

Chương 23. Độc tố vi khuẩn

Mục lục

Chương 23. Độc tố vi khuẩn	1
23.2. Độc tố protein của vi khuẩn	2
23.3. Độc tố có hoạt tính enzyme	5
23.3.1. Sự sắp xếp của tiểu đơn vị A cộng B	5
23.3.2. Đính vào và xâm nhập của độc tố	6
23.3.3. Độc tố gây bệnh bạch hầu.....	7
23.4. Độc tố hình thành lỗ trên màng	10
23.5. Siêu kháng nguyên: độc tố kích thích hệ miễn dịch.....	11
23.6. Kiểm soát sự tổng hợp và phóng thích độc tố protein	12
23.7. Các vấn đề khác.....	13
23.7. Nội độc tố vi khuẩn	17
23.8. Vai trò của LPS ở màng ngoài vi khuẩn Gram âm	19
23.9. Tính chất hóa học của nội độc tố.....	20
23.9.1. Vùng I - Lipid A	20
23.9.2. Vùng II - R-polysaccharide	21
23.9.3. Vùng III - chuỗi O đặc trưng	21
23.10. LPS và độc tính của vi khuẩn Gram âm.....	23
23.10.1. Polysaccharide O và độc tính	23
23.10.2. Lipid A và độc tính.....	24

23.1. Giới thiệu

Hình thành độc tố hoặc khả năng tạo độc tố là một cơ chế cơ bản mà nhiều vi khuẩn tạo ra nhằm gây bệnh cho người và động vật. Về phương diện hóa học, độc tố vi khuẩn gồm có hai dạng chính đó là lipopolysaccharide và protein. Độc tố dạng lipopolysaccharide liên quan đến thành tế bào vi khuẩn Gram âm, còn độc tố protein được tế bào phóng thích ra và có thể tác động tại vị trí mô cách xa vị trí tăng trưởng của vi khuẩn. Độc tố liên quan đến tế bào được xem là nội độc tố và độc tố khuếch tán ra bên ngoài tế bào được gọi là ngoại độc tố.

Nội độc tố là các chất có liên quan đến tế bào, đó là thành phần cấu trúc của vi khuẩn. Hầu hết nội độc tố nằm ở thành tế bào. Đó chính là lipopolysaccharide (LPS) hay lipooligosaccharide (LOS) nằm trên màng ngoài của vi khuẩn Gram âm. Mặc dù là thành phần cấu trúc của tế bào, nhưng nội độc tố tan được có thể được phóng thích từ vi khuẩn đang phát triển hoặc từ các tế bào bị ly giải do các cơ chế đề kháng hiệu quả của động vật chủ hoặc do hoạt động của một số kháng sinh. Nội độc tố thường tác động trong vùng lân cận của vi khuẩn đang tăng trưởng hoặc hiện diện.

Ngoại độc tố thường là các protein, trong đó có một lượng nhỏ là các polypeptide được vi sinh vật tiết ra và tấn công tế bào chủ tại vị trí cách xa với vị trí mà vi khuẩn tăng trưởng và hình thành độc tố. Trong một số trường hợp, ngoại độc tố chỉ được phóng thích do sự ly giải tế bào vi khuẩn. Ngoại độc tố thường hoạt động như một enzyme. Chúng tấn công trực tiếp lên tế bào chủ và kích thích làm tế bào chủ tạo ra nhiều phản ứng. Hầu hết các ngoại độc tố tấn công tại vị trí mô tách biệt với điểm ban đầu mà vi khuẩn xâm chiếm hay tăng trưởng. Tuy nhiên, một số ngoại độc tố vi khuẩn lại hoạt động tại vị trí vi sinh vật gây bệnh khu trú. Lúc này chúng đóng vai trò như là chất xâm chiếm.

23.2. Độc tố protein của vi khuẩn

Ngoại độc tố thường được tiết ra trong suốt quá trình tăng trưởng ở giai đoạn cấp số nhân của vi khuẩn. Nhìn chung sự sản sinh độc tố là yếu tố mang tính đặc trưng của loài. Cụ thể là các loài vi khuẩn gây bệnh liên quan đến độc tố, ví dụ chỉ có *Clostridium tetanus* tạo độc tố gây bệnh uốn ván, hay chỉ có *Corynebacterium*

diphtheriae sinh độc tố gây bệnh bạch hầu. Các chủng vi khuẩn gây bệnh thường tạo độc tố và ngược lại các chủng không gây bệnh thì không sinh độc tố. Chính vì vậy độc tố là yếu tố chính để xác định tính gây bệnh của vi khuẩn. Trước đây có quan điểm cho rằng ngoại độc tố được hình thành chủ yếu ở vi khuẩn Gram dương. Tuy nhiên ngày nay đã có bằng chứng cho thấy cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm đều có khả năng sinh độc tố protein tan được.

Độc tố protein của vi khuẩn là những chất độc rất mạnh đối với con người. Khả năng gây chết của chúng có thể so sánh với chất strychnine, nọc độc của rắn (Bảng 23.1).

Bảng 23.1. Khả gây chết của độc tố dạng protein ở vi khuẩn.

Độc tố	Liều độc (mg)	Tế bào chủ	Độc tính gây chết	So với	
			Strychnine	Nội độc tố (LPS)	Nọc độc của rắn
Độc tố botulin	$0,8 \times 10^{-8}$	Chuột	3×10^6	3×10^7	3×10^5
Độc tố gây uốn ván	4×10^{-8}	Chuột	1×10^6	1×10^7	1×10^5
Độc tố Shiga	$2,3 \times 10^{-6}$	Thỏ	1×10^6	1×10^7	1×10^5
Độc tố gây bạch hầu	6×10^{-5}	Chuột lang	2×10^3	2×10^4	2×10^2

Vị trí tổn thương do ngoại độc tố thường được biểu thị ở nơi mà độc tố đó hoạt động. Chính vì vậy các thuật ngữ như nội độc tố, độc tố thần kinh, leukocidin (là protein đa thành phần, do nhiều thành phần riêng rẽ hợp lại phân hủy màng. Leukocidin cũng phân hủy máu nhưng yếu hơn α – hemolysin) hoặc hemolysin là những thuật ngữ mô tả vị trí đích mà một số độc tố protein tấn công. Một số ít độc tố vi khuẩn gây chết cho động vật được biết là độc tố gây chết. Mặc dù đã biết được mô và vị trí mục tiêu hoặc cơ chất bị tác động nhưng cơ chế gây chết chính xác đến nay

vẫn chưa rõ hoàn toàn, ví dụ độc tố gây bệnh than.

Một số độc tố được sử dụng làm yếu tố xâm lấn vì những chất này hoạt động một cách cục bộ để thúc đẩy quá trình lan ra của vi khuẩn. Ví dụ các enzyme ngoại bào làm thoái hóa các nền mô hoặc tơ huyết (fibrin), từ đó cho phép vi khuẩn xâm nhập và lan ra. Các enzyme dạng này bao gồm collagenase, hyaluronidase và streptokinase. Các độc tố khác cũng được xem như là chất xâm lấn, phá hủy thành phần màng tế bào như các enzyme nhóm phospholipase và lecithinase. Một số độc tố có khả năng tạo lỗ thủng trên màng tế bào cũng được xem như là chất xâm lấn vì chúng chèn các lỗ vào màng tế bào eukaryote.

Một số độc tố protein có độc tính tế bào rất chuyên biệt, chúng chỉ tấn công vào các dạng tế bào cụ thể. Ví dụ các độc tố của vi khuẩn *C. tetanus* và *C. botulinum* chỉ tấn công vào các neuron thần kinh. Ngược lại một số độc tố được sinh ra từ các vi khuẩn staphylococcus, streptococcus, clostridia, ... có độc tính tế bào không chuyên biệt vì có phổ hoạt động khá rộng. Chúng gây chết cho nhiều loại tế bào hay làm tổn thương các mô, thậm chí là gây bệnh hoại tử. Độc tố dạng này thường thấy là các độc tố thuộc nhóm phospholipase. Trong thực tế các độc tố dạng này gồm nhóm gây tan huyết (hemolysin), nhóm tạo lỗ trên màng tế bào và các độc tố dạng leukocidin.

Độc tố protein vi khuẩn là những kháng nguyên mạnh. Trong cơ thể sống (*in vivo*), chỉ có kháng thể chuyên biệt mới trung hòa được độc tính của các ngoại độc tố do vi khuẩn sinh ra. Các kháng thể trung hòa này được gọi là kháng độc tố (antitoxin). Tuy nhiên trong điều kiện thí nghiệm, kháng độc tố có thể không ức chế hoàn toàn được hoạt tính này của độc tố protein. Vì vậy có ý kiến cho rằng yếu tố quyết định kháng nguyên của độc tố có thể khác biệt với phần hoạt động của phân tử protein. Mức độ trung hòa của vị trí hoạt động có thể phụ thuộc vào khoảng cách vị trí kháng nguyên trên phân tử. Tuy nhiên do độc tố được trung hòa hoàn toàn trong *in vivo*, nên đề nghị này cho rằng các yếu tố khác của vật chủ phải có vai trò trung hòa độc tính trong tự nhiên.

Ngoại độc tố protein vốn dĩ không bền vững. Nhiều khi chúng mất đặc tính gây độc nhưng vẫn còn các đặc tính về kháng nguyên. Điều này đã được Ehrlich khám

phá đầu tiên và gọi bằng thuật ngữ biến độc tố (toxoid). Biến độc tố là độc tố bị giải độc tính nhưng vẫn còn tính kháng nguyên và khả năng tạo miễn dịch. Có thể đẩy nhanh tốc độ hình thành biến độc tố bằng cách xử lý độc tố với nhiều hóa chất gồm formalin, iodine, pepsin, ascorbic acid, ketone, Hỗn hợp này được giữ ở 37°C trong khoảng pH 6 - 9 trong thời gian vài tuần. Các biến độc tố có thể được sử dụng để tạo miễn dịch nhân tạo chống lại các bệnh do vi khuẩn gây bệnh gây ra. Biến độc tố là yếu tố tạo miễn dịch hiệu quả chống lại các bệnh bạch hầu và uốn ván, một phần của vaccine DPT.

23.3. Độc tố có hoạt tính enzyme

Giống như protein, nhiều độc tố vi khuẩn có đặc tính tương tự như enzyme trong nhiều trường hợp như: bị biến tính do nhiệt, do acid và do enzyme phân giải protein có hoạt tính xúc tác và biểu hiện hoạt động một cách đặc hiệu. Cơ chất ở động vật chủ có thể là một thành phần của tế bào ở mô, cơ quan hoặc dịch cơ thể.

23.3.1. Sự sắp xếp của tiểu đơn vị A cộng B

Nhiều độc tố protein hoạt động trong nội bào, gồm hai thành phần: tiểu đơn vị A có hoạt tính enzyme và phần còn lại là tiểu đơn vị B dùng để tạo cầu nối với thụ quan chuyên biệt trên màng tế bào chủ và chuyển enzyme qua màng. Tiểu đơn vị A không có hoạt tính cho đến khi chúng được phóng thích ra khỏi phức hợp độc tố. Các tiểu đơn vị A được phân lập có hoạt tính enzyme nhưng lại không có khả năng liên kết với các tế bào. Các tiểu đơn vị B được phân lập có thể liên kết với các tế bào mục tiêu và thậm chí ngăn chặn sự liên kết của độc tố tự nhiên nhưng chúng không phải là độc tố.

Có nhiều cách để các tiểu đơn vị của độc tố có thể được tổng hợp và sắp xếp: kiểu A + B biểu thị cho độc tố được tổng hợp và tiết ra là hai tiểu đơn vị protein tách rời nhau nhưng tương tác tại bề mặt của tế bào mục tiêu. Kiểu sắp xếp A-B hay A-5B, các tiểu đơn vị A và B tách rời nhưng lại liên kết với nhau bằng các cầu nối không cộng hóa trị trong quá trình tiết ra và liên kết với mục tiêu của chúng. Kiểu 5B, protein được cấu tạo bằng 5 tiểu đơn vị giống hệt nhau, liên kết với nhau. Kiểu A/B biểu thị cho độc tố được tổng hợp chỉ có polypeptide đơn nhưng được chia thành hai

vùng A và B, hai vùng này có thể bị tách ra nhờ hoạt tính chẻ ra do protein phân giải.

23.3.2. Đính vào và xâm nhập của độc tố

Ít nhất có hai cơ chế xâm nhập vào tế bào mục tiêu của độc tố.

Cơ chế thứ nhất gọi là xâm nhập trực tiếp, tiểu đơn vị B của phức hợp độc tố ban đầu (A+B) tạo cầu nối với một thụ quan chuyên biệt trên tế bào mục tiêu và cảm ứng hình thành lỗ thủng trên màng, nhờ đó tiểu đơn vị A được chuyển vào tế bào chất.

Cơ chế thứ hai, phức hợp độc tố ban đầu (A+B) tạo cầu nối với tế bào mục tiêu và cấu trúc A+B xâm nhập vào tế bào nhờ quá trình nhập bào qua trung gian thụ thể (RME: receptor-mediated endocytosis). Độc tố này được tiếp nhận trong tế bào và được gói trong túi bao gọi là endosome. Ion H^+ xâm nhập vào endosome làm cho pH bên trong thể này hạ thấp dẫn đến các tiểu đơn vị A+B tách ra. Tiểu đơn vị B tác động làm cho tiểu đơn vị A ra khỏi endosome và tiếp cận mục tiêu của nó ở tế bào chất. Tiểu đơn vị B vẫn ở lại trong endosome và được tái chế ở bề mặt tế bào.

Trong cả hai trường hợp trên, phân tử protein lớn phải được chèn vào bên trong và băng ngang qua lớp đôi lipid màng tế bào hoặc màng endosome. Hoạt động này phản ánh khả năng của hầu hết các độc tố dạng A+B hay A/B hoặc các thành phần của B, để chèn vào các lớp đôi lipid tạo các lỗ thủng ion trên màng. Nếu tiểu đơn vị B chứa vùng kỵ nước (các amino acid) chèn vào màng (như trong trường hợp độc tố gây bệnh bạch hầu), lúc này nó có thể được xem như là vùng chuyển đoạn T của độc tố.

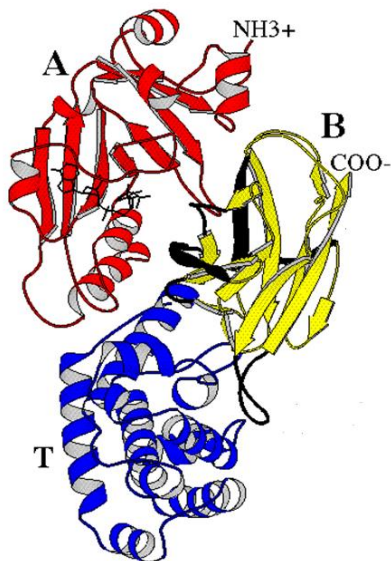
Một số độc tố vi khuẩn, ví dụ độc tố gây bệnh bạch hầu, sử dụng cả hai kiểu xâm nhập vào tế bào chủ đó là xâm nhập trực tiếp và xâm nhập qua trung gian thụ thể (RME). Điều này không làm ngạc nhiên vì cả hai cơ chế này chỉ là những biến thể trên một mục tiêu. Các độc tố vi khuẩn có cơ chế hoạt động tương tự như enzyme có thể xâm nhập vào các tế bào mục tiêu bằng những cơ chế khác nhau. Theo đó, độc tố gây bệnh bạch hầu và ngoại độc tố A của *Pseudomonas* có cơ chế hoạt động như enzyme. Chúng xâm nhập vào các tế bào mục tiêu bằng những cách tương đối khác nhau. Độc tố adenylate cyclase của *Bordetella pertussis* (độc tố gây bệnh ho gà AC) và độc tố gây bệnh than EF do vi khuẩn *Bacillus anthracis* tạo ra hoạt động tương tự nhau để xúc tác cho quá trình sản xuất cAMP từ nguồn ATP trong tế bào chủ. Tuy

nhiên độc tố gây bệnh than xâm nhập vào tế bào nhờ quá trình nhập bào RME, trong khi đó độc tố gây bệnh ho gà adenylate cyclase xâm nhập qua màng một cách trực tiếp.

Các thụ thể chuyên biệt cho tiểu đơn vị B của độc tố trên các tế bào hoặc mô mục tiêu thường là sialoganglioside (glycoprotein) được gọi là các protein G trên màng tế bào. Ví dụ độc tố gây bệnh tả (cholera) sử dụng ganglioside GM1 và độc tố gây bệnh uốn ván sử dụng ganglioside GT1 và /hoặc GD1b như là các thụ thể ở tế bào chủ.

23.3.3. Độc tố gây bệnh bạch hầu

Độc tố gây bệnh bạch hầu là độc tố vi khuẩn được hiểu rõ nhất. Độc tố này do *Corynebacterium diphtheriae* tạo ra. Độc tố gây bệnh bạch hầu là ngoại độc tố dạng A/B. Độc tố này là một chuỗi polypeptide có trọng lượng phân tử 60.000 dalton. Protein chức năng phân biệt ở hai tiểu đơn vị: tiểu đơn vị A, trọng lượng 21.000



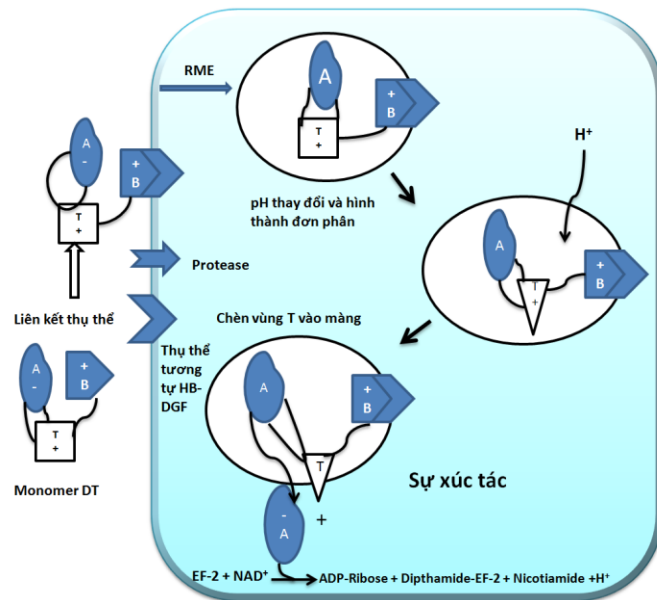
dalton, có hoạt tính enzyme để ức chế sự kéo dài của yếu tố 2 (EF-2) có liên quan đến sinh tổng hợp protein ở động vật chủ; tiểu đơn vị B có trọng lượng phân tử 39.000 dalton, chịu trách nhiệm liên kết với màng tế bào chủ nhạy cảm. Tiểu đơn vị B có vùng chuyển đoạn T, dùng để chèn vào màng endosome nhằm đảm bảo an toàn cho việc phóng thích cấu tử có hoạt tính enzyme vào tế bào chất.

Hình 23.1. Độc tố gây bệnh bạch hầu (Dtx). Phần A màu đỏ là vùng có chức năng xúc tác, phần B có

màu vàng là vùng liên kết với thụ quan để dính lên tế bào, vùng T có màu xanh da trời là vùng kỵ nước dùng để chèn vào màng endosome nhằm phóng thích tiểu đơn vị A.

Trong điều kiện thí nghiệm, độc tố ban đầu được tạo ra ở dạng không có hoạt tính. Chúng sẽ bị hoạt hóa nhờ enzyme trypsin phân giải protein dưới sự hiện diện của thiol (yếu tố làm giảm sự phân giải). Hoạt tính enzyme của đoạn A bị che hoàn toàn

khi phức hợp độc tố còn nguyên vẹn. Mảnh B đòi hỏi phải có mảnh A để tới nguyên sinh chất của tế bào nhạy cảm. Đầu cuối C của mảnh B là phần kỵ nước và có các yếu tố quyết định tương tác với thụ thể màng chuyên biệt nằm trên các màng nhạy cảm, đầu cuối N của mảnh B (còn gọi là vùng T) là vùng kỵ nước mạnh.



Hình 23.2. Minh họa sự xâm nhập và hoạt động của độc tố gây bệnh bạch hầu (Dtx) ở tế bào nhạy cảm. Vùng B của độc tố nối với thụ thể cognate trên tế bào nhạy cảm. Độc tố này được tiếp nhận ở endosome nhờ quá trình nhập bào qua trung gian thụ thể (RME). Sự acid hóa túi endosome làm lộ ra các chuỗi A và B, phơi ra vùng kỵ nước T của

độc tố. Vùng T chèn vào màng endosome, chuyển mảnh A có hoạt tính enzyme vào tế bào chất. Phần A có hoạt tính enzyme sử dụng NAD như là một cơ chất. Phần A xúc tác quá trình đính của ADP-ribose thuộc NAD lên yếu tố kéo dài (EF-2) yếu tố này bị bất hoạt chức năng của nó trong tổng hợp protein.

Độc tố bạch hầu xâm nhập vào các tế bào mục tiêu theo cách hoặc trực tiếp hoặc nhập bào qua trung gian thụ thể (RME). Trước tiên đầu cuối C của phần kỵ nước thuộc mảnh B (vị trí amino acid từ 432 đến 535) nối không thuận nghịch với thụ thể. Trong suốt quá trình nhập bào qua trung gian thụ thể, cả độc tố được tiếp nhận vào túi endosome. Trong túi này, pH giảm xuống khoảng giá trị 5 làm lộ ra các chuỗi A và B. Các vùng kỵ nước của các chuỗi A và B được chèn vào màng túi. Kết quả là làm phơi ra chuỗi A hướng vào nguyên sinh chất. Khi đó xuất hiện phản ứng khử và phân cắt protein làm phóng thích chuỗi A vào nguyên sinh chất. Đoạn A được phóng thích đóng vai trò như là chuỗi được mở rộng nhưng trở lại dạng hình cầu có hoạt tính enzyme trong nguyên sinh chất. Chuỗi A xúc tác sự ribosyl hoá ADP của nguyên tố

kéo dài 2 (EF-2) như mô tả của Hình 23.2. Một số độc tố vi khuẩn có hoạt tính enzyme và các hiệu ứng sinh học của những độc tố này ở người được mô tả ở Bảng 23.2.

Bảng 23.2. Tác động sinh học của một ngoại độc tố vi khuẩn có hoạt tính enzyme.

Độc tố	Hoạt tính enzyme	Tác động sinh học
Độc tố gây bệnh tả (A-5B)	ADP ribosyl hóa enzyme adenylate cyclase Gs điều hòa protein ở eukaryote.	Hoạt hóa enzym adenylate cyclase; làm tăng lượng cAMP nội bào thúc đẩy sự tiết dịch và chất điện giải ở biểu mô ruột dẫn đến tiêu chảy.
Độc tố gây bệnh uốn ván (A/B)	ADP ribosyl hóa yếu tố kéo dài 2	Ức chế sinh tổng hợp protein ở các tế bào động vật làm chết tế bào.
Độc tố gây bệnh ho gà (A-5B)	ADP ribosyl hóa enzyme adenylate cyclase Gi điều hòa protein	Ngăn chặn sự ức chế adenylate cyclase; làm tăng lượng cAMP tác động lên hoạt tính hormone và làm giảm hoạt tính thực bào.
Độc tố LT (A-5B) không bền nhiệt của <i>E. coli</i>	ADP enzyme adenylate cyclase Gs điều hòa protein	Tương tự như độc tố gây bệnh tả.
Độc tố Shiga (A/5B)	Enzyme glycosidase cắt rRNA tại vị trí base Adenine của tiểu đơn vị rRNA 28S.	Làm bất hoạt tiểu đơn vị ribosome 60S ở động vật có vú, ức chế sự tổng hợp protein và làm chết các tế bào miễn cảm; gây tiêu chảy, viêm kết tràng xuất huyết (HC) và/hoặc hội chứng tan huyết tăng urea máu.
Ngoại độc tố A <i>Pseudomonas</i>	ADP ribosyl hóa yếu tố kéo dài 2	Ức chế tổng hợp protein ở các tế bào nhạy cảm, làm chết tế bào.

(A/B)		
Độc tố botulin (A/B)	Protease phụ thuộc Zn^{++} tác động trên synaptobrevin tại mô tơ thần kinh tuyến ganglioside	Ức chế tiết acetylcholine tiền synap từ các dây thần kinh cholinergic ngoại biên làm liệt cơ mềm
Độc tố uốn ván (A/B)	Protease phụ thuộc Zn hoạt động trên synaptobrevin ở hệ thần kinh trung ương.	Ức chế phóng thích chất dẫn truyền thần kinh từ các dây thần kinh bị ức chế ở thần kinh trung ương làm liệt cơ cứng.
Độc tố gây bệnh than LF (A2+B)	Protease Metallo phân cắt enzyme MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase)	Kết hợp với tiểu đơn vị B (PA), LF miễn cảm làm phóng thích cytokine và làm chết các tế bào mục tiêu hoặc động vật thí nghiệm.
Độc tố ho gà (A/B) <i>Bordetella pertussis</i> .	Enzyme adenylate cyclase điều hòa calmodulin xúc tác hình thành cAMP từ ATP	Gia tăng cAMP trong các thực bào dẫn đến làm ức chế sự thực bào ở các thực bào trung tính và các đại thực bào; cũng gây tiêu huyết và bệnh bạch cầu
Độc tố gây than EF (A1+B) do <i>B. anthracis</i> tạo ra	trong các tế bào nhạy cảm, cũng như hình thành các lỗ thấm ion trong màng tế bào	
Độc tố Exfoliatin B của vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	Chẻ desmoglein 1, một cadherin được phát hiện trong các tiểu thể nối giản bào ở lớp biểu bì	Tách lớp hạt của lớp biểu bì da, giữa các lớp sống và các lớp chết ở mặt ngoài của da.

23.4. Độc tố hình thành lỗ màng

Các độc tố hình thành lỗ màng sẽ chèn lỗ xuyên màng tế bào chủ làm đảo lộn các dòng ion chọn lọc vào và ra khỏi màng. Nhóm độc tố này gồm các độc tố RTX

của vi khuẩn Gram âm, streptolysin O của *S. pyogenes* và độc tố alpha của *S. aureus*. Nhìn chung các độc tố này có thể tự tạo lỗ trên màng eukaryote.

Bảng 23.3. Một số độc tố vi khuẩn hình thành lỗ thủng trên màng.

Tên độc tố	Vi khuẩn	Mục tiêu	Bệnh
Perfringiolysin O	<i>C. perfringens</i>	Cholesterol	Hoại tử khí (gas gangrene)
Hemolysin	<i>Escherichia coli</i>	Màng tế bào	Nhiễm trùng tiết niệu (UTI)
Listeriolysin	<i>L. monocytogenes</i>	Cholesterol	Viêm màng não
Độc tố EF	<i>Bacillus anthracis</i>	Màng tế bào	Bệnh than
Độc tố alpha	<i>S. aureus</i>	Màng tế bào	Áp xe
Pneumolysin	<i>S. pneumoniae</i>	Cholesterol	Viêm phổi, viêm tai giữa
Streptolysin O	<i>Strep. pyogenes</i>	Cholesterol	Viêm họng do strep
Leukocidin	<i>S. aureus</i>	Màng thực bào	Nhiễm trùng sinh mủ

Độc tố alpha của *S. aureus* được xem như các độc tố tế bào có cấu trúc oligomer, hình thành lỗ màng. Độc tố alpha là phân tử tiền thân gồm 319 amino acid chứa trình tự tín hiệu có đầu cuối N gồm 26 amino acid. Độc tố này là phân tử kỵ nước có trọng lượng phân tử 33 kDa. Bảy protomer độc tố được lắp ráp hình thành nên cấu trúc có bảy đơn vị (heptamer) dạng hình nấm có trọng lượng 232 kDa, cấu trúc heptamer này gồm ba vùng riêng biệt. Vùng mũ và viền định vị tại bề mặt của màng plasma, ngược lại vùng thân được xem như là kênh vận chuyển ion xuyên màng.

23.5. Siêu kháng nguyên: độc tố kích thích hệ miễn dịch

Một số độc tố vi khuẩn có thể tấn công trực tiếp lên tế bào T và tế bào có kháng nguyên của hệ miễn dịch. Sự suy yếu chức năng miễn dịch do độc tố của tế bào này có thể gây bệnh cho người. Một nhóm lớn độc tố được gọi là ngoại độc tố gây sốt do staphylococcus và streptococcus sinh ra, hoạt tính sinh học của chúng gồm có khả năng kích thích hệ miễn dịch, gây sốt và gia tăng hội chứng sốc do nội ngoại tố.

Ngoại độc tố gây sốt là những độc tố được tế bào vi khuẩn tiết ra có trọng lượng từ 22 kDa đến 30 kDa, gồm độc tố đường ruột của staphylococcus type A-E, G

và H, ngoại độc tố gây sốt A-C của Nhóm A streptococcus, độc tố exfoliatin và TSST-1 của staphylococcus.

Nhìn chung, thuộc tính có khả năng gây kích thích miễn dịch của siêu kháng nguyên là do độc tố liên kết trực tiếp với vùng riêng biệt ngoài rãnh có liên kết peptide thuộc các phân tử MHC nhóm II (phức hợp thích ứng với tổ chức mô nhóm II), được biểu hiện trên bề mặt tế bào trình diện kháng nguyên (APCs) và đối với các yếu tố chuyên biệt V β trên thụ thể tế bào T của lympho T. Điều này làm tăng độ lớn của tế bào T lên 20%. Đi kèm theo sự gia tăng tế bào T là sự phóng thích một lượng lớn cytokine từ lympho bào như interleukin-2, yếu tố gây hoại tử khối u β , gamma interferon và bạch cầu đơn nhân như IL-1, IL-6, yếu tố gây hoại tử khối u α . Các cytokine hoạt động như là những chất trung gian làm xuất hiện các triệu chứng như giảm huyết áp, sốt cao và ban đỏ phân tán (diffuse erythematous rash) là đặc điểm của hội chứng sốc do nhiễm độc.

Độc tố đường ruột staphylococcus là siêu kháng nguyên, nhưng người ta không biết nếu hoạt tính này góp phần cho đặc điểm gây nôn mửa hay tiêu chảy do bị ngộ độc thực phẩm do độc tố đường ruột của chúng gây ra.

23.6. Kiểm soát sự tổng hợp và phóng thích độc tố protein

Yếu tố điều hòa kiểm soát chặt chẽ việc điều hòa sự tổng hợp và tiết ra nhiều độc tố protein. Yếu tố điều hoà là những yếu tố nhạy cảm với các tín hiệu của môi trường. Ví dụ, việc sản sinh độc tố gây bệnh bạch hầu thì bị kiểm hãm hoàn toàn do sắt có sẵn trong môi trường với hàm lượng đủ cho sự tăng trưởng của vi khuẩn. Khi hàm lượng sắt bị giới hạn dưới mức tăng trưởng của vi khuẩn, thì độc tố sẽ được tạo ra. Sự biểu hiện của độc tố tả và các yếu tố gây độc có liên quan (yếu tố dính) được kiểm soát bằng tính thẩm thấu và nhiệt độ của môi trường. Ở vi khuẩn *B. pertussis*, sự cảm ứng các thành phần độc tố khác nhau được sắp xếp lệch nhau, như các yếu tố dính được sản xuất đầu tiên để thiết lập sự xâm nhiễm, sau đó độc tố được tổng hợp và phóng thích ra để chống lại sự phòng vệ của vật chủ và thúc đẩy cho sự tồn tại của vi khuẩn.

Các quá trình tổng hợp và tiết protein cũng thay đổi. Nhiều ngoại độc tố cổ

được tổng hợp với trình tự tín hiệu dẫn đầu gồm 1 – 3 amino acid tích điện có NH và một mạch đuôi ra gồm 14 – 20 amino acid kỵ nước. Trình tự tín hiệu này có thể liên kết và chèn vào màng nguyên sinh chất trong quá trình dịch mã và như thế polypeptide được tiết ra trong lúc đang được tổng hợp. Peptide tín hiệu này được phân cắt thành độc tố dạng protein và được phóng thích vào trong chu chất. Ngoài ra, độc tố này có thể được tổng hợp trong bào tương, sau đó dẫn đầu trình tự để xuyên qua màng. Các protein chaperone thường được yêu cầu hướng dẫn quá trình này. Một số độc tố đa thành phần như độc tố tả cholera có các tiểu đơn vị được tổng hợp và tiết ra riêng lẻ để đi vào chu chất. Tại đây chúng được lắp ghép lại. Ở vi khuẩn Gram âm, màng ngoài có các lỗ thấm có tính chọn lọc, độc tố protein ở dạng hoà tan thường sử dụng kênh thấm chọn lọc này làm trung gian để phóng thích ra bên ngoài. Ngoại độc tố vi khuẩn Gram âm ví dụ độc tố đường ruột ST của *E. coli* có thể được phóng thích vào túi màng (membrane vesicle), túi này có thành phần cấu tạo từ màng ngoài. Do các túi này có thể có các yếu tố bám dính liên quan đến màng ngoài nên chúng có thể hoạt động như những quả bom thông minh có khả năng tương tác chuyên biệt với các tế bào mục tiêu và xâm nhập vào các tế bào mục tiêu này để phóng thích thành phần độc tố của chúng.

23.7. Các vấn đề khác

Khả năng di truyền để sản sinh ra độc tố bao gồm gen điều hòa có thể được phát hiện trên bộ gen vi khuẩn, plasmid và thực khuẩn thể gây tiềm tan (lysogenic bacteriophage). Đôi khi chúng xuất hiện trong các vùng gen gây bệnh (pathogenicity island). Trong bất kỳ trường hợp nào đi chăng nữa thì các quá trình trao đổi di truyền ở vi khuẩn đáng chú ý nhất là sự tiếp hợp (conjugation) và sự tải nạp (transduction), có thể di chuyển các yếu tố di truyền giữa các chủng và loài vi khuẩn. Chuyển gen theo chiều ngang (HGT) của các gen mã hóa cho độc tính được biết xuất hiện giữa các loài vi khuẩn. Điều này diễn giải làm thế nào mà *E. coli* và *Vibrio cholerae* tạo độc tố gây tiêu chảy gần như giống hệt nhau, cũng như làm thế nào mà *E. coli* O157:H7 mắc phải có khả năng tạo độc tố của *Shigella dysenteriae*. Tuyến tiêu hóa có lẽ là môi trường lý tưởng để vi khuẩn tiến hành chuyển gen theo chiều ngang từ vi

khuẩn này sang vi khuẩn khác.

Đã có những bằng chứng thuyết phục hoàn toàn về vai trò gây bệnh của độc tố gây bệnh bạch hầu, uốn ván và độc tố botulinum, nhiều độc tố đường ruột, độc tố gây hội chứng sốc nhiễm độc do staphylococcus và ngoại độc tố gây sốt của streptococcus. Cũng có những bằng chứng thuyết phục về sự liên quan đến bệnh lý của độc tố gây bệnh ho gà, độc tố gây bệnh than, độc tố shiga và độc tố gây hoại tử của clostridia trong việc gây bệnh do vi khuẩn. Nhưng tại sao một số vi khuẩn tạo độc tố có độc lực mạnh và tương tự với câu hỏi tại sao một vi sinh vật có khả năng tạo kháng sinh. Đây là những vấn đề vẫn còn bí ẩn. Việc sản sinh ra độc tố có thể đóng vai trò trong sự thích nghi của một vi khuẩn đối với một hốc sống (niche) cụ thể nhưng độc tố này cũng không phải thiết yếu cho khả năng sống được của vi khuẩn. Hầu hết vi khuẩn sinh độc tố sống tự do trong tự nhiên và có liên quan đến con người ở dạng kiểu hình giống với chủng sinh độc tố nhưng lại thiếu khả năng sản sinh độc tố.

Tóm tắt về độc tố protein của vi khuẩn và hoạt động của nó được mô tả ở Bảng 4. Chi tiết về cơ chế hoạt động của những độc tố này và sự liên quan trong việc phát sinh bệnh được thảo luận ở phần vi khuẩn gây bệnh đặc thù.

Bảng 23.4. Tóm tắt hoạt tính độc tố ngoại bào của vi khuẩn.

Tên độc tố	Vi khuẩn có liên quan	Hoạt tính
Độc tố gây bệnh than (EF)	<i>Bacillus anthracis</i>	Là enzyme adenylate cyclase làm tăng mức cAMP nội bào trong thực bào và hình thành các lỗ thấm ion trong màng tế bào. Gây ra phù và giảm phản ứng thực bào.
Độc tố Adenylate cyclase	<i>Bordetella pertussis</i>	Hoạt động làm gia tăng hàm lượng cAMP trong thực bào và hình thành các kênh màng ở màng tế bào cho phép ion đi qua.
Độc tố alpha	<i>Staphylococcus</i>	Các tiểu đơn vị protein lắp ráp hình thành cấu trúc

	<i>aureus</i>	oligome để tạo kênh ion ở màng tế bào huyết tương
Nội độc tố cholera (Ctx)	<i>Vibrio cholerae</i>	Ribosyl hoá ADP của protein G kích thích adenylate cyclase và gia tăng cAMP trong các tế bào của tuyến GI, gây ra sự bài tiết nước và chất điện giải dẫn đến tiêu chảy.
Độc tố LT của <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tương tự như độc tố cholera
Độc tố ST của <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Nội độc tố bền nhiệt (ST) tạo cầu nối với thụ thể guanylate cyclase dẫn đến làm tăng cGMP gây hiệu ứng bất lợi như làm tuôn trào các chất điện giải. Thúc đẩy sự bài tiết nước và chất điện giải từ biểu mô ruột gây tiêu chảy.
Độc tố Shiga	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>E. coli</i> O157:H7	Hoạt tính enzyme phân cắt rRNA 28S của eukaryote dẫn đến sự ức chế tổng hợp protein ở các tế bào nhạy cảm. Làm tiêu chảy, xuất huyết kết tràng (HC) và hội chứng tan huyết tăng urea máu (HUS)
Nội độc tố perfringens	<i>Clostridium perfringens</i>	Kích thích adenylate cyclase làm tăng cAMP trong các tế bào biểu mô. Gây tiêu chảy.
Độc tố A/B	<i>Clostridium difficile</i>	Biến đổi Rho, họ phụ của các protein nhỏ liên kết với GTP, là chất điều hòa khung actin. Khử amide của chức glutamine tại vị trí 63 của Rho để glutamic acid tạo ra protein Rho có hoạt tính nổi trội không có khả năng thủy giải liên kết GTP. Kết quả bệnh lý là sự hoại tử tế bào và tiêu chảy ra máu có liên quan đến viêm ruột kết.
Độc tố		Protease phụ thuộc Zn^{++} ức chế sự dẫn truyền thần

Botulin	<i>Clostridium botulinum</i>	kinh tại các synap thần kinh cơ (neuromuscular synapses) gây chứng liệt mềm (flaccid paralysis).
Độc tố uốn ván	<i>Clostridium tetani</i>	Protease phụ thuộc Zn^{++} ức chế sự dẫn truyền thần kinh tại các synap bị ức chế gây chứng liệt cơ cứng (spastic paralysis).
Độc tố bạch hầu (Dtx)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Ribosyl hóa ADP của yếu tố kéo dài 2 làm ức chế sự tổng hợp protein ở các tế bào mục tiêu.
Ngoại độc tố A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ức chế sự tổng hợp protein; tương tự như độc tố gây bệnh bạch hầu
Độc tố gây bệnh than (LF)	<i>Bacillus anthracis</i>	Yếu tố gây chết (LF) là protease phụ thuộc Zn^{++} , cảm ứng sự phóng thích cytokine và gây độc cho tế bào (cơ chế chưa rõ)
Độc tố gây bệnh ho gà (Ptx)	<i>Bordetella pertussis</i>	Ribosyl hóa ADP của protein G làm ngăn chặn sự ức chế của adenylate cyclase ở các tế bào nhạy cảm
Độc tố exfoliatin*	<i>Staphylococcus aureus</i>	Phân cắt trong các tế bào biểu bì; cũng tác động như là siêu kháng nguyên
Nội độc tố Staphylococcus*	<i>Staphylococcus aureus</i>	Siêu kháng nguyên gây hoạt hóa ở tất cả hệ miễn dịch gồm bạch huyết và các đại thực bào; vai trò chính xác trong gây nôn chưa được biết.
Độc tố gây triệu chứng sốc độc tố (TSST-1)*	<i>Staphylococcus aureus</i>	Siêu kháng nguyên tác động lên hệ tim mạch (vascular system) gây chứng viêm, sốt và sốc
Độc tố gây ban đỏ	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Siêu kháng nguyên tương tự như TSST – gây viêm sung, sốt và sốc; có thể phản ứng gây ban đỏ cục bộ (sốt phát ban)
Ngoại độc tố		

gây mủ của
streptococcus
(SPE)*

* Ngoại độc tố gây sốt do *S. aureus* và *Streptococcus pyogenes* tạo ra, được xem là siêu kháng nguyên. Chúng đại diện cho một họ các phân tử có khả năng gọi ra sự hoạt hóa quy mô lớn của hệ miễn dịch. Các protein này chia sẻ khả năng kích thích sự tăng lên của tế bào T bằng cách tương tác với các phân tử MHC nhóm II trên APCs và chuỗi beta V đặc trưng của thụ thể tế bào T. Đặc điểm quan trọng của sự tương tác này là kết quả của việc sản sinh IL-1, TNF và các lymphokine khác xuất hiện như là những yếu tố trung gian chính của các quá trình bệnh liên quan với các độc tố này.

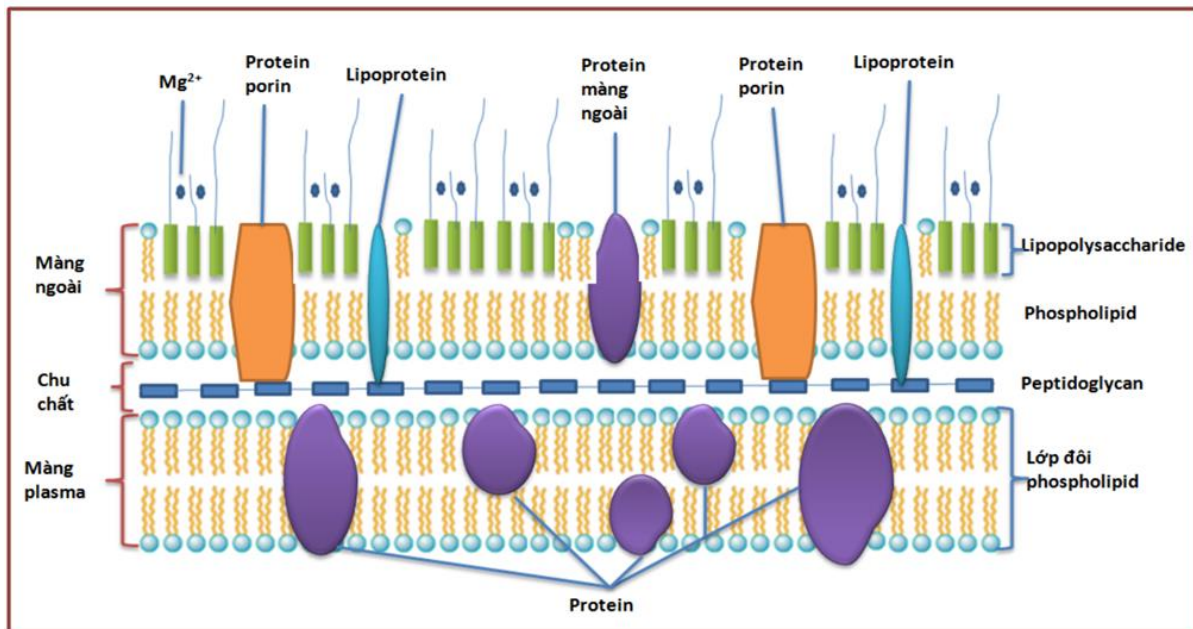
23.7. Nội độc tố vi khuẩn

Nội độc tố (endotoxin) là thành phần màng ngoài của thành tế bào vi khuẩn Gram âm. Phức hợp lipopolysaccharide (LPS) nằm ở màng ngoài vi khuẩn Gram âm gây bệnh đóng vai trò như là nội độc tố. Vi khuẩn Gram âm gây bệnh gồm: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* và *Vibrio cholerae*. Mối liên quan giữa nội độc tố (LPS) với bề mặt màng ngoài tế bào vi khuẩn được minh họa ở Hình 33.3.

Hoạt tính sinh học của nội độc tố liên quan đến phức hợp LPS, còn độc tính thì liên quan đến thành phần lipid (Lipid A) và đặc tính sinh miễn dịch (immunogenicity) liên quan đến các thành phần polysaccharide. Kháng nguyên O thuộc thành tế bào vi khuẩn Gram âm chính là các thành phần LPS. LPS gây ra hàng loạt các phản ứng viêm ở động vật và hoạt hóa bổ thể bằng con đường properdin. Vì vậy nó có thể là một phần của sự phát sinh bệnh do vi khuẩn.

Trong cơ thể sống (*In vivo*), vi khuẩn Gram âm trong giai đoạn đang tăng trưởng sẽ phóng một lượng nhỏ nội độc tố. Điều này là yếu tố quan trọng làm kích thích miễn dịch tự nhiên. Trong phòng thí nghiệm, khi nuôi cấy chủng vi khuẩn đến giai đoạn tăng trưởng cho thấy có một lượng nhỏ nội độc tố ở dạng hòa tan, được phóng thích ra khỏi tế bào. Tuy nhiên phần lớn nội độc tố vẫn còn liên kết với thành tế bào cho đến khi vi khuẩn bị phá hủy. Ở cơ thể sống, sự phóng thích nội độc tố xuất

phát từ quá trình như sự tự giải, sự ly giải từ bên ngoài qua trung gian bổ thể và do lysozyme, sự tiêu hóa tế bào vi khuẩn do thực bào.



Hình 23.3. Minh họa cấu trúc của màng bao vi khuẩn Gram âm (ví dụ *E. coli*). Lớp peptidoglycan thực tế nằm trong chu chất (periplasm) đó là khoảng không giữa màng plasma và màng ngoài. Mặt trong của màng ngoài bao gồm phospholipid, tương tự như màng plasma. Mặt ngoài của màng ngoài chứa một lượng phospholipid nhưng chủ yếu là lipopolysaccharide là nội độc tố, vừa có tính ưa nước vừa có tính kỵ nước của phospholipid. Các protein, lipoprotein và porin protein được đúc gắn vào màng ngoài, những chất này đôi khi đóng vai trò gây bệnh ở vi khuẩn Gram âm, nhưng lại không xem chúng như là các nội độc tố.

Khi so sánh với các ngoại độc tố cổ điển của vi khuẩn, thì hoạt động của nội độc tố khác ít đặc trưng hơn, do chúng không hoạt động theo kiểu enzyme. Các nội độc tố có tính bền nhiệt khi đun sôi trong vòng 30 phút vẫn không mất tính ổn định của chúng. Tuy nhiên một số chất có tính oxi hóa mạnh như superoxide, peroxide và hypochlorite có khả năng trung hòa nội độc tố. Mặc dù các nội độc tố có tính kháng nguyên nhưng lại không thể biến đổi chúng thành dạng biến độc tố (toxoid). Đặc tính của nội độc tố và ngoại độc tố được trình bày tóm tắt tại Bảng 23.5.

Bảng 23.5. Đặc tính của nội độc tố vi khuẩn và ngoại độc tố

Đặc tính	Nội độc tố	Ngoại độc tố
Bản chất hóa học	LPS, 10 kDa	Protein, 50 -1000 kDa
Quan hệ với tế bào	Phần màng ngoài	Ngoại bào, khuếch tán
Biến tính do luộc	Không	Thường xuyên
Tính kháng nguyên	Có	Có
Dạng biến tính của độc tố	Không	Có
Hoạt lực	Tương đối thấp (>100 ug)	Tương đối cao (1 ug)
Đặc hiệu	Mức độ thấp	Mức độ cao
Hoạt tính enzyme	Không	Thường xuyên
Gây sốt	Có	Thỉnh thoảng

23.8. Vai trò của LPS ở màng ngoài vi khuẩn Gram âm

Chức năng của màng ngoài vi khuẩn Gram âm đóng vai trò như là rào cản bảo vệ cho tính thấm chọn lọc qua màng. Màng ngoài không cho thẩm phân tử có kích thước lớn và hợp chất kỵ nước từ môi trường. LPS có chức năng quan trọng ở màng ngoài như sau:

Thứ nhất, chất này thiết lập rào cản có tính thấm chọn lọc, đó là chỉ cho phép thẩm phân tử có trọng lượng thấp, ưa nước qua màng. Ở *E. coli* các kênh màng ompF và ompC không cho qua tất cả các phân tử kỵ nước và những phân tử ưa nước nào có trọng lượng phân tử lớn hơn 700 dalton. Điều này nhằm giúp ngăn chặn sự xâm nhập của các chất có hại như muối mật và các phân tử gây độc từ tuyến dạ dày ruột vào tế bào vi khuẩn. Màng ngoài này cũng ngăn chặn lysozyme và nhiều chất kháng sinh.

Thứ hai, ở động vật chủ, màng ngoài có thể cản trở sự phá hủy tế bào vi khuẩn bằng hợp chất huyết thanh và các tế bào thực bào.

Thứ ba, LPS có thể đóng vai trò như là chất dính, được vi khuẩn sử dụng để kết cụm lên động vật chủ.

Cuối cùng, sự đa dạng trong cấu trúc LPS cho phép chủng vi khuẩn gây bệnh có kháng nguyên khác nhau có thể giúp bắt cầu với phản ứng miễn dịch trước đó có liên quan đến chủng vi sinh vật.

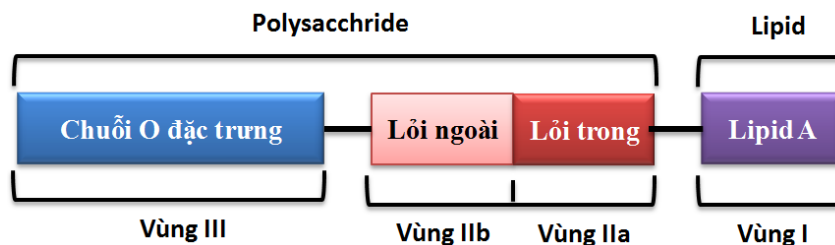
23.9. Tính chất hóa học của nội độc tố

Hầu hết những nghiên cứu về cấu trúc hóa của nội độc tố được tiến hành trên các loài *Salmonella* và *E. coli*. LPS có thể được chiết tách từ tế bào bằng cách xử lý trong phenol 45 % ở 90 °C. Thủy giải nhẹ LPS để tạo ra Lipid A và polysaccharide.

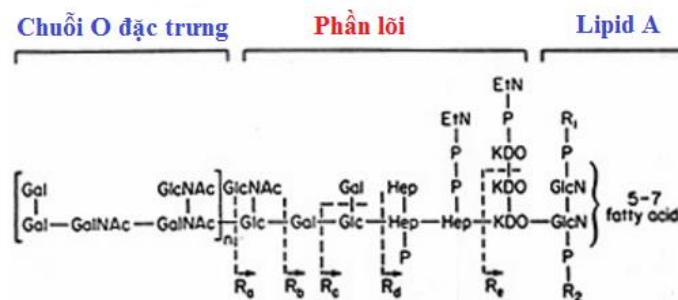
Lipopolysaccharide là phức hợp phân tử có tính lưỡng tính (amphiphilic) nghĩa là vừa có tính kỵ nước vừa có tính ưa nước, có trọng lượng phân tử khoảng 10 kDa. Chất này là thành phần phổ biến trong cả loài *Salmonella* và *E. coli*. Kiến trúc tổng quát của LPS được trình bày ở Hình 23.4. Cấu trúc chung *Salmonella* LPS được trình bày ở Hình 23.5 và cấu trúc hoàn chỉnh của *Salmonella* lipid A được trình bày ở Hình 23.6.

LPS gồm ba phần đó là: Lipid A, R polysaccharide và O polysaccharide.

23.9.1. Vùng I - Lipid A



Hình 23.4. Kiến trúc tổng quát của Lipopolysaccharide



Hình 23.5. Cấu trúc tổng quát của lipopolisacchride của *Salmonella*.

Glc = glucose; GlcNAc = N-acetyl-glucosamine; Gal = galactose; Hep = heptose; P = phosphate; Etn = ethanolamine; R1 and R2 = phosphoethanolamine hoặc amino arabinose. Ra đến Re biểu thị cho cấu trúc chưa xác định hoàn chỉnh của LPS. Kiểu hình Rd2 (không trình bày ở đây) cũng chỉ là một đơn vị heptose. Các thể đột biến Rc, Rd2 và Rd1 thiếu nhóm phosphate đính lên Hep.

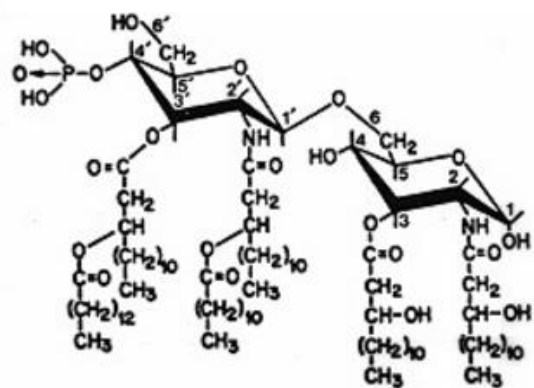
Lipid A, là thành phần lipid của LPS. Phần này chứa vùng kỵ nước neo vào màng thuộc LPS. Lipid A gồm NAG phosphoryl hóa (phosphorylated N-acetylglucosamine) có hai nhánh acid béo trùng nhau (dimer) dính vào. Trong đó nhánh 6 FA thường được phát hiện. Tất cả các acid béo trong Lipid A là acid béo bão hòa. Một số FA dính trực tiếp với dimer NAG, các chất khác bị ester hóa với 3-hydroxy acid béo. Ở vi khuẩn Gram âm, cấu trúc Lipid A có tính bảo tồn cao. Ở họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae*, Lipid A hầu như không đổi.

Cấu trúc cơ bản của Lipid A đã được làm sáng tỏ và chất này đã được tổng hợp bằng con đường hóa học. Hoạt tính sinh học của nó phụ thuộc vào cấu tạo hình thể đặc thù được xác định là glucosamine disaccharide, các nhóm PO_4 , các chuỗi acyl và phần lõi bên trong cũng có 2-keto-3-deoxyoctonoic acid (KDO).

23.9.2. Vùng II - R-polysaccharide

Là lõi kháng nguyên (R) hoặc R-polysaccharide dính vào vị trí thứ 6 của NAG. Kháng nguyên R là một chuỗi ngắn gồm các chức đường. Ví dụ: KDO - Hep - Hep - Glu - Gal - Glu - GluNAC -.

Hai chức đường là heptose và 2-keto-3-deoxyoctonoic acid (KDO) thường hiện



diện trong vùng lõi của polysaccharide. KDO là chức duy nhất lúc nào cũng hiện diện ở LPS và nó cũng được sử dụng như là chất chỉ thị cho LPS.

Hình 23.6. Cấu trúc hoàn chỉnh Lipid A, một nửa LPS của *S. typhimurium*, *S. minnesota* và *E. coli*.

Do chỉ có những biến đổi nhỏ nên vùng lõi polysaccharide là giống nhau trong tất cả các thành viên của cùng một giống vi khuẩn (ví dụ *Salmonella*). Tuy nhiên lại có sự khác biệt về cấu trúc cho các thành viên thuộc nhiều giống khác nhau của vi khuẩn Gram âm. *Salmonella*, *Shigella* và *Escherichia* có LPS tương tự nhưng lại khác nhau về vùng lõi.

23.9.3. Vùng III - chuỗi O đặc trưng

Là kháng nguyên thân hay polysaccharide O, được đính lên vùng lõi polysaccharide gồm các tiểu đơn vị oligosaccharide lặp lại, hình thành nên từ 3 đến 5 chức đường. Các chuỗi đơn lẻ này biến động về chiều dài, chúng dao động trong khoảng 40 đơn vị lặp lại. Polysaccharide O dài hơn nhân polysaccharide và nó duy trì vùng ưa nước của phân tử LPS. Yếu tố quyết định kháng nguyên chính (vị trí nổi kháng thể) của thành tế bào vi khuẩn Gram âm có trong polysaccharide O.

Có sự biến đổi lớn xảy ra trong thành phần của các chức đường ở chuỗi O giữa các loài và thậm chí ở các chủng vi khuẩn Gram âm. Ít nhất có 20 chức đường khác nhau xuất hiện và nhiều chức đường trong nhóm 20 này có duy nhất dideoxyhexose, là đặc tính tự nhiên chỉ có trong thành tế bào vi khuẩn Gram âm. Những biến đổi về hàm lượng đường của polysaccharide O góp phần làm đa dạng kiểu kháng nguyên của *Salmonella* và *E. coli* cũng như các chủng vi khuẩn Gram âm khác. Các chức đường cụ thể trong cấu trúc, nhất là các chức đường đính ở đầu cuối phản ánh tính chuyên biệt về miễn dịch của kháng nguyên O, cùng với chủng có đặc tính kiểu hình của khuẩn lạc nhẵn gọi là chủng S. Khi mất vùng chuyên biệt O do đột biến, kiểu hình khuẩn lạc của chúng sẽ trở nên ráp hay xù xì còn gọi là chủng R.

Việc làm sáng tỏ cấu trúc LPS (Hình 33.3) thì phụ thuộc hoàn toàn vào tính sẵn có của các thể đột biến, ngăn chặn một bước cụ thể trong quá trình tổng hợp LPS. Sinh tổng hợp LPS là một trình tự chặt chẽ. Khi lắp ráp một tiểu đơn vị có trình tự như sau: các chức đường được thêm vào Lipid A một cách trình tự và chuỗi bên O được thêm vào sau cùng. Đặc điểm của các thể đột biến đó là hình thành các phân tử LSP không hoàn chỉnh và chức năng sinh học được tiến hành từ nhiều phần của phân tử LPS.

Ở *E. coli* và *Salmonella*, khi làm mất kháng nguyên O dẫn đến làm mất phần gây độc, phần mất này của LPS có vai trò quan trọng trong tương tác giữa ký sinh và động vật chủ. Các thể đột biến xù xì thì dễ bị tổn thương hơn đối với sự thực bào và các phản ứng tiêu diệt khuẩn của huyết thanh.

Khi đột biến mất nhiều phần gần vùng lõi, gọi là thể đột biến xù xì nhiều (ví dụ thể đột biến Rd1, Rd2 và Re ở Hình 23.5, tạo ra các chủng nhạy cảm với các hợp chất

ky nước gồm: kháng sinh, chất tẩy, muối mật bò và tác nhân gây đột biến. Vùng này chứa một số lượng lớn các nhóm tích điện và được cho là đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì đặc tính thấm của màng ngoài.

Các đột biến trong quá trình lắp ráp Lipid A có thể làm chết vi khuẩn vì vậy vùng này là thiếu yếu cho sự sống của tế bào vi khuẩn. Vùng trong nhất của LPS gồm Lipid A và ba chức KDO cũng cần thiết cho sự sống của tế bào, có lẽ chúng được sử dụng để lắp đặt màng ngoài của tế bào vi khuẩn.

23.10. LPS và độc tính của vi khuẩn Gram âm

Cả hai Lipid A là thành phần độc của LPS và các chuỗi bên polysaccharide là phần không độc nhưng lại có tính kháng nguyên của LPS, tác động như là yếu tố quyết định độc tính ở vi khuẩn Gram âm.

23.10.1. Polysaccharide O và độc tính

Độc tính gây bệnh và đặc tính nhả đều có liên quan đến tính toàn vẹn của polysaccharide O. Sự liên quan của chuỗi polysaccharide trong gây bệnh được chứng minh bằng cách làm thay đổi nhỏ về các trình tự đường ở chuỗi bên của LPS, dẫn đến những thay đổi đáng kể về độc lực. Chuỗi bên polysaccharide liên quan đến sự biểu hiện độc tính có thể là do:

(1). Kháng nguyên chuyên biệt O có thể giúp vi sinh vật dính một cách chuyên biệt vào một số mô, đặc biệt là mô biểu bì.

(2). Chủng nhả S có lẽ kháng được sự thực bào trong khi đó các chủng đột biến R có hình dạng xù xì dễ bị thực bào nhân chìm và tiêu diệt.

(3). Polysaccharide O ưa nước có thể tác động như là chất mang tan được trong nước giúp cho Lipid A gây độc. Cấu trúc này có thể ảnh hưởng nhẹ đến khả năng liên kết với nước trên bề mặt tế bào.

(4). Kháng nguyên O có thể bảo vệ vi khuẩn thoát khỏi phản ứng gây hại do kháng thể và bổ thể gây ra. Chủng ráp R thường không gây bệnh của vi khuẩn Gram âm có nguồn gốc từ các chủng gây bệnh. Các chủng nhả S có các sợi tinh thể polysaccharide mang kháng nguyên O nhô ra bên ngoài khỏi bề mặt tế bào. Kháng nguyên O này là mục tiêu chính để kháng thể và bổ thể ở động vật chủ tấn công. Tuy

nhien khi phản ứng diễn ra tại các vị trí đỉnh đầu của chuỗi polysaccharide, thì từ các đầu đỉnh này đến bề mặt tế bào vi khuẩn luôn có một khoảng cách đáng kể, nên các đuôi bổ sung thường có hiệu ứng làm tan. Các vi khuẩn như vậy là vi khuẩn gây bệnh vì chúng kháng được miễn dịch của tế bào chủ. Nếu các chuỗi polysaccharide nhô ra này bị ngăn đi hoặc bị loại bỏ, thì phản ứng kháng thể đối với kháng nguyên trên bề mặt vi khuẩn rất gần với nó và bổ thể có thể ly giải vi khuẩn. Điều này góp phần làm mất đi tính gây bệnh của các chủng ráp.

(5). Polysaccharide O hoặc kháng nguyên O là nền tảng của sự khác nhau về kháng nguyên trong số các vi khuẩn gây bệnh Gram âm quan trọng gồm *E. coli*, *Salmonella* và *Vibrio cholerae*. Sự khác nhau về kháng nguyên đảm bảo cho sự tồn tại của nhiều kiểu huyết thanh của một vi khuẩn, vì vậy vi khuẩn có nhiều cơ hội để nhiễm vào động vật chủ nếu nó có thể vượt qua được phản ứng miễn dịch chống lại kiểu huyết thanh khác. Hơn nữa ngay cả khi các polysaccharide O là những kháng nguyên mạnh, thì chúng cũng hiếm khi khơi mào cho phản ứng miễn dịch của động vật chủ nhằm bảo vệ cơ thể chủ chống lại nội độc tố đặc trưng.

23.10.2. Lipid A và độc tính

Các hoạt tính sinh lý của LPS chủ yếu thể hiện qua trung gian thành phần Lipid A của LPS. Lipid A gây ra ứng sinh học mạnh. Chất này có thể kích thích hệ miễn dịch của động vật có vú. Trong quá trình diễn biến bệnh do vi khuẩn Gram âm, nội độc tố được phóng thích từ một phần hoặc nhiều tế bào đang nhân lên, có hiệu ứng tương tự trên động vật và góp phần đáng kể trong việc tạo ra các triệu chứng và bệnh lý của bệnh đang mắc phải.

Do Lipid A được đúc trong màng ngoài của tế bào vi khuẩn, nên nó chỉ có thể gây ra hiệu ứng độc khi được phóng thích ở dạng hòa tan từ nhiều tế bào đang nhân lên hoặc khi vi khuẩn bị phân giải do quá trình tự ly giải, do bổ thể và do phức hợp tấn công màng (MAC), do sự nuốt vào và tiêu diệt của thực bào hoặc do tác động diệt khuẩn của một số loại kháng sinh.

Khi tiêm LPS đã được tinh sạch từ các tế bào vi khuẩn Gram âm còn sống hay đã chết vào động vật thực nghiệm thì sẽ gây ra chùm các phản ứng sinh lý bệnh học

không đặc trưng như: sốt, thay đổi số lượng tế bào máu trắng, hội chứng đông máu rải rác nội mạch (DIC), chứng giảm huyết áp, sốc và chết. Khi tiêm liều tương đối nhỏ nội độc tố vào động vật có vú thì hầu hết động vật bị tiêm sẽ chết. Các chứng cứ này gây ra các trình tự biểu hiện sau: (i) giai đoạn tiềm ẩn; (ii) biểu hiện sinh lý như tiêu chảy, kiệt sức và sốc và (iii) chết. Làm thế nào mà tế bào chết nhanh khi có sự dao động về liều nội độc tố, cách thức đưa độc tố vào cơ thể và loài động vật. Các động vật thì có sự nhạy cảm khác nhau đối với nội độc tố.

Cơ chế này thì phức tạp. Ở người, LPS liên kết với protein liên kết với lipid (LBP) có trong huyết thanh, chất này được chuyển tới CD14 nằm trên màng tế bào, sau đó được chuyển đến MD2, một protein không neo vào màng có liên quan đến thụ thể 4 tương tự như Toll (TLR4). Các vị trí khởi động (trigger) này phát dòng tín hiệu đến thực bào/tế bào nội mô để tiết cytokine gây viêm và nitric oxide gây ra chứng sốc đặc trưng do nội độc tố. CD14 và TLR4 có trong một số tế bào của hệ miễn dịch tế bào, gồm các đại phân tử và tế bào tua. Ở bạch cầu đơn (monocyte) - một dạng tế bào máu trắng và đại thực bào, có ba kiểu sự kiện được nổ ra trong quá trình tương tác giữa chúng với LPS:

(1). Sản sinh cytokine, gồm IL-1, IL-6, IL-8, yếu tố gây hoại tử khối u (TNF) và yếu tố hoạt hóa tiểu cầu. Tới lượt các yếu tố này kích thích sản sinh prostaglandin và leukotriene. Đây là những chất trung gian rất mạnh, gây viêm nhiễm và gây sốc do nhiễm trùng huyết (septic shock) kèm theo đó là máu nhiễm độc (toxemia) do nội độc tố. LPS hoạt hóa các đại thực bào để tăng cường sự thực bào và độc tính tế bào (cytotoxicity). Các đại thực bào được kích thích để sản sinh và phóng thích ra enzyme lysosome, IL-1 (là yếu tố gây sốt nội tại) và yếu tố gây hoại tử khối u α (TNF alpha) cũng như cytokine và yếu tố trung gian khác.

(2). Hoạt hóa dòng thác bổ thể (Activation of the complement cascade): C3a và C5a gây phóng thích histamine (làm giãn mạch) và hiệu ứng hóa ứng động và tích lũy bạch cầu trung tính. Kết quả là gây ra chứng viêm.

(3). Hoạt hóa dòng đông máu (coagulation cascade): sự hoạt hóa ban đầu của yếu tố Hageman (là yếu tố đông máu XII) có thể làm hoạt hóa một số hệ thống

thể dịch dẫn đến các hậu quả sau:

(a). Sự đông máu (coagulation): đó dòng máu tụ đông lại, gây ra nghẽn mạch (thrombosis), gây tình trạng cấp tính do đông máu rải rác trong lòng mạch, làm tan tiểu cầu và nhiều yếu tố đông tụ dẫn đến xuất huyết nội.

(b). Hoạt hóa con đường bổ thể khác gây viêm.

(c). Hoạt hóa plasmin làm phân giải fibrin và gây xuất huyết.

(d). Hoạt hóa kinin làm phóng thích bradykinin và các peptide hoạt mạch (vasoactive peptide) khác gây chứng giảm huyết áp.

Hiệu ứng toàn phần là cảm ứng chứng viêm, đông máu nội mạch, xuất huyết và gây sốc.

LPS cũng tác động như là một nguyên phân bào B (B cell mitogen), kích thích sự biệt hóa đa dòng (polyclonal differentiation) và làm tế bào B nhân lên và kích thích tiết ra các immunoglobulin nhất là IgG và IgM.