ARI. Trong số này có khoảng 400-450 lượt trẻ em bị viêm phổi cấp cần phải điều trị, với khoảng 40-50 lần viêm phổi nặng [4].

Nghiên cứu của Nguyễn Văn Tập trên 398 trẻ em dưới 6 tuổi ở thành phố Huế cho thấy, trung bình có 89 trẻ em (chiếm tỷ lệ 22,36%) đã bị mắc ARI trong vòng 2 tuần qua [61]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Cồ Việt ở 3 tỉnh Hà Nam, Đà Nẵng, Tây Ninh cũng cho kết quả về tỷ lệ mắc ARI là 22,8% [6]. Nghiên cứu của Nguyễn Tấn Viên cho thấy tỷ lệ mắc ARI cao hơn ở trẻ em: 54,90% ở trẻ 0-12 tháng, 33,28% ở trẻ 13-36 tháng và 11,28% ở trẻ 37-60 tháng [20].

1.4.2. Nguyên nhân gây ARI ở trẻ em

ARI được phân loại thành nhiễm khuẩn đường hô hấp trên (URI) và nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới (LRIs). Đường hô hấp trên bao gồm từ lỗ mũi đến các dây thanh âm trong thanh quản, bao gồm cả các xoang cạnh mũi và tai giữa. Đường hô hấp dưới bao gồm sự tiếp nối của đường dẫn khí từ khí quản và phế quản, phế nang.

Nguyên nhân chính gây ARI ở trẻ em là virus và vi khuẩn. Người ta thấy rằng phần lớn ARI, đặc biệt là nhiễm khuẩn hô hấp trên thường là do virus, do phần lớn virus có ái lực với đường hô hấp, khả năng lây lan của virus dễ dàng, tỷ lệ người lành mang virus cao, khả năng miễn dịch đối với virus yếu và ngắn [4]. Các nghiên cứu trên thế giới đã tìm thấy những loại virus thường gây ARI ở trẻ em được xếp loại theo thứ tự như sau: Virus hợp bào hô hấp (*SRV*), *Influenzae Virus*, *Parainfluenzae Virus*, *Virus sởi*, *Adenovirus*, *Rhinovirus*, *Enterovirus*, *Cornavirus*. Nhưng ở các nước đang phát triển, vi khuẩn lại là nguyên nhân quan trọng gây nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính ở trẻ em. Các loại vi khuẩn thường gặp gây ARI ở trẻ em được xếp theo thứ tự như sau: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clamidia trachomatis* và các vi khuẩn khác.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu nguyên nhân gây ARI cũng cho kết quả tương tự. Hai loại vi khuẩn thường gặp nhất là *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae*, các loại virus thường gặp nhất cũng là Virus hợp bào hô hấp, Virus cúm, Virus cúm A.

1.4.2.1. Nhiễm khuẩn đường hô hấp trên cấp tính (URI):

Là bệnh truyền nhiễm phổ biến nhất, bao gồm viêm mũi (cảm lạnh thông thường), viêm xoang, viêm ống tai ngoài, viêm tai giữa, viêm họng cấp tính... Các biến chứng gây ra bởi viêm tai hay viêm thanh quản thường rất nghiêm trọng như bị điếc và viêm thấp khớp cấp tính. Phần lớn nguyên nhân của URI là virus.

Trong đó, nguyên nhân do *Rhinoviruses* chiếm tới 25- 30%; do các virus hợp bào (RSVs), *parainfluenza*, virus cúm, *metapneumovirus* và *adenovirus* cộng lại chiếm 25- 35%; do *corona virus* chiếm 10%; còn lại là các loại virus khác [62].

1.4.2.2. Nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới cấp tính:

Bệnh LRI cấp tính phổ biến ở trẻ em là viêm phổi, viêm phế quản và cúm. Nguyên nhân phổ biến nhất của LRI là do virus hợp bào hô hấp (*SRV*) và phụ thuộc theo mùa, virus *parainfluenza*, là nguyên nhân đứng thứ hai gây LRI.

1.4.3. Các yếu tố nguy cơ thường gặp gây ARI ở trẻ em

Có rất nhiều yếu tố khác nhau có thể gây bệnh ARI cho trẻ em. Các nguy cơ thường gặp nhất là: *Không đảm bảo nuôi con bằng sữa mẹ, suy dinh dưỡng, thiếu vitamin A, Kẽm và các vi chất dinh dưỡng, trẻ đẻ non hoặc có cân nặng sơ sinh thấp, tiếp xúc với người đang mắc bệnh ARI, các yếu tố nguy cơ khác như ô nhiễm không khí, ô nhiễm không khí nội thất hoặc khí hậu lạnh cũng có liên quan rõ rệt tới bệnh viêm phổi cấp ở trẻ em.*

1.4.4. Các giải pháp phòng chống bệnh ARI ở trẻ em

Các bệnh ARI ở trẻ em do nhiều nguyên nhân gây ra. Vì vậy muốn đề phòng bệnh ARI cho trẻ, cần có các biện pháp toàn diện như sau: *Quản lý tốt quá trình mang thai của bà mẹ, đảm bảo trẻ sinh đủ tháng, cân nặng sơ sinh trên 2500 g,- tổ chức cuộc đẻ an toàn, nuôi con bằng sữa mẹ, phòng thiếu vitamin A và khô mắt cho trẻ, bổ sung Fe, Zn và các vi chất khác, cho trẻ ăn bổ sung hợp lý, nhà cửa, nhà trẻ, trường học cần sạch sẽ, thông thoáng, Cần tập luyện cho trẻ để trẻ có sức đề kháng tốt, trẻ bị bệnh ARI cần đưa trẻ đến cơ sở y tế để được khám bệnh, theo dõi và điều trị kịp thời, cần cách li trẻ khỏi người bị bệnh ARI, để giảm thiểu lây nhiễm cho trẻ [4].*

1.5. CÁC BIỆN PHÁP DINH DƯỠNG TRONG PHÒNG CHỐNG NHIỄM KHUẨN HÔ HẤP VÀ TIÊU CHẢY CẤP Ở TRẺ EM

1.5.1. Nuôi con bằng sữa mẹ

1.5.1.1. Lợi ích của việc nuôi con bằng sữa mẹ

Nuôi con bằng sữa mẹ hiện vẫn là vấn đề đang được quan tâm nhiều nhất trong lĩnh vực dinh dưỡng cho trẻ nhỏ và trẻ sơ sinh. Quỹ nhi đồng Liên hiệp quốc (UNICEF) đã coi nuôi con bằng sữa mẹ là một trong bốn biện pháp bảo vệ sức khoẻ trẻ em, do sữa mẹ là thức ăn tốt nhất cho trẻ [2]. Trong thời gian 4-6 tháng đầu sau sinh, sữa mẹ là nguồn cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của trẻ, có tỷ lệ các chất dinh dưỡng cân đối và dễ hấp thu, đặc biệt là protein và vitamin A [11], [16]. Nuôi con bằng sữa mẹ giúp trẻ chống lại các bệnh nhiễm trùng và làm giảm tử vong của trẻ, đặc biệt là ở các nước đang phát triển, nơi mà điều kiện vệ sinh thực phẩm còn kém [39]. Thêm vào đó, sữa mẹ được xem là yếu tố khởi đầu, phát triển thành phần của vi khuẩn chí đường ruột [109]. Nhiều nghiên cứu cho rằng sữa mẹ có thể là nguồn vi khuẩn có lợi, nguồn vi khuẩn tiềm năng do có nhiều vi khuẩn được tìm thấy trong sữa mẹ như *Staphylococci*, *Micrococci*, *Lactobacili* và *Enterococci* [109]. Sữa mẹ chứa oligo-saccharides làm tăng sự phát triển của các loài vi khuẩn *bifidobacteria*, đây là loài vi khuẩn có mặt sớm nhất trong đường tiêu hoá [164] và sự có mặt của chúng trong đường tiêu hoá là tốt cho sức khoẻ của trẻ. Hệ vi sinh vật của trẻ được nuôi bằng sữa mẹ không những có nhiều vi khuẩn *bifidobacteria* mà còn chứa ít các vi khuẩn gây bệnh có hại so với trẻ bú sữa ngoài [149], điều này một phần nào giải thích tại sao tỷ lệ mắc của bệnh nhiễm khuẩn là thấp ở trẻ được nuôi bằng sữa mẹ. Do vậy, mỗi đứa trẻ khi sinh ra đều có quyền được nuôi bằng sữa mẹ [55] và theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) trẻ cần được bú sớm, bú ngay trong vòng nửa giờ đầu sau sinh.

1.5.1.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến tập quán nuôi con bằng sữa mẹ

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến tập quán nuôi con bằng sữa mẹ như sự phát triển nhanh chóng của xã hội, quá trình công nghiệp hoá, sự sẵn có các sản phẩm thay thế sữa mẹ trên thị trường, quá trình đô thị hoá cùng với công việc của các bà mẹ

ngày càng bận rộn hơn, sự xuất hiện của các bệnh dịch thế kỉ như HIV/AIDS cũng làm thay đổi bức tranh về tình hình nuôi con bằng sữa mẹ, đặc biệt là tại các đô thị. Kiến thức, thái độ của các bà mẹ về giá trị của sữa mẹ cũng đóng một vai trò quan trọng, sự lo ngại việc cho con bú sẽ làm ngực bị xấu đi, cho rằng sữa non là không tốt, chỉ có sữa ổn định là sữa tốt cho sức khoẻ của trẻ, một số còn cho rằng sữa non là bẩn và phải vứt bỏ đi [64], một lí do khác ảnh hưởng đến thời gian nuôi con bằng sữa mẹ là do mẹ thiếu sữa [23], thiếu sữa khiến nhiều bà mẹ phải cai sữa cho con trước 6 tháng tuổi [2], việc thiếu sữa xảy ra phổ biến cho các bà mẹ ở thành phố do căng thẳng trong công việc, do phải đi làm sớm, số lần cho trẻ bú ít đi cũng là nguyên nhân gây thiếu sữa ở các bà mẹ [65].

1.5.1.3. Ảnh hưởng của nuôi con bằng sữa mẹ tới nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp ở trẻ

Nghiên cứu của Victoria ở Brazil cho thấy, những trẻ không được bú mẹ mà phải ăn nhân tạo có tỷ lệ tử vong do tiêu chảy cao gấp 14,2 lần so với trẻ được nuôi bằng sữa mẹ [73]. Nghiên cứu của WHO cho thấy những đứa trẻ bắt đầu ăn bổ sung thêm sữa hộp ngay trong tuần đầu, có nguy cơ bị tiêu chảy cao gấp 3 lần và nguy cơ nhập viện cao gấp 5 lần so với trẻ chỉ bú sữa mẹ, đối với trẻ cai sữa trong tuần đầu sau đẻ có nguy cơ bị tiêu chảy cao gấp 5 lần và nguy cơ phải vào viện do tiêu chảy cao gấp 12 lần so với trẻ bình thường [165]. Ở Việt Nam, các nghiên cứu cũng cho thấy tỷ lệ suy dinh dưỡng và mắc các bệnh tiêu chảy, nhiễm trùng hô hấp ở trẻ em dưới 12 tháng tuổi cao hơn một cách có ý nghĩa ở nhóm trẻ mà mẹ bị thiếu sữa [7]. Nghiên cứu của Nguyễn Công Khẩn cũng chỉ rõ, nhóm trẻ nhỏ không được bú mẹ có nguy cơ bị các biểu hiện lâm sàng khô mắt do thiếu vitamin A cao hơn ở nhóm chúng [9].

1.5.2. Bổ sung Vitamin A

1.5.2.1. Vai trò vitamin A

Vitamin A (Retinol) là một vi chất cần thiết nhằm duy trì hoạt động của con

người như thị lực, tăng trưởng, phát triển, duy trì tính toàn vẹn của các tế bào biểu mô, chức năng miễn dịch và sinh sản.

1.5.2.2. Nhu cầu vitamin A

Nhu cầu Vitamin A ở trẻ em dưới 10 tuổi từ 325 - 400 mcg/ngày, trẻ vị thành niên và người trưởng thành từ 500 - 600 mcg/ngày. Nhu cầu tăng cao ở phụ nữ cho con bú, người mắc bệnh nhiễm trùng, kí sinh trùng và ở các giai đoạn hồi phục bệnh [2].

1.5.2.3. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của vitamin A tới nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp ở trẻ.

Có nhiều nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam về hiệu quả việc bổ sung đa vi chất, trong đó có vitamin A, lên tình trạng nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và đường hô hấp ở trẻ. Các nghiên cứu này bổ sung vi chất đơn lẻ hoặc bổ sung đa vi chất.

Nghiên cứu hiệu quả bổ sung vitamin A liều cao của Hà Huy Khôi và cộng sự năm 1990 cho thấy việc bổ sung vitamin A làm giảm nguy cơ mắc bệnh tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp, nhất là ở trẻ bị suy dinh dưỡng [10]. Một nghiên cứu khác của Hoàng Kim Thanh cũng cho kết quả tương tự [17].

Người ta ước tính rằng nguy cơ tương đối liên quan giữa thiếu vitamin A và tử vong do tiêu chảy là 2,15 (95% CI 1,83–2,58), do sốt rét là 1,78 (95% CI 1,43–2,19) và do các dịch bệnh khác là 1,13 (95% CI 1,01–1,32). Các bằng chứng khác cũng cho thấy hằng năm có khoảng 800.000 trường hợp tử vong ở trẻ em và bà mẹ trên thế giới là do thiếu vitamin A và khoảng 20-24% tử vong là do sỏi, tiêu chảy và sốt rét. Nghiên cứu của Shankar cho thấy cả vitamin A và kẽm đều có chức năng duy trì miễn dịch của cơ thể [146]. Kết quả của 8 nghiên cứu can thiệp bổ sung vitamin A tại châu Á và châu Phi cho trẻ từ 6 tháng đến 5 tuổi cho thấy tỷ lệ tử vong giảm một cách có ý nghĩa [80]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy việc bổ sung vitamin A cho trẻ ngay sau đẻ cũng làm giảm tỷ lệ tử vong

[91]. Một số nghiên cứu thực nghiệm trên động vật và nghiên cứu lâm sàng trên người đều cho rằng thiếu vitamin A có thể làm cho trẻ dễ bị nhiễm khuẩn hô hấp cấp hơn [44].

1.5.3. Bổ sung Kẽm

1.5.3.1. Vai trò của kẽm

Kẽm là một vi chất dinh dưỡng quan trọng có trong tất cả các cơ quan của cơ thể, các mô và dịch cơ thể, là vi lượng nhiều sau sắt, làm trung gian cho một loạt các chức năng sinh lý. Đó là một thành phần cần thiết của nhiều protein, bao gồm những protein quan trọng trong nhân bản DNA và phân chia tế bào, kẽm giúp duy trì tính toàn vẹn của miễn dịch [146], chủ yếu là miễn dịch tế bào [48], [120], và hoạt động chống oxy hóa. Do vai trò của kẽm trong việc duy trì tính toàn vẹn của tế bào và hệ miễn dịch, kẽm có một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát và phòng ngừa các bệnh nhiễm trùng. Kẽm là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của cơ thể. Ảnh hưởng của kẽm lên tiêu chảy có thể liên quan đến vai trò của kẽm trong vận chuyển nước, chất điện giải, tính thấm thấu của ruột [128], vai trò enzyme của enterocyte [77], tăng khả năng hồi phục các mô đường ruột [27], tăng miễn dịch tại chỗ nhằm ngăn sự phát triển và tiêu diệt vi khuẩn có hại [146].

Mặc dù với những chức năng quan trọng đối với cơ thể, nhưng kẽm không dự trữ trong cơ thể mà đòi hỏi phải được cung cấp thường xuyên qua khẩu phần ăn.

1.5.3.2. Nhu cầu kẽm ở trẻ em:

- Tổng lượng kẽm ở trẻ sơ sinh khoảng 60mg, trong quá trình lớn và phát triển, nồng độ kẽm trong cơ thể tăng dần.
- Để tính nhu cầu kẽm ở trẻ em, có thể dựa vào lượng kẽm mất hàng ngày (khoảng 0,064 mg/kg cân nặng với trẻ 6 - 11 tháng tuổi; 0,034 mg/kg cân nặng với trẻ lớn hơn) và lượng kẽm cần cho tăng trưởng (khoảng 0,02 mg/g trọng lượng cơ thể tăng thêm).

1.5.3.3. Sử dụng kẽm trong điều trị tiêu chảy ở trẻ em:

Tổ chức Y tế thế giới khuyến nghị liều hằng ngày trong điều trị tiêu chảy ở trẻ em là 20 mg kẽm trong vòng 14 ngày (riêng đối với trẻ < 6 tháng tuổi là 10 mg/ngày) kết hợp với ORS có hàm lượng glucose và muối thấp [166].

1.5.3.4. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của kẽm tới nhiễm khuẩn đường hô hấp và tiêu chảy cấp ở trẻ em

Các nghiên cứu về tác động của kẽm lên tình trạng bệnh tật cho các kết quả khác nhau. Một số nghiên cứu cho thấy việc bổ sung kẽm không có tác dụng làm giảm tỷ lệ mắc, thời gian bị tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp [129]. Một nghiên cứu khác trên trẻ 6 tháng tuổi với việc bổ sung sắt, kẽm, sắt kẽm phối hợp hoặc đa vi chất cho thấy ở nhóm trẻ được bổ sung sắt, kẽm hoặc sắt kẽm phối hợp đều có xu hướng giảm nguy cơ mắc tiêu chảy và viêm đường hô hấp cấp. Bổ sung sắt, kẽm đồng thời làm giảm 40% nguy cơ mắc viêm đường hô hấp cấp ở những trẻ có tình trạng dinh dưỡng kém [32]. Phân tích kết quả của 10 nghiên cứu bổ sung kẽm cho trẻ dưới 5 tuổi cho thấy ở nhóm trẻ được bổ sung kẽm thì tỷ lệ mắc và mắc mới của cả tiêu chảy và viêm phổi đều giảm đi đáng kể. Một số nghiên cứu khác thì cho thấy việc bổ sung kẽm làm giảm tỷ lệ cũng như mức độ nặng nhẹ của nhiễm khuẩn hô hấp cấp [38].

Có nhiều nghiên cứu về tác động của kẽm lên tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp cấp ở các nước đang phát triển. Nhìn chung các kết quả đều cho thấy việc bổ sung kẽm có tác dụng trong phòng ngừa và điều trị tiêu chảy như: giảm tỷ lệ tiêu chảy, giảm thời gian kéo dài tiêu chảy, giảm số lần đi phân lỏng, giảm nguy cơ mắc tiêu chảy ở trẻ [65], [129]. Bên cạnh đó các nghiên cứu khác cũng cho thấy kẽm cũng có tác dụng trong việc điều trị và phòng ngừa như làm giảm tỷ lệ mắc bệnh ARI, trẻ có hàm lượng kẽm thấp thì tỷ lệ mắc các bệnh ARI cao hơn so với trẻ bình thường. Trẻ được bổ sung kẽm giảm số lần sốt, hạ sốt nhanh hơn, giảm số lần ho, giảm tỷ lệ mắc mới viêm phổi [32], [38].

Ở Việt Nam một nghiên cứu bổ sung 10mg kẽm/ngày cho thấy có tác dụng rõ rệt trong việc giảm tỷ lệ tiêu chảy và viêm đường hô hấp [117]. Một nghiên cứu khác trên trẻ từ 3-48 tháng tuổi với việc bổ sung 10mg kẽm/ngày cho thấy, sau 3 tháng can thiệp tình trạng nhiễm trùng đường hô hấp ở nhóm trẻ được bổ sung kẽm giảm hẳn so với trẻ nhóm chứng [5].

1.5.3.5. Tình trạng kẽm trong nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp.

Trẻ bị tiêu chảy cấp và kéo dài thường có hàm lượng kẽm trong huyết thanh thấp [40], [49] và hàm lượng kẽm có mối liên quan với thời gian kéo dài của từng đợt tiêu chảy [134]. Tuy nhiên, thật khó để phân biệt là hàm lượng kẽm thấp trước khi tiêu chảy xảy ra và làm cho trẻ dễ mắc bệnh, hay là do kết quả việc mất kẽm và phân bố lại trong thời gian bị tiêu chảy cấp. Các nghiên cứu cũng thấy rằng hàm lượng kẽm thay đổi nhanh trong thời gian tiêu chảy cấp. Kết quả của nhiều nghiên cứu trên trẻ bình thường và trẻ suy dinh dưỡng cho thấy hàm lượng kẽm thấp có mối liên quan với tỷ lệ mắc mới cao và mức độ nặng hơn của tiêu chảy ở những tháng tiếp theo [29]. Một nghiên cứu khác cho thấy việc bổ sung kẽm trong điều trị tiêu chảy làm tăng hàm lượng kẽm huyết thanh và giúp trẻ duy trì hàm lượng kẽm đầy đủ trong giai đoạn phục hồi [21].

Một nghiên cứu khác lại cho thấy, trẻ khỏe mạnh có hàm lượng kẽm thấp khi bắt đầu nghiên cứu có tỷ lệ mắc mới nhiễm khuẩn hô hấp cấp cao hơn trong những tháng tiếp theo của nghiên cứu so với những trẻ khi bắt đầu nghiên cứu có hàm lượng kẽm bình thường [29]. Một nghiên cứu khác cho thấy trẻ bị nhiễm khuẩn hô hấp cấp (viêm phổi) có hàm lượng kẽm huyết thanh và hàm lượng kẽm ở tóc thấp hơn một cách có ý nghĩa so với trẻ bình thường không bị bệnh [112].

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. MỘT SỐ NÉT CƠ BẢN VỀ ĐỊA BÀN NGHIÊN CỨU

Phủ Yên là một huyện phía nam của tỉnh Thái Nguyên, phía đông giáp với huyện Hiệp Hòa tỉnh Bắc Giang, phía nam giáp với huyện Sóc Sơn Hà Nội, phía tây giáp tỉnh Vĩnh Phúc, phía bắc giáp Thành phố Thái Nguyên, Thị xã Sông Công của tỉnh Thái Nguyên. Huyện có diện tích 258,5 km² với dân số 137551 người gồm 4 dân tộc sinh sống (Kinh : 92,46%, Sán diu : 6,27%, Dao : 0,29%, Nùng : 0,29%). Toàn huyện có 15 xã và 03 thị trấn, trong đó có 6 xã miền núi, nghề nghiệp chính là nông nghiệp.

Tỷ lệ hộ nghèo tại huyện còn cao chiếm 21,5%. Tỷ lệ suy dinh dưỡng của trẻ dưới 5 tuổi cao chiếm 40% (Số liệu điều tra đánh giá suy dinh dưỡng năm 2006). Tỷ lệ này không đồng đều ở các xã, ở các xã miền núi, xã nghèo, xã có nhiều đồng bào dân tộc thì tỷ lệ này còn cao hơn. Một số đồng bào dân tộc còn có tập quán lạc hậu như đẻ nhiều con, cách chăm sóc và nuôi dưỡng trẻ nhỏ, bà mẹ mang thai chưa hợp lý như cho trẻ ăn thêm các loại thức ăn khác, sữa công thức ngoài sữa mẹ rất sớm, thực hành vệ sinh và chăm sóc trẻ còn chưa đúng cách.

2.2. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thử nghiệm can thiệp tại cộng đồng, được tiến hành theo 2 giai đoạn:
Giai đoạn 1: Điều tra mô tả cắt ngang, đánh giá thực trạng tình trạng dinh dưỡng, chăm sóc và nuôi dưỡng trẻ, cũng như tình hình bệnh tật của trẻ.

Giai đoạn 2: Nghiên cứu thử nghiệm can thiệp, ngẫu nhiên có đối chứng, mù kép, đánh giá mức độ ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic và synbiotic đến tình trạng dinh dưỡng, tình hình mắc tiêu chảy, nhiễm khuẩn hô hấp cấp và hệ vi khuẩn chí đường ruột của trẻ.

2.2.1. Giai đoạn 1: Điều tra mô tả cắt ngang, đánh giá thực trạng tình trạng dinh dưỡng, chăm sóc và nuôi dưỡng trẻ, cũng như tình hình bệnh tật của trẻ.

2.2.1.1. Địa điểm, đối tượng, cỡ mẫu

- ❖ **Địa điểm:** huyện Phở Yên, tỉnh Thái Nguyên
- ❖ **Đối tượng:** - Trẻ từ 5- 6 tháng tuổi (đến 6 tháng 29 ngày)
- Mẹ hoặc người chăm sóc trẻ
- ❖ **Cỡ mẫu:** Áp dụng công thức:

$$n = z^2 \frac{p(1-p)}{e^2}$$

Trong đó:

- n: số trẻ cần điều tra
- Z: Độ tin cậy đòi hỏi là 95%, Z= 1,96
- p: tỷ lệ trẻ bị tiêu chảy (theo kết quả nghiên cứu trước là 11,5 %) [89]
- e: sai số cho phép, chọn ngưỡng 5% (e= 0,05)

Thay vào công thức trên ta tính được: do chọn mẫu chùm nên cỡ mẫu nhân đôi

$$n = 155 \text{ trẻ} \times 2 = 310 \text{ trẻ} \times 5\% = 325 \text{ trẻ}$$

Như vậy tổng số trẻ cần nghiên cứu là 325 trẻ cho điều tra mô tả cắt ngang, ban đầu.

2.2.1.2. Phương pháp chọn mẫu:

- Theo danh sách trẻ 5 - 6 tháng tuổi của 18 xã/thị trấn do Trung tâm Y tế huyện Phở Yên cung cấp cho thấy trung bình có 30 - 40 trẻ/xã/thị trấn. Do vậy nghiên cứu đã bốc thăm chọn ngẫu nhiên ra 10 xã/thị trấn trong tổng số 18 xã/thị trấn để đưa vào nghiên cứu.

- Tổng số trẻ từ 5 - 6 tháng tuổi theo danh sách của 10 xã/thị trấn được chọn là 345 trẻ, nhưng tại thời điểm tiến hành nghiên cứu có một số trẻ vắng nhà, nên chỉ có 322 trẻ đã được chọn cho điều tra ban đầu.

2.2.1.3. Các số liệu nghiên cứu thu thập ở điều tra ban đầu:

- Nhân trắc: thu thập các số liệu về cân nặng, chiều dài nằm, tháng tuổi, giới để đánh giá tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo 3 chỉ tiêu: Z-Score của cân nặng theo tuổi, Z-Score của chiều dài nằm theo tuổi, Z-Score của cân nặng theo chiều dài nằm, trung bình cân nặng và chiều dài nằm của trẻ.
- Các thông tin về tình hình nuôi dưỡng trẻ (NCBSM, ăn bổ sung...), tình hình bệnh tật (tiêu chảy, nhiễm khuẩn hô hấp cấp) và các chăm sóc khi trẻ bị bệnh bằng bộ câu hỏi được thiết kế sẵn.

2.2.2. Giai đoạn 2: Nghiên cứu thử nghiệm can thiệp, ngẫu nhiên có đối chứng, mù kép, đánh giá mức độ ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic và synbiotic.

2.2.2.1. Địa điểm, đối tượng, cỡ mẫu

- ❖ **Địa điểm:** tại các xã/thị trấn của huyện Phổ Yên, tỉnh Thái Nguyên. Địa bàn này được chọn do có đội ngũ cán bộ y tế mạnh, có trình độ chuyên môn và có mạng lưới y tế cơ sở tốt, cách Hà Nội không xa giúp cho việc giám sát các hoạt can thiệp được thuận lợi và có hiệu quả.
- ❖ **Đối tượng:** - Trẻ từ 6-12 tháng tuổi
- Mẹ hoặc người chăm sóc trẻ
- ❖ **Cỡ mẫu:** Áp dụng công thức tính cỡ mẫu của Hassard [105].

$$n = 2 \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \delta^2}{d^2}$$

Đây là công thức để tính cỡ mẫu cho nghiên cứu can thiệp được tính toán dựa trên 2 biến số chủ yếu mà nghiên cứu mong muốn tìm hiểu là sự thay đổi số ngày bị ARI và số ngày bị tiêu chảy của trẻ trong thời gian 6 tháng can thiệp.

- Cỡ mẫu tính theo số ngày trung bình bị ARI: Ước lượng sự khác biệt thay đổi số ngày trung bình bị ARI giữa các nhóm can thiệp so với nhóm đối chứng (d) là 0,22 ngày, SD (δ) được ước lượng là 0,28 ngày (theo kết quả nghiên cứu của Weizman) [162], với $e = 0,05$; lực mẫu 90%. Cỡ mẫu cần cho mỗi nhóm nghiên

cứ sẽ là:

$$n = 2 \frac{(1,96 + 0,84)^2 \cdot 0,28^2}{0,22^2} = 25$$

- Cỡ mẫu tính theo số ngày trung bình bị tiêu chảy: Ước lượng sự khác biệt thay đổi số ngày trung bình bị tiêu chảy giữa các nhóm can thiệp so với nhóm đối chứng (d) là 1,2 ngày, SD (δ) được ước lượng là 2,3 ngày (theo kết quả nghiên cứu của Shornikova) [147], với $e = 0,05$; lực mẫu 90%. Cỡ mẫu cần cho mỗi nhóm nghiên cứu sẽ là:

$$n = 2 \frac{(1,96 + 0,84)^2 \cdot 2,3^2}{1,2^2} = 57$$

Để thoả mãn cả 2 tiêu chí trên thì cỡ mẫu cần là 57 trẻ/nhóm. Tỷ lệ bỏ cuộc ước tính là 15% trong 6 tháng nghiên cứu. Như vậy cỡ mẫu cần thiết cho mỗi nhóm can thiệp là 65 trẻ. Tổng số trẻ tham gia nghiên cứu can thiệp sẽ là:

$$65 \text{ trẻ/nhóm} \times 4 \text{ nhóm} = 260 \text{ trẻ.}$$

Cỡ mẫu xét nghiệm mẫu phân: 80 mẫu phân của trẻ được thu thập tại 3 thời điểm ngay từ đầu, sau 3 và 6 tháng can thiệp.

2.2.2.2. Phương pháp chọn mẫu:

❖ *Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng tham gia nghiên cứu:*

- Trẻ 5 - 6 tháng tuổi, mẹ không có sữa hoặc không đủ sữa và đã ăn thêm.
- Trẻ 5 - 6 tháng tuổi, không được bú mẹ vì một lí do nào đó.
- Các bà mẹ và thành viên gia đình phải viết bản cam kết tự nguyện tham gia và tuân thủ các yêu cầu đặt ra của nghiên cứu.

❖ *Tiêu chuẩn loại bỏ đối tượng:*

- Trẻ mắc các bệnh bẩm sinh, Trẻ đang mắc bệnh tại thời điểm điều tra
- Trẻ có cân nặng sơ sinh thấp dưới 2500 gam
- Trẻ bị suy dinh dưỡng nặng
- Trẻ dị ứng với sữa bò
- Trẻ đang sử dụng các sản phẩm có tăng cường prebiotic và probiotic

- Mẹ và thành viên gia đình không đồng ý tham gia

❖ *Cách chọn mẫu:*

- Trong số 322 trẻ đã tham gia trong điều tra ban đầu, chọn ra được 260 trẻ thoả mãn các tiêu chí của nghiên cứu can thiệp và gia đình tự nguyện đồng ý tham gia để đưa vào nghiên cứu can thiệp.

❖ *Cách chia nhóm nghiên cứu:*

- Sữa bổ sung đã được máy tính gán cho một mã số ngẫu nhiên từ 1-260.

- 260 trẻ được lựa chọn ở trên cũng sẽ được đánh mã số theo danh sách từ 1 đến 260 và sẽ được nhận các gói sữa bổ sung có đánh mã số tương ứng trong suốt 6 tháng thực hiện can thiệp.

- Những người tham gia nghiên cứu và các bà mẹ của trẻ đều không biết trẻ thuộc nhóm nào trong 4 nhóm can thiệp sau:

- Nhóm chứng: Sữa không được bổ sung prebiotic hoặc synbiotic
- Nhóm prebiotic: Sữa được bổ sung 0,8g/ngày prebiotic (GOS/FOS)
- Nhóm synbiotic1: Sữa được bổ sung 0,8g/ngày prebiotic (GOS/FOS) và $2,6 \times 10^9$ CFU/ngày hỗn hợp 2 probiotic (*CRL431/BB12*)
- Nhóm synbiotic 2: Sữa được bổ sung 1,6g/ngày prebiotic (GOS/FOS) và $2,6 \times 10^9$ CFU/ngày hỗn hợp 2 probiotic (*CRL431/BB12*)

❖ *Cách chọn mẫu phân*

80 trẻ được lựa chọn ngẫu nhiên ngay từ khi bắt đầu nghiên cứu, mỗi nhóm 20 trẻ để thu thập mẫu phân cho xét nghiệm vi sinh và các trẻ được chọn này được tiếp tục lấy mẫu phân tại thời điểm sau 3 và 6 tháng can thiệp.

2.2.2.3. Thời gian can thiệp:

Can thiệp tiến hành trong 6 tháng từ tháng 6 đến tháng 12 năm 2008.

2.2.2.4. Cách tiến hành

❖ *Tập huấn cho cán bộ tham gia nghiên cứu:*

- *Tập huấn cho giám sát viên và điều tra viên của Trung tâm y tế huyện Phó Yên:* giám sát viên và điều tra viên được tập huấn về mục đích nghiên cứu, đối

tượng nghiên cứu, cách lựa chọn trẻ tham gia nghiên cứu, thiết kế nghiên cứu, cách tiến hành điều tra, các chỉ số và cách thu thập số liệu trong điều tra ban đầu, trong thời gian can thiệp, giữa kì và cuối can thiệp. Các giám sát viên cũng được tập huấn về cách theo dõi cộng tác viên cho trẻ uống sữa, thu thập thông tin về bệnh tật và cho trẻ uống sữa.

- *Tập huấn cho cán bộ y tế xã*: Mỗi xã chọn 2 cán bộ y tế xã (trạm trưởng và 1 nhân viên). Các nội dung tập huấn bao gồm: tập huấn về mục đích và các nội dung của nghiên cứu và trách nhiệm của cán bộ y tế xã trong thời gian nghiên cứu. Cách quản lí, giám sát việc uống sữa, cách xử lí khi trẻ bị ốm nặng, cách viết báo cáo về bệnh tật của trẻ.

- *Tập huấn cho cộng tác viên*: Tùy theo số lượng trẻ được chọn tham gia nghiên cứu. Mỗi xã 1 đến 3 cộng tác viên được chọn. Cộng tác viên này được chọn từ cộng tác viên dinh dưỡng, y tế thôn hoặc cộng tác viên dân số. Các nội dung tập huấn bao gồm cách pha sữa đúng cách, hợp vệ sinh, cách quản lí trẻ nghiên cứu, cho trẻ uống đúng mã số ghi trên gói sữa, nhận đúng và kiểm tra sữa hằng tuần tại trạm y tế xã, cách điền vào bộ phiếu theo dõi trẻ uống sữa và tình hình bệnh tật của trẻ. Sau khi tập huấn các cộng tác viên được thực hành dưới sự giám sát của giảng viên. Hằng tháng các cộng tác viên được tập huấn lại các nội dung nêu trên.

- *Tập huấn cho các bà mẹ*: Tất cả các bà mẹ đều được tập huấn về mục đích, nội dung của nghiên cứu, cách cung cấp các thông tin cần thu thập trong thời gian nghiên cứu và cách lấy mẫu phân đúng cách khi nghiên cứu yêu cầu.

❖ *Điều tra ban đầu (To)*:

- Được tiến hành ngay sau khi chọn đủ 260 trẻ thoả mãn yêu cầu của nghiên cứu can thiệp.

- Chọn ngẫu nhiên ra 80 trẻ từ 4 nhóm nghiên cứu để lấy mẫu phân xét nghiệm vi khuẩn chí đường ruột.

- Các thông tin khác được lấy từ kết quả điều tra cắt ngang trong giai đoạn 1.

❖ *Tổ chức, thực hiện can thiệp:*

- Tổ chức thành các điểm uống sữa tập trung tại những vị trí thuận lợi nhất trong thôn để các bà mẹ có thể đưa trẻ đến uống, trung bình có khoảng 6-10 trẻ/điểm, do 01 cộng tác viên/y tế thôn phụ trách. Hằng ngày Cộng tác viên kiểm tra code sữa trên từng gói sữa, tên trẻ và danh sách trẻ, mở gói sữa bột có code sữa (13g sữa bột) và pha thành 100 ml sữa cho trẻ uống, ghi chép lại số lượng trẻ uống được từng bữa vào mẫu phiếu theo dõi. Mỗi trẻ có 1 cốc riêng có dán code mã của trẻ để tránh nhầm lẫn. Mỗi ngày trẻ nhận được 2 gói sữa bột, 1 gói buổi sáng, 1 gói buổi chiều (13g/gói x 2 = 26g/ngày) và trong 6 tháng liên tục. Các bà mẹ được yêu cầu nhớ mã số sữa của trẻ để kiểm tra cùng với cộng tác viên, tránh nhầm lẫn. Nếu trẻ vì một lí do nào đó không đến uống được, Cộng tác viên sẽ đến tận nhà để cho trẻ uống sữa.

- Cộng tác viên chịu trách nhiệm:

+ Nhận sữa, pha sữa và cho trẻ uống hằng ngày. Sau khi trẻ uống xong, ghi chép lại số lượng sữa đã uống, đồng thời thu thập các thông tin về bệnh tật và các thông tin khác từ bà mẹ hoặc người chăm sóc trẻ và điền vào mẫu phiếu theo dõi hằng ngày.

+ Nếu có trẻ bị ốm, Cộng tác viên sẽ hướng dẫn bà mẹ cách xử lí hoặc đưa trẻ đến trạm y tế xã hoặc Trung tâm y tế huyện (nếu thấy cần thiết), ghi lại các thông tin cần thiết vào mẫu phiếu theo dõi tình hình bệnh tật đã thiết kế sẵn để báo cáo.

+ Cộng tác viên sẽ nộp phiếu theo dõi uống sữa và phiếu theo dõi tình hình bệnh tật của mỗi trẻ cho trạm y tế xã hàng tuần.

- Trạm trưởng y tế chịu trách nhiệm:

+ Quản lí trẻ tham gia nghiên cứu và xử lí các vấn đề nảy sinh.

+ Theo dõi và điều trị cho trẻ khi bị ốm.

+ Viết báo cáo về tình hình điều trị bệnh cho trẻ.

+ Khi trẻ bị ốm nặng phải chuyển lên bệnh viện huyện.

- Nhân viên trạm y tế xã chịu trách nhiệm:

+ Hằng tuần lên Trung tâm y tế huyện để nhận sữa cho trẻ nghiên cứu tại xã mình và phân phối sữa cho Cộng tác viên ở các điểm uống. Nếu tại các điểm uống không có tủ lạnh thì sữa sẽ được bảo quản tại Trạm Y tế để phân phối dần cho cộng tác viên.

+ Phát và thu bộ phiếu theo dõi từ Cộng tác viên hằng tuần, rồi chuyển lên cho cán bộ giám sát của Trung tâm Y tế huyện.

❖ *Theo dõi và giám sát:*

- Mỗi xã có một cán bộ của trạm y tế xã chịu trách nhiệm theo dõi, giám sát việc uống sữa tại các điểm uống hàng ngày.

- 5 giám sát viên của Trung tâm y tế huyện Phổ Yên chịu trách nhiệm theo dõi, giám sát quá trình cho trẻ uống sữa tại các xã hàng tuần và thu thập lại các báo cáo về tình hình bệnh tật và các bộ phiếu theo dõi từ các cán bộ y tế của các xã. Giám sát viên cũng chịu trách nhiệm xử lý các vấn đề nảy sinh trong quá trình can thiệp và báo cáo lên Giám sát viên của Viện.

- 2 Giám sát viên của Viện Dinh dưỡng ở lại Trung tâm y tế huyện cùng tham gia giám sát chung các công việc được triển khai và xử lý các tình huống phát sinh.

- Vai trò của Nghiên cứu sinh: Nghiên cứu sinh chịu trách nhiệm theo dõi, giám sát toàn bộ hoạt động nghiên cứu trong thời gian 6 tháng: hỗ trợ kỹ thuật, tham gia giám sát luân phiên các điểm uống, hỗ trợ cho giám sát viên địa phương, cộng tác viên về vấn đề chuyên môn, xử lý các vấn đề nảy sinh trong thời gian triển khai, kiểm tra chất lượng số liệu thu thập được và báo cáo tiến độ triển khai cho chuyên gia bạn, tổ chức họp giao ban, rút kinh nghiệm hằng tháng với cán bộ giám sát trung ương, địa phương và cộng tác viên tham gia.

- 01 chuyên gia quốc tế sang phối hợp giám sát hàng tháng các hoạt động triển khai và hỗ trợ xử lý các vấn đề phát sinh.

- Hàng tháng tổ chức một cuộc họp giao ban tại Trung tâm y tế huyện để rút kinh nghiệm, tập huấn lại các nội dung đã được tập huấn ban đầu và xử lý các vấn đề nảy sinh trong quá trình thực hiện. Đồng thời khen thưởng những Cộng tác viên, Giám sát viên xã/ huyện có thành tích tốt trong tháng.

2.2.2.5. Các số liệu và thời điểm thu thập số liệu trong quá trình can thiệp

- *Tình hình bệnh tật của trẻ:*

+ Được thu thập trực tiếp bởi các Cộng tác viên tại các điểm uống sữa, qua việc thăm hỏi các bà mẹ bằng các bộ phiếu theo dõi được thiết kế sẵn hàng ngày.

+ Trạm trưởng y tế xã trực tiếp theo dõi, điều trị cho những trẻ bị bệnh và điền vào phiếu theo dõi bệnh tật của trẻ hàng tuần.

+ Những trẻ bị bệnh nặng được chuyển lên Trung tâm y tế huyện để theo dõi và điều trị. Sau đó được các Giám sát viên huyện thu thập lại hồ sơ bệnh án.

- *Cân đo nhân trắc:* do cán bộ của Viện Dinh dưỡng trực tiếp cân đo sau mỗi tháng can thiệp.

- *Lấy mẫu phân để xét nghiệm về thành phần và số lượng vi khuẩn:* do cán bộ của Viện Dinh dưỡng phối hợp với Cộng tác viên tại các điểm uống thu thập tại thời điểm ban đầu, sau 3 tháng và 6 tháng can thiệp.

2.2.2.6. Nguồn gốc và thành phần sữa sử dụng cho nghiên cứu:

- Sữa bột được sản xuất và đóng gói bởi công ty Friesland Campina tại Hà Lan với mục đích dùng cho nghiên cứu tại Việt Nam và được cung cấp đến tận địa bàn nghiên cứu, đảm bảo các tiêu chuẩn về vệ sinh thực phẩm.

- Sữa được kiểm nghiệm chất lượng, giá trị dinh dưỡng và melamine bởi trung tâm kiểm nghiệm chất lượng của công ty Friesland Campina tại Hà Lan.

- Trong thời gian 6 tháng can thiệp, sữa được bảo quản trong kho lạnh tại Trung tâm y tế huyện Phở Yên ở nhiệt độ $<20^{\circ}\text{C}$ để đảm bảo tính ổn định của probiotic và hằng tuần được phân phối đến các xã (được bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh trong vòng 1 tuần).

- Mỗi gói sữa được đóng gói trong gói nhỏ kim loại chứa 13g sữa bột và 252 gói nhỏ được đóng trong thùng giấy carton với code mã bên ngoài.
- Mỗi gói sữa được cộng tác viên pha với nước ấm 60⁰C thành 100ml sữa cho trẻ uống 1 lần.

Bốn loại sữa thử nghiệm có giá trị dinh dưỡng tương đương nhau, cụ thể như sau:

Bảng 2.1: Thành phần dinh dưỡng của 4 loại sữa trong 100g sữa bột

Giá trị dinh dưỡng	Đơn vị	Nồng độ	Giá trị dinh dưỡng	Đơn vị	Nồng độ
Năng lượng	Kcal	510	Selen	µg	13
Chất đạm	G	11.1	Beta-caroten	µg	310
Chất béo	G	27	Vitamin D3	µg	9.3
Carbohydrates	G	55	Acid Panthothenic	µg	1710
Acid Linoleic	Mg	3350	Vitamin B1	µg	355
Acid α-Linoleic	Mg	480	Vitamin B2	µg	700
DHA	Mg	53	Nicacin	µg	5900
AA	Mg	53	Vitamin B6	µg	300
Sphingo myelin	Mg	35	Acid Folic	µg	80
Lactose	G	53	Vitamin B12	µg	1.2
Maltodextrin	G	2	Biotin	µg	8.5
Acids Sialic	Mg	120	Vitamin C	mg	70
Ca	Mg	385	Vitamin E	mg	10
Phốt pho	Mg	230	Vitamin K	µg	39
Sắt	Mg	6	Vitamin A	µgRE	495
Đồng	µg	380	Nucleotid AMP	mg	3.7
Natri	Mg	155	Nucleotid CMP	mg	12
Kali	Mg	500	Nucleotid GMP	mg	2.3
Clorua	Mg	300	Nucleotid IMP	mg	1.6
Magie	Mg	46	Nucleotid UMP	mg	5.1
Kẽm	Mg	4.6	Taurin	mg	35
I ốt	µg	57	Cholin	mg	105
Man gan	µg	255	L-carnitin	mg	15
			Inositol	mg	3.1

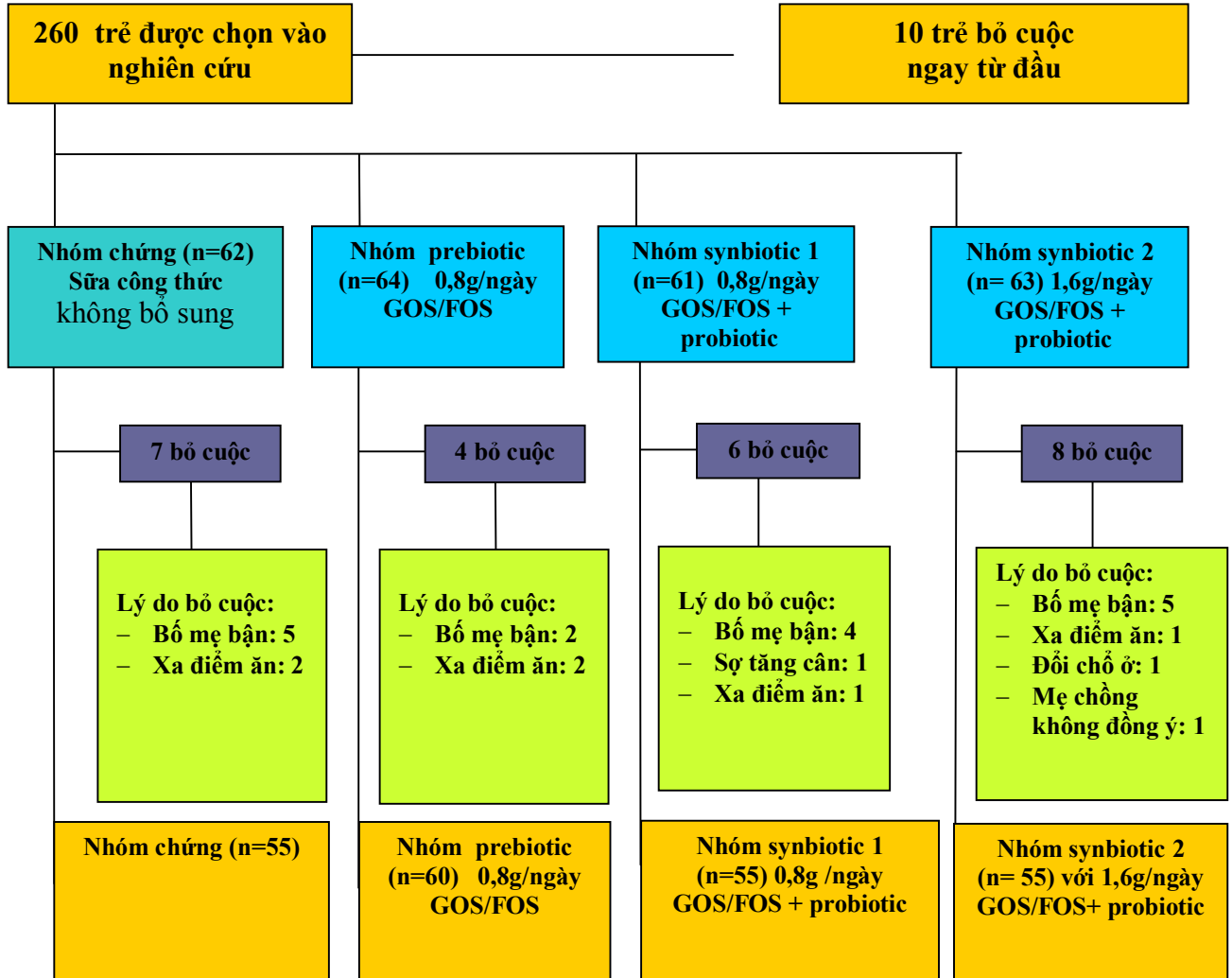
Sữa của nhóm thử nghiệm ngoài thành phần dinh dưỡng giống như nhóm chứng còn được bổ sung thêm các thành phần nêu ở bảng dưới đây:

Bảng 2.2: Thành phần prebiotic và probiotic của các nhóm thử nghiệm (200ml)

Giá trị dinh dưỡng	Đơn vị	Nồng độ trong 200 ml sữa (26g sữa bột)			
		Nhóm chứng	Nhóm prebiotic	Nhóm synbiotic 1	Nhóm synbiotic 2
Chất xơ	g	-	0,8	0,8	1,6
- GOS	g	-	0,7	0,7	1,4
- FOS	g	-	0,1	0,1	0,2
Probiotic		-	-	$2,6 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$
- <i>L. Casei</i> CRL431	CFU	-	-	$1,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
- <i>B. lactis</i> BB12	CFU	-	-	$1,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$

SƠ ĐỒ TỔ CHỨC VÀ LỰA CHỌN MẪU NGHIÊN CỨU CAN THIỆP

Tại thời điểm bắt đầu can thiệp, có 260 trẻ đạt tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu được lựa chọn. Có 10 trẻ bỏ cuộc ngay từ đầu và sau 6 tháng can thiệp còn 225 trẻ đạt tiêu chuẩn để đưa vào phân tích kết quả nghiên cứu, trong đó nhóm chứng là 55 trẻ, nhóm prebiotic 60 trẻ, nhóm synbiotic 1 và nhóm synbiotic 2 là 55 trẻ.



2.2.3. Các phương pháp thu thập số liệu và tiêu chuẩn đánh giá:

Các thông tin thu thập gồm các thông tin nhân trắc, nhóm thông tin về tình hình bệnh tật (tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp), Các chỉ số về thành phần và số lượng một số vi khuẩn chí đường tiêu hóa của trẻ tại các thời điểm T_0 , T_3 và T_6 .

2.2.3.1. Các chỉ số nhân trắc:

- Cách tính tuổi: Tuổi của trẻ được tính bằng cách lấy ngày, tháng, năm điều tra trừ đi ngày tháng năm sinh của trẻ và phân loại theo WHO (1995). Ví dụ: 0 tháng tuổi được tính từ khi trẻ sinh ra đến khi trẻ được 29 ngày, 7 tháng tuổi được tính khi trẻ tròn 7 tháng tuổi cho đến khi trẻ được 7 tháng 29 ngày.
- Cân nặng: Dùng cân SECA với độ chính xác 0,1kg. Khi cân, trẻ chỉ mặc quần áo mỏng, không mang giày dép, trọng lượng của bộ quần áo sẽ được trừ trước khi ghi kết quả. Kết quả được ghi theo đơn vị kg với một số lẻ.
- Chiều dài nằm: Sử dụng thước đo chiều dài nằm bằng thước gỗ UNICEF với độ chính xác 0,1 cm. Trẻ được đặt nằm ngửa trên thước, người trợ giúp giữ đầu trẻ để mắt trẻ hướng lên trần nhà, đỉnh đầu chạm vào thanh chắn đầu của thước, giữ đầu gối trẻ để chân trẻ duỗi thẳng, 2 gót chân sát vào nhau, dịch thanh trượt đi động từ dưới lên cho đến khi chạm và ép toàn bộ vào mặt bàn chân của trẻ, đảm bảo thanh trượt vuông góc với mặt của thước. Đọc và ghi kết quả với đơn vị là cm và một số lẻ. Tại thời điểm đo, trẻ được đo 3 lần để lấy số đo trung bình. Trong trường hợp 2 trong 3 lần đo có sự sai khác $> 0,3\text{cm}$ thì Điều tra viên phải thực hiện đo lại.
- Đánh giá tình trạng dinh dưỡng: Theo khuyến nghị của WHO, các chỉ tiêu để đánh giá tình trạng dinh dưỡng là Z-score của nặng theo tuổi (WAZ), chiều dài nằm theo tuổi (HAZ), cân nặng theo chiều dài nằm (WHZ). Trẻ bình thường khi các chỉ số WAZ, HAZ, WHZ có giá trị nằm trong khoảng từ -2 đến + 2. Suy dinh dưỡng được ghi nhận khi các chỉ số Z-score của WAZ, HAZ, WHZ < -2 .

2.2.3.2. Các chỉ số về đặc điểm đối tượng, tình hình chăm sóc và nuôi dưỡng trẻ, tình hình bệnh tật của trẻ trong điều tra ban đầu:

- Phòng vấn các bà mẹ theo bộ câu hỏi được thiết kế sẵn để thu thập các số liệu về thực hành chăm sóc và nuôi dưỡng trẻ, nuôi con bằng sữa mẹ, ăn bổ sung, sử dụng sữa bột, đánh giá tình hình mắc bệnh bằng hỏi ghi tiền sử mắc bệnh trong 2 tuần vừa qua. Các Điều tra viên được tập huấn thống nhất phương pháp phỏng vấn.

- Tiêu chí đánh giá về kiến thức, thực hành nuôi con bằng sữa mẹ, ăn bổ sung theo WHO (2007) [170]

2.2.3.3. Các chỉ số về tình hình sức khỏe và các thông tin về quá trình uống sữa của trẻ trong quá trình can thiệp:

- Trẻ được theo dõi các dấu hiệu bệnh tật trong 6 tháng can thiệp bằng bộ phiếu theo dõi được thiết kế sẵn để thu thập các thông tin về tình hình sức khỏe, bệnh tật (tiêu chảy, ARI, một số bệnh khác) và các thông tin về quá trình uống sữa của trẻ hằng ngày. Cộng tác viên/y tế thôn ghi nhận lại các triệu chứng hoặc dấu hiệu của tiêu chảy/viêm đường hô hấp vào phiếu theo dõi.

- Tiêu chuẩn để chẩn đoán Tiêu chảy: Theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Tổ chức Y tế thế giới, trẻ được chẩn đoán bị tiêu chảy khi trẻ đi đại tiện phân lỏng hoặc có máu và đi trên 3 lần/ngày. Nếu các biểu hiện đó hết trong 2 ngày liên tục thì được coi như chấm dứt một đợt tiêu chảy. Trẻ được coi là tiêu chảy kéo dài khi bị tiêu chảy trên 3 ngày/đợt.

- Triệu chứng sốt được ghi nhận khi trẻ được cộng tác viên đo thân nhiệt với nhiệt độ cao hơn 37,5 °C.

- Độ đặc lỏng của phân được đánh giá theo 3 mức độ: 1. Mềm /tạo thành khuôn
2. Cứng/rắn (phân trông cứng và giống các viên bi tròn nhỏ (còn gọi là phân dê) và phân lỏng

- Nôn/trớ: khi có hiện tượng thức ăn trong dạ dày hoặc ruột bị đẩy ra ngoài ở trẻ

- Số lần đại tiện: số lần trẻ đi đại tiện trong ngày

- Màu phân: được phân thành 4 loại: màu vàng, màu nâu đen, màu xanh và màu đỏ. Các bà mẹ quan sát màu phân của trẻ để thông báo cho cộng tác viên
- Mùi phân: được chia thành 2 loại: bình thường và mùi khó chịu. Mùi phân được đánh giá theo cảm nhận của người mẹ. Mùi khó chịu khi bà mẹ cảm nhận mùi phân của con mình có mùi khó chịu khác với mùi phân bình thường.
- Đầy hơi: trẻ ậm ạch khó chịu, bụng trướng, gõ rất trong và trung tiện nhiều lần. Triệu chứng chỉ được ghi lại sau khi cộng tác viên khám và xác nhận
- Phân chẩn đoán tiêu chảy do nghiên cứu viên đánh giá.
- Khò khè: tiếng thở bất thường có âm sắc trầm nghe rõ nhất khi trẻ thở ra, có thể nghe bằng cách áp sát tai vào miệng trẻ. Bà mẹ thông báo tiếng thở “ bất thường” của trẻ cho cộng tác viên và triệu chứng “ thở khò khè” chỉ được ghi lại sau khi cộng tác viên kiểm tra và xác nhận.
- Nghẹt mũi: khi trẻ có hiện tượng thở bằng mồm, đặc biệt khi ngủ, ngủ không sâu, quấy khóc. Triệu chứng chỉ được ghi lại sau khi được cộng tác viên kiểm tra và xác nhận.
- Chảy nước mũi: khi trẻ có dịch mũi chảy ra.
- Các triệu chứng của nhiễm khuẩn hô hấp như chảy nước mũi, ho, sốt, thở khò khè, nghẹt mũi nếu hết trong hai ngày liên tục thì được coi như chấm dứt một đợt.

2.2.3.4. Các chỉ số về thành phần và số lượng một số vi khuẩn đường tiêu hóa của trẻ:

- Cách lấy phân và bảo quản phân:
 - + Mẹ/người chăm sóc trẻ được cán bộ chuyên ngành vi sinh hướng dẫn cách lấy mẫu phân đúng cách.
 - + Mỗi trẻ sẽ được phát một xô đựng phân đã rửa sạch và 1 ống nhựa vô trùng có thìa bên trong để lấy phân.
 - + Sau khi trẻ đi đại tiện vào xô, bà mẹ trộn đều đồng phân và dùng thìa vô trùng lấy khoảng 15g phân cho ngay vào ống nhựa vô trùng, rồi đậy chặt nắp lại.

+ Ống nhựa đựng phân sẽ được cho bảo quản ngay trong phích lạnh 4-8 °C và trong vòng 15 phút được cán bộ y tế huyện vận chuyển ngay về Trung tâm y tế huyện để bảo quản đông lạnh trong tủ đá do UNICEF cung cấp ở nhiệt độ -40°C đến -80°C.

+ Sau đó, các ống nhựa đựng mẫu phân được đóng gói và bảo quản lạnh trong đá khô, vận chuyển theo đường chuyên phát nhanh bằng máy bay về Hà Lan để phân tích. Việc tách ADN được tiến hành tại Labo vi sinh của công ty Friesland Campina tại Leeuwarden với việc sử dụng bộ kit QIAamp® theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Công ty Qiagen, Venlo, Hà Lan) và tổng số vi khuẩn, *Bifidobacteria*, *bacteroides*, *Lactobacilli*, *Clostridia*, *E. Coli*, *BB12* được định lượng theo phương pháp PCR định lượng (quantitative real time PCR) tại Trung tâm hợp tác Friesland Campina, Deventer, Hà Lan.

Định lượng tác nhân đích có trong mẫu thử, phát hiện sản phẩm khuếch đại trong quá trình chạy PCR khi sản phẩm khuếch đại từ DNA đích được nhân bản đạt đủ số lượng để làm cho ống phản ứng phát được huỳnh quang khi nhận được nguồn sáng kích thích để biết được số lượng bản DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng dựa vào sự xuất hiện huỳnh quang của ống phản ứng sớm hay muộn, tức là chu kỳ ngưỡng (Ct) của ống phản ứng nhỏ hay lớn.

Định lượng tuyệt đối được sử dụng để xác định số copies của tác nhân đích có trong mẫu phân.

Để có thể thực hiện phương pháp định lượng tuyệt đối, tiến hành xét nghiệm real-time PCR của mẫu thử cùng lúc với các mẫu chuẩn đã biết trước số lượng rồi tính ra số copies DNA của tác nhân đích có trong ống phản ứng dựa vào đường biên diễn chuẩn xác định mối quan hệ giữa chu kỳ ngưỡng (Ct) với số lượng copies DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng. Cuối cùng xác định số copies tác nhân đích có trong mẫu phân dựa vào hệ số pha loãng mẫu và hệ số tách chiết DNA của phương pháp chuẩn bị mẫu trước khi thực hiện PCR.

Cụ thể phương pháp tính toán số copies của DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng dựa vào đường biểu diễn chuẩn như sau:

- Đường biểu diễn chuẩn cho được một hàm số biểu thị mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng ($Y = Ct$) với \log_{10} của số lượng bản DNA đích ban đầu có trong ống phản ứng ($X = \log_{10} Sq$). Hàm số đó là: $Y = [\text{slope}(X)] + \text{intercept}$, và các thông số slope và intercept đều hiển thị trên biểu đồ chuẩn.

- Từ hàm số này, người làm thí nghiệm sẽ hiểu được tại sao máy tính hiển thị được Sq, đó là nhờ tính toán từ $Sq = 10^{[(Ct - \text{intercept})/\text{slope}]}$

- Mẫu phân được đánh giá là (+) với *BB12* khi số lượng vi khuẩn *BB12* $\geq 10^5$ CFU/g phân khô.

2.3. Xử lý và phân tích số liệu:

- Những người tham gia nghiên cứu và các bà mẹ của trẻ đều không biết trẻ thuộc nhóm nào trong 4 nhóm nghiên cứu. Code của 225 mẫu sữa được giải mã ra các nhóm trước khi phân tích số liệu (sau khi kết thúc vào số liệu và kiểm tra số liệu)

- Code mã nhóm được lưu giữ tại Hà Lan và chỉ được mở sau khi kết thúc phân tích thống kê. Số liệu được phân tích tại Hà lan và Việt nam để so sánh kết quả.

- Số liệu được làm sạch và nhập và xử lý bằng phần mềm EPI-INFO 6.04 và SPSS 13.0

- Số liệu nhân trắc được nhập và xử lý bằng phần mềm Anthro của WHO 2006 trước khi chuyển vào phần mềm SPSS 13.0 để xử lý.

- Trẻ ăn đủ số lần ăn trên 90% và tổng lượng sữa trên 90% được đưa vào thống kê để đánh giá tác động của can thiệp.

- Kết quả xét nghiệm mẫu phân của trẻ chỉ được đưa vào thống kê để đánh giá tác động của can thiệp khi trẻ có đầy đủ 3 mẫu phân tại 3 thời điểm T_0 , T_3 , T_6 (50 mẫu).

- Số liệu được kiểm định về phân bố chuẩn trước khi sử dụng các phép thống kê.
- Các test ANOVA được sử dụng để kiểm định sự khác biệt giá trị trung bình giữa các nhóm nghiên cứu như cân nặng, chiều dài năm, Zscore WAZ, HAZ, WHZ, mức tăng cân nặng, chiều dài năm, số lần đi đại tiện... Khi test ANOVA có $p < 0,05$, tiếp tục sử dụng test Bonferroni để so sánh sự khác biệt giá trị trung bình của từng cặp nhóm nghiên cứu.
- Những số liệu phân bố không chuẩn như số ngày và số đợt mắc bệnh..., sử dụng test Kruskal Wallis và Mann-Whitney để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu và giữa 2 nhóm.
- Test χ^2 được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các tỷ lệ trong cùng một nhóm tại các thời điểm khác nhau hoặc so sánh giữa các nhóm cùng thời điểm.
- Chỉ số hiệu quả can thiệp thô: Được tính theo công thức:

$$H (\%) = \frac{A - B}{A} 100$$

Trong đó:

H là hiệu quả được tính bằng tỷ lệ %.

A là tỷ lệ hiện mắc tại thời điểm bắt đầu can thiệp TO;

B là tỷ lệ hiện mắc sau can thiệp tại T6 .

- Chỉ số hiệu quả can thiệp thực:

Được tính theo công thức:

$$HQCT = H1 - H2$$

Trong đó:

HQCT là hiệu quả can thiệp

H1 là chỉ số hiệu quả của nhóm can thiệp

H2 là chỉ số hiệu quả của nhóm chứng

Các biện pháp không chế sai số

- Số liệu nhân trắc: 2 điều tra viên của Viện Dinh dưỡng tham gia cân, đo từ khi bắt đầu nghiên cứu cho đến khi kết thúc, sử dụng cùng một loại cân, thước chuẩn. Điều tra viên được tập huấn kỹ thuật, thực hiện đúng theo thường quy và phương pháp thống nhất để tránh sai số do người đo và dụng cụ.

- Số liệu bệnh tật: cộng tác viên được tập huấn cách ghi chép, nhận biết các triệu chứng của bệnh, trạm trưởng y tế các xã và nghiên cứu viên kiểm tra số liệu ghi chép hàng tuần. Hàng tháng tổ chức họp giao ban và tập huấn lại về cách nhận biết và thu thập số liệu về bệnh tật cho cộng tác viên và cán bộ tham gia. Các bà mẹ cũng được tập huấn về cách nhận biết dấu hiệu bệnh tật để cung cấp cho cộng tác viên, một số triệu chứng chỉ được ghi lại sau khi được cộng tác viên kiểm tra và xác nhận như triệu chứng đầy hơi/trướng bụng, thở khò khè, chảy nước mũi...

- Các bà mẹ được tập huấn cách thu thập mẫu phân của trẻ. Cộng tác viên, cán bộ tham gia được tập huấn cách vận chuyển, qui trình bảo quản mẫu phân tại thực địa. Mẫu phân được bảo quản trong đá khô và chuyển sang Labo tại Hà Lan theo đường hàng không để phân tích.

- Số liệu được làm sạch và có 02 cán bộ chuyên trách nhập vào máy tính ngay tại thực địa và gửi cho chuyên gia tại Hà Lan kiểm tra.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Đề cương được Hội đồng đạo đức của Viện dinh dưỡng Việt nam và Hội đồng đạo đức quốc tế (IMEC) tại Wageningen thông qua. Trước khi triển khai nghiên cứu các bà mẹ/người chăm sóc trẻ và thành viên gia đình được giải thích về nội dung nghiên cứu, các quyền lợi và trách nhiệm khi tham gia, đồng thời kí vào bảng cam kết xin tự nguyện tham gia. Các cán bộ y tế có trách nhiệm giúp đỡ và giải thích cho các đối tượng khi họ gặp phải những vấn đề khó khăn, điều trị khi trẻ bị ốm. Các bà mẹ và gia đình được thông báo đầy đủ kết quả, kết luận nghiên cứu và đảm bảo tính bí mật riêng tư của trẻ.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. THỰC TRẠNG NCBSM, THỰC HÀNH ĂN BỔ SUNG, TÌNH HÌNH NUÔI DƯỠNG VÀ BỆNH TẬT CỦA TRẺ

3.1.1. Một số thực hành NCBSM và ăn bổ sung

Bảng 3.1. Thời gian cho trẻ bú sau sinh (n=322)

Thời gian	n	Tỷ lệ %
Trong nửa giờ đầu	143	44,4
Từ 30 - 60 phút sau sinh	39	12,1
Từ 1 - 6 giờ sau sinh	63	19,6
Từ 7 - 24 giờ sau sinh	28	8,7
Sau 24 giờ	49	15,2

Nhận xét: Kết quả bảng 3.1 cho thấy, có 44,4% và 12,1% bà mẹ đã cho con bú trong vòng nửa giờ đầu hoặc 1 giờ đầu sau khi sinh và 15,2% bà mẹ là cho con bú sau 24 giờ.

Bảng 3.2. Thức ăn cho trẻ trước khi bú lần đầu (n= 322)

Thức ăn	n	Tỷ lệ %
Bú chực	5	1,6
Sữa bột công thức cho trẻ sơ sinh	48	14,9
Nước đường	31	9,6
Mật ong	24	7,5
Khác (nước thảo mộc, nước cơm)	61	18,9
Không nhớ	5	1,6
Không cho ăn gì	148	45,9
Tổng	322	100,0

Nhận xét: Có 45,9% các bà mẹ không cho trẻ ăn gì trước khi bú lần đầu. Tuy nhiên, vẫn còn tới hơn một nửa các bà mẹ cho trẻ ăn các thức ăn khác trước khi cho con bú lần đầu. Thức ăn chủ yếu là sữa công thức cho trẻ sơ sinh (14,9%), nước đường (9,6%), mật ong (7,5%), còn lại là các thức ăn khác (nước thảo mộc, nước cơm).

Bảng 3.3. Thời điểm trẻ bắt đầu được cho ăn bổ sung (n= 322)

Thời điểm (Tháng tuổi)	n	%
Từ 0 - 1 tháng	15	4,5
Từ 1- 2 tháng	44	13,5
Từ 2- 3 tháng	101	31,3
Từ 3- 4 tháng	127	39,6
Từ 4 - 5 tháng	34	10,4
Từ 5 - 6 tháng	2	0,7
Tháng trung bình	322	3,4 ± 0,06

Nhận xét: Kết quả bảng 3.3 cho thấy, tỷ lệ các bà mẹ cho con ăn bổ sung sớm rất cao: có tới 4,5% số trẻ ăn bổ sung trong tháng đầu, 13,5% ăn trong thời gian 1-2 tháng tuổi, trong 4 tháng đầu có tới 88,9% số trẻ đã ăn bổ sung. Chỉ có 2/322 bà mẹ (0,7%) cho con ăn bổ sung trong thời gian từ 5- 6 tháng tuổi. Thời điểm bắt đầu cho trẻ ăn bổ sung trung bình là 3,4 tháng tuổi.

Bảng 3.4. Lý do cho trẻ ăn thêm ngoài sữa mẹ (n=322)

Lí do	n	Tỷ lệ %
Mẹ không đủ sữa	54	16,9
Mẹ bận đi làm xa	177	54,9
Mẹ bị bệnh	5	1,4
Khác	86	26,8
Tổng	322	100

Nhận xét: Kết quả bảng 3.4 cho thấy, lí do chủ yếu các bà mẹ phải cho con ăn bổ sung thêm là mẹ bận đi làm xa (54,9%), mẹ không đủ sữa cho con bú (16,9%), còn lại là các lí do khác (trẻ cứng cáp hơn, sợ không đủ chất cho trẻ).

Bảng 3.5. Thực phẩm được sử dụng cho trẻ ăn ngày hôm qua ngoài sữa mẹ (n=322)

Tên thực phẩm	n	Tỷ lệ %
Bột gạo, bột ăn liền	226	70,3
Thịt, cá, trứng	105	32,8
Rau xanh	74	23,1
Sữa công thức, sữa đậu nành	48	14,8
Tôm, cua, ốc	23	7,2
Dầu mỡ, lạc vừng	26	7,9
Đậu đỗ	23	7,2
Hoa quả	20	6,2
Bánh kẹo	9	2,8
Khác (mì gói, đậu phụ)	93	29,0

Nhận xét: Kết quả bảng 3.5 cho thấy, các thực phẩm được sử dụng phổ biến cho trẻ ăn là các loại bột gạo, bột ăn liền (70,3%), các loại thịt, cá, trứng (32,8%), rau xanh các loại (23,1%). Các loại thực phẩm như sữa công thức cho trẻ sơ sinh, sữa đậu nành chỉ có 14,8%; tôm, cua, ốc, dầu mỡ, lạc vừng, đậu đỗ, chỉ có trên 7% gia đình sử dụng để chế biến thức ăn bổ sung cho trẻ.

3.1.2. Tình hình mắc tiêu chảy, viêm đường hô hấp cấp ở trẻ và một số thực hành chăm sóc nuôi dưỡng trẻ

Bảng 3.6. Người chăm sóc trẻ khi mẹ vắng nhà (n=322)

Người chăm sóc trẻ	n	Tỷ lệ %
Bố	50	15,5
Ông/Bà	223	69,3
Anh/chị của trẻ	10	3,1
Khác (hàng xóm, họ hàng)	39	12,1
Tổng	322	100,0

Nhận xét: Kết quả bảng 3.6 cho thấy, ông bà là người chăm sóc trẻ chính khi mẹ vắng nhà (69,3%), bố là người chăm sóc trẻ chỉ có ở 15,5% gia đình.

Bảng 3.7. Cách thức cho bú khi trẻ bị bệnh (n= 322)

Cách thức cho bú	n	Tỷ lệ %
Bú nhiều hơn	168	52,2
Bú như bình thường	135	41,9
Bú ít đi	17	5,3
Không cho bú	2	0,6
Tổng	322	100,0

Nhận xét: Kết quả bảng 3.7 cho thấy, có 52,2% các bà mẹ cho con bú nhiều hơn bình thường khi trẻ bị bệnh, 41,9% cho bú như bình thường và có 5,3% bà mẹ là cho con bú ít hơn bình thường.

Bảng 3.8. Tỷ lệ trẻ mắc bệnh tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp cấp trong hai tuần qua (n= 322)

Bệnh	n	Tỷ lệ %
Tiêu chảy	70	21,7
Viêm đường hô hấp	89	27,6

Nhận xét: Kết quả bảng 3.8 cho thấy, trong tổng số 322 trẻ được điều tra, có tới 70 trẻ và 89 trẻ, chiếm tỷ lệ tương ứng là 21,7% và 27,6% đã bị tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp cấp trong 2 tuần qua.

3.2. Một số đặc điểm chung của đối tượng trước can thiệp

Bảng 3.9. Một số đặc điểm chung của trẻ ở 4 nhóm nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm chứng (n = 62)	Nhóm prebiotic (n = 64)	Nhóm synbiotic 1 (n = 61)	Nhóm synbiotic 2 (n = 63)	P*
Giới tính:					
- Trẻ trai (n /%)	32 (51,6)	33 (51,6)	35 (57,4)	30 (47,6)	>0,05
- Trẻ gái (n /%)	30 (48,1)	31 (48,4)	26 (42,6)	33 (52,4)	
Tháng tuổi	5,8 ± 0,7	5,5 ± 0,6	5,8 ± 0,7	5,7 ± 0,6	>0,05
Tuần thai khi đẻ	38,8 ± 2,2	39,0 ± 2,6	38,6 ± 4,0	39,8 ± 1,9	>0,05
Tình trạng lúc đẻ (%)					
- Đẻ thường	77,4	79,7	83,6	73,0	>0,05
- Đẻ can thiệp	0	1,6	1,6	1,6	
- Mổ đẻ	22,6	18,8	14,8	25,4	
Cân nặng sơ sinh (g)	3197 ± 411	3183 ± 473	3205 ± 385	3179 ± 427	>0,05
Số anh chị em	1,81 ± 0,9	1,66 ± 0,6	1,79 ± 0,7	1,70 ± 0,7	>0,05
Nơi sinh (%):					
- Tại nhà	3,2	1,6	1,6	0	>0,05
- Trạm y tế	16,1	7,8	11,5	19,0	
- Bệnh viện	80,6	90,6	86,9	81,0	

Số liệu biểu thị bằng $\bar{X} \pm SD$ và tỷ lệ %

*ANOVA test cho các số liệu trung bình, χ^2 test cho các giá trị %

Nhận xét: Kết quả bảng 3.9 cho thấy:

- Tất cả các đặc điểm chung của trẻ như giới, tháng tuổi, tuần thai khi sinh, cân nặng sơ sinh, số anh chị em, nơi sinh là tương đối đồng đều, tỷ lệ trẻ trai và trẻ gái không có sự khác biệt giữa 4 nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

Bảng 3.10. Một số đặc điểm chung của các bà mẹ ở 4 nhóm nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm chứng (n = 62)	Nhóm prebiotic (n = 64)	Nhóm synbiotic 1 (n = 61)	Nhóm synbiotic 2 (n = 63)	P*
Tuổi (năm)	28,2 ± 5,2	27,3 ± 4,7	28,3 ± 4,8	28,0 ± 4,9	>0,05
Trình độ văn hóa (%)					
- Mù chữ	1,6	0,0	0,0	0,0	>0,05
- Cấp 1	24,2	18,8	29,5	22,2	
- Cấp 2	35,5	56,3	42,6	55,6	
- Cấp 3	24,2	14,0	21,3	15,9	
- Đại học/trung cấp	12,9	10,9	6,6	6,3	
Nghề nghiệp chính (%)					
- Nông dân	59,7	62,5	65,6	68,3	>0,05
- Công nhân	8,1	15,6	8,2	4,8	
- Cán bộ	17,7	7,8	8,2	9,5	
- Buôn bán	8,1	9,4	11,5	12,7	
- Nghề khác	6,4	4,7	6,0	4,8	
Thời gian chăm sóc trẻ trong ngày (giờ)	10,8 ± 6,3	11,1 ± 6,6	9,4 ± 5,6	9,1 ± 5,0	>0,05
Tháng tuổi bắt đầu cho trẻ ăn bổ sung	3,5 ± 0,8	3,0 ± 1,2	3,4 ± 0,9	3,2 ± 1,1	>0,05

Số liệu biểu thị bằng $\bar{X} \pm SD$ và tỷ lệ %

*ANOVA test cho các số liệu trung bình, χ^2 test cho các giá trị %

Nhận xét: Kết quả bảng 3.10 cho thấy:

- Tuổi trung bình của các bà mẹ là 27 – 28 tuổi, trình độ văn hóa chủ yếu là cấp 2 (35,5 – 56,3%), trình độ đại học và trung cấp tương đối thấp (6,3 – 12,9%), Nghề nghiệp chính của các bà mẹ chủ yếu là nông dân (59,7 – 68,3%), chỉ có 7,8 – 17,7% là cán bộ, Các đặc điểm này tương đối đồng đều giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).
- Thời gian các bà mẹ dành cho chăm sóc trẻ tương đối nhiều, trung bình các bà mẹ dành 9,1 – 11,1 giờ mỗi ngày để chăm sóc con.
- Trẻ được ăn bổ sung từ rất sớm so với khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), trung bình từ 3,0 - 3,5 tháng tuổi, tương tự như nhau giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

3.3. Tình trạng dinh dưỡng của trẻ trong 6 tháng can thiệp

Bảng 3.11. Hiệu quả trên cân nặng tại các thời điểm can thiệp

Thời điểm	Nhóm chứng (n=55)	Nhóm prebiotic (n=60)	Nhóm synbiotic 1 (n=55)	Nhóm synbiotic 2 (n=55)
T ₀	6,9 ± 0,8	6,7 ± 0,9	6,8 ± 0,9	6,7 ± 0,8
T ₂	7,7 ± 0,9 ^b	7,9 ± 1,0 ^b	7,9 ± 0,9 ^b	7,8 ± 0,9 ^b
T ₄	8,2 ± 0,9 ^b	8,4 ± 1,1 ^b	8,4 ± 1,0 ^b	8,3 ± 1,0 ^b
T ₆	9,0 ± 0,8 ^b	9,3 ± 1,3 ^b	9,2 ± 1,1 ^b	9,0 ± 1,0 ^b
T ₂ -T ₀	0,9 ± 0,6	1,2 ± 0,9*	1,1 ± 0,5*	1,1 ± 0,5*
T ₄ -T ₀	1,4 ± 0,7	1,7 ± 1,0*	1,6 ± 0,6*	1,6 ± 0,6*
T ₆ -T ₀	2,2 ± 0,8	2,6 ± 1,1*	2,4 ± 0,7*	2,3 ± 0,7

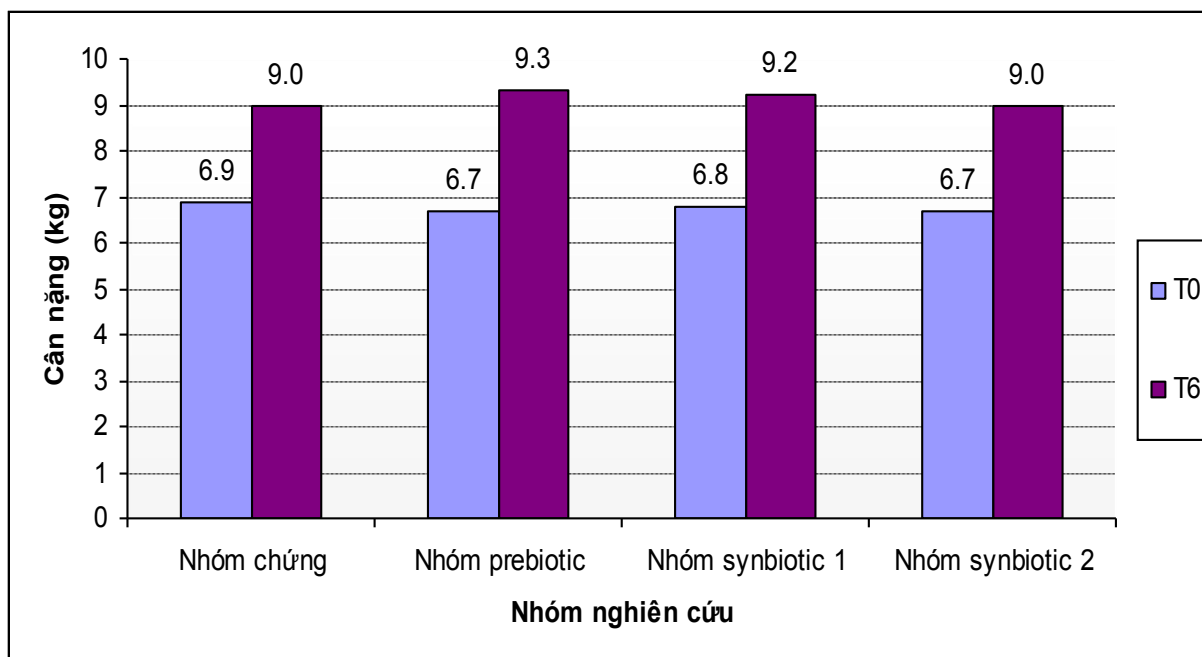
Số liệu biểu thị bằng $\bar{X} \pm SD$

* $p < 0,05$ so với nhóm chứng (ANOVA test);

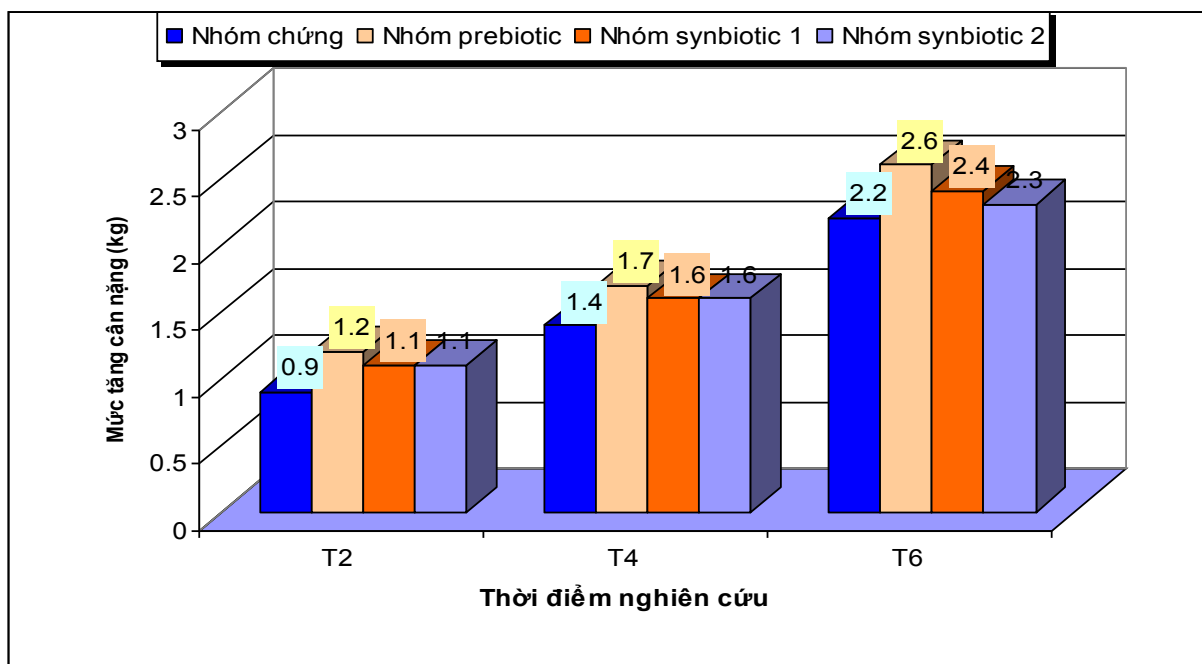
^a: $p < 0,05$; ^b: $p < 0,01$ vs. T₀, cùng nhóm (T test ghép cặp).

Nhận xét: Kết quả bảng 3.11 và biểu đồ 3.1 và 3.2 cho thấy:

- Cân nặng ban đầu ở các nhóm trẻ tương tự nhau, cao nhất ở nhóm chứng, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$) (ANOVA test).
- Cân nặng trung bình cả 4 nhóm đều tăng có ý nghĩa thống kê ở các giai đoạn can thiệp ($p < 0,01$) (T test ghép cặp)..
- Ở các giai đoạn nghiên cứu, cân nặng của trẻ ở các nhóm can thiệp có xu hướng cao hơn so với nhóm chứng. Cân nặng cao nhất ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)
- Mức tăng cân nặng ở cả 3 nhóm trẻ can thiệp cao hơn so với nhóm chứng. Đặc biệt trẻ ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 có mức tăng cân cao hơn hẳn ở tất cả các thời điểm nghiên cứu so với nhóm chứng ($p < 0,05$).
- Mức tăng cân nặng của trẻ ở nhóm synbiotic 2 có sự khác biệt so với nhóm chứng chỉ ở 4 tháng đầu can thiệp. Nhưng sau 6 tháng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p > 0,05$).



Biểu đồ 3.1. Thay đổi cân nặng của trẻ trước và sau can thiệp



Biểu đồ 3.2. Mức tăng cân nặng của trẻ trong các giai đoạn can thiệp

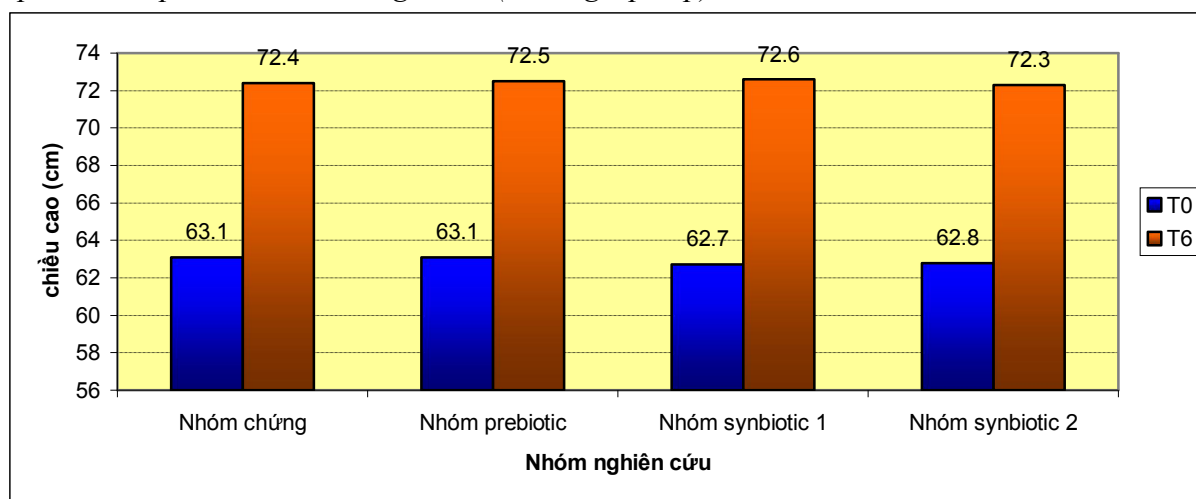
Bảng 3.12. Hiệu quả trên chiều dài nằm tại các thời điểm can thiệp

Thời điểm	Nhóm chứng (n=55)	Prebiotic (n=60)	Synbiotic 1 (n=55)	Synbiotic 2 (n=55)
T ₀	63,1 ± 2,1	63,1 ± 2,6	62,7 ± 2,7	62,8 ± 2,4
T ₂	67,0 ± 2,3 ^b	67,3 ± 2,5 ^b	67,1 ± 2,8 ^b	67,2 ± 2,4 ^b
T ₄	70,0 ± 2,3 ^b	70,4 ± 2,5 ^b	70,1 ± 2,8 ^b	70,4 ± 2,3 ^b
T ₆	72,4 ± 2,0 ^b	72,5 ± 2,4 ^b	72,6 ± 2,6 ^b	72,3 ± 2,3 ^b
T ₂ -T ₀	3,9 ± 1,7	4,2 ± 1,3	4,5 ± 1,3*	4,4 ± 1,2
T ₄ -T ₀	6,9 ± 1,5	7,3 ± 1,7	7,4 ± 1,4*	7,6 ± 1,6*
T ₆ -T ₀	9,3 ± 2,0	9,4 ± 1,9	9,9 ± 1,6*	9,5 ± 1,7

Số liệu biểu thị bằng $\bar{X} \pm SD$

* $p < 0,05$ so với nhóm chứng (ANOVA test)

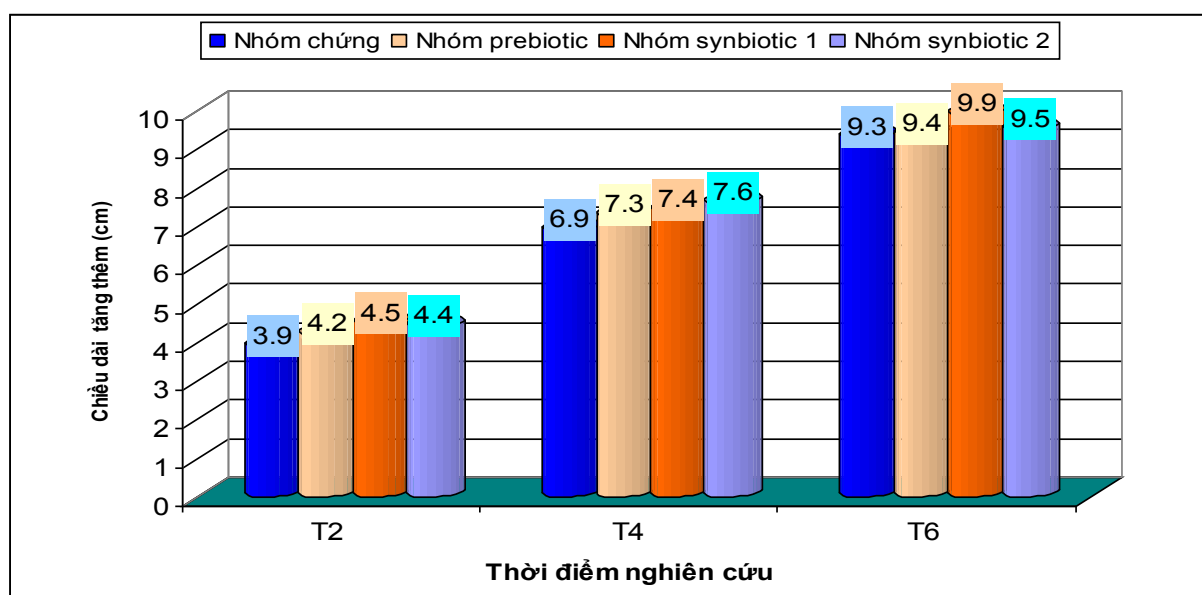
^a: $p < 0,05$; ^b: $p < 0,01$ vs. T₀, cùng nhóm (T test ghép cặp).

**Biểu đồ 3.3. Thay đổi chiều dài nằm của trẻ trước và sau can thiệp**

Nhận xét: Kết quả bảng 3.12, biểu đồ 3.3 và 3.4 cho thấy:

- Chiều dài nằm ban đầu ở nhóm chứng và nhóm prebiotic cao hơn một ít so với nhóm synbiotic 1 và 2, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu (ANOVA test)
- Chiều dài nằm trung bình cả 4 nhóm đều tăng có ý nghĩa thống kê ở các giai đoạn can thiệp ($p < 0,01$) (T test ghép cặp).
- Sau 6 tháng can thiệp chiều dài nằm của trẻ ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 cao hơn so với nhóm chứng và nhóm synbiotic 2. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Trẻ ở nhóm synbiotic 1 có mức tăng chiều dài nằm cao hơn hẳn so với nhóm chứng từ tháng can thiệp thứ hai trở đi cho đến khi kết thúc nghiên cứu ($p < 0,05$).
- Sau 6 tháng mức tăng chiều dài nằm của trẻ ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 2 có cao hơn so với nhóm chứng, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

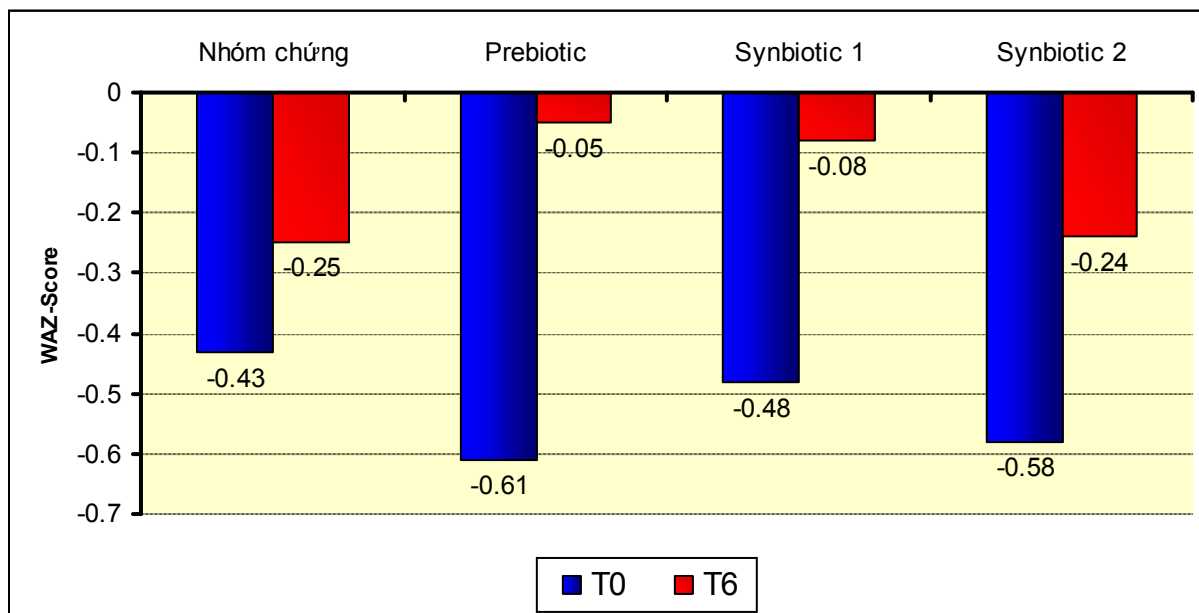


Biểu đồ 3.4. Mức tăng chiều dài nằm của trẻ trong các giai đoạn can thiệp

Bảng 3.13. Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo WAZ-Score tại các thời điểm nghiên cứu

Thời điểm	Nhóm chứng (n=55)	Nhóm prebiotic (n=60)	Nhóm synbiotic 1 (n=55)	Nhóm synbiotic 2 (n=55)	P*
T ₀	-0,43 ± 0,97	-0,61 ± 1,06	-0,48 ± 1,09	-0,58 ± 0,99	>0,05
T ₂	-0,59 ± 0,96	-0,44 ± 1,13	-0,40 ± 1,00	-0,50 ± 0,97	>0,05
T ₄	-0,63 ± 0,95	-0,46 ± 1,11	-0,41 ± 0,97	-0,53 ± 0,99	>0,05
T ₆	-0,25 ± 0,78	-0,05 ± 1,14	-0,08 ± 0,97	-0,24 ± 0,98	>0,05
T ₂ - T ₀	-0,16 ± 0,72	0,17 ± 0,92	0,09 ± 0,61	0,08 ± 0,65	>0,05
T ₄ - T ₀	-0,19 ± 0,77	0,15 ± 1,02	0,08 ± 0,70	0,04 ± 0,61	>0,05
T ₆ - T ₀	0,18 ± 0,81	0,55 ± 1,06	0,40 ± 0,75	0,33 ± 0,67	>0,05

Số liệu biểu thị bằng ($\bar{X} \pm SD$); *ANOVA test



Biểu đồ 3.5. Thay đổi WAZ-Score sau 6 tháng can thiệp

Nhận xét: Kết quả bảng 3.13 và biểu đồ 3.5 cho thấy

- Chỉ số Z-score cân nặng/ tuổi ở cả 4 nhóm trẻ là tương tự nhau tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu ($p > 0,05$) (*ANOVA test*).

- Sau thời gian 6 tháng can thiệp, Tình trạng dinh dưỡng của trẻ đều có sự cải thiện ở cả 4 nhóm trẻ. Sự cải thiện tốt nhất là ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 (Z-Score tăng từ -0,61/ -0,48 lên -0,05 và -0,08), sau đó là nhóm synbiotic 2 (Z-Score tăng từ -0,58 lên -0,24). Nhóm chứng cũng có sự cải thiện nhưng ở mức độ thấp hơn (Z-Score tăng từ -0,43 lên -0,25). Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ($p > 0,05$) (*ANOVA test*).

- Sau 6 tháng can thiệp, các nhóm can thiệp có mức tăng chỉ số Z-Score WAZ tốt hơn, đặc biệt là trẻ ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2 so với nhóm chứng (0,55; 0,40; 0,33 so với 0,18). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.14. Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo HAZ-Score tại các thời điểm nghiên cứu

Thời điểm	Nhóm chứng (n=55)	Nhóm prebiotic (n=60)	Nhóm synbiotic 1 (n=55)	Nhóm synbiotic 2 (n=55)	P*
T ₀	-0,79 ± 0,87	-0,75 ± 1,10	-0,91 ± 1,09	-0,86 ± 0,95	>0,05
T ₂	-1,04 ± 0,96	-0,90 ± 1,06	-0,95 ± 1,13	-0,91 ± 1,00	>0,05
T ₄	-0,89 ± 0,92	-0,73 ± 1,07	-0,82 ± 1,09	-0,67 ± 0,93	>0,05
T ₆	-0,98 ± 0,97	-0,91 ± 1,05	-0,89 ± 1,0	-0,92 ± 0,99	>0,05
T ₂ - T ₀	-0,25 ± 0,75	-0,16 ± 0,58	-0,03 ± 0,59	-0,06 ± 0,51	>0,05
T ₄ - T ₀	-0,10 ± 0,66	0,03 ± 0,69	0,09 ± 0,62	0,18 ± 0,64	>0,05
T ₆ - T ₀	-0,13 ± 0,79	-0,12 ± 0,79	0,10 ± 0,65	-0,05 ± 0,66	>0,05

Số liệu biểu thị bằng ($\bar{X} \pm SD$), *ANOVA test

Nhận xét: Kết quả bảng 3.14 cho thấy

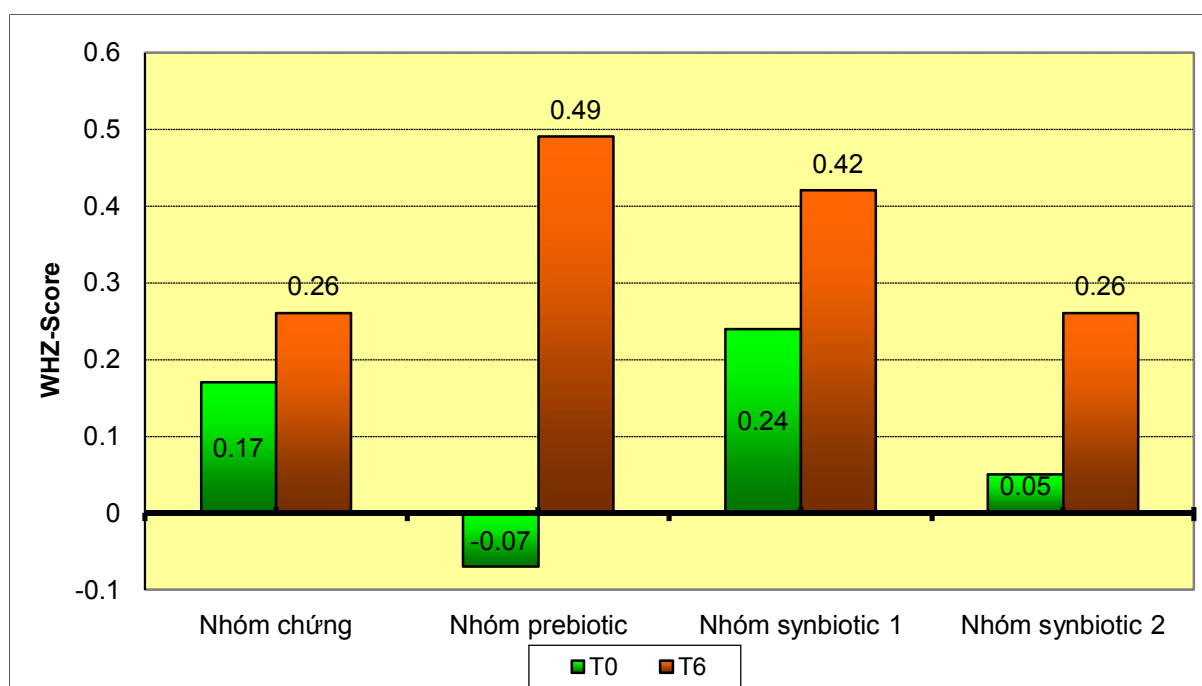
- Chỉ số Z-score chiều dài nằm/ tuổi ở cả 4 nhóm trẻ là tương tự nhau tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu ($p > 0,05$).
- Sau thời gian 6 tháng can thiệp, Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo chỉ tiêu này không có sự cải thiện ở cả 4 nhóm trẻ và không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$). Mức tăng chỉ số này sau 6 tháng can thiệp là không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ($p > 0,05$)

Bảng 3.15. Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo WHZ-Score tại các thời điểm nghiên cứu

Thời điểm	Nhóm chứng (n=55)	Nhóm prebiotic (n=60)	Nhóm synbiotic 1 (n=55)	Nhóm synbiotic 2 (n=55)	P*
T ₀	0,17 ± 1,09	-0,07 ± 0,96	0,24 ± 1,06	0,05 ± 1,02	>0,05
T ₂	0,08 ± 0,99	0,19 ± 0,96	0,28 ± 0,90	0,11 ± 0,91	>0,05
T ₄	-0,18 ± 0,92	-0,09 ± 1,00	0,08 ± 0,78	-0,21 ± 1,03	>0,05

Thời điểm	Nhóm chứng (n=55)	Nhóm prebiotic (n=60)	Nhóm synbiotic 1 (n=55)	Nhóm synbiotic 2 (n=55)	P*
T ₆	0,26 ± 0,77	0,49 ± 1,07	0,42 ± 0,90	0,26 ± 1,05	>0,05
T ₂ - T ₀	-0,09 ± 0,99	0,27 ± 1,07	0,04 ± 0,94	0,06 ± 0,79	>0,05
T ₄ - T ₀	-0,35 ± 1,02	0,01 ± 1,22	-0,16 ± 0,90	-0,26 ± 0,93	>0,05
T ₆ - T ₀	0,09 ± 1,10	0,56 ± 1,23	0,18 ± 1,08	0,20 ± 0,97	>0,05

Số liệu biểu thị bằng ($\bar{X} \pm SD$), *ANOVA test



Biểu đồ 3.6. Thay đổi WHZ-Score sau 6 tháng can thiệp

Nhận xét: Kết quả bảng 3.15 và biểu đồ 3.6 cho thấy

- Chỉ số Z-score cân nặng/ chiều dài nằm là tương tự nhau ở cả 4 nhóm trẻ tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu ($p > 0,05$).
- Sau thời gian 6 tháng can thiệp, Tình trạng dinh dưỡng của trẻ đều có sự cải thiện ở cả 4 nhóm trẻ. Sự cải thiện tốt nhất ở nhóm prebiotic (Z-Score tăng từ -0,07 lên 0,49), sau đó là nhóm synbiotic 1 và 2 (Z-Score tăng từ 0,24/ 0,05 lên 0,42 và 0,26). Nhóm chứng cũng có sự cải thiện nhưng ở mức độ thấp nhất (Z-Score tăng từ 0,17 lên 0,26). Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê

giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$). Mức tăng chỉ số này ở các nhóm nghiên cứu cao hơn, đặc biệt là ở nhóm prebiotic, nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2 so với nhóm chứng (0,56; 0,18; 0,20 so với 0,09). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Tình hình bệnh tật ở trẻ trong 6 tháng can thiệp:

Bảng 3.16. Tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn đường tiêu hóa trong 6 tháng can thiệp

Triệu chứng	Nhóm chứng (n= 55)	Nhóm prebiotic (n= 60)	Nhóm synbiotic 1 (n = 55)	Nhóm synbiotic 2 (n = 55)	P*
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
Tiêu chảy	72,7 (40)	73,3 (44)	83,6 (46)	72,7 (40)	>0,05
Nôn/trớ	52,7 (29)	36,7 (22)	43,6 (24)	47,3 (26)	>0,05
Đầy hơi	23,6 (13)	1,7 (1)*	21,8 (12)	9,1 (5)*	<0,05

* $p \leq 0,05$ so với Nhóm chứng (χ^2 -test)

Nhận xét: Kết quả bảng 3.16 cho thấy

- Tỷ lệ trẻ bị mắc các triệu chứng về nhiễm khuẩn đường tiêu hóa tương đối cao. Trong 6 tháng nghiên cứu có >70% số trẻ bị tiêu chảy, 36,7 đến 52,7% trẻ bị nôn/trớ ở cả 4 nhóm nghiên cứu. Tuy nhiên tỷ lệ này không có sự khác biệt giữa các nhóm ($p > 0,05$).

- Tỷ lệ trẻ bị đầy hơi thấp hơn nhiều so với 2 triệu chứng trên, trẻ ở nhóm prebiotic có tỷ lệ bị đầy hơi thấp nhất (1,7%), sau đó trẻ ở nhóm synbiotic 2 (9,1%), cao nhất là các trẻ ở nhóm chứng là 23,6% và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở 2 nhóm này so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Bảng 3.17. Tình hình nhiễm khuẩn đường tiêu hoá trong 6 tháng can thiệp

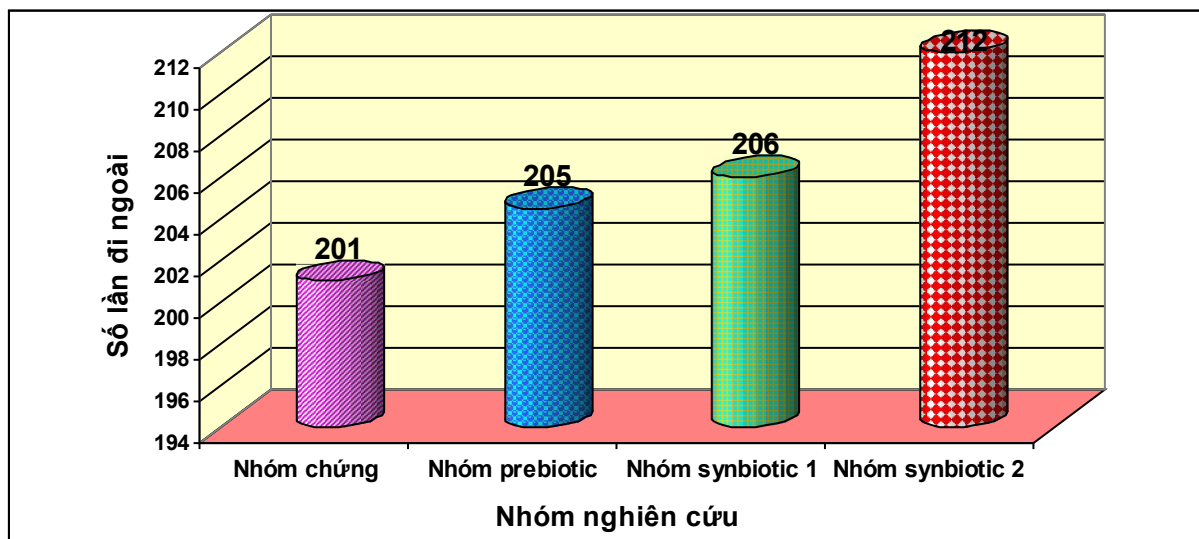
Tình hình bệnh	Nhóm chứng (n= 55)	Nhóm prebiotic (n= 60)	Nhóm synbiotic 1 (n = 55)	Nhóm synbiotic 2 (n = 55)	P^a
Số đợt bị tiêu chảy	1 [1;3]	2 [1;3]	3 [2;3]	1 [1;4]	>0,05
Số ngày bị tiêu chảy	5 [1;7]	4[2;7]	5 [3;6]	4 [1;9]	>0,05
Số ngày bị nôn/trớ	1 [0;1]	0 [0;1]	0 [0;1]	0 [0;1]	>0,05
Số đợt bị nôn/trớ	1 [0;1]	0 [0;1]	0 [0;1]	0 [0;1]	>0,05
Số lần đầy hơi	0 [0;0]	0 [0;0]	0 [0;0]	0 [0;0]	>0,05

Số liệu biểu thị bằng Median [CI 95%],^a Kruskal Wallis test

Nhận xét: Kết quả bảng 3.17 cho thấy:

-Tất cả các đặc điểm về tình trạng nhiễm khuẩn đường tiêu hóa như số đợt bị tiêu chảy, số ngày bị tiêu chảy là tương tự như nhau ở cả 4 nhóm nghiên cứu. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Tuy nhiên, số ngày bị tiêu chảy ở nhóm synbiotic 2 và prebiotic có xu hướng thấp hơn so với nhóm chứng (4 ngày/trẻ so với 5 ngày/trẻ ở nhóm chứng).

- Trẻ ở các nhóm synbiotic và prebiotic có số ngày và số đợt bị nôn/trớ đều thấp hơn so với trẻ ở nhóm chứng. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0.05$).



Biểu đồ 3.7. Số lần đại tiện của trẻ ở các nhóm nghiên cứu

Nhận xét: Kết quả biểu đồ 3.7 cho thấy trẻ ở các nhóm prebiotic và synbiotic tổng số lần đại tiện trong 6 tháng nghiên cứu có xu hướng nhiều hơn so với nhóm chứng (205 lần, 206 lần và 212 lần so với 201 lần/trẻ ở nhóm chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.18. Một số đặc điểm của phân trong 6 tháng can thiệp

Đặc điểm	Nhóm chứng (n= 55)	Nhóm prebiotic (n= 60)	Nhóm synbiotic 1 (n = 55)	Nhóm synbiotic 2 (n = 55)
Độ đặc lỏng của phân				
Phân mềm	139 [134;143]	136,5 [126;148]	142 [131;150]	142 ^a [136;147]
Phân cứng	1[0;2]	0[0;2]	0*[0;0]	0[0;1]
Phân lỏng	7[5;13]	9,5[7;14]	9[6;17]	9[3;18] ^a
Màu phân				
Màu vàng	144 [141;151]	146 [136;154]	149 [141;155]	151 ^a [143;159]
Màu nâu-đen	1[1;3]	0,5[0;2]	1[0;2]	1[0;2] ^a
Màu xanh	3[1;9]	3[0;5]	2[0;4]	2[0;5] ^a
Mùi phân				
Bình thường	154[149;157]	154[148;159]	155[150;161]	156[148;162] ^a
Khó chịu	1[0;2]	0[0;4]	1[0;3]	1[0;2]

Số liệu biểu thị bằng Median [CI 95%],^a Kruskal Wallis test , * $P < 0,01$ so với nhóm chứng, nhóm prebiotic, nhóm synbiotic 2 (Mann-Whitney test)

Nhận xét: Kết quả bảng 3.18 cho thấy:

- *Về độ đặc lỏng của phân:* số ngày trẻ đại tiện phân mềm và phân lỏng là tương tự như nhau ở cả 4 nhóm nghiên cứu (Kruskal Wallis test). Nhưng trẻ ở nhóm synbiotic 1 có số ngày đại tiện phân cứng thấp hơn so với các nhóm khác một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) (Mann- Whitney Test).

- *Về màu của phân:* Số ngày trẻ đi phân màu vàng cao hơn, phân màu xanh thấp hơn ở các nhóm trẻ được uống sữa bổ sung synbiotic, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Kruskal Wallis test).

- *Về mùi của phân:* Không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$) (Kruskal Wallis test).

Bảng 3.19. Tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn đường hô hấp ở trẻ trong 6 tháng can thiệp

Triệu chứng	Nhóm chứng (n= 55)	Nhóm prebiotic (n= 60)	Nhóm synbiotic 1 (n = 55)	Nhóm synbiotic 2 (n = 55)	P ^a
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
Ho	92,7 (51)	81,7 (49)	90,9 (50)	87,3 (48)	>0,05
Sốt	78,2 (43)	70,0 (42)	76,4 (42)	76,4 (42)	>0,05
Thở khò khè	38,2 (21)	41,7 (25)	41,8 (23)	36,4 (20)	>0,05
Chảy nước mũi	85,5 (47)	73,3 (44)	85,5 (47)	76,4 (42)	>0,05
Nghẹt mũi	69,1 (38)	53,3 (32)	67,3 (37)	63,6 (35)	>0,05

^a χ^2 -test

Nhận xét: Kết quả bảng 3.19 cho thấy

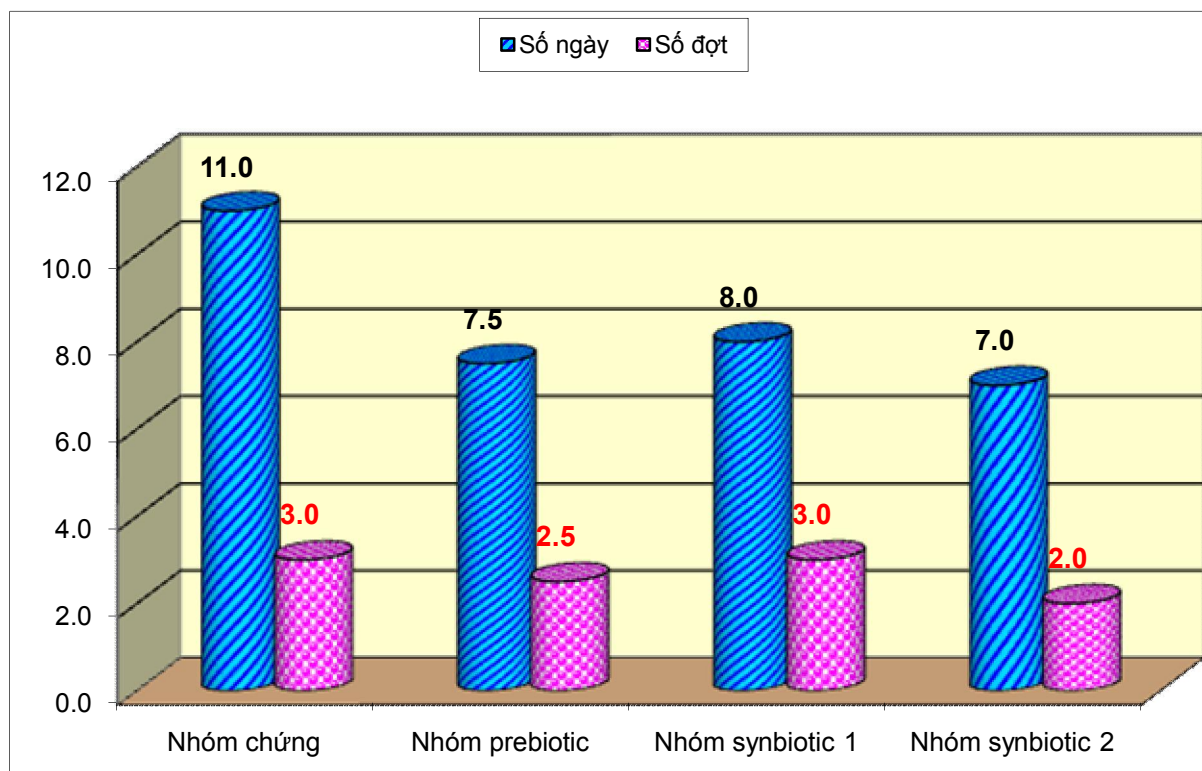
- Tỷ lệ trẻ bị mắc các triệu chứng ho và chảy nước mũi rất cao, từ 81,7% - 92,7% số trẻ bị ho và 73,3% - 85,5% số trẻ bị chảy nước mũi trong 6 tháng nghiên cứu. Trẻ ở nhóm chứng có tỷ lệ mắc cao nhất, thấp nhất là trẻ ở nhóm prebiotic. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 4 nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

- Tỷ lệ trẻ bị sốt và nghẹt mũi có thấp hơn, tuy nhiên vẫn ở mức tương đối cao. Từ 70% đến 78,2% số trẻ bị sốt và 53,3% - 69,1% trẻ bị nghẹt mũi. Cao nhất vẫn là các trẻ ở nhóm chứng và thấp nhất là các trẻ ở nhóm prebiotic. Tuy nhiên cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).
- Tỷ lệ trẻ bị thở khò khè là thấp nhất, tuy nhiên vẫn có tới 36,4% đến 41,8% số trẻ bị thở khò khè.

Bảng 3.20. Tình hình bệnh nhiễm khuẩn hô hấp cấp và điều trị bệnh sau 6 tháng can thiệp

Tình hình bệnh	Nhóm chứng (n= 55)	Nhóm prebiotic (n= 60)	Nhóm synbiotic 1 (n = 55)	Nhóm synbiotic 2 (n = 55)	p ^a
Số ngày bị sốt	3 [2;5]	3 [1;4]	3 [1;4]	2 [1;4]	>0,05
Số đợt bị sốt	2 [1;2]	2 [1;2]	1 [1;2]	1 [1;2]	>0,05
Số ngày bị ho	11[7;14]	7,5[5;12]	8 [7;12]	7[5;11]	>0,05
Số đợt bị ho	3 [2;4]	2,5 [1;3]	3 [2;3]	2 [2;2]	>0,05
Số ngày uống kháng sinh	8 [5;11]	8[5;10]	10[4;14]	5 [3;9]	>0,05
Số đợt uống kháng sinh	2 [1;3]	2 [1;2]	2 [1;3]	1 [1;2]	>0,05
Số lần khám bác sĩ	3 [2;4]	3 [1;4]	3 [1;4]	2 [1;4]	>0,05

Số liệu biểu thị bằng Median [CI 95%], ^a Kruskal Wallis test



Biểu đồ 3.8. Số ngày và số đợt bị ho của trẻ ở các nhóm nghiên cứu

Nhận xét: Kết quả bảng 3.20 và biểu đồ 3.8 cho thấy:

- Về triệu chứng ho: số ngày bị ho ở trẻ thuộc nhóm chứng có xu hướng cao hơn so với trẻ ở các nhóm can thiệp và thấp nhất là ở trẻ thuộc nhóm synbiotic 2 (11 so với 7,5, 8 và 7). Số đợt bị ho cũng thấp nhất ở nhóm synbiotic 2 (2 đợt/trẻ/6 tháng), rồi đến nhóm prebiotic (2,5 đợt/trẻ/6 tháng) so với nhóm chứng (3 đợt/trẻ/6 tháng). Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).
- Số ngày bị sốt và số đợt bị sốt là tương tự như nhau ở cả 4 nhóm ($p > 0,05$).
- Số ngày uống kháng sinh và số đợt uống kháng sinh thấp nhất ở nhóm synbiotic 2 so với 3 nhóm còn lại. Tuy nhiên sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.21. Tình hình nhiễm khuẩn đường hô hấp trong 6 tháng can thiệp

Triệu chứng		Nhóm chứng (n= 55)	Nhóm prebiotic (n= 60)	Nhóm synbiotic 1 (n = 55)	Nhóm synbiotic 2 (n = 55)	P ^a
Thở khò khè	Số ngày	0 [0;1]	0 [0;2]	0 [0;1]	0 [0;1]	>0,05
	Số đợt	0 [0;1]	0 [0;1]	0 [0;1]	0 [0;0]	>0,05
Chảy nước mũi	Số ngày	10[6;14]	7 [4;12]	10[5;13]	6[3;10]	>0,05
	Số đợt	3 [2;4]	3 [1;4]	3 [2;4]	2 [1;4]	>0,05
Nghẹt mũi	Số ngày	3 [2;4]	2 [0;3]	2 [1;6]	2 [0;4]	>0,05
	Số đợt	1 [1;2]	1 [0;2]	1 [1;2]	1 [0;2]	>0,05

Số liệu biểu thị bằng Median [CI 95%], ^a Kruskal Wallis test

Nhận xét: Kết quả bảng 3.21 cho thấy

- Số ngày/số đợt thở khò khè là tương tự như nhau ở 4 nhóm nghiên cứu ($p>0,05$).
- Về triệu chứng chảy nước mũi: số ngày và số đợt bị chảy nước mũi có xu hướng thấp hơn ở trẻ thuộc nhóm synbiotic 2 so với các nhóm kia. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).
- Về triệu chứng nghẹt mũi: số ngày bị nghẹt mũi thấp hơn ở cả 3 nhóm can thiệp so với nhóm chứng, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

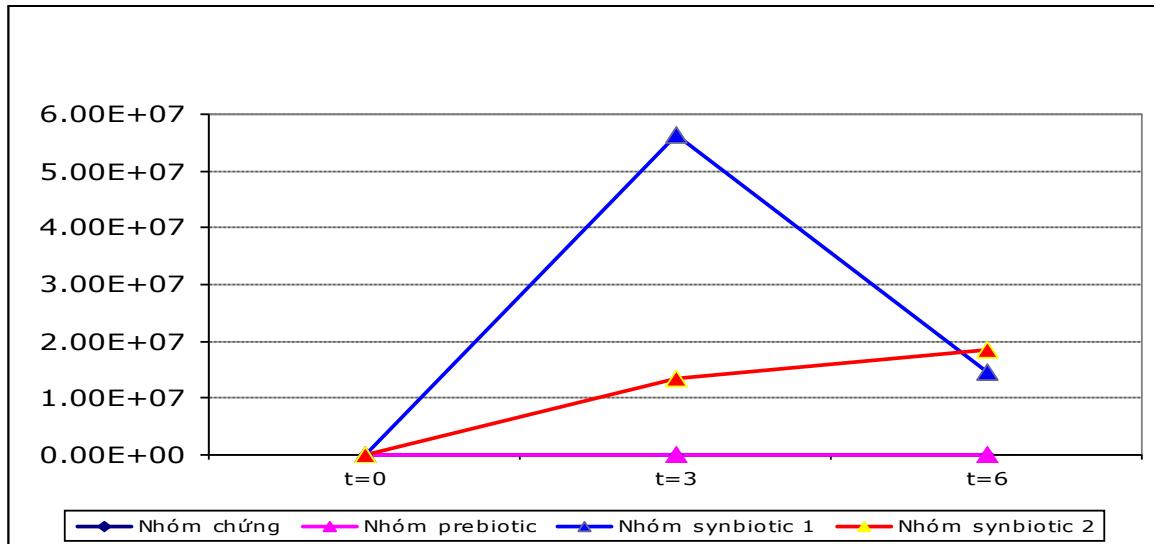
3.5. Sự thay đổi hệ vi khuẩn chí đường ruột của trẻ trong 6 tháng can thiệp:

Bảng 3.22. Mẫu phân có BB12 (+)^a tại các thời điểm nghiên cứu (n = 50)

Thời điểm nghiên cứu	Nhóm chứng n=16	Prebiotic n = 9	Synbiotic 1 n = 16	Synbiotic 2 n = 9	P (χ^2 -test)
Ban đầu	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	>0,05
Sau 3 tháng	18,8 (3)	11,1 (1)	81,3 (13)*	77,8 (7)*	<0,001
Sau 6 tháng	0,0 (0)	0,0 (0)	43,8 (7)*	66,7 (6)*	<0,001

Số liệu biểu thị bằng % (n). ^aĐược đánh giá là (+) khi số lượng vi khuẩn BB12 $\geq 10^5$ CFU/g phân khô; * $p<0,01$ so với nhóm chứng (χ^2 -test)

Nhận xét: Tỷ lệ trẻ có *BB12* (+) ở 2 nhóm synbiotic 1 và nhóm synbiotic 2 là 81,3% và 77,8% ở thời điểm sau 3 tháng can thiệp; sau 6 tháng là 43,8% và 66,7%, cao hơn hẳn so với nhóm chứng và nhóm prebiotic. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.



Biểu đồ 3.9. Thay đổi số lượng *BB12* trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu

Nhận xét:

Sau 3 tháng can thiệp, số lượng vi khuẩn *BB12* tăng lên rất nhanh so với thời điểm ban đầu ở nhóm synbiotic 1, sau đó đến nhóm synbiotic 2. Nhưng sau 6 tháng can thiệp, số lượng vi khuẩn này lại giảm xuống ở nhóm synbiotic 1 nhưng vẫn ở mức cao hơn so với ban đầu. Còn ở nhóm synbiotic 2 vẫn duy trì ở xu hướng tăng. Nhóm chứng và nhóm prebiotic hầu như không thay đổi trong suốt thời gian can thiệp.

Bảng 3.23. Hiệu quả sau 6 tháng can thiệp lên vi khuẩn có ích

Thời điểm	Nhóm chứng n = 16	Prebiotic n = 9	Synbiotic 1 n = 16	Synbiotic 2 n = 9	P Kruskal Wallis
Tổng số vi khuẩn					
T ₀	1,06.10 ¹¹ [6,61.10 ¹⁰ ;1,46.10 ¹¹]	0,85.10 ¹¹ [3,52.10 ¹⁰ ;1,35.10 ¹¹]	1,10.10 ¹¹ [5,11.10 ¹⁰ ;1,69.10 ¹¹]	1,49.10 ¹¹ [7,09.10 ¹⁰ ;2,26.10 ¹¹]	>0,05
T ₃	8,02.10 ¹⁰ [5,71.10 ¹⁰ ;1,03.10 ¹¹]	6,98.10¹⁰ [2,46.10 ¹⁰ ;1,14.10 ¹¹]	8,55.10 ¹⁰ [5,19.10 ¹⁰ ;1,18.10 ¹¹]	8,69.10 ¹⁰ [6,78.10 ¹⁰ ;1,08.10 ¹¹]	>0,05
T ₆	6,49.10 ¹⁰ [3,42.10 ¹⁰ ;9,57.10 ¹⁰]	5,96.10 ¹⁰ [2,50.10 ¹⁰ ;9,42.10 ¹⁰]	1,70.10^{10a**} [0,18.10 ¹⁰ ;3,58.10 ¹⁰]	5,06.10 ¹⁰ [1,74.10 ¹⁰ ;8,38.10 ¹⁰]	<0,01
Bifidobacteria					
T ₀	1,06.10 ¹⁰ [4,62.10 ⁹ ;1,66.10 ¹⁰]	0,92.10 ¹⁰ [3,35.10 ⁹ ;1,51.10 ¹⁰]	0,98.10 ¹⁰ [3,51.10 ⁹ ;1,61.10 ¹⁰]	1,32.10 ¹⁰ [3,04.10 ⁹ ;2,34.10 ¹⁰]	>0,05
T ₃	1,64.10 ¹⁰ [8,39.10 ⁹ ;2,42.10 ¹⁰]	1,59.10 ¹⁰ [1,21.10 ⁹ ;3,08.10 ¹⁰]	2,09.10¹⁰ [9,93.10 ⁹ ;3,16.10 ¹⁰]	1,64.10 ¹⁰ [9,62.10 ⁹ ;2,31.10 ¹⁰]	>0,05
T ₆	1,28.10 ¹⁰ [4,07.10 ⁹ ;2,16.10 ¹⁰]	0,73.10 ¹⁰ [1,40.10 ⁹ ;1,60.10 ¹⁰]	0,21.10 ^{10 c*} [0,60.10 ⁹ ;0,49.10 ¹⁰]	1,03.10 ¹⁰ [0,34.10 ⁹ ;2,03.10 ¹⁰]	<0,05
Lactobacilli					
T ₀	3,10.10 ⁶ [0,12.10 ⁶ ;6,09.10 ⁶]	5,73.10 ⁶ [4,47.10 ⁶ ;15,93.10 ⁶]	2,97.10 ⁶ [0,49.10 ⁶ ;5,46.10 ⁶]	0,46.10 ⁶ [0,41.10 ⁵ ;0,95.10 ⁶]	>0,05
T ₃	1,79.10 ⁷ [1,01.10 ⁶ ;3,45.10 ⁷]	2,88.10⁷ [2,00.10 ⁶ ;7,65.10 ⁷]	2,87.10⁷ [4,23.10 ⁶ ;6,21.10 ⁷]	1,79.10 ⁷ [4,72.10 ⁶ ;4,05.10 ⁷]	>0,05
T ₆	8,27.10⁷ [4,72.10 ⁷ ;21,26.10 ⁷]	2,0.10 ⁷ [1,51.10 ⁷ ;5,91.10 ⁷]	2,33.10 ⁷ [0,94.10 ⁶ ;4,76.10 ⁷]	5,69.10 ⁷ [4,94.10 ⁷ ;16,31.10 ⁷]	>0,05
BB12					
T ₀	0	0	0	0	
T ₃	0,11.10 ⁶ [0,10.10 ⁶ ;0,19.10 ⁶]	0,57.10 ³ -	56,5.10 ^{6b**} [19,04.10 ⁶ ;94,33.10 ⁶]	13,3.10 ^{6b**} [3,86.10 ⁶ ;30,47.10 ⁶]	<0,01
T ₆	0	0	1,47.10 ^{7b**} [0,25.10 ⁷ ;3,2.10 ⁶]	1,85.10 ^{7b**} [0,18.10 ⁷ ;3,90.10 ⁷]	<0,01
T ₃ -T ₀	0,11.10 ⁶	0,57.10 ³	56,5.10^{6b**}	13,3.10^{6b**}	<0,01
T ₆ -T ₀	0	0	1,47.10^{7b**}	1,85.10^{7b**}	<0,01

Số liệu biểu thị bằng \bar{X} [CI 95%]

a* : p<0,05 và a** : p<0,01 vs. nhóm chứng và nhóm prebiotic, nhóm synbiotic 2 (Mann-Whitney test).

$b^* p < 0,05$ và $b^{**} : p < 0,01$ vs. nhóm chứng và nhóm prebiotic (Mann-Whitney test).
 $c^* p < 0,05$ và $c^{**} : p < 0,01$ vs. nhóm chứng (Mann-Whitney test).

Nhận xét: Không có sự khác biệt về số lượng các loại vi khuẩn: tổng số vi khuẩn, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *BB12* trong phân của trẻ tại thời điểm điều tra ban đầu ở 4 nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

Sau 3 tháng can thiệp, kết quả phân tích về vi sinh vật cho thấy:

- Số lượng trung bình về tổng số vi khuẩn trong phân của trẻ ở nhóm prebiotic thấp hơn so với 3 nhóm kia ($6,98.10^{10}$ so với $8,02.10^{10}$, $8,55.10^{10}$ và $8,69.10^{10}$). Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).
- Số lượng trung bình về *Bifidobacteria* trong phân của trẻ ở nhóm synbiotic 1 cao hơn so với nhóm chứng và các nhóm còn lại ($2,09.10^{10}$ so với $1,64.10^{10}$, $1,59.10^{10}$, $1,64.10^{10}$). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.
- Số lượng trung bình về *lactobacilli* trong phân của trẻ ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 cao hơn so với nhóm chứng ($2,88.10^7$ và $2,87.10^7$ so với $1,79.10^7$ ở nhóm chứng). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.
- Số lượng trung bình về *BB12* trong phân của trẻ ở nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2 cao hơn hẳn so với nhóm chứng và nhóm prebiotic ($56,5.10^6$ và $13,3.10^6$ so với $0,11.10^6$ và $0,57.10^3$) ($p < 0,01$).
- Số lượng *BB12* đều tăng ở cả 4 nhóm trẻ, mức tăng cao nhất là ở nhóm synbiotic 1 (tăng $56,5.10^6$), rồi đến nhóm synbiotic 2 (tăng $13,3.10^6$) so với nhóm chứng và nhóm prebiotic và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).
- Số lượng các vi khuẩn có lợi *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* tăng lên nhiều hơn ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 so với nhóm chứng. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Sau 6 tháng can thiệp, kết quả phân tích về vi sinh vật cho thấy:

- Số lượng trung bình về tổng số vi khuẩn trong phân của trẻ ở nhóm synbiotic 1 thấp hơn so với 3 nhóm kia ($1,70.10^{10}$ so với $6,49.10^{10}$; $5,96.10^{10}$ và $5,06.10^{10}$) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).
- Khác hẳn so với thời điểm 3 tháng, sau 6 tháng can thiệp, số lượng vi khuẩn có lợi *Bifidobacteria* đã giảm đi ở cả 3 nhóm nghiên cứu, thậm chí còn thấp hơn so với thời điểm ban đầu, chỉ có nhóm chứng là còn duy trì ở mức cao và cao hơn hẳn so với nhóm synbiotic 1 ($p < 0,05$). Còn với vi khuẩn *Lactobacilli*, số lượng của vi khuẩn này vẫn giữ ở mức tăng lên ở cả 4 nhóm nghiên cứu.

- Về vi khuẩn *BB12*, chỉ còn tìm thấy vi khuẩn này ở 2 nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2 sau 6 tháng can thiệp. Hàm lượng trung bình về *BB12* và mức tăng số lượng này sau 6 tháng can thiệp ở nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2 cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng và nhóm prebiotic ($1,47.10^7$ và $1,85.10^7$ so với 0) ($p < 0,01$).

Bảng 3.24. Hiệu quả sau 6 tháng can thiệp lên vi khuẩn có hại

Thời điểm	Nhóm chứng n = 16	Prebiotic n = 9	Synbiotic 1 n = 16	Synbiotic 2 n = 9	P Kruskal Wallis
Bacteroides					
T ₀	1,02.10 ⁹ [0,51.10 ⁹ ;2,53.10 ⁹]	0,03.10 ⁹ [0,03.10 ⁹ ;0,06.10 ⁹]	1,86.10 ⁹ [0,33.10 ⁹ ;4,00.10 ⁹]	3,34.10 ⁹ [0,37.10 ⁹ ;6,32.10 ⁹]	>0,05
T ₃	0,96.10 ⁹ [0,48.10 ⁹ ;2,38.10 ⁹]	0,59.10⁹ [0,18.10 ⁹ ;1,35.10 ⁹]	4,13.10 ⁹ [0,41.10 ⁹ ;7,95.10 ⁹]	1,58.10 ⁹ [0,03.10 ⁹ ;3,23.10 ⁹]	>0,05
T ₆	7,60.10 ⁸ [0,98.10 ⁸ ;16,11.10 ⁸]	5,81.10 ⁸ [1,84.10 ⁸ ;13,48.10 ⁸]	0,66.10⁸ [0,04.10 ⁸ ;1,27.10 ⁸]	2,44.10 ⁸ [0,31.10 ⁸ ;4,57.10 ⁸]	>0,05
Clostridia 4x					
T ₀	65,4.10 ⁶ [19,78.10 ⁶ ;15,07.10 ⁷]	1,92.10 ⁶ [0,49.10 ⁶ ;4,34.10 ⁶]	1,27.10 ⁶ [0,07.10 ⁶ ;2,61.10 ⁶]	2,53.10 ⁶ [2,43.10 ⁶ ;7,48.10 ⁶]	>0,05
T ₃	1,09.10 ⁷ [0,45.10 ⁷ ;2,57.10 ⁷]	7,47.10 ⁷ [6,45.10 ⁷ ;22,89.10 ⁷]	10,6.10 ⁷ [9,18.10 ⁷ ;30,67.10 ⁷]	0,68.10 ⁷ [0,65.10 ⁷ ;1,99.10 ⁷]	>0,05
T ₆	4,72.10 ⁶ [0,73.10 ⁶ ;10,17.10 ⁶]	5,04.10 ⁶ [1,30.10 ⁶ ;11,39.10 ⁶]	14,9.10 ⁶ [13,07.10 ⁶ ;48,89.10 ⁶]	8,49.10 ⁶ [8,49.10 ⁶ ;25,48.10 ⁶]	>0,05
E.coli					
T ₀	2,99.10 ⁸ [0,70.10 ⁸ ;5,28.10 ⁸]	4,73.10 ⁸ [1,53.10 ⁸ ;7,93.10 ⁸]	1,65.10 ⁸ [0,79.10 ⁸ ;2,50.10 ⁸]	3,08.10 ⁸ [1,10.10 ⁸ ;3,85.10 ⁸]	>0,05
T ₃	6,38.10 ⁸ [2,21.10 ⁸ ;10,48.10 ⁸]	1,94.10⁸ [0,92.10 ⁸ ;2,96.10 ⁸]	4,55.10 ⁸ [0,95.10 ⁸ ;8,09.10 ⁸]	8,36.10 ⁸ [0,54.10 ⁸ ;16,37.10 ⁸]	>0,05

Số liệu biểu thị bằng \bar{x} [CI 95%]

Nhận xét: Không có sự khác biệt về số lượng các loại vi khuẩn như *Bacteroides*, *Clostridia 4x*, *E.coli* trong phân của trẻ tại thời điểm điều tra ban đầu ở 4 nhóm nghiên cứu ($p>0,05$).

Sau 3 tháng can thiệp, kết quả phân tích về vi sinh vật cho thấy:

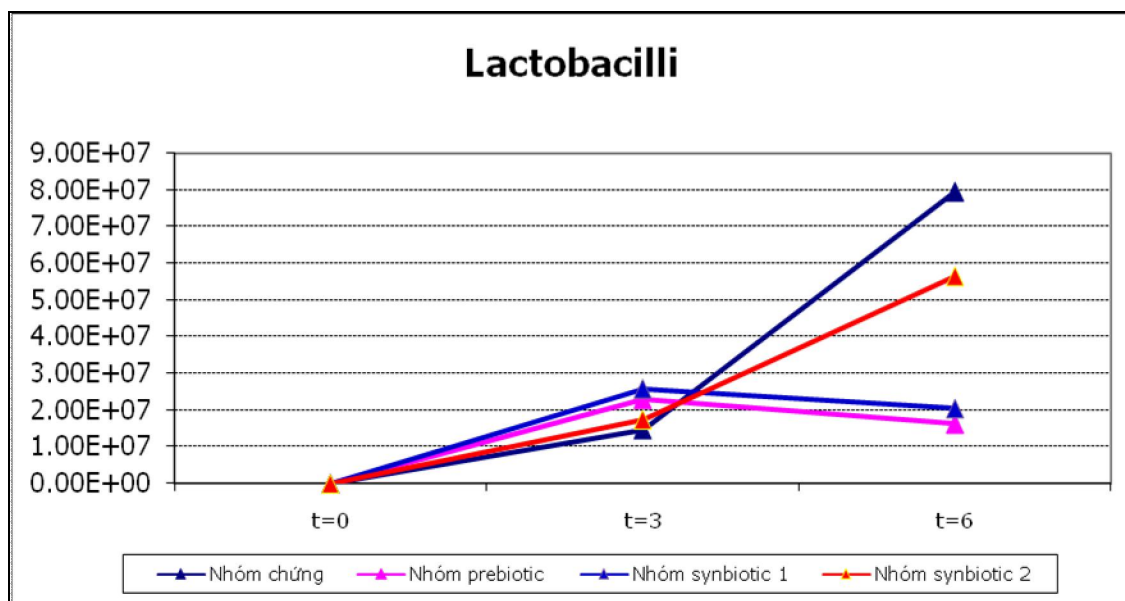
- Số lượng trung bình về vi khuẩn *Bacteroides* và *E.coli* trong phân của trẻ ở nhóm prebiotic thấp hơn so với 3 nhóm kia ($0,59.10^9$ so với $0,96.10^9$, $4,13.10^9$ và $1,58.10^9$ đối với *Bacteroides*; $1,94.10^8$ so với $6,38.10^8$, $4,55.10^8$ và $8,36.10^8$ đối với *E.coli*). Tuy nhiên các sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

- Số lượng trung bình *E.coli* ở nhóm chứng, nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2 đều có sự tăng lên, chỉ riêng ở nhóm prebiotic thì số lượng vi khuẩn này lại giảm xuống. Tuy nhiên những sự thay đổi này không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Sau 6 tháng can thiệp, kết quả phân tích vi sinh vật cho thấy:

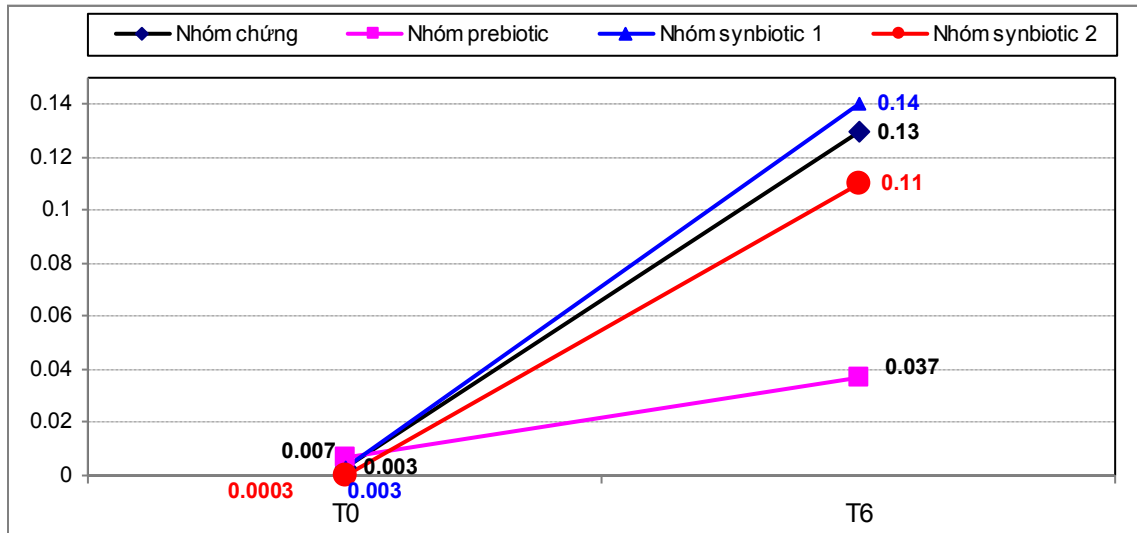
- Số lượng trung bình về vi khuẩn *Bacteroides* và *E.coli* trong phân của trẻ ở nhóm synbiotic 1 thấp hơn so với 3 nhóm kia ($0,66.10^8$ so với $7,60.10^8$, $5,81.10^8$ và $2,44.10^8$ đối với *bacteroides*; $0,24.10^8$ so với $7,57.10^8$, $10,4.10^8$ và $0,69.10^8$ đối với *E.coli*). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

- Số lượng trung bình *E.coli* ở 2 nhóm synbiotic đều giảm đi sau 6 tháng can thiệp, khác hẳn so với nhóm chứng và nhóm prebiotic, tuy nhiên những sự thay đổi này cũng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).



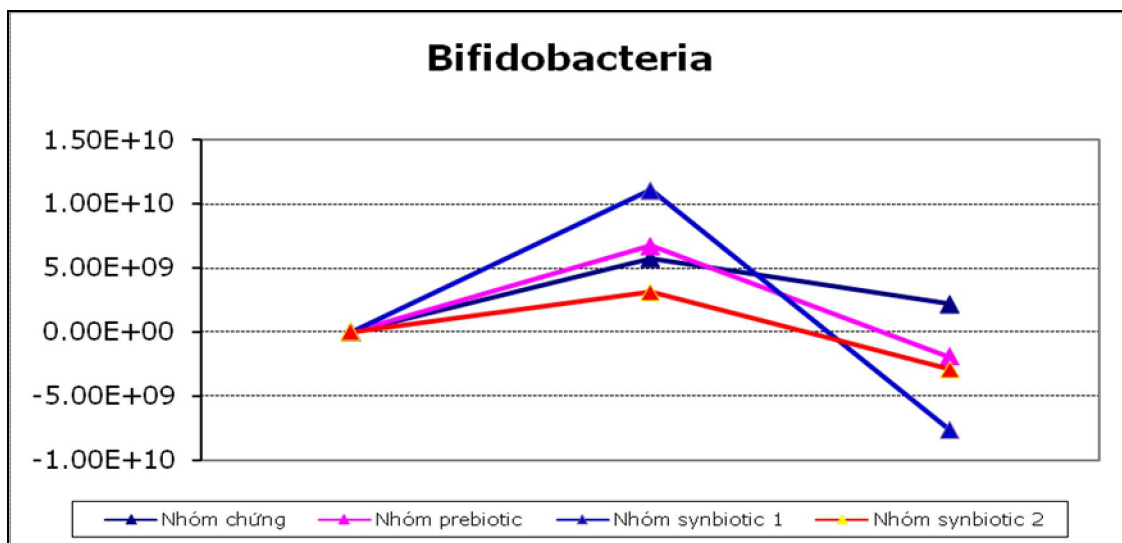
Biểu đồ 3.10. Thay đổi số lượng *Lactobacilli* trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu

Nhận xét: Số lượng *Lactobacilli* đều tăng lên ở cả 4 nhóm nghiên cứu sau 3 tháng can thiệp và vẫn duy trì xu hướng tăng sau 6 tháng ở nhóm chứng và nhóm synbiotic 2. Còn ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 có xu hướng giảm, tuy nhiên vẫn ở mức cao hơn so với thời điểm ban đầu.



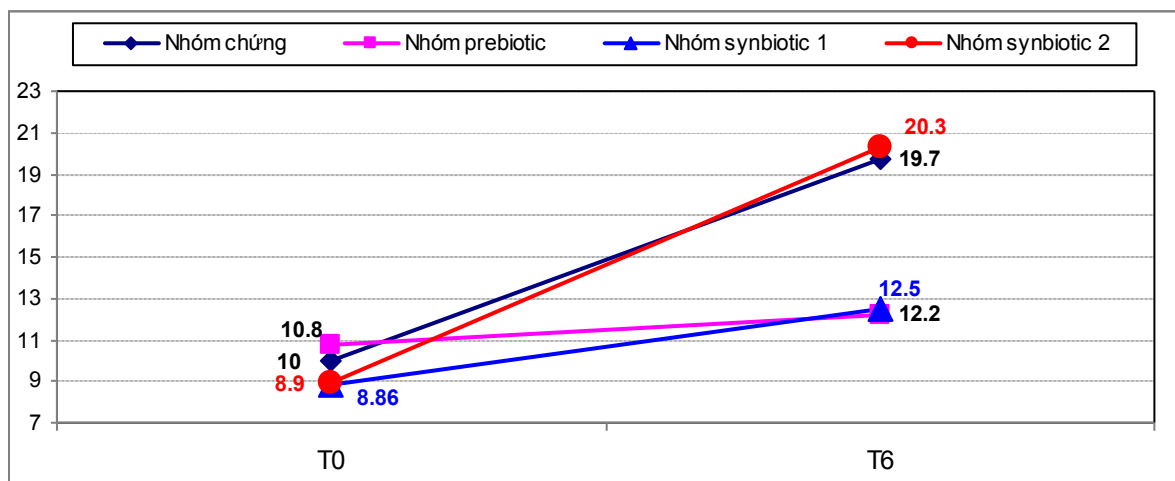
Biểu đồ 3.11. Tỷ lệ *Lactobacilli* trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp

Nhận xét: Tỷ lệ vi khuẩn có lợi *Lactobacilli* trên tổng số vi khuẩn trong phân sau can thiệp đã tăng lên ở cả 4 nhóm nghiên cứu, trong đó tăng cao nhất là ở nhóm synbiotic 1, rồi đến nhóm chứng và nhóm synbiotic 2.



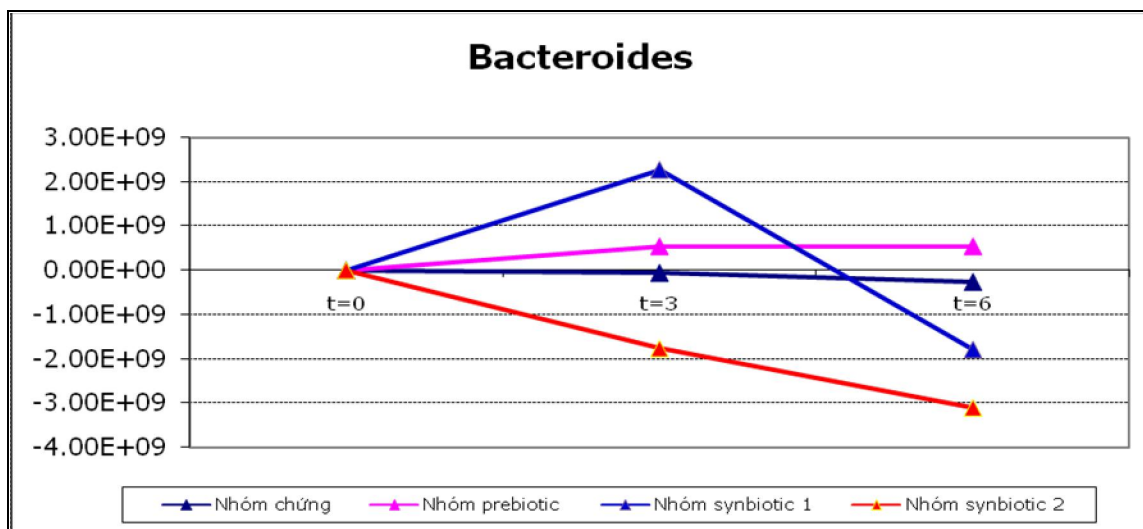
Biểu đồ 3.12. Thay đổi số lượng *Bifidobacteria* trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu

Nhận xét: Số lượng *Bifidobacteria* tăng lên ở cả 4 nhóm nghiên cứu sau 3 tháng can thiệp, nhưng sau đó lại giảm ở cả 3 nhóm can thiệp.



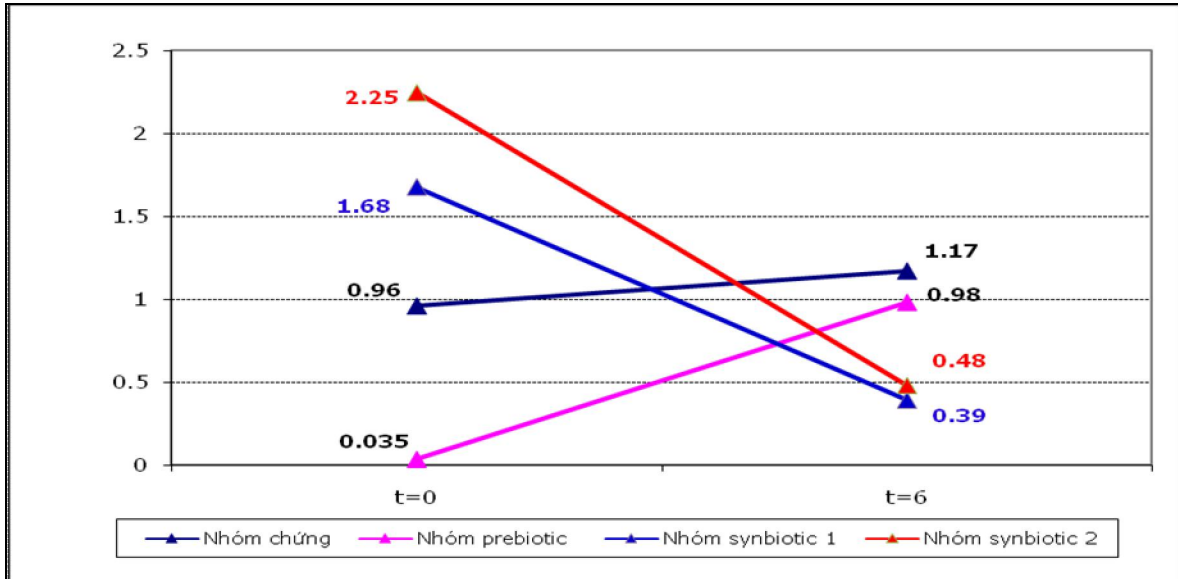
Biểu đồ 3.13. Tỷ lệ *Bifidobacteria* trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp

Nhận xét: Tỷ lệ vi khuẩn *Bifidobacteria* trên tổng số vi khuẩn trong phân sau can thiệp đã tăng lên ở cả 4 nhóm nghiên cứu, trong đó tăng cao nhất là ở nhóm synbiotic 2, rồi đến nhóm chứng và nhóm synbiotic 1. Thấp nhất cũng là ở nhóm prebiotic.



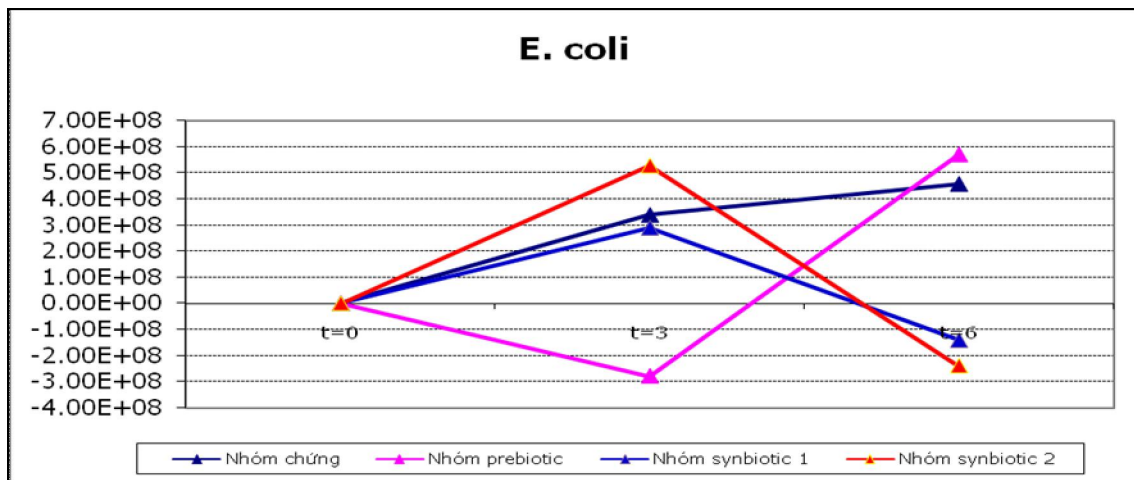
Biểu đồ 3.14. Thay đổi số lượng *Bacteroides* trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu

Nhận xét: Số lượng vi khuẩn *Bacteroides* đã giảm đi sau thời gian can thiệp ở nhóm synbiotic 1 và nhóm synbiotic 2. Còn ở nhóm chứng và nhóm prebiotic hầu như rất ít thay đổi.



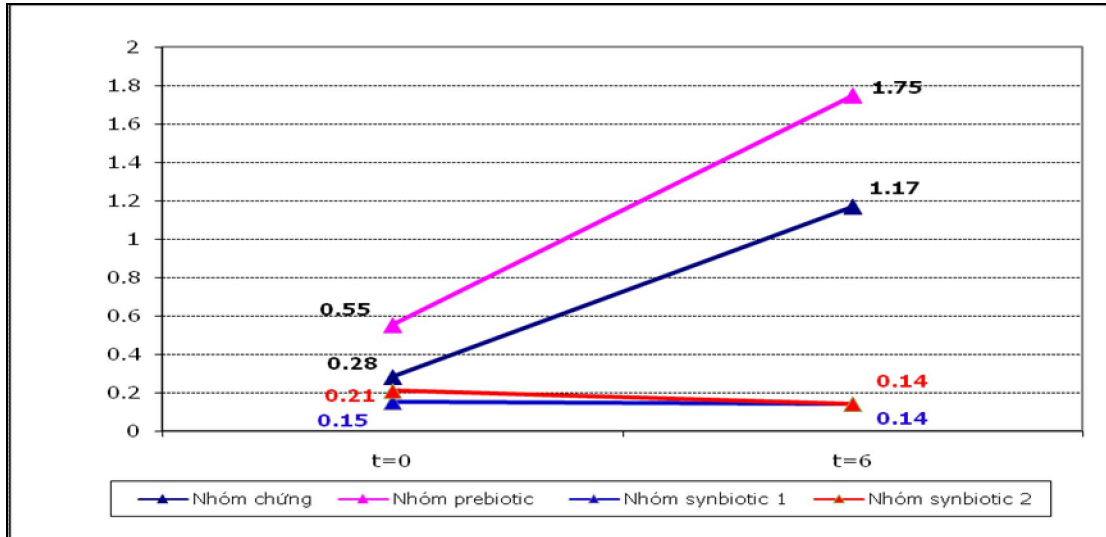
Biểu đồ 3.15. Thay đổi tỷ lệ *Bacteroides* trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp

Nhận xét: Tỷ lệ vi khuẩn *bacteroides* trên tổng số vi khuẩn trong phân sau can thiệp đã được giảm đi rất nhiều ở 2 nhóm synbiotic, nhất là nhóm synbiotic 2, trong khi lại tăng lên ở nhóm chứng và nhóm prebiotic.



Biểu đồ 3.16. Thay đổi số lượng *E.coli* trong phân tại các thời điểm nghiên cứu so với ban đầu

Nhận xét: Sau 6 tháng can thiệp, số lượng *E. coli* trong phân tăng lên ở nhóm chứng và nhóm prebiotic, trong khi lại giảm đi ở nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2 so với thời điểm ban đầu.



Biểu đồ 3.17. Thay đổi tỷ lệ *E. Coli* trên tổng số vi khuẩn trong phân trước và sau can thiệp

Nhận xét: Cũng tương tự như đối với vi khuẩn *bacteroide*, tỷ lệ *E. coli* trên tổng số vi khuẩn trong phân sau can thiệp đã được giảm đi tuy không nhiều ở 2 nhóm synbiotic, trong khi lại tăng lên rất cao ở nhóm chứng và nhóm prebiotic.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Thực trạng NCBSM, thực hành ăn bổ sung, tình hình nuôi dưỡng và bệnh tật của trẻ:

Kết quả điều tra ban đầu trên 322 trẻ cho thấy chỉ có 44,4 % bà mẹ cho con bú ngay trong vòng ½ giờ sau sinh và vẫn còn 15,2 % bà mẹ cho con bú sau 24h (bảng 3.1). Có đến hơn 50% bà mẹ vẫn còn cho trẻ uống sữa công thức cho trẻ sơ sinh, nước đường, mật ong hoặc các thức ăn khác trước khi cho bú lần đầu (bảng 3.2). Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ có 2/322 trẻ (0,7 %) được bắt đầu cho ăn bổ sung ở độ tuổi 5-6 tháng, cũng chỉ có 10,4 % trẻ được ăn bổ sung ở độ tuổi 4-5 tháng, còn lại gần 90% bà mẹ bắt đầu cho trẻ ăn bổ sung dưới 4 tháng tuổi, trong đó trẻ được ăn bổ sung trong vòng 2 tháng đầu là 18,0%, tháng tuổi trung bình trẻ bắt đầu được ăn bổ sung là 3,4 tháng tuổi (bảng 3.3). Kết quả nghiên cứu tập tính nuôi con dưới 24 tháng tuổi của các bà mẹ tại phường Láng Hạ, quận Đống Đa, Hà Nội cũng cho thấy tỷ lệ trẻ được bú mẹ sớm trong vòng ½ giờ đầu sau sinh thấp và chỉ đạt 40% [5], Một nghiên cứu khác cũng được tiến hành tại 1 huyện của tỉnh Thái Nguyên vào năm 2002 cũng cho thấy tỷ lệ trẻ được bú mẹ trong vòng ½ giờ đầu chỉ 37,8% thấp hơn trong nghiên cứu của chúng tôi và vẫn có đến 14,6% các bà mẹ cho trẻ bú sau 24 giờ [8]. Báo cáo về tình trạng dinh dưỡng trẻ em và bà mẹ năm 2005 của Viện Dinh dưỡng cho thấy, thực tế hiện nay việc cho trẻ dưới 4 tháng tuổi uống thêm nước cam, chanh, thậm chí là cho ăn thêm sữa bột và cháo bột là rất phổ biến. Tỷ lệ bú sữa mẹ hoàn toàn ở trẻ nhỏ dưới 4 tháng tuổi chỉ là 18,9% và đến 6 tháng tuổi là 12,4% và có tới 9,2% trẻ được cho ăn bổ sung sớm trong vòng hai tháng đầu sau sinh, tỷ lệ trẻ được cho ăn bổ sung trước 4 tháng là 23,1% [18]. Báo cáo về tình hình dinh dưỡng năm 2009-2010 thì tỷ lệ bú mẹ trong vòng ½ giờ đầu sau sinh có cao hơn nghiên cứu của chúng tôi là 61,7% [19]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy thực hành

nuôi con bằng sữa mẹ tại địa phương nghiên cứu còn nhiều điểm chưa hợp lí: tỷ lệ trẻ được bú mẹ hoàn toàn và bú ngay trong $\frac{1}{2}$ giờ đầu sau khi sinh còn rất thấp; rất nhiều bà mẹ cho trẻ uống hoặc ăn thêm sữa công thức cho trẻ sơ sinh, nước thảo mộc, nước đường trước khi cho con bú; đặc biệt, thời điểm bắt đầu cho trẻ ăn bổ sung thêm các thức ăn khác ngoài sữa mẹ rất sớm. Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2002 thì thời gian thích hợp cho trẻ ăn bổ sung là khi trẻ 6 tháng tuổi. Do vậy việc cho trẻ ăn bổ sung sớm sẽ là nguy cơ làm mẹ bị mất sữa, cũng như gây các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp cấp ở trẻ nhỏ. Đây cũng là một trong những nguyên nhân cơ bản dẫn đến SDD cho trẻ ở đây. Khi được hỏi, có rất nhiều lí do các bà mẹ đưa ra để giải thích vì sao lại cho con họ ăn bổ sung sớm như vậy. Trong các lí do, có đến 54,9% bà mẹ nói rằng do bận nhiều công việc phải đi làm xa hoặc không về nhà theo đúng giờ cho trẻ bú được, 16,9% bà mẹ cho rằng mình không đủ sữa cho con bú (bảng 3.4). Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trong đó chỉ rõ lí do ảnh hưởng đến thời gian nuôi con bằng sữa mẹ là do mẹ thiếu sữa [23], thiếu sữa khiến nhiều bà mẹ phải cai sữa cho con trước 6 tháng tuổi [2], việc thiếu sữa xảy ra phổ biến cho các bà mẹ ở thành phố do căng thẳng trong công việc, do phải đi làm sớm, số lần cho trẻ bú ít đi cũng là nguyên nhân gây thiếu sữa ở các bà mẹ [65]. Đây là một thực tế hiện nay không chỉ ở các vùng nông thôn, mà cả ở các vùng thành thị, khi mà các bà mẹ phải đi làm sớm và không có điều kiện về nhà đúng giờ cho con bú được. Tại địa bàn nghiên cứu, các thực phẩm được các gia đình sử dụng phổ biến cho trẻ ăn bổ sung là các loại bột gạo, bột ăn liền (70,3%), các loại thịt, cá, trứng chỉ chiếm (32,8%). (bảng 3.5)

Kết quả một nghiên cứu khác cũng cho kết quả như trong nghiên cứu này: bột ăn liền được sử dụng rộng rãi cho trẻ (72,4%) hoặc bột tự chế biến nhưng khi nấu thường ít cho thêm các loại thịt, dầu mỡ [14].

Nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra rằng khi mẹ đi làm thì người chăm sóc trẻ

chính là ông bà chiếm hơn 69%, các ông bố chăm sóc con khi mẹ vắng nhà chỉ có 15,5% (bảng 3.6), điều này cũng cho thấy việc tuyên truyền giáo dục NCBSM và ăn bổ sung hợp lí cần phải chú trọng đến các đối tượng là các ông/bà của trẻ, bên cạnh các bà mẹ trẻ là những đối tượng đích.

Mặc dù đã được tuyên truyền cách cho bú khi trẻ bị bệnh, nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi thì chỉ có 52,2% bà mẹ cho con bú nhiều hơn khi trẻ bị bệnh, thậm chí còn 5,3% bà mẹ còn cho bú ít hơn khi con họ bị ốm (bảng 3.7).

Thực hành nuôi con bằng sữa mẹ và cho trẻ ăn bổ sung của các bà mẹ tại địa bàn nghiên cứu, còn nhiều điểm chưa hợp lí. Phải chăng đây là những lí do quan trọng dẫn đến tỷ lệ mắc tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp trong vòng hai tuần trước khi nghiên cứu còn cao, tương ứng là 21,7% và 27,6 % (bảng 3.8). Do vậy, bên cạnh các yếu tố khách quan như mẹ thiếu sữa, mẹ phải đi làm sớm thì các yếu tố khác như hiểu biết của bà mẹ về NCBSM, ăn bổ sung và chăm sóc trẻ khi bị bệnh vẫn còn là những vấn đề cần được quan tâm nhiều hơn nữa tại địa phương này.

Theo Quỹ nhi đồng Liên hiệp quốc (UNICEF), NCBSM là một trong bốn biện pháp bảo vệ sức khoẻ trẻ em, sữa mẹ là thức ăn tốt nhất cho trẻ [2]. Trong thời gian 4-6 tháng đầu sau sinh, sữa mẹ là nguồn cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của trẻ, có tỷ lệ các chất dinh dưỡng cân đối và dễ hấp thu, đặc biệt là protein và vitamin A [11]. NCBSM giúp trẻ chống lại các bệnh nhiễm trùng và làm giảm tử vong trẻ, đặc biệt là ở các nước đang phát triển, nơi mà điều kiện vệ sinh thực phẩm còn kém [39]. Sữa mẹ được xem là yếu tố khởi đầu, phát triển thành phần của vi khuẩn đường ruột [109]. Sữa mẹ chứa oligo- saccharides làm tăng sự phát triển của các loài vi khuẩn *bifidobacteria*, đây là loài vi khuẩn có mặt sớm nhất trong đường tiêu hoá [164], và sự có mặt của chúng trong đường tiêu hoá là tốt cho sức khoẻ của trẻ. Hệ vi sinh vật của trẻ được nuôi bằng sữa mẹ không những có nhiều vi khuẩn *bifidobacteria* mà còn

chứa ít các vi khuẩn gây bệnh có hại so với trẻ bú sữa ngoài [149], điều này một phần nào giải thích tại sao tỷ lệ mắc mới của bệnh nhiễm khuẩn là thấp ở trẻ được nuôi bằng sữa mẹ.

4.2. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu trước can thiệp:

Kết quả ở bảng 3.9 cho thấy, tất cả các đặc điểm chung của trẻ như giới, tháng tuổi, tuần thai khi sinh, cân nặng sơ sinh, số anh chị em, nơi sinh... là tương đối đồng đều, tỷ lệ trẻ trai và trẻ gái đều tương đương nhau ở cả 4 nhóm, không có sự khác biệt nào giữa 4 nhóm nghiên cứu ($p>0,05$). Các đặc điểm khác như thời điểm trẻ được ăn bổ sung từ rất sớm so với khuyến cáo của WHO, trung bình từ 3,0 - 3,5 tháng tuổi, cũng tương tự như nhau giữa các nhóm nghiên cứu (bảng 3.10).

Về một số đặc điểm chung của các bà mẹ của trẻ như tuổi trung bình của các bà mẹ là 27 – 28 tuổi, trình độ văn hóa chủ yếu là cấp 2 (35,5 – 56,3%), trình độ đại học và trung cấp tương đối thấp (6,3 – 12,9%). Nghề nghiệp chính của các bà mẹ chủ yếu là nông dân (59,7 – 68,3%), chỉ có 7,8 – 17,7% là cán bộ. Các đặc điểm này cũng tương đối đồng đều giữa các nhóm nghiên cứu, không có sự khác biệt với $p>0,05$ (bảng 3.10).

Về tình trạng dinh dưỡng của trẻ ở thời điểm nghiên cứu ban đầu cũng không có sự khác biệt giữa 4 nhóm nghiên cứu. Cân nặng ban đầu ở các nhóm trẻ tương tự nhau, thậm chí cân nặng trung bình còn cao nhất ở nhóm chứng, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu (bảng 3.11). Cũng như cân nặng, chiều dài nằm ban đầu ở các nhóm trẻ cũng tương tự như nhau. Trẻ ở nhóm chứng và nhóm prebiotic có cao hơn không đáng kể so với nhóm synbiotic 1 và 2, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu (bảng 3.12).

4.3. Mức độ ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic và synbiotic đến tình trạng dinh dưỡng của trẻ trong 6 tháng can thiệp:

Ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic hoặc synbiotic 1 và synbiotic 2 đến sự tăng trưởng của trẻ nhỏ, đặc biệt là ở trẻ <12 tháng tuổi, đang được quan tâm nhiều trong những năm gần đây cả ở trong nước và quốc tế. Kết quả của một số nghiên cứu trên đối tượng trẻ nhỏ dưới 36 tháng tuổi cho thấy probiotic và prebiotic có tác dụng cải thiện các chỉ số nhân trắc của trẻ. Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá hiệu quả của bổ sung sữa có chứa prebiotic hoặc synbiotic 1 và synbiotic 2 - probiotic kết hợp với prebiotic với liều lượng thấp và cao (0,8g/ngày và 1,6g/ngày) trên đối tượng trẻ dưới 12 tháng tuổi trong 6 tháng. Kết quả nghiên cứu cho thấy:

4.3.1. Về cân nặng:

Với cân nặng ban đầu tương tự như nhau ở cả 4 nhóm trẻ, thậm chí còn cao nhất ở nhóm chứng (nhóm chứng). Sau 6 tháng can thiệp, mức tăng cân nặng ở cả 3 nhóm trẻ được uống sữa bổ sung đều cao hơn so với nhóm chứng (2,6 kg, 2,4kg, 2,3kg so với 2,2 kg), đặc biệt trẻ ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 có mức tăng cân cao hơn hẳn ở tất cả các thời điểm nghiên cứu so với nhóm chứng (2,6kg; 2,4kg so với 2,2 kg), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Mức tăng cân nặng của trẻ ở nhóm synbiotic 2 cũng cao hơn so với nhóm chứng, nhưng sự khác biệt chỉ ở 4 tháng đầu can thiệp, những tháng còn lại mức tăng cân cao hơn nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (bảng 3.11; biểu đồ 3.1; 3.2).

Một nghiên cứu bổ sung sữa có chứa synbiotic lên trẻ 18-36 tháng tuổi ở Việt Nam cũng cho kết quả như nghiên cứu của chúng tôi sau 5 tháng can thiệp mức tăng cân nặng ở nhóm can thiệp cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng (1,02 kg so với 0,6 kg) [15]. Nghiên cứu của Nguyễn Xuân Ninh trên trẻ 18-36

tháng tuổi và trẻ từ 24-26 tháng tuổi cũng cho kết quả tương tự như nghiên cứu của chúng tôi, mức tăng cân nặng của trẻ được uống sữa có chứa probiotic và prebiotic đều cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm đối chứng [12], [13]. Kết quả của một số nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự như nghiên cứu của chúng tôi [52], [133], [162]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này sử dụng các loại probiotic khác nhau với các đặc tính sinh học khác nhau, nên việc so sánh cũng chỉ có tính tương đối. Nhưng điều có thể chắc chắn là việc bổ sung sữa có chứa synbiotic không ảnh hưởng xấu đến sự tăng trưởng của trẻ nhỏ.

Một nghiên cứu khác được tiến hành ở trẻ 14 ngày tuổi nhưng không được bú sữa mẹ, với việc cho trẻ uống sữa công thức có chứa 2×10^7 CFU *Bifidobacterium longum* BL999 và 4g/L hỗn hợp chứa 90% galacto-oligosaccharides và 10% fructo-oligosaccharides trong vòng 112 ngày lại cho thấy kết quả là không có sự khác biệt về mức tăng cân giữa nhóm can thiệp và nhóm đối chứng với mức tăng trung bình khoảng 1,01 kg [122].

4.3.2. Về chiều dài nằm:

Cũng như cân nặng, chiều dài nằm ban đầu ở 4 nhóm trẻ được nghiên cứu là tương tự như nhau, nhóm chứng và nhóm prebiotic có thấp hơn nhưng không đáng kể so với nhóm synbiotic 1 và 2. Trong 6 tháng can thiệp, nhìn chung trẻ ở 3 nhóm can thiệp có mức tăng chiều dài nằm cao hơn so với nhóm đối chứng, tuy nhiên chỉ có trẻ ở nhóm synbiotic 1, nhóm được bổ sung probiotic kết hợp với prebiotic liều lượng thấp, có mức tăng chiều dài nằm cao hơn hẳn so với nhóm chứng từ tháng can thiệp thứ hai trở đi cho đến khi kết thúc nghiên cứu với $p < 0,05$ (Anova test). Còn mức tăng chiều dài nằm của trẻ ở nhóm prebiotic và synbiotic 2 có cao hơn so với nhóm chứng, nhưng mức tăng này chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (bảng 3.12; và biểu đồ 3.3; 3.4).

Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như của một số nghiên cứu khác khi bổ sung probiotic kết hợp với prebiotic liều thấp (0,8g/ngày) cho thấy nhóm trẻ can thiệp

đều có mức tăng chiều dài nằm cao hơn một cách rõ rệt so với nhóm chứng với $p < 0,05$ [12], [13]. Một nghiên cứu khác trên trẻ 18-36 tháng tuổi với việc bổ sung synbiotic cũng cho kết quả là sau 3 tháng can thiệp, mức tăng chiều cao ở nhóm can thiệp là cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng (4,93 cm so với 3,89 cm) [15]. Tuy nhiên kết quả của một số nghiên cứu của các tác giả khác lại cho thấy không có sự khác biệt về mức tăng chiều dài nằm/chiều cao ở nhóm có bổ sung synbiotic so với nhóm đối chứng và nghiên cứu này cũng chỉ cho thấy việc bổ sung synbiotic không ảnh hưởng đến mức tăng cân nặng và chiều cao của trẻ [122].

4.3.3. Về các chỉ số WAZ, HAZ và WHZ:

Bên cạnh sự cải thiện về chiều cao và cân nặng, nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy sự cải thiện các chỉ số Z-Score giữa 4 nhóm nghiên cứu:

- Kết quả đánh giá tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo chỉ số Z-Score cân nặng/tuổi cho thấy, Tình trạng dinh dưỡng ở cả 4 nhóm trẻ là như nhau tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu. Sau 6 tháng can thiệp, Tình trạng dinh dưỡng của trẻ đều có sự cải thiện ở cả 4 nhóm trẻ. Sự cải thiện tốt nhất là ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 (Z-Score tăng từ -0,61/ -0,48 lên -0,05 và -0,08), sau đó là nhóm synbiotic 2 (Z-Score tăng từ -0,58 lên -0,24). Nhóm chứng cũng có sự cải thiện nhưng ở mức độ thấp hơn (Z-Score tăng từ -0,43 lên -0,25). Tuy nhiên chưa có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$). Nhìn chung các nhóm nghiên cứu đều có xu hướng cải thiện chỉ số WAZ và tiến gần hơn đến mức phát triển của quần thể tham khảo (Bảng 3.13 và biểu đồ 3.5).

- Đánh giá tình trạng dinh dưỡng theo chỉ số Z-score chiều dài nằm/tuổi cũng cho thấy tình trạng dinh dưỡng ở cả 4 nhóm trẻ là tương tự nhau tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu và đều ở mức độ bình thường. Sau thời gian 6 tháng can thiệp, Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo chỉ tiêu này gần như không có sự cải thiện ở cả 4 nhóm trẻ (bảng 3.14).

- Tình trạng dinh dưỡng của trẻ theo chỉ số Z-score cân nặng/ chiều dài nằm cũng cho thấy ở cả 4 nhóm trẻ tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu đều ở mức độ bình thường, nhưng chỉ số Z-Score đều có giá trị “+” ở nhóm chứng, nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2. Chỉ có nhóm prebiotic là có giá trị “-”. Khác với các kết quả trên, sau 6 tháng can thiệp, Tình trạng dinh dưỡng của trẻ đều có sự cải thiện ở cả 4 nhóm trẻ. Sự cải thiện tốt nhất lại ở nhóm prebiotic (Z-Score tăng từ -0,07 lên 0,49), sau đó là nhóm synbiotic 1 và 2 (Z-Score tăng từ 0,24/ 0,05 lên 0,42 và 0,26). Nhóm chứng cũng có sự cải thiện nhưng ở mức độ thấp nhất (Z-Score tăng từ 0,17 lên 0,26), tuy nhiên không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu với $p > 0,05$ (*ANOVA test*) (bảng 3.15; biểu đồ 3.6).

Trong nghiên cứu của chúng tôi hiệu quả lên tăng trưởng chưa thực sự rõ rệt ở một số chỉ tiêu so với các nghiên cứu khác [12], [13], [15], có lẽ là do độ tuổi của trẻ ở các nghiên cứu là khác nhau, do chủng loại probiotic sử dụng trong các nghiên cứu cũng khác nhau và trong nghiên cứu của chúng tôi trong thời gian nghiên cứu có đến hơn 70% số trẻ bị tiêu chảy, là một trong những nguyên nhân làm giảm tăng trưởng của trẻ.

Một nghiên cứu mù kép trên trẻ từ 6-36 tháng tuổi ở Thái Lan về tác động lên tăng trưởng của việc bổ sung *B. lactis BB 12* đơn lẻ vào sữa công thức cho trẻ sơ sinh (n = 36 trẻ) hoặc kết hợp với *S. thermophilus* (n = 23 trẻ) so với nhóm chứng, nhóm không bổ sung (n = 25 trẻ). Trẻ được cho uống sữa hằng ngày trong thời gian 6 tháng. Liều bổ sung là 3×10^7 CFU /gam sữa. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc kết hợp các probiotic làm gia tăng đáng kể tốc độ đuổi kịp tăng trưởng của trẻ [118].

Một nghiên cứu khác trên 105 trẻ sơ sinh dưới 2 tháng tuổi; trong nghiên cứu này trẻ của nhóm can thiệp (51 trẻ) được bổ sung sữa công thức chứa *Lactobacillus rhamnosus GG* và trẻ nhóm chứng được bổ sung sữa công thức cho đến khi trẻ được 6 tháng tuổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm trẻ can thiệp có sự tăng

trưởng tốt hơn so với nhóm chứng, sự thay đổi cân nặng và chiều cao của nhóm can thiệp cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng ($0,44 \pm 0,37$ so với $0,07 \pm 0,06$, $P < 0,01$ và $0,44 \pm 0,19$ so với $0,07 \pm 0,06$, $P < 0,005$) [157].

Một nghiên cứu trên 624 trẻ từ 1-4 tuổi. Nhóm trẻ can thiệp (312 trẻ) được uống sữa có chứa prebiotic (2,4 g/ngày prebiotic oligosaccharides) và probiotic ($1,9 \times 10^8$ CFU/ngày *Bifidobacteria HN019*); nhóm chứng (n= 312 trẻ) được uống sữa công thức trong vòng 1 năm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, so với sữa công thức không tăng cường, trẻ được uống sữa tăng cường trong thời gian 1 năm, cân nặng của trẻ đã tăng 0,13 kg/năm (95% CI 0,03; 0,23; $p=0,02$) [150]. Kết quả phân tích tổng hợp của 3 nghiên cứu [67], [115], [170], sử dụng sữa công thức cho trẻ đủ tháng, cũng chỉ ra rằng trẻ được bổ sung sữa có chứa prebiotic có mức tăng cân nặng cao hơn một cách có ý nghĩa [119].

Các nghiên cứu được tiến hành tại một số nước khác trên thế giới, lại đưa ra kết quả khác với kết quả nghiên cứu của chúng tôi và một số nghiên cứu khác tại Việt Nam. Một nghiên cứu được tiến hành tại Hà Lan, trên 126 trẻ sơ sinh đủ tháng, dưới 7 ngày tuổi, với việc bổ sung prebiotic và probiotic, 0,24g prebiotic galacto-oligosaccharides/100 ml sữa và 1×10^7 CFU *B.animalis ssp. lactis*/g (còn gọi là *Bifidobacterium BB12*) và 1×10^7 CFU *L. paracasei ssp. paracasei*/g (còn gọi là *L. casei CRL-431*), trong vòng 6 tháng cho thấy chỉ số WAZ và HAZ không có sự khác biệt giữa nhóm nghiên cứu so với nhóm chứng (0,1 so với 0,17), (0,51 so với 0,50), mức tăng cân nặng và chiều cao của trẻ ở nhóm synbiotic sau 3 tháng can thiệp là 2507g và 10,3 cm so với 2661g và 10,6 cm của trẻ ở nhóm chứng. Sau 6 tháng can thiệp, tổng mức tăng cân nặng và chiều cao ở nhóm can thiệp là 4152 g và 17,7 cm so với 4282 g và 17,3 cm ở trẻ của nhóm chứng và sự khác nhau giữa các nhóm là không có ý nghĩa thống kê [158].

Một nghiên cứu khác tại Italia, được tiến hành trên 138 trẻ sơ sinh 14 ngày sau sinh không bú sữa mẹ với việc cho trẻ uống sữa có chứa 2×10^7 CFU

Bifidobacterium longum BL999 và 4g/L hỗn hợp chứa 90% galactooligosaccharides và 10% fructo-oligosaccharides trong vòng 112 ngày cũng cho thấy không có sự khác biệt về mức tăng chiều cao và cân nặng giữa nhóm can thiệp và nhóm chứng và mức tăng cân trung bình là khoảng 1,01kg. Mức tăng chiều cao/tháng ở trẻ trai của nhóm chứng và nhóm can thiệp là 3,51cm và 3,51 cm, còn đối với trẻ gái là 3,22 cm và 3,22 cm [122].

Một nghiên cứu trên 795 trẻ ở Malawi, có độ tuổi từ 5 đến 168 tháng (trung bình 22 tháng), bị suy dinh dưỡng cấp tính nặng với việc bổ sung probiotic và prebiotic (synbiotic 2000 Forte), với thời gian trung bình là 33 ngày, sau khi trẻ được điều trị ổn định tình trạng suy dinh dưỡng cấp. Kết quả nghiên cứu cho thấy tác dụng điều trị suy dinh dưỡng là như nhau ở hai nhóm synbiotic và nhóm chứng (53,9% và 51,3%; $p=0$) [97].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cùng với các tác giả khác có thể thấy rằng tác động của prebiotic và synbiotic lên tăng trưởng cân nặng và chiều cao của trẻ còn chưa thống nhất. Khi tham khảo kết quả của các nghiên cứu trong nước và ngoài nước, chúng tôi nhận thấy rằng các nghiên cứu tuy đều bổ sung synbiotic vào sữa công thức, nhưng trên trẻ với các độ tuổi khác nhau, chủng loại probiotic, liều lượng sử dụng và thời gian can thiệp khác nhau nên tác động đến tăng trưởng cũng khác nhau. Ngoài ra, một số tài liệu còn cho thấy tình trạng dinh dưỡng, bệnh tật của trẻ cũng ảnh hưởng đến tác dụng của probiotic và prebiotic.

Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sau 6 tháng can thiệp thì nhóm synbiotic 1 là nhóm có ưu thế trong cải thiện cả cân nặng và chiều cao của trẻ, nhóm synbiotic 2 cải thiện tốt cả 2 chỉ tiêu này ở 4 tháng đầu, trong khi đó nhóm prebiotic chỉ cải thiện được cân nặng của trẻ. Có được kết quả này là do trẻ hằng ngày được uống bổ sung 200 ml sữa và hầu hết các trẻ đã uống được trên 95% số bữa được bổ sung hằng ngày và > 90% trẻ uống hết số sữa cho từng bữa. Sữa là nguồn cung cấp các chất dinh dưỡng tốt cho trẻ về cả năng lượng và các

chất dinh dưỡng như lipit, protit và đặc biệt là các khoáng chất. Bên cạnh đó , ngoài việc được uống bổ sung các chất dinh dưỡng trong sữa như ở nhóm đối chứng, trẻ ở các nhóm này còn được bổ sung thêm một hỗn hợp gồm probiotic ($2,6 \times 10^9$ CFU/ngày gồm hỗn hợp 2 probiotic (*CRL431/BB12*) và prebiotic (0,8g hoặc 1,6g/ngày GOS/FOS). Đây là những vi khuẩn có ích khi vào trong đường ruột sẽ giúp cân bằng hệ vi khuẩn chí đường ruột, phân hủy và hấp thu nốt các thức ăn chưa được tiêu hóa, synbiotic cũng làm tăng hấp thu calci và magie và giúp hệ tiêu hóa hoạt động tốt hơn, tăng cường miễn dịch của cơ thể góp phần làm giảm tiêu chảy, táo bón cũng như bệnh tật của trẻ [97]. Cần tiếp tục có các nghiên cứu sâu hơn về hiệu quả lên tăng trưởng của trẻ của synbiotic với các liều lượng khác nhau của prebiotic.

4.4. Mức độ ảnh hưởng của sữa bổ sung prebiotic và synbiotic đến nhiễm khuẩn tiêu hóa và hô hấp ở trẻ trong 6 tháng can thiệp:

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tình hình mắc các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và đường hô hấp ở trẻ sau 6 tháng can thiệp như sau:

4.4.1. Tình hình mắc nhiễm khuẩn đường tiêu hóa:

- Kết quả nghiên cứu cho thấy trong 6 tháng can thiệp có tới trên 70% số trẻ bị tiêu chảy. Tỷ lệ mắc tiêu chảy không có sự khác biệt giữa nhóm chứng và các nhóm can thiệp, dao động từ 72,7% đến 83,6%. Tỷ lệ trẻ bị đầy hơi thấp hơn so với các triệu chứng khác. Trong đó, trẻ ở nhóm prebiotic có tỷ lệ bị đầy hơi thấp nhất (1,7%), rồi đến trẻ ở nhóm synbiotic 2 (9,1%), cao nhất là trẻ ở nhóm chứng là 23,6%. Tỷ lệ này có sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 2 so với nhóm chứng với $p < 0,05$. Tỷ lệ trẻ bị nôn dao động từ 36,7% – 52,7%, cao nhất là ở nhóm đối chứng (52,7%), (Bảng 3.16).

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy (Bảng 3.17):

- Số đợt mắc tiêu chảy giữa nhóm chứng và các nhóm can thiệp không có sự khác biệt, số ngày mắc tiêu chảy ở các nhóm synbiotic 2 và prebiotic có xu hướng thấp

hơn so với nhóm chứng (tương ứng là 4 ngày; 4 ngày so với 5 ngày), nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

- Số ngày bị nôn/trớ và số đợt bị nôn/trớ của trẻ ở nhóm chứng cao hơn so với 3 nhóm can thiệp. Tuy nhiên cũng chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ($p>0,05$).

Về tổng số lần đại tiện và đặc điểm của phân, kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Tổng số lần đại tiện của trẻ trong thời gian 6 tháng nghiên cứu có xu hướng tăng ở cả 3 nhóm can thiệp so với nhóm chứng (tương ứng là 205 lần, 206 lần, 212 lần so với 201 lần). Tuy nhiên sự khác biệt này chưa có nghĩa thống kê (biểu đồ 3.7).

- Nhóm synbiotic 1 có số lần đi phân cứng thấp hơn so với các nhóm còn lại một cách có ý nghĩa thống kê ($p<0,01$). Nhìn chung thì các nhóm trẻ được can thiệp bằng sữa bổ sung synbiotic có xu hướng đi phân bình thường mềm, màu vàng nhiều hơn là phân bất thường như phân cứng, phân lỏng, phân nâu, phân xanh. Tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Các đặc điểm khác của phân không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu (Bảng 3.18).

Một nghiên cứu tại Thái Lan cho thấy *BB 12* có thể phòng ngừa tiêu chảy liên quan đến *Rotavirus* trên trẻ từ 6-36 tháng [121]. Nghiên cứu của Gonzales và cộng sự cho thấy việc bổ sung *CRL431* kết hợp với *L. acidophilus* trên trẻ 5-29 tháng tuổi làm giảm tần suất mắc mới tiêu chảy từ 52% xuống 17% [82].

Trong khi đó nghiên cứu của Vlierger và cộng sự trên 126 trẻ sơ sinh ở Hà Lan cũng như trong nghiên cứu của chúng tôi; không thấy có sự thay đổi về tỷ lệ mắc các triệu chứng nhiễm khuẩn, mặc dù nghiên cứu này thiết kế nhằm tìm hiểu sự dung nạp và an toàn khi bổ sung synbiotic (*BB12/CRL341*) cho trẻ. Nghiên cứu này còn cho thấy trong 6 tháng can thiệp trẻ ở nhóm được bổ sung synbiotic có số lần đại tiện nhiều hơn so với nhóm chứng trong 3 tháng đầu (1,52 lần/ngày so với 1,29 lần/ngày; $P= 0,04$), tuy nhiên sự khác nhau này không có ý nghĩa thống

kê trong 3 tháng sau (1,6 lần/ngày so với 1,4 lần/ngày; $p=0,13$) và trẻ ở nhóm được bổ sung synbiotic có số lần đi phân mềm cao hơn so với nhóm chứng, tuy nhiên sự khác biệt này cũng chỉ xảy ra trong 3 tháng đầu [158].

Một số nghiên cứu lại đưa ra kết quả khác với nghiên cứu của chúng tôi. Phân tích tổng hợp của 4 nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng *L.Rhamnosus (GG)* có hiệu quả khi bổ sung sớm trong điều trị tiêu chảy do *Rotavirus*, và tác dụng chính là làm giảm thời gian kéo dài của tiêu chảy từ 0,5 đến 1,5 ngày [152]. Một số nghiên cứu với các ý nghĩa thống kê khác nhau đã chỉ ra rằng việc sử dụng *Bifidobacteria*, chủ yếu là *B.Lactis* [53], [131], *Lactobacilli*, chủ yếu là *L.Rhamnosus (GG)* [151] làm giảm tần suất mắc mới và mức độ nặng của tiêu chảy cấp. Nghiên cứu của Weizman và cộng sự tại 14 nhà trẻ của Israel trên trẻ từ 4-10 tháng tuổi không bú mẹ, trẻ được chia thành 3 nhóm, hai nhóm trẻ được uống sữa bổ sung $1,2 \times 10^9$ CFU/ngày *BB12* hoặc *Lactobacillus reuteri* và trẻ nhóm chứng được uống sữa công thức trong vòng 12 tuần. Kết quả nghiên cứu cho thấy trẻ ở nhóm chứng có số đợt tiêu chảy nhiều hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm can thiệp *BB12* hoặc *Lactobacillus reuteri* (tương ứng là 0,31 [0,22–0,40] so với 0,13 [0,05–0,21] và 0,02 [0,01–0,05]) và thời gian kéo dài của từng đợt cũng dài hơn so với hai nhóm can thiệp (tương ứng là 0,59 [0,34–0,84] so với 0,37 [0,08–0,66] và 0,15 [0,12–0,18] ngày) [163]. Một số nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng việc sử dụng probiotic có tác dụng tương tự như nghiên cứu của Weizman 2005, đặc biệt là tiêu chảy do virus [93], [111]. Tuy nhiên khi nghiên cứu này được tiến hành trên trẻ 0-3 tháng tuổi với liều lượng $8,5 \times 10^8$ CFU *BB12*/ngày trong thời gian 1 tháng thì không thấy có tác dụng lên tiêu chảy của trẻ [162]. Nghiên cứu phân tích tổng hợp của Allen với 46 nghiên cứu về tác động của probiotic lên điều trị tiêu chảy ở trẻ em và người trưởng thành cho thấy probiotic giảm tiêu chảy kéo dài trên 3 hoặc 4 ngày và giảm thời gian kéo dài của tiêu chảy khoảng 30 giờ [26]. Phân tích tổng hợp một số nghiên cứu về tác

động của *Lactobacillus* trong việc điều trị tiêu chảy cho thấy, thời gian kéo dài tiêu chảy giảm khoảng 0,7 ngày (95% CI: 0,3–1,2), số lần đại tiện giảm 1,6 lần vào ngày điều trị thứ 2 (95% CI: 0,7–2,6) ở nhóm can thiệp so với nhóm chứng. Một nghiên cứu trên 571 trẻ từ 3-36 tháng tuổi nhập viện do tiêu chảy với việc cho trẻ sử dụng các loại probiotic đơn lẻ hoặc hỗn hợp các loại probiotics: *Lactobacillus rhamnosus strain GG*; *Saccharomyces boulardii*; *Bacillus clausii*; hỗn hợp *L. delbrueckii var bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L acidophilus* và *Bifidobacterium bifidum*; hoặc *Enterococcus faecium SF68*. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, tổng số thời gian bị tiêu chảy ở nhóm trẻ uống *Lactobacillus rhamnosus GG* và nhóm trẻ uống hỗn hợp các probiotic là thấp hơn một cách rõ rệt so với nhóm chứng ($p < 0,01$), các nhóm can thiệp khác không có tác dụng lên tiêu chảy và thời gian kéo dài tiêu chảy [125]. Như vậy tác dụng lên tiêu chảy còn phụ thuộc vào chủng probiotic sử dụng. Kết quả một nghiên cứu trên trẻ từ 6 đến 24 tháng tuổi bằng điều trị *L. casei 431* cho thấy số lần đại tiện trong ngày tăng lên, thời gian kéo dài tiêu chảy và nôn/trớ của trẻ được giảm đi [76]. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như trong nghiên cứu của Giuseppe Puccio ở nhóm trẻ được bổ sung *Bifidobacterium longum BL999* và 4g/L GOS/FOS ít bị đầy hơi so với nhóm chứng ($p = 0,05$) và số lần đại tiện trẻ ở nhóm được uống sữa có probiotic kết hợp với prebiotic cao hơn so với trẻ ở nhóm chứng ($2,2 \pm 0,7$ so với $1,8 \pm 0,9$ lần/ngày; t test, $p = 0,018$). Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy không có mối liên quan giữa số lần đại tiện và tăng trưởng của trẻ (tương ứng $p = 0,28$ và $0,17$) [122].

Một nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá hiệu quả của *Lactobacillus GG* và sữa mẹ trong phòng ngừa nhiễm khuẩn do *Rotavirus* ở 220 trẻ từ 1-18 tháng tuổi, nằm viện từ tháng 12 năm 1999 đến tháng 5 năm 2000 cho thấy, tỷ lệ mắc mới ở nhóm bổ sung *Lactobacillus GG* là 25,4% và nhóm chứng là 30,2% và sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,42$. Trong số này tỷ lệ mắc mới ở nhóm

được nuôi bằng sữa mẹ là 10,6% và 32,4% ở nhóm không được nuôi bằng sữa mẹ và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p=0,003$. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy *Lactobacillus* GG không có hiệu quả trong phòng ngừa *Rotavirus* như sữa mẹ [110].

Báo cáo của một nghiên cứu khác trên trẻ từ 1 đến 3 tuổi chỉ ra rằng, việc bổ sung synbiotic 2,5g GOS /ngày và $1 \times 10^{7-8}$ CFU *BB12*/ngày làm giảm tỷ lệ mắc mới bệnh lỵ ở trẻ [137] Một nghiên cứu trên trẻ từ 4-16 tuổi bị táo bón cho thấy, trẻ được bổ sung hằng ngày 4×10^9 CFU hỗn hợp chứa *Bifidobacteria* (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lactobacilli* (*L. casei*, *L. plantarum* and *L. Rhamnosus* trong vòng 4 tuần cho thấy, việc bổ sung hỗn hợp probiotic có tác dụng làm giảm táo bón ở trẻ [35]. Một nghiên cứu trên người trưởng thành khỏe mạnh với việc bổ sung hỗn hợp *BB12* và *CRL-431* như trong nghiên cứu của chúng tôi với các liều khác nhau 10^8 , 10^9 , 10^{10} và 10^{11} CFU/ngày cho thấy tác động lên hệ miễn dịch là như nhau ở các liều bổ sung, thậm chí với liều cao 10^{11} CFU/ngày [54].

Nhìn chung trong nghiên cứu của chúng tôi, một số triệu chứng của nhiễm khuẩn tiêu hóa có xu hướng được cải thiện ở các nhóm can thiệp. Tỷ lệ trẻ bị đầy hơi thấp hơn rõ rệt ở các nhóm prebiotic và synbiotic 2 ($p<0,05$) và số lần đi phân cứng thấp nhất ở nhóm synbiotic 1 so với các nhóm khác. Ở các nhóm can thiệp, trẻ có xu hướng đại tiện phân bình thường nhiều hơn, số lần đại tiện của trẻ cũng cao hơn ở các nhóm can thiệp, nhất là trẻ ở nhóm uống sữa bổ sung synbiotic và qua tham khảo kết quả của các nghiên khác về tác động của prebiotic và synbiotic lên nhiễm khuẩn đường tiêu hóa cho thấy, đa số các kết quả là có tác động tích cực, nhất là trong điều trị nhiễm khuẩn tiêu hóa, tác dụng phòng ngừa của probiotic của một số nghiên cứu chưa cho kết quả thống nhất. Có thể là do các nghiên cứu này được tiến hành trên các đối tượng có độ tuổi khác nhau, chủng loại và liều lượng probiotic được sử dụng khác nhau, thời gian kéo dài của

các can thiệp cũng khác nhau, cần tiếp tục có các nghiên cứu sâu hơn về tác dụng của synbiotic với các liều khác nhau của prebiotic lên nhiễm khuẩn đường tiêu hóa ở trẻ.

4.4.2. Các bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp:

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ trẻ bị mắc các triệu chứng ho và chảy nước mũi rất cao, từ 81,7% - 92,7% trẻ bị ho và 73,3% - 85,5% trẻ bị chảy nước mũi trong 6 tháng nghiên cứu. Trẻ ở nhóm chứng có tỷ lệ mắc cao nhất so với các nhóm khác. Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 4 nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$). Tỷ lệ trẻ bị sốt và nghẹt mũi có thấp hơn, tuy nhiên vẫn ở mức tương đối cao, từ 70% đến 78,2% số trẻ bị sốt và 53,3% - 69,1% trẻ bị nghẹt mũi và cao nhất vẫn là các trẻ ở nhóm chứng. Tuy nhiên chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ trẻ bị thở khò khè là thấp nhất, tuy nhiên vẫn có tới 36,4% đến 41,7% số trẻ bị thở khò khè (Bảng 3.19).

Nhìn chung tỷ lệ mắc một số triệu chứng của bệnh nhiễm khuẩn hô hấp ở nhóm trẻ can thiệp có xu hướng thấp hơn so với nhóm chứng, tuy sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, trung bình số ngày bị sốt là tương tự như nhau ở cả 4 nhóm, nhưng có xu hướng thấp hơn ở nhóm synbiotic 2 là nhóm được uống sữa bổ sung synbiotic với prebiotic liều cao và số đợt bị sốt ở trẻ của nhóm đối chứng cao hơn so với trẻ ở nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2, mặc dù sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Trung bình số ngày phải uống kháng sinh và số đợt uống kháng sinh cũng thấp hơn ở trẻ thuộc nhóm synbiotic 2 so với 3 nhóm còn lại. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trung bình số ngày/ số đợt bị thở khò khè ở trẻ các nhóm là như nhau. Trung bình số ngày bị ho ở nhóm chứng có xu hướng cao hơn so với các nhóm can thiệp và thấp nhất ở nhóm synbiotic 2 (11 ngày so với 7,5 ngày, 8 ngày và 7 ngày) và tương tự như vậy số đợt bị ho cũng

thấp nhất ở nhóm synbiotic 2, là nhóm được uống sữa bổ sung synbiotic với prebiotic liều cao. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Trung bình số ngày bị nghẹt mũi cũng thấp nhất ở nhóm synbiotic 2, nhưng sự khác biệt cũng không có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.20; 3.21 và biểu đồ 3.8).

Nhìn chung, kết quả nghiên cứu cho thấy, trẻ ở nhóm synbiotic 2 có xu hướng giảm cả tỷ lệ mắc, số ngày mắc và số đợt mắc các triệu chứng của nhiễm khuẩn hô hấp như ho, sốt, chảy nước mũi, nghẹt mũi... so với nhóm đối chứng, mặc dù sự khác biệt này chưa thực sự rõ ràng. Điều này, có thể là do trong nghiên cứu này, trẻ ở các nhóm nghiên cứu, kể cả nhóm chứng vẫn đang được bú mẹ, sữa mẹ có chứa các yếu tố chống nhiễm khuẩn nên tác động của prebiotic và probiotic chưa thực sự rõ nét. Khác với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi, một số nghiên cứu đã đưa ra kết luận là GOS/FOS có khả năng làm giảm tỷ lệ mắc mới của các bệnh nhiễm khuẩn hô hấp và giảm việc sử dụng kháng sinh của trẻ [28], [45].

Nghiên cứu của Weizman 2005 cho thấy, nhóm trẻ nhóm đối chứng có số đợt bị sốt cao hơn so với nhóm trẻ được bổ sung *B. lactis* hoặc *L.reuteri* và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (tương ứng là 0,41 [0,28–0,54] so với 0,27 [0,17– 0,37] và 0,11 [0,04–0,18]) [163].

Trong một nghiên cứu khác trên trẻ từ 1-3 tuổi, được chia thành hai nhóm: nhóm chứng (n= 312) được uống sữa công thức và nhóm can thiệp (n= 312) uống sữa công thức có bổ sung 2,4 g/ngày prebiotic oligosaccharide và $1,9 \times 10^7$ CFU/ngày *Bifidobacterium lactis* HN019 trong vòng một năm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sữa bổ sung prebiotic và probiotic làm giảm tỷ lệ mắc mới của viêm phổi khoảng 24% (95% CI: 0 - 42%; p=0,05) và nhiễm khuẩn hô hấp cấp dưới thể nặng giảm khoảng 35% (95% CI: 0- 58%; p=0,05). So với nhóm chứng thì trẻ ở nhóm can thiệp giảm khoảng 5% (95% CI: 0 - 10%; p=0,05) số ngày bị sốt cao [138]. Kết quả nghiên cứu bổ sung 0,8g GOS/ngày cùng với $8-9 \times 10^9$ CFU/ngày của hỗn

hợp probiotic *L.rhamnosus* GG, *L. LC705*, *B. breve* Bb99, *propionibacterium freudenreichii* và *spp shermanii*, trong vòng 6 tháng cho trẻ có nguy cơ bị dị ứng cho thấy, số lượng nhiễm khuẩn đường hô hấp giảm đi [137]. Một nghiên cứu khác đã được tiến hành gần đây, với việc bổ sung probiotic đơn lẻ với 1×10^9 CFU *BBI2*/ngày cho thấy các triệu chứng nhiễm khuẩn hô hấp có giảm đi ở trẻ nhỏ [153].

Trong khi đó, một nghiên cứu khác lại cho thấy khi bổ sung *L. rhamnosus* 1×10^9 CFU/ngày cho trẻ từ 6 đến 24 tháng, có nguy cơ bị dị ứng và hen, thì không có ảnh hưởng lên thời gian kéo dài và số đợt của triệu chứng thở khò khè [126]. Nghiên cứu của Vliergy và cộng sự với việc bổ sung synbiotic chủng loại như trong nghiên cứu của chúng tôi tuy liều có thấp hơn cho thấy việc bổ sung synbiotic không có tác dụng lên nhiễm khuẩn hô hấp trong 6 tháng can thiệp (số đợt nhiễm khuẩn/tháng là 1,1 lần ở nhóm can thiệp so với 1,0 lần ở nhóm chứng với $p > 0,05$) [158].

Kết quả của các nghiên cứu khác cho thấy việc bổ sung prebiotic và probiotic nhìn chung có ảnh hưởng tích cực lên nhiễm khuẩn đường hô hấp ở trẻ. Tác dụng của probiotic lên nhiễm khuẩn là do các vi khuẩn có ích (probiotic) ngăn ngừa sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh, ức chế sự phát triển làm cho số lượng các vi khuẩn có hại trong đường ruột giảm đi, các vi khuẩn có ích sản xuất ra *bacteriocin* có thể tiêu diệt vi khuẩn có hại và số lượng của chúng được điều khiển bởi các enzyme của chủ thể [143]. Quá trình lên men và tạo ra các acid béo cũng làm giảm độ pH trong ruột già, làm giảm sự tăng sinh của vi khuẩn có hại và tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn có ích [155]. Bên cạnh đó các vi khuẩn có ích cũng cạnh tranh chất dinh dưỡng và điểm bám vào niêm mạc ruột với các vi khuẩn có hại và làm cho số lượng của chúng giảm đi. Bên cạnh đó nhiều nghiên cứu người ta thấy rằng probiotic có tác dụng lên tăng sản xuất mucin, giảm độ thấm thấu của ruột, tăng hoạt động tiêu diệt tế bào tự nhiên, đại

thực bào, thực bào và tác dụng của probiotic lên miễn dịch đặc hiệu như tăng tế bào sản sinh IgA, IgG, IgM, tăng IgA tổng thể và đặc hiệu trong huyết thanh và thành ruột và thay đổi các đáp ứng viêm

Prebiotic là thành phần thực phẩm không tiêu hóa được, có ảnh hưởng tích cực tới cơ thể vật chủ bằng cách kích thích sự phát triển và tăng cường hoạt động của một số loài vi sinh vật có lợi trong ruột của vật chủ [78]. Các prebiotic thường được sử dụng là FOS và GOS và Inulin. Hiện nay người ta thường kết hợp prebiotic với probiotic (được gọi là synbiotic) để tăng tác dụng có ích của probiotic lên cơ thể. FOS có khả năng kích thích sự phát triển của chủng *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* ở ruột già, các loài vi khuẩn này kích thích sự gia tăng các kháng thể IgA, IgM, IgG đồng thời cũng tạo ra chất kháng khuẩn như acid lactic, bacterioxin, H₂O₂

Nhìn chung, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy synbiotic tuy có tác động lên nhiễm khuẩn hô hấp của trẻ nhưng hiệu quả chưa thực sự rõ ràng và cần có các nghiên cứu tiếp theo để tìm hiểu sâu hơn về vấn đề này.

4.5. Ảnh hưởng lên hệ vi khuẩn chí đường ruột

Kết quả xét nghiệm 50 mẫu phân bằng phương pháp PCR cho thấy:

- Về vi khuẩn *BB12*: Tỷ lệ mẫu phân của trẻ có *BB12*(+) ở nhóm synbiotic 1 và nhóm synbiotic 2 là 81,3% và 77,8% ở thời điểm sau 3 tháng can thiệp; sau 6 tháng là 43,8% và 66,7%, cao hơn hẳn so với nhóm chứng và nhóm chỉ bổ sung prebiotic. Mặc dù tại thời điểm điều tra ban đầu các mẫu phân đều có kết quả (-) đối với vi khuẩn này. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Mẫu phân của trẻ được đánh giá là (+) khi số lượng vi khuẩn *BB12* $\geq 10^5$ CFU/g phân khô. Tại thời điểm T3, số lượng trung bình về *BB12* trong phân của trẻ ở tất cả các nhóm đều tăng lên; trong đó cao nhất là ở nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2, là các nhóm bổ sung probiotic *BB12*, so với nhóm chứng và nhóm prebiotic ($56,5 \cdot 10^6$ và $13,3 \cdot 10^6$ so với $0,11 \cdot 10^6$ và $0,57 \cdot 10^3$). Sự khác biệt này có ý nghĩa

thống kê với $p < 0,01$. Sau 6 tháng can thiệp, ở nhóm chứng và nhóm prebiotic không phát hiện thấy *BB12* trong phân của trẻ, trong khi đó số lượng trung bình về *BB12* trong phân của trẻ ở nhóm synbiotic 1 và synbiotic 2, là những nhóm được bổ sung *BB12* có số lượng cao hơn hẳn so với cả 2 nhóm kia ($1,47.10^7$ và $1,85.10^7$ so với 0) với $p < 0,01$. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, nếu trẻ được uống bổ sung sữa có probiotic thì *B. lactis BB12* có khả năng sống và phát triển trong đường ruột của trẻ. (Bảng 3.22; 3.23; biểu đồ 3.9)

- *Về tổng số vi khuẩn*: tổng số vi khuẩn có xu hướng thấp nhất ở nhóm prebiotic tại thời điểm T3 so với các nhóm còn lại, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Sau 6 tháng can thiệp, tổng số vi khuẩn đã giảm đi ở tất cả các nhóm nghiên cứu, thấp nhất ở nhóm synbiotic 1 so với nhóm chứng và nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 2, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ ($1,70.10^{10}$ so với $6,49.10^{10}$; $5,96.10^{10}$ và $5,06.10^{10}$) (Bảng 3.23).

- *Về vi khuẩn lactobacilli & Bifidobacteria*: Số lượng trung bình của *lactobacilli* trong phân của trẻ ở nhóm prebiotic và synbiotic 1 có xu hướng cao hơn so với nhóm chứng sau 3 tháng can thiệp ($2,88.10^7$ và $2,87.10^7$ so với $1,79.10^7$ ở nhóm chứng) và đến 6 tháng thì cao nhất lại ở nhóm chứng. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Còn đối với *Bifidobacteria*, sau 3 tháng can thiệp thì số lượng trung bình *Bifidobacteria* trong phân của trẻ ở nhóm synbiotic 1 có xu hướng cao hơn so với nhóm chứng và các nhóm còn lại ($2,09.10^{10}$ so với $1,64.10^{10}$, $1,59.10^{10}$, $1,64.10^{10}$), tuy nhiên sau 6 tháng can thiệp thì số lượng trung bình *Bifidobacteria* ở nhóm synbiotic 1 lại thấp hơn hẳn so với nhóm chứng với $p < 0,05$. Tỷ lệ vi khuẩn có lợi *Lactobacilli & Bifidobacteria* trên tổng số vi khuẩn trong phân sau can thiệp đã tăng lên ở cả 4 nhóm nghiên cứu, trong đó tăng cao nhất ở nhóm synbiotic 1, rồi đến nhóm chứng và nhóm synbiotic 2 đối với *Lactobacilli* và nhóm synbiotic 2 đến nhóm chứng và nhóm synbiotic 1 đối với *Bifidobacteria*, (Bảng 3.23 và biểu đồ 3.10; 3.11; 3.12 & 3.13).

- Về *Bacteroides* và *E.coli*: Cũng như tổng số vi khuẩn, sau 3 tháng can thiệp số lượng trung bình *Bacteroides* và *E.coli* ở nhóm prebiotic thấp hơn so với 3 nhóm còn lại, tuy không có ý nghĩa thống kê ($0,59.10^9$ so với $0,96.10^9$, $4,13.10^9$ và $1,58.10^9$ đối với *bacteroides*; $1,94.10^8$ so với $6,38.10^8$, $4,55.10^8$ và $8,36.10^8$ đối với *E.coli*). Tuy nhiên đến cuối can thiệp thì số lượng trung bình của *Bacteroides* và *E.coli* lại thấp nhất ở nhóm synbiotic 1 ($0,66.10^8$ so với $7,60.10^8$, $5,81.10^8$ và $2,44.10^8$ đối với *bacteroides*) và ($0,24.10^8$ so với $7,57.10^8$, $10,4.10^8$ và $0,69.10^8$ đối với *E. Coli*). Tuy nhiên các sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Như vậy đến cuối can thiệp (sau 6 tháng thì số lượng trung bình của tổng số vi khuẩn, *Bacteroides* và *E.coli* là thấp nhất ở nhóm synbiotic 1. Tỷ lệ vi khuẩn *bacteroide* trên tổng số vi khuẩn trong phân sau can thiệp đã được giảm đi rất nhiều ở 2 nhóm uống sữa bổ sung synbiotic, trong khi lại tăng lên ở nhóm chứng và nhóm uống sữa bổ sung prebiotic. Cũng tương tự như đối với vi khuẩn *bacteroide*, tỷ lệ *E. coli* trên tổng số vi khuẩn trong phân sau can thiệp đã được giảm đi tuy không nhiều ở 2 nhóm uống sữa bổ sung synbiotic, trong khi lại tăng lên rất cao ở nhóm chứng và nhóm uống sữa bổ sung prebiotic. (Bảng 3.24 và biểu đồ 3.14 & 3.15 & 3.16 & 3.17). Kết quả này của chúng tôi cũng giống như kết quả của một nghiên cứu khác việc bổ sung *BB12* làm giảm vi khuẩn có hại trong phân của trẻ [98]

Cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của chúng tôi, một số nghiên cứu của các tác giả khác cũng cho thấy, việc bổ sung GOS và FOS sẽ kích thích sự phát triển của các vi khuẩn có lợi trong đường ruột của trẻ như *Bifidobacteria* [99], [116].

Kết quả nghiên cứu của Rigo cho thấy kết hợp GOS / FOS (0,4 g/100 ml) ở trẻ sơ sinh đủ tháng có tác dụng lên *bifidobacteria* và tỷ lệ *bifidobacteria* trên tổng số vi khuẩn trong phân tăng từ 21% ở ba ngày tuổi lên khoảng 50% ở 25 ngày tuổi [123]. Kết quả nghiên cứu của Schmelzle cũng cho kết quả tương tự khi kết hợp GOS / FOS (0,8 g/100 ml) [141]. Nghiên cứu của Costalos cho thấy *clostridia*

trong phân thấp hơn, số lần đại tiện nhiều hơn, phân mềm hơn ở trẻ sơ sinh đủ tháng được cho bổ sung 0,4 g GOS / FOS (tỷ lệ 9:1) so với nhóm chứng [59].

Một trong các nghiên cứu lâm sàng đầu tiên của *B. lactis BB12* ở trẻ em được tiến hành tại Nhật Bản với sự tham gia của 7 trẻ em khỏe mạnh từ 15 đến 31 tháng tuổi. Trẻ được bổ sung probiotic *B. Lactis BB12* với liều lượng 1×10^9 /ngày trong 21 ngày. Trong thời gian can thiệp, *BB12* được tìm thấy trong các mẫu phân của trẻ cũng như IgA ở một số mẫu phân cao hơn đáng kể ở một số thời điểm can thiệp. Một tuần sau khi ngừng can thiệp, *BB12* đã không còn phát hiện trong các mẫu phân và IgA trong phân cũng không cao [74]. Sự xuất hiện có chọn lọc của *BB12* trong các mẫu phân của trẻ em được bổ sung probiotic cũng đã được ghi nhận trong các báo cáo khác được Haschke và cộng sự tổng hợp [87]. Một nghiên cứu khác cho thấy việc bổ sung *BB12* có ảnh hưởng lên hệ vi khuẩn đường ruột của trẻ đẻ non; số lượng *B. Lactis BB12* tăng lên ở trong phân, trong khi đó *Enterobacteria* và *clostridia* thì giảm khoảng 10-15% [113]. Một nghiên cứu khác tại Hà Lan trên trẻ từ 1,6 đến 4 tháng tuổi bị dị ứng sữa bò với việc cho uống sữa bổ sung *BB12* và *CRL341*, kết quả xét nghiệm cho thấy *BB12* và *CRL 341* cũng được tìm thấy trong phân [90].

Một nghiên cứu được tiến hành trên 30 người tình nguyện nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của GOS đơn lẻ hoặc GOS kết hợp với probiotic *B.Lactis BB12* cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ và số lượng *Bifidobacterium lactis BB12* giữa các nhóm nghiên cứu, kết quả này cho thấy GOS không phải là yếu tố làm tăng khả năng sống còn hoặc bền bỉ của *B. lactis BB12* [25]. Nghiên cứu của chúng tôi không chứng minh được điều này do không có nhóm probiotic riêng lẻ.

Một nghiên cứu khác được tiến hành trên 105 trẻ khỏe mạnh tuổi từ 0-2 tháng, trẻ được chia thành 2 nhóm: nhóm can thiệp (51 trẻ) được uống sữa có bổ sung *LGG* và nhóm chứng (44 trẻ) được uống sữa công thức không bổ sung cho đến khi trẻ được 6 tháng tuổi nhằm đánh giá ảnh hưởng của sữa công thức được bổ sung

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) lên tăng trưởng và vi khuẩn trong phân trong 6 tháng đầu đời của trẻ. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm can thiệp có số lần đại tiện cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng $9,1 \pm 2,06$ so với $8,0 \pm 2,8$ ($p < 0,05$). Chủng *Lactobacilli* được tìm thấy nhiều hơn một cách có ý nghĩa ở nhóm can thiệp so với nhóm chứng (91% so với 76% ($P < 0,05$)) [157]. Trong nghiên cứu của chúng tôi khi bổ sung *CRL-341* và *BB12* thì trong 3 tháng đầu số lượng *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* có tăng lên, tuy nhiên xu hướng này không được duy trì sau 6 tháng can thiệp.

Một số nghiên cứu khác còn cho thấy việc kết hợp prebiotic và probiotic cải thiện độ đặc lỏng của phân [36], [67], [122], [158] và ảnh hưởng tích cực lên vi khuẩn đường tiêu hóa thông qua việc kích thích sự phát triển của *Bifidobacteria* [122].

Nghiên cứu của Bakker-Zierikzee trên 3 nhóm trẻ sơ sinh được tiến hành ngay sau khi trẻ sinh ra, trẻ được ngẫu nhiên chia thành 3 nhóm: nhóm 1 ($n=19$) được uống sữa bổ sung prebiotic (GOS/FOS) với 6 g/l, Nhóm prebiotic ($n = 9$) được uống sữa có bổ sung *BB12* với liều lượng $6,0 \times 10^{10}/L$ và nhóm chứng ($n = 19$), được uống sữa công thức không bổ sung trong vòng 16 tuần. Mẫu phân được lấy xét nghiệm vào ngày thứ 5 và 10 sau khi trẻ sinh và vào tuần thứ 4, 8, 12 và tuần 16. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ *bifidobacteria* có cao hơn ở các nhóm can thiệp ở tuần thứ 16, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (tương ứng là 59,2%, 52,7% và 51,8% ở nhóm GOS/FOS, nhóm *BB12* và nhóm chứng [30]. Kết quả này cũng tương tự như trong nghiên cứu của chúng tôi, ở tháng thứ 3 tỷ lệ *bifidobacteria* ở các nhóm bổ sung prebiotic và synbiotic 1 cũng có xu hướng cao hơn so với nhóm chứng (22,9%, 24,4% so với 20,4%), tuy nhiên xu hướng này không duy trì ở tháng thứ 6.

Một nghiên cứu khác trên 30 trẻ đẻ non được chia làm 2 nhóm: nhóm can thiệp được bổ sung GOS/FOS 10g/L với tỷ lệ như trong sữa mẹ (9:1) và nhóm chứng được bổ sung sữa công thức, bên cạnh đó nhóm trẻ được nuôi bằng sữa mẹ với

n =12 được sử dụng như nhóm tham khảo. Mẫu phân của trẻ được thu thập vào ngày 1, 7, 14, và 28 ngày, và các đặc tính của phân, tăng trưởng, biến chứng cũng được thu thập và ghi lại. Kết quả nghiên cứu cho thấy số lượng *bifidobacteria* ở nhóm bổ sung GOS/FOS cao hơn một cách có ý nghĩa so với nhóm chứng ($p=0,0008$), trong thời gian can thiệp phân của nhóm chứng trở nên cứng hơn trong khi đó phân ở các nhóm khác thì ổn định [75]. Kết quả này cũng giống như kết quả nghiên cứu của chúng tôi trẻ ở nhóm synbiotic 1 có số ngày phân cứng ít hơn rõ rệt ($p<0,01$). Một nghiên cứu được tiến hành trên 20 người trưởng thành tuổi từ 40 - 65, trong đó nhóm can thiệp được bổ sung 3 lần/ ngày 100 ml sữa lên men bổ sung 10^9 CFU *L. casei Shirota*/ml và nhóm chứng được uống sữa không lên men trong vòng 8 tuần. Kết quả cho thấy so với nhóm chứng thì nhóm can thiệp có số lượng *Lactobacillus* trong phân tăng lên một cách rõ rệt, trong đó *L. casei Shirota* là chủ yếu với số lượng 10^7 CFU/g phân tươi và số lượng *Bifidobacterium* cũng tăng lên một cách có ý nghĩa ($p<0,05$) [150]. Một nghiên cứu trên người trưởng thành cho thấy việc bổ sung 250 ml sữa với các liều khác nhau của *Bifidobacterium lactis HN019 (DR10TM)* [5×10^9 CFU/ngày (cao), $1,0 \times 10^9$ CFU/ngày (trung bình) và $6,5 \times 10^7$ CFU/ngày (thấp)] trong vòng 4 tuần cho thấy sau can thiệp số lượng *bifidobacteria*, *lactobacilli* và *enterococci* trong phân tăng lên rõ rệt sau 4 tuần với số lượng trung bình *bifidobacteria* ở nhóm chứng là $9,31 \pm 0,01$ log CFU/g phân, ở nhóm liều cao, trung bình và liều thấp, số lượng *bifidobacteria* cao hơn hẳn so với nhóm chứng ($9,88 \pm 0,1$, $9,75 \pm 0,14$ và $9,74 \pm 0,11$ log CFU/g phân, tương ứng) ($p<0,006$), kết quả cho thấy thậm chí với liều thấp ($6,5 \times 10^7$ CFU/ngày) cũng làm thay đổi số lượng *bifidobacteria*, *lactobacilli*, *enterococci* [24]. Một nghiên cứu khác cho thấy việc bổ sung sớm *B. breve* cho trẻ có cân nặng sơ sinh thấp là có ích trong việc hỗ trợ hình thành hệ vi khuẩn chí đường ruột và *Bifidobacteria* [104].

Trong một nghiên cứu trên 232 bà mẹ mang thai có tiền sử bị dị ứng với việc bổ sung 1×10^8 CFU *L reuteri* (ATCC) 55730 hằng ngày trong vòng 4 tuần cuối trước khi sinh và con của họ được bổ sung như mẹ cho đến khi được 12 tháng tuổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy *Lactobacillus reuteri* được tìm thấy trong sữa mẹ và trong phân của hầu hết trẻ tham gia nghiên cứu [22].

Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, đối với hệ vi khuẩn chí đường ruột thì các nhóm synbiotic có tác dụng tích cực lên thành phần và tỷ lệ các vi khuẩn có lợi và hại của cơ thể, tuy nhiên tác dụng này chưa thực sự ổn định. Nghiên cứu cũng cho thấy *BB12* có thể sống và phát triển ổn định trong 6 tháng can thiệp. Phần lớn các nghiên cứu đều cho thấy probiotic có thể sống và tăng trưởng trong đường ruột của trẻ, tuy nhiên tác dụng của probiotic khi bổ sung trong thời gian dài cần phải được nghiên cứu thêm. Phần lớn các nghiên cứu can thiệp trong thời gian ngắn hoặc trong giai đoạn ban đầu thì tác dụng của probiotic tương đối rõ rệt hơn so với các giai đoạn sau.

Tác dụng của synbiotic có thể là do prebiotic và probiotic làm thay đổi hệ vi khuẩn trong đường ruột và do vậy làm tăng sức đề kháng đối với các bệnh nhiễm khuẩn thông qua cạnh tranh và ức chế sự phát triển của các vi khuẩn có hại hoặc (tuyên bảo vệ đầu tiên) và thông qua việc thay đổi chức năng miễn dịch (tuyên bảo vệ thứ hai).

Một nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc bổ sung *B. lactis BB12* và *L. casei CRL431* kết hợp với 0,25 g galacto-oligosaccharides trong 100 ml sữa công thức là an toàn và không có các tác dụng có hại lên sự tăng trưởng và hành vi ở trẻ nhỏ ở Hà Lan [158]. Mặc dù không phải là mục tiêu nhưng nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy việc bổ sung *B. lactis BB12* và *L. casei CRL431* cho trẻ em Việt nam là an toàn và dung nạp tốt khi kết hợp với GOS/FOS (9:1) trong sữa công thức (tác động tích cực lên tăng trưởng cân nặng/chiều cao của trẻ, không tác dụng có hại lên tình trạng nhiễm khuẩn của trẻ, tính chất phân của trẻ phần nào được cải

thiện, số lần đại tiện của trẻ có xu hướng tăng ở các nhóm synbiotic). Nghiên cứu chỉ ra rằng các nhóm trẻ được bổ sung prebiotic hoặc synbiotic có ưu thế về tăng trưởng cân nặng và chiều cao hơn so với nhóm chứng và ưu thế này được xác định ngay từ tháng đầu tiên và duy trì trong suốt thời gian nghiên cứu, nhất là trẻ ở nhóm synbiotic 1. Tác dụng lên tăng trưởng cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ và phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chủng probiotic, liều lượng, thời gian bổ sung và tình hình bệnh tật của trẻ.

Trong nghiên cứu của chúng tôi thì các triệu chứng nhiễm khuẩn ít bị tác động của việc bổ sung prebiotic và synbiotic, có thể do liều bổ sung trong nghiên cứu của chúng tôi là thấp hơn so với các nghiên cứu khác [52], [76]. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của chúng tôi, phần lớn trẻ vẫn tiếp tục bú mẹ bên cạnh việc bổ sung prebiotic và synbiotic. Như chúng ta đã biết sữa mẹ là tiêu chuẩn vàng cho sữa công thức, sữa mẹ giúp trẻ phòng chống bệnh nhiễm khuẩn, kích thích sự phát triển của vi khuẩn có ích và làm phân của trẻ mềm hơn. Trẻ bú sữa mẹ ít bị nhiễm khuẩn đường tiêu hóa hơn so với trẻ uống sữa công thức [33], [47], [63], [86]. Điều này là do trong sữa mẹ có các yếu tố bảo vệ như kháng thể IgA giúp chống lại các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn hô hấp và viêm đường ruột có trong môi trường xung quanh người mẹ và trẻ, lactoferrin trong sữa mẹ có thể tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh và ngăn ngừa chúng bám vào màng nhày [86], sữa mẹ còn chứa các chất kích thích miễn dịch và chất chống viêm như leukocytes, cytokines, chemokines, hóc môn, các acid béo, muối khoáng, vitamin và nucleotid. Các chất này cũng có thể ảnh hưởng lên hệ miễn dịch [51], [90]. Có thể trong nghiên cứu của chúng tôi tác dụng của việc bổ sung thêm prebiotic và synbiotic không được rõ ràng do trẻ đã có các yếu tố bảo vệ tốt từ sữa mẹ. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, phần lớn các trường hợp lượng sữa bổ sung cho trẻ bị hạn chế và chỉ bổ sung cho khoảng < 30% nhu cầu sữa hằng ngày và sữa mẹ cung cấp phần lớn nhu cầu của trẻ. Bên cạnh đó, các đặc tính của phân chưa được

cải thiện rõ rệt khi bổ sung prebiotic và probiotic. Điều này nói lên rằng việc bổ sung thêm GOS/FOS không thể cải thiện hơn khi trẻ đã có sữa mẹ do sữa mẹ chứa oligo- saccharides cũng làm tăng sự phát triển của các loài vi khuẩn *bifidobacteria*, đây là loài vi khuẩn có mặt sớm nhất trong đường tiêu hoá [164], Oligosaccharides trong sữa mẹ được xem như là prebiotic vì nó hỗ trợ sự phát triển của vi khuẩn *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* trong ruột già của những trẻ bú mẹ hoàn toàn [81]. Hệ vi sinh vật của trẻ được nuôi bằng sữa mẹ không những có nhiều vi khuẩn *bifidobacteria* mà còn chứa ít các vi khuẩn gây bệnh có hại so với trẻ bú sữa ngoài [149], điều này một phần nào giải thích tại sao tỷ lệ mắc mới của bệnh nhiễm khuẩn là thấp ở trẻ được nuôi bằng sữa mẹ.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra rằng nhóm synbiotic 1 là nhóm có một vài ưu thế hơn đối với tăng trưởng của trẻ, nhiễm khuẩn tiêu hóa và hô hấp, hệ vi khuẩn chí đường ruột, tuy có lúc chưa thực sự rõ ràng và ổn định.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả của nghiên cứu chúng tôi xin rút ra một số kết luận sau:

1. Về thực trạng nuôi con bằng sữa mẹ, ăn bổ sung, tỷ lệ bệnh nhiễm trùng tại địa bàn nghiên cứu:

Thực hành nuôi con bằng sữa mẹ, cho trẻ ăn bổ sung tại địa phương nghiên cứu còn chưa hợp lí: 44,4% trẻ được cho bú ngay trong vòng ½ giờ sau, 15,2 % bà mẹ cho con bú sau 24h; hơn 50 % bà mẹ cho trẻ ăn/uống các thức ăn khác trước khi cho bú lần đầu; gần 90% trẻ bắt đầu ăn bổ sung dưới 4 tháng tuổi; 10,4 % trẻ từ 4-5 tháng và 0,7 % từ 5-6 tháng tuổi, tháng tuổi trung bình trẻ bắt đầu ăn bổ sung là 3,4 tháng; lí do chủ yếu trẻ được cho ăn bổ sung sớm là do mẹ bận công việc (54,9%) và mẹ không đủ sữa (16,9%); thực phẩm phổ biến cho trẻ ăn bổ sung là các loại bột gạo, bột ăn liền (70,3%), các loại thịt, cá, trứng chỉ chiếm (32,8%).

Thực hành chăm sóc trẻ chưa phù hợp, tỷ lệ mắc bệnh nhiễm khuẩn còn cao: 52,2% bà mẹ cho con bú nhiều hơn khi trẻ bị bệnh và vẫn còn 5,3% bà mẹ cho bú ít hơn khi con họ bị ốm. Tỷ lệ tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp trong vòng hai tuần trước khi nghiên cứu tương ứng là 21,7% và 27,6%.

2. Về hiệu quả của sữa bổ sung prebiotic hoặc synbiotic lên tăng trưởng, nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp và hệ vi khuẩn chí đường ruột

2.1. Ảnh hưởng đến tăng trưởng ở trẻ:

- Sau 6 tháng can thiệp, mức tăng cân nặng ở cả 3 nhóm trẻ được uống sữa bổ sung prebiotic hoặc synbiotic đều cao hơn so với nhóm chứng (2,6 kg, 2,4kg, 2,3kg so với 2,2 kg), đặc biệt trẻ ở nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 1 có mức tăng cân cao hơn hẳn so với nhóm chứng (2,6kg; 2,4kg so với 2,2 kg) ($p < 0,05$);
- Trẻ ở 3 nhóm can thiệp có mức tăng chiều dài nằm cao hơn so với nhóm đối chứng (9,4cm; 9,9cm; 9,5cm so với 9,3cm), tuy nhiên chỉ có trẻ ở nhóm synbiotic 1 có mức tăng chiều dài nằm cao hơn hẳn so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

- Chỉ số Z-Score về cân nặng theo tuổi (WAZ), chiều dài nằm theo tuổi (HAZ), cân nặng theo chiều dài nằm (WHZ) không có sự khác biệt giữa các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

2.2. Ảnh hưởng đến nhiễm khuẩn tiêu hóa và hô hấp ở trẻ:

Sữa bổ sung prebiotic hoặc synbiotic cho trẻ đang bú mẹ trong thời gian 6 tháng chưa có tác dụng rõ rệt lên phần lớn các triệu chứng nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp. Tỷ lệ đầy hơi thấp hơn ở nhóm prebiotic và synbiotic 2 thấp hơn rõ rệt so với nhóm chứng (1,7%; 9,1% so với 23,6%) ($p < 0,05$), số lần trẻ đi phân cứng thấp hơn rõ rệt ở nhóm synbiotic 1 so với các nhóm chứng, nhóm prebiotic và nhóm synbiotic 2 (0 so với 1 và 0; 0) ($p < 0,01$).

2.3. Ảnh hưởng đến hệ vi khuẩn chí đường ruột ở trẻ:

- Sữa bổ sung synbiotic có xu hướng làm tăng số lượng, tỷ lệ một số vi khuẩn có lợi như *Lactobacilli*, (đối với *Bifidobacteria* thì xu hướng này chưa thực sự bền vững), đồng thời làm giảm tổng số vi khuẩn, số lượng, tỷ lệ một số vi khuẩn có hại như *Bacteroides* và *E.coli*. Đặc biệt, sau 6 tháng can thiệp tỷ lệ mẫu phân có *BB12* và số lượng trung bình *BB12* trong phân của trẻ uống sữa bổ sung synbiotic cao hơn hẳn so với cả 2 nhóm kia (43,8% và 66,7%, so với 0%) và ($1,47.10^7$ và $1,85.10^7$ so với 0) ($p < 0,05$). Nhóm synbiotic 1 là nhóm có một vài ưu thế hơn đối với hệ vi khuẩn chí đường ruột, tuy có lúc chưa thực sự ổn định.

KHUYẾN NGHỊ

1. Cần tăng cường tuyên truyền và giáo dục các bà mẹ tại địa bàn nghiên cứu về NCBSM và ăn bổ sung hợp lí theo khuyến cáo của WHO nhằm giảm thiểu các bệnh nhiễm khuẩn góp phần cải thiện tình trạng dinh dưỡng của trẻ.
2. Sữa bổ sung synbiotic, đặc biệt là synbiotic 1 có thể sử dụng cho trẻ từ 6-12 tháng tuổi không được bú mẹ hoặc mẹ bị thiếu sữa, góp phần cải thiện tình trạng dinh dưỡng và cải thiện hệ vi khuẩn chí đường ruột cho trẻ.
3. Cần có các nghiên cứu sâu hơn với các chủng probiotic khác nhau nhằm đánh giá ảnh hưởng của chúng lên tăng trưởng, tình trạng nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp, hệ vi khuẩn đường ruột ở trẻ, đặc biệt trẻ không được nuôi bằng sữa mẹ (trẻ mồ côi).

TÓM TẮT NHỮNG ĐIỂM MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Thử nghiệm hương can thiệp mới trong giảm thiểu nhiễm khuẩn đường tiêu hóa và hô hấp bên cạnh các giải pháp can thiệp dinh dưỡng khác góp phần cải thiện tình trạng dinh dưỡng trẻ em Việt Nam.
2. Đánh giá được ảnh hưởng của prebiotic và synbiotic (CRL341/*BB12* kết hợp với prebiotic GOS/FOS với các liều lượng khác nhau) lên tăng trưởng, nhiễm khuẩn đường tiêu hóa, hô hấp và lên hệ vi khuẩn đường ruột ở trẻ 6-12 tháng tuổi đang bú mẹ ở Việt Nam
3. Kết quả nghiên cứu cho thấy *B. lactis BB12* được bổ sung có khả năng sống và phát triển ổn định trong đường ruột trẻ em Việt nam trong 6 tháng nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. **Nguyễn Yên Bình (2003)**, *Nghiên cứu một số vi sinh vật gây tiêu chảy cấp ở trẻ từ 3 tháng đến 5 tuổi tại bệnh viện Xanh pôn- Hà nội và tính kháng thuốc của chúng*, Luận văn bác sỹ chuyên khoa 2, Trường đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
2. **Bộ môn dinh dưỡng & An toàn thực phẩm, Đại học Y Hà nội (2004)**, *Dinh dưỡng và an toàn thực phẩm*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.78-97, 113-128, 254-256.
3. **Bộ Y tế (2009)**, *Tài liệu hướng dẫn xử trí tiêu chảy ở trẻ em*, Ban hành kèm theo quyết định số 4121/QĐ-BYT ngày 28/10/2009, Bộ Y tế, Hà Nội.
4. **Bộ Y tế, Chương trình ARI (1994)**, *Nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính trẻ em*, Nhà xuất bản Giao thông vận tải, Hà Nội, tr.2-29, 142-150.
5. **Nguyễn Kim Cảnh, Lê Bạch Mai (2004)**, "Một số nhận xét về tình hình sữa mẹ và cân nặng sơ sinh trẻ em", *Thông tin dinh dưỡng số 1*, Viện Dinh dưỡng, Hà Nội.
6. **Nguyễn Việt Cồ, Bùi Đức Dương (2000)**, *Tình hình sử dụng dịch vụ y tế cơ sở và khả năng tiếp cận của trẻ em với chương trình NKHHCT*, Hội nghị tổng kết hoạt động ARI, Hà Nội, tr. 38.
7. **Đào Ngọc Diễn, Nguyễn Trọng An và CS (1989)**, "Tìm hiểu cách nuôi trẻ em trong thời kỳ bú mẹ", *Kỷ yếu công trình Nhi khoa*, Viện Bảo Vệ Sức Khỏe Trẻ Em, Hà Nội, tr.14.
8. **Cao Thu Hương (2005)**, *Sử dụng bột giàu năng lượng - vi chất phòng chống thiếu dinh dưỡng ở trẻ em 5-8 tháng tuổi*, Luận án Tiến sỹ Y học, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, Hà Nội.

9. **Nguyễn Công Khẩn (1995)**, *Thiếu vitamin A và bệnh khô mắt ở trẻ em dưới 5 tuổi vùng đồng bằng Sông Hồng Việt Nam*, Luận án Tiến sỹ Y học, Hà Nội.
10. **Hà Huy Khôi, Nguyễn Công Khẩn, Phạm Duy Tường, Nguyễn Trọng An (1990)**, "Tìm hiểu ảnh hưởng của việc bổ sung vitamin A liều cao tới tình trạng dinh dưỡng trẻ em", *Tạp chí y học thực hành*,(1), tr.5-6.
11. **Hà Huy Khôi, Từ giấy (1994)**, *Các bệnh thiếu dinh dưỡng và sức khoẻ cộng đồng ở Việt nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.4,7-19.
12. **Nguyễn Xuân Ninh, Bùi Anh Tuấn và CS (2008)**, "Hiệu quả của bổ sung sữa giàu Prebiotic đến tình trạng tiêu hóa, vi chất dinh dưỡng ở trẻ 24-36 tháng tuổi", *Tạp chí y học thực hành*, 1(594-595), tr. 87-90.
13. **Nguyễn Xuân Ninh, Dương Thị Tình và CS (2009)**, *Hiệu quả của sữa có probiotic và prebiotic đến tình trạng dinh dưỡng, nhiễm khuẩn, miễn dịch của trẻ 18-36 tháng tuổi*, Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Viện - Viện Dinh Dưỡng, Hà Nội.
14. **Phạm Văn Phú (2007)**, *Nghiên cứu giải pháp cải thiện chất lượng thức ăn bổ sung dựa vào nguồn nguyên liệu địa phương ở một vùng nông thôn tỉnh Quảng Nam*, Luận án Tiến sỹ Y học, Đại Học Y Hà Nội, Hà Nội.
15. **Nguyễn Lan Phương (2011)**, *Hiệu quả của bổ sung sữa có probiotic và prebiotic đến tình trạng dinh dưỡng và tình trạng miễn dịch của trẻ từ 18-36 tháng tuổi tại huyện Gia Bình, Bắc Ninh*, Luận án thạc sỹ dinh dưỡng cộng đồng, Viện Dinh Dưỡng, Hà Nội.
16. **Nguyễn Đình Quang (1996)**, *Thực hành nuôi con của bà mẹ ở nội ngoại thành Hà Nội giai đoạn hiện tại*, Luận án thạc sỹ dinh dưỡng cộng đồng, Đại Học Y Hà Nội, Hà Nội.

17. **Hoàng Kim Thanh, Hà Huy Khôi (1994)**, "Nghiên cứu tác dụng của bổ sung vitamin A liều cao tới tiến triển ỉa chảy- suy dinh dưỡng ở trẻ em", *Tạp chí y học thực hành* (3), tr.16-18.
18. **VDD (2005)**, *Báo cáo về tình trạng dinh dưỡng trẻ em và bà mẹ*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
19. **VDD (2011)**, *Tình hình dinh dưỡng Việt Nam năm 2009-2010*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
20. **Nguyễn Tấn Viên, Lê Thị Ngọc Việt (1994)**, "Một số nhận xét về bệnh NKHHCT ở trẻ dưới 5 tuổi qua 5.084 trường hợp NKHHCT ở trẻ 2 tháng đến 5 tuổi", *Kỷ yếu công trình Nhi khoa*, tr.358-363.

Tiếng Anh

21. **Abdullah H. Baqui, Robert E. Black, Christa L. Fischer Walker, Shams Arifeen, Khalequz Zaman, Mohammad Yunus, Mohammad A. Wahed and Laura E. (2006)**, "Caulfield. Zinc Supplementation and Serum Zinc During Diarrhea", *Indian J of Pediatr* 73.
22. **Abrahamsson TR, Sinkiewicz G, Jakobsson T, Fredrikson M, Björkstén B. (2009)**, "Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life", *J Pediatr Gastroenterol, Nut* 49(3), pp.349-54.
23. **Adel P. Denhatog, Wija A, Stevensen (1983)**, "Manual for social surveys on food habit and consumption in developing countries", *PUDOC Wagenigen*(8), pp.30-43.

24. **Ahmed M, Prasad J, Gill H, Stevenson L, Gopal P. (2007)**, "Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects", *J, Nutr, Health Aging* 11(1), pp.26-31
25. **Alander M, Mättö J, Kneifel W, Johansson M, Kögler B, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Saarela M. (2001)**, "Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract", *Int, Dairy, J* 11, pp.817-825.
26. **Allen SJ, Okoko B, Martinez E, et al (2004)**, "Probiotics for treating infectious diarrhoea", *Cochrane Database Syst, Rev* 2, CD003048.
27. **Arcasoy A, Akar N, Ors U, Delilbasi L, Karayalcin S.(1990)**, "Ultrastructural changes in the mucosa of the small intestine in patients with geophagia (Prasad's syndrome)", *J Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 11, pp.279–82.
28. **Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. (2007)**, "Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life". *J Nutr Dis* 137, pp.2420-2424.
29. **Bahl R, Bhandari N, Hambidge KM, Bhan MK. (1998)**, "Plasma zinc as a predictor of diarrheal and respiratory morbidity in children in an urban slum setting". *Am J Clin Nutr* 68 (2 Suppl), pp.414S–17S.
30. **Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J, Kok FJ, Tolboom JJ, Bindels JG. (2005)**, "Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium*

animalis on the intestinal microflora during the first 4 months of life". *Br, J, Nutr* 94(5), pp.783-90.

31. **Bakker-Zierikzee AM, Tel EA, Kroes H, Alles MS, Kok FJ, Bindels JG. (2006)**, "Faecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula". *Pediatr, Allergy Immunol* 17, pp.134-140.
32. **Baqui A. H., Zaman K., Persson L.A., Arifeen S.E., Yunus M., Bengum N., Black R. E. (2003)**, "Simultaneous Weekly supplementation of Iron and zinc is associated with Lower Morbidity Due to Diarrhoea and Acute lower Respiratory Infection in Bangladesh infants", *ASNS, J, Nutr* 133, pp.4150-57
33. **Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. (1995)**, "Relation between infant feeding and infections during the first six months of life", *J, Pediatr* 126, pp.191-197.
34. **Beaugerie L and Petit JC. (2004)**. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18(2), pp.337-352.
35. **Bekkali NL, Bongers ME, Van den Berg MM, Liem O, Benninga MA. (2007)**, "The role of a probiotics mixture in the treatment of childhood constipation: a pilot study", *Nutr, J*(6), pp. 17.
36. **Ben X-M, Li J, Feng Z-T, Shi S-Y, Lu Y-D, Chen R, Zhou X-Y. (2008)**, "Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli". *World, J, Gastroenterol* 14(42), pp.6564-6568.
37. **Bettelheim KA, Breadon A, Faiers MC, O'Farrell SM, Shooter RA (1974)**, "The origin of O serotypes of Escherichia coli in babies after

normal delivery". *J, Hyg (Lond)* 72(1), pp.67–70.

38. **Bhadari N., Bahl., Taneja S., Strand T., Molbak K., Ulvik R.J., Sommerfelt H., Bhan M. K. (2002)**, "Effect of routine zinc supplementation on pneumonia in children aged 6 months to 3 years: Randomized controlled trial in an urban slum", *BMJ*, pp.1358-1364.
39. **Bhandari N, Bahl R, Taneja S, et al. (2002)**, "Substantial reduction in severe diarrheal morbidity by daily zinc supplementation in young north Indian children", *Pediatrics*(109), pp.86.
40. **Bitarakwate E, Mworozzi E, Kekitiinwa A.(2003)**, "Serum zinc status of children with persistent diarrhoea admitted to the diarrhoea management unit of Mulago Hospital, Uganda", *Afr, Health, Sci* 3, pp.54–60.
41. **Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M (October 2001)**. "Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life", *J, Allergy Clin, Immunol* 108 (4), pp. 516–20.
42. **Bjorksten B. (2004)**, "Allergy prevention: interventions during pregnancy and early infancy", *Clin, Rev, Allergy Immunol* 26, pp.129-138.
43. **Black, R. E., S. S. Morris, and J. Bryce. (2003)**, "Where and Why Are 10 Million Children Dying Every Year?", *Lancet* 361(9376), pp.2226–34.
44. **Bloem MW, Wedel M, Egger RJ et al. (1990)**, "Mild vitamin A deficiency and risk of respiratory tract diseases and diarrhea in preschool and school children in northeastern Thailand", *Am J of Epidemiol* (131), pp:332–339.

45. **Bruzzese E, Volpicelli M, Squeglia V, Bruzzese D, Salvini F, Bisceglia M.(2009)**, "A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: an observational study", *Clin, Nutr* 28, pp.156-161.
46. **Carman RJ, Simon MA, Fernández H, Miller MA, Bartholomew MJ (December 2004)**. "Ciprofloxacin at low levels disrupts colonization resistance of human fecal microflora growing in chemostats", *Regul, Toxicol, Pharmacol* 40(3), pp.319–26.
47. **Chak E, Rutherford GW, Steinmaus C. (2009)**, "The role of breast-feeding in the prevention of helicobacter pylori infection: a systematic review", *Clin, Infect, Dis* 48, pp.430–437.
48. **Chandra RK, Au B.(1980)**, "Single nutrient deficiency and cell-mediated immune responses. I. Zinc", *Am, J, Clin, Nutr* 334, pp.736–8.
49. **Chaudhary S, Verma M, Dhawan V, et al.(1996)**, "Plasma vitamin A, zinc and selenium concentrations in children with acute and persistent diarrhoea", *J, Diarrhoeal Dis, Res* 14, pp.190–3.
50. **Chiang BL, Sheih YH, Wang LI-I, Liao CK, Gill HS (2000)**, "Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acidbacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses", *Eur, J, Clin, Nutr* 54, pp.849-855.
51. **Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A. (2008)**, "Anti infective properties of human milk", *J, Nutr* 138, pp.1801S-1806S.

52. **Chouraqui JP, Grathwohl D, Labaune JM, et al. (2008)**, "Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial", *Am, J, Clin, Nutr* 87, pp.1365–1373.
53. **Chouraqui JP, Van Egroo LD, Fichot MC. (2004)**, "Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 38, pp.288-292.
54. **Christensen HR, Larsen CN, Kaestel P, Rosholm LB, Sternberg C, Michaelsen KF, Frøkiaer H. (2006)**, "Immunomodulating potential of supplementation with probiotics: a dose-response study in healthy young adults", *FEMS, Immunol, Med, Microbiol* 47(3), pp.380-90.
55. **Chua S, Viegas O.A, Cousinsman J.J et al (1989)**, "Breastfeeding trends in Singapore", *Soc, Sci, Med* 28(3), pp.271-27.
56. **Cooper PA, Mokhachane M, Bolton KD, Steenhout P, Hager C. (2006)**, "Growth of infants born from HIV positive mothers fed with acidified starter formula containing *Bifidobacterium lactis*", *Eur, J, Peds* 165(Suppl 13), pp.114.
57. **Coppa GV, Bruni S, Morelli L, Soldi S, Gabrielli O. (2004)**. "The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides", *J, Clin Gastroenterol* 38(6 Suppl), pp. S80-3.
58. **Correa NB, Peret Filho LA, Penna FJ, Lima FM, Nicoli JR.** "A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactic* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants", *J, Clin, Gastroenterol* 39, pp 385-389.

59. **Costalos, C., Kapiki, A., Apostolou, M., Papathoma, E. (2007)**, “The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants”. *Early Hum Dev* doi: 10.1016/j.earlhumdev. 03.001.
60. **Cummings JH, Macfarlane GT, Macfarlane S. (2006)**, “Intestinal bacteria and ulcerative colitis”, *Curr, Issues, Intesl, Microbiol* 4, pp.9-20.
61. **Dang Nhu Phon, Nguyen Van Tap (2010)**, "Acute respiratory infections in children of pre-schools in Hue city", *J of science, Hue University* (61), pp.333-338.
62. **Denny, F. W. Jr. (1995)**, “The Clinical Impact of Human Respiratory Virus Infections”, *Am J of Respirat and Crit Care Med* 152 (4, part 2), pp. S4–12.
63. **Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen RL.(1995)**, "Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants", *J, Pediatr* 126, pp.696-702.
64. **Dixon G (1992)**, "Colostrum avoidance and early infant feeding in Asian society", *Asia pacific J, Clin, Nutr*(1), pp.225-229.
65. **Dutta P, Mitra U, Datta A, et al. (2000)**, "Impact of zinc supplementation in malnourished children with acute watery diarrhoea", *J, Trop, Pediatr*(46), pp.259–63.
66. **Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. (2003)**. “Intestinal microflora in early infancy: composition and development”, *Acta Paediatr, Suppl* 91(441), pp. 48-55.

67. **Fanaro S, Marten B, Bagna R, Vigi V, Fabris C, Peña-Quintana L et al. (2008)**, "Galacto-oligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study", *J, Pediatr Gastroenterol, Nutr* 48, pp. 82-88.
68. **FAO/WHO (2002)**. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*.
69. **Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. (2002)**. "Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates", *Appl, Environ, Microbiol* 68, pp.219-26.
70. **FAO/WHO (2001)**, *The Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*, FAO/WHO Report No. 10-1-2001.
71. **FAO/WHO (2002)**. *The Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*, FAO/IWHO Report No. 4-30-2002.
72. **Forchielli ML, Walker WA. (2005)**, "The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence", *Br, J, Nutr* 93(suppl 1), pp. S41-S48.
73. **Foundation (1990)**, "For the advancement of the knowledge of nutrition of mother and child in developing countries", *Urban nutrition of preschool children*, Proceeding of a workshop, Netherland, pp.44-45.
74. **Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. (1998)**, "Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children", *Int, J, Food Microbiol* 42, pp.39-44.

75. **G Boehm, M Lidestri, P Casetta, J Jelinek, F Negretti, B Stahl, A Marini. (2002)**, "Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants", *Arch, Dis, Child Fetal Neonatal*, Ed 86, pp.F178-181.
76. **Gaon D, Garcia H, Winter L, Rodriguez N, Quintas R, Gonzalez SN, Oliver G. (2003)**, "Effect of lactobacillus strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children", *Medicina* 63, pp.293-298.
77. **Gebhard RL, Karouani R, Prigge WF, McClain CJ. (1983)**, "The effect of severe zinc deficiency on activity of intestinal disaccharidases and 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the rat", *J, Nutr* 113, pp.855–9.
78. **Gibson GR, Roberfroid MB. (1995)**, "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics", *J, Nutr* 125, pp.1401–12.
79. **Gibson RG. (2004)**. "Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept)", *Clinical Nutrition Supplements* 1(2), pp. 25-31.
80. **Glasziou PP, Mackerras DEM (1993)**, "Vitamin A supplementation in infectious diseases: a meta-analysis", *British Med J* (306), pp.366–370.
81. **Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. (2000)**, "Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro", *J, Nutr* 130, pp.3014–50.

82. **Gonzalez SN, Albarracin G, Locascio de Ruiz Pesce M, Apella M, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G. (1990)**, "Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk", *Microbiol, Aliments, Nutr* 8, pp.349-354.
83. **Guarner F and Malagelada JR. (2003b)**. "Gut flora in health and disease", *The Lancet* 361(9356), pp. 512-519.
84. **Guarner F and Malagelada JR. (2003a)**. *Role of bacteria in experimental colitis*, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, Volume 17(Issue 5), pp.793-804.
85. **Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. (2000)**, "Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 31, pp.453-457.
86. **Hanson LA (2007)**, "Session 1: feeding and infant development breast-feeding and immune function", *Proc, Nutr, Soc* 66, pp.384-396.
87. **Haschke, F., Wang, W., Ping, G., Varavithya, W., Podhipak, A., Rochat, F., Link-Amster, H., Pfeifer, A., Diallo-Ginstl, E., and Steenhout, P. (1998)**, "Clinical trials prove the safety and efficacy of the probiotic strain Bifidobacterium Bb12 in follow-up formula and growing milks", *Monatsschr, Kinderheilk*, 146 (1), pp. S26-S30.
88. **Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. (2000)**. "Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 30, pp.61-7.

89. **HKI Indonesia (2004)**, “Nutrition and Health Surveillance in rural Central Java Key results for the period: Dec 1999 – Sep 2003”, *HKI Indonesia Crisis Bulletin* 10.
90. **Hol J, van Leer EH, Elink Schuurman BE, de Ruiter LF, Samsom JN, Hop W, Neijens HJ, de Jongste JC, Nieuwenhuis EE. (2008)**, "The acquisition of tolerance toward cow's milk through probiotic supplementation: a randomized, controlled trial", *J, Allergy Clin, Immunol* 121, pp.1448-1454.
91. **Humphrey JH, Agoestina T, Wu L et al. (1996)**, "Impact of neonatal vitamin A supplementation on infant morbidity and mortality", *J of Pediatr* (128), pp.489–496.
92. **Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. (2000)**, “Probiotics in the management of atopic eczema”, *Clin, Exp, Allergy* 30, pp.1604-1610.
93. **Isolauri E, Ribeiro HC, Gibson G, et al. (2002)**, "Functional foods and probiotics: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition", *J, Pediatr Gastroenterol, Nutr* 35, pp.S106–S109.
94. **Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. (2001)**, “Probiotics: effects on immunity”, *Am, J, Clin, Nutr* 73(2), pp.444S-50S.
95. **Isolauri E. (1996)**, “Studies on Lactobacillus CC in food hypersensitivity disorders”, *Nutr, Today Suppl* 31, pp.285-315.

96. **Jiang, Z., N. Nagata, E. Molina, L. O. Bakaletz, H. Hawkins, and J. A. Patel. (1999)**, “Fimbria-Mediated Enhanced Attachment of Nontypeable Haemophilus influenzae to Respiratory Syncytial Virus-Infected Respiratory Epithelial Cells”, *Infection and Immunity* 67, pp.187–92.
97. **Kerac M, Bunn J, Seal A, Thindwa M, Tomkins A, Sadler K, Bahwere P, Collins S (2009)**. "Probiotics and prebiotics for severe acute malnutrition (PRONUT study): a double-blind efficacy randomised controlled trial in Malawi.", *Lancet* 374(9684), pp.136-44.
98. **Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. (2002)**, “Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning”, *Gut* 51, pp.51-55.
99. **Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkers J, Gro S, Helm K, et al. (2005)**, “Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructooligosaccharides: more like breast-fed infants”, *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 40, pp.36–42.
100. **Kotowska M, Albrecht P, Szajewska H. (2005)**, “Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial”, *Aliment, Pharmacol, Ther* 21, pp.583-590.
101. **Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, et al (2008)**, "Long-term safety and impact on infection rates of postnatal probiotic and prebiotic (synbiotic) treatment: Randomized double-blind, placebo-controlled trial", *Pediatr* 122, pp.8-12.

102. **Kullen MJ, Bottler J. (2005)**, “The delivery of probiotics and probiotics to infants”, *Curr Pharm Des* 11, pp.55-74.
103. **Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. (2005)**, “Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy”, *Pediatr* 115, pp.178-181.
104. **Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. (2004)**, "Effects of bifidobacterium breve supplementation on intestinal flora of low birth weight infants", *Pediatr, Int* 46(5), pp.509-15.
105. **Lwanga S.K, Lemeshow S (1991)**, *Sample size determination in health study*, WHO, pp. 7-36.
106. **Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. (2008)**, "Bacterial metabolism and health related effects of galactooligosaccharides and other prebiotics", *J, Appl, Microbiol* 104(2), pp.305-344.
107. **Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. (1999)**, “Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression”, *Am, J, Physiol* 276, pp.G941-G950.
108. **Magne F, Suau A, Pochart P, Desjeux JF. (2005)**, “Fecal microbial community in preterm infants”, *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 41, pp.386-392.
109. **Martin et al. (2005)**, "Probiotic Potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breastmilk", *J, Hum, Lact* 21(1), pp.8-17.
110. **Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, et al. (2002)**, “Effect of Lactobacillus GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus

nosocomial infection”, *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 35, pp.527-5.

- 111. Matarese LE, Seidner DL, Steiger E. (2003),** "The role of probiotics in gastrointestinal disease", *Nutr, Clin, Pract* 18, pp.507–516.
- 112. Md. Salim Shakur, M.A. Malek, Nasreen Bano and Khaleda Islam. (2004),** "Zinc Status in Well Nourished Bangladeshi Children Suffering from Acute Lower Respiratory Infection”, *Indian Pediatr* 41.
- 113. Mohan R, Koebnick C, Radke M, Schildt J, Possner M, Blaut M. (2006),** “Microbial colonization of the gastrointestinal tract of preterm infants: diversity and new ways for prevention of infections”, *Eur Academy of Pediatr, Barcelona, Spain* Abstract PG3-07.
- 114. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, et al. (2006),** “Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study”, *J, Clin, Microbiol* 44, pp.4025-4031.
- 115. Moro G, Arslanoglou S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G. (2006),** "A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age", *Arch, Dis, Child* 91, pp.814-819.
- 116. Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, et al.(2002),** "Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructo-oligosaccharides in formula-fed term infants", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 34, pp.291–5.

- 117. Ninh N.X., Thissen J.P., Collette L, Gerard G, Khoi H.H., Ketelslegers J. M. (1996),** “Zinc supplementation increases growth and circulating insulin-like growth factor I (IGF) in growth- retarded Vietnamese children”, *Am, J, Clin, Nutr* (63), pp.514-9.
- 118. Nopchinda, S., Varavithya, W., Phuapradit, P., Sangghai, R., Suthovoravut, U., Chantraruska, V., and Haschke, F. (2002),** “Effect of Bifidobacterium Bb12 with or without Streptococcus thermophilus supplemented formula on nutritional status”, *J, Med, Assoc, Thai*, 85(4), pp.S1225-1231.
- 119. Osborn DA, Sinn JKH.(2009),** "Prebiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity", *Cochrane Database of Systematic Reviews*, pp.4.
- 120. Pekarek R, Sandstead H, Jacob R, Barcome D.(1979),** "Abnormal cellular immune responses during acquired zinc deficiency". *Am, J, Clin, Nutr* 32, pp.1466–71.
- 121. Phuapradit, P., Varavithya, W., Vatanophas, K., Sangghai, R., Podhipak, A., Suthovoravut, U., Nopchinda, S., Chantraruska, V., and Haschke, F. (1999),** “Reduction of rotavirus infection in children receiving bifidobacteria-supplemented formula”, *J, Med, Assoc, Thai* 82(1), pp.S43-48.
- 122. Puccio G, Cajozzo C, Meli F, et al. (2007),** "Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live Bifidobacterium longum BL999 and prebiotics", *Nutr* 23, pp.1–8.

- 123. Rigo, J., Pieltain, C., Studzinski, F., Knol, J., and Bindels, J.G. (2001),**
“Clinical evaluation in term infants of a new formula based on prebiotics, β -palmitate and hydrolysed proteins”. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 32, pp.402.
- 124. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. (2005),**
“Effect of probiotics and breastfeeding on the Bifidobacterium and Lactobacillus/ enterococcus microbiota and humoral immune responses”, *J, Pediatr* 147, pp.186-191.
- 125. Roberto Berni Canani, Pia Cirillo, Gianluca Terrin, Luisa Cesarano, Maria Immacolata Spagnuolo, Anna De Vincenzo, Fabio Albano, Annalisa Passariello et al. (2007),** "Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations", *BMJ*, pp.335-340.
- 126. Rose MA, Stieglitz F, Koksal A, Schubert R, Schultze J, Zielen S. (2010),** "Efficacy of probiotic Lactobacillus LGG on allergic sensitization and asthma in infants at risk", *Clin, Exp, Allergy* 40, pp.1398-1405.
- 127. Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, et al. (2002),** “Effect of probiotic Lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea”, *Pediatr, Infect, Dis, J*, pp.411-416.
- 128. Roy S, Behrens R, Haider R, et al.(1992),** "Impact of zinc supplementation on intestinal permeability in Bangladeshi children with acute diarrhoea and persistent diarrhoea syndrome", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 15, pp.289–96.

- 129. Ruel M. T., Rivera J.A., Santizo M. C., Lonnerdal B., Brown H. K (1997),** "Impact of zinc supplementation on morbidity from diarrhoea and respiratory infections among Guatemalan children", *Pediatrics* 99(60), pp.808-813.
- 130. Rutava S, Arvilommi H, Isolauri E. (2002),** "Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants", *Pediatr, Res* 60, pp.222-225.
- 131. Saavedra J. M., Bauman N. A., Oung I., et al. (1994),** "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus", *Lancet* (344), pp.1046-1049.
- 132. Saavedra J.M., Tschernia A. (2002),** "Human studies with probiotics and prebiotics clinical implications", *Br, J, Nutr* 87(suppl 2), pp.S241– 6.
- 133. Saavedra JM, bi-Hanna A, Moore N, et al. (2004),** "Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety", *Am, J, Clin, Nutr* 79, pp.261–267.
- 134. Sachdev HP, Mittal NK, Yadav HS. (1990),** "Serum and rectal mucosal zinc levels in acute and chronic diarrhea", *Indian Pediatr* 27, pp.125-33.
- 135. Satakka K, Savilahti E, Ponka A, et al (2001).** "Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial", *BMJ* 322, pp.1327–1329.
- 136. Sazawal S, Dhingra U, Hiremath G, Sarkar A, Dhingra P, Dutta A, Menon VP (2010),** "Black RE Effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 and prebiotic oligosaccharide added to milk on iron status, anemia, and growth among children 1 to 4 years old", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 51(3), pp.341-6.

- 137. Sazawal S, Dhingra U, Sarkar A, Dhingra P, Deb S, Marwah D, et al. (2004), "Efficacy of milk fortified with a prebiotic Bifidobacterium lactis (DR-10TM) and prebiotic galactooligosaccharides in prevention of morbidity and nutritional status", *Asia, Pac, J, Clin, Nutr* 13, pp.S28.**
- 138. Sazawal S, Usha Dhingra, Girish Hiremath, Archana Sarkar, Pratibha Dhingra, Arup Dutta, Priti Verma, Venugopal P. Menon, and Robert E. Black (2010). "Prebiotic and Probiotic Fortified Milk in Prevention of Morbidities among Children: Community-Based, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial", *PloS one* 5(8), pp.e12164.**
- 139. Schiffrin E. J., Blum S., Riedel C., Benyacoub J. (2004), "Review Probiotics in infant feeding", *Middle East Pediatr* 9(4), pp.129-134.**
- 140. Schwartz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. (2003), "Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants", *Pediatr Res* (54), pp.393-9.**
- 141. Schmelzle, H., Wirth, S., Skopnik, H., Radke, M., Knol, J., Böckler, H-M., Brönstrup, A., Wells, J., and Fusch, C. (2003). "Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high β -palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides", *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 36, pp.343-351.**
- 142. Sears CL. (2005). "A dynamic partnership: Celebrating our gut flora", *Anaerobe* 11(5), pp. 247-251.**
- 143. Sepp E, Julge K, Voor T, and Mikelsaar M. (2001), "Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life",**

J of Aller and Clinic Immunol 108(4), pp.516-520.

- 144. Servin AL. (2004)**, “Antagonistic activities of Lactobacilli and Bifidobacteria against microbial pathogens”, *FEMS, Microbiol, Rev* 28, pp. 405-440.
- 145. Shanahan F. (2002)**, “The host–microbe interface within the gut”, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 16(6), pp.915-931.
- 146. Shankar A, Prasad A. (1998)**, "Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection", *Am, J, Clin, Nutr* 68, pp.447S-63.
- 147. Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkanen H, Vesikari T. (1997)**, “Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children”, *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 24, pp.399–404.
- 148. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. (1987)**, “Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain”, *Antimicrob, Agents Chemother* 31, pp.1231-1233.
- 149. Sommer A, West KP Jr. (1996)**, “*Vitamin A deficiency: health, survival and vision*”, *Oxford University Press*, New York.
- 150. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. (1998)**, "The effect of consumption of milk fermented by Lactobacillus casei strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans", *Eur J, Clin, Nutr* 52 (12), pp.899-907.
- 151. Szajewska H, Mrukowicz JZ (2001)**. “Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials”, *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 33(2), pp.S17–S25.

- 152. Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. (2006),** “Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy”, *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 42, pp.454-475.
- 153. Taipale T, Pienihakinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P et al. (2010),** "Bifidobacterium animalis subspecies lactis BB12 in reducing the risk of infections in infancy", *Br, J, Nutr.*
- 154. Tejada-Simon 141V, Lee JH, Ustunol Z, Pestka JJ. (1999),** "Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice", *J, Dairy, Sci* 82, pp.649-660.
- 155. University of Glasgow (2005).** “The normal gut flora”, *Available through web archive.*
- 156. Van Nhien N, Khan NC, Ninh NX, Van Huan P, Hop le T, Lam NT, Ota F, Yabutani T, Hoa VQ, Motonaka J, Nishikawa T, Nakaya Y. (2008),** “Micronutrient deficiencies and anemia among preschool children in rural Vietnam”, *Asia, Pac, J, Clin, Nutr* 17(1), pp.48-55.
- 157. Vendt N, Grünberg H, Tuure T, Malminiemi O, Wuolijoki E, Tillmann V, Sepp E, Korpela R. (2006),** "Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial", *J, Hum, Nutr, Diet* 19(1), pp.51-8.
- 158. Vlioger A. M, Afke Robroch, Stef van Buuren, Jeroen Kiers, Ger Rijkers, Marc A. Benninga and Rob te Biesebeke (2009),** "Tolerance and safety of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in combination with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in a prebiotic-

containing infant formula: a randomised controlled trial", *Br J of Nutr*, pp.1-7.

- 159. Walker WA.** "Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 30(2), pp.S2-S7.
- 160. Wall, R. A., P. T. Corrah, D. C. Mabey, and B. M. Greenwood. (1986),** "The Etiology of Lobar Pneumonia in The Gambia.", *Bulletin of the WHO* 64(4), pp.553–58.
- 161.** Weekly Epidemiological Record (2008), vol 83(47).
- 162. Weizman Z & Alsheikh A (2006),** "Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study", *J, Am, Coll, Nutr* 25, pp.415–419.
- 163. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. (2005),** "Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents", *Pediatr* 115, pp.5-9.
- 164. Weng M, Walker WA. (2006),** "Bacterial colonization, probiotics, and clinical disease", *J, Pediatr* 149, pp.S107-S114.
- 165. WHO (1993).** *Breastfeeding-The technical basic and recommendation for action*, Geneva, pp.1-5, 6-12, 14, 113.
- 166. WHO (2005).** *Diarrhoea Treatment Guidelines Including new recommendations for the use of ORS and zinc supplementation for Clinic-Based Healthcare Workers.*
- 167. WHO (2010),** *Child Health Epidemiology Reference Group (CHERG) estimates presented in The Lancet.*

- 168. Williams, B. G., E. Gouws, C. Boschi-Pinto, J. Bryce, and C. Dye. (2002),** “Estimates of Worldwide Distribution of Child Deaths from Acute Respiratory Infections”, *Lancet Infectious Diseases*(2), pp.25–32.
- 169. WHO (2004),** *The global burden of disease: 2004 update*, Geneva. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.
- 170. WHO/UNICEF/AED (2007).** *Indicators for assessing infant and young child feeding practices*, Part 1 definitions.
- 171. Ziegler E, Vanderhoof JA, Petschow B, Mitmesser SH, Stolz SI, Harris CL, Berseth CL. (2007),** "Term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics grow normally and have soft stools similar to those reported for breast-fed infants", *J, Pediatr, Gastroenterol, Nutr* 44, pp.359-364.

