

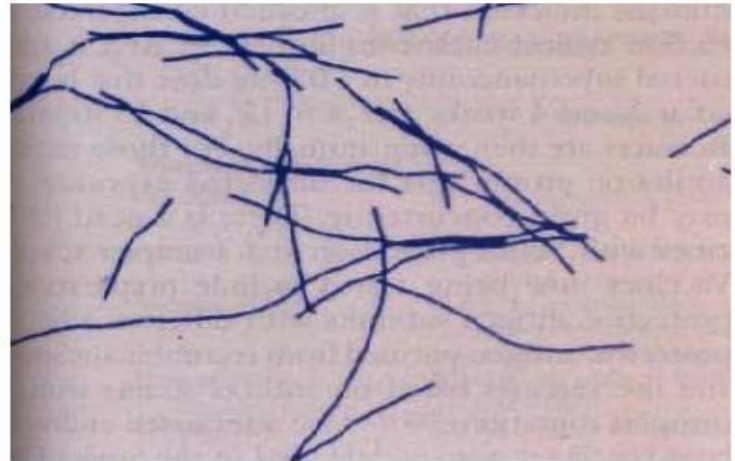
Trường ĐH Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học
Lớp DH06SH

TIỂU LUẬN:

VẮC-XIN PHÒNG BỆNH THAN DO VI KHUẨN
Bacillus anthracis

Giáo viên hướng dẫn:
PGS. TS Nguyễn Ngọc Hải

Sinh viên thực hiện:
Nguyễn Xuân Trung
MSSV:06126174



vi khuẩn *Bacillus anthracis*



1) Xuất huyết từ lỗ tự nhiên của cơ thể (hậu môn) khi bò chết đột ngột.



Tổn thương mắt do bệnh than.

VẮC-XIN PHÒNG BỆNH THAN DO VI KHUẨN *Bacillus anthracis*

I. Đặt vấn đề:

Bệnh than (hay còn gọi là bệnh nhiệt thán) là bệnh do trực khuẩn *Bacillus anthracis* (*B.anthraxis*) gây ra, gây bệnh trên gia súc và trên cả con người khi tiếp xúc với mầm bệnh. Bệnh gây nhiễm trùng và hoại tử cơ quan và có tỉ lệ tử vong cao nếu không được điều trị kịp thời. *B.anthraxis* dễ gây bệnh ở dạng bào tử và ở dạng này chúng rất khó tiêu diệt và dễ lây bệnh khi tiếp xúc. Dù bệnh ít phổ biến nhưng bệnh dễ lây lan, nguy hiểm, nguy cơ tử vong cao nên *B.anthraxis* đã trở thành một lựa chọn hàng đầu để sản xuất vũ khí sinh học khi bào tử *B.anthraxis* được cho vào những bao thư vận chuyển theo đường bưu điện gây bệnh cho người nhận (rất khó phát hiện) hay sử dụng bào tử phát tán trong không khí gây bệnh trên diện rộng bằng tên lửa, máy bay, gió. Đây là mối lo ngại lớn cho nhiều quốc gia trước những tấn công khủng bố và cuộc chạy đua chế tạo vắc-xin bệnh than hiệu quả và an toàn cho con người rất được chú trọng và hiện bệnh than chưa có thuốc đặc trị nào, bệnh chữa trị bằng các loại thuốc kháng sinh và nguy cơ có những chủng kháng thuốc. Vậy các loại vắc-xin bệnh than cho người và cho gia súc đã và đang được sản xuất như thế nào để chống lại căn bệnh nguy hiểm này? Bài tiểu luận này nhằm cung cấp một cách tổng quan về cơ sở khoa học gây bệnh của *B.anthraxis*, các cơ sở để nghiên cứu chế tạo vắc-xin bệnh than và các loại vắc-xin bệnh than đã được sản xuất.

II. Bệnh than

I.1 Bệnh than là gì?

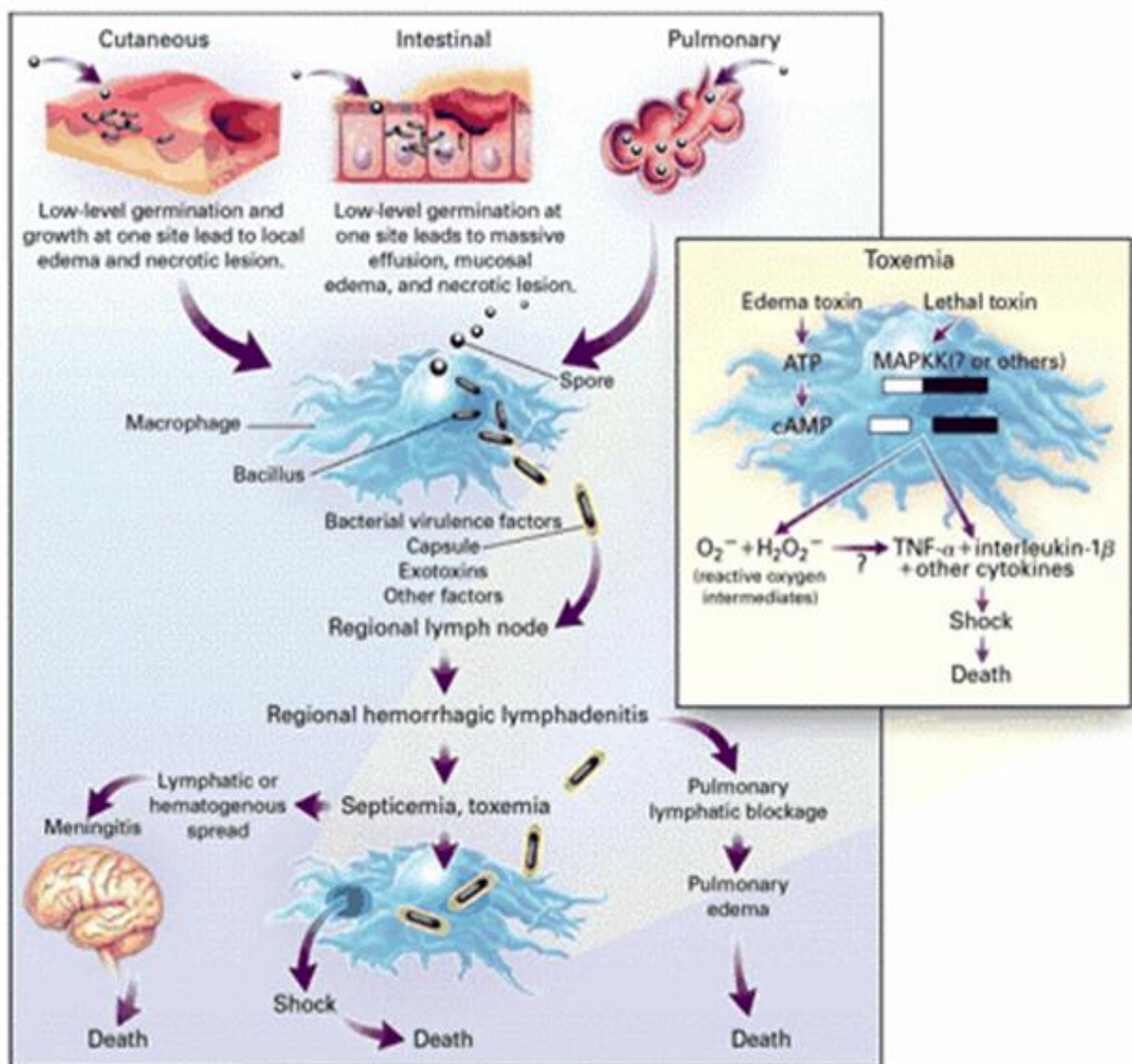
Bệnh than là bệnh hay xảy ra ở động vật có vú, đặc biệt là loài ăn cỏ. Và là bệnh có thể truyền sang người khi ăn phải thịt nhiễm bệnh hay tiếp xúc trực tiếp với bào tử *B.anthraxis*, nhưng chưa có trường hợp nào lây trực tiếp từ người này sang người khác. Dựa vào con đường xâm nhiễm của bào tử *B.anthraxis* mà ta có các dạng bệnh tích là xâm nhiễm qua vết xước trên da, qua đường hô hấp hoặc tiêu hóa. Thể bệnh ngoài da thường gặp nhất và dễ chữa. Nhiễm khuẩn do hít phải tác nhân gây bệnh có tỉ lệ tử vong gần 100% sau khi khởi phát vài ngày. Nhiễm bệnh qua đường tiêu hóa có tỉ lệ tử vong thay đổi tùy trường hợp, nhưng cũng có thể lên đến 100%. Biểu hiện lâm sàng trong các thể nặng, bao gồm sốc và đột tử, là hệ quả của tác động của phức hợp ngoại độc tố vi khuẩn. Là một bệnh hiếm gặp trong tự nhiên. Những báo cáo về các trường hợp bệnh ở người: có 18 ca bệnh than dạng phổi được ghi nhận từ năm 1900 đến 1976. năm 1979 cơ quan quân sự Sverdlovsk của Nga nghiên cứu bệnh than và rò rỉ phát tán mầm bệnh trong không khí nhiễm bệnh nhiều người và 64 người thiệt mạng. Năm 2001 những vụ tấn công khủng bố bằng những lá thư có bào tử bệnh than được gửi đến cho 22 người đàn ông và phụ nữ Hoa Kỳ, 5 người trong số họ đã chết. Ngày 29/10/2007, 20 người dân tại làng

Wolotou trên đảo Flores thuộc tỉnh Đông Nusa Tenggara, của Indonesia đã bị mắc bệnh than do ăn phải thịt trâu chết vì bệnh than. Còn một số trường hợp nhiễm bệnh được ghi nhận ở một số nước, nhiều nước có những chương trình sản xuất vũ khí sinh học từ bệnh than.

II.2 Quá trình sinh bệnh

Bệnh than khởi phát do nhiễm bào tử của *B.anthraxis*. Ở môi trường đất thích hợp, bào tử có thể tồn tại ở dạng tiềm sinh trong vài thập kỷ. Tất cả những gen độc lực của *B. anthracis* đều xuất phát từ sự nảy mầm của bào tử trong cơ thể.

Hình 1: sinh lý gây bệnh của bệnh than



Bào tử của *B.anthraxis* thâm nhập vào lớp dưới da, lớp niêm mạc tiêu hóa, khoang phế nang. Trong thể bệnh ở da và đường tiêu hóa, tại vị trí này bào tử nảy mầm ở mức độ thấp gây phù và hoại tử tại chỗ. Bào tử bị tấn công bởi đại thực bào và nảy

mầm. Đại thực bào chứa vi khuẩn di chuyển đến hạch bạch huyết khu vực. Trục khuẩn phát triển trong hạch gây viêm hạch huyết và đưa vào máu. Vi khuẩn lan truyền theo máu và hạch bạch huyết và tăng sinh gây nhiễm trùng huyết nặng. ngoại độc tố được tiết ra với nồng độ cao gây nhiễm độc và tử vong. Một số trường hợp nhiễm khuẩn toàn thân có thể gây viêm màng não. Trong thể hô hấp, viêm hạch bạch huyết quanh phế quản làm tắt dẫn lưu thông bạch huyết, dẫn đến phù phổi. Bệnh nhân có thể chết vì nhiễm khuẩn huyết, nhiễm độc hoặc biến chứng ở phổi.

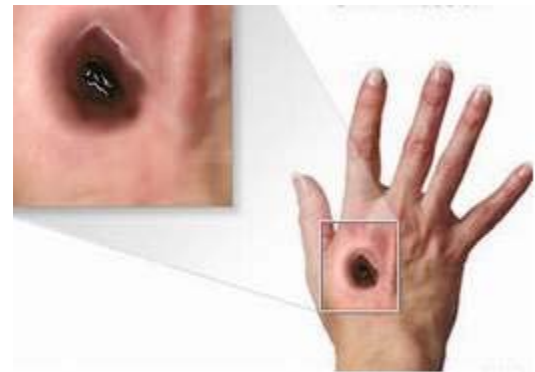
Hình nhỏ cho thấy ảnh hưởng của độc tố bệnh trên đại thực bào. Trục khuẩn bệnh than tiết ra hai ngoại độc tố tác động trên tế bào ký chủ. Độc tố gây phù là một adenat cyclase lệ thuộc calmodulin làm tăng nồng độ cAMP nội bào ở phần lớn các loại tế bào ký chủ. Điều đó làm rối loạn cân bằng nội môi gây phù nề. độc tố gây chết là một metalloprotease kềm gây tình trạng viêm ở thực bào, kích hoạt con đường chuyển hóa và phóng thích chất trung gian oxygen phản ứng và sản xuất cytokin tiền viêm như yếu tố hoại tử TNF – α và interleukin – 1 β gây sốc và tử vong.

II.3 Biểu hiện bệnh lâm sàng

Dựa vào con đường xâm nhiễm bệnh vào cơ thể mà có 3 loại bệnh than khác nhau với những biểu hiện bệnh lâm sàng khác nhau:

Bệnh than ngoài da

Chiếm 95% các trường hợp nhiễm bệnh than, thường do tiếp xúc với động vật mắc bệnh. Vị trí tổn thương thường ở đầu cổ, các chi. Tổn thương ban đầu trên da có dạng sần ngứa, không đau, xuất hiện sau khi nhiễm bào tử 3-5 ngày. Trong vòng 24-36 giờ, sẽ trở thành dạng bóng nước, bị hoại tử ở giữa, rồi khô đi để lại một vảy mực màu đen đặc trưng kèm phù chung quanh với những bóng nước đỏ tím (Hình 2). Nếu loét hoại tử có mủ, đau và bệnh nhân bị sốt chứng tỏ có bội nhiễm, thường là do tụ cầu hoặc liên cầu khuẩn (Edwards MS, 1992). Phù ở mặt, cổ thường lan rộng hơn so với phù ở thân hoặc các chi. Mặc dù là thể bệnh nhẹ, có thể khỏi mà không có biến chứng hoặc để sẹo trong 80-90% số trường hợp, nhưng cũng nên điều trị kháng sinh. Phù ác tính là biến chứng hiếm xảy ra, nhưng có thể gặp ở vùng cổ hoặc ngực kèm triệu chứng sốc và gây khó thở, đòi hỏi phải dùng corticosteroid hoặc đặt ống nội khí quản. Hình ảnh mô học của tổn thương da là hoại tử, kèm phù nề và thâm nhiễm bạch cầu lymphô. Có thể nhuộm Gram phát hiện được trục khuẩn ở mô dưới da.



Hình 2: Bệnh than da

Bệnh than đường tiêu hóa và họng-thanh quản

Bệnh than đường tiêu hóa một thể bệnh nặng. Sau khi ăn thịt động vật mắc bệnh có chứa bào tử, có thể xảy ra các triệu chứng sốt, đau bụng lan tỏa kèm hồi ứng

(rebound tenderness), táo bón hoặc tiêu chảy. Phân có màu bã cà phê hoặc lẫn máu. Sau khi khởi phát 2-4 ngày, có thể xuất hiện cổ trướng kèm với giảm đau bụng. Dịch cổ trướng có thể trong hoặc có mủ và khi cấy hoặc nhuộm Gram có thể phát hiện được *B. anthracis*. Khảo sát mô học có thể thấy trực khuẩn ở mô bạch huyết trong niêm mạc hoặc dưới niêm mạc ở vùng tổn thương; niêm mạc bị phù, hoại tử và thâm nhiễm tế bào viêm. Ngoài ra, còn thấy bằng chứng viêm bạch mạch mạc treo. Biến chứng nặng là do chảy máu, rối loạn nước điện giải và sốc. Bệnh nhân chết do thủng ruột hoặc nhiễm độc ngoại độc tố. Nếu vẫn sống sót, triệu chứng thường lui dần trong vòng 10-14 ngày (Alizad A et al., 1995).

Thể họng-thanh quản ít gặp hơn thể tiêu hóa, nhưng cũng do nuốt phải bào tử bệnh than. Những triệu chứng ban đầu gồm phù nề và sưng hạch bạch huyết vùng cổ, nuốt đau và khó thở. Có thể nhìn thấy tổn thương ở họng dưới dạng vết loét có màng giả. Thể bệnh này nhẹ và có tiên lượng tốt hơn thể tiêu hóa.

Bệnh than đường hô hấp

Thể bệnh này hiếm gặp trong tự nhiên nhưng có thể có tần suất cao trong trường hợp bào tử bệnh than được dùng làm vũ khí sinh học. Khi bào tử bệnh than được dùng dưới dạng khí dung, nó có thể lan xa trong khí quyển và thâm nhập vào đường hô hấp và gây bệnh với tỉ lệ tử vong cao. Trong vụ dịch do tai nạn tại Sverdlovsk (Liên Xô cũ) năm 1979, chỉ có 1/5 số bệnh nhân sống sót (Meselson et al., 1994). Mặc dù phổi là nơi nhiễm bào tử, nhưng bệnh than đường hô hấp không phải là viêm phổi thực thụ. Đa số trường hợp không có dấu hiệu viêm ở phổi (Abramova FA et al., 1993; Albrink WS, 1961). Trái lại, bào tử được đại thực bào phế nang bắt giữ và được đưa đến hạch bạch huyết quanh phế quản và hạch trung thất. Tại đây, chúng sẽ nảy mầm và trực khuẩn *B. anthracis* tăng sinh trong hạch bạch huyết, gây viêm bạch hạch xuất huyết, và lan đi khắp cơ thể bằng đường máu. Thời gian ủ bệnh ghi nhận được trong vụ dịch Sverdlovsk khoảng 10 ngày, nhưng triệu chứng có thể khởi phát muộn sau khi tiếp xúc đến 6 tuần. Thời gian ủ bệnh càng dài khi số lượng bào tử bị nhiễm càng ít. Triệu chứng lâm sàng ban đầu gần giống nhiễm siêu vi đường hô hấp trên với sốt, ho khan, đau cơ, mệt mỏi. Chụp X-quang lồng ngực từ đầu có thể thấy rộng trung thất (do viêm bạch hạch xuất huyết) và tràn dịch màng phổi. Sau 1-3 ngày, bệnh trở nặng với khó thở, ho the thé, rét run và có thể tử vong.

Thể viêm màng não:

Đây là một biến chứng hiếm gặp. Tổn thương bệnh học là viêm màng não xuất huyết với phù lan rộng, xâm nhiễm tế bào viêm và có trực khuẩn Gram dương ở màng não. Dịch não tủy thường có máu và vi khuẩn. Tình trạng thần kinh suy sụp nhanh và sau đó là tử vong.

II.4 Chẩn đoán và điều trị bệnh

a. Phương pháp chẩn đoán bệnh than

Xét nghiệm huyết thanh và miễn dịch học

Kháng nguyên của *B. anthracis* là các protein của lớp vỏ và các thành phần của ngoại độc tố. Kỹ thuật ELISA được sử dụng để phát hiện các thành phần độc tố và yếu tố bảo vệ kháng nguyên của *B. anthracis* đặc hiệu. Theo Sirisanthana và cộng sự (1988), các nghiên cứu huyết thanh học tại Thái Lan, kỹ thuật ELISA cho thấy độ nhạy với các độ đặc hiệu của từng nhân tố như sau: 72% đối với kháng nguyên bảo vệ (PA), 95-100% đối với kháng nguyên vỏ bọc, 42% đối với yếu tố chết (LF), và 26% đối với yếu tố phù (EF). Xét nghiệm vi ngưng kết hồng cầu gián tiếp cho kết quả tương tự như ELISA nhưng có nhược điểm là hồng cầu mẫu có tuổi thọ ngắn, khả năng lặp lại hạn chế, và mất thời gian lâu.

Xét nghiệm miễn dịch đối với ngoại độc tố bệnh than chỉ có giá trị dịch tễ học, ít có giá trị chẩn đoán trong lâm sàng, vì kháng thể xuất hiện muộn trong diễn tiến bệnh. Tuy vậy, test da với anthracin (chất trích từ một chủng *B. anthracis* giảm độc lực) có thể giúp chẩn đoán được 82% số trường hợp bệnh than sau khi khởi bệnh 1-3 ngày (Shlyakhov EN & Rubinstein E, 1996).

Hiện nay, kỹ thuật chẩn đoán mới tập trung vào việc sử dụng phản ứng PCR để khuếch đại các gen đặc hiệu hoặc các plasmid độc lực đặc hiệu của *B. anthracis*. Kỹ thuật này rất có ích để chẩn đoán sớm trên lâm sàng.

b. Điều trị bệnh

Bệnh than là bệnh do độc tố của *B. anthracis* nhưng hiện nay chưa có thuốc kháng độc tố nào để điều trị bệnh. Người bị mắc bệnh than thường được điều trị bằng kháng sinh.

Penicillin là kháng sinh chọn lọc đối với tác nhân gây bệnh, và trực khuẩn bệnh than trong thiên nhiên rất hiếm khi đề kháng với penicillin. Ngoài ra, *B. anthracis* cũng nhạy cảm với đa số kháng sinh thường dùng, ngoại trừ một số thuốc đã có bằng chứng kháng thuốc in vitro như cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, trimetoprim + sulfamethoxazole. Bảng 1 tóm tắt các thuốc điều trị bệnh than. Cần dùng thuốc đường tĩnh mạch đối với thể tiêu hóa, thể hô hấp, thể màng não, hoặc thể ngoài da nhưng có biểu hiện toàn thân, phù lan rộng hoặc tổn thương ở vùng đầu, cổ. Kháng sinh cần được dùng liên tục ít nhất là 14 ngày sau khi không còn triệu chứng. Nếu nghi ngờ kháng penicillin hoặc doxycyclin, hoặc không thử được độ nhạy cảm, thì nên dùng ciprofloxacin. Theo khuyến nghị mới đây (26/10 /2001) của Trung tâm Kiểm soát và Phòng Chống Bệnh (CDC) Hoa Kỳ, trong điều trị bệnh than thể hô hấp, ngay từ đầu nên dùng ciprofloxacin hoặc doxycyclin cộng với một hoặc hai kháng sinh khác có hoạt tính in vitro với *B. anthracis*.

Chống chỉ định cắt lọc vết loét hoại tử. Cần điều trị tăng dần để ngăn ngừa sốc nhiễm độc và rối loạn nước-điện giải, bảo đảm thông thoáng đường thở. Vì bệnh

than là bệnh do nhiễm độc nên hiện nay có đề nghị dùng liệu pháp kháng độc tố. Các thử nghiệm dùng kháng sinh trên động vật ở các giai đoạn bệnh khác nhau đã phát hiện được nguyên tắc "không quay lại" của bệnh này, nghĩa là một khi tình trạng nhiễm bệnh phát triển đến một mức nào đó, thì con vật sẽ chết cho dù có diệt sạch vi khuẩn, và những con vật được tiêm toxin gây chết tinh khiết sẽ chết y hệt như những con vật nhiễm bệnh tự nhiên (Hanna PC et al, 1993; Hanna PC et al, 1994). Mặc dù vậy, hiện vẫn chưa có chế phẩm kháng độc tố nào được sản xuất.

Bảng 1: điều trị bệnh than

| LIỆU PHÁP | LIỆU NGƯỜI LỚN | LIỆU TRẺ EM |
|------------------------------------|---|--|
| <i>Điều trị nhiễm khuẩn</i> | | |
| Penicillin V | 200 - 500 mg uống ngày 4 lần | 25 - 50 mg/kg/ngày chia uống 2-4 lần/ngày |
| Penicillin G | 8 triệu - 12 triệu đơn vị/ngày, tiêm tĩnh mạch mỗi 4-6 giờ | 100.000 - 150.000 đơn vị/kg/ngày chia ra mỗi 4-6 giờ |
| Streptomycin | 30 mg/kg/ngày tiêm bắp hoặc tĩnh mạch (có thể dùng gentamicin phối hợp với penicillin)? | |
| Tetracyclin | 250 - 500 mg, uống hoặc tiêm tĩnh mạch 4 lần/ngày | Không dùng cho trẻ em |
| Doxycyclin | Liều tải 200 mg uống hoặc tiêm tĩnh mạch, rồi dùng 50 - 100 mg mỗi 12 giờ | Không dùng cho trẻ em <9 tuổi. Trẻ =< 45 kg: 2,5 mg/kg mỗi 12 giờ Trẻ > 45 kg: dùng liều người lớn |
| Erythromycin | 250 mg uống mỗi 6 giờ | 40 mg/kg/ngày chia uống mỗi 6 giờ |
| Erythromycin lactobionat | 15 - 20 mg/kg/ngày (tối đa 4g), tiêm tĩnh mạch | 20 - 40 mg/kg/ngày, tiêm tĩnh mạch mỗi 6 giờ |
| Chloramphenicol | 50 - 100 mg/kg/ngày, uống hoặc tiêm TM mỗi 6 giờ | 50 - 75 mg/kg/ngày, chia dùng mỗi 6 giờ |
| Ciprofloxacin | 250 - 750 mg uống ngày 2 lần | 20 - 30 mg/kg/ngày, chia 2 lần |
| | 200 - 400 mg tiêm tĩnh mạch mỗi 12 giờ | Không dùng đường uống và đường tĩnh mạch cho bệnh nhân < 18 tuổi. |
| <i>Hóa dự phòng</i> | | |
| Doxycyclin | 100 mg uống ngày 2 lần trong 4 tuần | |
| Ciprofloxacin | 500 mg uống ngày 2 lần trong 4 tuần | |

Liệu pháp corticoid trong trường hợp phù nặng

Tiêu Luận Vắc-xin Phòng Bệnh Do *Bacillus anthracis*

| | | |
|--------------|--|----------------------------|
| Dexamethason | 0,75 - 0,90 mg/kg/ngày, tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm bắp, chia ra mỗi 6 giờ? | 0,25 - 0,5 mg/kg mỗi 6 giờ |
| Predison | Uống 1 - 2 mg/kg hoặc 5 - 60 mg/ngày | 0,5 - 2 mg/kg/ngày |

Ngoài ra khi người tiếp xúc với bào tử nhưng chưa có triệu chứng bị bệnh thì cần uống phòng doxycyclin hoặc ciprofloxacin ít nhất trong 6 tuần để ngăn ngừa bệnh.

Bảng 2: Điều trị dự phòng khi tiếp xúc với nguồn mầm bệnh than

| Loại trị liệu | Người lớn (kể cả thai phụ và người suy giảm miễn dịch) | Trẻ em |
|---|--|---|
| Trị liệu ban đầu | Ciprofloxacin 500 mg uống mỗi 12 giờ hoặc Doxycycline 100 mg uống mỗi 12 giờ | Ciprofloxacin 10-15 mg/kg uống mỗi 12 giờ hoặc Doxycycline 100 mg uống ngày 2 lần nếu trẻ >8 tuổi và >45 kg |
| Trị liệu tối ưu nếu vi khuẩn nhạy cảm với thuốc | Amoxicillin 500 mg uống mỗi 8 giờ hoặc Doxycycline 100 mg uống mỗi 12 giờ | Amoxicillin 500 mg uống mỗi 8 giờ nếu trẻ >20 kg; uống 40 mg/kg chia 3 lần/ngày nếu trẻ <20 kg. |

III. *Bacillus anthracis* và vắc-xin

III.1 Trục khuẩn *Bacillus anthracis*

Hệ thống phân loại *Bacillus anthracis*:

Giới : bacteria -

ngành : firmicutes -

lớp : bacilli -

bộ : bacillales -

họ : bacillaceae -

giống : bacillus -

loài : *B. anthracis*

B. anthracis là một loại trục khuẩn Gram dương, không di động và thường xếp thành chuỗi. Trong bệnh phẩm chúng thường có vỏ, không có ở dạng bào tử. Trong nuôi cấy: vi khuẩn than không có vỏ, khi gặp bất lợi thì hình thành bào tử bầu dục nằm giữa thân không làm biến dạng tế bào (mỗi vi khuẩn chỉ hình thành một bào tử). Trên môi trường thạch máu (hình 4),



Hình 3: Trục khuẩn *B. anthracis* phóng đại 1000 lần.



Hình 4: *B. anthracis* trên môi trường thạch máu

khuẩn lạc *B. anthracis* có màu trắng đến xám, đục như kính mờ, không gây tan huyết (Parry JM et al., 1983). Có thể phân lập được vi khuẩn trong máu bệnh nhân ở giai đoạn muộn, trong dịch cổ trướng, dịch màng phổi, dịch não tủy (nếu có viêm màng não). Trong trường hợp nhiễm khuẩn nặng, bệnh nhân thường chết trước khi có kết quả cấy máu, nên cần chẩn đoán vi khuẩn học sớm bằng cách dùng que thử chuyên dụng API 50 CH và API 20E để phát hiện trực khuẩn (Logan NA et al, 1985). Do tiềm năng kháng thuốc, mọi trực khuẩn đã phân lập cần được làm kháng sinh đồ.

Vi khuẩn than có thể nuôi cấy được trên môi trường thạch trong phạm vi pH và nhiệt độ thay đổi một diện rộng. Khi ở trạng thái tế bào sinh trưởng dễ bị tiêu diệt 55°C/40 ph, 80°C/1 ph. Ở trong tự nhiên *B. anthracis* thường ở dạng bào tử và có sức đề kháng cao và tồn tại rất lâu (ở trong đất tồn tại từ 20 - 30 năm). Bào tử không phân chia, không chuyển hóa và đề kháng với nhiệt, khô hạn, tia cực tím, bức xạ gamma và nhiều chất sát khuẩn (Watson & Keir, 1994). Khi bào tử tiếp xúc với điều kiện thích hợp nảy mầm và phát triển gây bệnh.

Đặt tính gây bệnh của *B. anthracis*

Nguyên nhân gây bệnh của *B. anthracis* trong cơ thể là do 2 nhân tố tạo nên toàn bộ độc lực: vỏ capsule giúp hạn chế sự thực bào của cơ thể và 3 nhân tố tạo độc tố bao gồm nhân tố bảo vệ kháng nguyên (PA) là phân tử protein khoảng 82 kDa, nhân tố gây phù (EF) và nhân tố gây chết (LF). Vỏ nang poly D-glutamic acid là nhân tố tạo nên độc lực *B. anthracis* phát triển trong cơ thể giúp hạn chế sự thực bào.

Độc lực của trực khuẩn anthracis chứa trong hai plasmid lớn, pX01 và pX02. Cả hai plasmids đều cần thiết cho toàn bộ quá trình sinh bệnh, và những dòng này chỉ chứa một plasmids thì không có khả năng gây bệnh. Plasmid pX01 (184kb) mã hoá cả ba thành phần của độc tố bệnh than, và plasmid pX02 (90kb) mã hoá cho vỏ capsule poly - D - glutamic acid.

Sự tồn tại của độc tố bệnh than được chứng minh lần đầu tiên vào năm 1955 trong những thí nghiệm chỉ ra rằng sự tiêm nhiễm cho heo kết quả là tạo sự phù cục bộ và gây chết. Nghiên cứu của các nhà khoa học Mỹ và Anh trong thập kỷ sau đó cho thấy tác nhân gây độc có ba thành phần riêng biệt và ba thành phần này không có tác dụng gây độc khi tác dụng từng nhân tố riêng rẽ. Khi tiêm nhân tố gây phù cùng với nhân tố bảo vệ kháng nguyên vào thỏ hoặc chuột lang gây nên phù cục bộ. Tiêm nhân tố gây chết và nhân tố bảo vệ kháng nguyên vào chuột sẽ gây chết trong vòng 60 phút. Nhân tố bảo vệ kháng nguyên được gọi như vậy bởi vì khi tiêm nhân tố này vào động vật thí nghiệm thì cơ thể động vật sẽ tạo đáp ứng miễn dịch bảo vệ, liên kết với tế bào thụ thể bề mặt để sản xuất một hệ thống có thể được cả hai nhân tố gây phù và gây chết để đưa vào tế bào chất gây độc. Chúng liên kết với nhau như enzyme AB. Sau khi yếu tố bảo vệ kháng nguyên gắn lên bề mặt tế bào vật chủ (gắn thành từng cụm 7 PA), nó đưa ra vị trí gắn đặt hiệu liên kết với 1 hoặc 2 nhân tố độc EF và LF xâm nhập vào tế bào. Khi chỉ có EF hoặc LF mà thiếu PA thì chúng không thể xâm nhập tế bào và gây độc.

Khi xuất hiện sự phù nề, một Calmodulin thuộc loại adenylate cyclase tăng lên rất nhiều trong tế bào so với tế bào bình thường, Calmodulin là phân tử chứa khoảng 200 vòng Adenosine monophosphate (AMP) và được cho là có liên quan trực tiếp đến sự phù nề là một dấu hiệu điển hình của bệnh than, nhân tố gây phù và nhân tố kháng nguyên bảo vệ ức chế sự thực bào trực khuẩn *B. anthracis* do tế bào bạch cầu đa nhân trong cơ thể. Và sự hoạt động của nhân tố phù nề phụ thuộc vào calmodulin nội bào.

Ở đại thực bào, độc tố gây chết LF sau khi vào trong (internalization) các thụ thể trên bề mặt tế bào làm calcium tràn vào và ức chế tổng hợp các đại phân tử. Độc tố gây chết gây ra hiện tượng chết chương trình (apoptosis) và hoại tử với các protein phosphatase dẫn đến ly giải protein trong vòng 2 giờ. Mới đây đã chứng minh được rằng LF là protease cắt amino tận cùng của mitogen-activated protein kinase kinases 1 và 2 (MAPKK1 và MAPKK2) và điều này làm bất hoạt MAPKK1 và ức chế con đường dẫn truyền tín hiệu MAPK.

Các nghiên cứu này cũng gợi ý rằng 2 trong các thành phần protein của độc tố than làm tăng sự nhạy cảm của ký chủ đối với nhiễm trùng bằng cách ức chế sự dẫn truyền tín hiệu, chức năng của bạch cầu đa nhân và đại thực bào và có tác động gây độc tế bào.

Các thí nghiệm thực hiện trên động vật cho thấy các bào tử lắng đọng ở dưới da hoặc niêm mạc của đường hô hấp hay nảy mầm ở niêm mạc ruột và dẫn đến thể dinh dưỡng nhân lên và sinh độc tố. Tổn thương khu trú tại chỗ do tác động độc tố trên vùng mô xung quanh gây hoại tử mô. Độc tố hoặc vi khuẩn hoặc cả hai có thể lan tỏa đi khắp cơ thể qua hệ thống mạch máu gây nên các triệu chứng toàn thân và các dấu hiệu nhiễm độc hoặc du khuẩn huyết (bacteremia). Vi khuẩn cũng thường bị hệ bạch huyết tóm bắt gây nên viêm hạch limphô và bệnh lý ở hạch bạch huyết.

III.2 Vắc-xin bệnh than

Tuy bệnh than là bệnh ít gặp phải nhưng ở những vùng nguy cơ cao, bệnh dễ lây, nguy hiểm và trước những nguy cơ tấn công khủng bố bằng bệnh than thì sản xuất vắc-xin thì rất cấp thiết và đang được nhiều quốc gia chú trọng.

Dựa vào những hiểu biết về trực khuẩn *B. anthracis* và cơ chế gây bệnh mà người ta sản xuất các loại vắc-xin phòng bệnh than cho người và gia súc.

Dạng vắc-xin bệnh than đầu tiên tạo ra bởi Pasteur, Toussaint and Greenfield vào năm 1881 và được sử dụng thành công to lớn trong những thử nghiệm trên cừu tại làng Pouilly-le-Fort trước dịch bệnh than. Dạng vắc-xin này từ trực khuẩn *B. anthracis* được xử lý bởi nhiệt độ. Dạng vắc-xin này còn chứa vỏ capsule, plasmid pX01 và pX02 và các thành phần của độc tố nên còn nguy hiểm. Nhưng nó cũng đã có tác dụng và cứu đàn gia súc lúc bấy giờ.



Hình 5:
vắc-xin
Stern 34
F2 phòng
bệnh than
trên gia súc

Vắc - xin Sterne

Vắc - xin Sterne được nghiên cứu và phát triển vào năm 1935. dòng vắc-xin sterne (hình 5) là dòng vắc-xin sống của dòng trực khuẩn *B.anthraxis* chỉ chứa plasmid pX01 (pX01⁺/pX02⁻), tạo ra độc tố nhưng không có vỏ bọc và do thiếu plamid pX02 và nó được sử dụng hiệu quả như vắc - xin thú y sống. Với dòng vắc-xin sterne tạo giúp cho ngành chăn nuôi không còn lo ngại trước bệnh than. Nhưng trong vắc-xin sterne còn chứa yếu tố PA, EF, LF, các yếu tố này có thể tạo phức hợp PA-EF và PA-LF có thể xâm nhập vào tế bào gây độc nên loại vắc-xin này chưa an toàn cao khi sử dụng cho con người. Một sản phẩm vắc-xin bệnh than được sử dụng cho gia súc hiện nay là một loại vắc-xin sống, đông khô, chứa nha bào nhiệt tán nhược độc chủng Stern 34 F2 có tính ổn định cao. Vắc xin an toàn, tạo miễn dịch tốt khi tiêm cho gia súc.

kháng nguyên: Mỗi liều vắc xin cho trâu bò chứa 107 nha bào nhiệt tán nhược độc chủng Stern 34 F2. Mỗi liều vắc xin cho dê, cừu, lợn chứa 5 x 10⁶ nha bào. Và chất bổ trợ của vắc-xin là sữa không kem. Vắc-xin được tiêm dưới da cho trâu bò trên 4 tháng tuổi với liều 1ml/con. Tiêm dưới da cho dê, cừu, lợn trên 3 tháng tuổi liều 0,5ml/con. Tiêm vào dưới da cổ cho gia súc với liều: bê nghé từ 6 tháng tuổi đến 1 năm: 1,5ml/con, trâu bò từ 1 năm tuổi trở lên: 2,0ml/con. Loại vắc-xin này chỉ dùng cho gia súc.

Vắc-xin dạng hút bím

Nhân tố protein PA là nhân tố được chứng minh là gây ra đáp ứng miễn dịch của cơ thể chống lại bệnh than và được các nhà khoa học nghiên cứu ứng dụng sản xuất vắc-xin bệnh than hiệu quả.

Dạng vắc-xin hút bím ANTHRAX VACCINE ADSORBED (gọi tắt là AVA) sản phẩm của hãng BIOPORT CORPORATION quân đội Mỹ có tên thương mại là BioThraxTM. Dạng vắc-xin này thì không chứa tế bào trực khuẩn, dạng huyền phù trắng sữa (khi trộn) được sản xuất từ dịch chiết nuôi cấy dòng *B.anthraxis* Sterne không có vỏ capsule do thiếu plasmid pX02 được dùng trong vắc-xin sterne.

Trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn, nhân tố PA được phóng thích trong môi trường nuôi cấy và nó được tách chiết tinh sạch để tạo thành loại vắc-xin hiệu quả cao an toàn không chứa nhân tố EF và LF. Trong sản phẩm vắc-xin ngoài PA còn chứa aluminum hydroxide, sodium chloride, benzethonium chloride, formaldehyde. Sản phẩm vắc-xin BioThraxTM được tiêm (cấp) 0.5 ml /liều đầu tiên và tiêm nhắc lại sau 2, 4 tuần và 6, 12, 18 tháng tiếp theo. Vắc-xin AVA được cấp cho quân nhân Mỹ và được chính quyền Mỹ công nhận (các loại vắc-xin bệnh than khác hầu như chưa được công nhận sử dụng cho người). Quân đội Hoa Kỳ yêu cầu quân nhân ở các vùng có nguy cơ cao chỉ được tiêm phòng ngừa bằng loại vắc-xin bệnh than được FDA cấp phép – BioThraxTM – do BioPort Corporation/Emergent Defense Operations sản xuất. Theo bộ quốc phòng, loại vắc-xin này được cơ quan Quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ chứng nhận năm 1998 và khoảng 1,8 triệu người Mỹ đã được tiêm loại vắc-xin này kể từ thời điểm đó. Có một vài tác dụng phụ hiếm gặp như nổi ban đỏ, buồn nôn, phù nề ở vị trí tiêm, chóng mặt, nhứt đầu, đau

khớp một mỗi được ghi nhận ở những người sử dụng. Và khoảng 6% các trường hợp các trường hợp này có phản ứng nghiêm trọng nguy hiểm đến tính mạng và thương vĩnh viễn và tác dụng phụ thường xảy ra ở nữ thường xảy ra hơn nam giới. Theo báo cáo của Hệ thống báo cáo sự kiện bất lợi vắc-xin (VAERS).

Vắc-xin tái tổ hợp

Nhằm tránh tối đa những sự tạp nhiễm của những yếu tố (EF, LF) gây độc cho người sử dụng ngoài yếu tố tạo đáp ứng miễn dịch của vắc-xin là PA, người ta đã tạo dòng gen tổng hợp PA và cho sản xuất PA tái tổ hợp. Điều này giúp cho vắc-xin an toàn và hiệu quả cao hơn, ổn định hơn trong cơ thể và làm cho đáp ứng miễn dịch tồn tại lâu hơn.

Vắc-xin tái tổ hợp sản xuất trên dòng vi khuẩn *B. subtilis* dòng IS53 để sản xuất kháng nguyên bảo vệ (PA) được tiến sĩ Bruce Ivins nghiên cứu sản xuất (U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fredrick, MD, USA). Ban đầu một đoạn DNA khoảng 6kb chứa gen PA trên plasmid pX01 được cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và sau đó được chuyển vào plasmid pR322 và chuyển vào trong *E. coli* (vodkin và Leppla, 1983). Từ kết quả plasmid tái tổ hợp pSE36, đoạn DNA 6kb này được nhân dòng phụ (subcloned) vào vector pUB110 (vector này có nguồn gốc *staphylococcus aureus*) và sử dụng vị trí cắt *Bam*HI. Vector tái tổ hợp thu được chuyển vào *B. subtilis* IS53 và thu được hai dòng là pPA101 và pPA102. plasmid pPA102 là plasmid sau khi chuyển đã bị mất một đoạn trình tự khoảng 4.2 kb có chứa gen tổng hợp kháng sinh kanamycin (dựa vào điều này để chọn lọc dòng tái tổ hợp pPA102). Hai dòng *B. subtilis* tái tổ hợp này đã cho tổng hợp PA ổn định có thể thu hoạch tinh sạch để sản xuất vắc-xin tái tổ hợp và dòng pPA102 được sử dụng nhiều hơn trong nghiên cứu cũng như sản xuất. Và vắc-xin tái tổ hợp dòng pPA102 đang được chờ công nhận và cho phép sử dụng trên người.

III.3 Những cải tiến vắc-xin bệnh than gần đây

Vắc-xin bệnh than dạng xịt

Theo một nghiên cứu đăng tải trên tờ *Clinical and Vaccine Immunology* và trên ScienceDaily (12 tháng 4 năm 2008) nghiên cứu của Mingtao Zeng – tiến sĩ Khoa vi trùng học và miễn dịch học thuộc trung tâm y tế trường đại học Rochester và cộng sự Qingfu Xu thuộc trung tâm y tế Rochester đã tạo ra một loại vắc-xin màng nhầy mới phòng chống bệnh than được chứng minh là có tiềm năng bảo vệ các quân nhân tốt hơn, hiệu quả hơn trước tác động của loại vũ khí sinh học phổ biến. Với loại vắc-xin mới này, các nhà nghiên cứu đã tìm cách cải tiến hai bước cùng một lúc: vừa điều chỉnh thành phần vắc-xin, vừa chuyển dạng sử dụng qua hình thức xịt đường mũi chứ không phải tiêm. Tiến sĩ Mingtao Zeng cho biết: “Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hệ thống truyền thuốc qua màng nhầy tạo ra một lớp miễn dịch thứ hai chống lại bệnh than nhờ đưa các tế bào kháng bệnh vào màng nhầy lót trong mũi cùng với màng trong máu và chỉ cần 3 liều là đủ. Điều đó cùng với thành phần vắc-xin mới được định lượng chính xác sẽ là những bước quan

trong trong cuộc đua nhằm đảm bảo cho quân đội có được sự phòng vệ chắc chắn hơn nhờ một loại vắc-xin dễ sử dụng hơn”.

Dòng vắc-xin hiện tại được cải tiến theo 2 con đường: phân phối vắc-xin qua màng nhầy và định lượng chính xác thành phần.

Cải cách vắc-xin theo con đường thứ nhất: phân phối vắc-xin qua màng nhầy.

Các lớp màng dày trong miệng, mũi, và dịch nhầy cổ họng giúp bảo vệ bề mặt những bộ phận này khi tiếp xúc với môi trường bên ngoài. Bản thân màng nhầy cũng có những tế bào kháng bệnh riêng tập trung tại mô lymphoid gắn với màng nhầy. Những tế bào này cùng họ nhưng khác biệt với tế bào miễn dịch trong máu, hạch hay lá lách.

Các nhà khoa học tin rằng **phân phối vắc-xin qua màng nhầy kích thích cả hai nhóm tế bào miễn dịch hoạt động, tạo nên phòng tuyến bảo vệ hai tầng với hiệu quả rất cao khi màng nhầy tiếp xúc trực tiếp với giao tử bệnh than.** Tiêm vắc-xin có thể chỉ kích thích hoạt động của hệ miễn dịch cơ thể. Ngoài ra, theo các nhà nghiên cứu vắc-xin màng nhầy không gây đau, nên rất tiện lợi ngay cả khi phải sử dụng nhiều liều.

Cải cách vắc-xin theo con đường thứ hai: cải tiến thành phần và định lượng chính xác. Dòng vắc-xin đang được nghiên cứu thay đổi thành phần có chứa PA và PA63 linh động về mặt sinh học với vai trò làm thành phần cấu tạo đầu tiên của vắc-xin. **Điều quan trọng nhất trong nghiên cứu chính là việc bổ sung dạng LF đã khử độc vào PA63 tạo ra phản ứng miễn dịch mạnh hơn.** Những nghiên cứu trước đó đã chứng minh các nhà khoa học có thể khử độc tố của LF bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tử để thay thế khối amino axit của nó. Dạng đột biến đã khử độc tố của LF (còn gọi là mLF) lần đầu tiên được tạo ra hơn một thập kỉ trước trong nghiên cứu của tiến sĩ Stephen H. Leppla – thuộc Phòng thí nghiệm nghiên cứu bệnh do vi khuẩn gây ra – Viện nghiên cứu dị ứng và các bệnh truyền nhiễm quốc gia (NIAID) (trực thuộc Viện y tế quốc gia).

Trong thí nghiệm, nhóm nghiên cứu của Zeng dùng 32 con chuột được chia đều thành 4 nhóm. Mỗi nhóm được xịt thuốc qua đường mũi 3 lần trong 4 tuần: nhóm một chỉ có PA, nhóm hai thuốc chỉ có mLF, nhóm ba thuốc kết hợp cả PA và mLF. Sau đó con vật được tiêm bào tử *B. anthracis* dưới da. Kết quả thu được: **tất cả những con chuột được tiêm vắc-xin hỗn hợp ở nhóm 3 (60 µg PA63/30 µg mLF) được bảo vệ hoàn toàn trước tác động của giao tử bệnh than và sống sót.** Chỉ 60% số chuột được tiêm PA63 (nhóm 1) sống sót, và 30% đối với những con được tiêm mLF (nhóm 2). Tất cả những con được tiêm dung dịch đều chết trong vòng 5 ngày sau khi tiếp xúc với giao tử gây bệnh.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, vắc-xin dạng xịt đường mũi kết hợp PA63 và mLF kích thích phản ứng kháng PA hay LF cao hơn đáng kể so với vắc-xin chỉ chứa một trong hai thành phần PA63 hay mLF cùng liều lượng (giá trị $P < 0,05$). Theo các nhà nghiên cứu, từ kết quả trên có thể kết luận rằng PA63 và mLF có tác động tương hỗ làm tăng hiệu quả của phản ứng miễn dịch. Hai loại tế bào miễn dịch, tế bào T và kháng thể, giúp hệ miễn dịch nhớ được loại vi khuẩn xâm nhập. Tỷ lệ của mỗi loại tế bào đều được theo dõi chặt chẽ.

Để biết được liệu vắc-xin màng nhầy hỗn hợp dạng xịt đường mũi có kích thích được hệ thống miễn dịch ở màng nhầy hay không, các nhà nghiên cứu đã đo tỉ lệ kháng thể chống PA và kháng thể chống LF trong nước bọt, nước mũi và các mẫu chất nhầy ở các con vật được tiêm vắc-xin. Nhóm 3 của thí nghiệm với tỉ lệ 60 µg PA63/ 30 µg mLF kích thích phản ứng của kháng thể chống PA và kháng thể chống LF cao hơn đáng kể so với vắc-xin chỉ chứa một trong hai thành phần PA63 hoặc mLF.

Bên cạnh đó, dòng vắc-xin hiện đại lấy protein làm cơ sở (cơ chế hoạt động như trong thí nghiệm) sử dụng các protein cụ thể được khử độc tính có cấu trúc tương tự protein do vi khuẩn nói chung hay vi khuẩn gây bệnh than nói riêng tạo ra (nhưng không phải tất cả) nên có mức độ an toàn cao hơn. Theo các nhà khoa học, dòng vắc-xin kết hợp mới này nên được chứng nhận để sử dụng trên người trong tương lai thì sẽ đơn giản hơn, an toàn hơn và có chi phí sản xuất thấp hơn.

Zeng cho biết: “Nghiên cứu này lần đầu tiên chứng minh rằng độc tố bệnh than chết người đã được khử độc tính có thể được sử dụng làm thành phần hiệu quả cho vắc-xin màng nhầy mà không cần thêm tá dược. Các kháng nguyên khác như đoạn hooc-môn N-BNP của nhân tố gây sưng, glycoprotein gắn với giao tử, axit poly-gamma-d-glutamic kháng vỏ và các thành phần khác của vi khuẩn B. anthracis cũng được chứng minh là có khả năng làm thành phần vắc-xin. Dòng vắc-xin trong tương lai có thể chứa một trong những yếu tố này cùng với 2 thành phần mà chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm”

Các nhà khoa học hi vọng đây là loại vắc-xin hữu hiệu chống lại bệnh than hay vũ khí sinh học từ bệnh than trong tương lai gần.

IV. Kết luận

Bệnh than, bệnh trên gia súc và trên người, với những nỗ lực sản xuất vắc-xin chống lại bệnh than ở những vùng có nguy cơ cao thì Vắc - xin Sterne được sử dụng phòng ngừa bệnh hiệu quả trên đàn gia súc với sự an toàn tương đối và giá thành không quá đắt của vắc-xin. Còn vắc-xin phòng bệnh than trên người đòi hỏi hiệu quả và sự an toàn nghiêm ngặt hơn thì loại vắc-xin hút bám AVA đã cho kết quả tốt, có thể chống lại những nguy cơ tấn công khủng bố sinh học. Và những nghiên cứu sản xuất vắc-xin bệnh than hiệu quả tốt hơn, đáp ứng miễn dịch lâu hơn, sử dụng đơn giản hơn đang được các nhà khoa học nghiên cứu và hoàn thiện.

V. tài liệu tham khảo

1. Biological Warfare and Vaccines: Anthrax
by Meryl Nass, M.D. has appeared in Infectious Disease Clinics of North America, volume 13, Number 1, March 1999.
2. Anthrax: Virulence and Vaccines *W. Edmund Farrar, MD*
Medical University of South Carolina

Charleston. 1994.

3. Vaccination against Anthrax with Attenuated Recombinant Strains of *Bacillus anthracis* That Produce Protective Antigen

JOHN P. BARNARD† AND ARTHUR M. FRIEDLANDER*

Division of Bacteriology, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, 1998.

4. Nose Spray Anthrax Vaccine Effective in Early Tests. Mingtao Zeng. 11/08/2008.

5. Anthrax Scientist Bruce E. Ivins and the History of Anthrax Vaccine. Biot Report #534: September 07, 2008

Một số địa chỉ web tham khảo trong bài báo cáo:

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/119837159/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96355/>

<http://www.patentstorm.us/patents/6316006/fulltext.html>

<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/04/080411175427.htm>